



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

**NANOPARTİKÜLLE MODİFİYE EDİLMİŞ POLİANİLİN TÜREVLİ
ENZİM ELEKTROTLARININ OPTİMİZASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

ESİYE İREM BAYRAM

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
ARALIK-2015**



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NANOPARTİKÜLLE MODİFİYE EDİLMİŞ POLİANİLİN TÜREVLİ
ENZİM ELEKTROTLARININ OPTİMİZASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

ESİYE İREM BAYRAM

KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
ARALIK-2015**

[04.12.2015]

TEZ BİLDİRİMİ

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

[ESİYE İREM BAYRAM]

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NANOPARTİKÜLLE MODİFİYE EDİLMİŞ POLİANİLİN TÜREVLİ ENZİM
ELEKTROTTLARININ OPTİMİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

ESİYE İREM BAYRAM
KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ danışmanlığında hazırlanan bu tez **04/12/2015** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ
Başkan


Doç. Dr. Gül ÖZYILMAZI
Üye


Prof. Dr. Birgül ÖZCAN
Üye

Kod No: 881


Prof. Dr. Okan ŞENER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 8681

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

NANOPARTİKÜLLE MODİFİYE EDİLMİŞ POLİANİLİN TÜREVİ ENZİM ELEKTROTLARININ OPTİMİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Bu çalışmada glukoz tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirilmiştir. Öncelikle Pt elektrot yüzeyinde sodyum okzalot (NaOx) ortamında dönüşümlü voltametri tekniğiyle poli-o-anisidin ve poli-o-toluidin sentezi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ise polimer kaplı elektrotlar glukoz oksidaz enzimi (GOD) ve ZnFe_2O_4 nanopartikülü içeren kitosan çözeltisine daldırılarak yüzeyde GOD içeren ince bir film tabakası oluşturulmuş ve son olarak elektrotlar glutaraldehit (GAL) çözeltisi ile etkileştirilerek çapraz bağlanmalarla enzimin yüzeye immobilizasyonu sağlanmıştır. Hazırlanan elektrotların glukoz duyarlılığı kronoamperometrik yöntemle 0,60 V potansiyel uygulanarak ölçülmüştür. Segment sayısı, tarama hızı, monomer derişimi, kitosan derişimi, glutaraldehit derişimi, enzim derişimi ve nanopartikül derişimi optimize edilerek en uygun elektrot tasarım parametreleri belirlenmiştir. Elde edilen tüm elektrotların glukoz duyarlı oldukları belirlenmiştir. Ayrıca ZnFe_2O_4 nanopartikül içeren elektrotların glukoz varlığında ölçülen akım değerlerinin nanopartikülsüz elektrotlara göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Elektrotlar yüzey yapısı ve biyokimyasal özellikleri açısından karakterize edilmiştir. Pt/POA/Chi+GOD/GAL, Pt/POA/Chi+GOD+ ZnFe_2O_4 /GAL, Pt/POT/Chi+GOD/GAL ve Pt/POT/Chi+GOD+ ZnFe_2O_4 /GAL elektrotların akım değerleri 1 mM glukoz derişimine kadar doğrusal olarak artmıştır. Lineweaver-Burk eğrisinden K_M değerleri ve $I_{\max}$ değerleri hesaplanmıştır. En yüksek $I_{\max}$ değeri ise POA kaplı, ZnFe_2O_4 nanopartikül içeren elektrot için elde edilmiştir.

2015, 55 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glukoz oksidaz, amperometrik biyosensör, poli(o-anisidin), poli(o-toluidin), ZnFe_2O_4 nanopartikül

ABSTRACT

OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION OF POLYANILINE DERIVED ENZYME ELECTRODES MODIFIED WITH NANOPARTICLE

In this study, a new amperometric biosensor was developed for glucose determination. Firstly, poly-o-anisidine (POA) and poly-o-toluidine (POT) synthesis was carried out in sodium oxalate (NaOx) medium using cyclic voltammetry technique on the Pt electrode surface. Then, a thin layer was constructed by dipping polymer coated electrode in Glucose oxidase (GOD) enzyme and ZnFe_2O_4 nanoparticle containing chitosan solution. Finally immobilization of enzyme on the surface was carried out via crosslinking by reacting with glutaraldehyde (GAL) solution. Glucose sensitivity of prepared electrodes was measured by chronoamperometric method applying 0,6 V potential. Optimal electrode construction parameters were determined by optimizing segment number, scan rate, monomer concentration, chitosan concentration, glutaraldehyde concentration, enzyme concentration and nanoparticle concentration. It was observed that, all obtained electrodes are sensitive to glucose. Also, it was observed that, current values measured for nanoparticle containing electrodes were higher than those of non-containing counterparts. Electrodes were characterized by surface structure and biochemical properties. Current values were increased linearly up to 1 mM glucose concentration. $I_{\max}$ and K_M values were calculated using Lineweaver-Burk plots. The highest $I_{\max}$ value was determined for POA coated and ZnFe_2O_4 nanoparticle contained Pt electrode.

2015, 55 pages

Key Words: Glucose oxidase, amperometric biosensors, poly(o-anisidine), poly(o-toluidine), ZnFe_2O_4 nanoparticles

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince beni yönlendiren ve laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü konuda fikir ve yardımlarını aldığım değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ'a sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca tezim süresince yapıcı eleştirileri ve çok değerli önerileriyle bana katkıda bulunan sayın Hocam Doç. Dr. Gül Özyılmaz'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında desteğini ve yardımını gördüğüm meslektaşım ve en yakın dostum Rağibe Hülya Abay'a ve emeği geçen Dr. Esra Yağız'a, Dr. Abdurrahman Akdağ'a, Nazan Uygun'a, Seda Ağcam'a, Taşkın Çamurcu'a teşekkür ederim.

Şu an çalışmakta olduğum Halis Yağ Gıda San. Ltd. Şti. sahibi Cemal Bulanık'a verdiği destekten dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince sabır, ilgi ve desteğini benden esirgemeyen ANNEM'e, Babam'a ve kardeşlerime sonsuz teşekkürler... |

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	19
3.1.2. Elektrokimyasal Ölçümler İçin Kullanılan Elektrotlar.....	19
3.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	19
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Elektrotların Hazırlanması ve Temizlenmesi.....	20
3.2.2. Enzim Elektrotların Oluşturulması.....	20
3.2.3. Enzim Elektrotların Glukoz Varlığında Kronoamperometrik Akım Ölçümünde Kullanımı.....	21
3.2.4. Glukoz Biyosensörün Hazırlanma Parametrelerinin Optimizasyonu.....	21
3.2.4.1. Segment Sayısının Belirlenmesi.....	21
3.2.4.2. Tarama Hızının Belirlenmesi.....	22
3.2.4.3. Monomer Derişiminin Belirlenmesi.....	22
3.2.4.4. Kitosan Derişiminin Belirlenmesi.....	22
3.2.4.5. Glutaraldehit (GAL) Derişiminin Belirlenmesi.....	22
3.2.4.6. Enzim Derişiminin Belirlenmesi.....	23
3.2.4.7. Enzim Elektrotların $ZnFe_2O_4$ Nanopartikülü ile Modifikasyonu.....	23
3.2.5. Enzim Elektrotların Karakterizasyonu.....	23
3.2.5.1. Enzim Elektrotların Dijital Fotoğraf ve SEM Görüntüleri.....	23
3.2.5.2. Enzim Elektrotların Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi.....	23
3.2.5.3. Enzim Elektrotların Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi.....	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	24
4.1. Enzim Elektrotların Oluşturulması İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi... ..	25
4.1.1. POA ve POT Sentez Koşullarının Optimizasyonu.....	25
4.1.1.1. Segment Sayısının Belirlenmesi.....	25
4.1.1.2. Tarama Hızının Belirlenmesi.....	27
4.1.2. Monomer Derişiminin Belirlenmesi.....	28
4.1.3. Kitosan Derişiminin Etkisi.....	30

4.1.4. GAL Derişiminin Etkisi.....	32
4.1.5. Enzim Derişiminin Etkisi.....	33
4.1.6. ZnFe ₂ O ₄ Nanopartikül Derişiminin Etkisi.....	34
4.1.7. Dijital Fotoğraflar ve SEM Görüntüleri.....	36
4.1.8. Optimum Koşullarda Elde Edilen CV ve Akım Değerleri.....	38
4.1.9. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi.....	43
4.1.10. Biyosensörlerin Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi.....	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	55



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bir biyosensörün genel şematik gösterimi.....	1
Şekil 1.2. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi.....	2
Şekil 1.3. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi.....	3
Şekil 1.4. Glukoz oksidaz enziminin reaksiyonu.....	5
Şekil 1.5. Biyobileşen immobilizasyonunda kullanılan yöntemler.....	5
Şekil 1.6. Glutaraldehit yapısı.....	6
Şekil 1.7. Kitosanın kimyasal yapısı.....	7
Şekil 1.8. Poli(o-anisidin) zincirinin şematik formülü.....	10
Şekil 1.9. Poli (o-toluidin) zincirinin şematik formülü.....	10
Şekil 3.1. Üç elektrot sistemi.....	21
Şekil 4.1. Biyosensör elektrotun hazırlanması.....	24
Şekil 4.2. Glukoz biyosensörün işleyiş mekanizması.....	25
Şekil 4.3. Farklı segmentler uygulanarak elde edilen POA kaplı elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri.....	26
Şekil 4.4. Farklı segmentler uygulanarak elde edilen POT kaplı elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri.....	27
Şekil 4.5. Farklı tarama hızları uygulanarak elde edilen POA kaplı elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri.....	27
Şekil 4.6. Farklı tarama hızları uygulanarak elde edilen POT kaplı elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri.....	28
Şekil 4.7. Farklı o-anisidin derişimleriyle elde edilen Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri.....	29
Şekil 4.8. Farklı o-toluidin derişimleriyle elde edilen Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri.....	30
Şekil 4.9. Farklı kitosan derişimleri ile elde edilen Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri.....	31
Şekil 4.10. Farklı kitosan derişimleri ile elde edilen Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri.....	31
Şekil 4.11. Farklı GAL derişimleri ile elde edilen Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri.....	32
Şekil 4.12. Farklı GAL derişimleri ile elde edilen Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri.....	33
Şekil 4.13. Farklı enzim derişimleri ile elde edilen Pt/POA/Chi+GOD/GAL Elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri.....	33
Şekil 4.14. Farklı enzim derişimleri ile elde edilen Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri.....	34
Şekil 4.15. Farklı nanopartikül derişimleri ile elde edilen Pt/POA/Chi+GOD+ZnFe ₂ O ₄ /GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri.....	35

Şekil 4.16. Farklı nanopartikül derişimleri ile elde edilen Pt/POT/Chi+GOD+ZnFe ₂ O ₄ /GAL elektrotların glukoz derişimine bağlı akım değerleri.....	35
Şekil 4.17. Pt/POA (a), Pt/POA/HCl (b), Pt/POA/HCl/Chi+GOD (c), Pt/POA/HCl/Chi+GOD/GAL (d) elektrotların dijital fotoğrafları.....	36
Şekil 4.18. Pt/POA (a), Pt/POA/HCl (b), Pt/POA/HCl/Chi+GOD+ ZnFe ₂ O ₄ (c), Pt/POA/HCl/GOD+ ZnFe ₂ O ₄ /GAL (d) elektrotların dijital fotoğrafları.....	36
Şekil 4.19. Pt/POT (a), Pt/POT/HCl (b), Pt/POT/HCl/Chi+GOD+ ZnFe ₂ O ₄ (c), Pt/POT/HCl/GOD+ ZnFe ₂ O ₄ /GAL (d) elektrotların dijital fotoğrafları.....	37
Şekil 4.20. Pt/POT (a), Pt/POT/HCl (b), Pt/POT/HCl/Chi+GOD+ ZnFe ₂ O ₄ (c), Pt/POT/HCl/GOD+ ZnFe ₂ O ₄ /GAL (d) elektrotların dijital fotoğrafları.....	37
Şekil 4.21. Çıplak platin elektrotun fotoğrafı (a), Pt/POA/HCl/Chi+GOD/GAL (b), Pt/POA/HCl/Chi+GOD+ZnFe ₂ O ₄ /GAL (c) elektrotların SEM görüntüleri.....	38
Şekil 4.22. Platin elektrotun 0,05 M OA+0,15 M NaO _x ortamında 20 segment uygulanarak elde edilen dönüşümlü voltagram eğrileri.....	39
Şekil 4.23. Optimum koşullarda elde edilen Pt/POA/Chi+GOD/GAL, Pt/POA/Chi+GOD+ZnFe ₂ O ₄ /GAL kaplı elektrotların farklı glukoz derişimlerinde elde edilen akım grafiği.....	40
Şekil 4.24. Platin elektrotun 0,04 M OT+0,15 M NaO _x ortamında 4 segment uygulanarak elde edilen dönüşümlü voltagram eğrileri.....	41
Şekil 4.25. Optimum koşullarda elde edilen Pt/POT/Chi+GOD/GAL, Pt/POT/Chi+GOD+ ZnFe ₂ O ₄ /GAL kaplı elektrotların farklı glukoz derişimlerinde elde edilen akım grafiği.....	42
Şekil 4.26. Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrodunun Michaelis-Menten (a) ve Lineweaver-Burk (b) eğrileri.....	43
Şekil 4.27. Pt/POA/Chi+GOD+ZnFe ₂ O ₄ /GAL elektrodunun Michaelis-Menten (a) ve Lineweaver-Burk (b) eğrileri.....	44
Şekil 4.28. Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrodunun Michaelis-Menten (a) ve Lineweaver-Burk (b) eğrileri.....	45
Şekil 4.29. Pt/POT/Chi+GOD+ ZnFe ₂ O ₄ /GAL elektrodunun Michaelis-Menten (a) ve Lineweaver-Burk (b) eğrileri.....	45
Şekil 4.30. 5 mM glukoz derişiminde Pt/POA/Chi+GOD/GAL ve Pt/POA/Chi+GOD+ ZnFe ₂ O ₄ /GAL elektrotunun tekrar kullanım kararlılığı.....	48
Şekil 4.31. 5mM glukoz derişiminde Pt/POT/Chi+GOD/GAL ve Pt/POT/Chi+GOD+ ZnFe ₂ O ₄ /GAL elktrotunun tekrar kullanım kararlılığı	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler.....	19
Çizelge 4.1. o-anisidin ve o-toluidin için Lineweaver-Burk grafiklerinden yararlanarak elde edilen K_M ve I_{max} değerleri.....	46



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

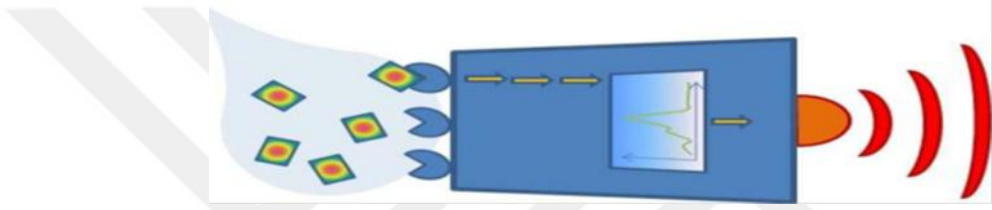
I	: Akım
$I_{\max}$	: Maksimum Akım
K_M	: Michaelis-Menten Hız Sabiti
[S]	: Substrat Derişimi
[E]	: Potansiyel Fark
Pt	: Platin

KISALTMALAR

NaO _x	: Sodyum Okzalat
N.P	: Nanopartikül
POA	: Poli(o-anisidin)
POT	: Poli(o-toluidin)
Chi	: Kitosan
GAL	: Glutaraldehit
GOD	: Glukoz Oksidaz

1. GİRİŞ

Biyosensörler, biyolojik tepkimelerde hedef analitleri belirlemek için kullanılan küçük algılayıcı cihazlardır. Birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek onu tanımadır. Bu tanıma olayının sonucunda biyokimyasal üründe oluşabilmektedir. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmekle görevlidir.



Şekil 1.1. Bir biyosensörün genel şematik gösterimi

Son yirmi yıldır, sensör alanındaki araştırma ve gelişmeler aktif araştırmacı sayısı, yayınlanmış makale ve mali destek açısından büyük bir ivmeyle artmaktadır. Bir sensörün görevi fiziksel, kimyasal, biyolojik çevre hakkında bilgi vermektir. Polimerler, fiziksel ve kimyasal özellikleri belli gereksinimler için uygun hale getirilebildiğinden sensör tasarımlarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Adhikari ve Majumdar, 2004). İletken polimerler elektronik, manyetik ve optik özelliklerinden dolayı büyük bilimsel ve teknolojik öneme sahiptirler (Retama ve ark. 2005). Özellikle elektrokimyasal depolama sistemleri, telekomünikasyon, moleküler elektronik ve sensör tasarımı gibi uygulamalarda önemleri giderek artmaktadır (Ahuja ve ark. 2007).

Biyosensörlerin çalışma sistemi, ilk önce substratın çözelti içerisinde biyosensör yüzeyine taşınması ile gerçekleşir. Substratın taşınması difüzyon, karıştırma vb. gibi çeşitli şekillerde olabilir. Substrat biyokatalizörün aktif bölgesine difüzlenir. Biyokatalizör, polimerik gözenekli membrana (selülozik diyaliz membranı gibi) emdirilmiş veya algılayıcı ile polimerik membran (selofan, selüloz asetat/nitrat, polivinil alkol, poliüretan vb) arasına sandviç edilmiş veya polimerik bir jel içinde hapsedilmiş olabilir. Bu hapsetme işlemi için poliakrilamid, jelatin, kollajen, agaroz vb. gibi doğal ve

sentetik polimerler kullanılabilir. Biyokatalizör ve substrat arasında reaksiyon meydana gelen bu etkileşim sonucu gaz molekülleri (O_2 , CO_2 , NH_3 vb.) salınabilir veya kullanılabilir, seçimli iyonlar (H^+ , NH_4^+ , diğer tek değerlikli anyon ve katyonlar) oluşabilir, ısı ortaya çıkar veya kaybolabilir, optik yoğunluk değişebilir, elektron salınabilir veya kullanılabilir. Biyokatalizör ve substrat reaksiyonu sonucu oluşan ürün algılayıcı yüzeyine taşınır. Algılayıcı yüzeyinde yukarıda bahsedilen değişimler algılanıp elektriksel devrelerle ölçülebilecek bir boyuta dönüştürülür. Ölçülen elektriksel sinyal analit derişimiyle orantılıdır. Şekil 1.2’de bir biyosensörün çalışma prensibi şematize edilmiştir.



Şekil 1.2. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi

Biyosensörlerin yüksek spesifikliğı yanında, renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir derişim aralığında doğrudan ölçmeye olanak sağlamak gibi üstünlükleri vardır. Fakat reseptör olarak adlandırılan biyobileşenlerin pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenmesi biyosensörün kullanım ömrünü kısaltmaktadır (Telefoncu, 1999).

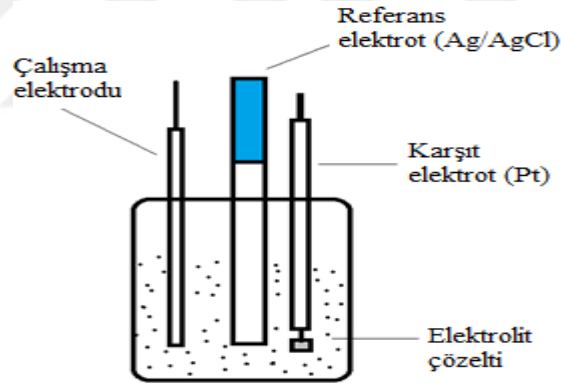
Medyatörler ve özellikleri: Medyatörler oksidoredüktazların koenzimlerinin yenilenmesinde önemli rol oynarlar. Enzim çözünmüş şekilde değilse koenzimin hareketi azalır ve elektronların elektrot ve koenzim arasında taşınması için bir medyatöre gereksinim duyulur.

Medyatörün tatmin edici bir fonksiyon gösterebilmesi için aşağıdaki özellikleri de sağlaması gerekir (Telefoncu, 1999).

- Kolay indirgenip yükseltgenebilmesi,
- Yükseltgenmiş ve indirgenmiş şeklinin kararlı olması,
- Çözeltideki oksijen ile tepkime vermemesi,
- Hücre içi uygulamalar için zararlı olmaması.

Medyatörler inert veya elektro aktif bir polimer ile immobilize edilmektedir. İyon değiştirici polimerler (nafyon gibi) ve iletken polimerler (polipirol, polianilin gibi) bu amaçla kullanılır.

Fiziksel bileşen olarak kullanılan dönüştürücüler optik, kalorimetrik, piezoelektrik ve elektrokimyasal biyosensörler olarak sınıflandırılabilir. Elektrokimyasal biyosensör türü olan amperometrik biyosensörler, genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrotunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin derişiminin bir fonksiyonu olarak tanımlanmaktadır. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görmektedir. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin derişimlerinin belirlenmesinde yararlanır.



Şekil 1.3. Amperometrik esaslı biyosensörlerin şematik gösterimi

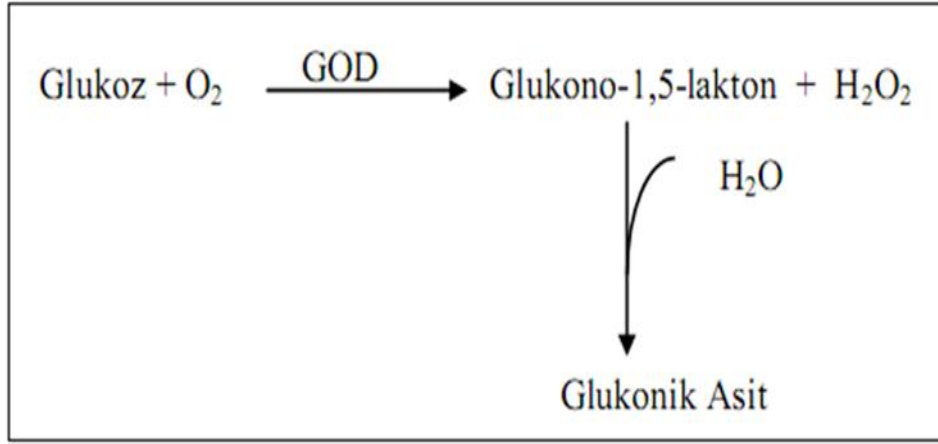
Tayin edilecek madde yükseltgeninceye (veya indirgeninceye) kadar hücreye uygulanan gerilime bağlı olarak elde edilen akımda ani bir değişim ile bir pik oluştuğu gözlenir. Pik akımının yüksekliği doğrudan elektroaktif türün derişimiyle orantılıdır. Uygun yükseltgenme (veya indirgenme) potansiyel biliniyorsa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

İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılmasının potansiyometrik sensörden en büyük farkı, ürünlerde sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir.

Bir biyosensörün biyoaktif tabakasındaki reaksiyonlar oldukça kompleks bir kinetiğe sahiptirler.

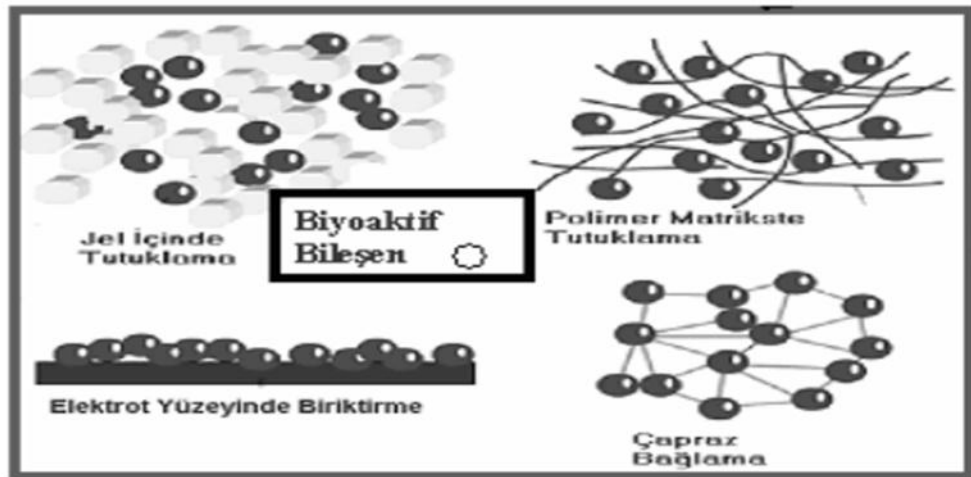
Biyobileşenler ise, analiz edilecek maddeyi dönüşüme uğratar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler dönüştürücü tarafından algılanır (Telefoncu, 1999). Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar, nükleik asitler ve biyolojik zarlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler, sensörlerde biyobileşen olarak kullanılırlar. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyobileşenlerdir. Temelde bütün biyokimyasal reaksiyonlar enzimler tarafından katalizlenir. Enzimler çok güçlü katalizörlerdir. Enzimler son derece etkilidirler. Sıradan kimyasal katalizörlere göre tepkimeleri 10^8 - 10^{11} kez daha hızlı gerçekleştirebilmektedirler. Enzimler gösterdikleri bu hıza ulaşırken pH, sıcaklık, basınç açısından oldukça ılımlı koşullarda çalışabilmeyi mümkün kılarlar. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar fazla enerji gerektirmezler. Ayrıca en kolay bulunan, en ucuz, en emniyetli çözücü olan su içerisinde çalışmak enzimler için mümkün olmaktadır. Enzimler reaksiyonun tipine ve substrata son derece spesifiktirler. Böylece yüksek verim ve çok az sayıda yan ürün meydana gelir.

Enzimler tepkimenin başlaması için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürürler. Bir enzim daima bir çeşit tepkimeyi kontrol eder. Biyosensör yüzeyi artıkça enzim aktivitesi de artar. Hücre içinde üretilebilmelerine rağmen hücre dışında da etki gösterebilirler. Enzimlerin kontrol ettiği tepkimelerin çoğu çift yönlüdür. Genellikle protein yapılı olmalarından dolayı proteinlerin etkilendiği faktörlerden etkilenirler (Telefoncu, 1986). Son yıllarda biyomedikal araştırmalarda yaygın olarak kullanılan glukoz oksidaz (GOD) (EC 1.1.3.4, β -D- glukoz: oksijen oksidoredüktaz) glukozun moleküler oksijen ile yükseltgenip glukono-1,5-lakton ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) oluştuğu reaksiyonu katalizler. Lakton sulu ortamda herhangi bir enzime ihtiyaç duymaksızın hidroliz olarak glukonik aside dönüşür. Reaksiyon aşağıdaki gibidir;



Şekil 1.4. Glukoz oksidaz enziminin reaksiyonu

Biyosensörlerde uygun biyoreseptör ve dönüştürücü seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması aşılması gereken en önemli sorundur. Bu bağlama işlemi biyoreseptör immobilizasyonu olarak tanımlanır. Bağlama işleminde çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen dönüştürücü ve biyoreseptöre göre belirlenir. Immobilizasyon biyoreseptörün kararlılığı ve tekrar kullanım açısından büyük avantaj sağlar. Biyosensör immobilizasyonunda başlıca dört yöntem kullanılmaktadır (Telefoncu, 1999).



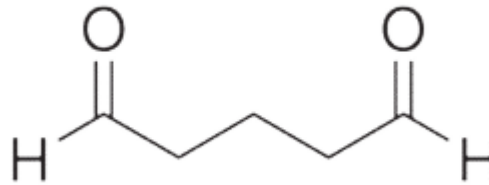
Şekil 1.5. Biyobileşen immobilizasyonunda kullanılan yöntemler

Bu yöntemler kovalent bağlama, tutuklama, çapraz bağlama ve adsorpsiyondur. Kovalent bağlama, enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilecek en önemli nokta,

bağlanmanın enzim aktivitesi için aktif merkezdeki aminoasitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların sterik engellemeye maruz kalmamasıdır. Kovalent bağlanma enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir (Telefoncu,1999). Tutuklama, biyoreseptörün bir membran veya tabaka içerisinde hapsedilmesidir. Enzimler makromoleküler yapıları proteinler olup polimer jel tabakalarda ve daha basit olarak diyaliz membranlarında tutuklanabilirler. Bu yöntem enzimler yanında organeller, hücreler ve antikolar için de uygulanabilir. Elektrokimyasal polimerleşme diğer bir tutuklama yöntemidir (Telefoncu, 1999). Çapraz bağlama yöntemi biyosensör hazırlanmasında daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde uygulanır. Çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehit, heksametilen diizosiyanat, diflorodinitrobenzen, bismaleimidoheksan, disüksinilsüberat en fazla kullanılmaktadır. İki fonksiyonlu reaktifler enzimler yanında organeller, hücreler ve antijenlerin immobilizasyonunda da uygulanmaktadır. Adsorbsiyon ise biyoreseptörün film veya tabaka ile hidrofobik, hidrofilik veya iyonik etkileşim sonucu assosiyasyonudur.

Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan biyoaktif materyallerin (enzim, hücre, doku, vb.), jelatin, kollajen, kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehit ile çapraz bağlar oluşturması esasına dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Guilbault and Kauffmann, 1987). Yöntem kolay uygulanabilir olması yanında immobilize sistemin termal ve tekrar kullanım, aynı zamanda da depolama kararlılığını artırması bakımından tercih edilmektedir.

Glutaraldehit, özellikle enzimlerin immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan biyofonksiyonel bir reaktiftir.



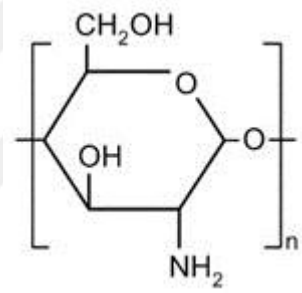
Şekil 1.6. Glutaraldehit yapısı

Glutaraldehit ile enzimlerin bağlanması genellikle nötral pH veya ona yakın bir değerde gerçekleştirilir. Reaksiyon, oda sıcaklığında kullanılan glutaraldehit miktarına

göre 1-60 dakika süresinde gerçekleştirilir. Optimal şartlar kullanılacak enzime göre değişebilir. Ayrıca enzimin aktif bölgesini korumak amacıyla glutaraldehit ile muamele edilirken ortama enzimin substratıda ilave edilebilir.

Enzimler bu şekilde bağlandıklarında jelatinsi bir yapı oluştururlar. Çok sayıda enzim molekülü diğer enzim molekülleri için matriks olarak davranır. Ancak enzimler sadece birbirlerine değil de bir matrikse de glutaraldehit ile bağlanabilirler. Bu şekilde matrikse kovalent olarak bağlanan enzim kullanım açısından çok uygundur ve uzun süre kullanılabilir (Wood, ve ark. 1982).

Enzimlerin polimer kaplı yüzeye tutuklanması için kullanılan kitosan polimeri, 1800'lü yıllardan beri incelenen bir polimer olup, son yirmi yıldır farklı uygulamalara yönelik kullanılabilirliği gündemdedir. (Albarghouthi et al., 2000; Zhang et al., 1995). Özellikle biyouyumluluğu ilaçların kontrollü salınımına ilişkin uygulamalarda bu polimeri popüler hale getirmiştir.



Şekil 1.7. Kitosanın kimyasal yapısı

Kitosan farmosötik uygulamalar dışında, film oluşturucu ajan olarak kozmetik, boya bağlayıcı olarak tekstil, güçlendirici katkı maddesi olarak kağıt sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Dodane ve ark. 1998).

Enzim elektrot modifikasyonunda, elektron tutucu etki gibi özelliklere sahip olması nedeniyle nanopartiküller kullanılmaktadır. 1970'lerden beri bilim insanları nanopartikülleri incelemekte ve özelliklerini belirlemeye çalışmaktadır. Çalışmalar başlangıçta optik ve elektronik cihazlar üzerinde yoğunlaşmışken, şimdi biyoölçümler üzerinde çok sayıda araştırma yapılmaktadır.

Nanopartiküller, nanoboyutlu malzemelerin dolayısıyla nano teknolojinin temelini oluşturmaktadır. Bu partiküller diğer ticari malzemelerden genelde farklı ve üstün kabul edilen özellikler göstermektedir. Sıkça belirtilen nanopartikül özelliklerinin çekiciliğinin günümüzde bilinen nedenleri ise; kuantum boyut etkileri, elektronik

yapısının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının benzersiz karakterleri ve yüksek yüzey/hacim oranı olarak ön plana çıkmaktadır. Nanopartikül sentezi bu yapıların sergiledikleri olağandışı özellikler sebebiyle yüksek aktiviteli katalizörler, optik uygulamalar için özel teknolojik malzemeler ile birlikte süper iletkenler, aşınmaya karşı katkılar, yüzey aktif maddeler, ilaç taşıyıcılar ve özel teşhis aletleri gibi birçok teknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanmasının yolunu açmıştır. Bunların yanı sıra, malzemelerin nanoboyut seviyesinde kontrolü nanotaşıyıcılar, sensörler, nanomakinalar ve yüksek yoğunluklu veri toplama hücreleri gibi kendine özgü işlevselliğe sahip minyatürleştirilmiş aygıtların gerçekleştirilmesine izin vermektedir.

Metalik nanopartiküller analitiksel öneme sahip bazı elektrokimyasal tepkimelerin aşırı potansiyelini düşürerek metalik elektrotlarda tersinmez olan redoks tepkimelerde tersinirlik sağlamaktadır.

Glukoz derişiminin belirlenmesi gıda işlemleri ve fermentasyonda olduğu kadar klinik, biyolojik ve kimyasal örneklerde de çok önemlidir (Yoshimura ve Hozumi 1996; Mizutani ve Yabuki 1997). Şeker hastalığının izlenmesi ve tıbbi teşhis amacıyla glukoz tayinleri yaygın olarak yapılmaktadır.

21. yüzyılın en büyük sağlık sorunlarından biri olan şeker hastalığına yakalanan hasta sayısının 2025 yılına kadar 300 milyonu bulacağı tahmin edilmekte (King ve ark. 1998) ve kan şekeri seviyelerinin düzenli olarak ölçülmesi gerekmektedir (Garg ve ark. 2004). Bu nedenle, deri altı dokularında glukoz derişimini sürekli bir değerlendirmeye tabi tutabilmek ve kandaki glukoz seviyesini belirlemek amacıyla duyarlı, seçici, güvenilir ve düşük maliyetli glukoz sensörü üretimi için giderek artan bir çaba sarfedilmektedir (Yasuzawa ve ark. 2000; Sljukic ve ark. 2006).

Elektrokimyasal analizler açısından düşünüldüğünde, glukozun da içinde yer aldığı çoğu karbohidratın, yaygın olarak kullanılan elektrotlar üzerinde yükseltgenmesi büyük bir aşırı gerilim uygulamasını gerektirdiği için kolay değildir. Bu yüzden yüksek katalitik aktiviteye sahip ve daha basit işlemler gerektiren alternatif elektrot malzemeleri bulmak için çalışılmaktadır. Bu amaca yönelik en umut verici yaklaşım modifiye elektrotların kullanımı olarak görülmektedir (Barrera ve ark. 2006). Bir elektrot yüzeyini modifiye etmek, modifiye edilmemiş yüzeyde gerçekleşmeyen bazı kimyasal özelliklerin gerçekleşmesini sağlar ve böylece elektrot yüzeyinin seçiciliğinde artma meydana gelir (Oni ve ark. 2005). Kimyasal olarak modifiye bir elektrot elde etmek için

elektrotlar çoğu zaman iletken veya yarı iletken bir malzemeyle kaplanır veya kimyasal bir modifikasyon ajanı yük transfer reaksiyonları ya da ara yüzey bağlantıları vasıtasıyla yapıya sokulur (Leznoff ve Lever 1989).

Modifiye bir elektrot elde etmek için kullanılan iletken polimerler, çeşitli elektrokimyasal özelliklerinden dolayı çok değişik alanlarda kullanılabilmektedirler. Özellikle sensörler, şarj olabilen piller, fotokimyasal hücreler, elektrokromik aletler ve iyon seçici elektrotların yapımında kullanım potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir.

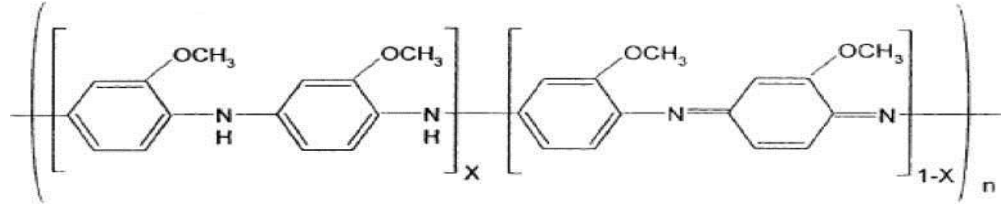
İletken polimerler kimyasal ve elektrokimyasal yöntemlerle sentezlenebilmeleri, metallere yakın elektriksel iletkenlik göstermeleri ve kolay işlenebilirliklerinden dolayı çok geniş uygulama alanına sahiptirler (Toppare, 2003).

π elektron iskeletine sahip olan iletken polimerler, elektrik iletkenliği, düşük enerjili optik geçişler, düşük iyonlaşma gerilimi ve yüksek elektron ilgisi gibi elektronik özellikleri sayesinde polimer zinciri boyunca tekli ve çiftli bağların konjugasyonu ile elektrik iletiminde rol oynamaktadırlar. Bu bağların konjugasyonu sayesinde birçok atom elektronları paylaşabilmekte ve polimer iletkenlik kazanabilmektedir.

İletken polimerler biyolojik materyallerin immobilizasyonu için uygun kompozitlerdir. Bu malzemelerin redoks özelliklerinden dolayı son yıllarda kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Enzim, elektrolit çözeltiye eklenerek elektropolimerleşme ile yüzeye yerleştirilebileceği gibi, sentezlenmiş polimer filme fiziksel ya da kimyasal olarak bağlanarak da immobilize edilebilir.

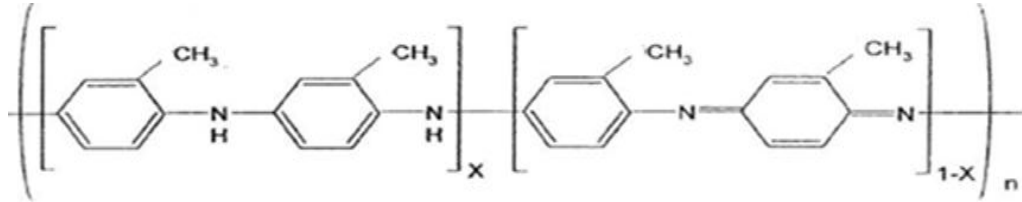
Diğer iletken polimerlere göre daha karmaşık bir yapıya sahip olan polianilin (PANI), sulu çözeltilerde ve atmosferik ortamdaki kararlılığı, monomerinin ucuzluğu, kolayca sentezlenebilmesi, yüksek elektrokimyasal aktiflik ve elektrokromik özelliği sayesinde sensör, biyosensör, şarj olabilen piller, elektrokromik ve elektronik cihazlar, metal kaplamalardaki kullanımları ile korozyon önleme gibi çok çeşitli ve önemli uygulama alanlarına sahiptir (Ozyilmaz, 2006a; Ozyilmaz ve ark., 2006b; Dispenza, 2006; Zhang, 2007; Chen, 2008). Anilin molekülünün türevlerinden biri olan o-anisidin (OA), ayrıca o-metoksi anilin (OMA) olarak adlandırılır ve kimyasal, elektrokimyasal metotlarla sentezlenir. Organik çözücülerin çoğunda polianilinin kompozitleri; polianilin içeren cihazlar ve araştırma çalışmaları üretiminde zorluklar yaratan çok düşük çözünürlüğe sahip olmasından, poli-o-anisidin ile hazırlanan kompozit malzemeler araştırma çalışmalarında daha ilginç olabilir. Çünkü, bu polimer için

gözlenen en önemli özellikler PANI'inkinden daha yüksek çözünürlüğü ve doping anyonunun kullanıldığındaki kadar iyi sentezleme koşullarına güçlü bir şekilde bağlı olan elektrokromik özellikleridir.



Şekil 1.8. Poli(o-anisidin) zincirinin şematik formülü

Diğer PANI türevlerinden olan poli(o-toluidin) (POT) ise baz yapısı amorf, hidroklorür tuz yapısı ise kısmen kristaldir (Jòzefowicz ve ark., 1991). POT'un kristal kısmının, polimer zincirinin zikzak açısını artırdığını, zincirler arası aralığı büyüttüğünü ve düzensizlik artışına rağmen $-CH_3$ gruplarının varlığının, polimer zincirindeki yığılmayı azalttığını belirtmişlerdir. POT'un birçok özelliği PANI'ya benzer fakat tek büyük farklılık POT'un emeraldin hidroklorür yapısının iletkenliğinin, PANI'nın iletkenliğinden 1000 kat daha az olmasıdır (Jòzefowicz ve ark., 1991).



Şekil 1.9. Poli(o-toluidin) zincirinin şematik formülü

Bu çalışmanın amacı, platin elektrot üzerine dönüşümlü voltametri tekniğiyle sentezlenen poli(o-anisidin) (POA) ve poli(o-toluidin) (POT) iletken polimer filmlerin üzerine kitosan polimeri içinde çözünmüş glukoz oksidaz (GOD) enziminin immobilizasyonu ve glutaraldehit ile çapraz bağlanmasıyla, glukozu duyarlı biyosensör elektrot tasarlanmaktadır. Ayrıca hazırlanan enzim elektrot, $ZnFe_2O_4$ nanopartikülü ile modifiye edilmiş ve iletkenliğe katkı yapıp yapmadığı araştırılmıştır. Optimizasyon çalışmaları yapılarak verimliliği arttırmak, üretimde kaliteyi yükseltmek, zamandan tasarruf etmek amaçlanmıştır. Bu çalışmada enzim elektrodunun

kullanımında glukoz çözeltisinde ölçülen akım değerlerinin nicel büyüklüğünü birçok parametre etkilemektedir. Bu nedenle monomer derişimi, elektrolit derişimi, tarama hızı, segment sayısı, GOD derişimi, kitosan derişimi, glutaraldehit derişimi, nanopartikül derişimi, çalışma potansiyeli gibi çeşitli parametrelerin akım değeri üzerine etkisi incelenmiştir. Yüzeyi POA veya POT ile modifiye edilmiş enzim elektrotları, SEM ve fotoğraf görüntüleri ile yapısal; CV analizleri ile elektrokimyasal; kinetik parametreleri, tekrar kullanım kararlılıkları belirlenerek biyokimyasal olarak karakterize edilmişlerdir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Zhang ve ark. (2001), osmiyum kompleks medyatörü içeren enzim sensörlü yeni bir akış enjeksiyon analit sistemi geliştirmişlerdir. Geçirgen membran üzerinde osmiyum-kompleks ve glukozoksidazın koimmobilizasyonu ve ince film tekniği kullanarak yeni bir glukoz enzim elektrotu geliştirmişlerdir. Membrandaki enzim ve medyatör bileşimini ve analitik koşulları en uygun hale getirmişlerdir. Akış enjeksiyon elektrokimyasal sistemi, 0,03 mM tayin sınırı ile 50 pL'lik örneklerden saate yaklaşık 40 örnek enjekte ederek 0,1-10 mM derişim aralığında glukozun doğrusal olarak tespit edilebildiğini göstermişlerdir. Glukoz enzim elektrotu 100'den fazla enjeksiyondan ve bir ayın üzerinde saklandıktan sonra glukozu karşı sabit cevabını korumuştur. Dizayn edilen enzim immobilize edilmiş elektrodun elektrokimyasal akış sisteminde, glukozun hızlı ve otomatik analizi için uygun olduğu anlaşılmıştır.

Xu ve ark. (2001), enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksidin 0,6 V potansiyelde amperometrik cevabı ölçülerek glukoz tayini yapmışlardır. Bu sensörün performans özelliklerini farklı monomer derişimleri ve polimerizasyon potansiyelleri ile ayrıntılı şekilde çalışmışlardır. Optimum şartlar altında hazırlanan enzim elektrot $2,5 \cdot 10^{-4}$ - $1,5 \cdot 10^{-2}$ M glukoz derişimi aralığında doğrusal bir cevap verdiğini gözlemlemişler, korelasyon katsayısını 0,997 cevap süresini 2 saniyeden daha az bulmuşlardır. 90 gün sonra enzim elektrot cevabının hiç değişmediği ve halen iyi bir kararlılığa sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

Luo ve ark. (2004), glukozun tayini için kolay hazırlanabilen ve homojen bir biyokompoziti temel alan amperometrik bir enzim elektrot hazırlamışlardır. Bu biyokompoziti chitosan hidrojel, altın parçacıkları ve glukozoksidazın direkt ve kolay elektrokimyasal tutuklanma metodlarından yararlanarak hazırlamışlardır. Enzim elektrodun cevap süresini oldukça kısa bulmuşlardır. Glukoz için tayin sınırını $2,7 \mu\text{M}$ ve elektrodun 5,0 mM ile 2,4 mM arasında ise doğrusallık sergilediğini belirlemişlerdir.

Borole ve ark. (2004), poli-o-anisidin (POA), poli-o-toluidin (POT) ve onların kopolimerleri olan poli-o-anisidin-co-o-toluidin (POA-co-POT)'i 0,10 M monomer içeren 1 M H_2SO_4 ortamında 50 mV/s tarama hızıyla -0,20 ve 1,0 V potansiyel aralığında Ag/AgCl elektrota karşı platin elektrot üzerine elektropolimerize etmişlerdir. POA, POT ve kopolimer (POA-co-POT)filmleri asetat ve fosfat tamponu içinde platin levhaya elektrokimyasal olarak depolanmış ve oluşturulan ince filmler içine tutuklama

yöntemiyle glukozoksidazı (GOD) hapsedmişler ve bir glukoz biyosensörü oluşturmuşlardır. Her iki tamponda da GOD immobilize edilmiş POA, POT, POA-co-POT polimer film kaplanmış elektrotlar için maksimum akımı pH 5,5'te ve 0,60 V potansiyel aralığında gözlemişlerdir. Amperometrik ölçümlerde fosfat tamponunun asetat tamponuna göre daha hızlı yanıt verdiğini görmüşler ve fosfat tamponunu tercih etmişlerdir. POT/GOD film kaplı elektrodun her iki tampon içinde amperometrik ölçümlerde kullanım için POA-co-POT/GOD ve POA/GOD film kaplı elektrotlara göre daha tercih edilebilir olduğu bulunmuştur.

Eftekhari (2004), demir elektrot üzerine polianilin filmin elektrodepolanmasıyla oluşturulan modifiye enzim elektrot örnekleri üzerinde çalışmıştır. Demir elektrotu pasifleştirerek anilin elektropolimerizasyonunu gerçekleştirmiştir. Elektrot yüzeyindeki pasif tabaka varlığının meydana gelen elektroaktif film üzerinde önemli etkilere sahip olduğunu belirtmiştir. Anilin elektropolimerizasyonunu GOD varlığında gerçekleştirerek enzim elektrotlarını elde etmiştir. Pasifleştirilmiş demir elektrot üzerindeki polianilin filmin daha kararlı olduğunu rapor etmiştir.

Xian ve ark. (2006), Au nanopartikül (NPs)-iletken polianilin (PANI) nanofiberlerin kompozitlerine dayanan yeni bir glukoz enzim elektrotu geliştirmişlerdir. Hidrojen peroksidin elektrokimyasal oksidasyonu ile nanokompozit yüzeyi üzerine Nafion ve glukozoksidazla immobilize edilmiş, glukozu duyarlı hassas ve seçici bir enzim elektrot geliştirmişlerdir. Glukoz enzim elektrotu için $5,0 \times 10^{-7}$ M ve 2,3 mA/M'lık eğim ve algılama kararlılığı için $8,0 \times 10^{-4}$ 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.

Ahmadlinezhad ve ark. (2009), Prusya mavisiyle modifiye edilmiş nanogözenekli altın yüzeye GOD immobilize ederek orijinal bir glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Bu çalışmada hızlı cevap veren ve 2,5 μ M gibi glukoz derişimine duyarlı amperometrik glukoz biyosensörü hazırlamışlardır. Hassasiyeti 177 μ A/mM olarak bulmuşlardır ve Michaelis-Menten sabitini 2,1 mM olarak hesaplamışlardır. Bununla beraber biyosensörün tekrar kullanım kararlılığının iyi olduğunu ve 60 gün süreyle bu kararlılığı sürdürdüğünü bildirmişlerdir. Biyosensörün antigirişim yeteneği incelenmiş; askorbik asit, ürik asit, asetaminofen gibi girişim etkisi yapan bileşiklerden çok az miktarda etkilendiği sonucuna ulaşmışlardır.

Can (2010), 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. Elektrotlar farklı glukoz derişimlerinde dönüşümlü voltametri ve doğrusal taramalı voltametri teknikleri ile karakterize edilmiştir. Elde edilen Pt/PPy-GOD_{pTS} ve Pt/PPy-GOD_{NapTS} enzim elektrotları için optimum potansiyel değerleri sırasıyla 0,70 ve 0,60 V; optimum pH değerleri ise sırasıyla 4,5 ve 7,0 olarak bulunmuştur. Glukoz derişimine bağı 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-GOD_{pTSA} ve Pt/PPy-GOD_{NapTSA} için K_M değerleri sırasıyla 5,2 ve 1,7 mM, I_{max} değerleri ise 14,2 ve 25,4 μA olarak hesaplanmıştır.

Ozdemir ve ark. (2010), glukozu tespit etmek için, altın nanopartikülleri (AuNPs)/polianilin (PANI)/AgCl/jelatin nanokompozitine dayalı piranoz oksidaz (PyOx) biyosensörü üretmişlerdir. PyOx, camı karbon elektrot üzerine yerleştirilmiş nanokompozit matriks üzerinden immobilize edilmiştir. Elektrodun yüzeyini taramalı elektron mikroskopu ile görüntülemişlerdir. Enzimatik reaksiyon süresince tüketilen oksijen miktarını amperometrik olarak -0,70 V'ta gözlemişlerdir. Elektrodu optimize ettikten sonra karakterize etmişlerdir. Biyosensörün glukozu olan duyarlılığını 0,05 ile 0,75 mM aralığında tespit etmişlerdir. Ürettikleri biyosensörleri gerçek örnek analizlerinde denemişler ve standart glukoz kitleri ile elde ettikleri sonuçlara göre kıyaslamışlardır. Sonuçta elde ettikleri biyosensörün gerçek örneklerin analizlerinde başarıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Zheng ve ark. (2010), medyatör olarak ferrosen-karbonil- β -siklodekstrin (FcCD) kompleksi ve elektron transfer düzenleyicisi olarak karbon nanotüp (CNT) kullanarak yeni bir glukoz biyosensörü yapmışlardır. Glukoz biyosensöründe FcCD kompleksi ve glukoz oksidaz (GOD), CNT'ye poli-L-Lizin(PLL) ile kovalent bağlarla bağlanmıştır. Biyosensörde glukozun elektrokatalitik oksidasyonu; başlıca girişim yapan maddeler olan ürik asit, askorbik asit ve L-Sistein'in 5 kat daha yüksek derişimini içeren gerçek numunelerde girişim etkisi bertaraf ederek, 200 mV'un altındaki düşük potansiyellerde

gerçekleştirilmiştir. Glukoz derişimlerini $1,0 \times 10^{-5}$ - $2,9 \times 10^{-3}$ aralığında doğrusal ve tayin sınırını $2,2 \times 10^{-6}$ M olarak bulmuşlardır.

Arslan ve ark. (2011), elektrokimyasal olarak polianilin-polivinilsülfanat (Pani-Pvs) filmler üzerine glukoz oksidazın immobilizasyonu ile yeni bir amperometrik glukoz biyosensörünü tutuklama tekniğıyle elde etmişlerdir. Pt elektrotun yüzeyine anilinin elektropolimerizasyonunu, polivinilsülfonat ve anilin içeren elektrokimyasal bir hücre kullanılarak sabit potansiyelde (0,75V vs. AgCl) gerçekleştirilmiştir. İlk olarak Pani-Pvs film hazırlamak için optimum çalışma koşullarını incelemişlerdir. Glukozun belirlenmesi AgCl karşı 0,40 V'de enzim olarak üretilen H_2O_2 'in oksidasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Sıcaklık ve optimum pH etkileri incelenmiş ve optimum pH değerini 7,5 olarak bulmuşlardır. Ayrıca enzim elektrotun depolama kararlılığını da çalışmışlardır. Sonuçlar 16 aktivite çalışmasından sonra akım değerlerinin % 75'inde olduğunu elirmişlerdir. Hazırlanan glukoz biyosensör 4°C'de 0,10 M fosfat tamponunda saklandığında 40 günden sonra ilk etkinliğin % 80,6 olduğunu belirlemişlerdir.

Aydoğdu (2011), glukoz tayini için çinko oksit nanopartikül ile modifiye edilmiş amperometrik enzim elektrotlar hazırlamıştır. Bu amaçla, glukoz oksidaz enzimini, karbon pasta matriks ortamına çapraz bağlanma yöntemi ile immobilize etmiştir. Glukoz tayini, enzim olarak oluşan hidrojen peroksitin Ag/AgCl'e karşı +0,40 V'da yükseltgenmesine dayanarak yapılmıştır. Hazırlanan enzim elektrotların uygun elektrot bileşimi, optimum çalışma koşulları ve performans faktörleri ve gerçek numunelerde glukoz tayininde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Çinko oksit modifiye glukoz enzim elektrodu için optimum enzim ve çinko oksit miktarı, tampon cinsi, derişimi, pH'sı ve optimum çalışma sıcaklığı sırasıyla 10 U, 10 mg, fosfat tamponu, 0,10 M, pH 7,0 ve 25°C olarak bulunmuştur. Enzim elektrodun çalışma aralığı, $1,96 \times 10^{-4}$ mM-14,49 mM arasında, cevap süresi 20 s, raf ömrü 5 ay ve tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarında elde edilen kalibrasyon eğrilerinin bağıl standart saptamaları sırasıyla % 3,27 ve % 4,53 olarak belirlenmiştir. Hazırlanan elektrodun cevabına biyolojik ortamlarda bulunan ve girişim yapabilecek türlerin etkisini incelemiştir. Serumda glukoz tayini hazırlanan çinko oksit nanopartikül modifiye karbon pasta enzim elektrotla yapılmış ve sonuçların spektroskopik yöntemle elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür.

Zhang ve ark. (2011), altın nanopartiküller (AuNPs)-glukoz oksidaz (GOD)- karbon nanotüpler-polivinil alkol biyokompozit film üzerine yeni bir glukoz biyosensör üretmişlerdir. Film de GOD'nin doğrudan elektrokimyasını gözlemlemişlerdir. 100 mV s⁻¹ tarama hızında, pH 7,0 fosfat tamponunda, -0,504 V potansiyelde yarı tersinir redoks tepe noktasını elde etmişlerdir. Elektrot ve GOD arasında doğrudan elektron iletişiminin elektron aktarım hızı 2,2 s⁻¹ olarak hesaplamışlardır. AuNPs, elektrot ve GOD'nin elektroaktif merkezi arasında elektron alışverişini kolaylaştırmada önemli rol oynamıştır. Ayrıca üretilen elektrot 16,6 µA mM⁻¹ cm⁻² yüksek duyarlılıklı, 0,5 ile 8,0 mM glukoz konsantrasyonu aralığında lineer bir amperometrik yanıt sergilemişlerdir.

Bal (2012), glukoz tayini için amperometrik enzim elektrot geliştirmişlerdir. Glukoz oksidaz enzimi, pirolün paratoluensülfonatlı ortamda elektropolimerleşmesiyle hazırlanan polipirol-paratoluensülfonat film üzerine glutaraldehitte çapraz bağlama yöntemiyle immobilize etmişlerdir. Bu amaçla önce polipirol-paratoluensülfonat filminin en uygun çalışma şartlarını belirlemişlerdir. Glukoz tayini, hazırlanan enzim elektrodun yüzeyinde gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksitin 0,30 V'da yükseltgenmesine dayanarak yapmışlardır. Enzim elektrodun glukoz için doğrusal çalışma aralığı 1,0x10⁻⁴-7,5x10⁻² M olarak tespit etmişlerdir. İmmobilize edilen glukoz oksidazın K_M ve V_{maks} değerlerini sırasıyla 0,267 mM ve 4,048 mM olarak hesaplamışlardır. Enzim elektrodun optimum pH değeri 7,5 optimum sıcaklık değerini ise 55 °C olarak bulmuşlardır. Enzim elektrodun 16 ölçüm sonunda aktivitesini % 68 oranında koruduğunu gözlemlenmişlerdir ve 7 hafta sonunda başlangıç amperometrik cevabının %53'ünü koruduğunu görmüşlerdir. Hazırlanan enzim elektrotla biyolojik sıvıda (kan) glukoz tayini yapmışlardır. Biyolojik ortamlarda olabilecek girişimlerin enzim elektrot cevabı üzerine etkilerini incelemişlerdir.

Jung ve ark. (2012), ZnO-nanotel tabanlı glukoz biyosensörler, ZnO nanotellere bağlı bir bağlayıcı üzerine glukoz oksidaz (GO_x) üretmişlerdir. Farklı bağlama maddeleri ZnO nanotellere GOD'nin bağlanmasını artırmak için (3-aminopropil)trimetoksisilan (APTMS), (3-aminopropil)trietoksisilan (APTES) ve (3-aminopropil)metildietoksisilan (APS) kullanmışlardır. ZnO nanoteller üzerine GO_x immobilizasyon miktarı, duyarlılık, performans, her biyosensörün Michaelis-Menten sabiti ve biyosensör sayesinde elektron transfer direnci, ZnO nanotel-tabanlı biyosensör üzerine birleştirme maddesinin etkilerini araştırmak için tümünü ölçmüşlerdir. Farklı

biyosensörler arasında APS ile muamele edilmiş biyosensör en yüksek duyarlılığa ($17,72 \mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$) ve en düşük Michaelis Menten sabitine ($1,37 \text{ mM}$) sahip olduğunu bulmuşlardır. ZnO nanotellere APS muamele edildiğinden bu yana biyosensörle elektron transfer direnci ve C-N grupların en büyük sayısını göstermiştir. Bu özellikler APS ile muamele edilen glukoz biyosensörlerin performansında önemli faktörlerdir.

Zhao ve ark. (2012), özel modifiye malzemeler olarak fosfonik asit-fonksiyonlandırılmış silika nanopartiküller (PFSi NPs) kullanılarak hazırlanan amperometrik biyosensör için etkili bir strateji hazırlamışlardır. Böyle bir stratejinin, glukoz oksidaz (GOD) fosfonik asit fonksiyonlandırılmış silika nanopartiküller (PFSi NPs)'in varlığında glukoz biyosensör üretmek için model protein olarak seçmişlerdir. PFSi NPs, camı karbon (GC) elektrot yüzeyine ilk olarak modifiye etmişlerdir. Sonra GOD'yi daldırma-kaplama ile PFSi NPs üzerine adsorbe etmişlerdir. PFSi NPs nükleer manyetik rezonans (NMR) spektrumu ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile karakterize edilmiştir. GOD ile PFSi NPs'in etkileşimi dairesel dikroizm spektroskopisi (CD) ile incelenmiştir. Sonuçlara göre PFSi NPs GOD'nin temel doğal yapısını muhafaza ettiğini bahsetmişlerdir. (PFSi NPs)/GC elektrot üzerine GOD'nin doğrudan elektron transferi glukozun oksidasyonu için mükemmel elektrokatalitik etkinlik sergilediğini gözlemişlerdir. PFSi NPs ile önerilen modifiye biyosensör $2,44 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($S/N=3$)'ün düşük algılama limiti ve $5,00 \times 10^{-4}$ 'den $1,87 \times 10^{-1} \text{ M}$ geniş glukoz konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu, glukozu karşı hızlı amperometrik yanıt sergilemiştir. Ayrıca biyosensörün birçok gerçek örnekte glukoz konsantrasyonunun değerlendirilmesi için kullanılabilir olduğunu belirtmişlerdir (bağıl hata $< 3\%$). PFSi NPs ile modifiye edilmiş GOD biyosensörün, iyi performansı ve basit üretim metodu gelecekteki pratik uygulaması ve temel anlama sahip olabileceğini belirtmişlerdir.

Wang ve ark. (2012), kitosan (CS)- glukoz oksidaz (GOD) film ve gümüş nanoteller (AgNWs) üzerine bir amperometrik glukoz biyosensör üretmişlerdir. Üretim süreci taramalı elektron mikroskobu tarafından karakterize edilmiş ve biyosensörün elektrokimyasal davranışları dönüşümlü voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile karakterize etmişlerdir. Optimum koşullar altında, üretilen biyosensör $10 \mu\text{M}$ 'dan 8 mM aralıkta doğrusal, $2,83 \mu\text{M}$ tayin sınırı ile glukoz

saptanabilmiştir. Glukoz biyosensör yüksek duyarlılık, hızlı yanıt ve iyi stabilite göstermiştir.

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

Yağız (2015), bu çalışmada karbon pasta elektrot (CPE) yüzeyine dönüşümlü voltametri tekniği ile polianilin (PANI), poli(o-anisidinin) (POA) ve poli(anilin-ko-o-anisidin) (PANI-co-POA) sentezlenerek üzerine glukoz oksidaz (GOD) enziminin immobilizasyonu ile amperometrik biyosensör tasarımı gerçekleştirmişlerdir. Glukoz varlığında ölçülecek akım değerleri ve deneysel parametreleri yanıt yüzey yöntemi (YYY) ile optimize etmişlerdir. Bunun için State Ease Design Expert 8.0.7.1. (Seri No 0021-6578) bilgisayar programını kullanmışlardır. CPE, karbon pasta içerisine MWCNT, iyonik sıvı veya organik bileşik ilavesi ile modifiye edilmiş, en yüksek akım değerini 1(2-siyanoetil) pirol ile hazırlanan elektrotlar göstermişlerdir. Elde edilen veriler ışığında, Design Expert programı çalışılan parametreler cinsinden akım değerinin tahmin edilmesinde çoğunlukla kuadratik modeli önermişlerdir. Çalışmada deneysel olarak ölçülen akım değerleri ile model tarafından tahmin edilen değerler birbirine oldukça yakın bulunmuş ve model uygunluğu ANOVA testi ile desteklenmişlerdir. Optimal koşullarda oluşturulan polimer kaplı elektrotların yüzeylerine GOD+invertaz ve GOD+ β -galaktozidaz enzimlerinin koimmobilizasyonu ile sırasıyla sükroz ve laktoz biyosensörler oluşturmuşlardır. CPE esaslı biyosensörlerin glukoz, sükroz ve laktoza duyarlı olduklarını CV ve impedans analizleri ile göstermişlerdir. Ayrıca, kinetik parametreler açısından PANI, tekrar kullanım ve depolama kararlılıkları bakımından PANI-co-POA esaslı biyosensörlerin kullanımının daha uygun olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan o-anisidin (Merck), o-toluidin (Fluka), sodyum okzalat (Fluka), kitosan (Aldrich), *Aspergillus niger* kaynaklı glukoz oksidaz enzimi (G-0543,429 U.mg⁻¹, 24 mg. ml⁻¹) (Sigma), glutaraldehit (Sigma), demir çinko oksit (<100 nm) (Aldrich), glukoz (Aldrich), fosforik asit (Sigma), hidroklorik asit (Merck) firmalarından tedarik edilmiştir.

3.1.2. Elektrokimyasal Ölçümler İçin Kullanılan Elektrotlar

Karşıtl Elektrot: 0,09 cm² yüzey alanına sahip platin levha kullanılmıştır.

Çalışma Elektrotu: 0,09 cm² yüzey alanına sahip platin levha kullanılmıştır.

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

3.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler

Cihazlar	Marka
Elektrokimyasal Analiz Cihazı	CHI 606 C
Elektrokimyasal Analiz Cihazı	CHI 660 B
İletkenlik Cihazı	Electronic Digital Micrometer
Dijital Fotoğraf Makinesi	Canon Ultrasonik EF 100 nm
Analitik Terazî	RADWAG
pH metre	Hanna
SEM	Jeol JSM-5500

Sonikatör	Bandelin
Etüv	Wise Ven
UV-Görünür Bölge Spektrofotometresi	Perkin Elmer

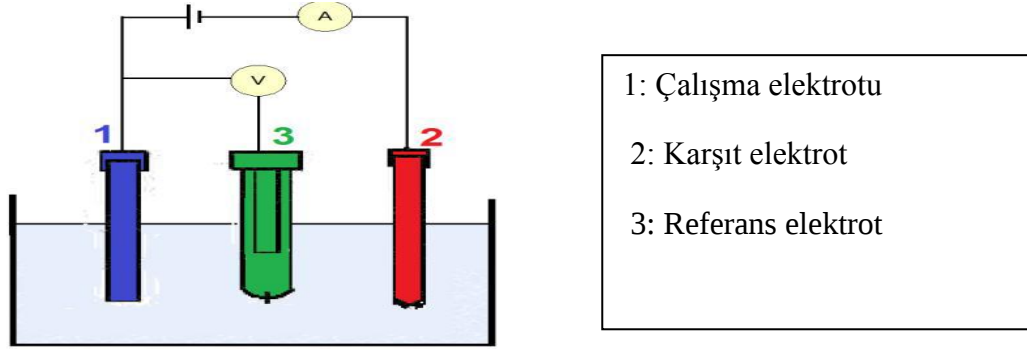
3.2. Yöntem

3.2.1. Elektrotların Hazırlanması ve Temizlenmesi

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

3.2.2. Enzim Elektrotlarının Oluşturulması

Temizlenen elektrotların yüzeyine homopolimer filmlerin sentezi 0,05 M o-anisidin veya 0,04 M o-toluidin 0,15 M sodyum okzalat (NaOx) ortamında taze olarak oda sıcaklığında hazırlanmıştır. Monomerler sentezden önce damıtılmış ve buzdolabında muhafaza edilmiştir. Polimer film sentezleri oda sıcaklığında dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak tek hücrede üç elektrot sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Sentezin gerçekleştiği tek hücreli üç elektrot sistemi şematik olarak 3.1.'de görülmektedir. 1 no'lu elektrot; çalışma elektrotu olarak kullanılan platin elektrot, 2 no'lu elektrot; karşıt elektrot olarak kullanılan platin elektrot, 3 no'lu elektrot ise referans elektrot olarak kullanılan Ag/AgCl elektrottur.



Şekil 3.1. Üç elektrot sistemi

Polimer filmler optimum koşullar sonucu, poli(o-anisidin) (POA) sentezi 0,15 M NaO_x ortamında 0,35 – 1,50 V potansiyel aralığında 50 mV/s tarama hızı ile 20 segment, poli(o-toluidin) (POT) sentezi ise 0,15 M NaO_x ortamında 0,20–2,00 V potansiyel aralığında 50 mV/s tarama hızı ile 4 segment uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Polimer film ile kaplanan platin elektrotlar 1 M HCl çözeltisinde 1 saat bekletildikten sonra saf su ile yıkanmıştır. Ardından GOD içeren kitosan çözeltisine 15 saniye daldırılmıştır. Elektrotlar 1 saat kurutulduktan sonra son olarak glutaraldehit (GAL) çözeltisine 5 saniye daldırılmış ve 20 saat buzdolabında bekletilmiştir. Ayrıca kitosan çözeltisinin içerisine ZnFe_2O_4 nanopartikülü kullanılarak nanopartiküllü ve nanopartikülsüz elektrotlar hazırlanmıştır.

3.2.3. Enzim Elektrotların Glukoz Varlığında Kronoamperometrik Akım Ölçümünde Kullanımı

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

3.2.4. Glukoz Biyosensörün Hazırlanma Parametrelerinin Optimizasyonu

3.2.4.1. Segment Sayısının Belirlenmesi

Pt elektrot yüzeyine dönüşümlü voltametri tekniğiyle POA ve POT sentezi için uygulanacak segment sayısının optimizasyonu yapılmıştır. Monomer derişimi, uygulanan potansiyel aralık sabit tutularak POA sentezi için 10-20-30 segment, POT

sentezi için 2-4-6 segmet uygulanarak Pt elektrot yüzeyi polimerle kaplanmıştır. Bu elektrotlarla oluşturulan biyosensörlerin glukozla bağlı akım değerleri kronoamperometrik olarak belirlenmiş ve en uygun segment sayısı seçilmiştir.

3.2.4.2. Tarama Hızının Belirlenmesi

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

3.2.4.3. Monomer Derişiminin Belirlenmesi

POA sentezinde elektrolit ortamdaki o-anisidin monomer derişimi 0,03 ile 0,08 M aralığında değiştirilmiştir. Diğer şartlar sabit tutularak elde edilen elektrotların glukoz derişimine bağlı akım değerleri, kronoamperometrik yöntemle belirlenmiştir. Ölçülen akım değerlerine göre en uygun monomer derişimi belirlenmiştir. POT sentezi için aynı çalışma 0,04-0,07 M OT derişim aralığı için tekrarlanmıştır.

3.2.4.4. Kitosan Derişiminin Belirlenmesi

POA veya POT kaplı elektrotlar aynı derişimde GOD içeren % 0,5 - 1,0 arasında kitosan derişimleri kullanılarak enzim elektrotlar oluşturulmuştur. Her elektrot için kronoamperometrik metodla glukoz derişimine bağlı akım değerleri ölçülmüş ve akım değerlerine göre en uygun kitosan derişimi seçilmiştir.

3.2.4.5. Glutaraldehit (GAL)Derişiminin Belirlenmesi

POA veya POT kaplı elektrotların % 0,025 - 0,100 arasında GAL derişimleri kullanılarak enzim elektrotlar oluşturulmuştur. Her elektrot için kronoamperometrik metodla glukoz derişimine bağlı akım değerleri ölçülmüş ve optimum GAL derişimi belirlenmiştir.

3.2.4.6. Enzim Derişiminin Belirlenmesi

POA ve POT için 1-4 mg/ml arasında enzim derişimleri kullanılarak enzim elektrotlar oluşturulmuştur. Her elektrot için kronoamperometrik metodla glukoz derişimine bağı akım değerleri ölçölmüş ve optimum GOD enzim derişimi belirlenmiştir.

3.2.4.7. Enzim Elektrotların $ZnFe_2O_4$ Nanopartikölü ile Modifikasyonu

Enzim elektrotlar, hazırlanma aşamasında kitosan çözeltisine GOD ile beraber $ZnFe_2O_4$ nanopartikülleri eklenerek modifiye edilmiştir. Daha önce belirlenen optimal şartlarda hazırlanan POA kaplı elektrot için 0,5-2,0 mg/ml aralığında, POT kaplı elektrot için ise 0,5-4,0 mg/ml aralığında olacak şekilde farklı miktarlarda $ZnFe_2O_4$ nanopartikülleri eklenerek optimizasyon yapılmıştır. En uygun metal oksit nanopartiköl miktarının belirlenmesi için glukoz derişimine bağı akım değerleri karşılaştırılmıştır.

3.2.5. Enzim Elektrotların Karakterizasyonu

3.2.5.1. Enzim Elektrotların Dijital Fotoğraf ve SEM Görüntüleri

POA veya POT kaplı, nanopartiköllü ve nanopartikölsüz elektrotların (Pt/POA/Ch₁+GOD/GAL, Pt/POA/Ch₁+GOD+ $ZnFe_2O_4$ /GAL, Pt/POT/Ch₁+GOD/GAL ve Pt/POT/Ch₁+GOD+ $ZnFe_2O_4$ /GAL) dijital fotoğraf makinesi ile fotoğrafları çekilmiş ve elektrot yüzeyi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntölenmiştir.

3.2.5.2. Enzim Elektrotların Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Çalışılan glukoz çözelti derişim aralığı 0,2 ile 3,0 mM arasında seçilmiştir. Her iki elektrot için optimum potansiyeller uygulanarak ölçüm alınmış ve Lineweaver - Burk eğrilerinden I_{max} ve K_M değerleri hesaplanmıştır.

3.2.5.3. Enzim Elektrotların Tekrar Kullanım Kararlılıklarının Belirlenmesi

Biyosensör elektrotların tekrar kullanım kararlılıkları optimum çalışma koşullarında 5,0 mM glukoz çözeltisinde ardışık olarak 20 defa akım değerleri ölçölerek belirlenmiştir.

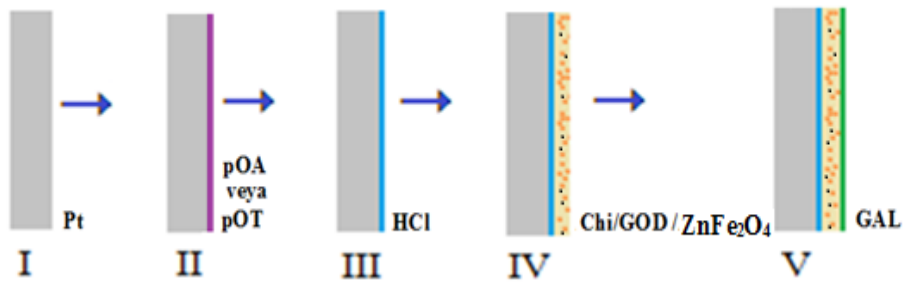
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu çalışmada Pt elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak poli(o-anisidin) (POA) ve poli(o-toluidin) (POT) sentezi sodyum okzalat (NaO_x) ortamında gerçekleştirilmiştir. Her iki polimer türünün sentezi için potansiyel aralığı, segment sayısı, tarama hızı, monomer derişimi ve enzim elektrotların hazırlanma aşamasında kitosan derişimi, glutaraldehit derişimi, enzim derişimi ve nanopartikül derişimi optimize edilmiştir.

Pt elektrot yüzeyine POA veya POT sentezi elektrokimyasal olarak NaO_x ortamında gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen polimerlerin iletkenliğini arttırmak için 1 M hidroklorik asit (HCl) ile doplama yapılmıştır. Daha sonra elektrot yüzeyi glukozoksidaz (GOD) enzimi ve çinko demir oksit (ZnFe_2O_4) nanopartikül içeren kitosan (chi) çözeltisine daldırılarak enzim ve nanopartikül tutuklanmıştır. Ardından elektrot yüzeyi glutaraldehit (GAL) çözeltisi ile muamele edilerek enzim bünyesinde bulunan amino grupları arasında çapraz bağlar oluşturulmuştur.

Şekil 4.1'de biyosensör elektrotun aşamalı olarak nasıl hazırlandığı gösterilmiştir.

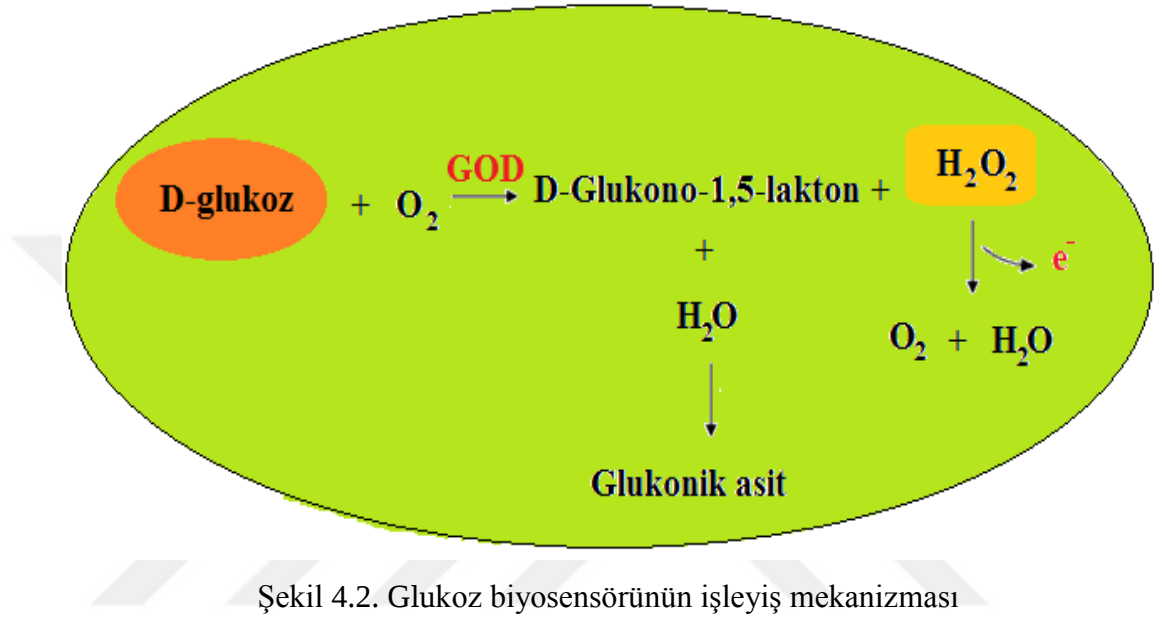
Bu aşamalar sırasıyla Platin elektrot (Pt,I), polimer film sentezi (Pt/polimer, II), polimer kaplı platin elektrotun HCl ile doplanması (Pt/polimer/HCl, III), doplanmış polimer film kaplı platin elektrot yüzeyine kitosan, enzim ve nanopartikülün adsorbsiyonu (Pt/polimer/HCl/Chi+GOD+ ZnFe_2O_4 ,IV), son olarak hazırlanan elektrotun glutaraldehit ile muamelesi (Pt/polimer/HCl/Chi+GOD+ ZnFe_2O_4 /GAL,V) şeklindedir.



Şekil 4.1. Biyosensör elektrotun hazırlanması

Bu şekilde hazırlanan elektrotlar buzdolabında 24 saat bekletildikten sonra 0,2-3,0 mM aralığında glukoz çözeltilerinde kronoamperometrik yöntemle akım değerlerinin ölçümünde kullanılmıştır.

Hazırlanan elektrotlar glukoz çözeltisine daldırıldığında, öncelikle GOD biyokatalizörlüğünde Şekil 4.2.'de verilen tepkimeler gerçekleşir.



Şekil 4.2. Glukoz biyosensörünün işleyiş mekanizması

İki basamak üzerinden yürüyen tepkimede görüldüğü gibi, birinci aşamada GOD glukozu yükseltgeyerek kendisi indirgenmiş, ikinci aşamada ise GOD, O_2 ' i H_2O_2 'e indirgeyerek kendisi tekrar yükseltgenmiştir. Oluşan H_2O_2 Pt elektrot yüzeyinde sabit bir potansiyelde aşağıdaki tepkimeye göre yükseltgenmektedir.



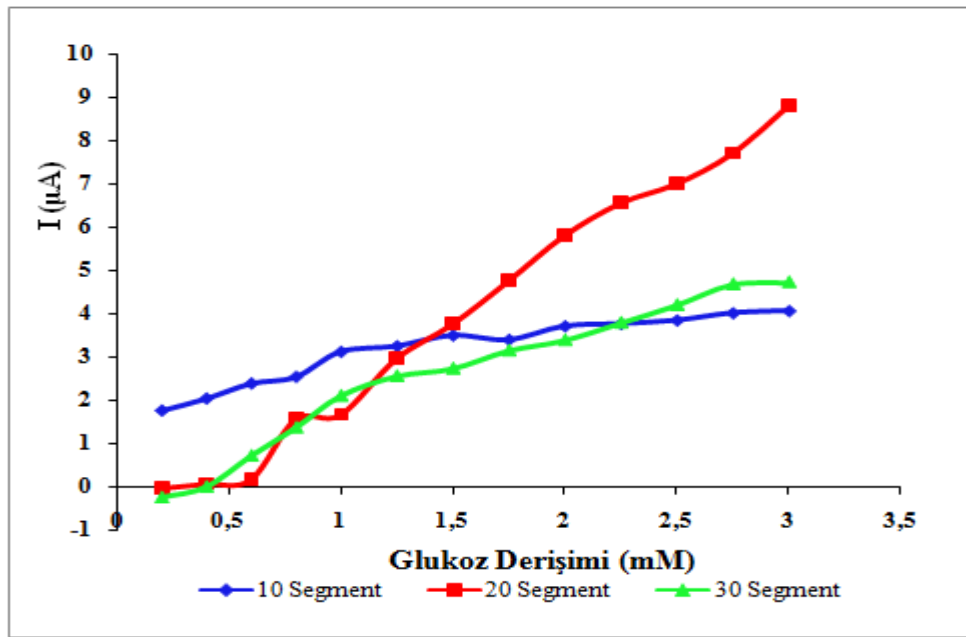
Yükseltgenmenin meydana geleceği bir potansiyelde çalışıldığında devreden geçen anodik akım yukarıdaki tepkimeye bağlı olarak H_2O_2 derişimi ile; dolayısıyla glukoz derişimi ile orantılı olacaktır.

4.1. Enzim Elektrotların Oluşturulması İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi

4.1.1. POA ve POT Sentez Koşullarının Optimizasyonu

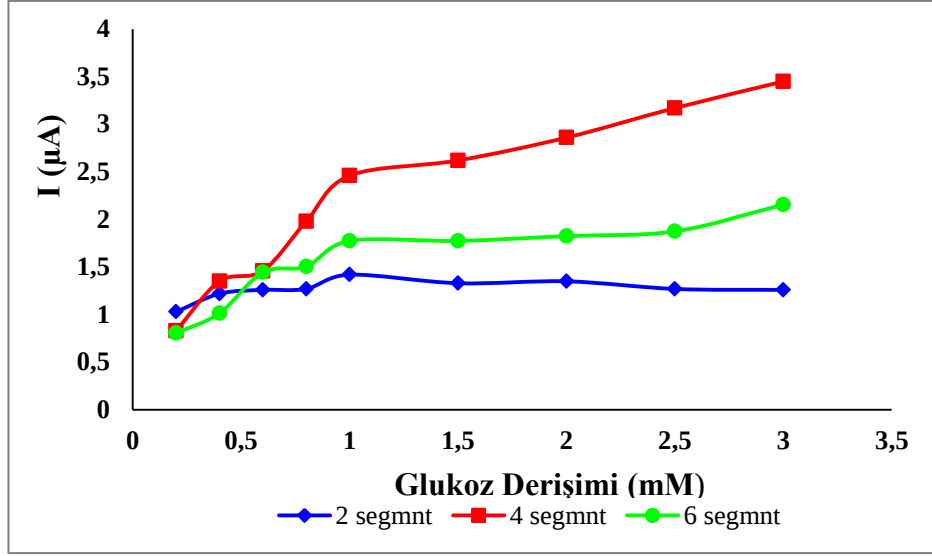
4.1.1.1. Segment Sayısının Belirlenmesi

0,05 M o-anisidin içeren 0,15 M NaO_x ortamında 0,35-1,50 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında 10-20-30 segment uygulanarak 3 farklı segmentte poli(o-anisidin) (POA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Pt elektrot yüzeyinde POA filmler farklı segmentlerde elde edilerek hazırlanan Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağlı akım değerlerine bakıldığında 20 segment uygulanarak elde edilen Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrotun akım değerinin lineer olduğu görülmektedir. Bu nedenle sonraki çalışmalarda POA sentezi 20 segment uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Farklı segmentler uygulanarak elde edilen POA kaplı elektrotların glukoz derişimine bağlı akım değerleri

0,04 M o-toluidin içeren 0,15 M NaO_x ortamında 0,2-2,0 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında 2, 4 ve 6 segment uygulanarak 3 farklı segmentte poli(o-toluidin) (POT) sentezi gerçekleştirilmiştir. 4 segment uygulanarak elde edilen Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrotun glukoz derişimine bağlı akım değerlerinin yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 4.4.).

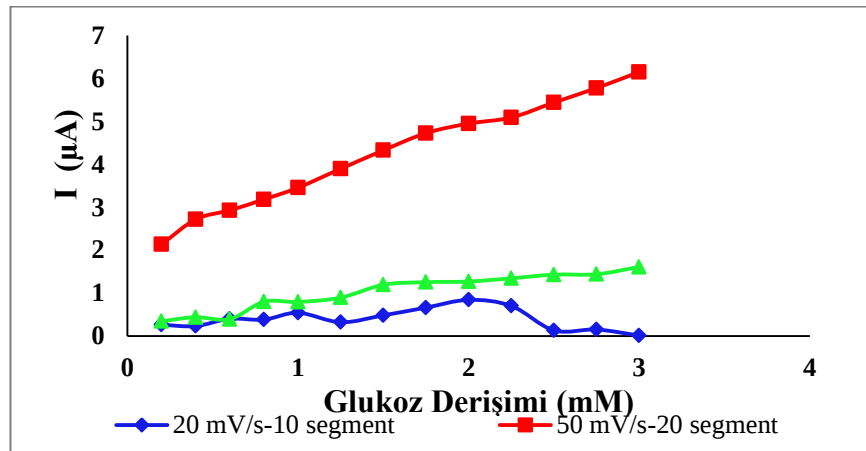


Şekil 4.4. Farklı segmentler uygulanarak elde edilen POT kaplı elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri

Bu nedenle sonraki çalışmalarda 4 segment uygulanarak POT sentezi gerçekleştirilmiştir.

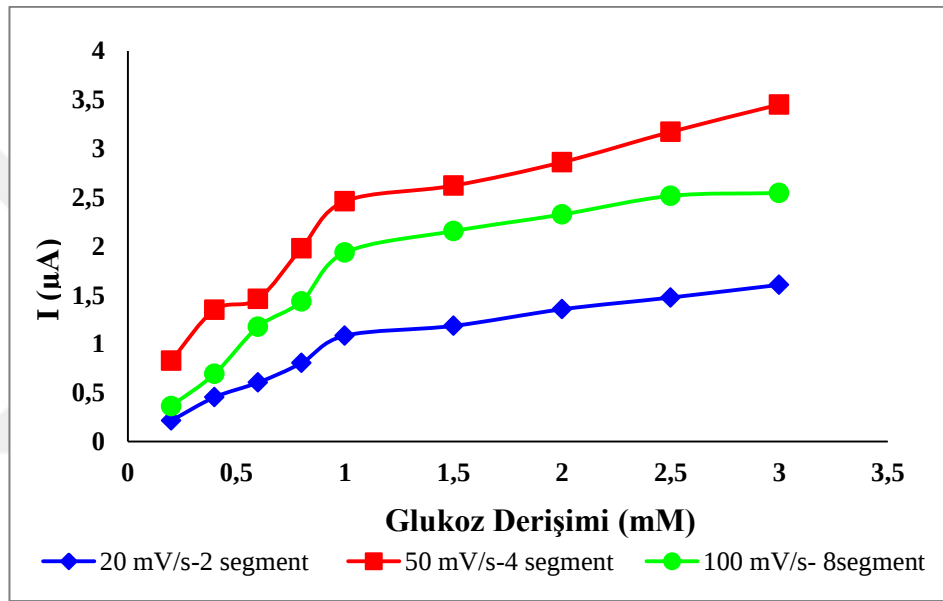
4.1.1.2. Tarama Hızının Belirlenmesi

0,05 M o-anisidin içeren 0,15 M NaO_x ortamında 0,35-1,50 V potansiyel aralığında, 20, 50 ve 100 mV/s tarama hızları uygulanarak 3 farklı POA sentezi gerçekleştirilmiştir. Farklı tarama hızlarında hazırlanan Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı ölçüm sonuçlarına göre en yüksek akım değerleri 50 mV/s tarama hızı ile elde edilen elektrot kullanıldığında elde edilmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Farklı tarama hızları uygulanarak elde edilen POA kaplı elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri

0,04 M o-toluidin içeren 0,15 M NaO_x ortamında 0,2-2,0 V potansiyel aralığında, 20, 50 ve 100 mV/s tarama hızları uygulanarak 3 farklı POT sentezi gerçekleştirilmiştir. Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım sonuçları 50 mV/s tarama hızı ile elde edilen elektrotun en yüksek akım değerine sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 4.6.). Borole ve ark., (2004), POA, POT ve onların kopolimerleri olan (POA-co-POT)'i 0,10 M monomer içeren 1 M H₂SO₄ ortamında 50 mV/s tarama hızıyla -0,2 ve 1,0 V potansiyel aralığında Ag/AgCl elektrota karşı platin elektrot üzerine elektropolimerize etmişlerdir.



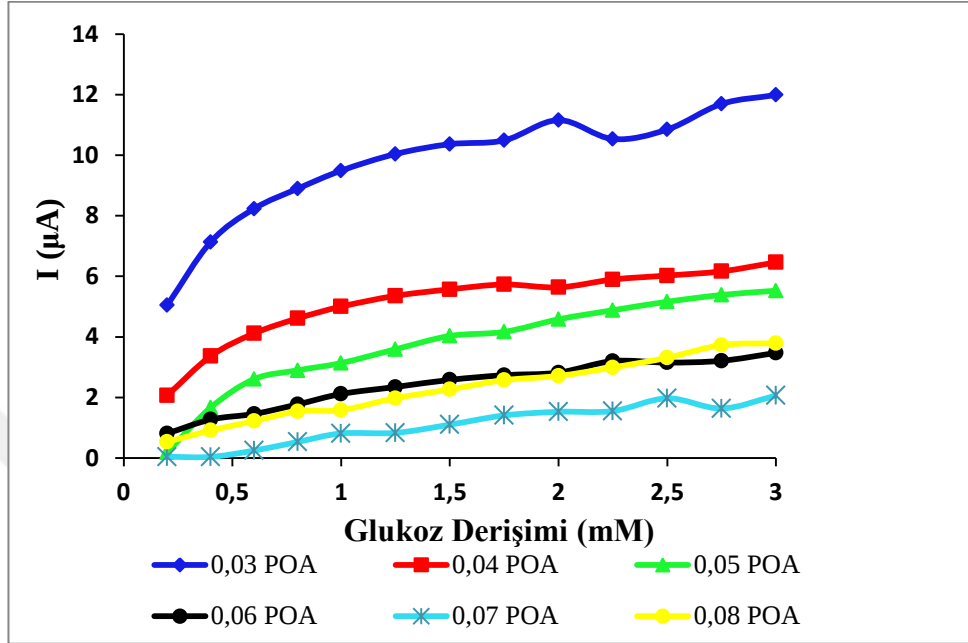
Şekil 4.6. Farklı tarama hızları uygulanarak elde edilen POT kaplı elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri

4.1.2. Monomer Derişiminin Belirlenmesi

Kimyasal olarak modifiye bir elektrot elde etmek için elektrotlar çoğu zaman iletken veya yarı iletken bir malzemeyle kaplanır veya kimyasal bir modifikasyon ajanı yük transfer reaksiyonları ya da ara yüzey bağlantıları vasıtasıyla yapıya sokulur (Leznoff ve Lever, 1989). Bu çalışmada iletken polimer olarak POA ve POT kullanılmıştır.

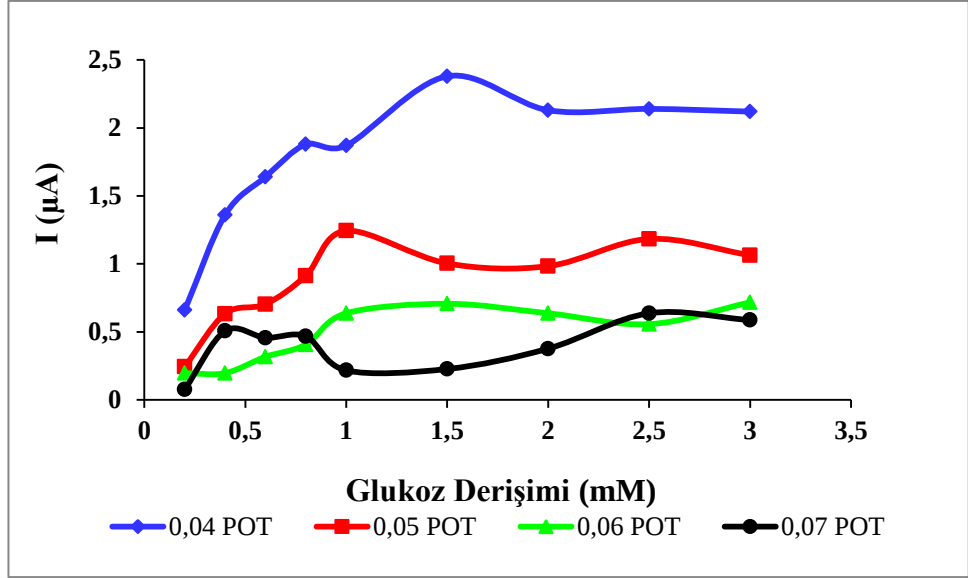
0,03-0,08 M arasında o-anisidin konsantrasyonlarının glukoz derişimlerine bağı olarak akım değerlerinin etkileri incelenmiştir. 0,03 M o-anisidin ile poli(o-anisidin) film kaplı elektrotun glukoz derişimlerine bağı akım değerlerinin en yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak akım değerlerinin doğrusal olduğu aralığın kısa olması ve

çalışmanın ilerleyen aşamalarında kaplamanın elektrot yüzeyinden dökülmesi sebebi ile akım değerlerinin yüksek ve doğrusallığın en geniş olduğu 0,05 M o-anisidin derişimi ile çalışmaya devam edilmiştir (Şekil4.7.).



Şekil 4.7. Farklı o-anisidin derişimleri ile elde edilen Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağlı akım değerleri

0,04-0,07 M arasında o-toluidin konsantrasyonlarında oluşturulan POT filmler ile hazırlanan enzim elektrotların glukoz derişimlerine bağlı akım değerleri ölçüldüğünde 0,04 M o-toluidin ile oluşturulan elektrot en yüksek performansı göstermiştir. Çalışmalarda 0,03 M o-toluidin monomer derişiminde de POT sentezi gerçekleştirilmiş ancak elde edilen enzim elektrotu için belirlenen net akım değerleri negatif çıkmıştır (Şekil 4.8.).

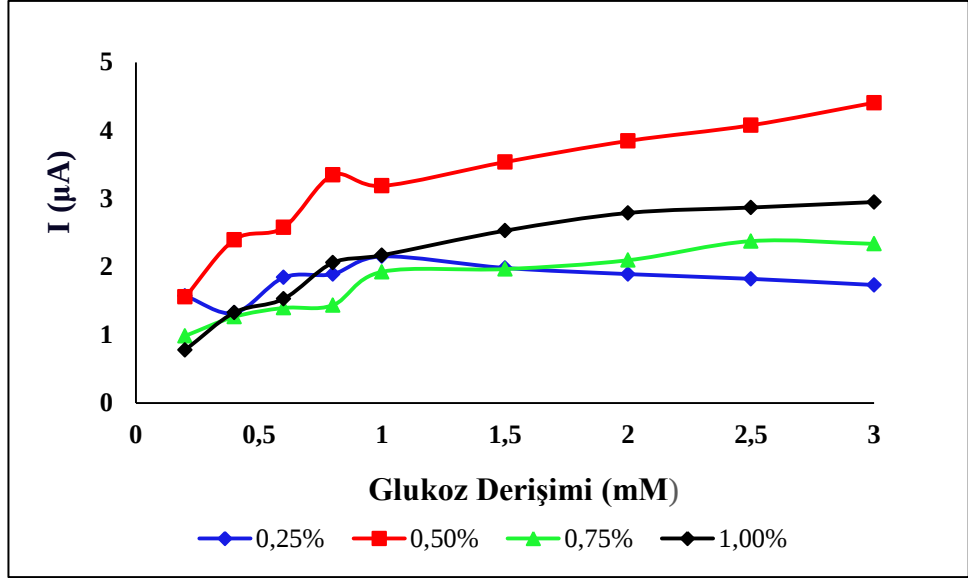


Şekil 4.8. Farklı o-toluidin derişimleri ile elde edilen Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri

Borole ve ark., (2004), poli-o-anisidin (POA), poli-o-toluidin (POT) ve onların kopolimerleri olan poli-o-anisidin-co-o-toluidin (POA-co-POT)'i 0,10 M monomer içeren 1 M H_2SO_4 ortamında Ag/AgCl elektrota karşı platin elektrot üzerine elektropolimerize etmişlerdir. Can ve ark., (2010), 0,10 M pirol ve 2 mg/ml GOD'nin bulunduğu, 0,20 M p-toluen sülfonik asit ortamında platin elektrot üzerine sentezlenmiştir.

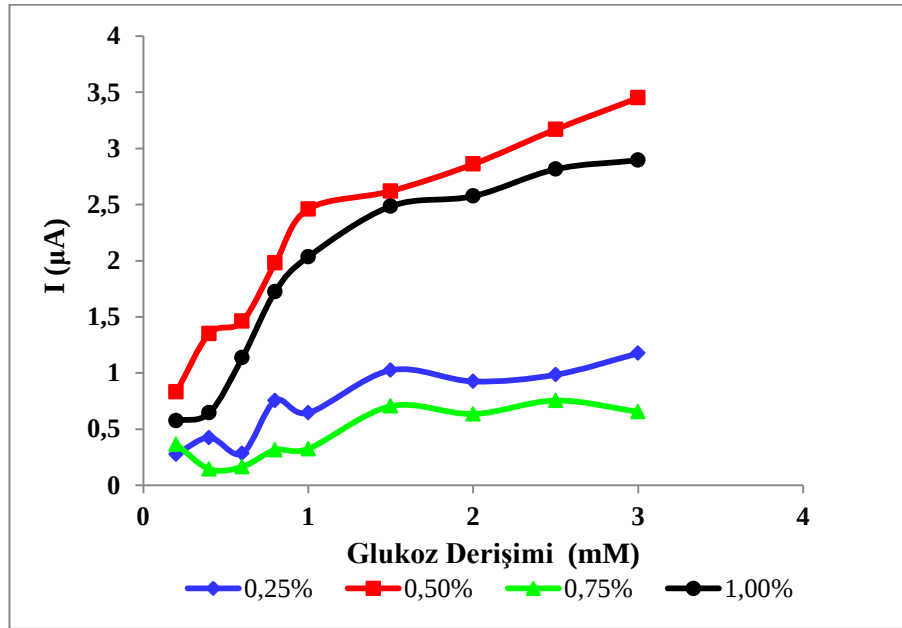
4.1.3. Kitosan Derişiminin Etkisi

Şekil 4.9'da % 0,5 - 1,0 aralığındaki kitosan derişimlerinde elde edilen Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrotların optimizasyonu yapılmıştır. Farklı kitosan derişimlerinde hazırlanan elektrotların glukoz derişimlerine bağı olarak akım değerlerine bakıldığında % 0,5 kitosan kullanılan elektrotun akım değerlerinin en yüksek olmasından dolayı ile % 0,5 kitosan derişimine karar verilmiştir.



Şekil 4.9. Farklı kitosan derişimleri ile elde edilen Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri

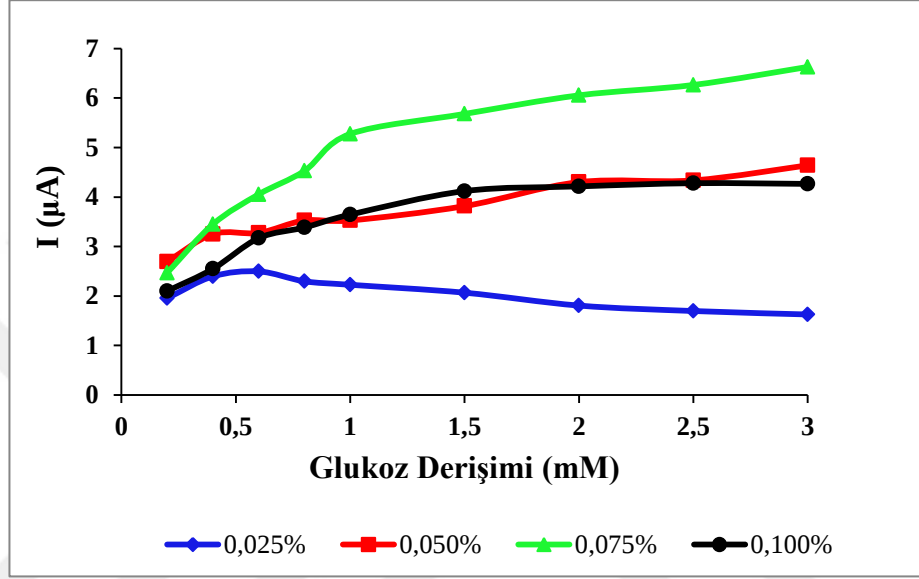
Şekil 4.10’da %0,5-1,0 aralığındaki kitosan derişimlerinde elde edilen Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrotların optimizasyonu yapılmıştır. Farklı kitosan derişimlerinde hazırlanan elektrotların glukoz derişimlerine bağı olarak akım değerlerine bakıldığında % 0,5 kitosan kullanılan elektrotun akım değerlerinin en yuğek olması itibari ile % 0,5 kitosan derişimine karar verilmiştir.



Şekil 4.10. Farklı kitosan derişimleri ile elde edilen Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri

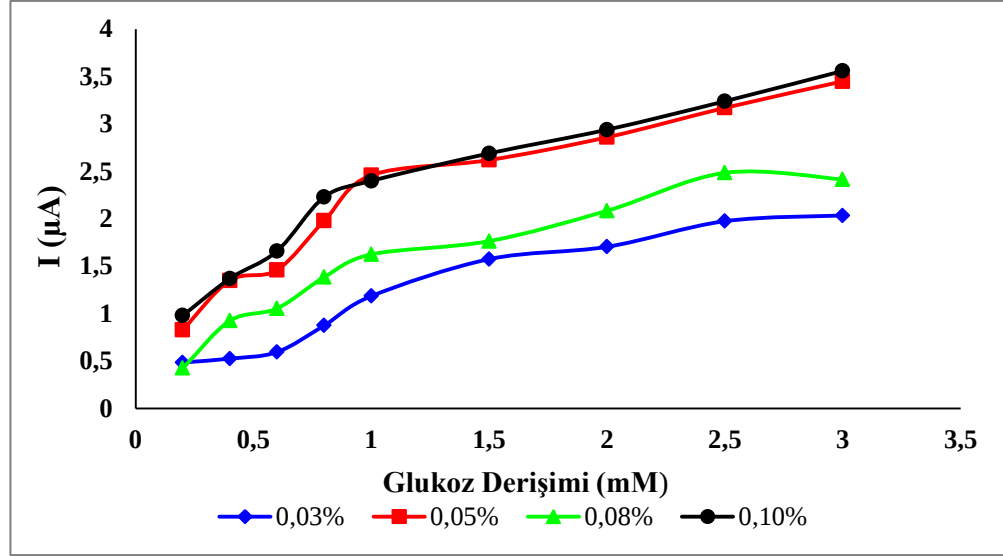
4.1.4. GAL Derişiminin Etkisi

Şekil 4.11’de % 0,025 - 0,100 aralığındaki glutaraldehit derişimlerinde elde edilen Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrotların optimizasyonu yapılmıştır. % 0,075 glutaraldehit derişimine karşılık gelen akım değerleri en yüksek çıktığından dolayı % 0,075’lik GAL derişimiyle çalışmaya devam edilmiştir.



Şekil 4.11. Farklı GAL derişimleri ile elde edilen Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri

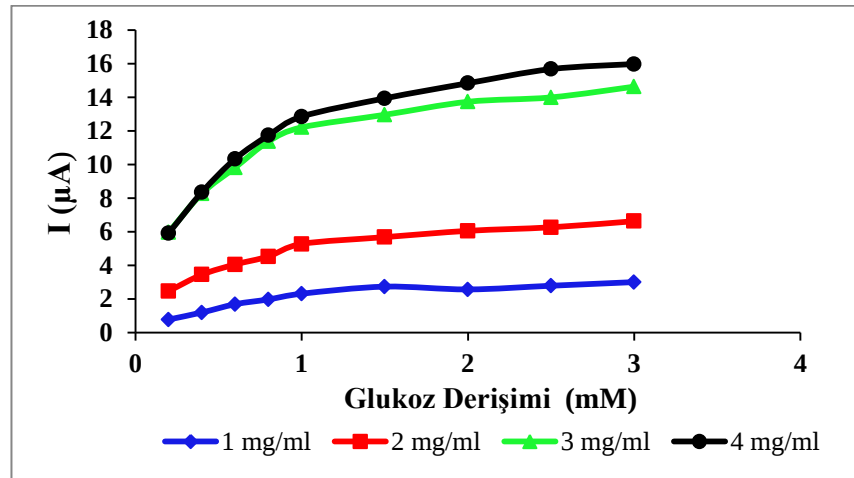
Şekil 4.12’de % 0,025 - 0,100 aralığındaki glutaraldehit derişimlerinde elde edilen Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrotların optimizasyonu yapılmıştır. % 0,10’lik GAL derişimine karşılık gelen akım değerleri en yüksek çıktığından dolayı % 0,10’ lik GAL derişimiyle çalışmaya devam edilmiştir. % 0,1’ den büyük GAL derişimlerinde elektrotlar hazırlandığında akım değerleri negatif çıkmaktadır.



Şekil 4.12. Farklı GAL derişimleri ile elde edilen Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri

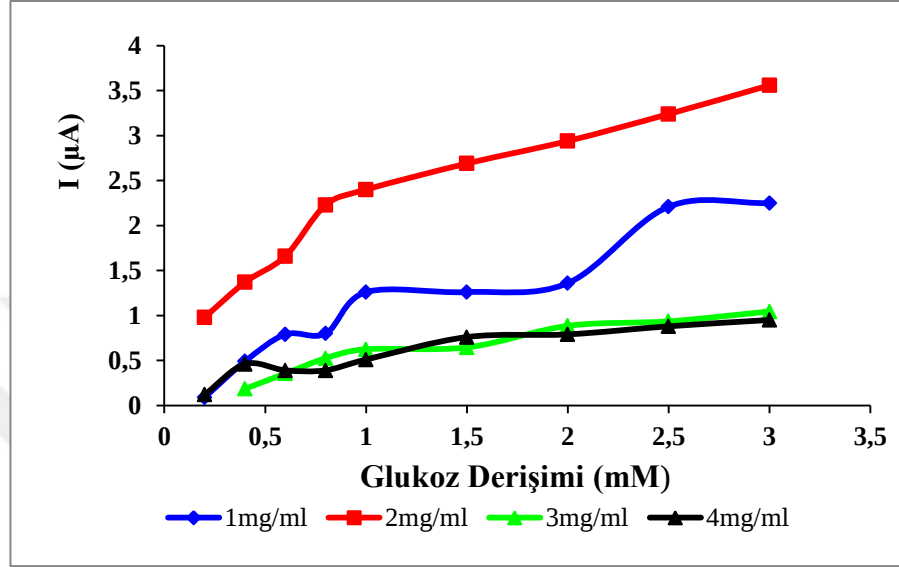
4.1.5. Enzim Derişiminin Etkisi

Uygun glukoz biyosensör elektrot için 1-4 mg/ml aralığındaki enzim (GOD) derişimlerinde elde edilen Pt/POA/Chi+GOD/GAL ve Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrotların optimizasyonu yapılmıştır. Şekil 4.13’de Pt/POA/Chi+GOD/GAL şeklinde oluşturulan elektrotun farklı enzim derişimleri incelendiğinde 0,2-3,0 mM aralığı glukoz derişimlerinde kronoamperometrik yöntemle 0,60 V’ta elde edilen akım değerlerinin 4 mg/ml enzim derişimli Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrot için en yüksek olduğı bulunmuştur. 5 mg/ml enzim derişiminde ise akım değerleri negatif çıkmaktadır.



Şekil 4.13. Farklı enzim derişimleri ile elde edilen Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri

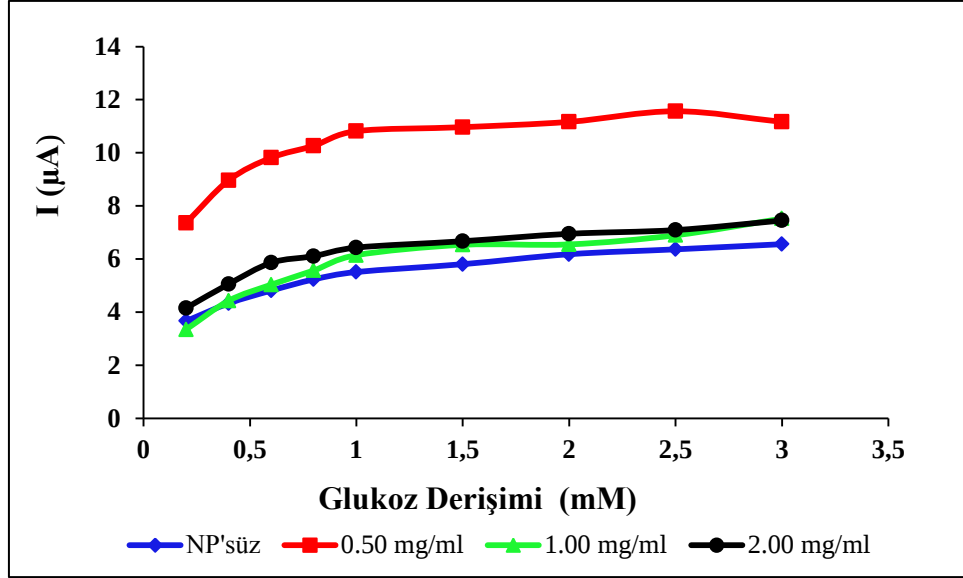
Şekil 4.14’de 1-4 mg/ml aralığında enzim kullanılarak oluşturulan Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri incelendiğinde, 2 mg/ml enzim derişimli Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrotun en yüksek akım değerlerini gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.14. Farklı enzim derişimleri ile elde edilen Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri

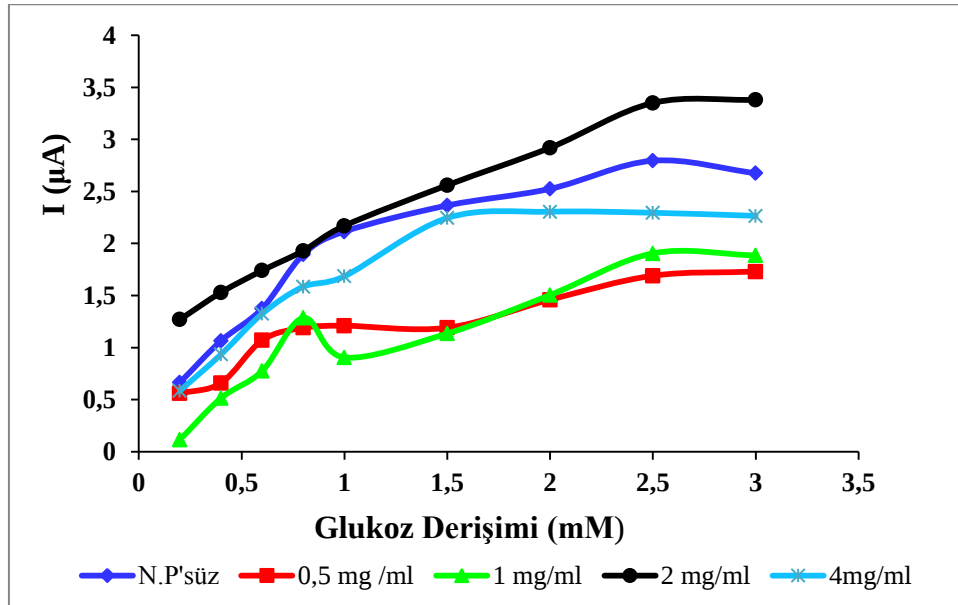
4.1.6. ZnFe₂O₄ Nanopartikül Derişiminin Etkisi

Uygun glikoz biyosensör elektrot için farklı ZnFe₂O₄ nanopartikül derişimlerinde elde edilen Pt/POA/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL ve Pt/POT/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri belirlenmiş ve sırasıyla Şekil 4.15 ve Şekil 4.16 elde edilmiştir. Görüldüğü gibi akım değerlerinin 0,50 mg/ml ZnFe₂O₄ nanopartikül derişimli Pt/POA/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL elektrot için en yüksek olduğı bulunmuştur. Nanopartikül kullanılmayan (NP’süz) elektrottaki akım değerlerinin en düşük olduğı yine Şekil 4.15’te görülmektedir.



Şekil 4.15. Farklı nanopartikül derişimleri ile elde edilen Pt/POA/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri

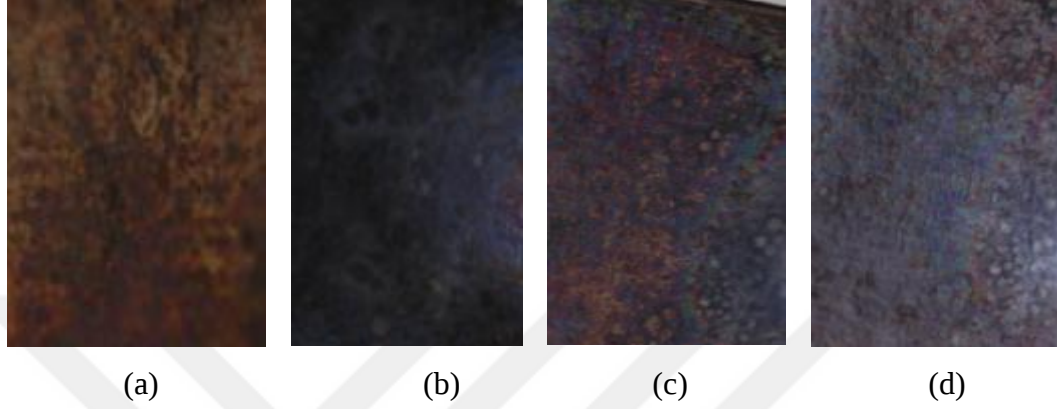
Şekil 4.16'da Pt/POT/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL şeklinde oluşturulan elektrotun farklı nanopartikül derişimlerine bağı olarak ölçülen akım grafikleri incelendiğinde 2 mg/ml ZnFe₂O₄ nanopartikül derişimli Pt/POT/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL elektrotun en yüksek performansı gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.16. Farklı nanopartikül derişimleri ile elde edilen Pt/POT/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri

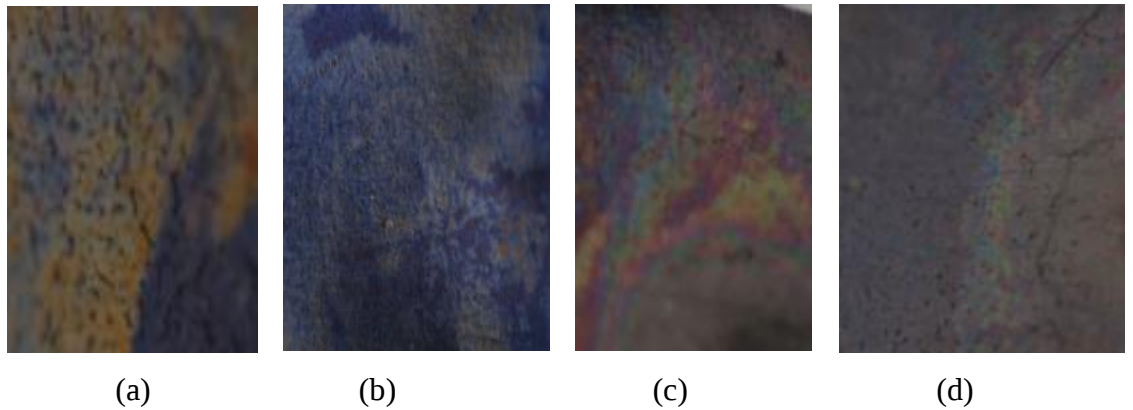
4.1.7. Dijital Fotoğraflar ve SEM Görüntüleri

Pt/POA/Chi+GOD/GAL ve Pt/POA/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL elektrotların hazırlanma aşamalarının dijital fotoğrafları sırasıyla Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.17. Pt/POA (a) , Pt/POA/HCl (b), Pt/POA/HCl/Chi+GOD (c), Pt/POA/HCl/Chi+GOD/GAL (d) elektrotların dijital fotoğrafları

Platin üzerine kaplı POA’nın renginin kahverengi tonlarında olduğu görülmektedir (Şekil 4.17 a). Yüzey HCl ile doplama yapıldıktan sonra rengin koyu mor olduğu görülmektedir (Şekil 4.17 b). Ardından GOD ile immobilizasyon yapıldığında yüzeyin renginin açıldığı ve farklı bölgelerde GOD’nin varlığını andıran sarı renkler görülmektedir (Şekil 4.17 c). Son aşamada yüzey GAL ile çapraz bağlandığında yüzeyin renginin açıldığı ve yüzeyin homojen olduğu görülmektedir (Şekil 4.17 d).

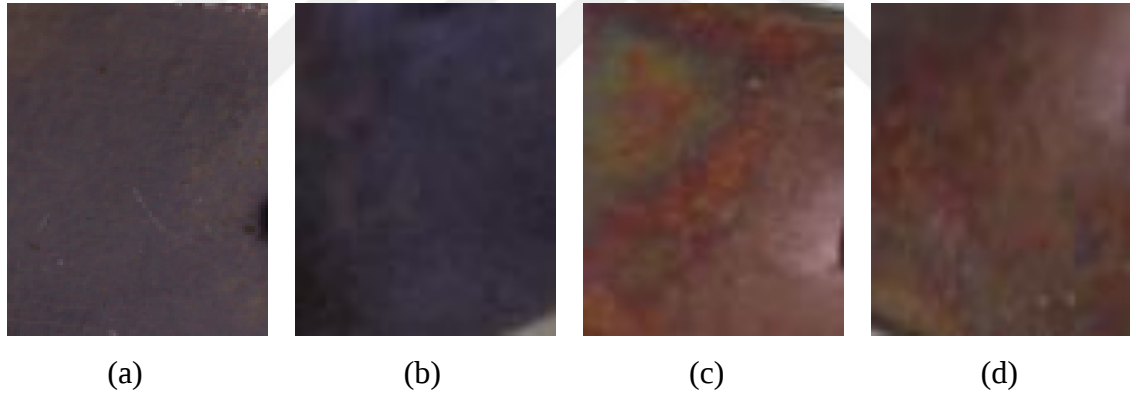


Şekil 4.18. Pt/POA (a) , Pt/POA/HCl (b), Pt/POA/HCl/Chi+GOD+ ZnFe₂O₄ (c), Pt/POA/HCl/Chi+GOD+ ZnFe₂O₄/GAL (d) elektrotların dijital fotoğrafları

Şekil 4.17 ve 18’de platin elektrot yüzeyine POA sentezinin yapılmasının ardından her aşamada yüzey fotoğrafları incelendiğinde, yüzeydeki değişim görülmekle birlikte rengin giderek açıldığı görülmektedir. Şekil 17’den farklı olarak Şekil 4.18’ de $ZnFe_2O_4$ kullanılmıştır ve yüzeyin daha homojen bir görüntüsü olduğu görülmektedir.



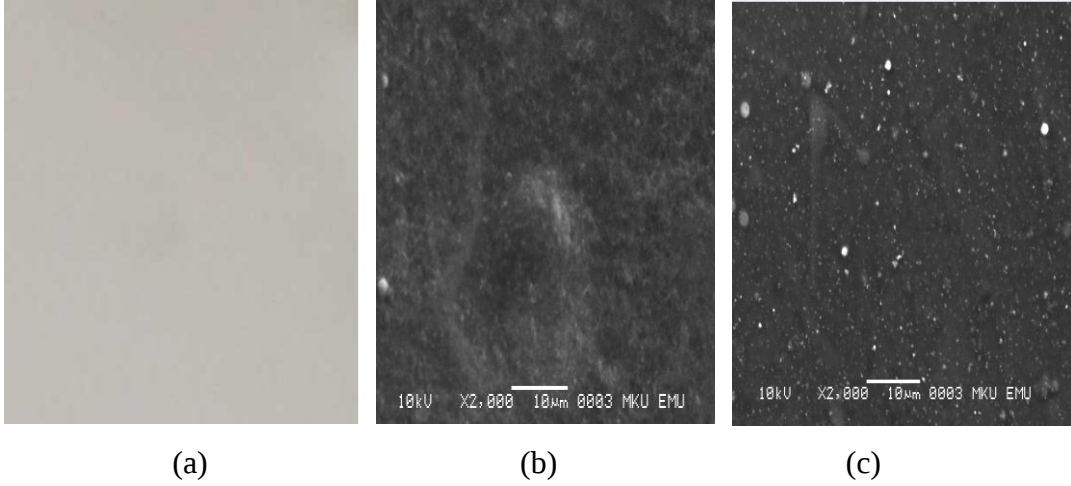
Şekil 4.19. Pt/POT (a) , Pt/POT/HCl (b), Pt/POT/HCl/Chi+GOD (c), Pt/POT/HCl/Chi+GOD/GAL (d) elektrotların dijital fotoğrafları



Şekil 4.20. Pt/POT (a) , Pt/POT/HCl (b), Pt/POT/HCl/Chi+GOD+ $ZnFe_2O_4$ (c), Pt/POT/HCl/Chi+GOD+ $ZnFe_2O_4$ /GAL (d) elektrotların dijital fotoğrafları

Şekil 4.19 ve 20’de platin elektrot yüzeyine POT sentezinin yapılmasının ardından her aşamada yüzey fotoğrafları incelendiğinde, yüzeydeki değişim görülmekle birlikte rengin giderek açıldığı görülmektedir.

Pt/POA/Chi+GOD/GAL ve Pt/POA/Chi+GOD+ $ZnFe_2O_4$ /GAL elektrotların SEM görüntüleri Şekil 4.21’de verilmiştir.

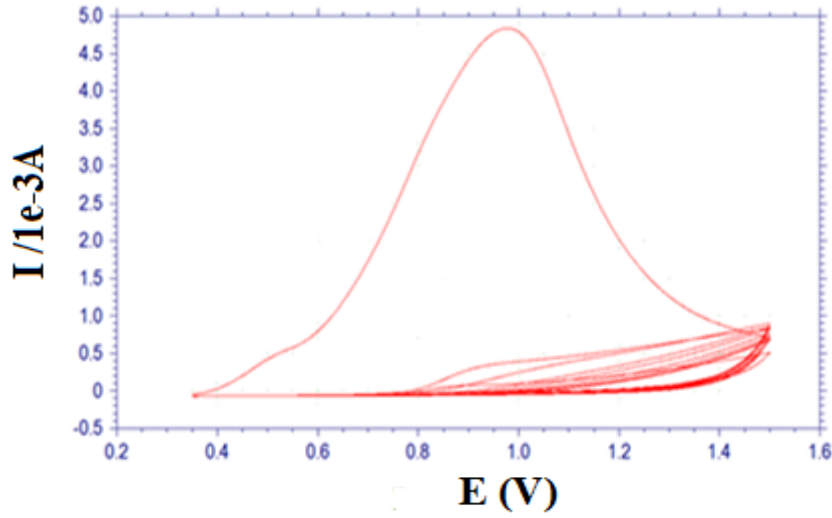


Şekil 4.21. Çıplak platin elektrot (a), Pt/POA/HCl/ChI+GOD/GAL (b), Pt/POA/HCl/ChI+GOD+ ZnFe₂O₄/GAL (c) elektrotların SEM görüntüleri

Pt/POA/HCl/ChI+GOD/GAL kaplı elektrotun SEM görüntüsü incelendiğinde yüzeyde gözeneklerin oluştuğu, pürüzlü ve beyaz dalgalanmaların olduğu görülmektedir. Pt/POA/HCl/ChI+GOD+ZnFe₂O₄/GAL kaplı nanopartikül içeren elektrotun SEM görüntüsünde yüzeyin daha homojen bir yapıya sahip olduğu, gözeneklerin azaldığı ve yüzeyde nanopartiküllerin olduğu görülmektedir.

4.1.8. Optimum Koşullarda Elde Edilen CV ve Akım Değerleri

Poli(o-anisidin) film Pt elektrot yüzeyine elektrokimyasal olarak 0,05 M o-anisidin (OA) içeren 0,15 M NaO_x ortamında 0,35 – 1,50 V potansiyel aralığında 50 mV/s tarama hızı ile 20 segmentte gerçekleştirilmiştir. Optimal koşullarda gerçekleştirilen POA sentezine ait dönüşümlü voltagram eğrisi Şekil 4.22’de verilmiştir.

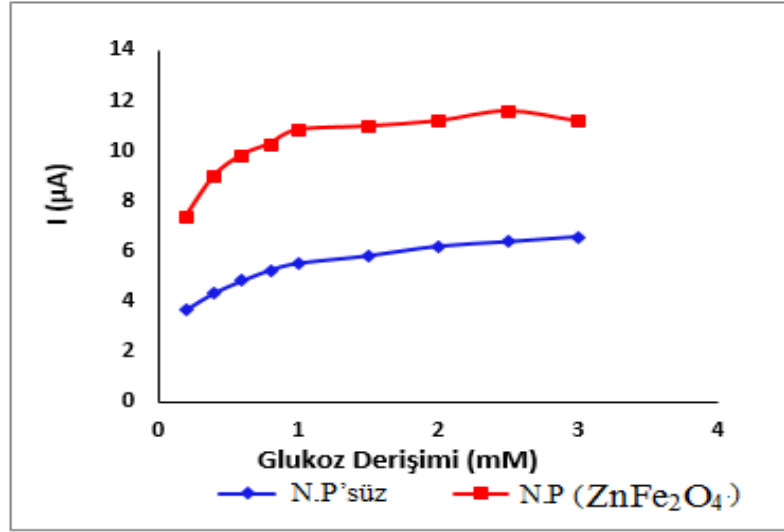


Şekil 4.22. Platin elektrotun 0,05 M OA+0,15 M NaO_x ortamında 20 segment uygulanarak elde edilen dönüşümlü voltagram eğrileri

Şekil 4.22’de 0,05 M OA+0,15 M NaO_x ortamında 50 mV/s tarama hızı ile 20 segment uygulanarak elde edilen dönüşümlü voltagram eğrisinde akım artışı platin yüzeyindeki metal oksit tabakalarının kalktığı akım düşüşü ise monomer oksidasyonunun gerçekleştiği ve yüzeyde polimer film kalınlığının arttığını gösterir. Potansiyel aralığını 0,35-1,50 V yapmamızın sebebi ise 1,50 V tan sonrasında oksijen çıkışı gözlenmesi ve bu durum yüzeydeki polimer filmin dökülmesine sebep olmasıdır.

Polimer kaplı platin elektrotlar, 1 M HCl çözeltisinde 1 saat bekletilerek doplama yapılmıştır. Daha sonra elektrot yüzeyi 4 mg/ml GOD enzimi ve 0,50 mg/ml ZnFe₂O₄ nanopartikül içeren % 0,5’lik chi çözeltisine daldırılarak enzim ve nanopartikül tutuklanmıştır. Ardından elektrot yüzeyi % 0,075’lik GAL çözeltisi ile muamele edilerek optimum koşullarda elektrotlar hazırlanmıştır. Hazırlanan elektrotlar fosfat tamponunda ardından glukoz çözeltilerinde akım değerleri ölçülerek glukoz derişimine karşı net akım değerleri grafiğe geçirilmiştir.

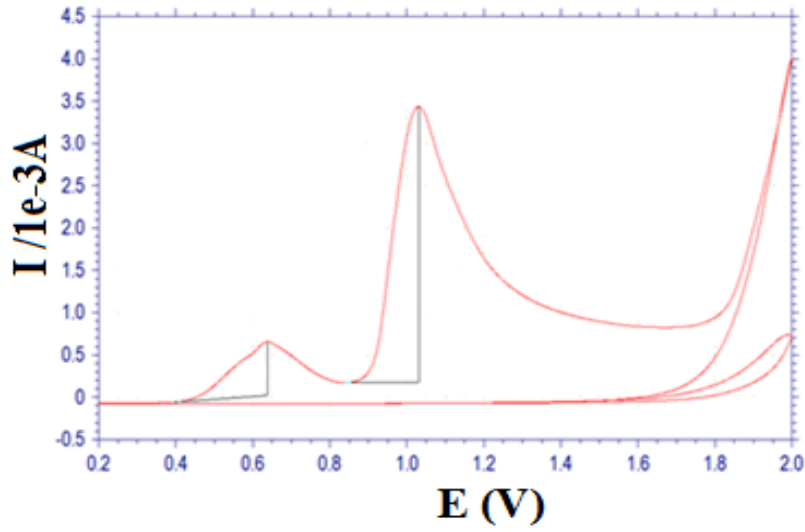
Nanopartikül içeren ve içermeyen elektrotlarla elde edilen glukoz derişimine bağlı net akım grafikleri Şekil 4.23’de verilmiştir.



Şekil 4.23. Optimum koşullarda elde edilen Pt/POA/Chi+GOD/GAL, Pt/POA/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL elektrotların farklı glukoz derişimlerinde elde edilen akım grafiğı

Şekil 4.23'de optimum koşullarda elde edilen Pt/POA/Chi+GOD/GAL Pt/POA/Chi+GOD+ ZnFe₂O₄ /GAL elektrotların glukoz derişimine karşı akım değerleri incelenmiştir. Ortamda bulunan GOD enzimi glukozu oksitleyerek H₂O₂ açığa çıkarmaktadır. H₂O₂ 'nin oksidasyonu sonucunda açığa çıkan elektron miktarına bağlı olarak akım yoğunluğu ölçülmüştür.

Aynı işlemler farklı parametreler kullanılarak platin elektrot yüzeyine poli(o-toluidin) film sentezlenerek gerçekleştirilmiştir. Pt elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak POT film sentezi, 0,04 M OT içeren 0,15 M NaO_x ortamında 0,2-2,0 V potansiyel aralığında 50 mV/s tarama hızı ile 4 segmentte gerçekleştirilmiştir. POT sentezine ait dönüşümlü voltagram eğrisi Şekil 4.24'de verilmektedir.

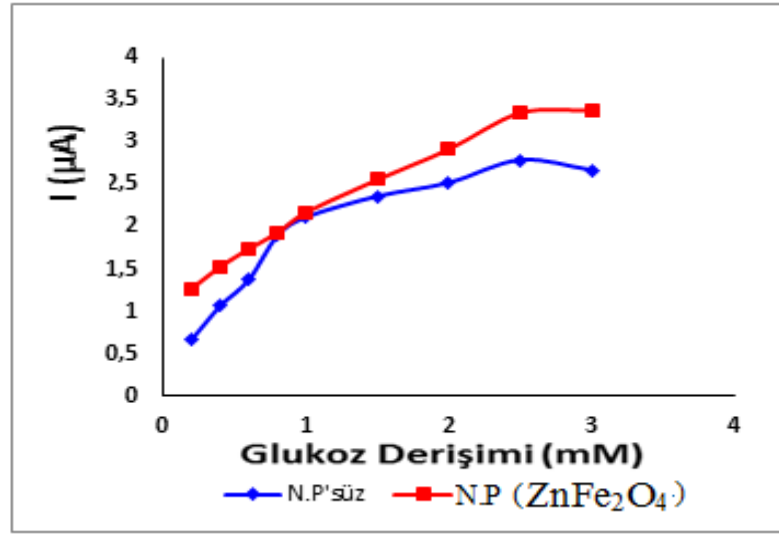


Şekil 4.24. Platin elektrotun 0,04 M OT+0,15 M NaO_x ortamında 4 segment uygulanarak elde edilen dönüşümlü voltaqram eğrileri

Şekil 4.24’de 0,04 M OT+0,15 M NaO_x ortamında 50 mV/s tarama hızı ile 4 segment uygulanarak elde edilen dönüşümlü voltaqram eğrisinde akım değerlerinin artışı platin yüzeyindeki platin oksitlerin bozunmasından kaynaklanmaktadır. Akım değerlerinin düşüşü polimer film gözeneklerinin kapanmasından kaynaklanmaktadır.

Polimer kaplı platin elektrotlar, 1 M HCl çözeltisinde 1 saat bekletilerek doplama yapılmıştır. Daha sonra elektrot yüzeyi 2 mg/ml GOD enzimi ve 2 mg/ml ZnFe₂O₄ nanopartikül içeren % 0,5’lik chi çözeltisine daldırılarak enzim ve nanopartikül tutuklanmıştır. Daha sonra kaplı elektrot yüzeyi % 0,1’lik GAL çözeltisi ile muamele edilerek optimum koşullarda elektrotlar hazırlanmıştır. Hazırlanan elektrotlar fosfat tamponunda ardından glukoz çözeltisinde akım değerleri ölçülerek glukoz derişimine karşı net akım değerleri grafiğe geçirilmiştir.

Nanopartikül içeren ve içermeyen POT kaplı elektrotlar için glukoz derişimine bağlı net akım değerleri Şekil 4.25’de verilmiştir.



Şekil 4.25. Optimum koşullarda elde edilen Pt/POT/Chi+GOD/GAL, Pt/POT/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL elektrotların glukoz derişimine bağı akım değerleri

Şekil 4.25’de optimum koşullarda elde edilen Pt/POT/Chi+GOD/GAL Pt/POT/Chi+GOD+ ZnFe₂O₄ /GAL elektrotların glukoz derişimine karşı akım değerleri incelenmiştir ve ZnFe₂O₄ nanopartikülü içeren elektrotun akım değerlerinin daha yüksek olduğu görölmektedir.

Şekil 4.23 ve şekil 4.25’te göröldüğü gibi POA kaplı elektrotların akım değerleri POT kaplı elektrotlara göre daha yüksek çıkmaktadır. Bu durum o-anisidin yapısında bulunan metoksi grubundaki oksijenin benzen halkasını aktive etmesinden kaynaklanmaktadır. Oysa, o-toluidin yapısında bulunan metil grubu ise halkayı deaktive etmektedir. Ayrıca ZnFe₂O₄ nanopartikülü içeren elektrotların nanopartikül içermeyen elektrotlara göre akım değerleri daha yüksektir. ZnFe₂O₄ nanopartikülünün elektron transferini hızlandırarak akım değerlerini arttırdığı gözlenmiştir.

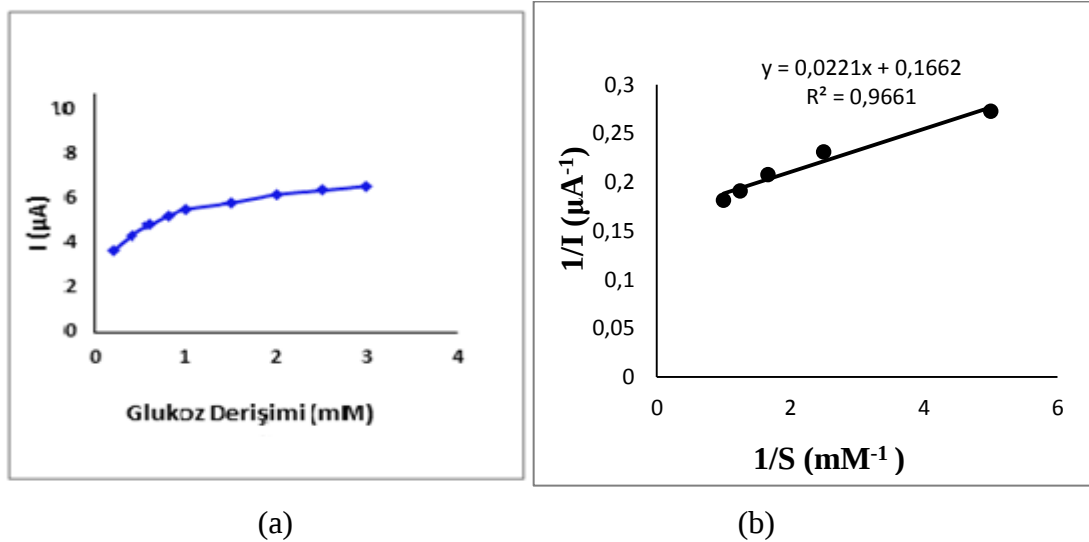
Glukoz tayini için ZrO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş amperometrik enzim elektrotlar hazırlanmıştır. Pt/ZrO₂/Chi/GO_x elektrotun K_M değeri 3,14 mM, I_{max} değeri ise 0,29 μA dır. ZrO₂ nanopartikülü kullanılmayan elektrotta ise I_{max} değeri 0,18 μA’dır. (Yang ve ark., 2004). H₂O₂’in yükseltgenme ve indirgenmesinin elektrokatalitik etkinliğini arttırmak için ultraduyarlı amperometrik glukoz biyosensör geliştirilmiştir. Platin elektrot; kitosan, platin nanoparçacıkların (PtNCs), glukoz oksidaz (GOx) ve nafyonun karışımı ile modifiye edilmiştir. Nafyon/Chi/GOx+PtNCs elektrot, H₂O₂’in yükseltgenme ve indirgenmesine karşı üstün elektrokatalitik etkinliği ortaya

konulmuştur. PtNCs, elektron transfer hızını desteklediği, glukoz belirlenmesinde duyarlılığı arttırdığı için iyi bir katalitik yeteneğe sahip olduğunu belirlemişlerdir. (Ren ve ark., 2012). Glukozun nicel ölçümü için amperometrik bir biyosensör hazırlamışlardır. Biyosensör homojen ve kolay hazırlanan bir biyokompozit üzerine temellendirilmiştir. Bu kompozit kitosan, glukoz oksidaz ve altın nanopartiküllerden oluşmuştur. Enzim uygun koşullar altında elektrokimyasal depolama yöntemiyle yüzeye immobilize edilmiştir. Altın nanopartiküller ilavesiyle de biyokompozite mükemmel bir üstünlük kazandırılmıştır. Nanopartikül kullanılmadan hazırlanan elektrotta akım değerleri daha düşük çıktığını gözlemlemişlerdir ve bu durumu altın nanopartiküllerin enzimi adsorbe gücü ve enzim kaybını önlemesine bağlamışlardır. Ayrıca altın nanopartikülün biyosensöre duyarlılığı, nanopartikülsüz elektrottan daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (Luo ve ark., 2004).

4.1.9. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Optimal koşullarda elde edilen elektrotların tampon çözeltilerdeki akım değerleri kronoamperometrik olarak ölçülmüş, ardından farklı derişimlerde hazırlanmış glukoz çözeltilisindeki akım değerleri ölçülerek akım farkları alınmış, substrat derişimine karşılık gelen net akım değerleri hesaplanmıştır.

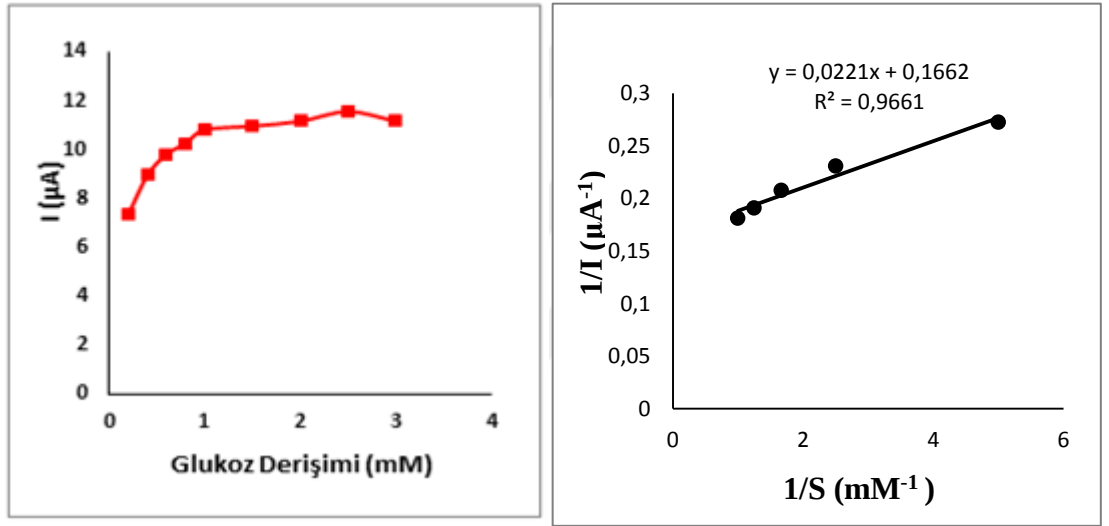
Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrodunun glukoz derişimine bağlı akım değerleri için elde edilmiş Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri sırasıyla Şekil 4.26.(a) ve Şekil 4.26. (b)'de verilmiştir.



Şekil 4.26. Pt/POA/Chi+GOD/GAL elektrodunun Michaelis-Menten (a) ve Lineweaver-Burk (b) eğrileri

Reaksiyon koşulları ve enzim derişimi sabit tutulurken substrat derişimi arttırılırsa reaksiyon hızı belli bir maksimum değere erişir. Bu değerden sonra, substrat derişimi arttırılsa bile reaksiyon hızında bir değışme gözlenmez. Bunun nedeni, ortamdaki enzim moleküllerinin ortam substrat moleküllerini karşılayamamasından kaynaklanmaktadır (Devlin, 1997).

Pt/POA/Chi+GOD+ ZnFe₂O₄/GAL elektrodunun glukoz derişimine bağı akım değerleri için elde edilmiş Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri sırasıyla Şekil 4.27.(a) ve Şekil 4.27. (b)'de verilmiştir.

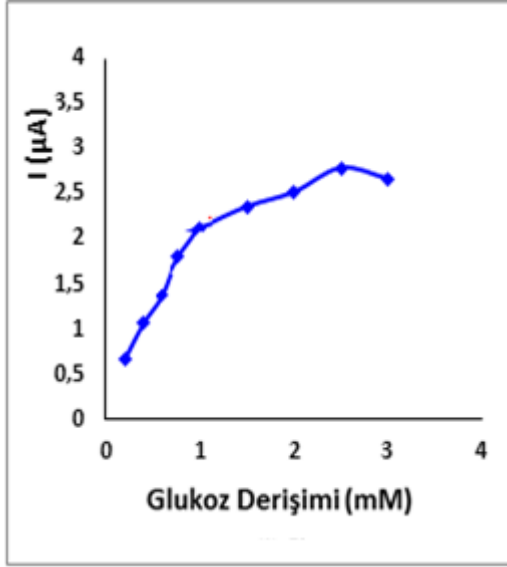


(a)

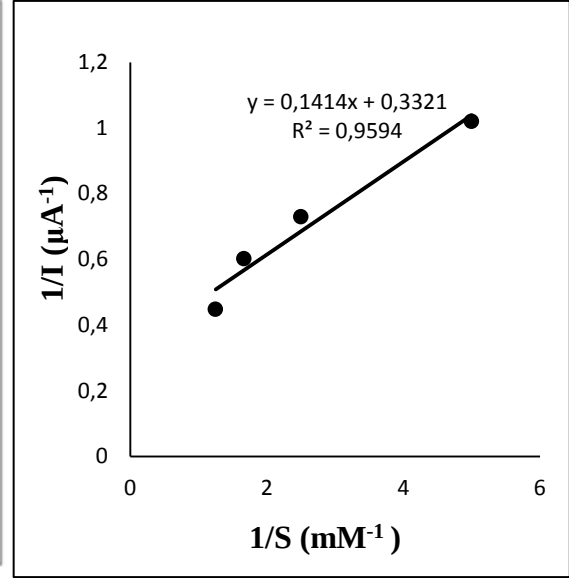
(b)

Şekil 4.27. Pt/POA/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL elektrodunun Michaelis-Menten (a) ve Lineweaver-Burk (b) eğrileri

Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrodunun glukoz derişimine bağı akım değerleri için elde edilmiş Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri sırasıyla Şekil 4.28.(a) ve Şekil 4.28. (b)'de verilmiştir.



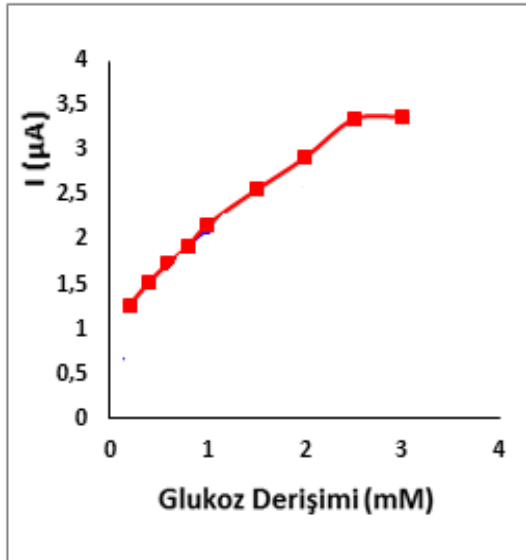
(a)



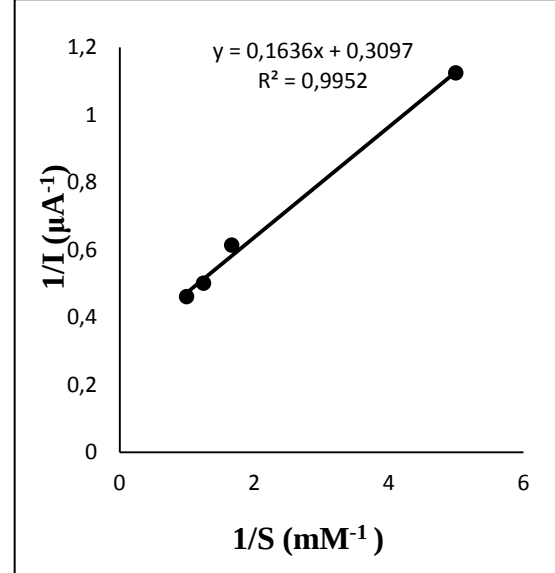
(b)

Şekil 4.28. Pt/POT/Chi+GOD/GAL elektrodunun Michaelis-Menten (a) ve Lineweaver-Burk (b) eğrileri

Pt/POT/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL elektrodunun glukoz derişimine bağı akım değerleri için elde edilmiş Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri sırasıyla Şekil 4.29.(a) ve Şekil 4.29. (b)'de verilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.29. Pt/POT/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL elektrodunun Michaelis-Menten (a) ve Lineweaver-Burk (b) eğrileri

Enzimatik reaksiyonlarda, tepkime hızı başlangıçta substrat derişimi ile orantılı olarak artarken, sonrasında substrat derişimi artsa bile tepkime hızı sabit kalır. Bu durumda enzimin maksimum hıza ulaşmıştır. Maksimum hızın yarısına ulaşmak için gerekli substrat derişimi K_M olarak adlandırılır. Bu çalışmada tepkime hızının belirlenmesi akım ölçümü ile dolaylı olarak yapılmaktadır. Fiziksel olarak K_M katsayısı enzim ve substratın birbirine olan ilgisini göstermektedir. Enzim ve substrat arasındaki ilgi fazla ise oldukça düşük substrat derişimlerinde bile enzimi substrat ile doyurmak mümkündür (Devlin, 1997). Enzimin K_M değeri bulunurken Lineweaver-Burk çiziminden yararlanılır. Nanopartikül içeren ve içermeyen tüm elektrotlar için Lineweaver-Burk denkleminde K_M ve I_{max} değerleri hesaplanarak sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. o-anisidin ve o-toluidin için Lineweaver-Burk grafiklerinden yararlanarak elde edilen K_M ve I_{max} değerleri

	K_M (mM)	I_{max} (μA)	I_{max}/K_M (μA)/ (mM)
Pt/POA/Chi+GOD/GAL	0,133	6,017	45,241
Pt/POA/Chi+GOD+ZnFe ₂ O ₄ /GAL	0,125	11,947	95,576
Pt/POT/Chi+GOD/GAL	0,425	3,011	7,085
Pt/POT/Chi+GOD+ZnFe ₂ O ₄ /GAL	0,528	3,229	6,116

Çizelge 4.1’de ZnFe₂O₄ nanopartikülü içeren elektrotlar için elde edilen I_{max} değerinin nanopartikül içermeyen I_{max} değerinden büyük olması nanopartikül etkinliğinin daha yüksek olduğunu gösterir. Yine aynı şekilde K_M değerlerinin farklı çıkması enzimin mikroçevresindeki etkilenmelerin farklı olduğunu göstermektedir. K_M değeri düştükçe substrata olan ilginin arttığını, elektrotların biyokatalitik etkinliğinin dolayısıyla akım değerlerinin daha yüksek olduğu sonucunu doğurmaktadır. Hesaplanan I_{max} değerleride bu sonucu desteklemektedir. Fakat POT kaplı ZnFe₂O₄ içeren elektrotun, POT kaplı ZnFe₂O₄ içermeyen elektrota göre I_{max} değeri daha yüksek olmasına rağmen, K_M değeride daha yüksektir. Bu sebeble I_{max}/K_M değerlerini kıyasladığımızda ise POT kaplı ZnFe₂O₄ içeren elektrotun değerleri daha düşüktür.

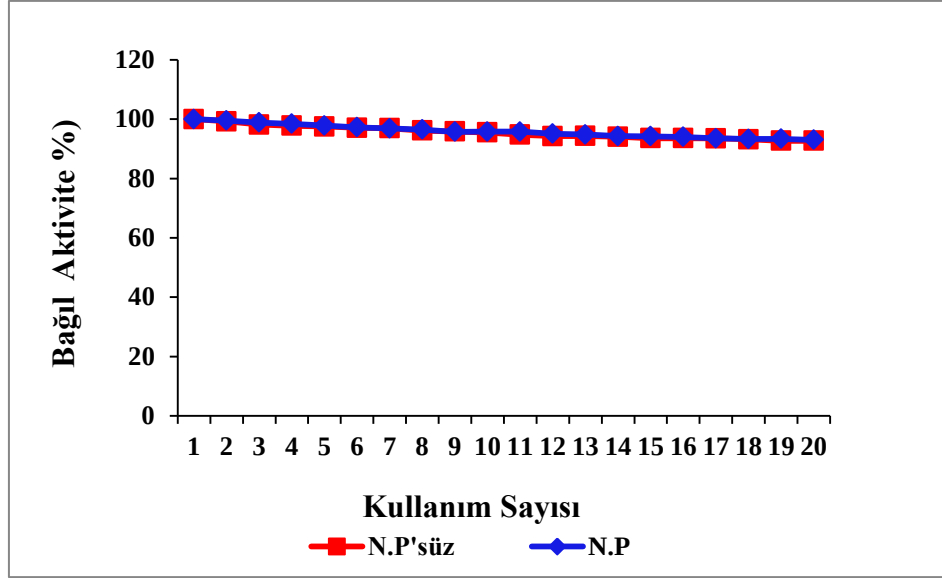
Can ve ark (2010), dönüşümlü voltametri tekniği ile para-toluen sülfonik asit (pTSA) ve sodyum para-toluen sülfonat ortamında (NapTS) polipirrol (PPy) sentezlemiş

ve sentez ortamında bulunan GOD enziminin eş zamanlı olarak immobilize edilmesi ile hazırlanan glukoz biyosensöründe 1,0 mM glukoz derişimine kadar doğrusal bir artış gözlemiştir. Lineweaver-Burk denkleminde $Pt/PPy-GOD_{pTSA}$ ve $Pt/PPy-GOD_{NapTSA}$ için K_M değerleri sırasıyla 5,2 ve 1,7 mM, I_{max} değerleri ise 14,2 ve 25,4 μA olarak hesaplanmıştır. I_{max} değerlerinin bizim çalışmamızdaki değerlerden büyük çıkmasının nedeni PPy filmin iletkenliğinin POA ve POT'a göre daha yüksek olmasıyla açıklanır. Bal ve ark., (2012), pirol, paratoluensülfonat, glukoz oksidaz enzimi ve glutaraldehit kullanılarak hazırladıkları biyosensör elektrotta glukozla bağı olarak doğrusal bir artış gözlemiştir, K_M ve V_{max} değerlerini sırasıyla 0,267 mM ve 4,048 mM olarak hesaplamıştır. Patil ve ark. (2007), yumuşak çelik üzerine POA film sentezlemiş, fiziksel adsorbsiyon metoduyla GOD enzimini POA film ile birlikte yüzeye immobilize etmiştir. Bu şekilde hazırladıkları biyosensör ile glukoz ortamında ölçülen akım değerinde doğrusal bir artış gözlemiştir, I_{max} ve K_M değerlerini sırasıyla, 406 $\mu A/cm^2$ ve 1,03 mM olarak hesaplamıştır.

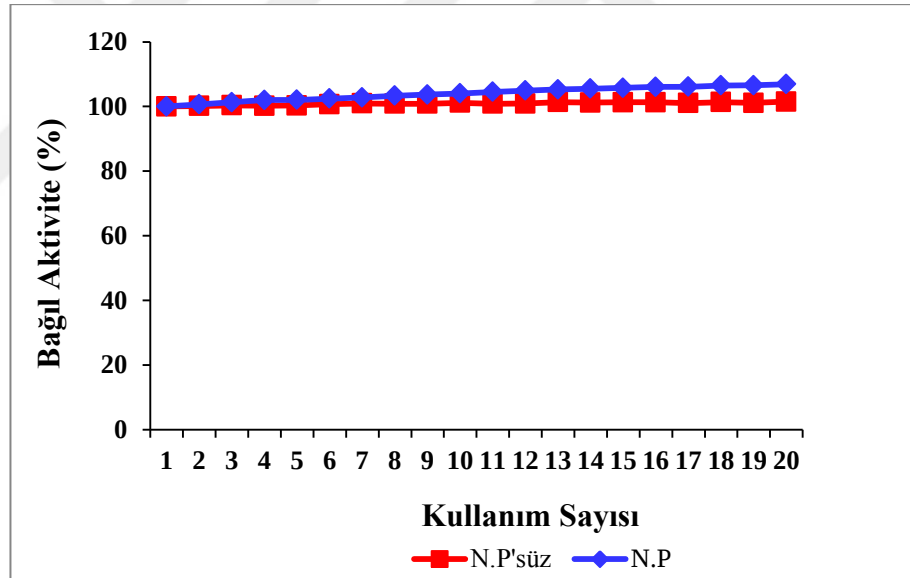
4.1.10. Biyosensörün Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

Enzimler oldukça pahalı maddeler olduğundan ve kolayca temin edilemediklerinden serbest enzim varlığındaki analizler yerini immobilize enzimlerle yapılan analizlere bırakmıştır (Hooda, 2009). Enzim immobilizasyonu ile hazırlanan enzim elektrotların çok sayıda analiz için kullanılması önemlidir. Enzimler kendi katalitik aktivitelerini çok kolay kaybettikleri ve denatüre oldukları için enzimlerin dikkatli depolanması ve bakımı çok önemlidir. Tekrarlanabilirlik biyosensör elektrotlar için çok önemli olup arka arkaya fazla sayıda analiz yapmak, maliyeti düşürmesi açısından büyük bir avantaj sağlamaktadır.

Şekil 4.30'da $Pt/POA/Chi+GOD/GAL$, $Pt/POA/Chi+GOD+ZnFe_2O_4/GAL$ ve Şekil 4.31'de $Pt/POT/Chi+GOD/GAL$ ve $Pt/POT/Chi+GOD+ZnFe_2O_4/GAL$ elektrotlar ile 5 mM glukoz çözeltisinde elde edilen 20 ardışık ölçümün % bağıl aktivite olarak kullanım sayısına bağı değişimi verilmektedir.



Şekil 4.30. 5 mM glukoz derişiminde Pt/POA/Chi+GOD/GAL ve Pt/POA/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL elektrotunun tekrar kullanım kararlılığı



Şekil 4.31. 5mM glukoz derişiminde Pt/POT/Chi+GOD/GAL ve Pt/POT/Chi+GOD+ ZnFe₂O₄/GAL elektrotunun tekrar kullanım kararlılığı

Şekil 4.30 incelendiğinde, ölçme sayısı arttıkça özellikle akımlarda çok azda olsa azalma olduğu ve bağl aktivitenin düştüğü görülmektedir. Akımlardaki bu düşmelerin zamanla enzim aktivitesindeki değişmeden kaynaklandığı söylenebilir. Pt/POA/Chi+GOD/GAL, Pt/POA/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL, Pt/POT/Chi+GOD/GAL, Pt/POT/Chi+GOD+ZnFe₂O₄/GAL elektrotları için 5 mM glukoz derişiminde 20 ölçme

sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla yaklaşık % 92; % 93; % 101; % 107'ünü koruduğu görülmektedir. Bal ve ark. (2012), paratoluensülfonatlı ortamda pirol kaplı platin elektrotun 16 ölçüm sonunda aktivitesini % 68 oranında koruduğunu gözlemlemiştir. Arslan ve ark. (2011), elektrokimyasal olarak polianilin-polivinilsülfanat (Pani-Pvs) filmler üzerine glukoz oksidazın immobilizasyonu ile elde edilen elektrotun 16 aktivite çalışmasından sonra akım değerlerinin % 75'inde olduğunu belirlemişlerdir. Can ve ark. (2010), sodyum para toluen sülfonat ortamında (NapTS) polipirol (PPy) sentezlenmiş ve sentez ortamında bulunan glukoz oksidaz (GOD) enziminin eş zamanlı olarak immobilize edilmesi ile Pt/PPy-GOD_{NapTS} elektrotu için 5, 10, 20 mM glukoz derişiminde 50 ölçme sonunda başlangıç aktivitesinin sırasıyla yaklaşık % 43,0; 39,5 ve 44,0'ını koruduğunu rapor etmişlerdir.

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanım kararlılığının kullanım sayısına bağlı olarak düşmesi genel olarak gözlenen bir durumdur. Ancak GOD sisteminde açığa çıkan H₂O₂ molekülü enzimi deaktive etmesine rağmen üretilir üretilmez oksidasyona uğradığından çok fazla etkilemez. Buna karşın meydana gelen glukonik asit enzimin mikro çevresinde pH'yı düşüreceğinden GOD'ı, dolayısıyla biyosensör elektrodun etkinliğini olumsuz yönde etkileyecektir. Glukoz derişimine bağlı olarak enzimin üreteceği glukonik asit miktarında meydana gelecek değişimde enzimin tekrar kullanım kararlılığını farklı oranda etkileyecektir (Can, 2010).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Çalışmada kolay, pratik bir şekilde hazırlanan modifiye edilmiş platin elektrotların glukozu duyarlı amperometrik biyosensör olarak kullanılabilecekleri belirlenmiştir.
- o-anisidin yapısında bulunan metoksi grubundaki oksijenin benzen halkasını aktive ettiğinden dolayı o-anisidin kaplı elektrotların akım değerleri o-toluidin kaplı elektrotlara göre daha yüksek çıkmaktadır. o-toluidin yapısında bulunan metil grubu ise halkayı deaktif etmektedir.
- Pt/POA/HCl/Ch₁+GOD/GAL, Pt/POA/HCl/Ch₁+GOD+ZnFe₂O₄/GAL, Pt/POT/HCl/Ch₁+GOD/GAL, Pt/POT/HCl/Ch₁+GOD+ZnFe₂O₄/GAL elektrotları hazırlanmış olup, en yüksek akım değerinin POA kaplı ZnFe₂O₄ nanopartikül içeren elektrot olduğu belirlenmiştir.
- ZnFe₂O₄ nanopartikülünün elektron transferini hızlandırarak akım değerlerini arttırdığı gözlenmiştir.
- Yüzeye POA ve POT kaplı Pt/POA/HCl/Ch₁+GOD/GAL, Pt/POA/HCl/Ch₁+GOD+ZnFe₂O₄/GAL, Pt/POT/HCl/Ch₁+GOD/GAL, Pt/POT/HCl/Ch₁+GOD+ ZnFe₂O₄/GAL şeklinde hazırlanan nanopartiküllü ve nanopartikülsüz elektrotların SEM görüntüleri ve dijital fotoğraflarla yüzeyin homojen olduğu ve ZnFe₂O₄ nanopartikülünün polimer filme bağlandığı ispatlanmıştır.
- En iyi sonuç alınan ZnFe₂O₄'ten başka ZnO, CuFe₂O₄Zn gibi metal oksit nanopartikülleri ile modifiye edilerek hazırlanan biyosensörlerin özelliklerinin geliştirilebileceği görülmüştür.
- Bu çalışma sentez koşullarının değiştirilmesi ile zenginleştirilebilir. Örneğin farklı elektrolit türleri denenebilir, sentez sıcaklığı optimize edilebilir. Ayrıca polimer film kalınlığının etkisi detaylı bir şekilde incelenebilir.
- Pt yerine C, Al, Au gibi farklı elektrot türleri kullanılabilir.
- Modifiye edilmiş elektrotlar sükröz ve laktoza karşı duyarlılığı araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Adhikari, B. and Majumdar, S., 2004. Polymers in sensor applications. **Progress in Polymer Science**, 29 (7): 699-766.
- Ahuja, T., Mir, I. A., Kumar, D., Rajesh, 2007. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, 28 (5):791-805.
- Ahmadalinezhad, A., Kafi, A.K.M., Chen, A., 2009. Glucose biosensing based on the highly efficient immobilization of glucose oxidase on a prussian blue modified nanostructured Au surface. **Electrochemistry Communications**, 11: 2048-2051.
- Albarghouthi, M., Fara, A.D., Saleem, M., El-Thaher, T., Matalka, K., Badwan, A., 2000. Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads. **International Journal of Pharmaceutics**, 206: 23-24.
- Arslan, F., Ustabaş, S., Aslan, H., 2011. An amperometric biosensor for glucose determination prepared from glucose oxidase immobilized in polyaniline polyvinylsulfonate film. **Sensors**, 11: 8152-8163.
- Aydoğdu, G., 2011. Çinko oksit modifiye karbon pasta enzim elektrotla glukoz tayini. Yüksek Lisans Tezi.
- Bal, Ö., 2012. Biyolojik sıvılardaki glukozun tayini için polipirol filme glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi.
- Borole, D.D., Kapadi, U.R., Mahulikar, P.P., Hundiware, D.G., 2004. Glucose oxidase electrodes of poly(o-anisidine), poly(o-toluidine) and their copolymer as a biosensor: a comparative study. **Polymer Advanced Technologies**, 41: 2183-2188.
- Barrera, C., Zhukov, I., Villagra, E., Bedioui, F., Pérez, M.A., Costamagna, J., Zagal, J.H., 2006. Trends in reactivity of unsubstituted and substituted cobalt-phthalocyanines for the electrocatalysis of glucoseoxidation. **Journal of Electronalytical Chemistry**, 589: 212-218.
- Can, F., 2010. Glukoz oksidaz enziminin iletken polimerlere immobilizasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi.
- Chen, C. Sun, C. and Gao, Y., 2008. Electrosynthesis of a net-like microstructured poly(p-aminophenol) film possessing electrochemical properties in a wide pH range. **Journal of Macromolecular Science**, 972-979.
- Devlin, T., 1997. **Text book of biochemistry with clinical correlations**, 136-139.
- Dervisevic, M., Çevik, E., Şenel, M., 2015. Development of glucose biosensor based on reconstitution of glucose oxidase onto polymeric redox mediator coated pencil graphite electrodes. **Enzyme and Microbial Technology**, 68: 69-76.
- Dispenza, C., Lo Presti, C., Belfiore, C., Spadaro, G. and Piazza, S., 2006. Electrically conductive polyaniline-hydrogel composites made of polyaniline nanoparticles and poly(N-vinyl-2-pyrrolidone). **Polymer**, 47, 961-971.
- Dodane, V. and Vilivalam, V.D., 1998. Pharmaceutical applications of chitosan. **PSTT**, 1(6): 246-263.

- Eftekhari, A. 2004. Electropolymerization of aniline onto passivated substrate and its application for preparation of enzyme-modified electrode. **Synthetic Metals**, 145: 211-216.
- Garg, S.K., Hoff, H.K., Chase, H.P., 2004. The role of continuous glucose sensors in diabetes care. **Endocrinology & Metabolism Clinics of North America**, 33: 163-173.
- Guibault, G.G., and Kauffmann, J.M., 1987. Enzyme-based electrodes as analytical tools. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 9: 95-113.
- Hooda, V., Gahlaut, A. Kumar, H. and Pundir, C.S. 2009. Biosensors based on enzyme coupled PVC reaction cell for electrochemical measurement of serum total cholesterol. **Sensors and Actuators B**, 136, 235-241.
- Jung, J., Lim, S., 2012. ZnO nanowire-based glucose biosensors with different coupling agents. **Applied Surface Science**, 265: 24-29.
- Józefowicz, M.E., Epstein, A.J., Pouget, Masters, J.G. Ray., A. And., Macdiarmid, A.G., 1991. X-RAY structure of the polyaniline derivative poly(o-toluidine): the structural origin of charge localization. **Macromolecules**, 24 (21):5863-5866.
- King, H., Aubert, R.E., Herman, W.H., 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025: Prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, 21: 1414-1431.
- Leznoff, C.C. and Lever, A.B.F. (eds), 1989. Phthalocyanines: properties and applications. VCH, New-York, A.B.D.
- 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.
- Mizutani, F., Yabuki, S., 1997. Rapid determination of glucose and sucrose by an amperometric glucose-sensing electrode combined with an invertase/mutarotase- attached measuring cell Biosens. **Bioelectron**, 12: 1013-1020.
- Oni, J., Diab, N., Reiter, S., Schuhmann, W., 2005. Metallophthalocyanine modified glassy carbon electrodes: effects of film formation conditions on electrocatalytic activity towards the oxidation of nitric oxide sens. **Actuators B**, 105: 208-213.
- Ozyilmaz, A. T., 2006a. The corrosion performance of polyaniline film modified on nickel plated copper in aqueous *p*-toluenesulfonic acid solution. **Surface and Coatings Technology**. 200, 3918-3923.
- Ozyilmaz, A. T., Erbil, M., Yazıcı, B., 2006b. The electrochemical synthesis of polyaniline on stainless steel and its corrosion performance. **Current Applied Physics**. 6, 1-9.
- Ozdemir, C., Yeni, F., Odacı, D., Timur, S., 2010. Electrochemical glucose biosensing by pyranose oxidase immobilized in gold nanoparticle-polyaniline/AgCl/gelatin nanocomposite matrix. **Food Chemistry**, 119, 380-385.
- Patil, D., Gaikwad, A. B., Patil, P., 2007. Poly(o-anisidine) films on mild steel: electrochemical synthesis and biosensor application. **Journal of Physics D: Applied Physics**, vol:40, no:8.

- Ren, J., Shi, W., Li, K., Ma, Z., 2012. Ultrasensitive platinum nanocubes enhanced amperometric glucose biosensor based on chitosan and nafion film. **Sensors and Actuators B**, 163:115-120.
- Retama, J.R., Cabarcos, E.L., Ruiz, B.L., 2005. High stability amperometric biosensor based on enzyme entrapment in microgels. **Talanta**, 68 (1): 99-107.
- Sljukic, B., Banks, C.E., Salter, C., Crossley, A., Compton, R.G., 2006. 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.
- Telefoncu A., 1986. İmmobilize enzimler ve immobilizasyon yöntemleri. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu, İzmir.1-16, 193-249.
- Telefoncu A., 1999. **Biyoreseptör immobilizasyonu**. Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu, Kuşadası, 42-61.
- Toppare, L., 2003. **Bilim ve Teknik Dergisi Yayınları**, Kasım, 86-87.
- Wang L., Gao X., Jin L, Wu Q., Chen Z.,Lin X.,2012. Amperometric glucose biosensor based on silver nanowires and glucose oxidase. **Sensors and actuators B: Chemical**, 176: 9-14.
- Wood, L.L., Hartdegen, F.J., Hahn, P.A., 1982. Enzymes bound to polyyurethane. **US Patent**, 4:342,834.
- 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.
- Xu, J.J., Zhang, X.Q., Yu, Z.H., Fang, H.Q., Chen, H.Y., 2001. A stable glucose biosensor prepared by co-immobilizing glucose oxidase into poly (p-chlorophenol) at a platinum electrode. **Analytical Chemistry**, 369 (6): 486-490.
- Yağız, E., 2015. Modifiye Karbon Pasta Elektrotlarının Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu, Karakterizasyonu ve Biyosensör Uygulamalarında Kullanımı. Doktora Tezi.
- Yang, Y., Yang, H., Yang, M., liu, Y., Shen, G., Yu, R., 2004. Amperometric glucose biosensor based on a surface treated nanoporous ZrO₂/chitosan composite film as immobilization matrix. **Analytica Chimica Acta**, 525: 213-220.
- Yasuzawa, M., Nieda, T., Hirano, T. ve Kunugi, A., 2000. Properties of glucose sensors based on the immobilization of glucose oxidase in N-substituted polypyrrole film Sens. **Actuators B**, 66: 77-79.
- Yoshimura, K. and Hozumi, K., 1996. Response characteristics of a glucose electrode with a sensing membrane prepared by plasma polymerization. **Microchemical Journal**, 53: 404-412.
- Zhang, S. and Gonsalves, K.E., 1995. Chitosan- Calcium carbonate composites by a biomimetic process. **Materials Science and Engineering: C**,3:117-124.
- Zhang, C., Gao., Q., Aizawa, M., 2001. Flow injection analytical system for glucose with screen-printed enzyme biosensor incorporating Os-complex mediator. **Analytica Chimica Acta**,426:33-41.

- Zhang, J., Shan, D. and Mu, S., 2007. A promising copolymer of aniline and maminofenol: Chemical preparation, novel electric properties and characterization. **Polymer**, 48, 1269-1275.
- Zhang H., Meng Z., Wang Q., Zheng J., 2011. A novel glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase incorporated in biomediated gold nanoparticles- carbon nanotubes composite film. **Sensors and ActuatorsB**, 158: 23-27.
- Zhao, W., Fang, Y., Zhu, Q., Wang, K., Liu, M., Huang, X., Shen, J., 2012. A novel glucose biosensor based on phosphonic acid-functionalized silica nanoparticles for sensitive detection of glucose in real samples. **Electrochimica Acta**, 89:278-283.
- Zheng, L., Li, J., Xu, J., Xiong, L., Zheng, D., Liu, Q., Liu, Y., Yang, S., Xia, J., 2010. Improvement of amperometric glucose biosensor by the immobilization of FcCD inclusive complex and carbon nanotube. **Analyst**, 135: 1339-1344.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1988 yılında Antakya’da doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini aynı ilde tamamlayarak aynı ilde 2007 yılında girdiği Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünden 2011 yılında mezun oldu. 2011 yılında girdiği Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü’nde Yüksek Lisans öğrenimine başladı ve 2015 yılında Eğitim Fakültesinden Formasyon eğitimi aldı. 2013 yılında girdiği Halis Yağ Gıda San. Ltd. Şti. ‘de halen çalışmaktadır.

