

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KERATİN/SİLİKA SOL-JEL TEMELLİ HİBRİT YÜZEYLERİN SENTEZİ VE
BİYOSENSÖR PLATFORMLARI OLARAK ETKİNLİKLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Tuğba SEZGİN ARSLAN

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

KERATİN/SİLİKA SOL-JEL TEMELLİ HİBRİT YÜZEYLERİN SENTEZİ VE BİYOSENSÖR PLATFORMLARI OLARAK ETKİNLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tuğba SEZGİN ARSLAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

Bu tez çalışmasında, sol-jel reaksiyonları kullanılarak üç farklı organik-inorganik kompozit kserojel sentezi, yapısal ve fizikokimyasal karakterizasyonu ve sensor matrisi olarak etkinliklerinin araştırılması hedeflenmiştir. Film oluşturulabilmesi, biyoyumlu olması ve içerdiği reaktif fonksiyonel gruplar nedeniyle, keratin gözenek oluşturucu şablon olarak kullanılmıştır. Sol-jel reaksiyonları için silika öncüsü olarak TEOS kullanılmış olup, öncelikle reaksiyon şartları optimize edilmiştir. Kırılabilirliği azaltmak ve film esnekliğini arttırabilmek için, sol-jellerin içerisine plastikleştirici bir poliol olan gliserol ilave edilmiştir. Organik-inorganik polimerik ağı genişletmek ve grafen oksit, bakır ve titanyum dioksit nanoparçacıkların bağlanması için daha çok aktif bölge oluşturmak suretiyle, reaksiyonlara borik asit dahil edilmiştir. Silika ve bor temelli tüm kserojeller ile SPCE yüzeylerinde film oluşturulmuştur. Yüzey karakterizasyonu tamamlanan kserojellerle modifiye edilmiş SPCE'lerin elektrokimyasal davranışları EIS ve CV metotları ile belirlenmiştir. İlaveten, enzim içermeyen hidrojen peroksit sensörleri olarak kullanım potansiyelleri amperometrik ölçümlerle araştırılmıştır. AFM, SEM ve BET analizleri sonucunda kserojel temelli tüm filmlerin geniş yüzey alanı, arttırılmış yüzey pürüzlülüğü ve gözeneklilik gibi sensör hassasiyeti ve performans artırıcı niteliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Kullanılan elektroanalitik teknikler neticesinde hidrojen peroksit karşı en iyi katalitik aktivite gösteren kserojelin GO-keratin/silika/bor olduğu sonucuna varılmıştır. Belirlenen sentez yöntemi, çok farklı nanopartiküllerin polimerik ağı kolayca ilave edilebilmesi açısından etkili ve kolay bir yöntemdir. Bu bağlamda, ilerleyen çalışmalar neticesinde iletkenlik özellikleri daha da geliştirilmiş kompozit kserojellerin sensör alt taşı olarak kullanım potansiyellerinin yüksek olacağı kanaatindeyiz.

Eylül 2023, 121 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyosensör, sol-jel, keratin, bor, silika, grafen oksit, titanyum dioksit, bakır, yüzey kimyası

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

SYNTHESIS OF KERATIN/SILICA SOL-GEL BASED HYBRID SURFACES AND EVALUATION OF THEIR EFFICACY AS BIOSENSOR PLATFORMS

Tuğba SEZGİN ARSLAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

In this thesis work, it was aimed at synthesizing of three different organic-inorganic composite xerogels, evaluating structural and physicochemical characteristics and investigating of their effectiveness as sensor matrices. Keratin was used as a pore-forming template because of features such as its ability to form a film, biocompatibility, and the possession of reactive functional groups. TEOS was used as the silica precursor for the sol-gel reactions, and the reaction conditions were optimized first. To reduce brittleness and increase film flexibility, glycerol, a plasticizing polyol, was added to the sol-gels. Boric acid was incorporated into the reactions to expand the organic-inorganic polymeric network and generate more active sites for the binding of graphene oxide, copper, and titanium oxide nanoparticles. Silica and boron-based xerogel films were formed onto the SPCE surfaces. In addition, their potential for use as non-enzymatic hydrogen peroxide sensors was investigated by amperometric measurements. As a result of AFM, SEM, and BET analyses, it was determined that all xerogel-based films have sensor sensitivity and performance-enhancing features such as large surface area, increased surface roughness, and porosity. It was concluded that the xerogel with the best catalytic activity against hydrogen peroxide was GO-keratin/silica/boron by using electroanalytical techniques. The designed synthesis method is an effective and easy method in terms of easily adding many different nanoparticles to the polymeric network. In this context, we believe that composite xerogels with improved conductivity, because of further studies, will have a high potential to be used as sensor matrices.

September 2023, 121 pages

Key Words: Biosensor, sol-gel, keratin, boron, silica, graphene oxide, titanium dioxide, copper, surface chemistry

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması boyunca bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek engin fikirleriyle yetişmeye ve gelişmeye katkıda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Emel EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı),

Elektrokimya konusunda bilgi ve desteğini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Kaan Cebesoy EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi, Kimya Bölümü),

Tez izleme komitesinde yer alarak değerli görüşleri ile araştırmanın şekillenmesini sağlayan Prof. Dr. Fatma ARSLAN (Gazi Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı) ile Doç. Dr. Burak DERKUŞ (Ankara Üniversitesi, Kimya Bölümü) hocalarıma,

Sol-jel reaksiyonları konusunda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Doç. Dr. Uğur CENGİZ'e (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı), Çalışmanın uygulama sürecinde desteklerini esirgemeyen tüm ekip arkadaşlarıma (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü Regeneratif Biyomalzemeler Laboratuvarı),

Çalışmalarımın her aşamasında maddi ve manevi olarak yanımda olan, zor zamanlarımda desteğini hep hissettiğim sevgili eşim Yavuz Emre ARSLAN'a,

Maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, ilgi ve sevgilerini hep hissettiğim haklarını asla ödeyemeyeceğim annem, babam ve kardeşime,

Her şeyden önce beni anne yapan, en büyük motivasyon kaynağım, canım kızım Ela ARSLAN'a

Doktora tez çalışmamı YÖK (100/2000 Doktora Programı) ve TÜBİTAK (BİDEP 2211-A Yurt İçi Genel Doktora Burs Programı) bursiyeri olarak tamamlamış bulunmaktayım. Maddi desteklerinden dolayı adı geçen kurumlara,

En derin duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Tuğba SEZGİN ARSLAN
Ankara, Eylül 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Biyosensörlere Genel Bir Bakış.....	4
2.2 Enzim İçermeyen Amperometrik H ₂ O ₂ Sensörler	6
2.3 GO ve Özellikleri.....	8
2.4 TiO ₂ ve Özellikleri.....	9
2.5 Sol-Jel Tekniği	9
2.6 Sol-Jel Temelli Biyosensörler	14
2.7 Keratin ve Özellikleri.....	16
2.8 Kaynak Araştırması.....	17
3. ÇALIŞMANIN AMACI	24
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
4.1 Materyaller	25
4.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler	25
4.1.2 Kullanılan cihazlar	25
4.2 Yöntem	27
4.2.1 Koyun yününden keratin ekstraksiyonu.....	27
4.2.2 Koyun yünü keratininin biyokimyasal analizi	28
4.2.3 Sol-jel temelli keratin/silika/bor kompozit kserojellerin üretimi için reaksiyon şartlarının optimizasyonu.....	30
4.2.4 Bakır ile katkılanmış keratin/silika/bor (Cu-keratin/silika/bor) Kserojel Sentezi	33
4.2.5 TiO ₂ ile katkılanmış keratin/silika/bor (TiO ₂ -keratin /silika/bor) kserojel Sentezi	34
4.2.6 GO ile katkılanmış keratin/silika/bor (GO-Keratin/silika/bor) kserojel sentezi.....	35
4.2.7 Sentezlenen organik-inorganik kompozit kserojellerin yapısal ve fizikokimyasal karakterizasyonu	36
4.2.8 SPCE yüzeylerde inorganik-organik kompozit kserojel temelli film üretimi için optimizasyon çalışmaları.....	37
4.2.9 Temas açısı analizi	38
4.2.10 Kompozit filmlerin yüzey karakterizasyonu	38
4.2.11 Elektrokimyasal davranışın incelenmesi	39
4.2.12 Enzimatik olmayan H ₂ O ₂ sensörleri olarak etkinliğin araştırılması.....	39
4.2.13 İstatistiksel analiz	42

5. BULGULAR	43
5.1 Koyun Yünü Keratininin Biyokimyasal Karakterizasyonu	43
5.2 Sol-Jel Reaksiyon Şartlarının Optimizasyonu	47
5.2.1 Keratin/silika kompozit kserojel sentezi	47
5.2.2 Keratin/silika/bor kompozit kserojel sentezi	48
5.2.3 Cu-keratin/silika/bor kompozit kserojel sentezi	49
5.2.4 TiO ₂ - keratin/silika/bor kompozit kserojel sentezi	51
5.2.5 GO- keratin/silika/bor kompozit kserojel sentezi	52
5.3 İnorganik-Organik Kompozit Kserojellerin Yapısal ve Fizikokimyasal Karakterizasyonu	53
5.3.1 FT-IR analizi	53
5.3.2 Katı hal ²⁹ Si-CP-Mas ve ¹¹ B-MAS NMR spektroskopisi.....	59
5.3.3 Raman spektroskopisi.....	60
5.3.4 X-Işını Difraktometresi (XRD) analizi	63
5.3.5 BET analizi	68
5.3.6 Termogravimetrik analiz.....	71
5.4 SPCE Yüzeylerde İnorganik-Organik Kompozit Kserojel Temelli Film Üretimi İçin Optimizasyon Çalışmaları	73
5.5 Kompozit Filmlerin Yüzey Karakterizasyonu	76
5.5.1 Temas açısı analizi	76
5.5.2 AFM analizi	77
5.5.3 FE-SEM/EDS analizi	79
5.6 Elektrokimyasal Davranışın İncelenmesi	89
5.7 Amperometrik Ölçümler	93
5.7.1 Çalışma potansiyelinin belirlenmesi.....	93
5.7.2 Çalışma pH'sının belirlenmesi	94
5.7.3 Tüm elektrotların H ₂ O ₂ hassasiyetinin belirlenmesi ve kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması	95
5.7.4 LOD değerinin belirlenmesi	97
5.7.5 Yeniden üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve raf ömrü testleri.....	98
5.7.6 Tüm kserojellerle modifiye edilmiş SPCE'lerin H ₂ O ₂ varlığında elektrokatalitik performanslarının değerlendirilmesi.....	101
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	104
KAYNAKLAR	108
ÖZGEÇMİŞ	119

SİMGELER DİZİNİ

E	Potansiyel
$\text{Fe(CN)}_6^{4-/3}$	Potasyum ferrosiyanür ve potasyum ferrisiyanür
I	Akım yoğunluğu
kDa	Kilo Dalton
M	Molarite
mA	Miliamper
mM	Milimolar
mmol	Milimol
mV	Milivolt
N	Normalite
R_{ct}	Yük transfer direnci
t	Süre
V	Volt
Z	İmpedans
μA	mikroamper
Ω	Ohm

Kısaltmalar

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
BET	Brunauer - Emmett - Teller
BSA	Sığır Serum Albümin
CV	Dönüşümlü voltametri
EDS	Enerji dağılımlı X-ışını spektrometresi
EIS	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
FE-SEM	Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu
GA	Glutaraldehit
GO	Grafen oksit
KYK	Koyun yünü keratini
LOD	Dedeksiyon limiti
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
RFU	Bağlı floresans birimi
RSD	Bağlı standart hata
rTEOS	Reaktif TEOS
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi
SPCE	Ekran baskılı karbon elektrotlar
TEOS	Tetra etoksi silan
TGA	Termo Gravimetrik Analiz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Elektrokimyasal sensörün şematik diyagramı	4
Şekil 2.2 Sol-jel işlemi reaksiyon basamakları	10
Şekil 2.3 Silisyum alkoksitlerin a. Asit, b. baz katalizli kondenzasyon reaksiyon mekanizmaları	11
Şekil 2.4 Sol-jel sürecinin farklı aşamalarının şeması	12
Şekil 2.5 Koloidal soldan sentezlenen a. kserojel filmler, b. toz formda kserojeller.....	13
Şekil 4.1 Sülfitolizis reaksiyonu ile alkali ortamda gerçekleştirilen KYK ekstraksiyon aşamaları.....	28
Şekil 4.2 rTEOS hazırlık aşamaları.....	30
Şekil 4.3 Keratin /silika kompozit kserojel sentezi.....	32
Şekil 4.4 Keratin /silika/bor kompozit kserojel sentezi	33
Şekil 4.5 Cu-Keratin/silika/bor kompozit kserojel sentezi	34
Şekil 4.6 TiO ₂ -keratin/silika/bor kompozit kserojel sentezi	35
Şekil 4.7 GO-keratin/silika/bor kompozit kserojel sentezi	35
Şekil 5.1 Sülfitolizis reaksiyonu	43
Şekil 5.2 Qubit ile florometrik ölçümlerle elde edilen keratin standart kalibrasyon grafiği	44
Şekil 5.3 SDS-PAGE analizi.....	45
Şekil 5.4 L-sistein standart kalibrasyon grafiği.....	46
Şekil 5.5 Farklı oranlarda rTEOS ile yapılan keratin/silika kserojel temelli kompozit filmlerin makro fotoğrafları.....	47
Şekil 5.6 Çeşitli hacimlerde gliserol ilavesi ile yapılan keratin/silika kserojel temelli kompozit filmlerin makro fotoğrafları.....	48
Şekil 5.7 Cu-keratin/silika/bor temelli hibrit hidrojelde oluşan inorganik ve organik ağların muhtemel şeması	50
Şekil 5.8 TiO ₂ -keratin/silika/bor temelli hibrit hidrojelde oluşan inorganik ve organik ağların muhtemel şeması	51
Şekil 5.9 GO-keratin/silika/bor temelli hibrit hidrojelde oluşan inorganik ve organik ağların muhtemel şeması	52
Şekil 5.10 ATR-FTIR analiz sonuçları	53
Şekil 5.11 ATR-FTIR analiz sonuçları	55
Şekil 5.12 ATR-FTIR analiz sonuçları	56

Şekil 5.13 ATR-FTIR analiz sonuçları	58
Şekil 5.14 Keratin/silika/bor temelli kserojellerin ²⁹ Si-CP-MAS ve ¹¹ B-MAS NMR spektrumları	59
Şekil 5.15 Keratin/silika ve keratin/silika/bor kserojellerin Raman spektrumları	60
Şekil 5.16 Cu-keratin/silika/bor ve keratin/silika/bor kserojellerin Raman spektrumları	61
Şekil 5.17 TiO ₂ -keratin/silika/bor ve keratin/silika/bor kserojellerin Raman spektrumları	62
Şekil 5.18 GO-keratin/silika/bor, GO ve keratin/silika/bor kserojellerin Raman spektrumları	63
Şekil 5.19 XRD analiz sonuçları	64
Şekil 5.20 XRD analiz sonuçları	65
Şekil 5.21 Cu-keratin/silika/bor kserojel için XRD analiz sonuçları	66
Şekil 5.22 XRD analiz sonuçları	67
Şekil 5.23 XRD analiz sonuçları	68
Şekil 5.24 Azot adsorpsiyon izotermi	69
Şekil 5.25 BJH gözenek boyutu dağılım eğrileri	71
Şekil 5.26 Koyun yünü keratini ve kompozit kserojellerin TGA ve DTG eğrileri	72
Şekil 5.27 Çeşitli konsantrasyonlarda GA ile cam yüzeylerde hazırlanan keratin/silika/bor kserojel temelli kompozit filmlerin yıkama öncesi ve sonrası stereo mikroskop görüntüleri	73
Şekil 5.28 0,3 M GA ile hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki keratin/silika/bor kserojellerle modifiye edilmiş SPCE yüzeylerin yıkama öncesi ve sonrası stereomikroskop görüntüleri	74
Şekil 5.29 SPCE yüzeylerin kserojellerle modifikasyonu	75
Şekil 5.30 Cu, TiO ₂ ve GO ile katkılanmış keratin/silika/bor kompozit kserojel ile modifiye edilmiş SPCE yüzeylerin yıkama öncesi ve sonrası stereomikroskop görüntüleri	75
Şekil 5.31 AFM görüntüleri	78
Şekil 5.32 a. Kaplanmamış SPCE'nin yüzey aktivasyonu öncesi, b. sonrası soldan sağa sırasıyla 500x, 1500x ve 5000x büyütmelelerdeki SEM mikrografileri (Ölçek çubukları 500x ve 1500x büyütme için 10µm'yi, 5000x için ise 1µm'yi göstermektedir. Turuncu oklar ile gösterilen parlak yapılar pul benzeri grafit düzlemleri, mavi oklarla gösterilen nispeten koyu bölgeler ise grafitik karbon ve amorf karbondan oluşan yapıları temsil etmektedir)	81
Şekil 5.33 a. Kaplanmamış SPCE'nin yüzey aktivasyonu öncesi, b. sonrası EDS spektrumları	82

Şekil 5.34 a. Keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE yüzeylerinin soldan sağa sırasıyla 500x, 5000x ve 20000x büyütmelelerdeki SEM mikrografileri (Ölçek çubukları 500x büyütme için 10µm'yi ve 5000x ve 20000x için ise 1µm'yi göstermektedir), b. EDS spektrumu.....	84
Şekil 5.35 Farklı iki konsantrasyonda CuSO ₄ .5H ₂ O ile sentezlenmiş Cu-keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE yüzeylerinin soldan sağa sırasıyla 500x ve 1500x büyütmelelerdeki SEM mikrografileri (Ölçek çubukları 10µm'yi göstermektedir) ve EDS spektrumları	85
Şekil 5.36 a. TiO ₂ -keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE yüzeylerinin soldan sağa sırasıyla 500x, 1500x ve 5000x büyütmelelerdeki SEM mikrografileri (Ölçek çubukları 500x ve 1500x büyütme için 10µm'yi, 5000x için ise 1 µm'yi göstermektedir), b. EDS spektrumları, c. Si, B ve TiO ₂ için elementel haritalama.....	87
Şekil 5.37 a. GO-keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE yüzeylerinin soldan sağa sırasıyla 500x, 1500x ve 5000x büyütmelelerdeki SEM mikrografileri (Ölçek çubukları 500x ve 1500x büyütme için 10µm'yi, 5000x için ise 1 µm'yi göstermektedir), b. EDS spektrumları, c. Si ve B için elementel haritalama	88
Şekil 5.38 SPCE yüzeylerinin temizlenme ve aktivasyon işlemi sonunda elde edilen voltamogram.....	89
Şekil 5.39 İki farklı konsantrasyonlardaki tüm kserojeller için elde edilen Nyquist eğrileri ve voltamogramlar	91
Şekil 5.40 2mg/ml konsantrasyonda hazırlanan kserojeller ile kaplanmış SPCE'lerin Nyquist eğrileri ve voltamogramları	92
Şekil 5.41 Çalışma potansiyelinin araştırılması.	94
Şekil 5.42 Çözelti pH 'sının a. Cu-keratin/silika/bor, b. TiO ₂ -keratin/silika/bor, c. GO-keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE'lerin 0,5mM H ₂ O ₂ 'ye karşı verdikleri akım cevabının etkisi.....	95
Şekil 5.43 Kaplanmış ve kaplanmamış tüm SPCE yüzeylerinde H ₂ O ₂ 'ın oksidasyonu neticesinde elde edilen akım cevaplarına ilişkin a. kalibrasyon, b. zaman-akım grafikleri	96
Şekil 5.44 LOD değerlerinin belirlenmesi çalışması.	98
Şekil 5.45 Tüm kserojellerle kaplanmış SPCE'lerle yapılan a. yeniden üretilebilirlik, b. stabilite testlerine ilişkin grafikler	100
Şekil 5.46 Farklı pH'larda PBS içerisinde a. Cu-keratin/silika/bor, b. TiO ₂ -keratin/silika/bor, c. GO-keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE'ler ile 0,025 mM H ₂ O ₂ varlığında elde edilen voltamogramlar.....	101

Şekil 5.47 Tüm kserojellerle kaplanmış ve kaplanmamış SPCE'ler ile optimum pH'larda PBS içerisinde, H ₂ O ₂ varlığında ve yokluğunda elde edilen voltamogramlar	103
---	-----



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 KYK konsantrasyonu ve rTEOS oranı optimizasyonu	31
Çizelge 4.2 Gliserol ve rTEOS oranı optimizasyonu	31
Çizelge 5.1 Üretilen kompozit kserojellerin yüzey alanı ve ortalama por çapı	70
Çizelge 5.2 Cam ve SPCE yüzeylerde kserojel temelli kompozit filmlerin denge temas açıları.....	77
Çizelge 5.3 Yüzey pürüzlülüğü parametreleri	79



1. GİRİŞ

Biyokimyasal tepkileri elektrik sinyallerine dönüştürebilen biyouyumlu, esnek ve kararlı malzemeler; biyolojik yapıların düzensiz yüzeyine uyum sağlayabilen elektrokimyasal sensörler üretmek için büyük önem taşımaktadır. Diğerleri arasında, yün ve insan saçlarından ekstrakte edilen keratinler, yüksek teknolojik potansiyele sahip biyo-polimer sınıfındırlar. Hücresel tanıma ve davranışı düzenlemek için kendi kendine birleştirilmiş düzenlemeler oluşturan keratin ile ilgili ilaç iletimi ve doku mühendisliği alanlarında yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Bununla birlikte, film oluşturulabilmesi ve düşük yüzeysel pürüzlülük, yüksek şeffaflık, düşük sıcaklıkta işleme gibi bazı avantajları sebebiyle keratinin biyo-sensör uygulamalarında da kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Natali ve ark., 2019).

Silika ile modifiye edilmiş elektrotlar, malzeme özellikleri ile ilgili çekici özellikler sunmaktadırlar. Örneğin, reaktivite ve tanıma yeteneğini ayarlamak için organo fonksiyonel grupların olası kovalent bağlanmasını sağlamaktadırlar, hızlı kütle taşınması için gözenekli sağlam inorganik çerçeve olarak davranmaktadırlar ve aktif biyo-moleküller veya nano nesneler için konakçı görevi görmektedirler (Walcarius 2018). Borik asit içeren bileşiklerin kullanımı ise, son zamanlarda malzeme bilimi, analitik kimya, biyokimya ve farmakoloji gibi bir dizi alanda artan ilgi görmüştür. Özellikle, bor bileşikleriyle şekerler, proteinler ve peptitler gibi biyomoleküller arasındaki etkileşimlere odaklanan çok sayıda çalışma son yıllarda bildirilmiştir (Hattori vd. 2017).

Sol-jel tekniği, implant ve sensör olarak kullanılmaya uygun biyo-aktif kaplamalar, tozlar ve substratlar üretmek için kullanılmaktadır. Bu teknik ile hibrit malzemeler üretilerek hem organik hem de inorganik özellikler birleştirilebilmektedir (Kakkar ve Madhan 2016).

Hidrojen peroksit (H_2O_2), oksidaz enzimleri tarafından katalize edilen reaksiyonlarda üretilen elektroaktif türlerden biridir (Bilgi Kamac vd. 2020) ve tayini kimyasal, biyolojik, klinik ve diğer birçok alanda pratik öneme sahiptir (F. Arslan vd. 2006).

H₂O₂'nin elektrokimyasal tespiti, enzimatik ve enzimatik olmayan yaklaşımlarla gerçekleştirilebilmektedir.

Enzimatik elektrokimyasal sensörler, seçicilik ve hassasiyet açısından üstün performansa sahip olmalarına rağmen, enzimlerin immobilizasyon sürecinin karmaşıklığı ve enzim aktivitesinin çevresel koşullara bağlı olması (sıcaklık, pH, nem ve diğer kimyasallar vs.) gibi bazı dezavantajları vardır. Bu nedenle son zamanlarda enzim içermeyen H₂O₂ sensörlerinin geliştirilmesine daha fazla dikkat çekilmiştir (Shamkhalichenar ve Choi 2020). Bu sensör tipinde, H₂O₂ doğrudan elektrot malzemesi ile etkileşime girmektedir. H₂O₂ ve elektrot malzemesi arasında meydana gelen belirli katalitik işlemler, net bir elektrokimyasal tepki ve sonuç olarak sensörün seçiciliğini sağlamaktadır. Nanoyapılı malzemeler, elektrotun çalışma yüzeyi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. En yaygın olanları geçiş metali nanoparçacıkları, karbon nanotüpler, metal oksitler, grafen ve mezoporoz karbondur (Mihailova vd. 2022). Nanoyapılı Pt, Pd, Au, Ag ve bunların alaşımları gibi soy metalik nanoyapılar, üstün elektrokatalitik aktiviteleri nedeniyle enzimatik olmayan hidrojen peroksit sensörlerinin yapımı için mükemmel malzemelerdir. Bununla birlikte, pahalı ve kaynaklarının da sınırlı olması nedeniyle uygulama alanları kısıtlıdır. Son yıllarda, CuO, CuS, Fe₃O₄, MnO₂, MoS₂, NiO ve TiO₂ gibi çok daha ucuz geçiş metali bileşik nanomalzemeler de bu amaçla kullanılmaya başlanmıştır (He ve ark., 2014). İlaveten, bahsi geçen nano yapıları malzemeler sol-jel matrisleri içerisine kolaylıkla ilave edilebilmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, sol-jel yöntemi kullanılarak grafen oksit katkılı keratin/silika/bor (GO-keratin/silika/bor), bakır katkılı keratin/silika/bor (Cu-keratin/silika/bor) ve TiO₂ katkılı keratin/silika/bor (TiO₂-keratin/silika/bor) kompozit kserojelerin sentezi, yapısal karakterizasyonu ve sensör alt taşı olarak kullanım potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir. Gözenek oluşturu makromoleküler katkı maddesi olarak kullanılan keratin, koyun yününden ekstrakte edilmiş ve biyokimyasal tekniklerle karakterize edilmiştir. Sentezlenen toz formdaki tüm kserojeller alkali çözeltiler içerisinde dağıtıldıktan sonra ekran baskılı karbon elektrotlar (SPCE) üzerine damlatılarak modifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilen SPCE'lerin elektrokimyasal davranışları dönüşümlü voltametri (CV) ve Elektrokimyasal İmpedans

Spektroskopisi (EIS) ile belirlenmiş olup, enzimatik olmayan hidrojen peroksit sensörleri olarak etkinliği ise yapılan amperometrik ölçümler ile değerlendirilmiştir. İlaven, sensör performansını belirleyen lineer aralık, dedeksiyon limiti (LOD), tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve raf ömrü gibi çeşitli parametreler de araştırılmıştır.

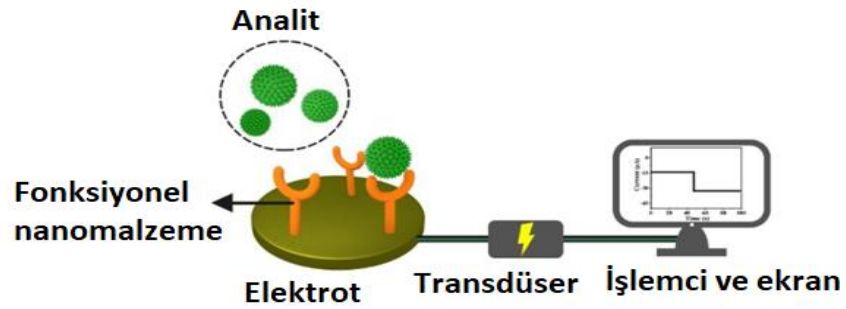


2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Biyosensörlere Genel Bir Bakış

Çeşitli alan ve uygulamalardaki önemleri nedeniyle biyosensörler, bilim insanlarının büyük ilgisini çekmeye devam etmektedir. Biyosensör, bir analitin konsantrasyonuyla ilgili ölçülebilir bir sinyal üretebilen fiziksel, optik, kütle veya elektrokimyasal transdüserlerle yakın temas halinde olan bir protein, antijen, antikor, DNA veya RNA gibi biyolojik bir algılama elemanından oluşan analitik bir cihazdır (**Şekil 2.1**)(Ju vd. 2011). Elektrokimyasal biyosensörler, büyük analitik enstrümanlar gerektirmemesi, düşük yanıt süreleri, yüksek hassasiyetleri, seçicilikleri, tekrarlanabilirlikleri, hedef analitlerin gerçek zamanlı takibi ve bakım kolaylığı nedeniyle çevre, gıda endüstrisi ve biyomedikal alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Hughes vd. 2019).

Pratik elektriksel analiz ve algılamada, genellikle referans, çalışma ve karşıt olmak üzere üç elektrotlu sistem kullanılmaktadır. Çalışma elektrodu genellikle metal, metal oksit veya karbondur. Ölçülen analite olan seçiciliği arttırmak ve elektrotu analiz gereksinimlerini karşılayacak şekilde değiştirmek için genellikle fonksiyonel nanomalzemeler kullanılmaktadır.



Şekil 2.1 Elektrokimyasal sensörün şematik diyagramı (**Wei vd. 2020** 'den değiştirilerek alınmıştır)

Elektrokimyasal ölçüm teknolojisindeki kullanılan temel yöntemler arasında CV, EIS, doğrusal taramalı voltametri (LSV), diferansiyel puls voltametri (DPV) ve kromoamperometri gibi yöntemler sayılabilir. Tüm sistemler elektrokimyasal

reaksiyonların özellikleri, mekanizması ve elektrot ile analit arasındaki elektron alışveriş süreçlerine yönelik araştırma yapmaya imkan sağlamaktadır (Wei vd. 2020).

EIS, antikor-antijen ve substrat-enzim etkileşimi veya tam hücre tutunması gibi elektrot yüzeyinde meydana gelen biyo-tanım olaylarıyla ilgili arayüz özelliklerinin analizi için kullanılan güçlü bir tekniktir. Bu yöntemde, geniş bir AC potansiyel frekans aralığında (0,1Hz-100kHz) ölçülen impedimetrik yanıtlar ile biyomolekülün immobilizasyonu sonucunda meydana gelen fizikokimyasal değişiklikler ve ayrıca malzemelerin iletkenlik özellikleri hakkında yararlı bilgiler elde edilmektedir (Magar vd. 2021). Elektrokimyasal kompleks empedans (Z), genel olarak sırasıyla bir elektrolitik hücrenin direncinden ve kapasitansından kaynaklanan gerçek (Z_{real}) ve hayali (Z_{imag}) bileşenlerin toplamı olarak temsil edilebilmektedir. Bode grafiği ve Nyquist grafiği, yaygın olarak kullanılan iki tür empedans grafiği olup, Nyquist grafiğinin yarım daire kısmı kapasitans ve direnç hakkında bilgi verirken, lineer kısım difüzyon etkilerini göstermektedir (Derkus vd. 2014a).

CV, elektrokimyadaki en kullanışlı tekniklerden biridir. Bu teknikte, katalizörlerin elektrokimyasal tepkisi, elektrolit ile etkileşimi ve katalitik aktivitesi hakkında hızlı bir şekilde nitel bilgiler elde edilmektedir. Bu yöntemle, çalışma elektroduna hem ileri hem de geri yönde bir potansiyel uygulandığında ortaya çıkan akım, tek bir döngü veya çoklu döngüler olarak kaydedilebilmektedir. İlaveten, anodik ve katodik pik potansiyelleri, akımları ve yarım pik potansiyelleri elde edilebilmektedir (Bakirhan vd. 2017, S. Li ve Thomas 2019).

Bu alanda popüler olan, bir diğer elektroanalitik yöntem amperometridir. Amperometrik sensörlerde, uygulanan sabit bir potansiyel altında redoks reaksiyonlarının bir sonucu olarak meydana gelen akım değişiklikleri değerlendirilir. Akım yoğunluğundaki bu değişiklikler stokiometrik olarak analitlerin konsantrasyonuyla ilişkilidir (Tong vd., 2023).

Genellikle elektrokimyasal olarak ölçülebilir bir akım sinyali üretmek için redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerin kullanıldığı birinci nesil amperometrik sensörler, nispeten basit tasarımları, düşük maliyetleri ve çeşitli enzimlerle çalışabilmeleri nedeniyle yaygın uygulama alanları bulmuşlardır.

İlaveten, redoks akımlarını temel alan diğer sensör mekanizmalarına kıyasla düşük konsantrasyonlarda daha doğru ölçümler sağlamaktadırlar (Labban vd. 2019). Son yıllarda, glikoz dehidrogenaz (GDH) veya glukoz oksidaz (GOx) temelli amperometrik biyosensörler, yüksek seçicilikleri, hassasiyetleri ve düşük tespit limitleri nedeniyle glukoz ölçümü için en güçlü cihazlardan biri haline gelmiştir. Bu ölçümde, spesifik bir oksidaz enzimi, hedef analit ile oksijen arasındaki reaksiyonu katalize ederek H_2O_2 üretimine neden olmaktadır. Ortaya çıkan H_2O_2 daha sonra çalışma elektrodunda oksitlenmektedir ve oksidasyon sonucunda mevcut analit miktarıyla doğru orantılı bir akım üretilmektedir. Geleneksel enzimatik sensörler için, yukarıda bahsedildiği gibi enzim, (GOx, GDH, vb.) elektrot üzerinde elektrokatalizör olarak kullanılmaktadır. Enzimatik olmayan sensörler için, modifikasyon malzemelerinin yüzeyindeki atomlar veya elektrotların kendileri elektrokatalizör görevi görmektedir. Metal temelli (özellikle Pt, Au ve Ni) glikoz sensörlerinin, enzimatik olmayan sensörlerde en yoğun şekilde çalışılan katalizörler olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, Pt ve Au elektrotlarının yaygın uygulamaları, klorür zehirlenmesi riskleri ve yüksek maliyetleri nedeniyle sınırlandırılmıştır (Zhu vd. 2016).

2.2 Enzim İçermeyen Amperometrik H_2O_2 Sensörler

H_2O_2 'nin çevre, farmasötik, klinik, tekstil, gıda üretimi ve madencilik gibi çeşitli alanlarda yaygın şekilde kullanılması, onu analitik kimyada önemli bir analit haline getirmiştir. İlaveten, alkol oksidaz (AlOx), GOx, laktat oksidaz (LOx), kolesterol oksidaz (ChoOx) gibi bazı enzimatik biyokimyasal reaksiyonlarda üretilen bir yan üründür. Bu nedenle H_2O_2 'nin hızlı, güvenilir ve uygun maliyetli yaklaşımlarla doğru ve kesin olarak belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (Gholami ve Koivisto 2019). H_2O_2 'nin belirlenmesinde titrimetri, spektrometre ve kemilüminesans gibi çeşitli analitik teknikler geliştirilmiştir. Ancak bu tekniklerin çoğu düşük verimlilikte ve hassasiyette olup genellikle

karmaşık, pahalı ve zaman alıcıdır. Elektroanalitik yöntem (özellikle enzim temelli sensörler), nispeten düşük maliyeti, daha iyi verimliliği, kullanım kolaylığı, yüksek hassasiyeti, düşük tespit limiti ve hızlı tepkisi nedeniyle tercih edilen alternatif bir yöntemdir (J. Wang vd. 2015). Ancak elektrot yüzeyinde enzimin denatürasyonu nedeniyle aktivite kaybı yaşanabilmektedir. Bu nedenle, enzim temelli sensörlerin, zayıf aktivite, düşük tekrarlanabilirlik ve kararlılık gibi bazı dezavantajları olabilmektedir (Sahin 2015). Tüm bu dezavantajlar sebebiyle, son zamanlarda enzim içermeyen H_2O_2 sensörlerinin geliştirilmesine daha fazla dikkat çekilmiştir.

Enzim içermeyen sensörler tasarlanırken karşılaşılan en önemli zorluklar arasında, yüksek çalışma potansiyeli, öngörülemeyen redoks reaksiyonları, yavaş elektrokinetik, ara ürün zehirlenmesi ve zayıf algılama gibi parametreler sayılabilir. Bu nedenle, bilim insanları enzimatik olmayan sensörlerin üretimi için yüksek iletkenliğe, verimli katalitik aktiviteye ve mükemmel fiziksel ve kimyasal güce sahip yeni nanomalzemelerin keşfedilmesi için çaba göstermektedir (Thatikayala vd. 2020).

Son zamanlarda, nanoteknolojik alanların da hızla gelişmesiyle birlikte, enzimatik olmayan H_2O_2 sensörlerde kullanılmak üzere çeşitli morfolojilerde, çok işlevli nanomalzemelerin üretimi için farklı stratejiler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu stratejilerden ilki, nanotüpler, nanoçiçekler ve nanokümeler gibi farklı şekillerde, küçük boyutlu ve gözenekli değerli metal malzemelerin nanoteknoloji kullanılarak sentezidir. Metallerin, inorganik karbon malzemelerinin, metal-organik çerçeve'lerin (MOF'lerin) ve organik malzemelerin tek başlarına ve/veya birlikte kullanımı ise geliştirilen ikinci stratejidir. Elektrokimyasal aktif bölgenin açığa çıkarılması için elektrot veya nanomalzeme yüzeyinin pürüzlülüğünü arttırmak ise geliştirilen üçüncü stratejidir (Wei vd. 2020).

Özellikle metaller (Pd, Pt, Au, Ni), karbon temelli malzemeler (karbon nanotüpler, grafen, grafen oksitler, nitrojen katkılı grafen), geçiş metali oksitler (CuO , CuS , Fe_3O_4 , MnO_2 , MoS_2 , NiO ve TiO_2) veya iletken polimerlerden (polipirol, polianilin) oluşan elektrokimyasal olarak aktif nanomalzemeler, büyük yüzey-hacim oranına ve artan katalitik aktivitelere sahip olduklarından, enzimatik olmayan elektrokimyasal sensörler

için kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (M. J. Song vd. 2010). İlâveten, karbon nanotüpler (CNT), GO ve indirgenmiş grafen oksit (rGO) gibi karbon temelli nanomalzemeler, kolay sentezlenebilmeleri, suda iyi dağılım göstermeleri, biyolojik uyumlulukları ve yüksek iletkenlikleri nedeniyle biyosensör üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır (Kıymaz Onat vd. 2023).

2.3 GO ve Özellikleri

Benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikleri ile grafen nanoelektronik, nanokompozitler, piller, sensörler ve güneş pilleri gibi birçok teknolojik alandaki potansiyel uygulamaları nedeniyle oldukça dikkat çekmektedir. Son yıllarda grafen temelli analitik sistemler oldukça aktif bir alan haline gelmiştir. Grafen, farklı malzemelerin immobilizasyonu için çok geniş bir yüzey alanına sahip olmakla birlikte elektrot ve analitler arasındaki elektron transferini etkili bir şekilde teşvik edebilmektedir (Peng vd. 2014). Grafenin bir türevidir olan GO, mükemmel dağılılabilirlik, iyi biyoyumluluk ve kolay yüzey işlevselliği gibi benzersiz özelliklerinden dolayı büyük önem taşımaktadır. GO, uçlarda karboksil, hidroksil ve keton grupları gibi reaktif gruplar ile düzlem içinde hidroksi ve epoksi grupları içermektedir. Farklı reaktivite yetenekleri nedeniyle, GO'daki bu fonksiyonel gruplar, spesifik ve seçici moleküller kullanılarak değiştirilebilmektedir. Kenarlardaki karboksil grupları, modifikasyonlara en uygun olanlarıdır; ancak hidroksil ve epoksit grupları da seçici olarak değiştirilebilmektedir. GO'da hidroksi gruplarının varlığı, onun suda dağılmasına ve kondenzasyon reaksiyonlarında kullanılmasına imkan vermektedir. Bu özellik, GO'yu sulu ortamda sol-jel reaksiyonları için ilginç ve uygun bir öncü yapmaktadır (Hintze vd. 2016). Ayrıca, GO, kovalent olmayan etkileşimler (elektrostatik etkileşimler veya Van der Waals kuvvetleri gibi) yoluyla farklı metaller, yarı iletkenler veya nanomalzemelerle modifiye edilebilmektedir (Silva vd. 2020). GO'daki oksijen içeren gruplar, nanohibritlerin hazırlanması için SiO₂, Au, Ag, ZnO ve TiO₂ ile reaksiyona girerek büyük bir reaktivite sağlamaktadır (Dong ve ark., 2019).

2.4 TiO₂ ve Özellikleri

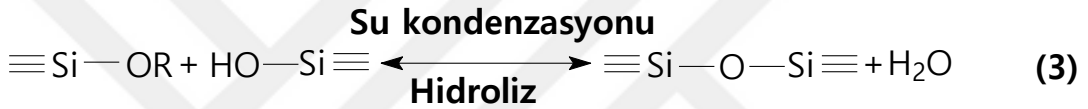
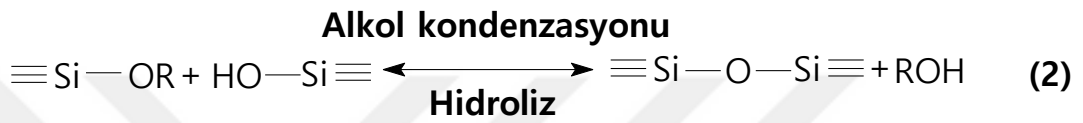
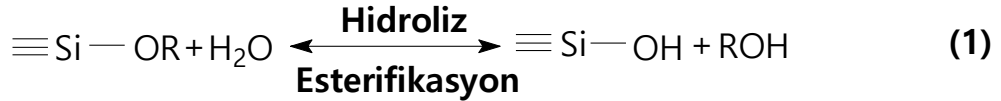
TiO₂ benzersiz enerji bant aralığına sahip olması, kimyasal ve fiziksel stabilitesi nedeniyle birçok uygulamada büyük ilgi gören en önemli yarı iletken malzemelerden biridir. İlaveyen, fotokataliz, fotoelektrokimyasal, sensörler, biyomedikal, biyoelektronik, pil ve süper kapasitör gibi birçok uygulamada değiştirilmiş yapı ve yüzey fonksiyonel malzeme formunda araştırılmış ve kullanılmıştır. TiO₂'nin doğada anataz, rutil ve brokit olmak üzere üç farklı fazı bulunmakla birlikte bu fazlar için bant boşlukları sırasıyla, 3.2, 3.02 ve 2.96 eV'dir (Praveen vd. 2014). Özellikle, 3.2 eV bant boşluk enerjisi ile en iyi bilinen yarı iletken olan anataz TiO₂ nanoparçacıklar, çeşitli elektrokimyasal uygulamalar için kullanılmıştır. İyi biyouyumluluk özellikleri, yüksek iletkenliği ve düşük maliyeti nedeniyle, nanoparçacıklar, nano iğneler ve nanotüpler gibi çeşitli formlarda üretilebilen TiO₂, elektrokimyasal sensörler ve biyosensör uygulamaları için çekici bir elektrot malzemesi haline gelmiştir (Emregul vd. 2013).

2.5 Sol-Jel Tekniğı

Sol-jel tekniğı, nano boyutlardan makro boyutlara uzanan geniş ve disiplinler arası bir araştırma alanını kapsayan çeşitli yeni malzemelerin geliştirilmesinde rol oynayan umut verici araçlardan biridir (Trindade ve Politi 2019). Başlangıç malzemeleri olarak koloidal çözeltilerin (sol) kullanıldığı bu teknik, cam, seramik ve organik-inorganik hibritler içeren ileri düzey malzemelerin hazırlanması için esnek bir yaklaşım sunmaktadır (Esposito 2019). Son yıllarda farklı kimyasal sensörlerin geliştirilmesi için sol-jel tekniğı üzerine kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Bu teknolojinin başlıca kullanımı optik sensörler alanında olsa da sol-jel temelli elektrokimyasal ve biyosensörlerle ilgili çalışmaların sayısı da göz ardı edilemeyecek kadar fazladır. Özellikle, biyomoleküllerin sol-jel matrislerine immobilizasyonu ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Mujahid vd. 2010).

Sol-jel işlemi genel olarak, bir sistemin sıvı 'sol'den (parçacıkların koloidal süspansiyonu) katı 'jele' geçişine ilişkin bir süreçtir. Bu süreçte tetrametoksi silan (TMOS) veya tetraetoksi silan (TEOS) gibi düşük moleküler ağırlıklı bir metal alkoksit öncül molekülü

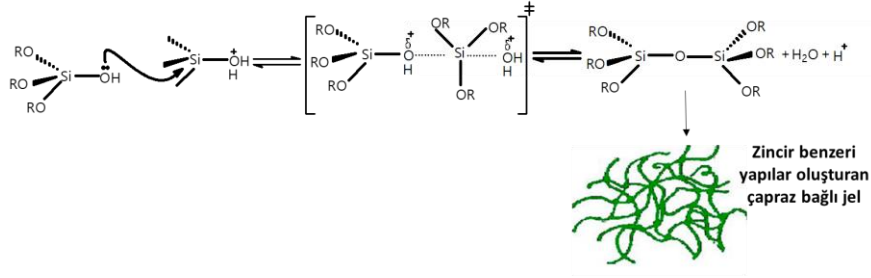
asit veya baz katalizör varlığında hidrolize edilmektedir. Metal alkoksit (örneğin, TEOS veya TMOS) öncülerinin hidrolizi ile silanol grupları (Si-OH) oluşmaktadır ve ardından oluşan silanol grupları arasında gerçekleşen kondenzasyon ve polikondenzasyon reaksiyonları sonucunda siloksan (Si-O-Si) yapıları meydana gelmektedir (**Şekil 2.2**) (Kandimalla ve ark., 2006).



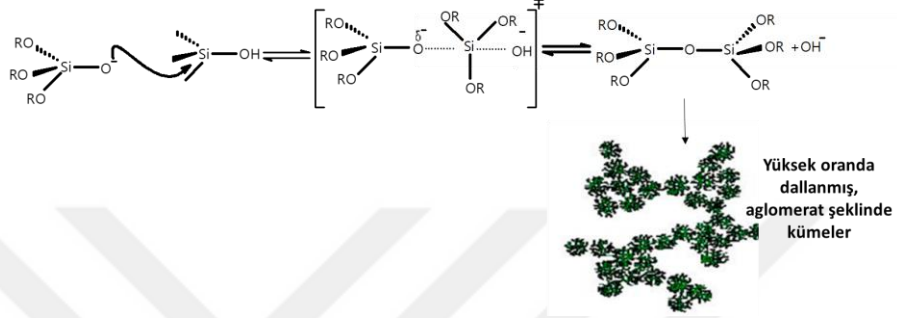
Şekil 2.2 Sol-jel işlemi reaksiyon basamakları

Hidroliz reaksiyonları için en çok kullanılan asit veya baz katalizörler HCl, NH₄OH, H₂CO₃, HF ve NH₄F olarak sıralanabilir. Sol-jel geçişi sırasında, solüsyonun viskozitesi kademeli olarak artmaktadır ve sol (küçük partiküllerin koloidal süspansiyonu) birbirine bağlanarak sert ve gözenekli bir yapı (jel) oluşturmaktadır. Sol-jel işleminin koşullarına bağlı olarak, jelleşme saniyelerden aylara kadar bir zaman diliminde gerçekleşebilmektedir ve sonuç olarak birbirine bağlı üç boyutlu bir ağ elde edilmektedir (Casero ve Vázquez 2017). Elde edilen jelin yüksek derecede dallanmış aglomeratlar veya ağ benzeri yapılar halinde bulunması ise hidrolizin bazik veya asidik koşullar altında gerçekleştirilmesine bağlıdır. Bazik hidroliz daha hızlı gerçekleştiğinden tüm silanol grupları hızla oluştuktan sonra kondenzasyon reaksiyonları başlamaktadır. Yapılan bu çoklu kondenzasyon basamakları neticesinde solde küçük dallanmış aglomeratlar oluşmaktadır. Asidik ortamda kondenzasyon hidroliz tamamlanmadan başladığından solde zincir benzeri yapılar oluşmaya başlamaktadır (**Şekil 2.3**) (Danks ve ark. 2016).

a) Silisyum alkoksitlerin asit katalizli kondenzasyon reaksiyonları

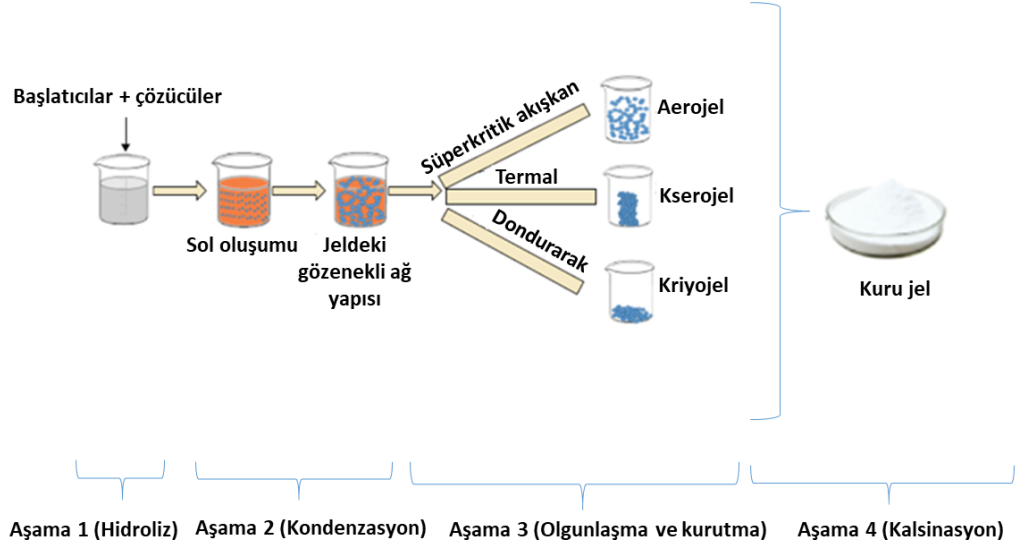


b) Silisyum alkoksitlerin baz katalizli kondenzasyon reaksiyonları



Şekil 2.3 Silisyum alkoksitlerin a. asit, b. baz katalizli kondenzasyon reaksiyon mekanizmaları (Danks ve ark. 2016' dan değiştirilerek alınmıştır)

Sol-jel geçişinden sonra, elde edilen ıslak jelin gözeneklerindeki çözücünün uzaklaştırılma yöntemine bağlı olarak aerogel (süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile kurutma), kserojel (buharlaştırma ile kurutma) ve kriyojel (dondurarak kurutma) üretilabilmektedir (**Şekil 2.4**). İlâveten kurutma koşullarına bağlı olarak yüzey alanı, gözenek hacmi, gözenek boyutu, gözenek morfolojisi gibi özellikler de değişmektedir (Cantürk Öz ve Kaya 2019). Genellikle, kserojeller, çapraz bağlanma ve yoğunlaştırma açısından hidrojellere göre, mekanik özellikler ve kimyasal direnç bakımından daha üstündür. İlâveten çok sayıda küçük gözenek nedeniyle genellikle yüksek bir yüzey alanına sahiptir. Ancak yapı düzenleyici maddeler eklenmeden bu gözeneklilik genellikle düzensizdir (Kandimalla vd. 2006).

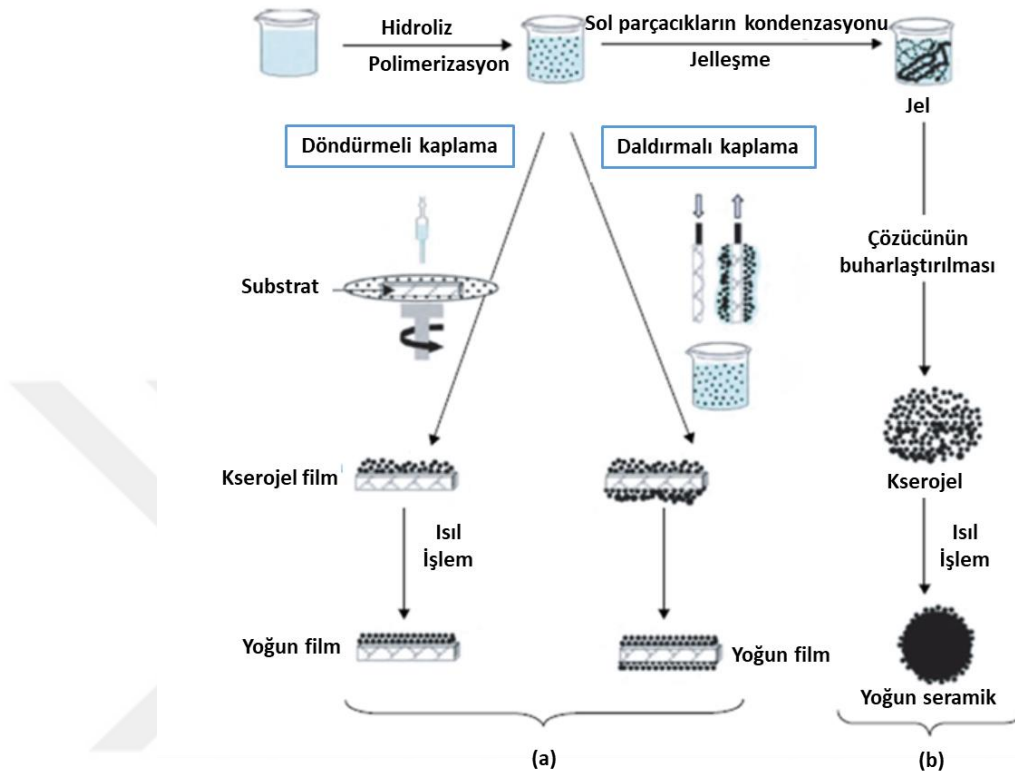


Şekil 2.4 Sol-jel sürecinin farklı aşamalarının şeması (Bokov ve ark., 2021'den değiştirilerek alınmıştır)

Ayrıca gözeneklilik ve yüzey alanı gibi özelliklerin büyük ölçüde sol-jel işlemi parametrelerine (alkoksit öncü seçimi, alkoksit: su oranı, katalizör ve çözücünün konsantrasyonu ve türü, jelleşme sıcaklığı, pH vb.) bağlı olduğunu belirtmek gerekmektedir. Elde edilen seramik malzemeler kimyasal ve termal stabilite, optik şeffaflık ve gözenek özelliklerini ayarlama imkanı ile karakterize edilmektedir. Silika sol-jeller saydamdır, kimyasal olarak inerttir, çoğu organik polimere kıyasla organik çözücülerde ihmal edilebilir şişme özellikleri göstermekle birlikte mekanik olarak da stabildir. Sol jel reaksiyonları oda sıcaklığında ve ılıman koşullarda gerçekleştiğinden biyolojik aktiviteyi değiştirmeden biyomoleküllerin çevresinde veya hatta daha büyük biyolojik türlerde silika matrisi sentezini mümkün kılmaktadır. İlaveten proteinler, enzimler, hormonlar, antikorlar, hücre bileşenleri ve hatta canlı tüm hücreler gibi biyomoleküller gözenekli ağda aktif kalabilmektedir.

Çevreden gelen daha küçük türler ise matris içinde yayılabilmektedir ve hapsolmuş biyomoleküllerle etkileşime girebilmektedir (Preda vd. 2011). Sol-jelin destek olarak diğer bir avantajı, çok farklı konfigürasyonlarda kolaylıkla üretilebilir olmalarıdır. Bu nedenle, bir silika sol, ince bir film oluşturmak için bir cam slayt, elektrot yüzeyi veya optik fiber üzerine daldırılarak (dip-coating) veya döndürülerek (spin-coating) kaplanabilmektedir.

Molekül difüzyonu için önemli olan bu ince filmler sıklıkla kimyasal sensörler ve biyosensörler hazırlamak için kullanılmaktadır (Şekil 2.5)(Casero ve Vázquez 2017).



Şekil 2.5 Koloidal soldan sentezlenen a. kserojel filmler, b. toz formda kserojeller (Casero ve Vázquez 2017’den değiştirilerek alınmıştır)

Çoğu durumda, ince filmler, iyi difüzyon özelliklerinden dolayı kalın olanlara göre daha hızlı tepki göstermektedir. Jel kalınlığının artmasıyla, sinyal bozulmaktadır ve analitlerin bir biyomolekül aktif bölgesine difüzyonu zorlaşmaktadır; sonunda bu faktörler zayıf tepkiye yol açmaktadır. Bu nedenle film kalınlığı önemli bir parametredir (Kandimalla vd. 2006).

Yayınlanan birçok çalışmaya rağmen, sensör alt taşı olarak kullanılabilen bu tür jellerin geliştirilmesinde hala bazı problemlerle karşılaşmaktadır. Silika sol-jel matrislerinin oluşturulmasında karşılaşılan genel problemlerden bir tanesi jelin kuruması sırasında alkol ve su gözeneklerden buharlaşırken büzülme sonucu yüzeyde oluşan çatlaklardır (Prieto-Simón vd. 2004).

İlaveten gözeneklerin homojen olmaması, suya daldırıldığında kuru monolitik sensörlerde çatlaklara ve kırılmalara neden olmaktadır. Bazı araştırmacılar setiltrimetil amonyum bromür (CTAB) veya Triton X-100 gibi yüzey aktif maddelerin kullanımının malzemenin çatlamasını önleyerek, iç ve yüzey gerilimlerini azaltmada ve ıslatma derecesini arttırmada yararlı olduğunu göstermişlerdir. Aynı amaçla, kitosan, polietilen glikol (PEG) gibi çeşitli polimerler veya polivinil piridin ve polivinil alkol kopolimerleri sol-jel ağlarına dahil edilmektedir. PEG bir gözenek doldurucu görevi görerek jel büzülmesini ve gözenek çökmesini önlemektedir. Benzer şekilde, perflorosülfonatlı bir iyonomer olan nafyon da sadece sol-jel filmlerin çatlamasını önlemek için değil, aynı zamanda biyosensörlerdeki analitik özellikleri iyileştirmek için de kullanılmaktadır (Casero ve Vázquez 2017). Son yıllarda, silika sol-jel temelli inorganik-organik hibrit malzemeler ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Silisyum, alüminyum, titanyum gibi metal alkoksii öncüllerine çeşitli fonksiyonel grupların (amino, glisidoksi, epoksi, hidroksil vb.) dahil edilmesi ile organik olarak modifiye edilmiş sol-jel camlar (ormosiller) üretilebilmektedir (Tripathi vd. 2006). En yaygın katkı maddeleri, örneğin amfifiller, blok kopolimerler, iyonik sıvılar, biyopolimerler ve proteinler gibi "yumuşak şablonlar" olmuştur. Bu hibrid sol-jel materyallerinde kovalent, hidrojen, Van der Waals bağları veya inorganik ve organik bileşenler arasında elektrostatik etkileşimler meydana gelebilmektedir (Danks vd. 2016). Biyo enkapsülasyon işlemi sürecinde ormosillerin kullanımı, konakçı matrislere hidrofobik veya hidrofilik özellikler kazandırabilmektedir. Hidrofobik silika oluşturan monomerler kullanıldığında, ortaya çıkan elektrotlar suyu reddeder ve elektrolit ile temas halinde olan en dış yüzeyde yalnızca ayrılmış karbon adacıkları bırakmaktadır. Öte yandan, hidrofilik monomerler kullanıldığında, sol-jel camın suyla ıslanan alanında bir artış olmaktadır. Bu nedenle, organik olarak modifiye edilmiş bir sol-jel camdaki hidrofilik ve hidrofobik monomerlerin oranı, biyo-uyumlu matrislerin hazırlanmasında ve sensör tasarımında oldukça önemlidir (Tripathi vd. 2006).

2.6 Sol-Jel Temelli Biyosensörler

Sensör cihazlarının analitik kapasitelerini geliştirebilecek yeni materyallerin geliştirilmesi, biyosensör teknolojisinin önemli bir yönüdür. Sol-jel matrisleri, elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Özellikle silika içeren gözenekli sol-jel temelli malzemeler, biyosensör tasarımında oldukça uygun özellikler sergilemektedirler (B. Liu vd. 2003). Örneğin, UV ve görünür spektral aralıkta şeffaf olmaları, onları soğurma, yansıtma, floresans, kemilüminesans ve biyolüminesans gibi yaygın algılama tekniklerine uygun hale getirmektedir. Katı bir faz desteği sunan bu malzemeler, mekanik olarak sağlam, nispeten kimyasal olarak inert, termal, fotokimyasal ve biyolojik bozunmalara karşı dirençlidir. İlâveten, silika çerçeve konuk biyomoleküllerin etrafında büyüdüğü ve katkı boyutunun üst sınırlarını genişlettiği için çok çeşitli algılama elemanları ile katkılanabilmektedirler (Owens vd. 2016). İç içe geçmiş silika ağları ise biyomoleküllerin etkili bir şekilde enkapsülasyonuna hizmet ederek onların sızmasını önlemektedir. Bu sıkı ağ yapısı içinde makromoleküler alışveriş engellenirken, sensör uygulamalarında gerekli olabilecek tampon iyonları, substratlar ve gözenekli yapı içinde ve dışında reaksiyon ürünleri dahil olmak üzere küçük moleküllerin sınırsız taşınmasına da izin verilmektedir (Jin ve Brennan 2002). İlâveten, malzemenin iletkenliğini veya diğer başka özelliklerinin değiştirilmesine imkan verecek şekilde metal partiküller (altın, paladyum, iridyum, demir, bakır, seryum ve çinko vb.), metal oksit nanoparçacıklar (TiO_2 nanopartiküller, ZrO_2) karbon malzemeler (karbon nanotüp, grafen vb.) sol-jel matrisleri içerisine kolaylıkla ilave edilebilmektedir (D. Li vd. 2016).

Biyomoleküllerin (genellikle enzim) sol-jel matrisi içerisine enkapsüle edilmesi işlemi, katalizör olarak güçlü asit veya bazın kullanılmasını gerektirmektedir. Ayrıca, silan öncüsünün hidrolizi sırasında ise organik alkoller (metanol) oluşmaktadır. Oluşan alkoller ve daha da önemlisi olumsuz pH koşulları, biyomoleküllerin kısmi denatürasyonuna sebebiyet vermektedir (Gavalas vd. 2004). İlâveten, üretim için önemli miktarda enzime ihtiyaç vardır. Bahsi geçen sorunların üstesinden gelmek için alternatif bir diğer yöntem ise biyomoleküllerin sol-jel omurgasına kovalent bağlanma yoluyla immobilizasyonu olup, bu yöntemde ihtiyaç duyulan enzim miktarı ise minimumdur. Buradaki stratejide ise sol-jel silikat omurgasında biyomoleküllerin kolaylıkla bağlanabileceği uygun bir kısmın veya fonksiyonel grubun varlığı ($-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$) gerekmektedir. Bu nedenle, genellikle 3-aminopropiltrimetoksisilan (APTMOs) ve 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) gibi amin temelli silika öncüleri tek başlarına yada başka silika öncüleri ile karıştırılarak kullanılmaktadır (Yang vd. 2003).

Kitosan, biyobozunurluk ve biyouyumluluk özellikleri nedeniyle biyomolekül immobilizasyonu için sıklıkla kullanılan doğal bir polimerdir. Hem içerdiği fonksiyonel gruplar nedeniyle reaktif silika öncülleri ile sol-jel ağı oluşturma yetenekleri hem de biyomoleküllerle eşleşme reaksiyonu vermeleri sebebiyle organik-inorganik kompozit sensör matrisleri sentezinde sıklıkla tercih edilmektedirler (Miao ve Tan 2001, G. H. Wang ve Zhang 2006). İlaveten glutaraldehit, biyomoleküllerin elde edilen bu yüzeylere kovalent olarak bağlanması için çapraz bağlama reaktifi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (G. Wang vd.2003).

2.7 Keratin ve Özellikleri

Yenilenebilir bir kaynak olarak keratin, selüloz ve kitinden sonra doğada en çok bulunan üçüncü polimerdir ve saç, tüy, yün ve boynuz gibi ekzoiskelet yapılarında yaygın olarak bulunmaktadır (C. Su vd. 2020). Belirgin bir üç boyutlu yapısı olan yün keratini yaklaşık %95 protein, %0,5 mineral, %5 lipid içermektedir. Keratinin bu yapısını, moleküller arası ve molekül içi bağlarla birbirine bağlı, farklı amino asitlerden oluşan iki polipeptit zinciri oluşturmaktadır (Berechet vd. 2020). Polipeptitteki ikincil yapıların sıkı bir şekilde paketlenmesinin yanı sıra, yapısında bulunan hidrojen, iyonik ve disülfid (-S-S-) çapraz bağları nedeniyle yün keratininin çeşitli çözücülerde çözünürlüğü düşük olup kararlılığı yüksektir. Bu sebeple keratinin ekstraksiyonu oldukça karmaşık ve zor bir süreç haline gelmiştir. Keratinin çeşitli kaynaklardan nispeten hızlı, uygun maliyetli, etkili ve yüksek verimde ekstraksiyonu için; indirgeme, oksidasyon, alkali ekstraksiyonu ve sülfitolizis gibi ekstraksiyon teknikleri literatürde oldukça fazla çalışılmıştır (X. Liu vd. 2017).

Mükemmel biyobozunurluk ve biyouyumluluk özellikler gösteren keratinde, aromatik yan grupların yanı sıra, karboksilik, hidroksil, amin ve tiyol gibi çeşitli reaktif fonksiyonel gruplar bulunmaktadır. Bu özellikleri ile keratin, yara iyileşmesi, kemik rejenerasyonu, implant malzemeleri, hemostatik pansumanlar ve kontrollü ilaç salınımı gibi doku mühendisliği ve tıbbi uygulamalar için kullanılan ideal biyomalzemelerdir (Sirion ve Jatuphorn 2020). Keratin ve/veya diğer biyopolimerlerle (doğal ya da sentetik) oluşturulan kompozitleri kullanılarak; hidrojel, film, lif, sünger ve yara bantları formunda

çok sayıda malzeme üretilmiş ve biyomalzemeler olarak etkinlikleri araştırılmıştır (Berechet vd. 2020).

Bununla birlikte, film oluşturulabilmesi ve düşük yüzeyel pürüzlülük, yüksek şeffaflık, düşük sıcaklıkta işleme gibi bazı avantajları sebebiyle keratinin biyo-sensör uygulamalarında da kullanılabilecek potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Natali vd. 2019). İlaveten, sol-jel temelli organik-inorganik kompozit hidrojellerin üretimi ve doku mühendisliği alanında kullanımıyla ilgili birkaç çalışma mevcuttur. Tüm bu çalışmalara ilişkin detaylı bilgiler kaynak araştırması kısmında verilecektir.

2.8 Kaynak Araştırması

Sol-jel teknolojisi, farklı sensör uygulamaları için son derece yenilikçi malzemeler üretme potansiyeline sahiptir. İnce ve şeffaf sol-jel temelli filmler, çeşitli biyolojik türlerin gelişmiş hassasiyet ve seçicilik ile tespiti için uygun platformlar sağlamaktadırlar. İnorganik, ormosiller, hibrid sol-jeller ve iç içe geçen polimer ağları gibi farklı sol-jel matrislerinin sentezi ve sensör uygulamaları (enzimli veya enzimsiz) için kullanım potansiyelinin araştırıldığı bazı çalışmalar derlenmiştir. Belirtilen çalışmalarda, enzimatik sensörlerde immobilizasyon işlemi, sol jel matrisi içine enkapsülasyon ya da sol-jel omurgasına kovalent bağlanma yoluyla gerçekleştirilmiştir. Yang vd. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada gözenekli bir organik-inorganik hibrit sol-jel karbon kompoziti geliştirilmiş ve enzim biyosensörlerin üretimi için immobilizasyon platformu olarak etkinliği değerlendirilmiştir. Kompozit, grafit tozu, ferrosen ve bir amino- ve metil-silikat omurga içermektedir. Amin temelli sol-jel çözeltisi metiltrimetoksisilan (MTMOS) ve APTMOS'ın belirli oranlarda karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Grafit tozu, elektrot için iletkenlik sağlamaktadır ve ferrosen, enzimin aktif merkezinden iletken yüzeye elektron iletimi için aracı görevi görmektedir. Chang vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada 96 kuyucukdan oluşan glukoz biyosensör dizisi üretilmiştir. Bu tasarımda öncelikle kuyucukların dip kısmı florofor katkılı ince bir sol-jel filmi ile kaplanmıştır (oksijen algılayıcı film). Bu ince film için florofor katkılı ormosil kullanılmıştır. GOx, hidrolizde üretilen etanolün büyük bir kısmının vakumlanarak uzaklaştırıldığı TEOS türevi sol-jelde enkapsüle edilmiştir ve ardından bu ince film

üzerine uygulanmıştır. Bu glikoz optik biyosensör dizilerinin, ticari bir floresans plaka okuyucu kullanılarak 96 örneğe kadar büyük ölçüde paralel analizler için kullanılabileceği belirtilmiştir. Tan vd. (2005) yaptıkları bu çalışmada çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) katkılı organik olarak modifiye edilmiş sol-jel/kitosan hibrit kompozit film temelli bir amperometrik kolesterol biyosensörü geliştirmişlerdir. Silika öncüsü olarak MTOS kullanılmış ve elde edilen kitosan/silika kompozit jel, prusya mavisi ile modifiye edilmiş cam karbon elektrot yüzeyine uygulanarak film oluşturulmuştur. ChoOx, ise enkapsülasyon yoluyla immobilize edilmiştir. Enzim immobilizasyonu, Triton X-100 konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve uygulanan potansiyel gibi bazı deneysel değişkenlerin biyosensörün akım yanıtı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Thenmozhi ve Narayanan (2007) yaptıkları bir çalışmada, sol-jel temelli enzim içermeyen amperometrik H_2O_2 sensör geliştirmişlerdir. Elektrokatalizör olarak kullandıkları tiyoinin ile amin grubu içeren APTMOS silika öncüsünün eşleşme reaksiyonları bifonksiyonel çapraz bağlayıcı olan glutaraldehit varlığında gerçekleştirilmiştir. Tiyoinin ile modifiye edilmiş APTMOS'in asidik ortamda gerçekleştirilen hidroliz ve kondenzasyon işlemleri neticesinde elde edilen sol-jel matris grafit çubuk üzerine ince bir tabaka halinde kaplanmıştır. CV ve amperometri ölçümleri neticesinde, modifiye edilen elektrodun H_2O_2 'nin indirgenmesine yönelik iyi bir elektrokatalitik aktivite gösterdiği belirtilmiştir. İlaveten, $3,82 \times 10^{-6} M$ ile $4,07 \times 10^{-3} M$ arasında değişen H_2O_2 derişimlerine karşı akım cevapları arasında 0,99 korelasyon katsayısı ile lineer bir ilişki olup, LOD değeri ise $1,53 \times 10^{-6} M$ olarak belirlenmiştir. G.Wang vd. (2003) doğal bir polimer olan kitosan ile (3-aziriloksipropil) dimetoksimetil silan (APDMOS) arasında gerçekleştirdikleri sol-jel reaksiyonları neticesinde elde ettikleri hibrit malzemenin amperometrik H_2O_2 biyosensörü olarak etkinliğini değerlendirmişlerdir. HRP'nin sol-jel matrisi üzerine immobilizasyonu kovalent bağlanma ile gerçekleştirilmiş ve LOD değeri $2 \times 10^{-9} M$ olarak belirlenmiştir. Miao ve Tan (2001) yaptıkları bir çalışmada, tetrametoksi silan (TMOS) ve kitosandan oluşan sol-jel temelli kompozit film sentezi gerçekleştirmişlerdir. Kompozit film üzerinde HRP immobilizasyonu kovalent bağlanma ile gerçekleştirilmiştir. Destek elektroliti içerisinde elektron vericisi olarak potasyum hekzasiyanoferrat (II) kullanılmış olup, yapılan ölçümler neticesinde LOD değeri $3 \mu M$ olarak hesaplanmıştır.

Literatür bulguları incelendiğinde, sensör tasarımlarında matriks olarak sentezlenen sol-jel temelli organik-inorganik kompozit malzemelerde genellikle doğal bir polimer olan kitosan kullanıldığı göze çarpmaktadır. Ancak keratinin kullanıldığı organik-inorganik hibrit malzeme ile sol-jel temelli sensör tasarımı bulunmamaktadır.

Son yıllarda metal oksit nanomalzemeler, düşük maliyetleri, olağanüstü kimyasal ve termal dayanımları nedeniyle elektrokimyasal sensör araştırmalarında büyük ilgi görmektedir. Ayrıca, yarı iletken metal oksitler, elektron transfer kinetiği için uygun adaylar olarak kabul edilmektedirler. İlâveten, biyomoleküllerin adsorpsiyonunu arttırarak, sensörlere daha iyi performans sağlamaktadırlar. Enzimatik veya enzimatik olmayan H_2O_2 sensörlerin üretimi için Fe_3O_4 , MnO_2 , TiO_2 , ZnO , CuO ve SnO_2 gibi yarı iletken temelli oksit nanomalzemeler içeren çalışmalar oldukça fazladır (Rashed vd. 2021). Özellikle nano boyutlu TiO_2 içeren, ayarlanmış pürüzlülük veya nano yapı dizileriyle karakterize edilen ince filmlerin kullanıldığı elektrokimyasal biyosensör çalışmaları oldukça dikkat çekicidir. Burada TiO_2 , biyoreseptör ile analit arasındaki reaksiyon sonucu oluşan elektronları toplayarak dedeksiyonu sağlamaktadır. Anataz fazındaki TiO_2 nanopartiküllerin substrat ile iyi bir elektronik bağlantı gösterdiği bilinmektedir (Bertel vd. 2021). İlâveten, spesifik moleküllerin çeşitli fonksiyonel gruplarına (silanlar, fosfonatlar, karboksilatlar, katekoller, alkenler/alkinler ve aminler) kovalent bağlanma noktaları olarak işlev gören yüzeye bağlı reaktif $-OH$ grupları barındırmaları sebebiyle, yüzey modifikasyonları mümkün olabilmektedir ve biyosensörler için önemli olan kendiliğinden organize olan tek tabaka moleküller (SAM) yapılarının oluşumunu desteklemektedir (Pujari vd. 2014). Ognjanović vd. (2020) yaptıkları bir çalışmada impedimetrik glukoz sensörü tasarlamışlardır. Bunun için, öncelikle APTES ile silanlanmış TiO_2 , belli oranlarda karboksilik grafen (CG) ile karıştırılmıştır. Elde edilen bu karışımdan, 10 μl hacimde alınarak SPCE yüzeyi modifiye edilmiştir. GOx enzim immobilizasyonu modifiye edilen bu yüzey üzerine kovalent bağlanma yoluyla gerçekleştirilmiştir. APTES burada içerdiği $-NH_2$ grupları ile hem immobilizasyonu hem de CG ile bağlanmayı sağlamıştır. Liang vd. 2008 yaptıkları başka bir çalışmada ise, amperometrik GOx sensörü tasarlanmıştır. Bu tasarımda ise, altın elektrot prusya mavisi (PB) ile elektropolimerizasyon yöntemiyle modifiye edilmiştir. Bu yüzey üzerinde sol-jel temelli titanyum filmi ise buhar biriktirme yöntemiyle

oluşturulmuştur. GOx ise bu film içerisine enkapsülasyon işlemi ile immobilize edilmiştir. Üretilen GOx/titanyum sol-jel/PB membran temelli biyosensörün, içeriğinde bulunan tüm malzemelerin sinerjik etkileri sayesinde yüksek hassasiyet, iyileştirilmiş kararlılık, iyi seçicilik, kısa tepki süresi ve geniş bir doğrusal aralık gibi iyi performanslar sergilediği belirtilmiştir. Prieto-Simón vd. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, bakır, demir, çinko ve seryum gibi metaller ile aminopropiltrimetoksi silan (APTMS)/TEOS karışımını içeren silika öncüleri arasında sol-jel reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Metal modifiye APTES/TEOS (M-APTES/TEOS, M= Cu^{2+} , Ce^{4+} , Fe^{3+} , Zn^{2+}) hazırlanırken, metal öncülerle ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{SO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{ZnCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) silika öncüler belirli oranlarda bazik ortamda karıştırılıp, kondenzasyon reaksiyonları gerçekleştirildikten sonra, elde edilen jel 110°C 'ta 12 saat boyunca kurutulmuştur. Elde edilen kserojel, PEG ve selüloz asetat içerisinde dağıtılıp Pt elektrot yüzeyinde film oluşturulmuştur. GOx veya başka peroksidazlar bu yüzeye immobilize edildikten sonra M-APTMS/TEOS modifiye Pt elektrotların elektrokatalitik aktivitesi CV ve amperometrik ölçümler yapılarak araştırılmıştır.

Bu çalışmalara ek olarak biyosensör tasarımında biyopolimer/ TiO_2 hibrit malzemelerin kullanıldığı bazı çalışmalar da bulunmaktadır. Emregul vd. (2013) yaptıkları bir çalışmada, süper oksit radikali (O_2) $^{\cdot-}$ tayini için oldukça hassas elektrokimyasal karboksimetilselüloz (CMC)/jelatin/ TiO_2 /süperoksit dismutaz (SOD) biyosensörü geliştirmişlerdir. Biyopolimer karışımının (CMC ve jelatin), SOD- TiO_2 için biyouyumlu bir ortam sağladığı ve nano ölçekli bir elektrot görevi görerek Pt elektrot yoluyla elektron transfer oranını arttırdığı belirtilmiştir. Hibrit sensör, sağlıklı ve kanserli beyin dokusunda (O_2) $^{\cdot-}$ tespiti için 1,5 nM ile 2 mM'lik geniş bir doğrusal aralık, yüksek hassasiyet ve hızlı yanıt süresi (1,8 s) ile yüksek analitik performans sergilemiştir. Derkus vd. (2014b) yaptıkları başka bir çalışmada, Pt elektrot yüzeyinde oluşturdukları aljinat/ TiO_2 nanokompozit film üzerine multipl skleroz (MS) oto-antijeni olan miyelin temel proteininin (MBP) immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elektrot yanıt kapasitesinin ve uygulanabilirliğinin belirlenmesinde CV ve EIS teknikleri kullanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında kullanılan bir diğer materyal ise GO'dur. Yüksek yüzey alanı ve içerdiği fonksiyonel gruplar (-OH, karboksil ve epoksit vb.) nedeniyle GO, polimerlerin özelliklerinin geliştirilmesi için kullanılmıştır. İlâveten, biyolojik uyumlulukları ve yüksek iletkenlikleri nedeniyle biyosensör üretiminde de sıklıkla kullanılmaktadır. Kıymaz Onat vd. (2023) Nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) ve H_2O_2 'yi aynı elektrot üzerinde amperometrik olarak belirleyebildikleri ikili SPCE (DSPCE) sistemini kullanmışlardır. DPSCE yüzeyi katman katman olacak şekilde sırasıyla rGO, iletken bir polimer olan polinötral kırmızı (PNR) ve Au nanoparçacıkları (AuNPs) ile modifiye edilmiştir. RGO/PNR/AuNPs sisteminin NADH'nin oksidasyonu ve H_2O_2 'nin indirgenmesi üzerinde elektrokatalitik bir etki gösterdiği bildirilmiştir. X. Liu vd. (2012) yaptıkları diğer bir çalışmada ise dopamin ve ürik asidin belirlenmesine yönelik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Camsı karbon elektrodun (GCE) kullanıldığı bu sensör tasarımında yüzey rGO ve AuNPs içeren sol-jel temelli kitosan/silika hibrit membranlar (CSHMs) ile modifiye edilmiştir. Silika öncüsü olarak APTES kullanılmış olup, negatif yüklü AuNPs, pozitif yüklü amino grupları içeren CSHMs içerisine elektrostatik etkileşimlerle bağlanmıştır. EIS ve CV ölçümleri neticesinde, sensör yüzeyindeki rGO ve AuNPs'lerin dopamin ve ürik asidin elektro oksidasyon sinyalini attırdığı belirtilmiştir. P. G. Su vd. (2015) ise PET substrat üzerine inşa edilmiş iç içe geçmiş Au elektrotları kullanarak esnek nem sensörleri tasarlamışlardır. Yüzey modifikasyonu için SAM ve sol-jel yöntemlerinin kombinasyonu kullanılmıştır. Bu bağlamda, öncelikle asidik ortamda hidroliz edilen 3-merkaptopropiltrimetoksisilan (MPTMOS) silika öncüsü ile GO karıştırılıp, tarak benzeri Au elektrot yüzeyine damlatılmıştır. AuNPs'lerin sol-jel ağının tiyol gruplarına bağlanması sağlanmıştır. AuNPs/GO/MPTMOS sol-jel filminin nem algılama mekanizması EIS ölçümleri ile araştırılmıştır.

Atık malzemelerden (örneğin yün, tüy, saç ve tırnaklar) elde edilebilen keratin ekstraktlar doğada bol bulunmaları ve mükemmel biyoyumluluk özellikleri nedeniyle, hidrojel, sünger ve film gibi farklı formlarda biyomedikal alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. İçerdikleri Lösin-Aspartik Asit-Valin (LDV) ve Glutamik Asit-Aspartik Asit-Serin (EDS) peptit domainleri gibi bazı sinyal motiflerine sahip olması nedeniyle hücrelerin tutunup çoğaldığı bir yapı iskelesi olarak doku mühendisliği

alanında oldukça fazla kullanım alanı bulunmaktadır (Y. E. Arslan vd. 2017). Hem iyonik/elektriksel transdüksiyon için aktif malzeme olmaları hem de düşük yüzeyel pürüzlülük, yüksek şeffaflık, düşük sıcaklıkta işlenmesi, biyouyumluluk/biyobozunurluk gibi özellikleri nedeniyle keratin sensör tasarımları için avantajlı biyopolimerler olarak değerlendirilmektedir (Natali vd. 2019). İlâveten, keratin, yüksek derecede kimyasal işlevsellığe sahip bir biyopolimer olup, nem tutma ve termal iletkenlik gibi birçok özellik sergilemektedir (Hamouche vd. 2018). Bu bağlamda, literatürde keratin film temelli nem sensörleri tasarımı yapılmış bazı çalışmalar mevcuttur. Natali vd. (2019) yaptıkları bir çalışmada, koyun yününden sülfitolizis yoluyla ekstrakte ettikleri keratini kullanılarak, diyot benzeri keratin temelli bipol (KBs) sensör üretmişlerdir. Diyot benzeri KB, keratin ince filminin İndiyum Kalay Oksit (ITO) ile altın elektrotlar arasına dikey bir mimaride sıkıştırılmasıyla elde edilmiştir. Burada keratin kaplı ITO çalışma elektrodu, üstteki altın elektrot ise karşı elektrot olarak kullanılmıştır. Yapılan CV çalışmaları sonucunda, higroskopik özellik gösteren ince film formundaki keratin temelli KB cihazının akım sinyali ile çevresel nem seviyeleri arasında doğrusal bir korelasyon elde edildiği belirtilmiştir. Hamouche vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada ise interdigitated ve spiral olmak üzere iki elektrot sistemi kullanılarak yün keratini temelli kapasitif nem sensörleri üretilmiştir. Yüksek yüzey pürüzlülüğü, gözenekli ve oldukça hidrofilik karakterdeki keratin filmlerin su tutma kapasitesinin yüksek olduğu vurgulanmış ve yapılan ölçümler neticesinde keratin filmlerin nem sensörleri için uygun biyopolimerler olduğu belirtilmiştir. Souza vd. (2020) yaptıkları çalışmada doğal ve denatüre edilmiş insan saç keratininin elektrokimyasal davranışını değerlendirmişlerdir. Bunun için GCE yüzeyi üzerinde keratin film oluşturmuşlardır. Kalıcı saç boyalarında kullanılan ve keratinin yapısını bozan p-toluendiamin (PTD) ve p-aminofenol (PAP) gibi öncü maddeler ile oksidatif ve alkali ortamda muamele edilen keratin, denatüre keratin olarak kullanılmıştır. Yapılan DPV ve EIS ölçümleri neticesinde, doğal keratinde sistein ve metiyonin amino asitlerinden kaynaklanan iki oksidasyon piki elde edilmiştir. Denatürasyon işlemi neticesinde keratinin yapısındaki değişiklikler nedeniyle elektrot yüzeyi ile teması büyük ölçüde gerçekleşmiştir. Böylece elektroaktif amino asit kalıntılarının oksidasyonu kolaylaşarak sinyal iletimi de artmış ve yeni oksidasyon pikleri açığa çıkmıştır.

Bu çalışmalara ilave olarak sol-jel temelli organik-inorganik hibrit malzemelerin üretimi ve doku mühendisliği alanında kullanımına ilişkin bazı çalışmalar da mevcuttur. Kakkar ve Madhan (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, asidik ortamda hidrolize edilen TEOS ile keratinin reaksiyonu sonucu oluşan hidrojelın yapısal karakterizasyonları tamamlanmıştır. Fibroblast hücreleri ile *in vitro* ortamda gerçekleştirilen canlılık testleri neticesinde, gözenekli hibrit hidrojellerin biyouyumlu oldukları tespit edilmiş ve yumuşak doku mühendisliği alanında kullanım potansiyeline sahip biyomalzemeler olabilecekleri belirtilmiştir. Cal vd. (2021) ise sol-jel temelli bor ve silika içeren kolajen/saç keratini (B-Si-Col-HK) kriyojelleri üretmişler ve kemik doku mühendisliği için etkinliğini araştırmışlardır.

Yukarıda derlenen literatür çalışmaları incelendiğinde, keratinin nem sensörleri ve sol-jel temelli doku mühendisliği yapılmış hibrit malzemelerle ilgili az sayıda uygulaması olduğu görülmektedir. Literatür araştırmalarımız neticesinde, keratinin gözenek oluştıurucu yumuşak şablon olarak kullanıldığı, karbon ve/veya metal oksit nanoyapılar ile katkılanmış, sol-jel temelli organik-inorganik kompozit kserojellerin sensör alt taşı olarak değerlendirildiği ve H₂O₂ dedeksiyonuna yönelik amperometrik ölçümlerin gerçekleştirildiği bir çalışma yapılmadığı anlaşılmıştır.

3. ÇALIŞMANIN AMACI

Bu tez çalışmasının amacı, azaltılmış kırılma yapı, yüksek şeffaflık, iyileştirilmiş hidrofilitiklik, esnek gözeneklilik, vb. gibi gelişmiş özelliklere sahip yeni nesil sol-jel matrislerinin sentezi, yapısal karakterizasyonu ve sensör alt taşı olarak kullanım potansiyellerini araştırmaktır. Silika öncüsü olarak kullanılan TEOS ile reaksiyona girebilecek $-NH_2$, $-SH$, $-OH$ gibi fonksiyonel gruplara sahip olan keratin, gözenek oluşturuca makromoleküler katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Keratin varlığının sentezlenen matrislerin biyo-uyumluluk özelliklerini arttıracak ve elektrokimyasal biyosensörlerde önemli bir basamak olan biyomoleküllerin immobilizasyonunu kolaylaştıracağı öngörülmüştür. İlâveten, GO-keratin/silika/bor, Cu-keratin/silika/bor ve TiO_2 -keratin/silika/bor temelli kompozit kserojellerin yenilikçi olmaları sebebiyle literatüre katkı sağlayacak niteliktedirler. Sensör yüzeyinde matris olarak kullanılma potansiyeli bulunan tüm kompozit kserojellerin sentez yöntemi ve doğal kaynaklı olması sebebiyle maliyetinin de ucuz olması, ilerleyen çalışmalar neticesinde ticarileşmesinin ve klinik ortamlarda kullanımlarının mümkün hale gelebileceği düşüncesindeyiz. Bu doğrultuda, koyun yününden keratin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen ekstrakt biyokimyasal tekniklerle karakterize edilmiştir. Daha sonra belirli orandaki keratin ekstraktları, TEOS ve borik asit ile karıştırılıp sol-jel metodu uygulanarak keratin/silika/bor kompozit hidrojelleri sentezlenmiştir. İletkenliklerini arttırmak amacıyla, elde edilen kompozit kserojeller Cu, TiO_2 nanopartiküller ve GO ile katılanmıştır. Reaksiyona girmeyen reaktiflerden ve safsızlıklardan arındırmak amacıyla yıkanıp 40-50 °C’de kurutulan toz formdaki hidrojel (kserojel) yapıları fizikokimyasal tekniklerle belirlenmiştir. Belirli miktarlarda alınan kserojeller alkali çözeltiler içerisinde süspanse edildikten sonra SPCE üzerine damlatılarak modifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Çeşitli kserojeller ile modifiye edilen elektrotlar üzerinde temas açısı analizleri gerçekleştirilerek yüzeyin hidrofilitik/hidrofobik özellikleri araştırılmıştır. Kompozit kserojeller ile modifiye edilen SPCE’lerin elektrokimyasal davranışları ise CV ve EIS ile belirlenmiş olup, enzimatik olmayan H_2O_2 sensörleri olarak etkinlikleri, yapılan amperometrik ölçümler ile belirlenmeye çalışılmıştır. İlâveten, sensör performansını belirleyen lineer aralık, LOD, tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve raf ömrü gibi çeşitli parametreler de araştırılmıştır.

4. MATERİYAL ve YÖNTEM

4.1 Materyaller

4.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarda kullanılan potasyum ferrosiyanür ve potasyum ferrisiyanür ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$), hidroklorik asit (HCl), sülfürik asit, gliserol, etanol, glutaraldehit (%25), sodyum hidrojen fosfat (NaH_2PO_4), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), TEOS, potasyum klorür (KCl), sodyum klorür (NaCl), sodyum sülfid (Na_2S), sodyum hidroksit (NaOH), hidrojen peroksit (H_2O_2), borik asit, bakır (II) sülfat penta hidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), GO (2mg/ml konsantrasyonda sudaki süspansiyonu, tek katmanlı tabaka, tabakaların çapı<10µm) ve titanyum dioksit (TiO_2) Sigma (St Louis, MO, USA)'dan temin edilmiştir.

Keratin ekstraksiyonu için kullanılan yünler Çanakkale bölgesinde bulunan küçük baş hayvan çiftliklerinden ve/veya kesimhanelerden temin edilmiştir.

Keratinin saflaştırma işlemi için diyaliz membran (MWCO:1kDa, Spectra/Por 6 Dialysis membrane Pre-wetted RC Tubing) kullanılmıştır.

Keratin tayini için Invitrogen Qubit Protein BR Assay Kit (A50668) kullanılmıştır.

Deneylerde kullanılan Tip I ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$ direncinde) ve Tip II kalitesindeki saf su, Merck-Millipore marka Milli Q model saf su sistemi kullanılarak temin edilmiştir.

4.1.2 Kullanılan cihazlar

CV, EIS ve kronoamperometri çalışmaları “Gamry Instrument using Framework Version 5.50 software” kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler sırasında çalışma elektrodu

olarak 0,2 cm² (0,5 cm x 0,4 cm) yüzey alanına sahip ekran baskılı karbon elektrotlar (SPCE, Pine Research Instrumentation) kullanılmıştır.

Keratin ekstraksiyonu, biyokimyasal karakterizasyonu ve organik-inorganik kompozit kserojellerin üretimi sırasında temel laboratuvar cihazları olarak, ultrasonik banyo (Elma marka S30H model), sıcaklık kontrollü ısıtıcı tablalı-manyetik karıştırıcı sistemi (Thermo scientific marka cimarec⁺ modeli), UV-Vis spektrofotometre cihazı (Shimadzu marka UV mini-1240 model), liyofilizatör (Telstar (Spain) marka LyoQuest model), vorteks (IKA Genious 4), hassas terazi (Mettler Toledo marka), blok ısıtıcı (Jeiotech marka), pH metre (Mettler Toledo marka), sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) jel sistemi (Thermo, (Dual-Gel Vertical Electrophoresis Systems (P8DS, MA, USA))), düşük devirlerde (Hettich EBA20, 145 Germany) ve yüksek devirlerde (Hettich Micro120, Germany) santrifüj cihazları, Qubit 4 florometre cihazı kullanılmıştır.

Keratinin ve kserojellerin yapısal karakterizasyonu için, Brunauer - Emmett - Teller (BET) cihazı (Quantachrome Instruments, ABD), termo gravimetrik analiz (TGA) (8000™, Perkin Elmer, ABD), Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) cihazı (Nicolet IS50 Flex Gold Kızılötesi Spektrometre, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, ABD), RAMAN cihazı (WITEC marka ALPHA 300RA model), X-Işını difraktometresi (XRD)(PANalytical Empyrean) ve katı nükleer manyetik rezonans (NMR) cihazları kullanılmıştır.

Kserojel temelli kompozit filmlerin yüzey karakterizasyonu için, streomikroskop (Zeiss Stemi 305), atomik kuvvet mikroskobu (AFM)(WITEC marka ALPHA 300RA model), FE-SEM/EDS (Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu / Enerji dağılımlı X-ışını spektrometresi) (JFM 7100F EDS, JEOL, Japan) ve Au-Pd alaşımı kaplama cihazı (SC7620 Mini Sputter Coater (Quorum Technologies, East Sussex, İngiltere) kullanılmıştır.

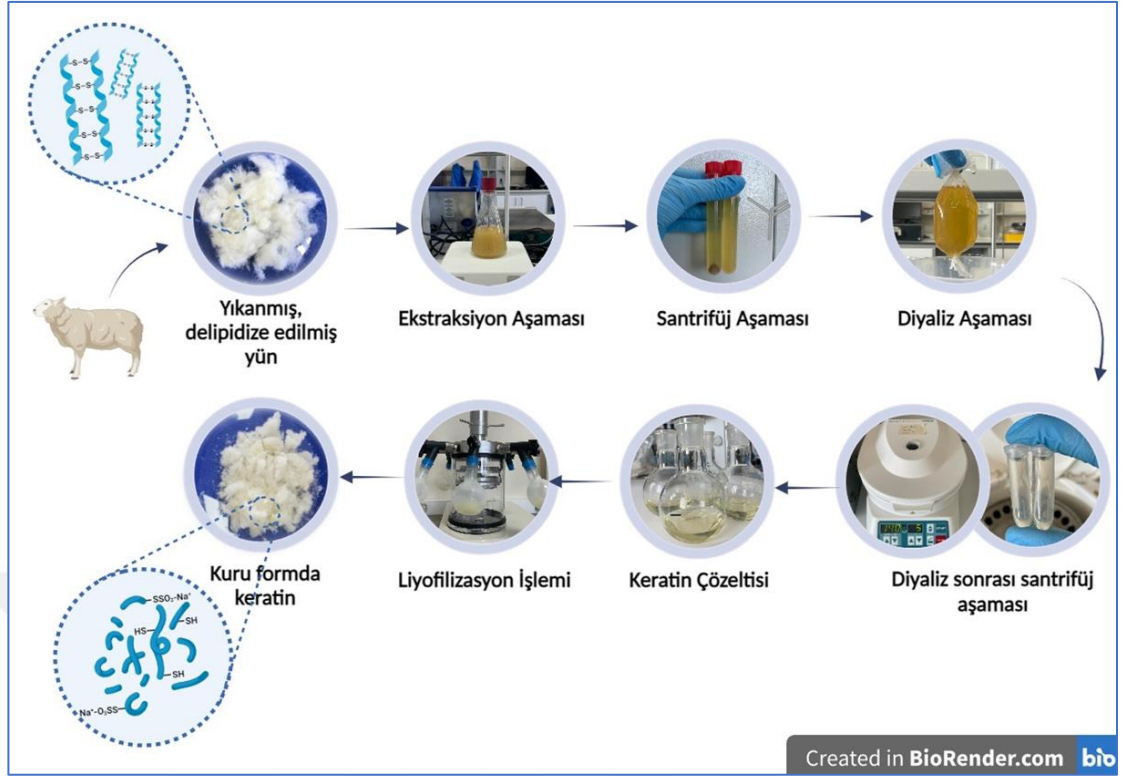
İlaveten, sentezlenen kompozit filmlerin temas açısı analizleri için Attension Theta Optik Tansiyometre (Biolin Scientific, Gothenburg, İsveç) cihazı kullanılmıştır.

4.2 Yöntem

4.2.1 Koyun yününden keratin ekstraksiyonu

Koyun yününden keratin ekstraksiyonu sülfitolizis reaksiyonu ile alkali ortamda gerçekleştirilmiş olup, gerekli işlem basamakları daha önce yapılan çalışmalar temel alınarak gerçekleştirilmiştir (Cal vd. 2021, Sezgin Arslan 2017). Özetle, kesimhanelerden ve/veya çiftliklerden temin edilen yünlere bir seri, yıkama (sıcak su ve deterjanla), dezenfeksiyon (%99,9 etanol ile) ve delipidizasyon 2(h/h) oranında kloroform:metanol karışımı içerisinde 16 saat bekletilerek) işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ön hazırlık aşamasından geçirilen yünler küçük parçalara kesildikten sonra, 5 gram alınıp, %5(a/h) NaOH ve %5(a/h) Na₂SO₃ içeren 100 ml ekstraksiyon çözeltisine ilave edilmiştir.

Ekstraksiyon işlemi, 50°C'ye ayarlanmış sıcaklık kontrollü bir ısıtıcı tabanlı-manyetik karıştırıcı sisteminde, yünler tamamen çözülünceye kadar (yaklaşık 2 saat) gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonunda, çözünmeyen parçalar süzme ve ardından 6000 rpm'de 15 dk. santrifüj ile ayrılmış ve elde edilen süpernatantlar toplanmıştır. Aşırı bazik olan (pH 13-14) ekstrakt, nötralleşinceye kadar (yaklaşık 48 saat) saf suya karşı diyaliz edilmiş olup, diyaliz suyu her gün tazeyle değiştirilmiştir. Diyalizatta oluşabilen çözünmeyen protein agregatlarından arındırmak amacı ile bu defa 14000 rpm'de 15 dk. boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Berrak olan süpernatantlar toplanıp cam balonlara konulduktan sonra -40 °C'ta dondurulmuştur. Liyofilizasyon işleminden sonra elde edilen toz formdaki koyun yünü keratini (KYK) biyokimyasal karakterizasyon ve sol-jel reaksiyonlarında kullanılmak üzere -26 °C'de saklanmıştır. KYK üretimine yönelik genel işlem basamakları **şekil 4.1**'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Sülfitolizis reaksiyonu ile alkali ortamda gerçekleştirilen KYK ekstraksiyon aşamaları

4.2.2 Koyun yünü keratininin biyokimyasal analizi

Ekstrakte edilen KYK'nın florimetri temelli kantitatif tayini ilk defa bu çalışmada gerçekleştirilmiş olup, analiz için qubit cihazı ve qubit protein ölçüm kiti kullanılmıştır. Standart stok çözeltileri olarak keratinin farklı konsantrasyonlarda (0,1,2,3,4,5,15 ve 20 mg/ml) suda hazırlanmış çözeltileri kullanılmıştır. Ölçüm ise, cihazın florimetre modunda gerçekleştirilmiştir. Özetle, her bir konsantrasyonda keratin çözeltisi kit içerisinde bulunan floresan boya ve diğer reaktiflerle karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dk. inkübasyon sonrası floresans ölçümleri alınmıştır. Artan keratin konsantrasyonuna karşılık bağıl floresans birimi (RFU) ni gösteren kalibrasyon eğrisi ve denklemi elde edilmiştir. Bilinmeyen numuneler için de benzer bir yöntem uygulanmış olup, konsantrasyon elde edilen doğru denklemden hesaplanmıştır.

Ekstrakte edilen keratinin moleküler büyüklüğünü ve polimer zincirlerinin karakteristik bantlarını belirlemek için SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiştir. Laemmli metoduna

göre yapılan bu yöntemde, ayırıcı ve yükleme jeli için, akrilamid-bisakrilamid konsantrasyonları sırasıyla %12,5(a/h) ve %4(a/h) olan çözeltiler hazırlanmıştır. Numune tamponu ile 1:1(h/h) oranında karıştırıldıktan sonra 100°C'ta 5dk. süreyle denatüre edilen protein çözeltilerden keratin 25µg ve negatif kontrol olarak kullanılan BSA ise 0,5µg olacak şekilde kuyucuklara yüklenmiştir. Protein standart (Biorad (Biorad, Precision Plus Protein Dual Xtra Standarts; Katalog numarası: 161-0377) ise 5µl hacimde uygulanmıştır. Yürütme işlemi 10 °C'de ve 15 mA'e sabitlenen güç kaynağı ile yaklaşık 60-90 dk. süreyle gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi sonrasında, jeldeki bantların görünür olabilmesi için boyama işlemi koloidal Coomassie Brilliant Blue G250 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Jelin görüntüsü ise Biorad (Gel Doc XR+, ABD) görüntüleme cihazı kullanılarak alınmıştır.

Keratin içeriğinde iki sistein amino asidinin birleşmesiyle oluşmuş karakteristik sistin kökleri bulunmaktadır. Bu yapıların alkali koşullarda indirgenmesiyle oldukça reaktif serbest sülfidril (-SH) grupları oluşmaktadır. Keratin içeren dokularda bu grupların varlığı oldukça önemli olup, tayini için Ellman's reaktifi (5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)) kullanılmıştır. Gerekli prosedür, daha önce yapılan bazı çalışmalarda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir (Sezgin Arslan 2017, Cal vd. 2021).

Keratindeki serbest -SH gruplarını tayinine geçilmeden önce, belirli konsantrasyonlarda L-sistein standart çözeltileri hazırlanmış kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Elman's reaktifi ile -SH varlığında oluşan sarı renkli kompleksin absorbansı 412 nm'de ölçülmüş olup, 1 mg keratindeki -SH gruplarının mmol cinsinden miktarı kalibrasyon grafiği ve **eşitlik 1** kullanılarak hesaplanmıştır:

mmol serbest SH grupları /g keratin = [(OD412 / eğim) x (seyreltme faktörü x toplam

hacim)] / keratin ağırlığı (g) (eşitlik 1)

4.2.3 Sol-jel temelli keratin/silika/bor kompozit kserojellerin üretimi için reaksiyon şartlarının optimizasyonu

Çalışmanın bu kısmında, sol-jel temelli kompozit organik-inorganik kserojellerin üretimi sırasında, TEOS ve gözenek oluşturuucu yumuşak şablon görevi gören KYK'nın oranları araştırılmıştır. Ayrıca, kırılma gücü azaltmak ve film esnekliğini artırabilmek için, sol-jellerin içerisine çeşitli konsantrasyonlarda plastikleştirici bir poliol olan gliserol ilave edilmiştir. Farklı oranlarda ve miktarlarda TEOS, KYK ve gliserol karıştırılarak, cam slaytlar üzerinde filmler oluşturulmuştur. Filmlerin yüzey morfolojisi makroskobik olarak değerlendirilmiş ve optimum reaksiyon şartları belirlenmiştir. Bu doğrultuda öncelikle, sol-jel reaksiyonu için gerekli olan TEOS sol, Yuan ve Wei-Jen (2004) yaptıkları çalışmaya göre reaksiyon şartları biraz değiştirilerek elde edilmiştir. Buna göre 3,3 ml TEOS, 2,45 ml ultra saf su ve 0,375 ml 0,1 M HCl cam tüp içerisine alınmıştır ve 5 dk. süre ile vortekslenerek iyice karışması sağlanmıştır. TEOS su ile karışmadığından ilk etapta faz ayrımı gözlenmekte ve karıştırma bittikten sonra bulanık bir çözelti elde edilmektedir. Bu aşamadan sonra yaklaşık 45-50 °C'ye ayarlanmış ultrasonik banyoda berrak bir çözelti elde edilene kadar (yaklaşık 10 dk) inkübe edilmiştir. Böylelikle TEOS asidik ortamda hidroliz edilerek reaktif silanol grupları oluşturulmuş ve bu berrak çözelti reaktif TEOS (rTEOS) olarak adlandırılmıştır (**Şekil 4.2**). rTEOS çözeltileri her reaksiyon öncesi taze olarak hazırlanmıştır.



Şekil 4.2 rTEOS hazırlık aşamaları

Öncelikle KYK miktarı optimize edilmiş olup, kullanılan oranlar ve miktarlar **çizelge 4.1**’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1 KYK konsantrasyonu ve rTEOS oranı optimizasyonu

KYK çözeltileri % (a/h)	rTEOS:KYK oranı (h/h)		
1	1:1	1:3	3:1
2	1:1	1:3	3:1
3	1:1	1:3	3:1

Katı/toz formda koyun yünü keratininin % 1, %2 ve %3 (a/h) konsantrasyonlarında sulu çözeltileri hazırlanmıştır. rTEOS ile bu üç konsantrasyondaki keratin çözeltileri sırasıyla 1:1, 3:1, 1:3 (h/h) oranlarında karıştırıldıktan sonra (seri bir şekilde pipetlenerek) cam slaytlar üzerine 5, 10, 15 ve 20 µl hacimlerde damlatılarak uygulanmıştır. Kaplanan slaytlar oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilerek kurumaları ve olgunlaşmaları (aging) sağlanmıştır. Keratin miktarı optimize edildikten sonra, gliserol ve nihai rTEOS oranının optimizasyonuna geçilmiştir. Optimizasyon için gerekli oranlar **çizelge 4.2**’de özetlenmiştir

Çizelge 4.2 Gliserol ve rTEOS oranı optimizasyonu

Gliserol % (h/h)	rTEOS:KYK oranı (h/h)				
1	1:1	1:3	1:5	1:7	1:10
2	1:1	1:3	1:5	1:7	1:10
3	1:1	1:3	1:5	1:7	1:10

% 3(a/h) KYK çözeltisi ile %1-3(h/h) gliserol içeren karışımlar farklı oranlarda rTEOS ile etkileştirilerek sol-jel reaksiyonları yapılmış ve cam slaytlara çeşitli hacimlerde kaplanmıştır. Jellerin olgunlaşması ve kuruması için oda sıcaklığında inkübasyon tekrarlanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda cam yüzeyinde oluşturulan film yüzeylerinin

homojen ve nispeten pürüzsüz olduğu oranlar optimum kabul edilmiştir (bulgular ve tartışma kısmında detaylandırılacaktır). Buna göre, keratin/silika kompozit hidrojellerin sentezi için öncelikle % 3(a/h) KYK çözeltisi içerisine % 3(h/h) gliserol ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra, rTEOS ve gliserol içeren KYK çözeltisi sırasıyla 1:10(h/h) oranda kapağı kapalı bir falkonda karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında jelleşme işlemi gerçekleştirildikten sonra (yaklaşık 45-90 dk), elde edilen jel olgunlaşması için 1 saat daha oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda jel, reaksiyona girmeyen reaktiflerden arındırmak amacı ile 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Yıkama işleminden sonra elde edilen pellet 45-50 °C'de kurutularak toz formdaki keratin/silika kompozit kserojel elde edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Keratin /silika kompozit kserojel sentezi

KYK, rTEOS ve gliserol miktarları belirlendikten sonra borik asitle olan reaksiyonların optimizasyon işlemlerine geçilmiş olup, reaksiyonlar için 1-3 (a/h) konsantrasyonlarında borik asit çözeltileri hazırlanmıştır. Borik asitlerin şekerlerle ve diğer 1,2- veya 1,3-diol bileşikleriyle ile çapraz bağ reaksiyonu pH ~ 9 veya üzerinde (borik asidin pKa'sına eşit veya daha büyük) meydana gelmektedir (Chen vd. 2017, Piest vd. 2011). Bu nedenle, borik asidin ultra saf sudaki çözeltileri %1(a/h), %2(a/h) ve %3(a/h) konsantrasyonlarında hazırlanmıştır ve daha sonra 1M NaOH kullanılarak çözeltilerin pH'ları 9.24'e ayarlanmıştır. Böylelikle, alkali çözeltideki borik asit ile tetrahedral tetrahidroborat anyonları oluşturulmuştur. Katı/toz formda KYK % 3(a/h) olacak şekilde tartılmıştır ve hazırlanan borik asit çözeltilerinde çözülmüştür. Bu karışım içerisine % 3(h/h) gliserol

ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Gerekli işlem basamakları tekrarlandıktan sonra toz formda keratin/silika/bor kserojeller üretilmiştir (Şekil 4.4).



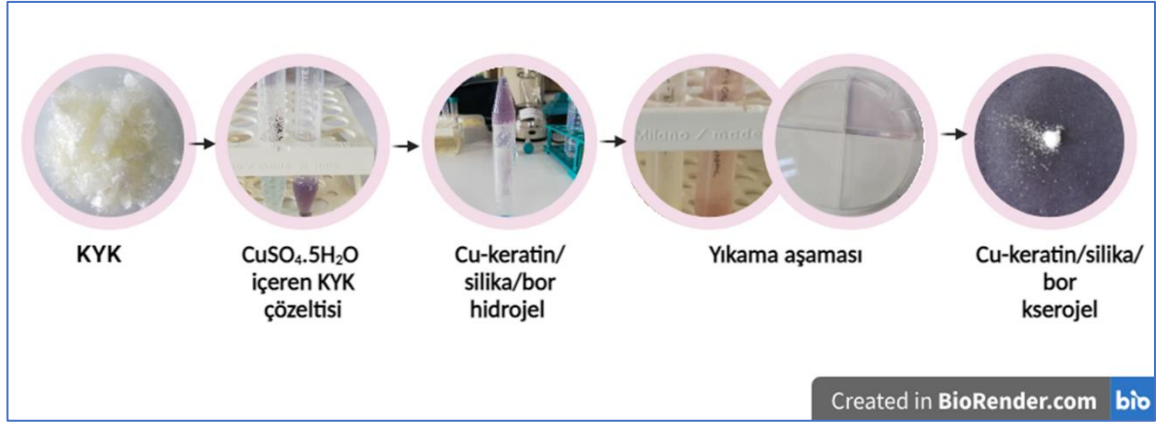
Şekil 4.4 Keratin /silika/bor kompozit kserojel sentezi

Yapılan çalışmalar neticesinde optimum borik asit çözelti konsantrasyonu %3(a/h) olarak belirlenmiş olup bundan sonraki tüm kompozit kserojeller bu orana göre sentezlenmiştir. Borik asit optimizasyonuna ilişkin detaylı bilgi bulgular ve tartışma kısmında verilmiştir.

4.2.4 Bakır ile katkılanmış keratin/silika/bor (Cu-keratin/silika/bor) kserojel sentezi

Cu-keratin/silika/bor kserojellerin sentezi sürecinde öncelikle Cu-keratin kompleksleri oluşturulmuştur ve daha sonra sol-jel reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Protein-bakır kompleksleri Alhazmi tarafından yapılan çalışma referans alınarak elde edilmiştir (Alhazmi 2019). 1 mg/ml konsantrasyonda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri %3(a/h) borik asit çözeltisi (pH 9,24) içerisinde hazırlanmıştır.

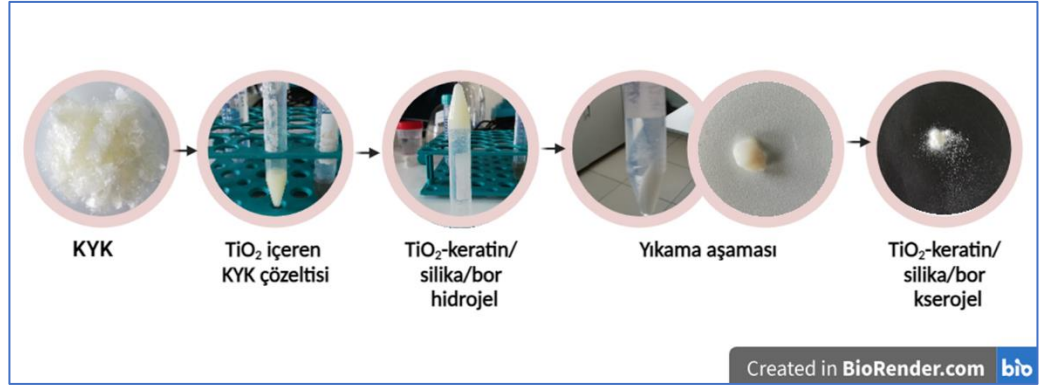
Koyun yünü keratini %3(a/h) konsantrasyonda olacak şekilde bu çözeltiler içerisinde çözülmüştür. Çözelti iki saat boyunca karıştırılmadan oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. %3(h/h) gliserol ilavesinden sonra sol-jel reaksiyonları için gerekli işlem basamakları tekrarlanarak toz formda Cu-keratin/silika/bor kserojeller üretilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Cu-Keratin/silika/bor kompozit kserojel sentezi

4.2.5 TiO_2 ile katkılanmış keratin/silika/bor (TiO_2 -keratin /silika/bor) kserojel sentezi

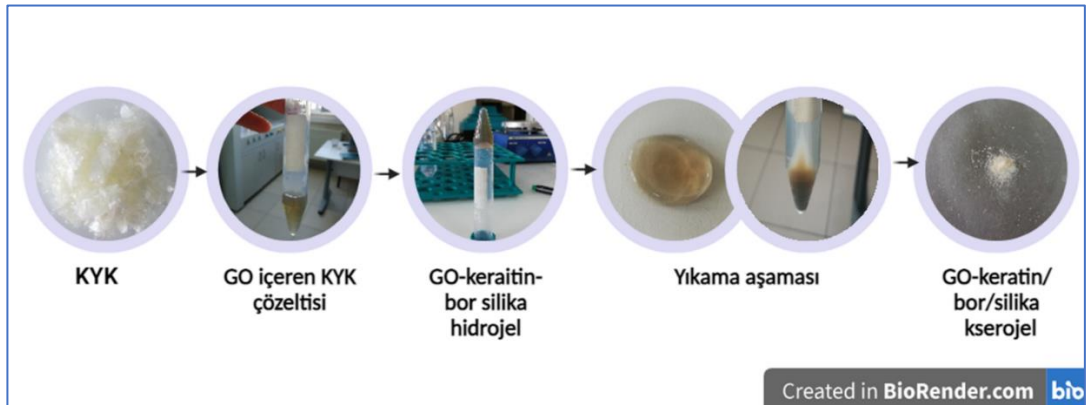
TiO_2 -keratin/silika/bor kserojeller benzer bir yaklaşımla sentezlenmiştir. Keratin- TiO_2 hibritlerinin üretimi için, öncelikle 1mg/ml konsantrasyonda toz formda TiO_2 nanopartiküller içeren süspansiyonlar %3(a/h)(pH 9,24) borik asit içerisinde yaklaşık 30s vortekslenerek hazırlanmıştır. Koyun yünü keratini %3(a/h) konsantrasyonda olacak şekilde bu çözeltiler içerisinde çözülmüştür. Ultrasonik banyoda yaklaşık 30 dk. boyunca inkübe edilerek TiO_2 nanopartiküllerin iyice dağıtılması sağlanmıştır. Elde edilen süspansiyon inkübe edilmeden doğrudan sol-jel reaksiyonlarına geçilmiştir. Gliserol ilavesinin ardından gerekli işlem basamakları tekrarlandıktan sonra elde edilen jel yıkanıp kurutulmuştur ve toz formda TiO_2 -keratin /silika/bor kserojeller elde edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 TiO₂-keratin/silika/bor kompozit kserojel sentezi

4.2.6 GO ile katkılanmış keratin/silika/bor (GO-Keratin/silika/bor) kserojel sentezi

GO-keratin/silika/bor kserojel üretimi için, öncelikle %3(a/h) konsantrasyonda keratin çözeltisi %3(a/h) borik asit içerisinde (pH 9,24) çözülerek hazırlanmıştır. 2 mg/ml konsantrasyonda ultra saf suda dağıtılarak elde edilen stok çözelti (Sigma-Aldrich, 763-705-25 ml) ile keratin çözelti sırasıyla 1:20 (h/h) oranında karıştırılmış ve GO'ların iyice dağılması için ultrasonik banyoda 30 dk. süreyle inkübe edilmiştir. Bu çözelti içerisine daha sonra %3(h/h) oranında gliserol ilave edilip iyice vortekslenmiştir. Sol-jel reaksiyonu için gerekli işlem basamakları tekrarlandıktan sonra elde edilen jel yıkayıp kurutulmuştur ve toz formda GO-keratin/silika/bor kserojeller elde edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 GO-keratin/silika/bor kompozit kserojel sentezi

4.2.7 Sentezlenen organik-inorganik kompozit kserojellerin yapısal ve fizikokimyasal karakterizasyonu

Sentezlenen tüm kompozit kserojellerin yapısal ve fizikokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla, FT-IR, RAMAN, NMR, XRD, BET ve TGA analizi gerçekleştirilmiştir.

Toz formdaki örneklerden belirli miktarlarda alınarak FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Spektrumlar, 2 cm^{-1} spektral çözünürlükle $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında taramalar yapılarak elde edilmiştir.

Toz formdaki keratin/silika/bor temelli kserojellerin atomik yapısı ve silisyum, bor ve keratinden oluşan hibrit yapıların bağlanma şekillerini araştırmak için NMR analizi JEOL ECZ 500R cihazı (JEOL, Japonya) ile $3,2\text{ mm}$ 'lik zirkonyum oksit rotorlar kullanılarak oda sıcaklığında ve $B_0=11,7\text{ T}$ manyetik alan şiddetinde gerçekleştirilmiştir. ^{29}Si -CP-MAS ve ^{11}B -MAS NMR spektrumları $\nu_0=160,45\text{ MHz}$ rezonans frekanslarında, $\omega/2\pi=6\text{ kHz}$ spin frekansında 5000 kez taranarak elde edilmiştir.

Tüm hibrit malzemelerin kimyasal yapılarını daha fazla aydınlatabilmek için Raman analizi gerçekleştirilmiştir. Raman spektrumları 1 cm^{-1} spektral çözünürlükte 532 nm 'lik bir lazer ışık kaynağı ile gerçekleştirilmiştir.

Tüm kserojellerin kristal yapısının incelenmesi için XRD analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için, toz formdaki örnekler uygun bir numune tutucuya yerleştirildikten sonra $0.02^\circ/\text{dk}$ 'lık bir tarama hızında Cu-K α radyasyonuna ($\lambda = 1.54056\text{ \AA}$, 45 kV ve 40 mA) maruz bırakılmıştır. Yansıyan ışın ölçümleri (2θ) $5\text{-}70^\circ$ aralığında yapılmış ve tüm veriler X'Pert High Score Plus yazılımı ile işlenerek spektrumlar elde edilmiştir.

Kompozit kserojellerin toplam yüzey alanı, ortalama gözenek çapı ve gözenek boyutu dağılımı gibi parametreler yapılan BET analizi ile belirlenmiştir. Öncelikle örnekler 100

°C’de 3 saat boyunca degas işlemine tabi tutulmuştur. Analiz ise 77 K’de azot gazı atmosferi koşullarında gerçekleştirilmiş ve azot adsorpsiyon izotermi elde edilmiştir. Örneklerin yüzey alanı multipoint BET ve Barrett, Joyner ve Halenda (BJH) metodu ile hesaplanmıştır.

Kompozit kserojellerin termal dayanımları ise yapılan TGA ile belirlenmiştir. Analiz, inert azot gazı altında (20 ml azot/dakika) 10°C/1 dk. hızla 800 °C’a kadar ısıtılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.8 SPCE yüzeylerde inorganik-organik kompozit kserojel temelli film üretimi için optimizasyon çalışmaları

Kserojel temelli kompozit filmlerin oluşturulması için gerekli optimizasyon çalışmaları öncelikle cam yüzeylerde gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon için öncelikle keratin/silika/bor kserojeller kullanılmıştır. Toz formdaki kserojeller 5mg/ml konsantrasyonda 0,1 M NaOH çözeltisi içerisinde ultrasonik banyoda 45-50°C’de 30 dk. süreyle dağıtılmıştır. Elde edilen çözelti son konsantrasyon 2mg/ml olacak şekilde sırasıyla 0,0125M, 0,025M, 0,05M, 0,1M, 0,2M ve 0,4M glutaraldehit (GA) çözeltileri ile karıştırılmıştır. Bu karışımdan 10’ar µl cam yüzeylere damlatıldıktan sonra oda şartlarında kurumaya bırakılmıştır. Fazla glutaraldehitin uzaklaştırılması amacıyla yüzeyler 15 dakika boyunca saf su ile yıkanmıştır. Ön bilgi edinebilmek amacıyla, yıkanıp kurutulan filmlerin yüzey morfolojileri stereomikroskop ile incelenmiştir. Kserojel konsantrasyonu sabit tutulup uygun GA konsantrasyonu belirlendikten sonra, optimizasyon sürecine SPCE yüzeylerde devam edilmiştir. SPCE yüzeyleri kserojellerle modifiye edilmeden önce temizleme ve aktivasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem elektrot üreticisinin önerdiği prosedüre göre CV kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gerekli prosedür ve elektrolit içeriği bölüm 4.2.11’de verilmiştir. 1-3,5mg/ml konsantrasyonlarda keratin/silika/kserojel çözeltileri 0,3M GA kullanılarak benzer şekilde hazırlanmıştır. Temizlenmiş ve aktive edilmiş SPCE yüzeyleri üzerine bu çözeltilerden 10’ar µl damlatılarak yüzey modifikasyonu sağlanmıştır. Oda sıcaklığında bekletildikten sonra, gerekli yıkama ve kurutma işlemleri tekrarlanmıştır. Filmlerin yüzey morfolojileri

stereomikroskop ile incelenmiş olup yüzeylerin homojen olduğu oranlar optimum kabul edilmiştir (bulgular ve tartışma kısmında detaylandırılacaktır).

Bu bağlamda, Cu, TiO₂ ve GO katkılı keratin/silika/bor kserojeller ile aktive edilmiş SPCE yüzeylerinde filmler benzer şekilde optimum kserojel ve GA konsantrasyonunda hazırlanmış ve stereomikroskop ile yüzey morfolojileri incelenmiştir.

4.2.9 Temas açısı analizi

Kserojellerin hidrofilik/hidrofobik özelliklerinin araştırılması için temas açısı analizi gerçekleştirilmiştir. Temas açısı ölçümleri $\pm 1^\circ$ hassasiyette motorlu bir şırınga ile Attension Theta Optik Tansiyometre (Biolin Scientific, Gothenburg, İsveç) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan filmlerin üzerine motorlu şırınga ile 3 μ L Milli-Q su damlatılmıştır.

4.2.10 Kompozit filmlerin yüzey karakterizasyonu

Elde edilen film yüzeylerinin pürüzlülük parametreleri ve yüzey topografisini belirlemek amacıyla AFM analizi gerçekleştirilmiştir. Yüzeylerin topografik görüntüleri temassız modda, 100 x 100 μ m² alanda taramalar yapılarak elde edilmiştir.

Kaplanmamış SPCE ve tüm kserojellerle modifiye edilen SPCE'lerin yüzey morfolojileri ve elementel bileşimleri yapılan FE-SEM/EDS analizleri ile belirlenmiştir. Bunun için tüm SPCE yüzeyler 90 saniye boyunca 8x10⁻¹ mbar/Pa basınçta Au-Pd (%80:20) alaşımıyla SC7620 Mini Sputter Coater cihazı ile yüzeyler kaplanmıştır. İletken örneklerin görüntüleri 10 kV'de farklı büyütmelerde ve yüksek vakum altında FE-SEM cihazı ile alınmıştır. Yüzeylerin elementel bileşimi ve elementel haritalama işlemleri cihazın EDS birimi ile gerçekleştirilmiştir.

4.2.11 Elektrokimyasal davranışın incelenmesi

Kompozit kserojeller ile modifiye edilmiş elektrotların elektrokimyasal davranışı, döngüsel voltamogramlar kullanılarak incelenmiştir. Elektrot yüzeylerinin modifikasyon çalışmaları sırasında önemli parametrelerden biri olan polimer derişiminin optimizasyonu süresince ölçüm yöntemi olarak EIS kullanılmıştır. EIS ve CV çalışmaları “Gamry Instrument using Framework Version 5.50 software” kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler sırasında, üzerinde $0,2\text{cm}^2$ yüzey alanındaki karbon çalışma elektrodu, Ag/AgCl referans elektrot ve karbon karşıt elektrot olmak üzere üç elektrot sisteminden oluşan ekran baskılı karbon elektrotlar (Pine Research Instrumentation) kullanılmıştır. Elektrokimyasal hücre sistemi 1 ml’lik elektrot hücresinden oluşmaktadır. Destek elektroliti ise 0.1M KCl ve 0,5mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ elektron donör ve akseptörü bulunan fosfat tamponundan (0,05M, pH 7,4) oluşmaktadır. Elektrotlar bu çözeltiler içerisine daldırıldıktan sonra EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. CV ölçümleri, +1 ile -1V aralığında, 50mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir. EIS ölçümleri ise açık devre potansiyelinde 0,01-100kHz frekans aralığında kaydedilmiştir.

SPCE’lerin aktivasyon ve temizlenmesi işlemleri üretici firmanın talimatlarına göre CV ölçümleri alınarak gerçekleştirilmiştir. Destek elektroliti olarak 0,1N H_2SO_4 çözeltisi kullanılmıştır. +2,5 ila -2,5 V aralığında 100mV/s tarama hızında ve arka arkaya üç döngü olacak şekilde CV ölçümleri alınmıştır.

4.2.12 Enzimatik olmayan H_2O_2 sensörleri olarak etkinliğin araştırılması

Sentezlenen ve yapısal karakterizasyonları tamamlanan tüm sensör alt taşları ile modifiye edilmiş SPCE’lerin enzimatik olmayan H_2O_2 sensörleri olarak etkinlikleri, yapılan amperometrik ölçümler ile belirlenmeye çalışılmıştır. İlaveten, sensör performansını belirleyen lineer aralık, LOD, tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve raf ömrü gibi çeşitli parametreler de araştırılmıştır.

Çalışma potansiyeli anodik bölgede +0,1 ile +0,7V aralığında gerçekleştirilen amperometrik ölçümler ile belirlenmeye çalışılmıştır. Elektrokimyasal hücre sistemi 10 ml'lik elektrot hücresinden oluşmaktadır. Destek elektroliti olarak Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 ve %0,9 NaCl ile pH 7.4 'de hazırlanan 0,05M PBS kullanılmıştır. Olası bir bozunmaya karşılık 0,1M H_2O_2 stok çözeltisi, ölçüm öncesi taze olarak hazırlanmıştır. Ölçümler oda sıcaklığında ve sürekli karıştırma işlemi yapılarak gerçekleştirilmiş olup, elektrot 10 ml PBS (pH 7,4) içeren hücreye daldırıldıktan sonra sabit akım elde edilene kadar yaklaşık olarak 1000s beklenmiş ve sabit akım (i_a) not edilmiştir. Denge akımına ulaşıldığı noktada, 0,1M H_2O_2 stok çözeltisinden 25 μl ilk enjeksiyon yapılmış ve 180 saniye aralıklarla enjeksiyonlara beş kez daha devam edilmiştir (J. Wang vd. 2015). Artan H_2O_2 derişimlerine karşı oluşan akım cevapları, bir sonraki enjeksiyon yapılmadan hemen önce (yani enjeksiyondan 180 saniye sonra) kaydedilmiştir (i_b) (O'Brien vd. 2007). 0,25-1,48 mM aralığında artan H_2O_2 derişimlerine karşı elde edilen akım değerlerini ($\Delta i = i_b - i_a$) içeren grafikler çizilmiştir ve elektrotların lineer bir tepki verdiği konsantrasyon aralığı belirlenmeye çalışılmıştır (F. Arslan vd., 2006, Bodur vd. 2021).

H_2O_2 ve elektrot yüzeyleri arasında meydana gelen elektrokimyasal reaksiyonları etkileyen diğer bir önemli parametre ise çalışma pH'sıdır. Bu nedenle, çeşitli pH'larda (5,4; 6,4; 7,4 ve 8,0) PBS çözeltileri hazırlanmıştır ve 0,5mM H_2O_2 ile 0,6V'da amperometrik ölçümler alınmıştır.

Tüm elektrotların optimum çalışma potansiyeli ve pH'sı belirlendikten sonra Cu ve TiO_2 -için pH 8,0 ve GO-keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE için ise pH 7,4'te hazırlanmış 10 ml 0,05M PBS destek elektroliti içerisinde ve 0,6V'da sürekli karıştırma altında 25'er μl 0,1M H_2O_2 'nin art arda 6 kere enjeksiyonu ile ölçümler tekrarlanmıştır. İlâveten, H_2O_2 'ye hassasiyetin karşılaştırılması amacıyla aktive edilmiş ve edilmemiş kaplanmamış SPCE'ler ile de aynı koşullarda (pH 7,4 ve pH 8'de hazırlanan PBS'lerde ayrı ayrı olacak şekilde) amperometrik ölçümler alınmıştır. İlâveten, elektrotların yüzeyindeki H_2O_2 yükseltgenme reaksiyonunu değerlendirmek için akım-zaman grafikleri de oluşturulmuştur.

Tüm kserojellerle kaplanmış SPCE'lerin H_2O_2 için dedeksiyon limitinin belirlenmesi için H_2O_2 standart çözeltinin derişimi 0,01M hazırlanmış olup 180 saniye aralıklarla enjeksiyon bu kez 10'ar µl hacimlerde gerçekleştirilmiştir. Amperometrik ölçümler sürekli karıştırma altında, 10 ml 0,05M PBS içerisinde (Cu ve TiO_2 için pH 8,0 ; GO için ise pH 7,4) ve 0,6V'da oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Ölçümler tamamlandıktan sonra kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. LOD değeri ise $3,3 \cdot \sigma / S$ eşitliğine göre hesaplanmıştır. Burada σ değeri amperometrik yanıtların standart hatası olup, S ise kalibrasyon grafiğinin eğimidir.

Tüm kserojellerle kaplanmış SPCE'lerin tekrarlanabilirlik testleri 0,5mM H_2O_2 ile üretilen anodik akımın tek bir günde toplam 15 kez ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. İlâveten, her bir kserojelle kaplanmış 5 farklı elektrot ile 0,5mM H_2O_2 'nin oksidasyonu neticesinde üretilen akımlar ölçülerek sensörlerin tekrar üretilebilirliği incelenmiştir. Tasarlanan tüm sensörlerin raf ömürleri ise 10 gün boyunca her üç günde bir yapılan amperometrik ölçümler ile belirlenmeye çalışılmıştır. 0,5mM H_2O_2 'nin oksidasyonu neticesinde elde edilen akımların ölçüldüğü bu süreçte, elektrotlar oda sıcaklığında 0,05M PBS içerisinde (Cu ve TiO_2 için pH 8,0; GO için ise pH 7,4) saklanmıştır. Tüm testler için gerçekleştirilen amperometrik ölçümler sürekli karıştırma altında, 10 ml 0,05M PBS içerisinde (Cu ve TiO_2 için pH 8,0 ; GO için ise pH 7,4) ve 0,6V'da oda sıcaklığında yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar ile %RSD değerleri **eşitlik 2** kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% RSD = (\text{Standart Hata} / \text{Ortalama}) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2})$$

H_2O_2 'nin tüm kserojellerle kaplanmış SPCE'ler üzerindeki elektrokimyasal davranışı CV yöntemi kullanılarak incelenmiştir. CV ölçümleri 50 mV /s tarama hızında, +1 ilâ -1 V aralığında ve 10ml 0,05M PBS içerisinde gerçekleştirilmiştir. PBS içerisinde ölçümler alındıktan sonra, çözelti içerisine 0,01M H_2O_2 'den 25 µl enjeksiyon yapılmış ve kısa bir karıştırmadan sonra CV ölçümleri alınmıştır. Böylelikle H_2O_2 varlığında ve yokluğunda ölçümler tamamlanmıştır. İlâveten farklı pH'larda da (5,4; 6,4; 7,4 ve 8,0) CV ölçümleri alınarak pH'nın etkisi araştırılmıştır. Karşılaştırma yapmak amacıyla aktive edilmiş ve edilmemiş kaplanmamış SPCE'ler ile aynı şekilde CV'ler alınmıştır.

4.2.13 İstatistiksel analiz

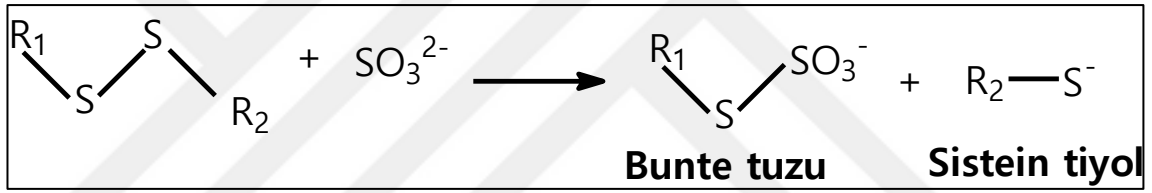
İstatistiksel analizler Orijin Pro 8SR0 (v.0724, OriginLab Corporation, MA, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. Bütün değişkenlerin $\pm$ standart hatalarını belirlemek için Microsoft Office Professional Plus 2016 Excel programı kullanılmıştır. Tüm analizler üç tekrarlı olarak (n=3) gerçekleştirilmiştir.



5. BULGULAR

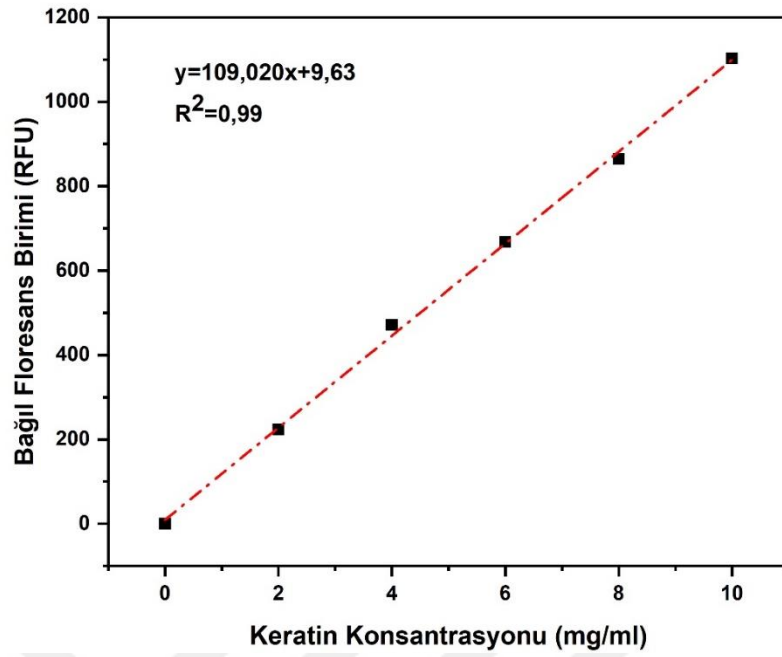
5.1 Koyun Yünü Keratininin Biyokimyasal Karakterizasyonu

Keratin ekstraksiyonu için kullanılan başlıca yöntemler indirgeme, oksidasyon, buhar patlatma işlemi, iyonik sıvıların kullanımı ve sülfitolizis reaksiyonlarıdır (C. Su ve ark., 2020). Tez çalışması kapsamında, keratin koyun yününden sülfitolizis reaksiyonu ile ekstrakte edilmiştir. Belli konsantrasyonlarda NaOH ve Na₂SO₃ içeren alkali çözeltinin kullanıldığı bu reaksiyonda, keratindeki disülfid bağları kırılarak, S-sülfonatlar (S-SO₃⁻) (Bunte tuzu) oluşmaktadır (**Şekil 5.1**). NaOH ise güçlü molekül içi hidrojen bağlarına etki ederek ekstraksiyon hızını ve verimini arttırmıştır (Sezgin Arslan 2017, Shavandi vd. 2017).



Şekil 5.1 Sülfitolizis reaksiyonu

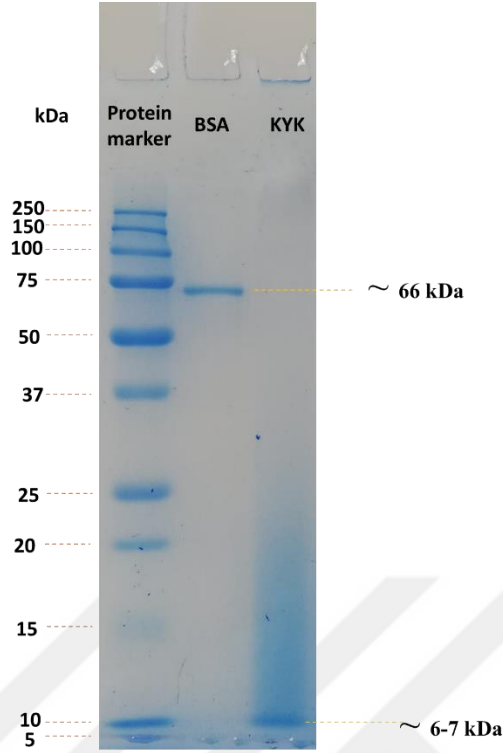
Keratinin florometrik nicel tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği **şekil 5.2**'de verilmiştir. Diyalizattaki keratin konsantrasyonu kalibrasyon grafiği kullanılarak 9,70±0,06 mg/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.2 Qubit ile florometrik ölçümlerle elde edilen keratin standart kalibrasyon grafiği

İlaveten, diyalizat konsantrasyonuna ve kuru ağırlığa göre belirlenen ekstraksiyon verimleri sırasıyla %32,98 ve %36,70 olarak bulunmuştur. İki değer de yaklaşık olarak aynı olduğundan, ekstrakte edilen KYK'nın saf olduğu düşünülmüştür. Literatüre sunulan bazı çalışmalarda sülfitolizis reaksiyonuyla gerçekleştirilen ekstraksiyon verimleri %30-41 aralığında olup, elde ettiğimiz sonuçlarla benzerdir (Aluigi vd. 2014, Fatma Cal vd. 2021, Shavandi vd. 2017, Tonin vd. 2007).

Keratinde bulunan polipeptit zincirlerinin moleküler büyüklüğünü belirlemek için SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiş olup, jelin görüntüsü **şekil 5.3**'te verilmiştir.

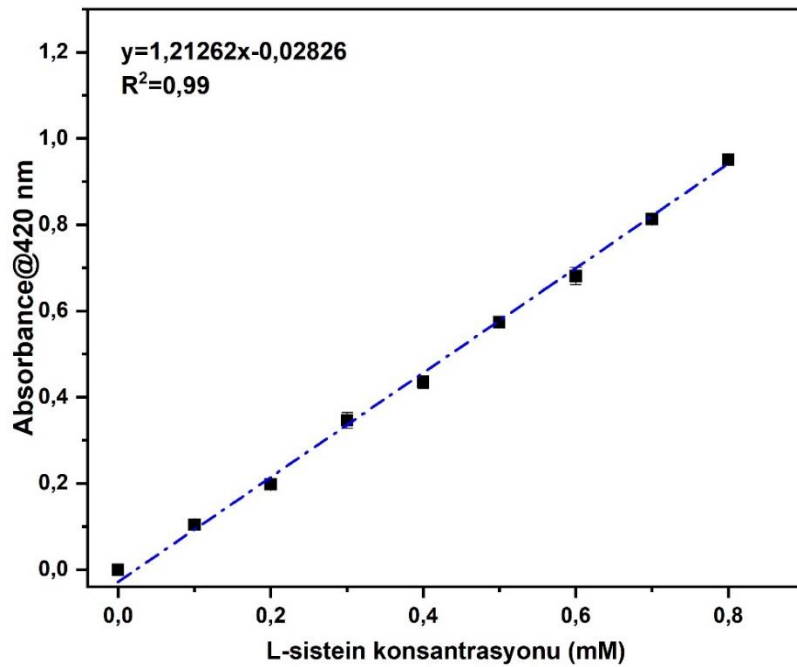


Şekil 5.3 SDS-PAGE analizi

Jelde protein standardın, negatif kontrol olarak kullanılan BSA'nın ve keratinin bantları görülmektedir. 2. kuyucukta yaklaşık 66kDa'da görülen net bir bant BSA 'ya özgü bir banttır. 3. kuyucukta KYK'ya ait 6-7kDa civarında bir bant görülmektedir. Keratinin SDS-PAGE analizine ilişkin çalışmalar incelendiğinde, keratine ait 40–60kDa (mikrofibril bandı), 10–20kDa (matriks proteinleri) ve 100–200kDa (yüksek molekül ağırlığındaki minör componentler) olmak üzere karakteristik üç bandın olduğu görülmüştür (Y. E. Arslan vd. 2017, Xu vd. 2013, Zhou vd. 2014). Sülfitolizis reaksiyonuyla ekstrakte edilen KYK için bu bantlar görülmemekle birlikte, aşırı alkali ortam (pH 12-14) nedeniyle keratinde bulunan polipeptit omurgalarının yapı bütünlüğü bozularak, molekül ağırlığı yaklaşık 6-7kDa'da olan küçük fraksiyonlara bölünmüştür. Alkali ortamda gerçekleştirilen ekstraksiyon neticesinde, saç ve/veya koyun yünü keratininde yapı bütünlüğü bozulması neticesinde tipik bantların kaybolduğu, 6-8kDa ve hatta 3-5kDa molekül ağırlığında daha küçük peptitlerin ortaya çıktığı yapılan çalışmalar neticesinde bildirilmiştir (F. Cal vd. 2021, Shavandi vd. 2017, Vineis vd. 2019). Kısa peptitlerde açığa çıkan daha çok fonksiyonel grupların varlığı, sol-jel reaksiyonlarında daha çok aktif bölge anlamına geldiği için bu durum avantaj sağlamaktadır. İlaveten,

ucuz, toksik olmaması ve reaksiyon süresinin kısıllığı ile kullandığımız bu yöntem doku mühendisliği ve kozmetik içerikli uygulamalarda kullanım potansiyeline sahiptir (F. Cal vd. 2021).

Keratinin sülfitolizis reaksiyonu neticesinde, disülfid bağları kırılarak sistein tiyol (indirgenmiş keratin) ve S-sülfonat anyonları oluşmaktadır. Dolayısıyla yapıdaki serbest sülfidril grup analizi Ellman's reaktifi ile gerçekleştirilmiş olup, L-sisteinin standart olarak kullanıldığı kalibrasyon grafiğı **şekil 5.4**'te verilmiştir.



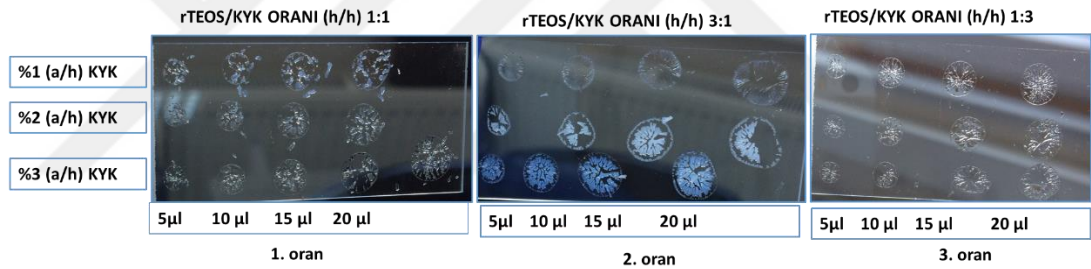
Şekil 5.4 L-sistein standart kalibrasyon grafiğı

Keratindeki serbest –SH gruplarının miktarı kalibrasyon grafiğı ve **eşitlik 1** kullanılarak hesaplanmış olup, $0,0243 \pm 0,001$ mmol SH/g keratin olarak bulunmuştur. Sistein kalıntılarındaki bulunan bu gruplar, diğer moleküller ile hidrojen bağları oluşturmaya orta derecede ilgi gösteren reaktif gruplardır. Bu nedenle, keratindeki az miktarda sistein kalıntısı, keratinin jelleşmesine ve sol-jel yöntemi ile silisyum-keratin ve/veya silisyum/keratin/bor biyomatrisinin birbirine bağlı gözenekli ağlarının oluşumuna da katkıda bulunabilmektedir (F. Cal vd. 2021).

5.2 Sol-Jel Reaksiyon Şartlarının Optimizasyonu

5.2.1 Keratin/silika kompozit kserojel sentezi

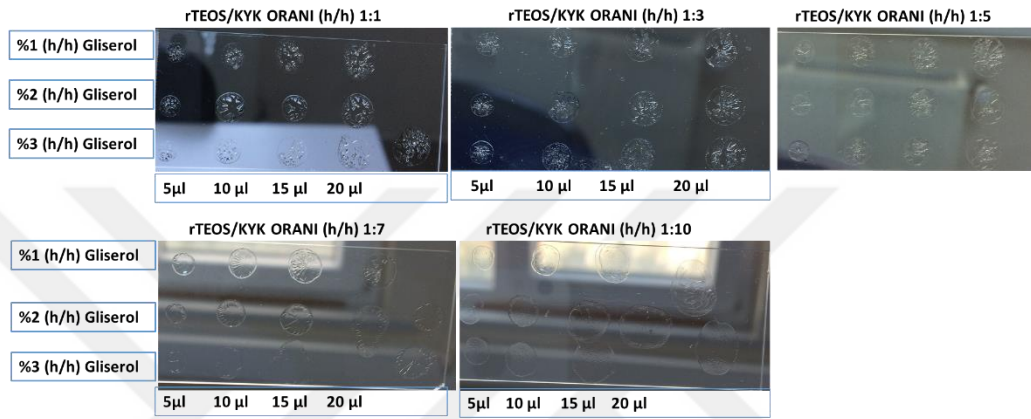
Sol-jel reaksiyonları için silika öncüsü olarak TEOS kullanılmış olup, asidik ortamda hidroliz yolu ile oluşan aktif silanol grupları içeren formu rTEOS olarak adlandırılmıştır. İnorganik-organik hibrit filmlerin üretim sürecinde, organik kısım olarak KYK kullanılmış olup, yüzeyi düzgün ve stabil filmlerin oluşturulması için kullanılan bu iki reaktifin optimum oranı araştırılmıştır. Bu süreçte, farklı oranlarda rTEOS ve KYK çözeltileri karıştırılıp cam yüzeyine çeşitli hacimlerde kaplanmıştır. Kaplanan slaytlar oda sıcaklığında inkübe edilerek kurumaları ve olgunlaşmaları (aging) sağlanmıştır. İnkübasyon sonrası filmlerin makro fotoğrafları elde edilmiştir (Şekil 5.5).



Şekil 5.5 Farklı oranlarda rTEOS ile yapılan keratin/silika kserojel temelli kompozit filmlerin makro fotoğrafları

Şekil incelendiğinde bu oranlarda elde edilen tüm filmlerin yüzeylerinde çatlakların oluştuğu ve özellikle rTEOS miktarının fazla olduğu 1. ve 2. oranda yüzeyde dökülmeler meydana geldiği açıkça görülmektedir. Keratin konsantrasyonu ve hacmi arttıkça film yüzeylerinin çatlaması ve dökülmesinin nispeten az olduğu 3. oranda görülmektedir. Bu bulgulardan hareketle %3(a/h) KYK'nin kullanıldığı 1:5, 1:7 ve 1:10 TEOS/keratin oranlarını içeren sol -jeller hazırlanmıştır. İlaveten, film esnekliğini arttırmak ve kırılabilirliği azaltmak için sol-jellerin içerisine plastikleştirici olarak çeşitli oranlarda gliserol ilavesi yapılmıştır. Plastikleştiriciler, molekül içi ve moleküller arası çekici kuvvetleri azaltmaktadır ve zincir hareketliliğini artırarak film esnekliğini geliştirmektedir. Gliserol, protein filmlerinde kullanılabilen en iyi plastikleştiricilerden

biridir. Düşük moleküler ağırlığa sahip olan gliserol, polar yapıda olması, suda çözünbilmesi ve uçucu olmaması sebebiyle proteinlerle kolaylıkla karışabilmektedir (Rocha Plácido Moore vd. 2006). Bu bağlamda hem gliserol hem de rTEOS oranlarının araştırıldığı optimizasyon çalışmalarına geçilmiştir. Sol-jel reaksiyonları ve inkübasyon süreçleri tamamlandıktan sonra oluşturulan hibrit filmlerin makro fotoğrafları alınmıştır (Şekil 5.6).



Şekil 5.6 Çeşitli hacimlerde gliserol ilavesi ile yapılan keratin/silika kserojel temelli kompozit filmlerin makro fotoğrafları

%3(h/h) gliserol içeren ve TEOS/KYK(h/h) oranının 1:10 olduğu sol-jel ile hazırlanan filmin yüzey özellikleri bakımından en düzgün film olduğu **şekil 5.6**'da açıkça görülmektedir. Sonraki sentezlerde kompozit kserojeller bu oranlara göre hazırlanmıştır.

5.2.2 Keratin/silika/bor kompozit kserojel sentezi

Borik asit ve polihidroksi gruplar içeren malzemeler arasındaki tersinir kompleksleşme reaksiyonları, sakkarit algılama teknolojisi ve afinite kolon kromatografisi gibi birçok farklı alanda kullanılmıştır. İlâveten, borik asit kimyası, biyolojik olarak yanıt veren, kendi kendini iyileştiren malzemeler alanında oldukça fazla uygulama alanı bulmuştur (Piest vd. 2011). Sol-jel reaksiyonlarının modifiye edilmesiyle, bor içeren homojen biyoaktif inorganik-organik malzemelerin sentezlendiği çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Pang vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, TEOS, borik asit ve kalsiyum nitrat karışımından oluşan homojen sol nanopartiküller ile PVA arasında sol-jel reaksiyonları

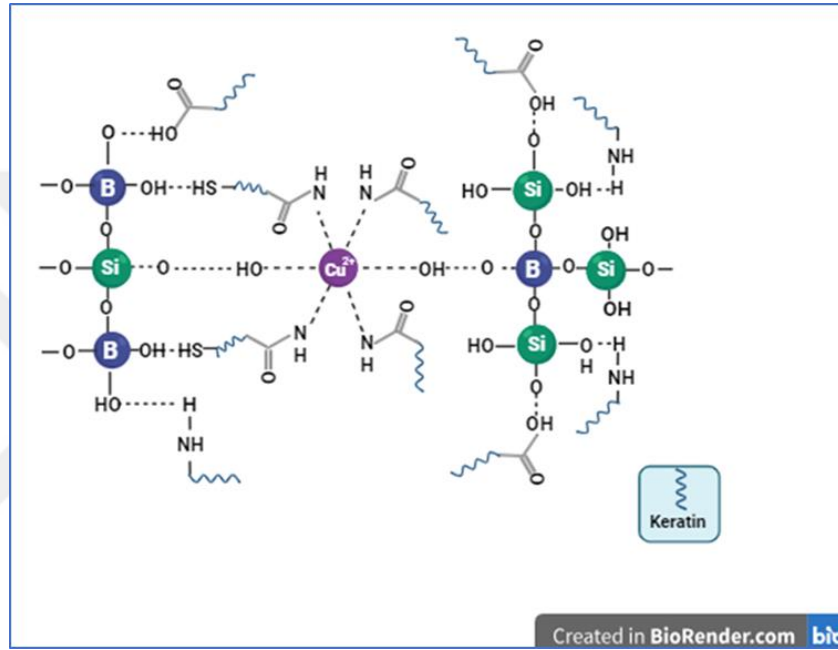
gerçekleştirilmiştir. Jelleşme aracılığıyla, inorganik birincil nanoparçacıklar PVA molekülleri etrafında toplanmış ve bir araya gelerek birbirine bağlanmıştır. Özellikle, silikon-oksijen [SiO₄] ve bor-oksijen tetrahedronları [BO₄] ve kalsiyum iyonları arasında köprü kurarak birbirine bağlanan inorganik yapılar, PVA ile ayrıca bağ kurarak organik-inorganik bir ağ yapısı oluşturmuştur. Bu çalışmadan hareketle, hem gözenekli organik-inorganik kompozit ağı genişletmek hem de istenilen nanoparçacıkların yapıya dahil edilmesini sağlamak için borik asit, rTEOS ve keratin içeren sol-jel reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Borik asidin sol-jel reaksiyonlarına katılması ile hidrojen bağı ve kovalent bağ oluşturmak suretiyle oluşan keratin/silika/bor temelli hidrojellere GO, Cu ve TiO₂ nanoparçacıkların bağlanması için daha çok aktif bölge oluşacağı düşünülmüştür.

Bor temelli bileşiklerin sentezi pH bağımlı reaksiyonlar olup, pH değerinin 9 ve üzerinde olduğu (borik asidin pKa'sına eşit veya daha büyük) alkali çözeltilerde şekerlerle ve diğer 1,2- veya 1,3-diol bileşikleriyle reaksiyonları sonucunda kararlı boronik asit esterleri oluşmaktadır. Nötral veya asidik pH'larda ise oluşan bu esterler, hemen hidrolize olmaktadır (Chen vd. 2017). Dolayısıyla, keratin/silika/bor kserojellerin sentezi için öncelikle farklı konsantrasyonlarda (%1-3(a/h)) borik asit çözeltileri hazırlanmıştır ve bu çözeltilerin pH'sı 9,24 olarak ayarlanmıştır. Keratin bu çözeltiler içerisinde çözülüp gliserol ilave edildikten sonra sol-jel reaksiyonları için gerekli işlemler tekrarlanmıştır. %3(a/h) borik asit ile yapılan reaksiyonun 45-90dk. sonra jelleştiği görülmüştür. Ancak, %2(a/h) borik asitle yapılan reaksiyon 22-24 saat sonra jelleşirken %1(a/h) borik asitle ise jelleşme meydana gelmediği görülmüştür. Bu nedenle optimum borik asit çözelti konsantrasyonu %3(a/h) kabul edilip, keratin/silika/bor kompozit kserojeller bu orana göre sentezlenmiştir.

5.2.3 Cu-keratin/silika/bor kompozit kserojel sentezi

İletkenliğin, seçiciliğin ve duyarlılığın iyileştirilmesi için, elektrokimyasal biyosensör yapımında metal partiküller (altın, paladyum, iridyum, demir, bakır, seryum ve çinko vb.), metal oksit nanoparçacıklar (TiO₂ nanopartiküller, ZrO₂) karbon malzemeler (karbon nanotüp, grafen vb.) sol-jel matrisleri içerisine kolaylıkla ilave edilebilmektedir

(Kandimalla vd. 2006, D. Li vd. 2016). Bu bağlamda, tez çalışması kapsamında Cu, TiO₂, GO ile katkılanmış keratin/bor/silika kompozit kserojeller sentezlenerek iletkenlik özellikleri araştırılmıştır. Bazı metal iyonlarının proteinlere karşı yüksek afinitelerinin olduğu iyi bilinmektedir. Proteinlerdeki amino asit kalıntıları, katyonik metal iyonları için potansiyel ligandlar olarak fonksiyonel gruplar sağlamaktadır (Alhazmi 2019, Norocel ve Gutt 2019).

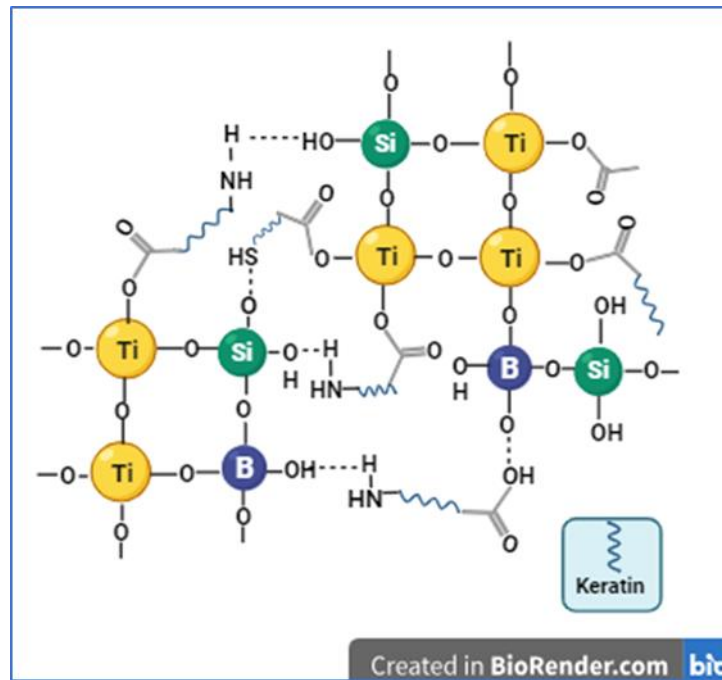


Şekil 5.7 Cu-keratin/silika/bor temelli hibrit hidroajellerde oluşan inorganik ve organik ağların muhtemel şeması

Özellikle Cu²⁺ iyonlarının proteinlerle yaptığı kompleks birçok protein tayin metodunun (biüret, lowry vs.) temelini oluşturmaktadır. Bu nedenle modifikasyon sürecinde öncelikle, keratin-bakır kompleksi oluşturulmuştur ve daha sonra sol-jel reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. **Şekil 5.7**'de gerçekleştirilen reaksiyonların muhtemel mekanizması gösterilmiştir. Elde edilen kompozit Cu-keratin/silika/bor kserojeller yapısal olarak karakterize edildikten sonra iletkenlik özellikleri araştırılmıştır.

5.2.4 TiO₂- keratin/silika/bor kompozit kserojel sentezi

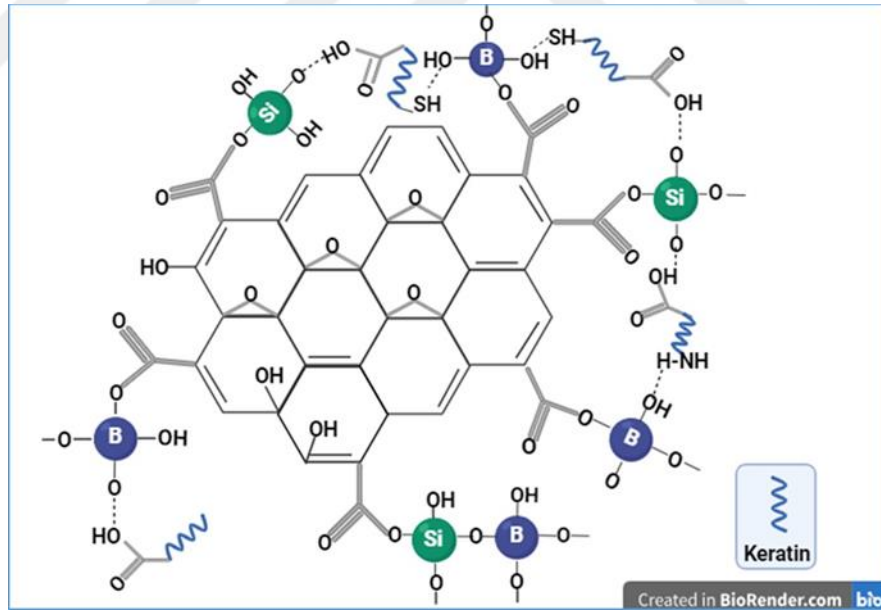
Proteinler TiO₂ yüzeyleri ile iyonik bağ, hidrojen bağları gibi zayıf etkileşimler veya proteinlerin üç boyutlu yapısının kırılmasıyla açığa çıkan yan zincirlerdeki sistein disülfid bağları gibi kovalent bağların güçlü etkileşimleri ile modifiye edilebilmektedir (Phoohinkong vd. 2018). Proteinler ve TiO₂ yüzeyleri arasındaki bağlanma etkileşimi, protein tipi, yapısı, konformasyonu ve konsantrasyonu ile TiO₂ yüzey kafesi ve morfolojik yapısı, TiO₂ yüzey alanı, sıcaklık ve pH gibi birçok faktöre bağlı olduğu iyi bilinmektedir (Phoohinkong vd. 2018, Villanueva vd. 2020). Yüksek oranda glisin, serin ve sistein gibi fonksiyonel gruplar içeren keratinin TiO₂ yüzeyleri ile interaksyonu için uygun bir protein olduğu yapılan bazı çalışmalarda vurgulanmıştır (Daoud vd. 2008, Phoohinkong vd. 2018). Tez çalışma kapsamında, keratinin TiO₂ ile interaksyonu göz önünde bulundurularak iletkenliğin ve hassasiyetinin artırılabilmesi için TiO₂-keratin/silika/bor kserojel temelli sensör matrisleri üretilmiştir. Muhtemel reaksiyon mekanizması **şekil 5.8**'de verilmiştir. TiO₂ hem keratindeki fonksiyonel gruplarla hem de rTEOS ve tetrahydroborat anyonları ile reaksiyon verdiği görülmektedir.



Şekil 5.8 TiO₂-keratin/silika/bor temelli hibrit hidrojelde oluşan inorganik ve organik ağların muhtemel şeması

5.2.5 GO- keratin/silika/bor kompozit kserojel sentezi

Yapısında bulunan epoksi, hidroksil ve karboksil grupları sayesinde, nispeten hidrofilik karakterde ve suda iyi dağılım gösteren GO, sol-jel reaksiyonları için oldukça iyi bir öncü moleküldür. Geniş yüzey alanına sahip bu malzemeler, biyouyumlu olmaları ve yüksek iletkenlik özellikler sergilemeleri sebebiyle sensör tasarımlarında oldukça fazla kullanılmaktadır. Bu bağlamda, tez çalışması kapsamında, GO sol-jel reaksiyonları ile keratin/silika/bor polimerik ağ içerisine dahil edilmeye çalışılmıştır. Sol-jel reaksiyonları için gerekli basamaklar tekrarlanmış ve toz formda GO-keratin/silika/bor kompozit kserojeller üretilmiştir. Gerekli karakterizasyonlar tamamlandıktan sonra iletkenlik özellikleri araştırılmıştır. GO'nun sol-jel ağı içerisine dahil olduğu muhtemel reaksiyon mekanizması **şekil 5.9**'da verilmiştir. Burada, GO'daki karboksil grupları hem rTEOS hem de tetrahidroborat anyonları ile reaksiyon vermiştir. Keratin ise tetrahidroborat anyonları ve rTEOS ile verdiği reaksiyonlar neticesinde polimerik ağı dahil olmuştur.

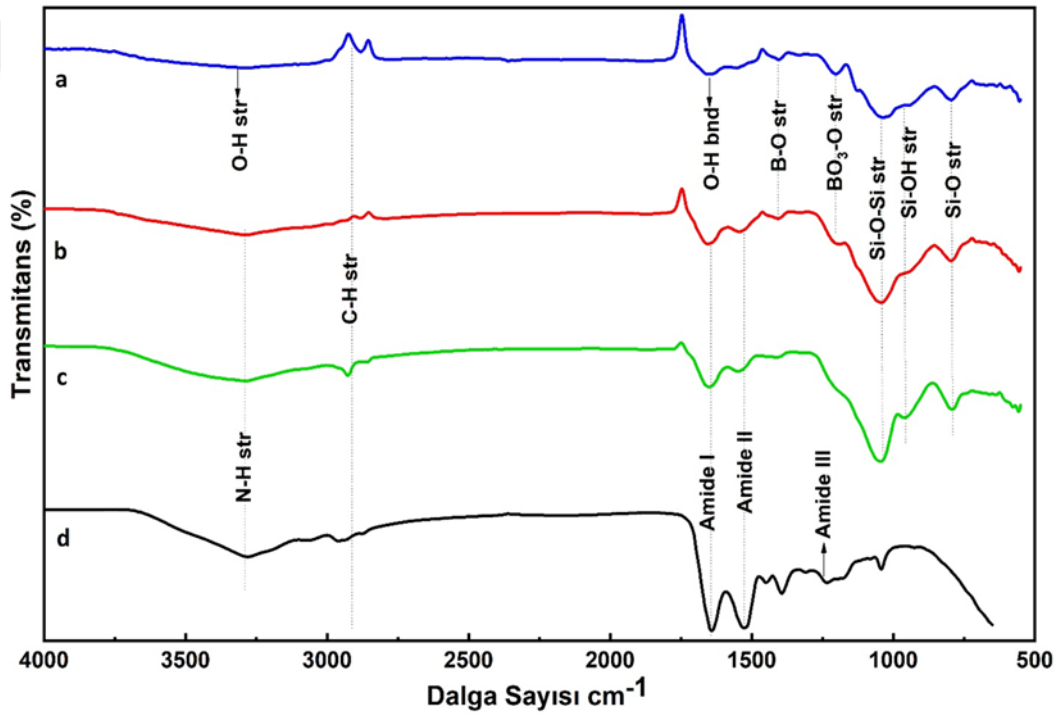


Şekil 5.9 GO-keratin/silika/bor temelli hibrit hidrojelde oluşan inorganik ve organik ağların muhtemel şeması

5.3 İnorganik-Organik Kompozit Kserojellerin Yapısal ve Fizikokimyasal Karakterizasyonu

5.3.1 FT-IR analizi

Sentezlenen kserojellerin kimyasal yapıları FT-IR analizi kullanılarak belirlenmiştir. Keratin/silika/bor kserojelin FT-IR spektrumu **şekil 5.10**'da verilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla, koyun yünü keratininin, keratin/silika ve silika/bor kserojellerin spektrumları **şekil 5.10**'a eklenmiştir.



Şekil 5.10 ATR-FTIR analiz sonuçları

a. silika/bor kserojel, b. keratin/silika/bor kserojel, c. keratin/silika kserojel, d. koyun yünü keratini

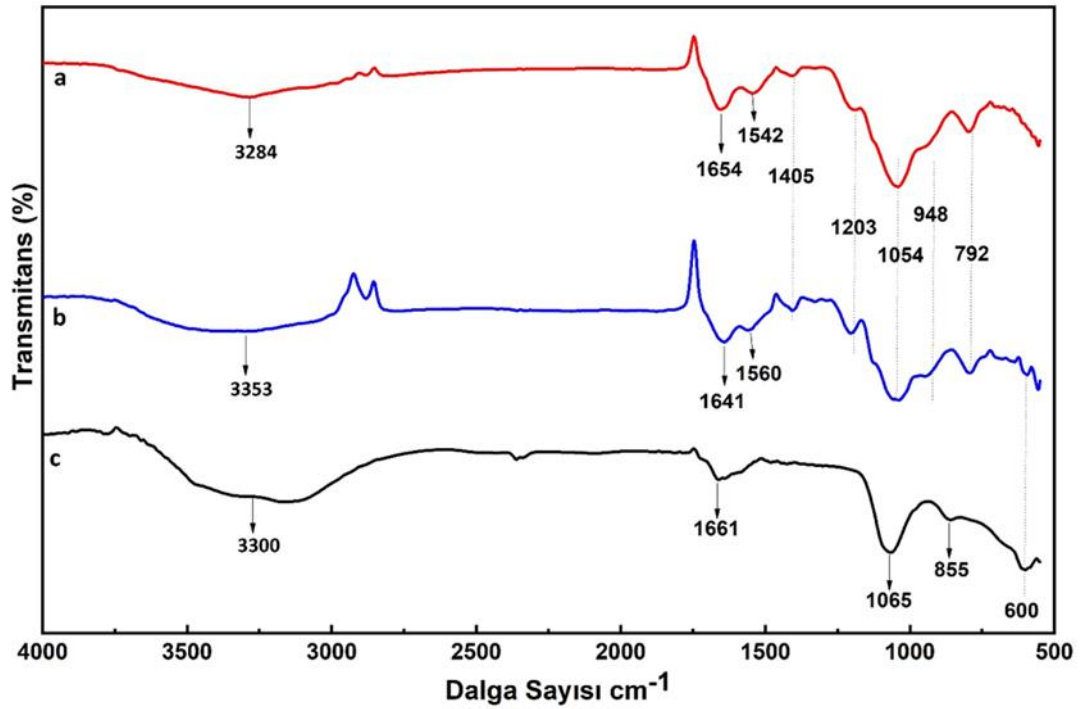
Keratin/silika/bor kserojeldeki borun yapıdaki varlığını kanıtlayabilmek amacıyla silika/bor kserojeli benzer şekilde sentezlenmiş ve FT-IR spektrum analizi gerçekleştirilmiştir. Silika/bor kserojeline ait spektrum incelendiğinde, 3345 cm^{-1} 'de görülen geniş pik sudaki hidroksil gruplarından kaynaklanmaktadır. Buradaki geniş pik bağlı suyu -OH grupları şeklinde göstermektedir (Elbeyli 2015). İlâveten, yaklaşık 1655

cm^{-1} 'de görülen pik ise toz formdaki malzemelerin higroskopik karakterini göstermektedir ve adsorbe edilmiş su moleküllerinin bükülme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Satvekar vd. 2015, Villanueva vd. 2020). 2881cm^{-1} ' de $-\text{CH}_2$ gruplarından kaynaklanan CH gerilmelerine ait pik görülmektedir (Sándor vd. 2016). 1404 ve 1200 cm^{-1} 'de görülen pikler sırasıyla B-O ve $\text{BO}_3\text{-O}$ bağlarının asimetrik gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır (Ahtaz vd. 2020, Sorarù vd. 1999). 1035 , 947 ve 795 cm^{-1} 'de görülen pikler Si-O-Si bağlarının asimetrik gerilme titreşimlerinden ileri gelmekle birlikte, 1035 cm^{-1} 'de görülen pik aynı zamanda Si-O-C, C-O-C ve Si-C bağlarına ait karakteristik absorpsiyon pikidir (Djambaski vd. 2009).

947 ve 795 cm^{-1} 'deki pikler, sırasıyla Si-OH bağının asimetrik titreşimlerini ve Si-O bağının simetrik titreşimini ifade etmektedir. Keratin/silika/bor kserojele ait spektrumu ise silika/bor kserojelin spektrumu ile benzer şekilde olup, borun polimerik ağa katıldığını kanıtlayan karakteristik pikler 1407 ve 1188 cm^{-1} 'de görülmektedir. Bu pikler keratin/silika kserojelde görülmemektedir. İlâveten Si-O-Si, Si-OH ve Si-O bağlarına ait karakteristik pikler hem keratin/silika kserojelin (1044 , 961 ve 791 cm^{-1}) hem de keratin/silika/bor kserojelin spektrumlarında (1041 , 965 ve 796cm^{-1}) açıkça görülmektedir. Bahsi geçen pikler koyun yünü keratininde bulunmamakla birlikte 3278 cm^{-1} 'de bulunan amit A bandı, N-H bağlarının gerilme titreşimlerinden kaynaklanan primer amin gruplarına aittir. 1647 cm^{-1} piki keratindeki amit I titreşiminden (C=O) ileri gelmekle birlikte, 1542 cm^{-1} piki ise β tabakalarda görülen N-H eğilme ve C-H gerilme titreşimlerinin yol açtığı amit II bandına aittir (Y. E. Arslan vd. 2017; Lin vd. 2019). Amit A, Amit I ve amit II pikleri keratin/silika ve keratin/silika/bor kserojellerine ait spektrumlarda da benzer bölgelerde görülmektedir.

Cu-keratin/silika/bor kompozit kserojele ait FT-IR spektrumu **şekil 5.11**'de verilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla, keratin/silika/bor ve $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ 'ın spektrumları şekil içerisine eklenmiştir. $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ 'ın spektrumunda yaklaşık 3300 cm^{-1} 'de görülen pik yapıdaki sudan kaynaklanan -OH gerilme titreşimlerini işaret etmektedir. Bu pikten daha düşük bölgelerde çıkan pikler ise O atomları ile ametal atomlar arasındaki bağ titreşimleriyle açıklanabilir (Derun vd. 2014). 1661cm^{-1} 'de görülen pik ise suyun -OH bükülmesinden kaynaklanmaktadır. 1065 ve 600 cm^{-1} 'deki pikler sülfat iyonunun üçlü

dejenere germe titreşimleri ve 855 cm^{-1} 'deki pik ise suyun eğilme titreşimi nedeniyle oluşan piklerdir (Gamo 1961). Cu-keratin/silika/bor kserojelin spektrumu incelendiğinde $\text{BO}_3\text{-O}$ gerilme titreşiminden kaynaklanan pikin yoğunluğunda belirgin bir artış görülmektedir. İlaveten 593cm^{-1} 'de küçük de olsa yeni bir pik oluştuğu görülmektedir. Bakır-keratin kompleksi oluşurken yapıdaki sülfat iyonları ile tetrahidroborat anyonlarının etkileşime girdiği muhtemel bir reaksiyon gerçekleşmiş ve yapıya sülfat iyonları dahil olmuş olabilir (Balinski vd. 2021). Literatürde yapılan bazı çalışmalarda metal-protein kompleks etkileşimi yapılan FT-IR analizleri ile belirlenmiştir. Metal iyonlarının konsantrasyonlarının arttıkça özellikle amit A, I ve II bantlarında spektral kayma ve yoğunluklarında ise düşüş gözlemlenebildiği ve bu değişimlerin metal iyonları ile polipeptit zincirindeki O ve N atomları ile etkileşiminden kaynaklandığı ifade edilmiştir (Alhazmi, 2019, Stănilă vd. 2011). Bu bağlamda Cu-keratin kompleksinin oluşma etkinliği amit I ve amit II bantlarının yoğunluğu ve spektral kaymaları incelenerek belirlenmeye çalışılmıştır. Cu-keratin/silika kserojellerin spektrumu incelendiğinde amit A, I ve II bantlarında spektral kaymalar meydana geldiği ancak yoğunluklarında belirgin bir değişme olmadığı görülmektedir.

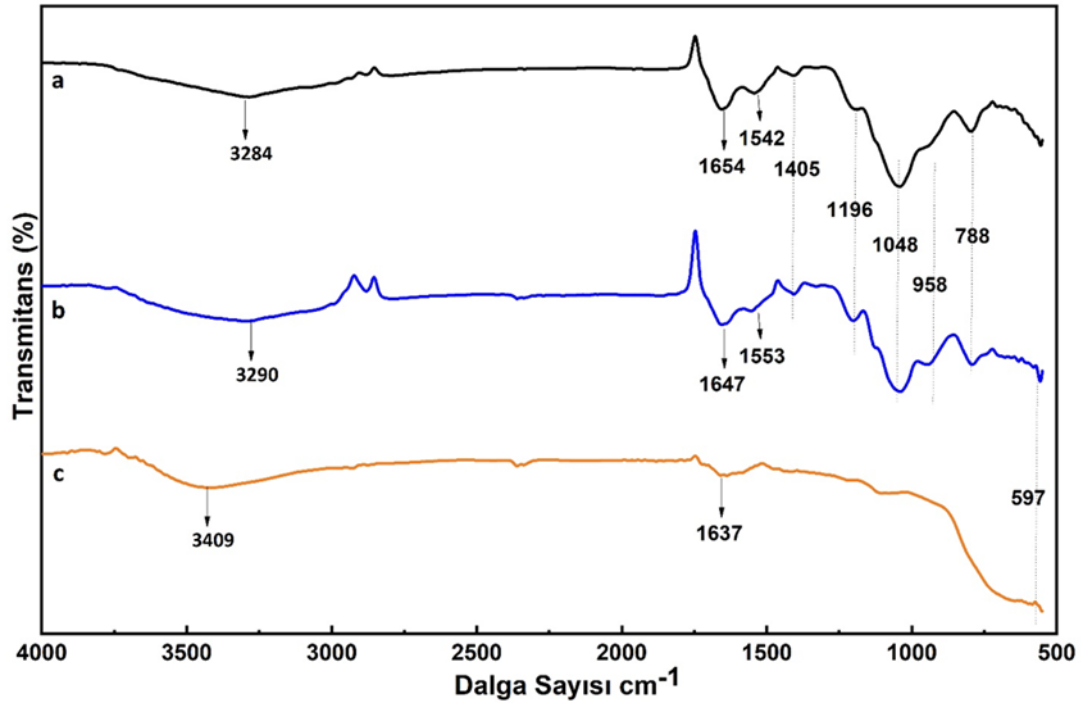


Şekil 5.11 ATR-FTIR analiz sonuçları

a. Keratin/silika/bor kserojel, b. Cu-keratin/silika/bor kserojel, c. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Keratin/silika/bor kserojelde 3284 cm^{-1} 'de görülen ve NH gerilme titreşimlerinden kaynaklanan amit A bandı, Cu-keratin kompleksi içeren Cu-keratin/silika/bor kserojelde spektral kayma sonucu daha yüksek bir bölgede yaklaşık 3353 cm^{-1} 'de oluşmuştur. Bu durum amin gruplarının kompleks oluşumuna katıldığına göstergesidir. Keratin/silika/bor kserojelde 1654 cm^{-1} 'de görülen ve C=O grubunun gerilme titreşiminden kaynaklanan amit I bandı ise spektral kayma sonucu daha düşük bir bölgede yaklaşık 1641 cm^{-1} 'de oluşmuştur. Cu-keratin oluşumunda karboksil gruplarının yer aldığına kanıtı olarak gösterilebilir. 1542 cm^{-1} 'de görülen ve N-H eğilme ve C-H gerilme titreşimlerinin yol açtığı amit II bandının spektral kayma sonucu daha yüksek bir bölgede yaklaşık 1560 cm^{-1} 'de oluşması NH_2 gruplarının Cu-keratin kompleksinde yer aldığına göstergesidir (Stănilă vd. 2011).

TiO_2 -keratin/silika/bor kompozit kserojele ait FT-IR spektrumu **şekil 5.12**'de verilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla, keratin/silika/bor ve TiO_2 nanopartiküllerin spektrumları şekil içerisinde eklenmiştir.



Şekil 5.12 ATR-FTIR analiz sonuçları

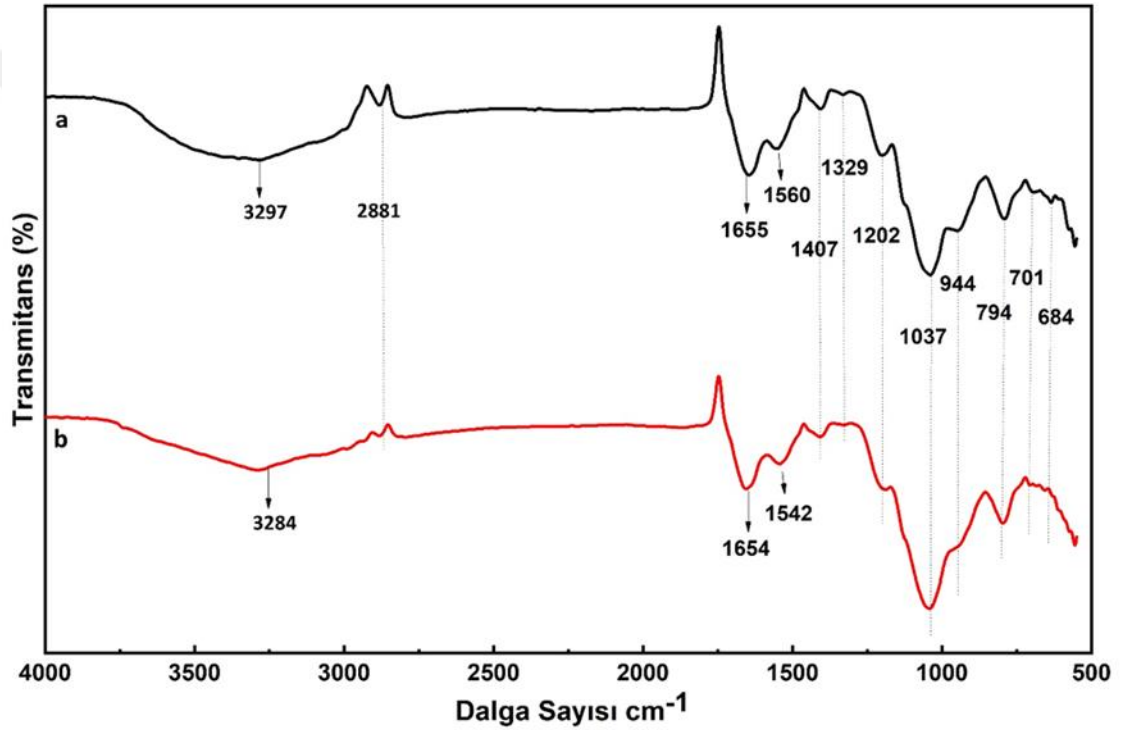
a. Keratin/silika/bor kserojel, b. TiO_2 -keratin/silika/bor kserojel, c. TiO_2 nanopartikül

TiO₂ nanopartiküllerin spektrumunda göze çarpan 3409 cm⁻¹ piki adsorbe edilmiş su moleküllerinden kaynaklanan -OH gerilme titreşimlerini, 1637cm⁻¹ ise eğilme titreşimlerini ifade etmektedir (Al-Amin vd. 2016, Villanueva vd. 2020). İlâveten, hem TiO₂'de hem de TiO₂-keratin/silika/bor kserojellerde Ti-O gerilmesinden kaynaklanan 500-600 cm⁻¹ aralığında net bir pik görülmemektedir. Her iki örnekte 597cm⁻¹'de görülen çok zayıf bir pik bu bağ gerilmesine karşılık gelebilir. Ancak belirgin bir pik elde edilememiştir. Villanueva vd. (2020) keratin hidrojel/TiO₂ interaksyonuyla ilgili yaptıkları bir çalışmada benzer bir durumla karşılaşmış ve bu durumun nanopartiküllerin düşük konsantrasyonundan ve TiO₂ gruplarının düşük kızılotesi absorpsiyonundan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada ayrıca TiO₂ ve keratin hidrojel/TiO₂'nin önemli bantlarının belirlenmesi için Raman spektrumu kullanılmıştır. Bu bağlamda yapının iyice aydınlatılması için TiO₂- keratin/silika/bor kserojeller için RAMAN spektroskopisi uygulanmıştır. Ayrıca, Cu-keratin/silika/bor kserojellerin FTIR spektrumu ile benzer şekilde TiO₂-keratin/silika kompozit kserojellerin amit A, I ve II bantlarında spektral kayma görülmektedir. TiO₂'nin proteinlerde bulunan fonksiyonel gruplar ile (-NH₂, -OH, -COOH ve -SH) kovalent ve/veya kovalent olmayan etkileşimler yoluyla molekül içi bağlar oluşturma yetenekleri (Anaya-Esparza vd. 2020, Siriorn ve Jatuphorn 2020) göz önüne alındığında özellikle amit bantlarındaki bu spektral kayma keratin-TiO₂ interaksyonun gerçekleştiğinin kanıtı olabilmektedir. İlâveten, yapılan bazı çalışmalarda yapıya TiO₂ ilave edilmesiyle birlikte proteinin yapısında konformasyonel değişimlerin meydana geldiği ve özellikle amit pik alanlarının değiştiği belirtilmiştir (Phoohinkong vd. 2018, Villanueva vd. 2020).

GO-keratin/silika/bor kompozit kserojele ait FT-IR spektrumu **şekil 5.13**'te verilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla, keratin/silika/bor kserojele ait spektrum şekil içerisine yerleştirilmiştir. Yüzeyinde oksijen içeren fonksiyonel gruplar barındıran GO'nun çözelti ortamındaki rTEOS ve/veya tetrahidroborat iyonlarıyla reaksiyona girerek polimerik ağa katılması ve böylelikle GO-keratin/silika/bor kompozit kserojellerin elde edilmesi planlanmıştır. GO-keratin/silika/bor kserojele ait spektrum incelendiğinde, GO'nun varlığına kanıt oluşturabilecek bazı yeni absorpsiyon bantlarının ortaya çıktığı görülmektedir. Yaklaşık 1329 cm⁻¹'de görülen pik C-OH yapılarından

kaynaklanmaktadır. 3297cm^{-1} 'de görülen geniş pik GO yapısındaki OH gruplarından kaynaklanıyor olabilir. 2881cm^{-1} 'de görülen ve yoğunluğu keratin/silika/bor kserojelin spektrumuna kıyasla daha fazla olan pik C-H gerilme titreşimlerini ifade etmektedir. 1633cm^{-1} 'de görülen pik GO yapısındaki C=C gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir (Dong vd. 2019). GO-keratin/silika/bor kserojelinde bu bölgede amit I piki mevcut olup yoğunluğu keratin/silika/bor kserojele göre biraz daha artmıştır. Bu iki fonksiyonel grupların pikleri aynı bölgede üst üste çakışmış olabilir. Dolayısıyla bu pikin varlığı muhtemeldir.



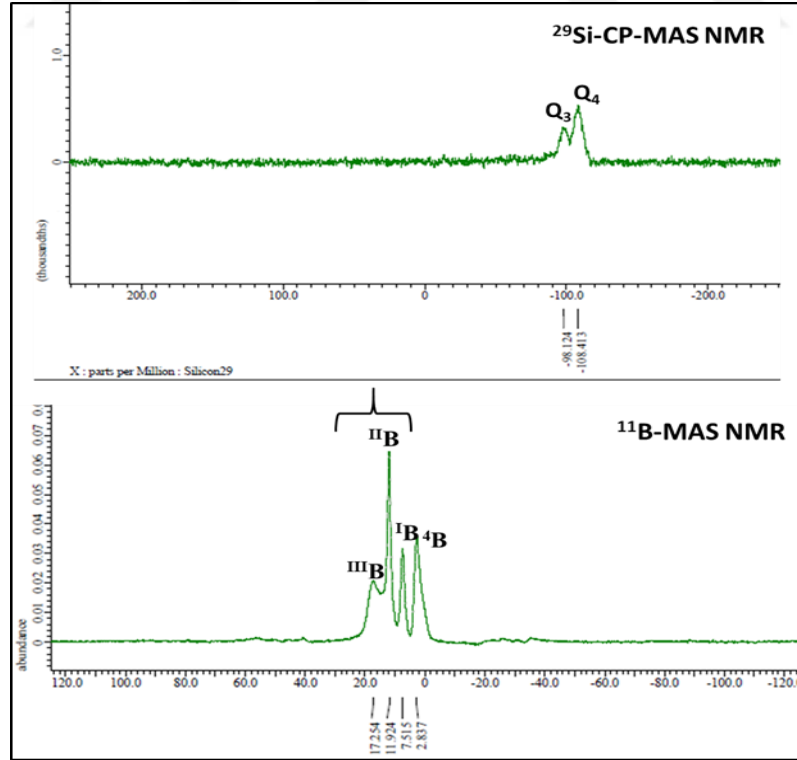
Şekil 5.13 ATR-FTIR analiz sonuçları

a. GO-keratin/silika/bor kserojel, b. keratin/silika/bor kserojel

İlaveten, $701\text{ ve }684\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen yeni zayıf pikler Si-O-C bağlarından kaynaklanmaktadır (Teresa ve Choi 2010). Bu pikler GO'in polimerik ağa katıldığını kanıtlar niteliktedir. Ancak GO'nun yapıdaki varlığını daha iyi araştırmak için Raman spektroskopisinden faydalanılmıştır.

5.3.2 Katı hal ^{29}Si -CP-Mas ve ^{11}B -MAS NMR spektroskopisi

Keratin/silika/bor kserojellerin katı hal ^{29}Si ve ^{11}B NMR spektrumları **şekil 5.14**'te verilmiştir. Literatür bulguları incelendiğinde, sol-jel reaksiyonları neticesinde sentezlenen organik-inorganik hibrit moleküllerin ^{29}Si -CP-MAS NMR spektrumlarında geminal gruplar (Q_2 ; kimyasal kayma $\delta = -91$ ppm), serbest ve bağlı gruplar (Q_3 ; kimyasal kayma $\delta = -101$ ppm) ve siloksan grupları (Q_4 ; $\delta = -110$ ppm) olmak üzere karakteristik üç tür aktif merkez bulunduğu görülmektedir (Angeli vd. 2010, Fatma Cal vd. 2021, Yılmaz vd. 2021). Keratin/silika/bor temelli kserojelin ^{29}Si -CP-MAS NMR spektrumu incelendiğinde yaklaşık -110 ppm 'de siloksan bağları için $(\text{Si}(\text{OX})_4, \text{X}=\text{Si}$ ve/veya $\text{B})$ karakteristik olan bir Q_4 piki görülmektedir (Ivanova vd. 2006). Yaklaşık -98,124 ppm'de ise $\text{Si}(\text{OX})_3\text{OR}$ ($\text{X} = \text{Si}$, $\text{R}=\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ gibi fonksiyonel gruplar) bağlarından kaynaklanan bir Q_3 piki ortaya çıkmıştır (Yılmaz vd. 2021). Bu pik, üçü Si-O-Si köprülerinden, biri ise rTEOS ve keratindeki fonksiyonel gruplar arasındaki reaksiyonlar sonucu oluşan Si-O-R bağının oluşumunu göstermektedir.

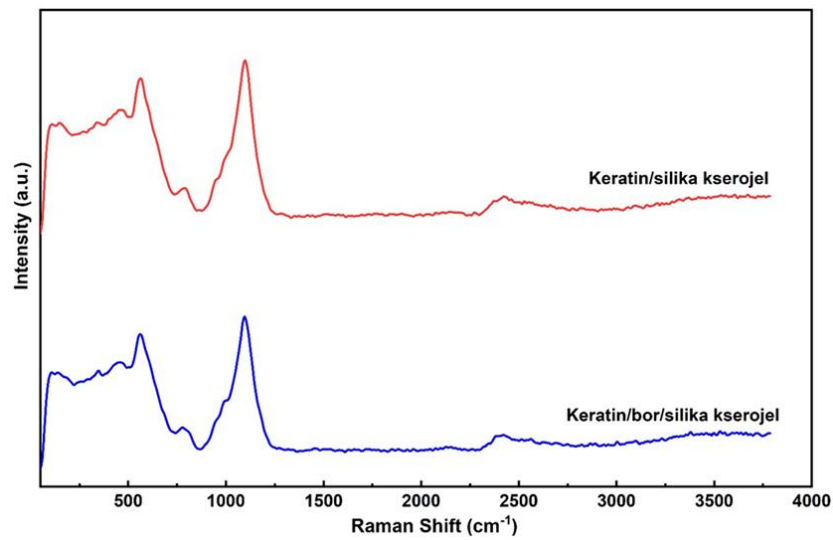


Şekil 5.14 Keratin/silika/bor temelli kserojellerin ^{29}Si -CP-MAS ve ^{11}B -MAS NMR spektrumları

^{11}B -MAS NMR spektrumu incelendiğinde, tetrahedral (BO_4 grupları, ^4B) ve trigonal bor türlerine (BO_3 grupları, ^3B) ait dört ana pik noktasının olduğu görülmektedir. Genellikle 0 ppm’de görülen dar bir tepe noktası silisyum atomları ile çevrili tetrahedral bor türlerini ($\text{B}(\text{OSi})_4$) temsil etmektedir. Ancak ^4B yapısındaki bor atomları silisyum atomu ile yer değiştirdiğinde 2-3 ppm’lik bir kimyasal kayma görülmektedir. Dolayısıyla spektrumda yaklaşık 2,84 ppm civarında görülen belirgin bir pik ^4B - ($2\text{B},2\text{Si}$) veya ^4B ($1\text{B},3\text{Si}$) türlerine karşılık gelmektedir (Angeli vd. 2010, Cal vd. 2021, Du ve Stebbins 2003). Spektrumda görülen diğer üç belirgin pik ^3B türlerine aittir. 7,52 ppm’deki ^1B piki $\text{B}(\text{OSi})_3$ 11,92 ppm’deki ^{II}B piki $\text{B}(\text{OSi})_2\text{OH}$ ve 17,25 ppm’deki ^{III}B piki ise $\text{BOSi}(\text{OH})_2$ yapılarının varlığından kaynaklanmaktadır. Görüldüğü üzere B-O-Si köprülerinin sayısı arttıkça trigonal borun kimyasal kayma değerleri de düşmektedir. Bu bağlamda kimyasal kayma değeri arttıkça yapıdaki silisyumun azaldığı rahatlıkla görülmektedir (Cal vd. 2021, Du ve Stebbins 2003, Fild vd. 2000).

5.3.3 Raman spektroskopisi

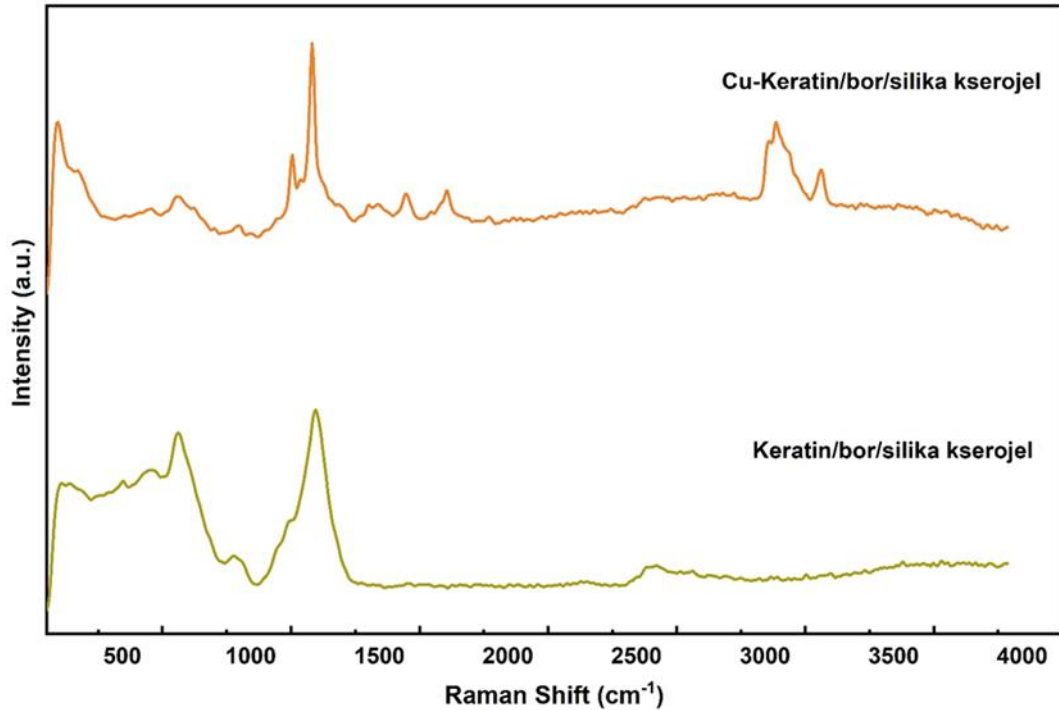
Malzemelerin kimyasal yapılarını daha fazla aydınlatabilmek için Raman analizi gerçekleştirilmiştir. **Şekil 5.15**’te keratin/silika/bor ve keratin/silika kserojellerin Raman spektrumları verilmiştir.



Şekil 5.15 Keratin/silika ve keratin/silika/bor kserojellerin Raman spektrumları

Şekil incelendiğinde her iki kserojelin spektrumlarında benzer absorpsiyon bantlarının olduğu görülmektedir. Yaklaşık 1100, 800 ve 561 cm^{-1} 'de görülen pikler sırasıyla, Si-O-C/Si-O-Si asimetrik gerilme, Si-O-Si simetrik gerilme ve Si-O-Si bükülme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (Dong vd. 2019, Spallino vd. 2014). İlaveten keratin/silika/bor kserojelinin Raman spektrumunda, bor elementine ait spesifik bantlar görülmemiştir.

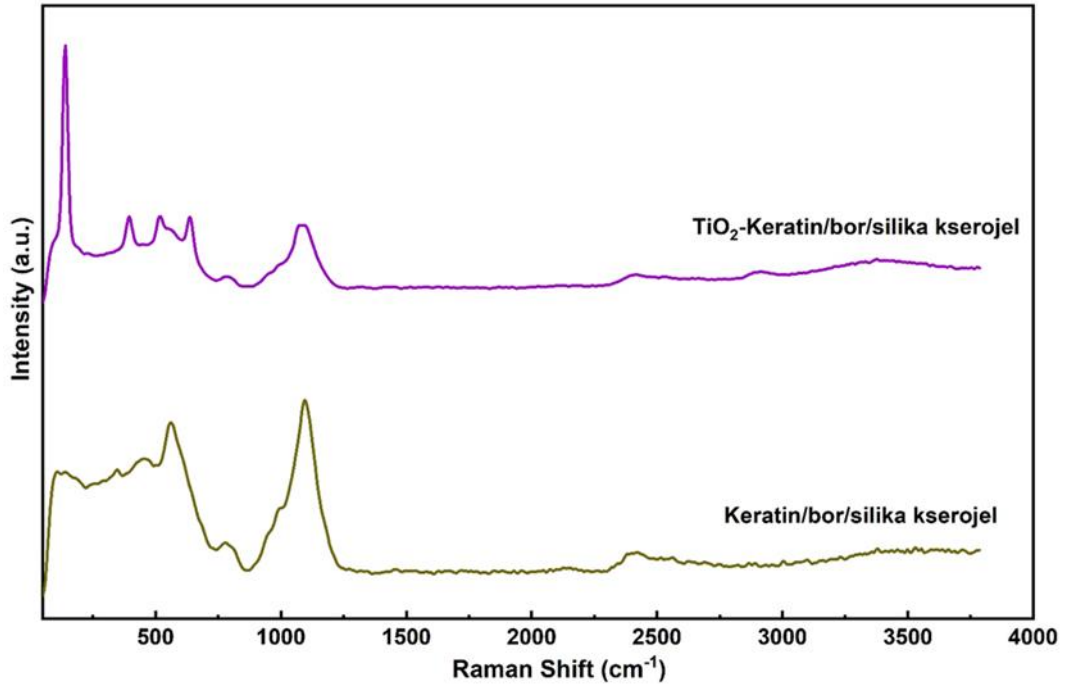
Şekil 5.16'da Cu-keratin/silika/bor kserojeline Raman spektrumu verilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla keratin/silika/bor kserojelin spektrumu şekil içerisine dahil edilmiştir. Cu-keratin/silika/bor kserojelin spektrumu incelendiğinde keratin/silika/bor kserojele kıyasla 1200-1650 cm^{-1} arasında 1618, 1455 ve 1326 cm^{-1} olmak üzere üç yeni absorpsiyon piklerinin ortaya çıktığı görülmektedir. Raman spektrumunda görülen bu pikler özellikle proteinlerdeki amin grupları ile Cu^{2+} iyonları arasında oluşan kompleksler sonucu ortaya çıkmaktadır. Elde edilen sonuçlar literatür bulgularıyla benzerdir (L. Chen vd. 2016; Wagner ve Baran 2004).



Şekil 5.16 Cu-keratin/silika/bor ve keratin/silika/bor kserojellerin Raman spektrumları

Şekil 5.17'de TiO_2 -keratin/silika/bor kserojelin Raman spektrumu verilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla keratin/silika/bor kserojelin spektrumu şekil içerisine dahil edilmiştir. TiO_2 -keratin/silika/bor kserojelin spektrumu incelendiğinde keratin/silika/bor kserojele kıyasla yaklaşık 148, 400, 526 ve 647 cm^{-1} olmak üzere dört yeni absorpsiyon pikinin ortaya çıktığı açıkça görülmektedir. Bu pikler anataz TiO_2 nanopartiküllerin karakteristik pikleri olup sırasıyla E_g , B_{1g} , A_{1g} ve E_g simetrileri ile anataz fazının Raman-aktif modlarına karşılık gelmektedir (Villanueva vd. 2020).

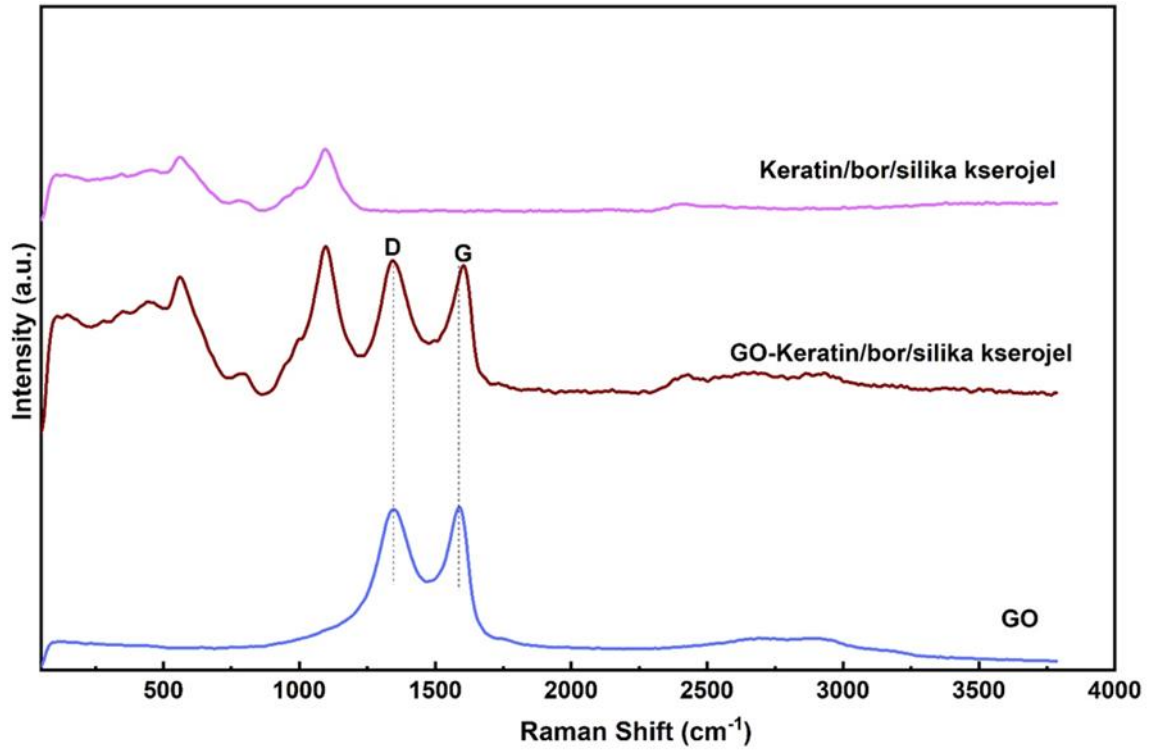
TiO_2 -keratin/silika/bor kserojelde karakteristik TiO_2 bantlarının varlığı TiO_2 nanopartiküller ile keratin/silika/bor hidrojel arasında bir interaksiyon olduğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 5.17 TiO_2 -keratin/silika/bor ve keratin/silika/bor kserojellerin Raman spektrumları

Şekil 5.18'de GO-kseratin/silika/bor kserojeline ait Raman spektrumu verilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla GO'nun ve keratin/silika/bor kserojelin spektrumları şekil içerisine dahil edilmiştir. GO'nun spektrumunda yaklaşık 1352 cm^{-1} (D bandı) ve 1592 cm^{-1} (G bandı) olmak üzere iki önemli karakteristik Raman piki görülmektedir. G

bandı, tüm sp^2 karbon formları için ortaktır ve C-C bağının gerilmesinden kaynaklanmaktadır. GO'daki D bandı ise oksidasyon sırasında kusurların, boşlukların ve bozulmaların oluşmasıyla sp^2 alanlarının boyutundaki azalma nedeniyle genişlemektedir (Perumbilavil vd. 2015). GO-keratin/silika/bor kserojelin spektrumunda da benzer şekilde karakteristik G ve D bantları görülmekte olup GO'nun polimerik ağı katıldığına kanıtı niteliğindedir.

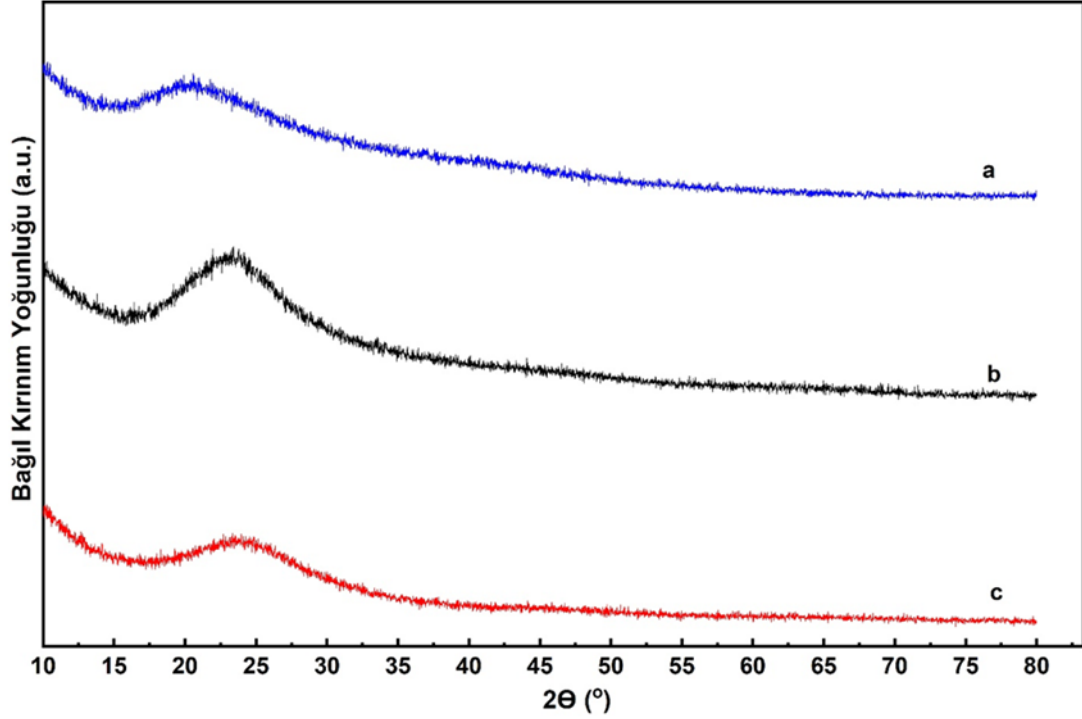


Şekil 5.18 GO-keratin/silika/bor, GO ve keratin/silika/bor kserojellerin Raman spektrumları

5.3.4 X-Işını Difraktometresi (XRD) analizi

Tüm kserojellerin kristal yapısının incelenmesi için XRD analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.19'da rTEOS, keratin/silika ve koyun yünü keratininin XRD spektrumları verilmiştir. XRD analizinden elde edilen sonuçlar, tüm örneklerin amorf durumda olduğunu göstermektedir. rTEOS'un XRD spektrumunda 25° civarında görülen geniş pik amorf silika matriksin varlığını ifade etmektedir (Djambaski vd. 2009, Satvekar vd.

2015). Koyun yünü keratininin XRD spektrumunda ise yaklaşık 20°'de amorf pik görülmektedir.

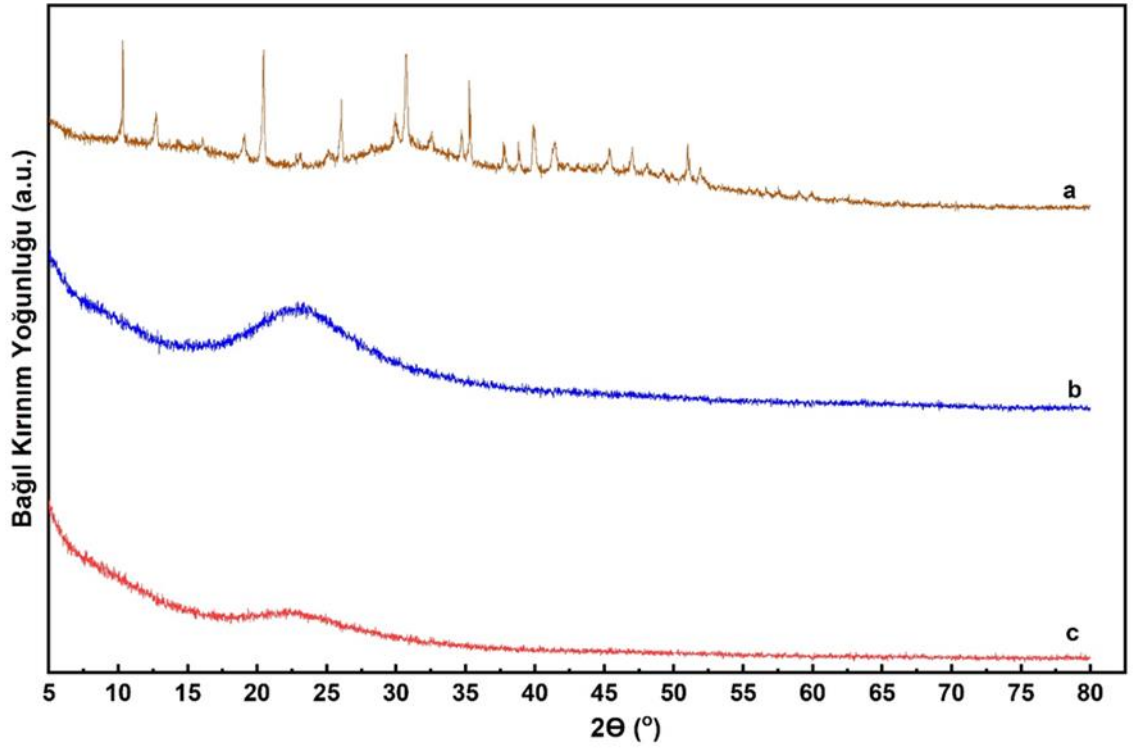


Şekil 5.19 XRD analiz sonuçları

a. Koyun yünü keratini, b. Keratin/silika kompozit kserojel, c. rTEOS

Literatürde yapılan önceki çalışmalara göre koyun yünü keratininde 9,62° ve 21° olmak üzere amorf yapıda iki adet pik bulunmaktadır ve bu pikler sırasıyla α -heliks ve β -tabakalı yapıları işaret etmektedir (Fan vd. 2018, X. Liu vd. 2017, Villanueva vd. 2020, Wu vd. 2017). Dolayısıyla sülfitolizis reaksiyonuyla alkali ortamda (pH 12-14) yapılan ekstraksiyon neticesinde elde edilen keratin ekstraktlarda ağırlıklı olarak β tabakalı yapıların varlığı söz konusudur. Keratin/silika kompozit kserojelde ise 2θ açısı 24-25° civarında olup silisyumun keratin fraksiyonları ile başarılı bir şekilde reaksiyon verdiğinin göstergesidir.

Şekil 5.20'de keratin/silika/bor kompozit kserojelin XRD spektrumu verilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla silika/bor kserojelin ve borik asidin spektrumları şekil içerisine ilave edilmiştir.

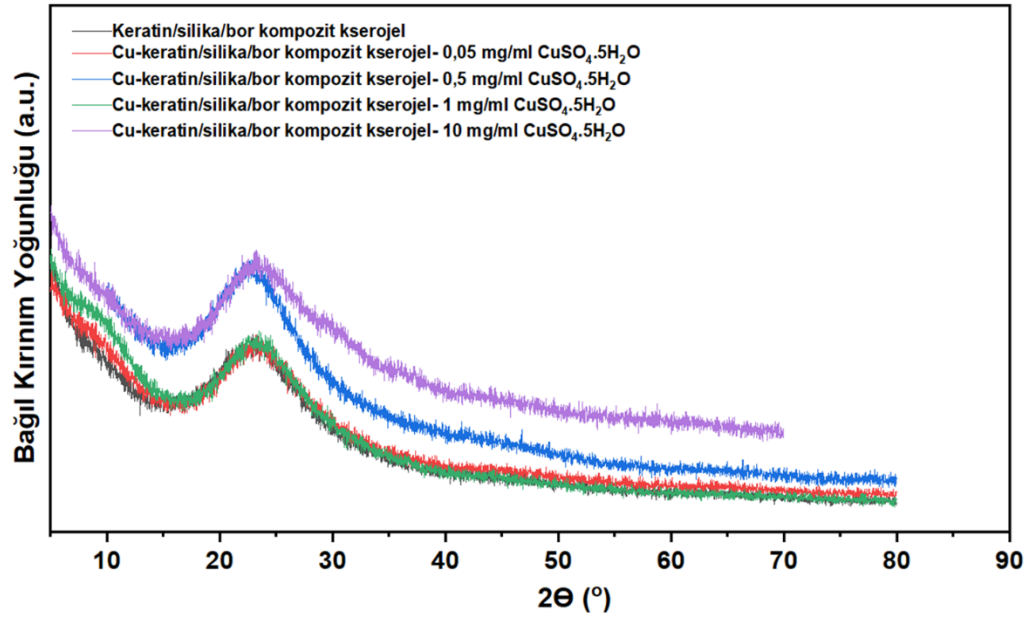


Şekil 5.20 XRD analiz sonuçları

a. Borik asit, b. keratin/silika/bor kompozit kserojel, c. bor-silika kserojel

Beyaz kristal formdaki borik asidin spektrumunda 9° - 60° arasında keskin karakteristik pikler görülmektedir. Keratin/silika/bor ve silika/bor kserojelin spektrumlarında ise bu pikler görülmemekle birlikte yapı amorfudur. Borik asidin keratin zincirler ve rTEOS ile tamamen çapraz bağlanması sonucu polimer ağlar içerisine dahil olması ve yapıda tuz şeklinde kalmamasından dolayı keratin/silika/bor kserojellerin kristallenmesine bir katkı sağlamadığı düşünülmüştür.

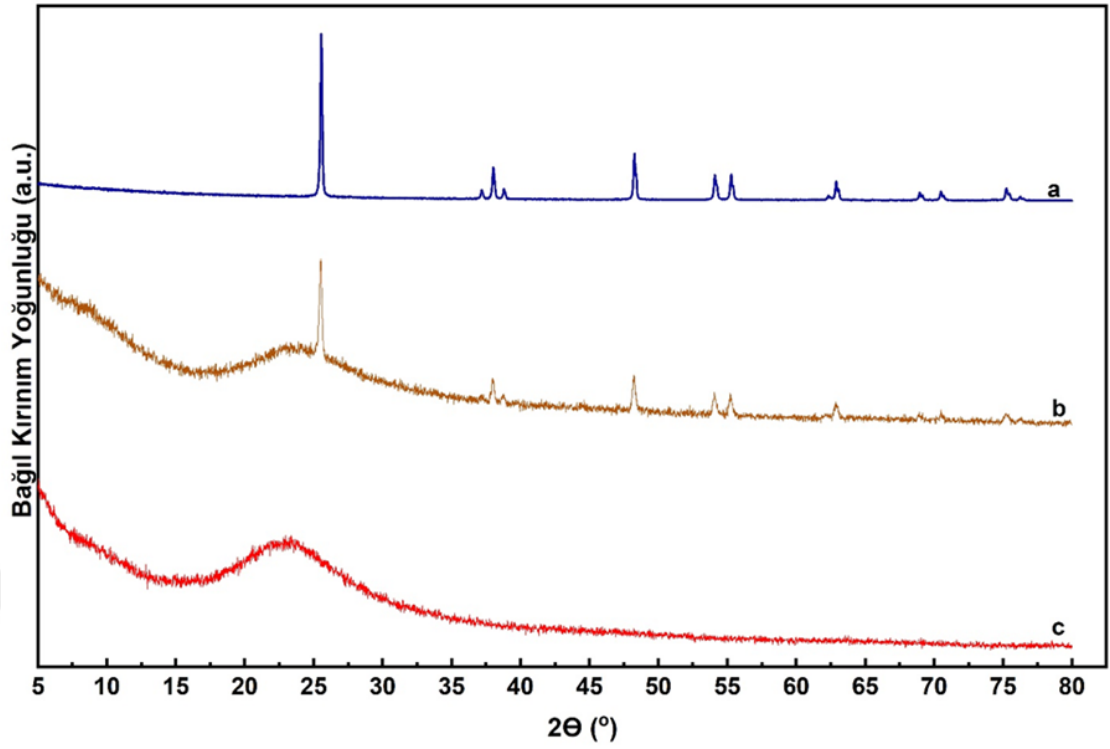
Cu-keratin/silika/bor kserojelin XRD spektrumu **şekil 5.21**'de verilmiştir. Karşılaştırma yapmak için farklı konsantrasyonlarda (0,05, 0,5 ve 10mg/ml) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ile üretilen Cu-keratin/silika/bor kserojel ve keratin/silika/bor kserojelin spektrumları da eklenmiştir.



Şekil 5.21 Cu-keratin/silika/bor kserojel için XRD analiz sonuçları

0,05-10mg/ml konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ilavesiyle birlikte amorf yapı sabit kalmış ve 2θ değerinde de bir değişme görülmemiştir. Kumar ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ile doplanmış poli(m-toluidin) sentezlemiş ve dopantın poli(m-toluidin) özellikleri üzerindeki etkisini araştırmak için UV-VIS spektroskopisi, FTIR ve XRD analizleri gerçekleştirmişlerdir. XRD analiz sonuçlarına göre, poli(m-toluidin) amorf yapıda olduğu belirlenmiştir. %3-10(a/h) konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ile doplanmış poli(m-toluidin)'de ise aynı bölgede amorf bir pik gözlemlenmiştir. Dopantın konsantrasyonu arttıkça amorf yapının korunduğu belirtilmiştir (Kumar vd. 2013).

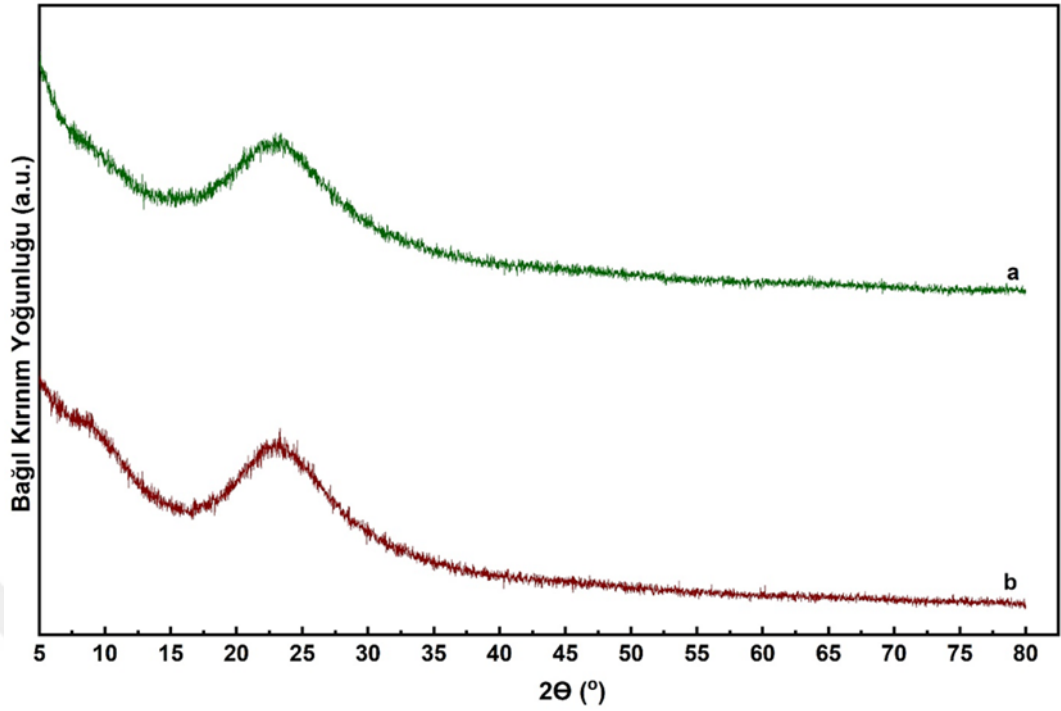
Şekil 5.22'de TiO_2 -keratin/silika/bor kserojelin XRD spektrumu verilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla keratin/silika/bor kserojelin ve TiO_2 nanopartiküllerin spektrumları şekil içerisine dahil edilmiştir. TiO_2 nanopartiküllerin spektrumu incelendiğinde 2θ değerleri yaklaşık 25° , 37° ve 48° olan anataz TiO_2 'ye ait karakteristik üç önemli keskin kırınım pikleri görülmektedir (Al-Amin vd. 2016, Villanueva vd. 2020). TiO_2 -keratin/silika/bor kserojelin spektrumunda da benzer pikler mevcut olup TiO_2 nanopartiküllerin başarılı bir şekilde yapıya dahil edildiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 5.22 XRD analiz sonuçları

a. TiO_2 nanopartikül, b. TiO_2 -keratin/silika/bor kserojel, c. keratin/silika/bor kserojel

Şekil 5.23'te GO-keratin/silika/bor kserojelin XRD spektrumu verilmiştir. Karşılaştırmak amacıyla keratin/silika/bor kserojelin spektrumu şeklin içerisine ilave edilmiştir. Her iki tür kserojelde yaklaşık $2\theta=23^\circ$ 'de amorf bir pik bulunmaktadır. Literatür bulguları incelendiğinde GO için karakteristik kırınım pikinin yaklaşık $2\theta=10,5-11^\circ$ arasında olduğu görülmektedir (Bouibed vd. 2019, Hintze vd. 2016). rTEOS ile GO'nun kimyasal modifikasyonu neticesinde, silika ve/veya bor yapıları arasında düzensiz dağılan GO'nun, düzgün katmanlı yapısı bozulmuş ve dolayısıyla GO-keratin/silika/bor kserojelin XRD spektrumunda böyle bir kırınım piki gözlenmemiştir (Dong vd. 2019, Jiang vd. 2014).



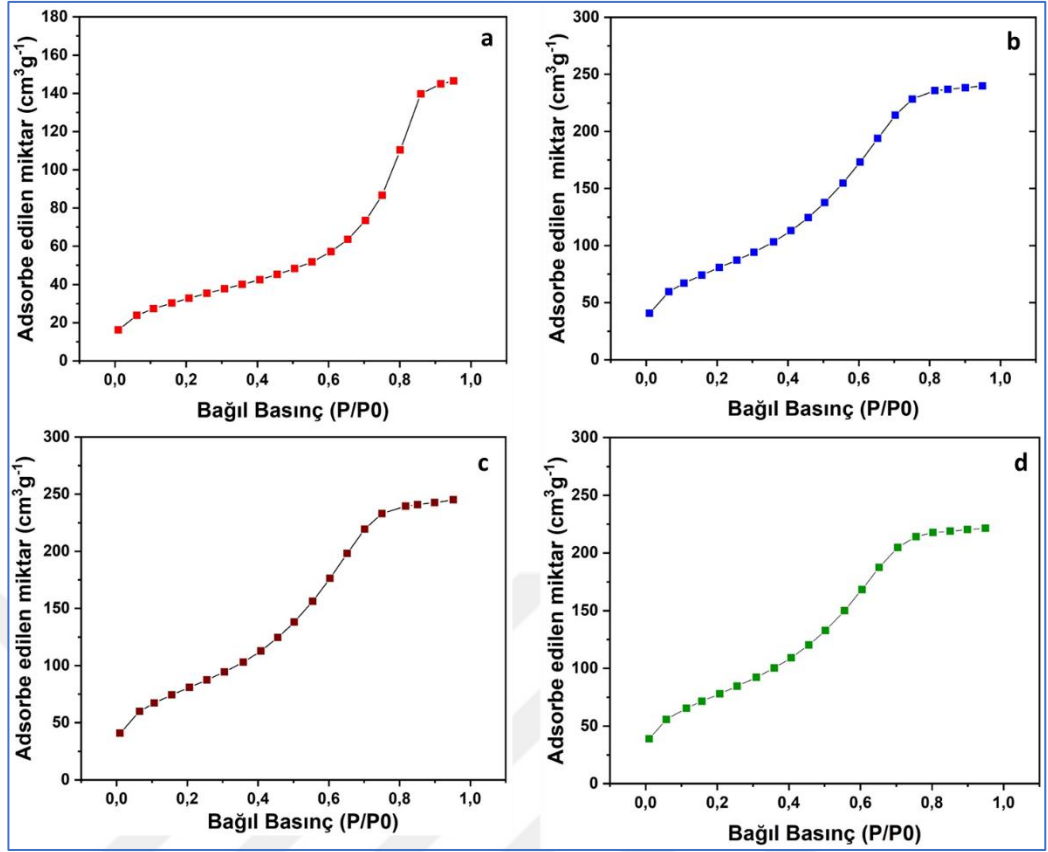
Şekil 5.23 XRD analiz sonuçları

a. Keratin/silika/bor kserojel, b. GO-keratin/silika/bor kserojel

5.3.5 BET analizi

Toz formdaki tüm kserojellerin toplam yüzey alanı, ortalama gözenek çapı ve gözenek boyutu dağılımı gibi parametreler yapılan BET analizi ile belirlenmiştir. Malzemelerin gözenekliliği ve gözenek boyutu dağılımı hakkında bilgi veren fiziksel adsorpsiyon izotermi IUPAC sistemine göre tip I-VI olmak üzere 6 farklı şekilde gösterilmektedir. Bunlar arasında mikro gözenekli yapılarda tip I, gözeneksiz veya makro gözenekli yapılarda ise tip II, III ve VI izoterm eğrileri görülmektedir. Mezo gözenekli yapılar için izoterm eğrileri ise tip IV ve V olarak sınıflandırılmıştır (Alothman 2012).

Şekil 5.24'te sentezlenen tüm kserojellerin adsorpsiyon izoterm eğrileri verilmiştir. Toz formda keratin/silika kompozit kserojeller için belirgin bir adsorpsiyon izotermi elde edilememiştir. Bu durum malzemenin yeterli derecede gözenekli yapılar barındırmamasıyla açıklanabilir. Tüm izotermilerin şekilleri incelendiğinde mezogözenekli yapılar için karakteristik olan tip IV adsorpsiyonuna karşılık geldiği açıkça görülmektedir.



Şekil 5.24 Azot adsorpsiyon izotermi

a. Keratin/silika/bor, b. GO-keratin/silika/bor, c. TiO_2 -keratin/silika/bor, d. Cu-keratin/silika/bor kserojeller

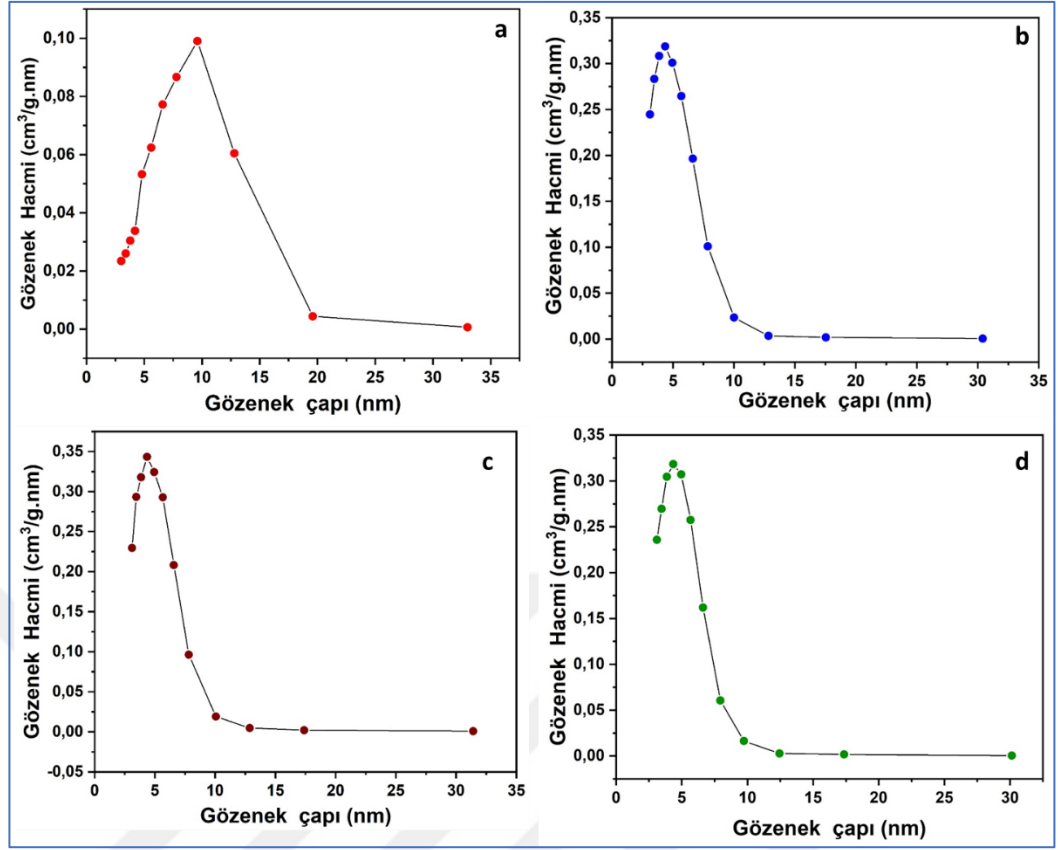
İlave olarak her iki tür kompozit kserojeller için yüzey alanı ve ortalama por çapı gibi parametreler fiziksel adsorpsiyon izotermine dayanan çok noktalı BET ve BJH yöntemleri kullanılarak hesaplanmış ve tüm bulgular **çizelge 5.1**'de özetlenmiştir.

Çizelge 5.1 Üretilen kompozit kserojellerin yüzey alanı ve ortalama por çapı

Kserojel	BET yüzey alanı (m ² g ⁻¹)	BJH adsorpsiyon yüzey alanı (m ² g ⁻¹)	Ortalama Por çapı (nm)
Keratin/silika kserojel	-	1,281	-
Keratin/silika/bor kserojel	117,028	101,761	7,75
GO-keratin/silika/bor kserojel	288,832	266,044	5,14
TiO ₂ - keratin/silika/bor kserojel	290,013	276,464	5,23
Cu-keratin/silika/bor kserojel	280,261	248,307	4,89

Çizelge 5.1 incelendiğinde keratin/silika/bor kompozit kserojel için BET ve BJH adsorpsiyon yüzey alanları sırasıyla 117,028 ve 101,761 m²g⁻¹ olarak ölçülmüş olup sonuçlar keratin/silika kompozit kserojelden oldukça yüksektir. Tüm bu bulgular incelendiğinde, borik asidin hem keratindeki fonksiyonel gruplarla hem de reaktif silanol gruplarıyla reaksiyona girerek polimerik ağa katıldığı ve dolayısıyla gözenekliliğin arttığı ve daha yoğun polimerik ağların oluştuğu sonucu çıkarılabilmektedir. Bor temelli diğer kompozit kserojellerin toplam yüzey alanlarının ise keratin/silika/bor kserojelden oldukça yüksek olup Cu, GO ve TiO₂ nanoparçacıkların polimerik ağa başarılı bir şekilde katıldığını kanıtlar niteliktedir. Ortalama por çaplarının ise tüm kserojel tiplerinde benzer olduğu görülmektedir.

Bor temelli tüm kserojeller için gözenek boyutu dağılımı BJH metodu ile hesaplanmış ve elde edilen eğriler **şekil 5.25**'te verilmiştir. Keratin/silika/bor kserojel için verilen eğri incelendiğinde gözenek çaplarının yaklaşık 2,5-15 nm olduğu görülmektedir. Bu değerler diğer tüm kompozit kserojeller için benzer olup por çapları yaklaşık olarak 2,5-10 nm aralığındadır. Tüm kserojellerin mezo gözenekli yapılar olduğu belirlenmiş olup sonuçlar izoterm eğrilerini doğrulamaktadır.



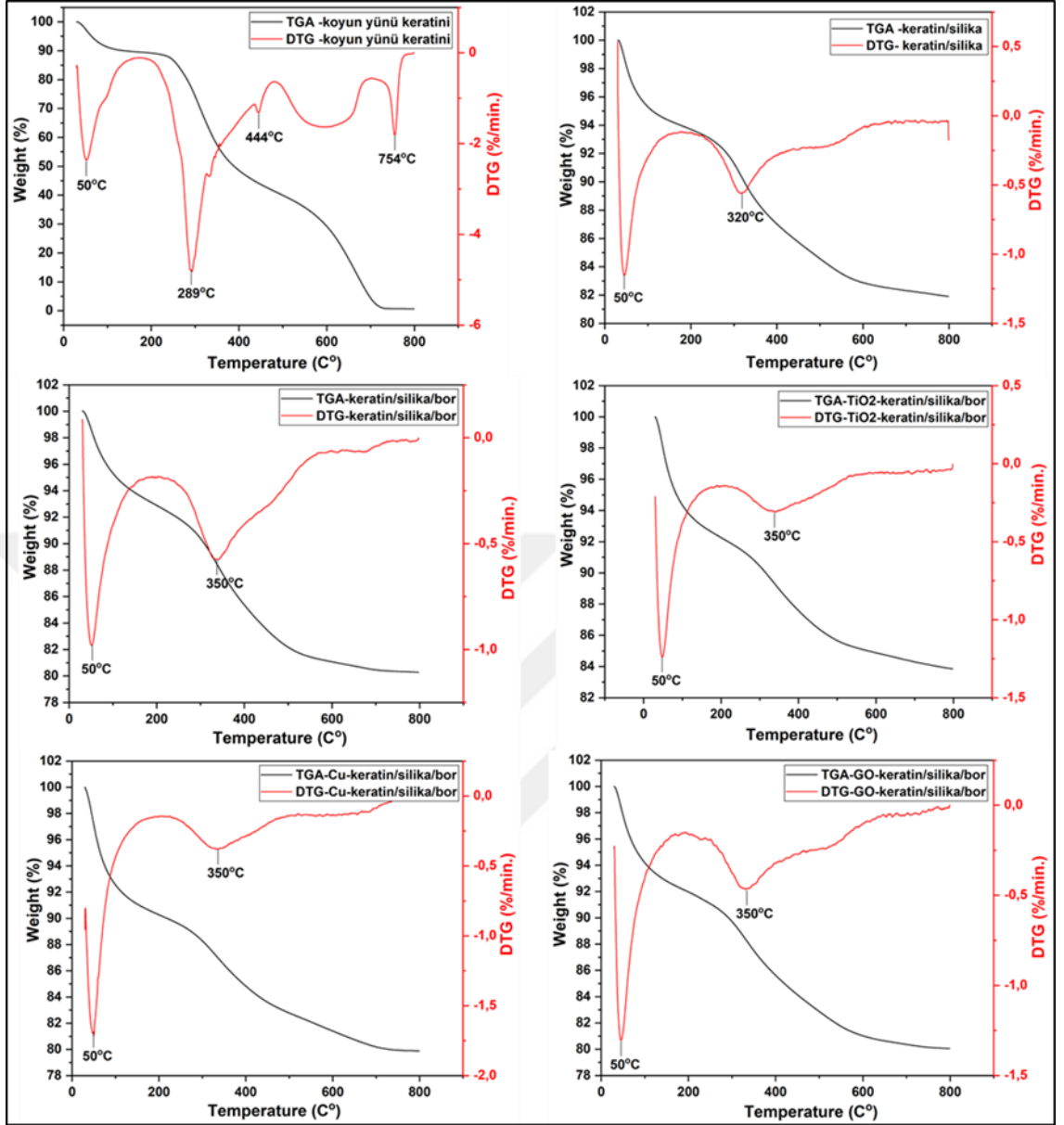
Şekil 5.25 BJH gözenek boyutu dağılım eğrileri

a. Keratin/silika/bor, b. GO-keratin/silika/bor, c. TiO₂-keratin/silika/bor, d. Cu-keratin/silika/bor kserojeller

Hidrojenlerin üç boyutlu, gözenekli yapısı, malzemenin yüzey alanını artırarak, küçük moleküllerden proteinlere ve hatta hücrelere kadar değişen daha büyük miktarlarda tanıma elemanlarının immobilizasyonuna olanak tanımaktadır (Herrmann vd. 2021). Bu bağlamda yüksek yüzey alanı ve gözenekliliğe sahip tüm bor temelli kserojeller biyosensör uygulamalarında matriksler olarak kullanım potansiyellerine sahip olabileceği düşünülmektedir.

5.3.6 Termogravimetrik analiz

Tüm kserojellerin ve KYK'nın termal analizleri tamamlanmış olup, elde edilen termogramlar ve diferansiyel termal termogravimetrik (DTG) eğrileri **şekil 5.26**'da verilmiştir. Tüm örneklere ait eğrilerde yaklaşık 100°C'nin altındaki sıcaklıklarda görülen kütle kayıpları yapıdaki suyun uzaklaştığının göstergesidir.



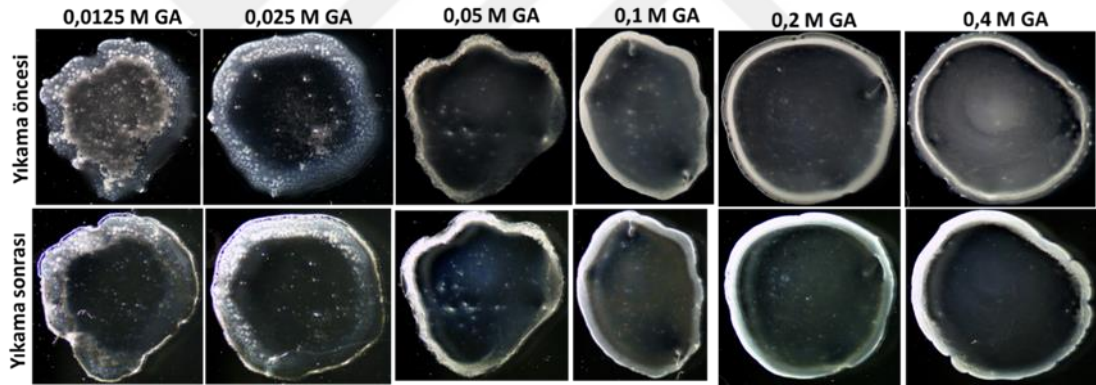
Şekil 5.26 Koyun yünü keratini ve kompozit kserojellerin TGA ve DTG eğrileri

Koyun yünü keratininde %40-50'lik bir kütle kaybı yaklaşık 289°C'de gerçekleşirken 800°C'de kütlelerinin neredeyse tamamının kaybettiği açıkça görülmektedir. Diğer tüm kompozit kserojellerde %2-6'lık kütle kayıpları 320-350 °C arasında gerçekleşirken, 800 °C'de kütlelerinin neredeyse %80-84'ü korunmuştur. Keratine kıyasla, üretilen kserojellerin termal dayanımının ve bozulma sıcaklığının artmış olması, bahsi geçen minerallerin sol-jel reaksiyonları vasıtasıyla polimerik ağa başarılı bir şekilde dahil olduğunun kanıtıdır. Yapıya katılan bor nedeniyle keratin/silika/bor kserojellerin bozunma sıcaklığının yaklaşık 30°C arttığı görülmektedir.

İlaveten TiO_2 , Cu ve GO ile modifiye edilmiş keratin/silika/bor kserojellerinde maksimum bozulma sıcaklıkları aynı kalmış (yaklaşık 350 °C), ancak bu sıcaklıkta kütle kayıplarında az da olsa değişiklikler olmuştur.

5.4 SPCE yüzeylerde inorganik-organik kompozit kserojel temelli film üretimi için optimizasyon çalışmaları

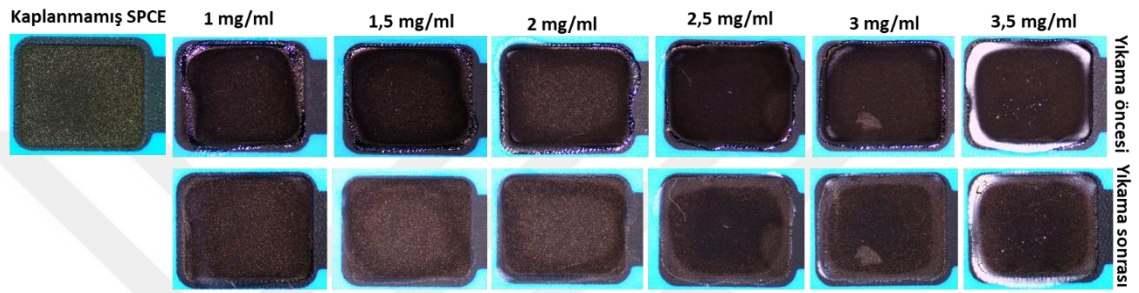
Optimizasyon öncelikle cam yüzeylerde gerçekleştirilmiştir. 5mg/ml keratin/silika/bor stok kserojel çözelti hazırlanmış ve son konsantrasyon 2,5 mg/ml olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda GA ile 1:1 oranda karıştırılmıştır. Bu karışımından 10 µl hacimlerde damlatılarak kaplamalar yapılmıştır. Yani kserojel konsantrasyonu sabit tutularak optimum GA konsantrasyonu araştırılmıştır. Elde edilen filmlerin yıkama öncesi ve sonrası stereomikroskop görüntüleri **şekil 5.27**'de verilmiştir.



Şekil 5.27 Çeşitli konsantrasyonlarda GA ile cam yüzeylerde hazırlanan keratin/silika/bor kserojel temelli kompozit filmlerin yıkama öncesi ve sonrası stereo mikroskop görüntüleri

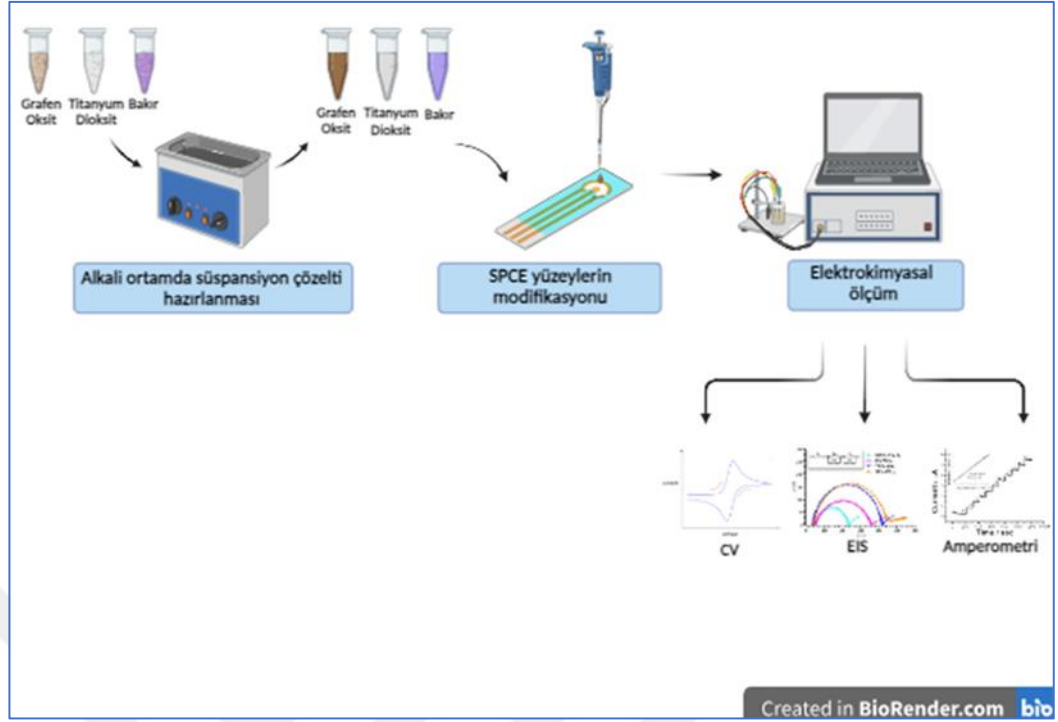
Şekil 5.27 incelendiğinde yıkama öncesi ve sonrası film yüzeylerinin düzgün ve stabil olduğu en düşük GA konsantrasyonunun 0,2M olduğu görülmektedir. Ancak, SPCE yüzeylerinin cam yüzeylere göre daha hidrofobik olmaları sebebiyle, hibrit kserojellerin bu yüzeylere daha iyi yayılım göstermesi ve tutunabilmesi için GA konsantrasyonu biraz daha yüksek tutularak arada bir değer olan 0,3M GA ile hazırlanmasına karar verilmiştir. İlaveten, TiO_2 , GO ve Cu ile katılanmış kserojellerde gözeneklilik ve yüzey alanı daha fazla olduğundan (bkz. BET sonuçları), su tutma kapasitesi yüksek olacağı

öngörülmüştür. Dolayısıyla daha çok su tutan bu yüzeylerin, kururken gözeneklerinden buharlaşan su sebebiyle çatlaması muhtemeldir. Bu bakımdan, çapraz bağlayıcı oranı biraz daha arttırılarak, SPCE yüzeylerde optimizasyon çalışmalarına 0,3M GA ile devam edilmiştir. Bu sebeple GA konsantrasyonu sabit tutulup, optimum kserojel konsantrasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Aktive edilen SPCE yüzeylerinde çeşitli konsantrasyonlarda keratin/silika/bor kserojeller ile benzer şekilde oluşturulmuş filmlerin yıkama öncesi ve sonrası stereomikroskop görüntüsü **şekil 5.28**'de verilmiştir.



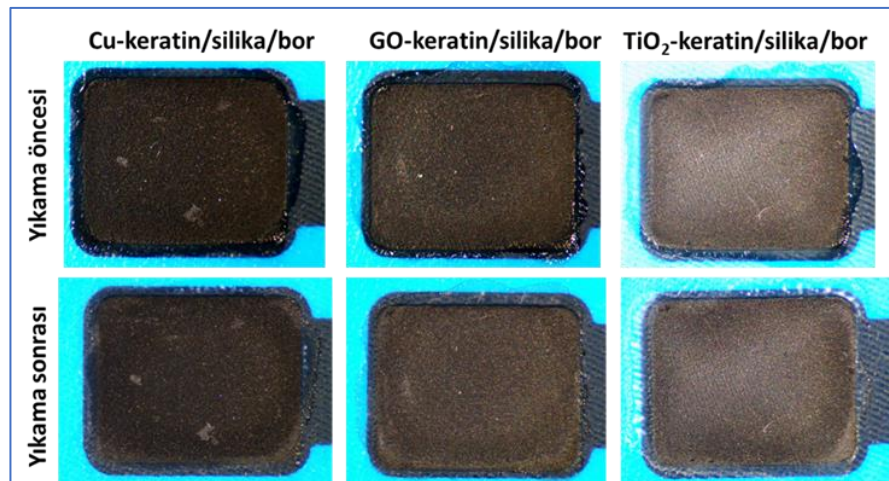
Şekil 5.28 0,3 M GA ile hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki keratin/silika/bor kserojellerle modifiye edilmiş SPCE yüzeylerin yıkama öncesi ve sonrası stereomikroskop görüntüleri

Şekil 5.28 incelendiğinde, 2,5mg/ml konsantrasyonda kserojelle oluşturulmuş kompozit filmin yüzeyinde yıkama sonrası çatlamalar ve dökülmelerin başladığı görülmektedir. Dolayısıyla optimum keratin/silika/bor kserojel konsantrasyonu 2mg/ml olarak seçilmiştir. 5mg/ml konsantrasyondaki Cu, TiO₂ ve GO ile katkılanmış keratin/silika/bor kserojel stok çözelti ile 0,3 M GA son konsantrasyon 2mg/ml olacak şekilde karıştırılmış ve bu karışımdan aktive edilmiş SPCE yüzeyine 10 µl damlatılarak kaplamalar yapılmıştır (**Şekil 5.29**).



Şekil 5.29 SPCE yüzeylerin kserojellerle modifikasyonu

Filmlerin yıkama öncesi ve sonrası morfolojisi stereomikroskop kullanılarak araştırılmıştır (Şekil 5.30). SPCE yüzeylerde de oluşturulan kompozit kserojel temelli filmlerin bütünlüğünün yıkama öncesi ve sonrası bozulmadığı ve yüzeyde herhangi bir çatlama ya da dökülme oluşmadığı açıkça görülmektedir.



Şekil 5.30 Cu, TiO₂ ve GO ile katkılanmış keratin/silika/bor kompozit kserojel ile modifiye edilmiş SPCE yüzeylerin yıkama öncesi ve sonrası stereomikroskop görüntüleri

Morfolojik incelemelerden sonra en uygun kserojel konsantrasyonunun belirlenebilmesi için EIS ve CV kullanılmıştır. Bu çalışmalar bölüm 5.6’da detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

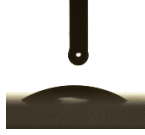
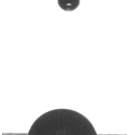
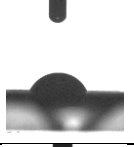
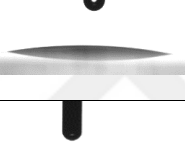
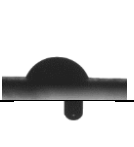
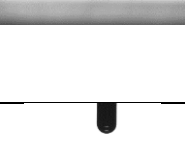
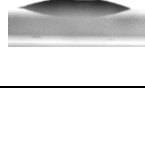
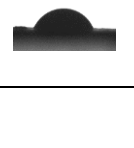
5.5 Kompozit Filmlerin Yüzey Karakterizasyonu

Kompozit filmlerin öncelikle hidrofilik/hidrofobik özellikleri yapılan temas açısı analizi ile belirlenmeye çalışılmıştır. İlaveten yüzeyin topografik özellikleri ve pürüzlülük değerleri AFM analizi ile belirlenirken, morfolojik yapısı ve elementel bileşimi ise FE-SEM/EDS analizi ile araştırılmıştır.

5.5.1 Temas açısı analizi

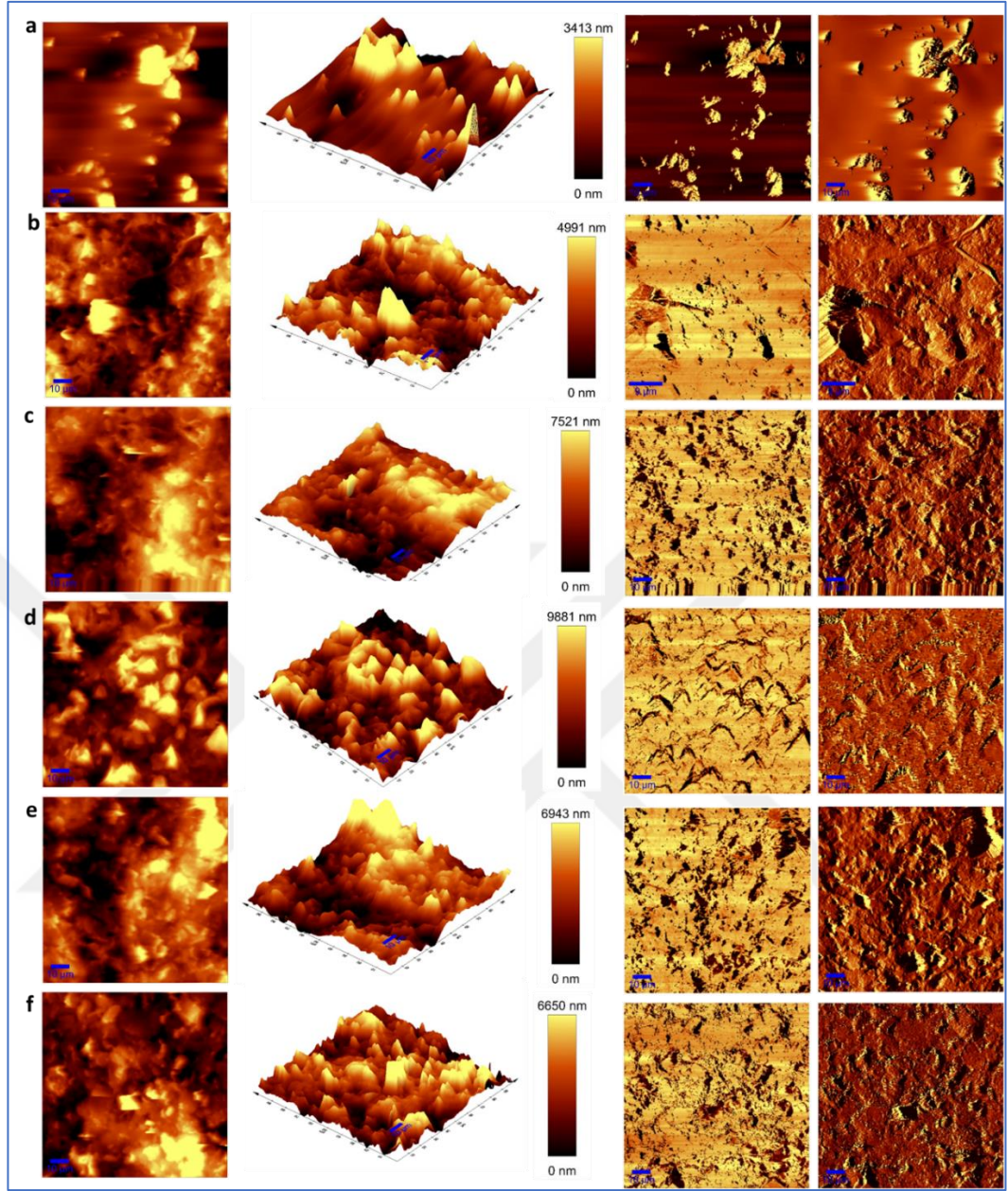
Biyomoleküllerin etkili bir şekilde immobilizasyonu için temas açısının 40-50° arasında olan yeterli derecede hidrofilik bir yüzey elde etmek gerekmektedir (Derkus v.d 2016). Dolayısıyla yüzeylerin su tutma özellikleri yapılan temas açısı analizleri ile araştırılmıştır. Tüm kserojellerle cam ve aktive edilmiş SPCE’lerde oluşturulan filmlerin denge temas açıları **çizelge 5.2**’de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde elektrotların temizlenmesi ve aktivasyon işleminin yüzey özelliklerini değiştirdiği ve yaklaşık 140° olarak ölçülen denge temas açısının 77°’ye kadar düştüğü görülmektedir. Cam yüzeylere kaplanmış tüm kserojel temelli filmlerin denge temas açıları oldukça düşük olmakla birlikte bu yüzeylerde tüm kserojellerin süperhidrofilik özellik gösterdikleri söylenebilir. Cam yüzeylere kıyasla, SPCE yüzeylerde oluşturulan aynı türde filmlerin denge temas açıları ise oldukça yüksek çıkmıştır. SPCE ve cam yüzeylerde bulunan aynı özellikteki ve derişimdeki filmlerin denge temas açılarındaki bu farklılık kaplanan yüzeylerin pürüzlülük ve yapı bakımından farklı olmasıyla açıklanabilir.

Çizelge 5.2 Cam ve SPCE yüzeylerde kserojel temelli kompozit filmlerin denge temas açıları

Kserojel Tipi	Cam Yüzey Denge Temas Açısı	Damla Görüntüsü	SPCE Yüzey Denge Temas Açısı	Damla Görüntüsü
Aktive edilmemiş kaplanmamış SPCE yüzeyi	-	-	140°	
Kaplanmamış yüzey	34°		77°	
Keratin/silika/bor	13°		65°	
Cu-keratin/silika/bor	12°		65°	
TiO ₂ -keratin/silika/bor	8°		85°	
GO-keratin/silika/bor	19°		70°	

5.5.2 AFM analizi

Aktive edilmiş SPCE yüzeylerinde oluşan kserojel temelli filmlerin topografya, faz ve genlik görüntüleri **şekil 5.31**'de verilmiştir (ölçek çubukları 10µm'yi göstermektedir).



Şekil 5.31 AFM görüntüleri

a. Kaplanmamış aktive edilmiş SPCE yüzeyi, b. Keratin/silika/bor, c. 1 mg/ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile sentezlenmiş Cu-keratin/silika/bor, d. 10 mg/ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile sentezlenmiş Cu-keratin/silika/bor, e. GO-keratin/silika/bor, f. TiO_2 -keratin/silika/bor kompozit kserojel temelli film kaplı SPCE yüzeyler

Şekil 5.31 incelendiğinde tüm kserojellerin elektrot yüzeylerinde film oluşturarak yüzeyi tamamen kapladığı açıkça görülmektedir. İlaveten, kserojel temelli filmlerin kaplanmamış SPCE yüzeylerini kaplarken pürüzlülüğü arttırdığı söylenebilir. Yüzeylerin pürüzlülük parametreleri çizelge 5.3'te özetlenmiş olup, kaplanmamış SPCE yüzeyine kıyasla keratin/silika/bor kserojel temelli film yüzeyindeki pürüzlülüğün nispeten arttığı

görülmektedir. Cu-keratin/silika/bor kserojel ile kaplı yüzeylerde bakır konsantrasyonu artırıldığında yüzey pürüzlülüğünün oldukça arttığı görülmektedir.

Çizelge 5.3 Yüzey pürüzlülüğü parametreleri

Yüzey	Root Mean Square (RMS) Roughness (Rq) (nm)
Kaplanmamış SPCE yüzeyi	1615
Keratin/silika/bor kserojel ile kaplanmış yüzey	1773
1 mg/ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi kullanılarak sentezlenen Cu-keratin/silika/bor kserojel ile kaplanmış yüzey	2061
10 mg/ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi kullanılarak sentezlenen Cu-keratin/silika/bor kserojel ile kaplanmış yüzey	2815
GO-keratin/silika/bor kserojel ile kaplanmış yüzey	2175
TiO_2 -keratin/silika/bor kserojel ile kaplanmış yüzey	2460

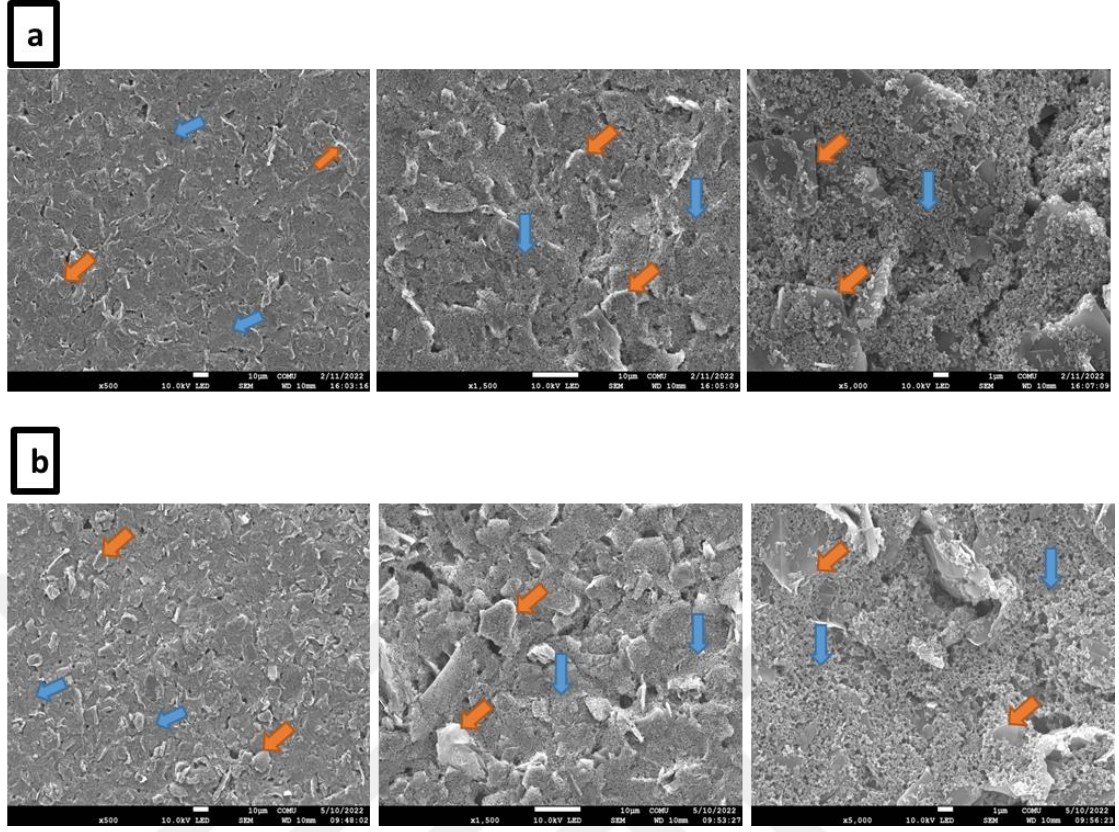
GO ve TiO_2 nanopartiküller süspansiyon şeklinde dağıtılarak polimerik ağa dahil edildiği için bu yüzeylerde pürüzlülük keratin/silika/bor kserojellerle kaplı yüzeylere nispeten oldukça artmıştır. GO-keratin/silika/bor kserojel ile kaplanmış yüzeyin pürüzlülüğünün ise TiO_2 -keratin/silika/bor kserojele göre daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun, GO tabakalarının oldukça pürüzsüz bir yüzeye sahip tipik olarak kavisli, katman benzeri bir yapı göstermesiyle alakalı olabileceği düşünülmektedir. Tüm kserojellerle oluşturulmuş film yüzeylerinin morfolojileri SEM analizi ile daha detaylı açıklanmıştır.

5.5.3 FE-SEM/EDS analizi

Üretici firmaların SPCE'leri üretirken kullandıkları iletken karbon mürekkebin yapısında genellikle grafit parçalarının (elektroaktiviteyi arttırmak için) yanı sıra esnek bir substrat üzerine dağılımı ve yapışmayı iyileştirmek için polimerik bağlayıcıların, çözücülerin ve bazı katkı maddelerinin bulunduğu bilinmektedir (Stoll vd. 2022).

Elektroaktif karbon parçacıklarını barındıran bu karbon mürekkebinin içeriğindeki bağlayıcı maddelerden ötürü yavaş elektrot kinetiği meydana gelmektedir. Bu problemi aşmak ve karbon elektrot yüzeyini etkinleştirmek için ısıl işlem, oksijen plazma işlemi, aşırı anodik potansiyellerde CV ölçümleri gibi çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Tüm teknikler ile elektrotransfer özelliklerin geliştirilmesi ve ilgilenilen bileşiklere duyarlılığın artırılması hedeflenmiştir. İlave, SPCE yüzeylerdeki bu ön işlemler neticesinde, kirletici maddelerin yüzeyden arındırılmasının yanı sıra, yüzeydeki karbon-oksijen fonksiyonel gruplarında ve yüzeyin hidrofilik özelliğinde artış gözlemlenebilmektedir (González-Sánchez vd. 2018).

Bu bağlamda, tez çalışması kapsamında SPCE'lerin aktivasyon ve temizlenmesi işlemleri üretici firmanın talimatlarına göre yüksek anodik ve katodik potansiyellerde CV ölçümleri alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu prosedür ile SPCE yüzeyinde bulunan karbon mürekkebinde yer alan iletken olmayan kısımlar, grafit yapıları zarar vermeden temizlenerek matristeki karbonun elektron transfer kinetiği hızlandırılması ve kserojellerin ise temiz yüzeylere etkin bir şekilde kaplanması amaçlanmıştır. Aktivasyon işleminden önce ve sonra yüzeyde meydana gelen morfolojik değişimleri gösteren ve farklı büyütme ölçeklerinde elde edilen SEM mikrografileri **şekil 5.32**'de verilmiştir.



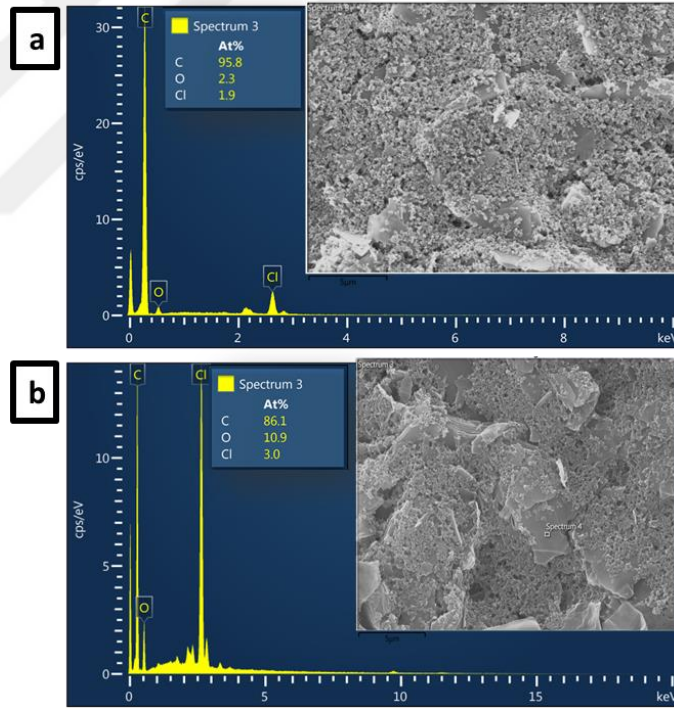
Şekil 5.32 a. Kaplanmamış SPCE'nin yüzey aktivasyonu öncesi, b. sonrası soldan sağa sırasıyla 500x, 1500x ve 5000x büyütmelerdeki SEM mikrografileri (Ölçek çubukları 500x ve 1500x büyütme için 10µm'yi, 5000x için ise 1µm'yi göstermektedir. Turuncu oklar ile gösterilen parlak yapılar pul benzeri grafit düzlemleri, mavi oklarla gösterilen nispeten koyu bölgeler ise grafitik karbon ve amorf karbondan oluşan yapıları temsil etmektedir)

Şekil 5.32-a incelendiğinde aktivasyon işleminden önce SPCE yüzeyde polimerik mürekkep içerisine adeta gömülmüş grafit pullar ile kaplı, düzensiz ve pürüzlü yüzeyler görülmektedir. Aktivasyon işleminden sonra ise (Şekil 5.32-b) matriksten arınmış, grafit pulların daha belirgin hale geldiği ve dolayısıyla daha pürüzlü yüzeyler elde edilmiştir.

Faria vd. (2020) aynı üretici firmanın prosedürüne göre SPCE yüzeylerde temizleme ve aktivasyon işlemi gerçekleştirmiştir. SEM, AFM ve RAMAN teknikleri kullanılarak yüzey ve yapısal analizleri tamamladıktan sonra CV ve EIS ölçümleri ile elektrokimyasal davranışları incelemişlerdir. Elde ettikleri bulgulara göre, aktivasyon işlemi yüzeyin pürüzlülüğünü artırarak elektrolite daha fazla aktif karbon alanı açığa çıkarmıştır. Bu durum da iletkenliğin artmasını sağlamıştır. SEM mikrografilerinde gördükleri koyu ve

parlak bölgeler için RAMAN analizi gerçekleştirilmiştir. Açık bölgelerin grafit pullarındaki sp^2 yapılarını ve koyu bölgelerin ise sp^2 grafitik karbon ve sp^3 amorf karbon yapılarının karışımını oluşturduğunu belirlemişlerdir. Bu bağlamda, **şekil 5.32-a ve b**'de aktivasyon işleminden sonra SPCE yüzeyde rastgele dağılan grafit pullarını (turuncu oklar ile gösterilmiş) temsil eden parlak yapıların nispeten arttığı, amorf ve grafitik karbondan oluşan koyu renkli matriksin (mavi oklar ile gösterilmiş) ise nispeten azaldığı yorumları yapılabilir.

Aktivasyon ve temizleme işlemlerinden önce ve sonra kaplanmamış SPCE yüzeylerinin elementel bileşimini araştırmak için EDS analizi yapılmış ve elde edilen spektrumlar **şekil 5.33**'te verilmiştir.

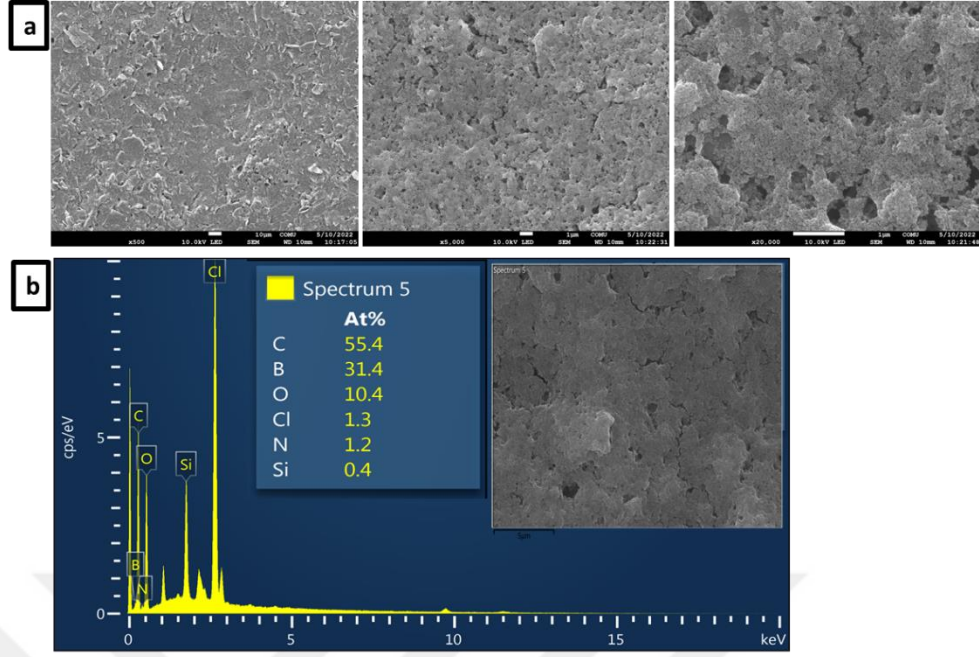


Şekil 5.33 a. Kapanmamış SPCE'nin yüzey aktivasyonu öncesi, b. sonrası EDS spektrumları

Spektrumlar incelendiğinde kaplanmamış SPCE'de aktivasyon öncesi C ve O elementlerinin % atomik kütle cinsinden değerleri sırasıyla yaklaşık olarak %96 ve %2,3 olarak tespit edilirken aktivasyon sonrası bu değerler yaklaşık olarak %86 ve %11 olarak

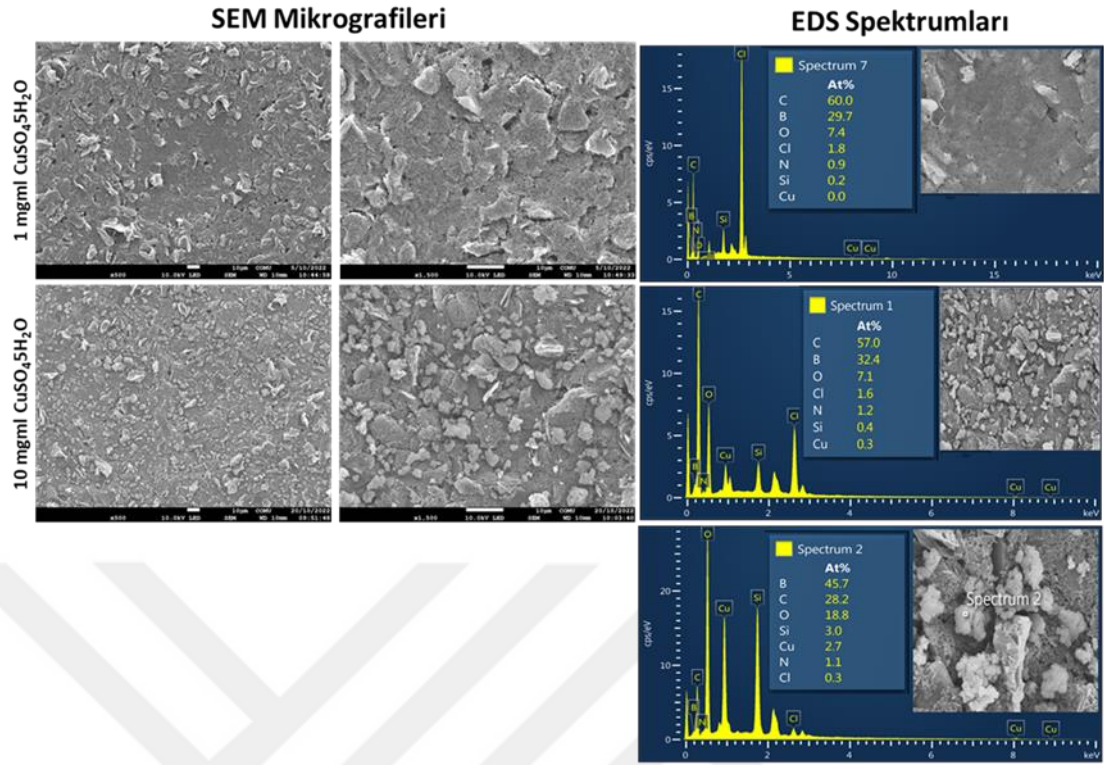
tespit edilmiştir. Bu durum yüzeydeki karbon-oksijen fonksiyonel gruplarında artış olduğunun göstergesidir. İlâveten kaplanmamış SPCE'lerin yüzey aktivasyonu öncesi ve sonrası temas açısı ölçümleri sırasıyla 140° ve 77° olarak belirlenmiş olup, aktivasyon sonrası yüzeyin hidrofilik özelliğinin arttığı açıkça görülmektedir. Yüzeydeki karbon-oksijen fonksiyonel grupları ve hidrofilik özellikteki bu artış, elektrotların elektrotransfer özelliklerini iyileştirmesinin yanı sıra, modifikasyonu sırasında kserojel çözeltilerin yüzeye homojen olarak yayılması ve oluşan filmlerin yüzeye tutunmasında pozitif katkı sağlamaktadır. İlâveten her iki spektrumda da tespit edilen Cl elementi, SPCE'lerin üretimi sırasında karbon mürekkebin plastik ve seramik yüzeylere tutunmasını sağlamak için kullanılan mineral bağlayıcılar ve/veya yalıtıcı polimerlerden kaynaklanmaktadır (Pine research 2016).

Keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE yüzeylerin 500x, 5000x ve 20000x büyütmelelerdeki SEM mikrografileri ve EDS spektrumu **şekil 5.34**'te verilmiştir. SEM mikrografileri incelendiğinde, polimerin yüzeyi tamamen kapladığı ve pürüzlü bir morfoloji sergilediği görülmektedir. EDS spektrumunda ise C ve O'ya ek olarak, B, Si ve N elementlerinin % atomik kütle cinsinden değerleri sırasıyla %31,4, %0,4 ve %1,2 olarak tespit edilmiş olup bu sonuç keratin, rTEOS ve borik asit ile gerçekleştirilen sol-jel reaksiyonları neticesinde organik-inorganik hibrit yapıların başarılı bir şekilde sentezlendiğinin göstergesidir.



Şekil 5.34 a. Keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE yüzeylerinin soldan sağa sırasıyla 500x, 5000x ve 20000x büyütmelerdeki SEM mikrografileri (Ölçek çubukları 500x büyütme için 10µm'yi ve 5000x ve 20000x için ise 1µm'yi göstermektedir), b. EDS spektrumu

Şekil 5.35'de 1mg/ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi kullanılarak sentezlenen Cu-keratin/silika/bor kserojel ile kaplanmış SPCE yüzeyinin SEM mikrografisi incelendiğinde, keratin/silika/bor kserojel temelli film yüzeyleri ile benzer morfolojide oldukları görülmektedir. EDS spektrumunda ise benzer elementler tespit edilirken, Cu elementi belirlenememiştir. Bu durumun yapıdaki Cu'nun cihazın belirleyebileceğinden daha düşük miktarda olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüş olup, bu kez 10mg/ml konsantrasyonda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi kullanılarak Cu-keratin/silika/bor kserojeller sentezlenmiştir. Gerekli işlem basamakları tekrarlandıktan sonra Cu-keratin/silika ile modifiye edilmiş SPCE'ler hazırlanmıştır. SEM mikrografileri incelendiğinde, aglomeratlardan kaynaklanan oldukça pürüzlü yüzeyler görülmektedir.



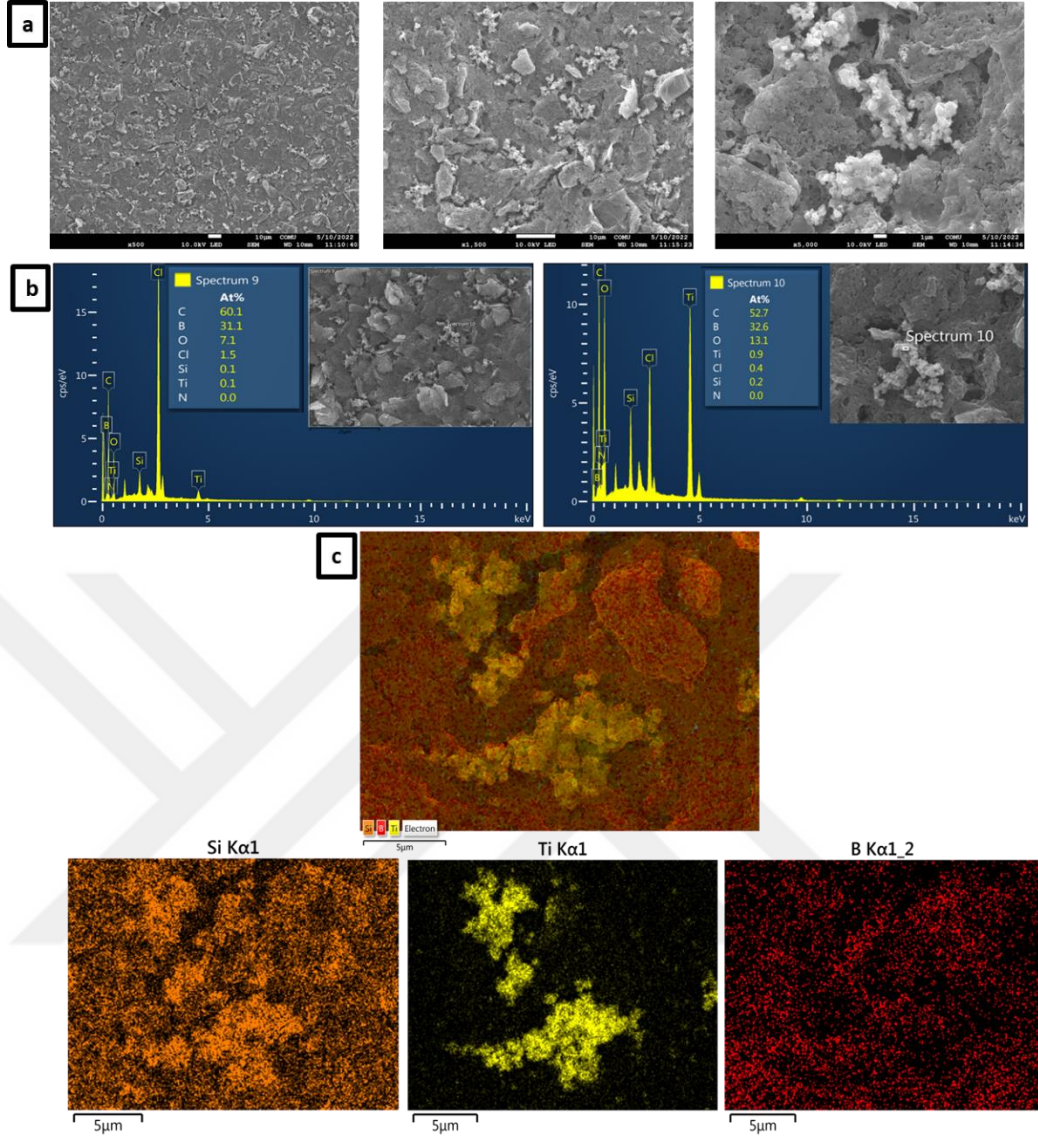
Şekil 5.35 Farklı iki konsantrasyonda CuSO₄.5H₂O ile sentezlenmiş Cu-keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE yüzeylerinin soldan sağa sırasıyla 500x ve 1500x büyütmelelerdeki SEM mikrografileri (Ölçek çubukları 10µm'yi göstermektedir) ve EDS spektrumları

Tüm yüzeyin EDS spektrumunda atomik kütle cinsinden %0,3 oranında Cu elementi tespit edilmiştir. İlaveten aglomerat üzerinde alınan spektrumda ise, diğer tüm elementlerin belirlenmesinin yanı sıra Cu (%2,7), B (%45,7) ve Si (%3) elementlerinin atomik kütle cinsinden değerlerinin oldukça arttığı görülmektedir. Burada Cu miktarı artıkça, Cu-keratin komplekslerin miktarı ve dolayısıyla bu yapıların sol-jel reaksiyonu neticesinde B ve Si ile çapraz bağlanma oranları artmıştır. İlaveten, bu kümelenmeler, sol-jel reaksiyonu sırasında reaktif silanol grupları ve tetrahidroborat anyonlarının hem Cu²⁺ hem de keratin-Cu komplekslerindeki fonksiyonel gruplarla aynı anda reaksiyonu sonucunda oluşan yapılardır.

1mg/ml konsantrasyonda CuSO₄.5H₂O çözeltisi kullanıldığında bu reaksiyonlar daha az gerçekleşmiş, dolayısıyla aglomerat yapılar oluşmamıştır. Kserojel temelli film

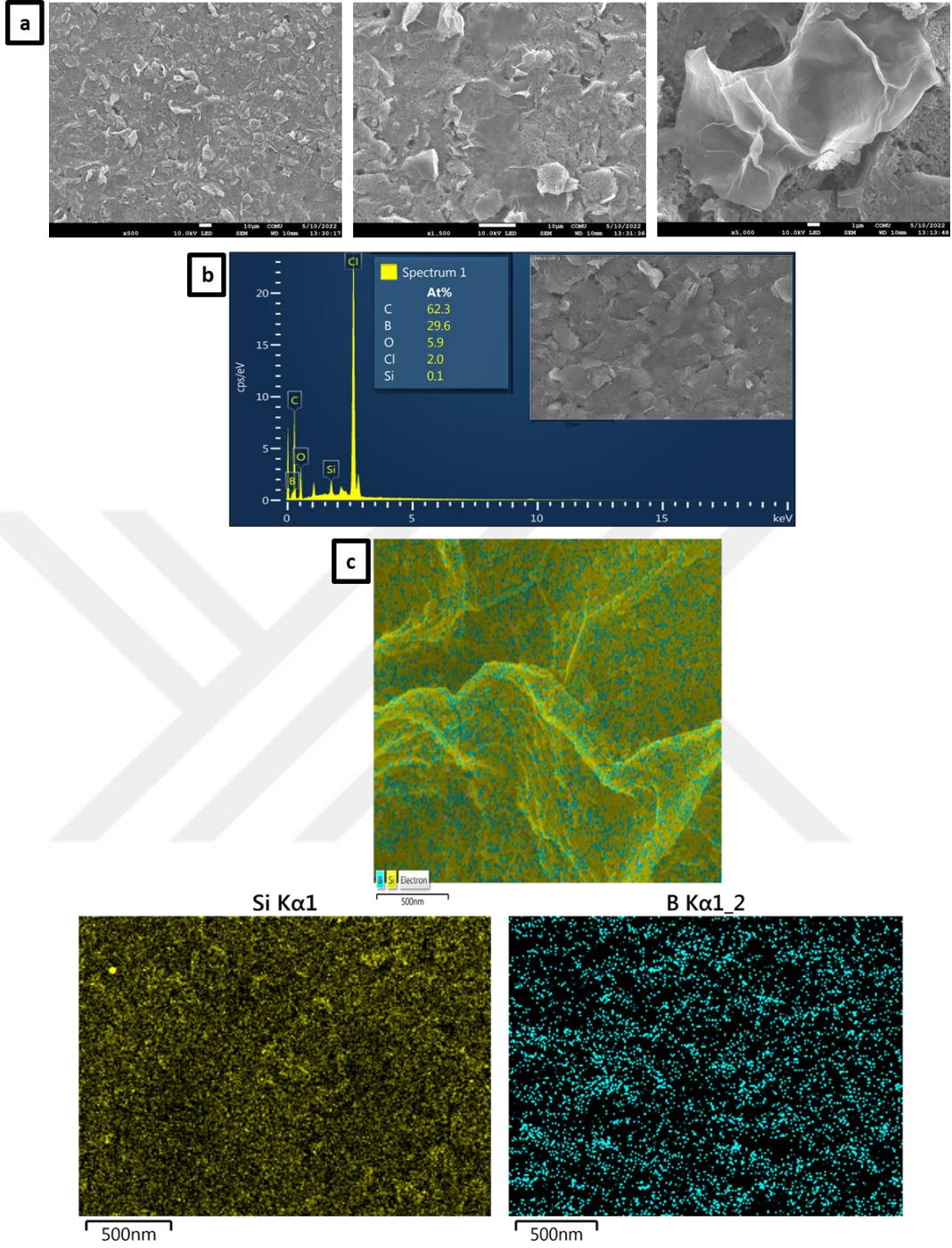
yüzeyinde daha düşük miktarda olan Cu, EDS spektrumunda belirlenememiştir. Ancak yapıdaki Cu'ın varlığı Raman ve BET analizleri ile kanıtlanmıştır.

Şekil 5.36-a'da TiO₂-keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE yüzeylerinin 500x, 1500x ve 5000x büyütmelerdeki SEM mikrografileri verilmiştir. Bu yüzeylerde yine aglomeratlardan kaynaklanan oldukça pürüzlü yüzeyler görülmektedir. Tüm yüzeyin EDS spektrumunda C,O,B ve Si elementlerinin yanında %0,1 atomik kütle değeri ile Ti elementi görülmektedir ki bu durum sol-jel reaksiyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve Ti'nin polimerik ağa dahil edildiğinin kanıtıdır. Aglomerat üzerinde alınan EDS spektrumu incelendiğinde ise, diğer tüm elementlerin belirlenmesinin yanı sıra Si(%0,2), Ti(%0,9) elementlerinin atomik kütle cinsinden değerlerinin arttığı görülmektedir (**Şekil 5.36-b**). Benzer bir durum burada da gerçekleşmiş Ti-keratin kompleksi ve yapıdaki TiO₂ nanoparçacıklar sol-jel reaksiyonları sırasında reaktif silanol ve tetrahidroborat anyonları ile reaksiyonlar vererek yüzeyde yer yer kümelenmeler oluşturmuştur. TiO₂-keratin/silika/bor kserojel temelli film yüzeylerinde elementel EDS haritalaması **şekil 5.36-c'**de verilmiş olup, Si, B ve Ti'nin homojen olarak dağıldığı, aglomerat yapılarda ise diğer bölgelere kıyasla Ti ve Si miktarlarının daha çok olduğu görülmektedir.



Şekil 5.36 a. TiO_2 -keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE yüzeylerinin soldan sağa sırasıyla 500x, 1500x ve 5000x büyütmelerdeki SEM mikrografileri (Ölçek çubukları 500x ve 1500x büyütme için 10µm'yi, 5000x için ise 1 µm'yi göstermektedir), b. EDS spektrumları, c. Si, B ve TiO_2 için elementel haritalama

GO-keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE yüzeylerinin 500x, 1500x ve 5000x büyütmelerdeki SEM mikrografileri **şekil 5.37-a** da verilmiştir.

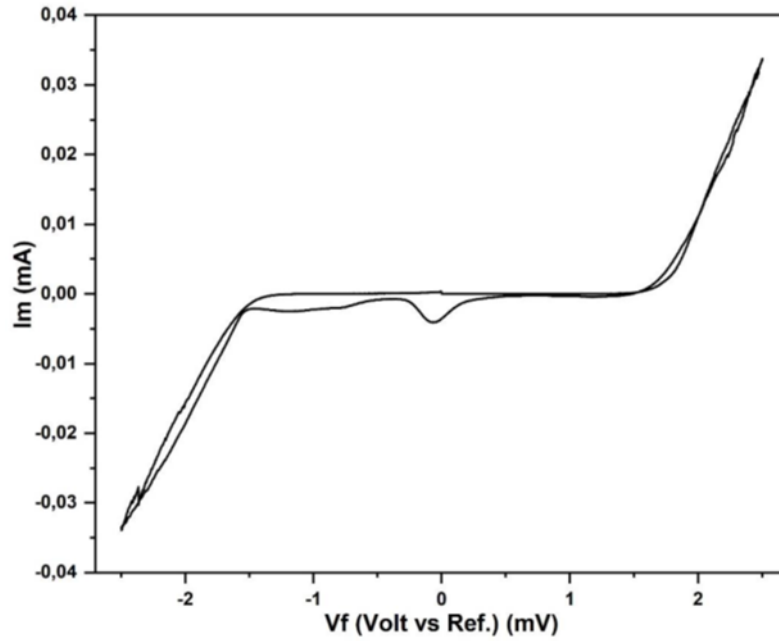


Şekil 5.37 a. GO-keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE yüzeylerinin soldan sağa sırasıyla 500x, 1500x ve 5000x büyütmelerdeki SEM mikrografileri (Ölçek çubukları 500x ve 1500x büyütme için 10 μm 'yi, 5000x için ise 1 μm 'yi göstermektedir), b. EDS spektrumları, c. Si ve B için elementel haritalama

Şekil incelendiğinde, oldukça pürüzsüz bir yüzeye sahip tipik olarak kavisli, katman benzeri bir yapı gösteren GO tabakalar görülmekte olup, sol-jel reaksiyonları neticesinde GO tabakaların başarılı bir şekilde polimerik ağa katıldığını kanıtlamaktadır. İlaveten GO yapılar nedeniyle yüzeyde oluşan filmin nispeten daha düzgün ve pürüzsüz olduğu söylenebilir. EDS spektrumu ile yapıda ilgili elementlerin tespiti gerçekleştirilmiş, B ve Si atomlarının protein yapılarına katıldığı doğrulanmıştır (Şekil 5.37-b). İlaveten, polimerik ağa katılan GO tabaka üzerinde gerçekleştirilen elementel EDS haritalama neticesinde, Si ve B elementlerinin GO yüzeyinde homojen olarak dağıldığı belirlenmiştir (Şekil 5.37-c).

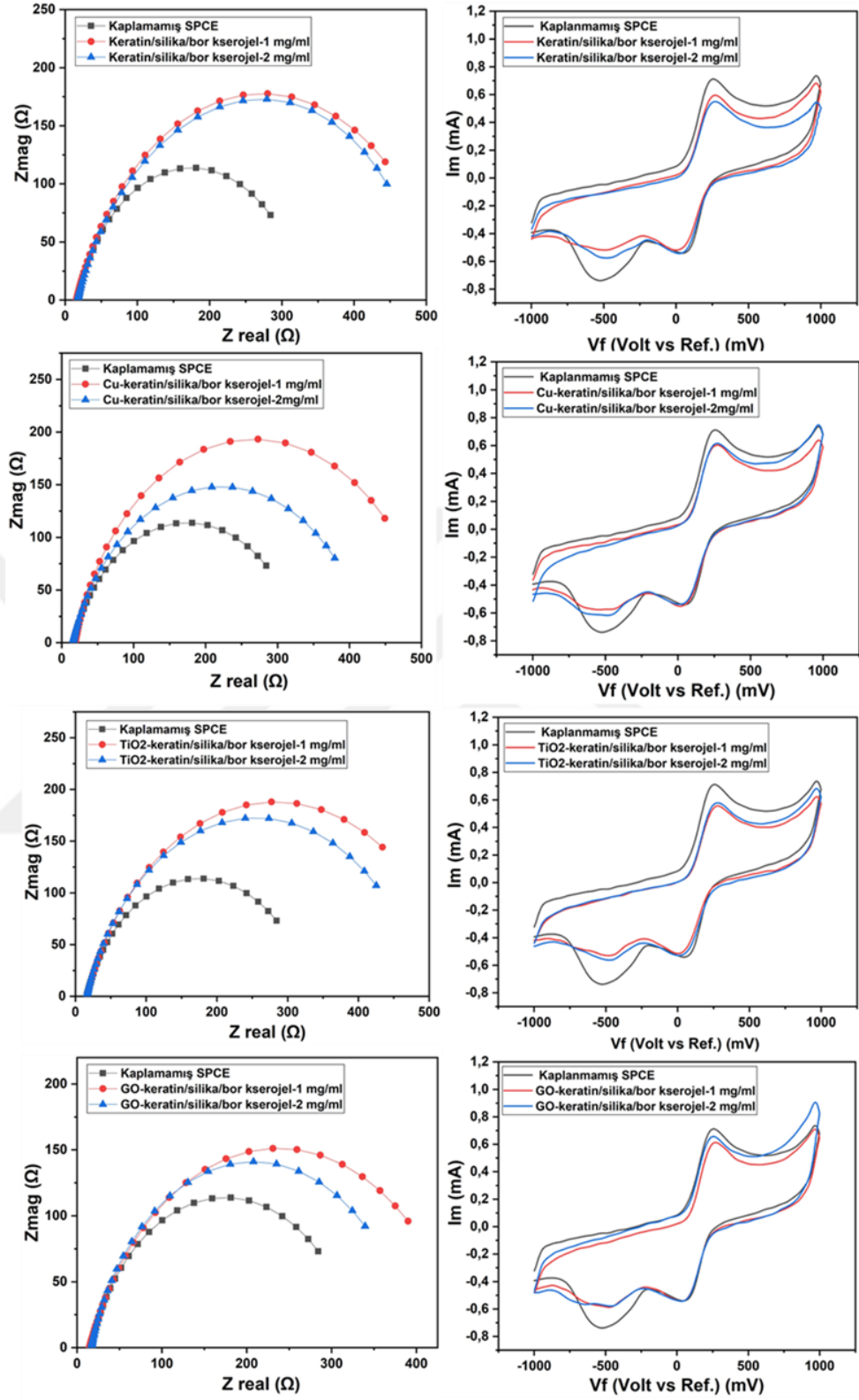
5.6 Elektrokimyasal Davranışın İncelenmesi

SPCE'ler kserojellerle kaplanmadan önce temizlenme ve aktivasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem, aşırı anodik ve katodik potansiyellerde art arda üç kez gerçekleştirilen CV ölçümleri ile yapılmıştır (Şekil 5.38).



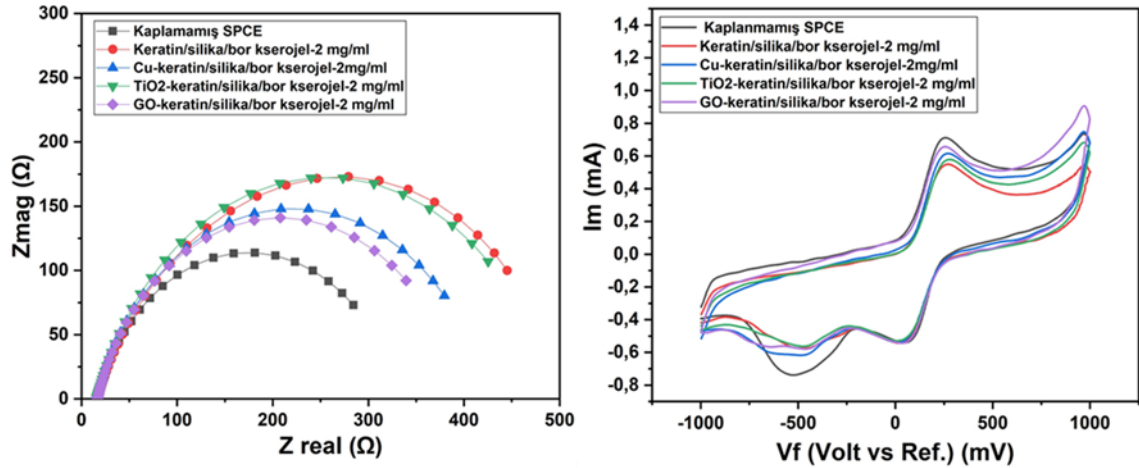
Şekil 5.38 SPCE yüzeylerinin temizlenme ve aktivasyon işlemi sonunda elde edilen voltamogram

Aktivasyon ve temizleme işlemi sonrası elektrotlar saf su içerisinde iyice yıkanmış ve kurutulmuştur. Bölüm 5.4'te kserojellerin konsantrasyonu, elde edilen film yüzeylerinin morfolojik açıdan değerlendirilmesi ile optimize edilmeye çalışılmış ve tüm film yüzeylerinin kararlı olduğu maksimum konsantrasyon 2mg/ml olarak tespit edilmiştir. Elektrot yüzeyinin modifiye edildiği polimer konsantrasyonu elektrokimyasal ölçümler için önemli bir parametre olup, ölçüm yöntemi olarak EIS kullanılmıştır. SPCE'lerin kserojellerle modifikasyonu bölüm 5.4 'te bahsi geçen yöntem ile gerçekleştirilmiş olup 1 ve 2mg/ml olmak üzere iki farklı konsantrasyonda kserojeller kullanılmıştır. Modifiye edilen elektrotlar ile EIS ölçümleri alındıktan sonra randles devre modeli kullanılarak Nyquist eğrileri elde edilmiştir. EIS/CV ölçümleri neticesinde elde edilen Nyquist eğrileri ve voltamogramlar **şekil 5.39**'da verilmiştir.



Şekil 5.39 İki farklı konsantrasyonlardaki tüm kserojeller için elde edilen Nyquist eğrileri ve voltamogramlar

Kserojeller ile modifiye edilen SPCE'lerin iletkenlik özellikleri değerlendirilirken yük transfer dirençlerindeki (R_{ct}) değişim esas alınmış olup sonuçlar voltamogramlar ile desteklenmiştir. R_{ct} değerlerindeki azalma, iletkenlik özelliklerindeki artma olarak değerlendirilmiştir. **Şekil 5.39**'daki Nyquist eğrileri incelendiğinde, kaplanmamış SPCE'nin R_{ct} değerinin en düşük olduğu, kserojel ile modifiye edilmiş SPCE'lerde ise R_{ct} değerlerinin arttığı açıkça görülmektedir. Bu durum, SPCE yüzeylerinin kserojeller ile başarılı bir şekilde modifiye edildiğinin göstergesidir. İlaveten, iki farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kserojellerle modifiye edilmiş tüm kserojellerde 2mg/ml konsantrasyondaki R_{ct} 'ler 1 mg/ml'ye göre nispeten daha düşüktür. Bu bağlamda 2 mg/ml konsantrasyonlardaki kaplamaların daha iletken oldukları söylenebilir. Voltamogramlar incelendiğinde, tüm kserojellerle modifiye edilmiş elektrotlarda $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ ya ait belirgin bir çift indirgenme-yükseltgenme piki görülmektedir. 2 mg/ml konsantrasyonlardaki kserojellerle yapılan kaplamalarda redoks pik akımları nispeten daha yüksek olup sonuçlar R_{ct} değerleri ile tutarlıdır. Bu bağlamda en iyi konsantrasyonun 2mg/ml olduğu sonucuna varılmıştır. Karşılaştırma yapmak amacı ile bu konsantrasyondaki tüm kserojellerin Nyquist eğrileri ve voltamogramları **şekil 5.40**'ta verilmiştir.



Şekil 5.40 2mg/ml konsantrasyonda hazırlanan kserojeller ile kaplanmış SPCE'lerin Nyquist eğrileri ve voltamogramları

Şekil 5.40 incelendiğinde R_{ct} değerlerinin azalmasına paralel olarak redoks pik akımlarının arttığı açıkça görülmektedir. Keratin/silika/bor kompozit kserojeller

SPCE'lerin iletkenliklerini düşürmüş olup, kserojel polimerik ağların yapısına Cu, TiO₂ ve GO nano parçacıklar dahil edildiğinde, redoks pik akımları artmıştır. En belirgin artış GO-keratin/silika/bor kserojelinde görülmektedir. Bunun nedeni, kompozit kserojeldeki GO'nun matris filmin iletkenliğini büyük ölçüde geliştirmesi ve aracı ile elektrot arasındaki elektron transferini kolaylaştırması olarak görülmektedir.

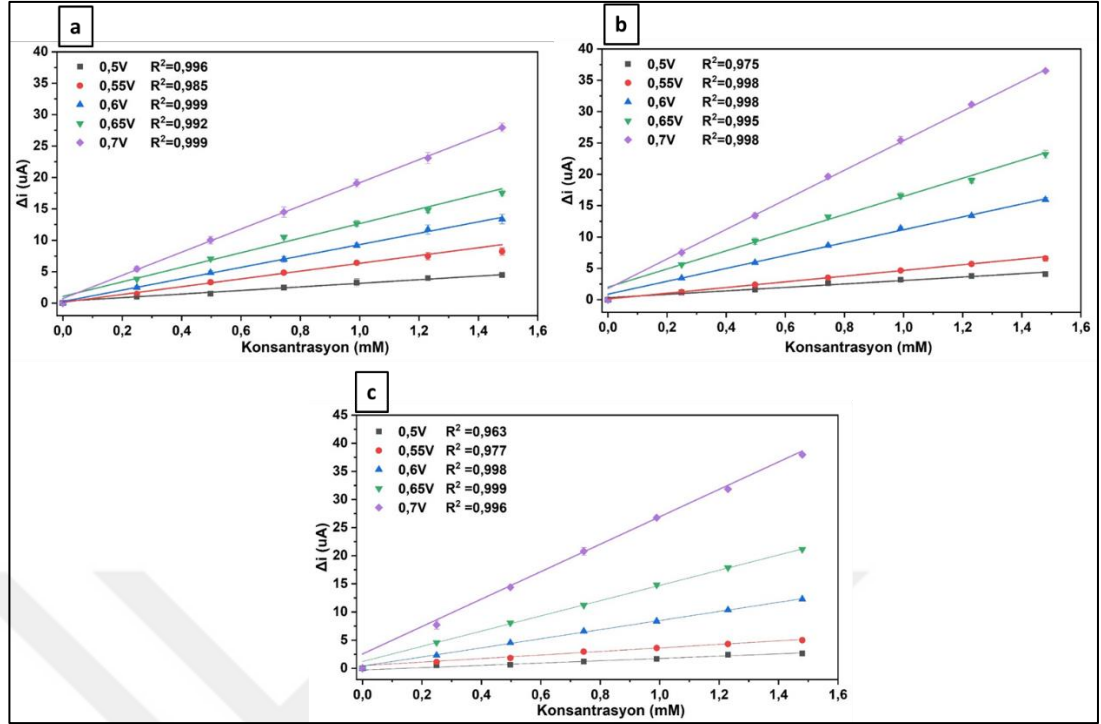
5.7 Amperometrik Ölçümler

Tüm kserojeller ile modifiye edilmiş SPCE'lerin enzimatik olmayan amperometrik H₂O₂ sensörleri olarak etkinlikleri değerlendirilmiştir. Bu bağlamda, sırasıyla çalışma potansiyeli, pH'sı ve LOD değeri belirlenmiştir. Daha sonra sensör performansını etkileyen, tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve raf ömrü gibi çeşitli parametreler de ayrıca araştırılmıştır.

5.7.1 Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

+0,1 ile +0,7V aralığında gerçekleştirilen amperometrik ölçümler neticesinde, artan H₂O₂ derişimine karşı, tüm kserojellerle modifiye edilen elektrotların farklı potansiyelerde ölçülmüş akım cevaplarını içeren grafikler şekil 5.41'de verilmiştir. Her üç yüzeyde de +0,1V-0,5V aralığında amperometrik ölçümler alınmış olup çok düşük akımlar elde edildiğinden grafiklerde gösterilmemiştir.

Şekil incelendiğinde yüzeyi modifiye edilen tüm elektrotlarda potansiyel ve H₂O₂ derişimi arttıkça anodik akımların da arttığı ve +0,7V'da en yüksek değerine ulaştığı görülmektedir. Ancak vücut sıvısında bulunan bazı türlerin (askorbik asit, ürik asit vb.) girişim etkisinin yüksek potansiyelerde oldukça yüksek olduğu bilinmektedir (Bodur vd. 2021, Tunç vd. 2016). Bu sebeple lineerlik sağlayan en uygun çalışma potansiyeli +0,6 V olarak belirlenmiştir.

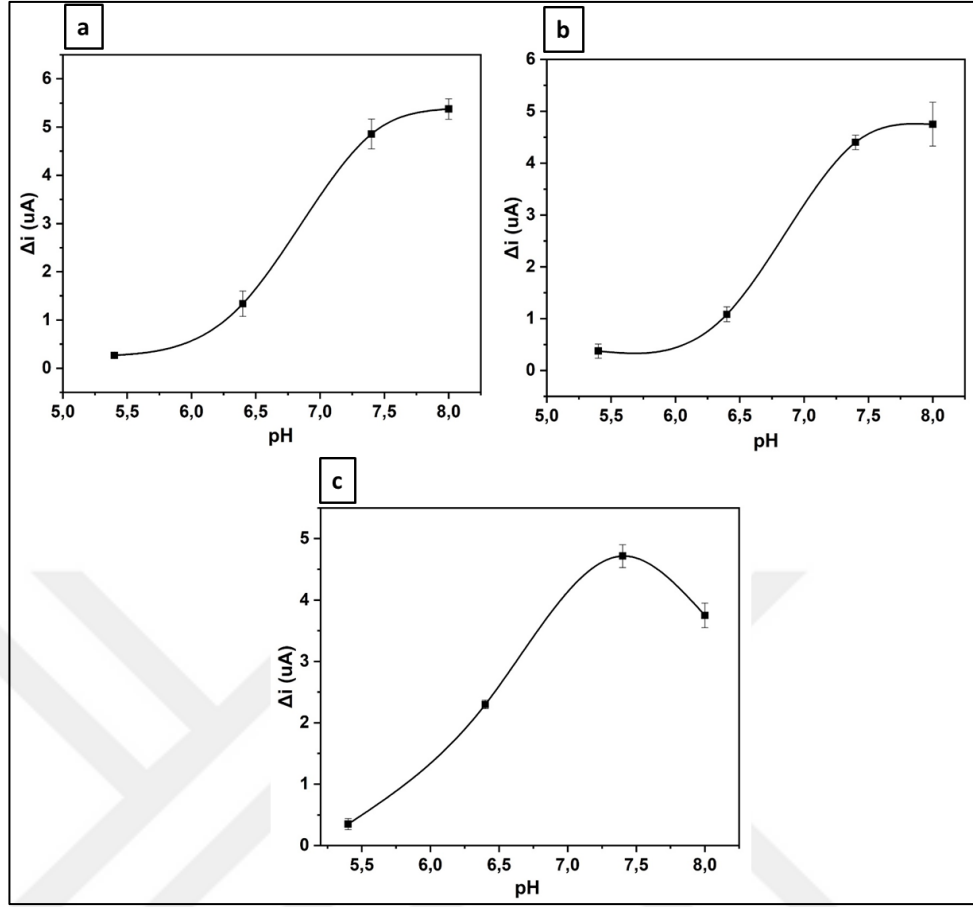


Şekil 5.41 Çalışma potansiyelinin araştırılması

a. Cu-keratin/silika/bor, b. TiO_2 -keratin/silika/bor, c. GO-keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE'lerin artan H_2O_2 derişimine karşı amperometrik akım cevapları

5.7.2 Çalışma pH'sının belirlenmesi

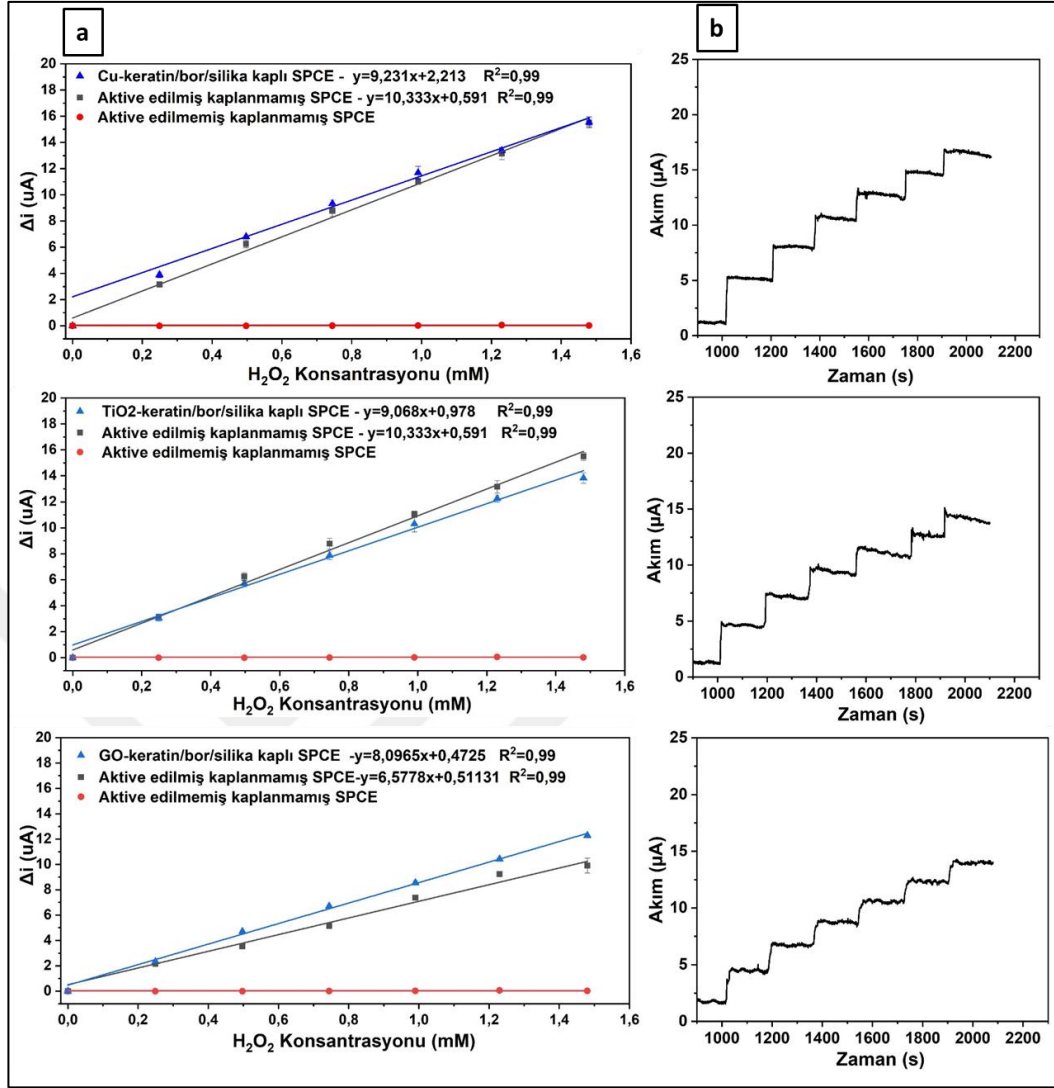
0,6V'da farklı pH'larda amperometrik ölçümler neticesinde elde edilen denge akımlarını (Δi) içeren grafikler **şekil 5.42**'de verilmiştir. Cu ve TiO_2 -keratin/silika/bor kserojellerle modifiye edilmiş SPCE'lerin pH 8'de en yüksek akım değerlerine ulaştığı ve burada bir dengeye ulaştığı söylenebilir. Bu sebeple bu iki yüzey için optimum çalışma pH'sı 8,0 olarak belirlenmiştir. İlaveten GO-keratin/silika/bor ile modifiye edilmiş SPCE'de ise pH 'nın artmasıyla birlikte akımın arttığı, pH 7,4'te ise maksimum akım değerine ulaştığı ve pH'nın biraz daha artmasıyla birlikte akımın da düştüğü gözlemlenmektedir. Dolayısıyla, bu yüzey için optimum çalışma pH'sı ise 7,4 olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.42 Çözelti pH 'sının a. Cu-keratin/silika/bor, b. TiO_2 -keratin/silika/bor, c. GO-keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE'lerin 0,5mM H_2O_2 'ye karşı verdikleri akım cevabının etkisi

5.7.3 Tüm elektrotların H_2O_2 hassasiyetinin belirlenmesi ve kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması

Belirlenen optimum pH ve çalışma potansiyelinde tüm kserojeller ile modifiye edilmiş SPCE'lerde ölçümler tekrarlanmış ve kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Kronoamperometrik ölçümler sonrasında elde edilen akım-zaman grafikleri ve kalibrasyon grafikleri **şekil 5.43**'te verilmiştir.



Şekil 5.43 Kaplanmış ve kaplanmamış tüm SPCE yüzeylerinde H₂O₂'ın oksidasyonu neticesinde elde edilen akım cevaplarına ilişkin a. kalibrasyon, b. zaman-akım grafikleri

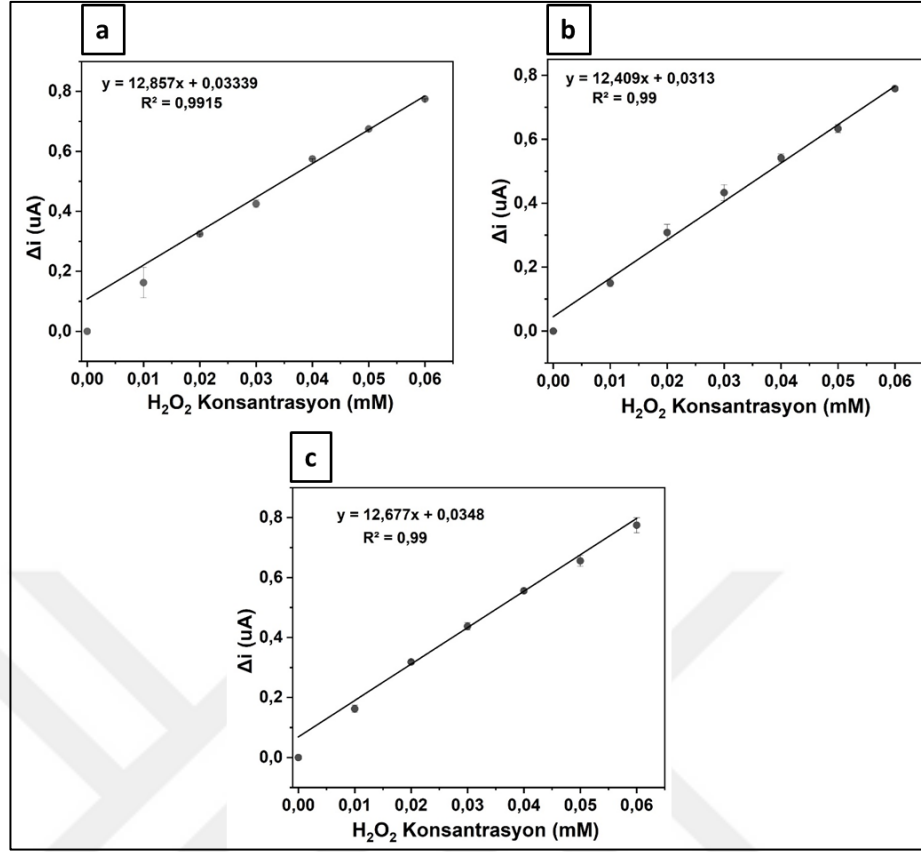
Kalibrasyon grafikleri incelendiğinde tüm elektrotlarda 0,25-1,48 mM aralığında H₂O₂ derişimlerine karşı akım cevapları arasında 0,99 korelasyon katsayısı ile lineer bir ilişki olduğu görülmektedir. İlâveten aktivasyon ve temizlenme işlemleri yapılmayan kaplanmamış SPCE'de artan H₂O₂ derişimine karşılık akım cevabı oluşmazken, aktive edilmiş kaplanmamış SPCE'lerde ise akım oldukça artmıştır. Bu durum da SPCE yüzeylerdeki bu ön işlemler neticesinde (üretim sırasında yüzeye yapışan polimerik kirleticilerden arındırma işlemi) sensör yüzeyindeki elektrottransfer özelliklerinin geliştirilerek, analite duyarlı hale getirildiğinin ispatı niteliğindedir. Aktive edilmiş

kaplanmamış SPCE'lere kıyasla, Cu ve GO ile modifiye edilmiş kserojellerle kaplı SPCE'lerde ise elektron transfer süreçleri biraz daha kolaylaşmış, nispeten daha yüksek akım cevapları elde edilmiştir. Bu farklılık GO-keratin/silika/bor kserojel kaplı SPCE'de daha belirgin olup bu yüzeylerin daha elektroaktif oldukları söylenebilir. SPCE yüzeyinde oluşturulan TiO₂-keratin/silika/bor kserojel film ise elektron transferini zorlaştırarak akımın düşmesine neden olmuştur. TiO₂-keratin komplekslerinin ve yapıdaki TiO₂ nanoparçacıkların sol-jel reaksiyonları sırasında reaktif silanol ve tetrahidroborat anyonları ile reaksiyonlar vererek yüzeyde yer yer kümelenmeler oluşturduğu (bkz. SEM-EDS görüntüleri) düşünülürse, bu kümelerin elektrot yüzeyinde elektroaktif bölgeleri kapatarak akımın düşmesine sebebiyet verdiği varsayılmıştır.

Tüm yüzeyler için akım-zaman grafikleri **şekil 5.43-b**'de verilmiştir. Grafikler incelendiğinde, 180 saniye aralıklarla yapılan 25'er µl 0,1M H₂O₂ enjeksiyonu neticesinde akımın ilk 10-20 saniyede hızla arttığı ve dengeye geldiği görülmektedir. Dolayısıyla, her üç kserojelle kaplanmış SPCE'lerin H₂O₂'nin oksidasyonuna ilişkin oldukça hızlı bir amperometrik yanıt verdikleri söylenebilir.

5.7.4 LOD değerinin belirlenmesi

Tüm kserojellerle modifiye edilmiş SPCE'lerin LOD değerlerinin belirlenmesine ilişkin kalibrasyon grafikleri **şekil 5.44**'te verilmiştir. Tüm grafikler incelendiğinde 0,01-0,06 mM aralığında H₂O₂ derişimlerine karşı akım cevapları arasında 0,99 korelasyon katsayısı ile lineer bir ilişki olduğu görülmektedir. İlaveten, TiO₂, Cu ve GO-keratin/silika/bor kserojel kaplı SPCE'ler için LOD değerleri sırasıyla 0,0120, 0,0125 ve 0,0122mM olarak hesaplanmıştır. *In vivo* ve *ex vivo* biyolojik uygulamalar için canlı hücrelerden salınan H₂O₂'nin saptanması ve miktarının belirlenmesi için en uygun çalışma aralığı 0,1-10µM olduğu bildirilmiştir (Jiménez-Pérez vd. 2020). Bilgi Kamac vd. (2020) poli(nötral) kırmızı (PNR), indirgenmiş GO ve altın nanoparçacıklar ile modifiye ettikleri SPCE ile enzimatik olmayan H₂O₂ sensörü tasarlamışlar ve yaptıkları amperometrik ölçümler neticesinde LOD değerini 6,35 µM olarak belirlemişlerdir.



Şekil 5.44 LOD değerlerinin belirlenmesi çalışması

a. Cu-keratin/silika/bor, b. TiO₂-keratin/silika/bor, c. GO-keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE'ler için elde edilen kalibrasyon grafikleri

Tüm bu bulgular ışığında, sentezlediğimiz sensör alt taşları ile belirlenen LOD değerlerinin ($\sim 12\mu\text{M}$) ancak çalışma üst limitine nispeten yakın olduğu görülmektedir. Kamac ve arkadaşlarının tasarladıkları sensörde daha iletken unsurların varlığı dikkate alındığında elde edilen sonucun uyumlu olduğu düşünülmektedir.

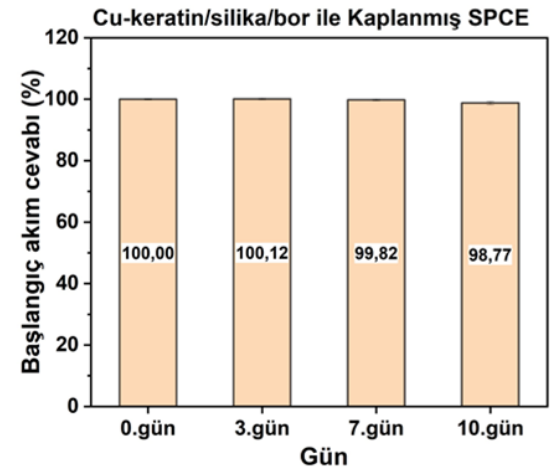
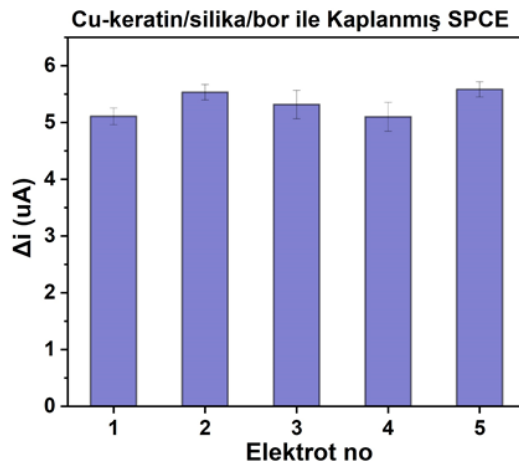
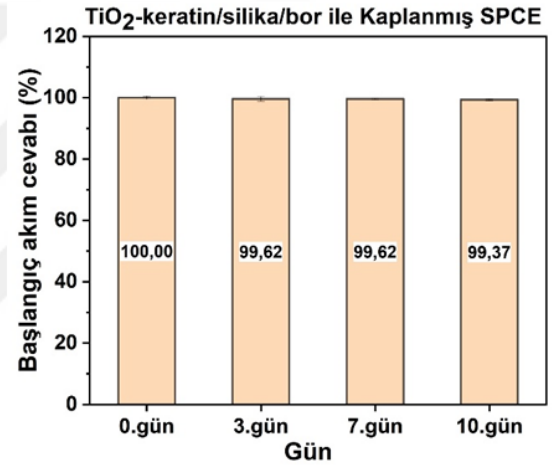
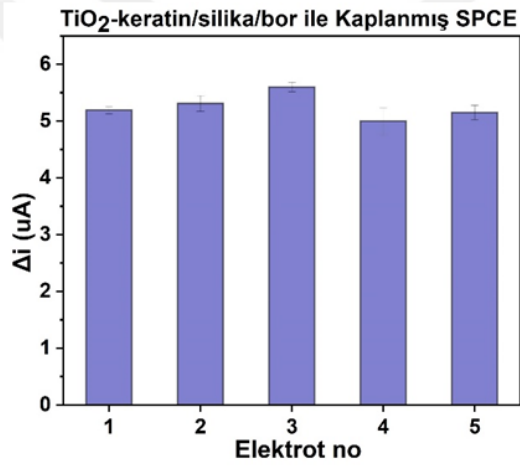
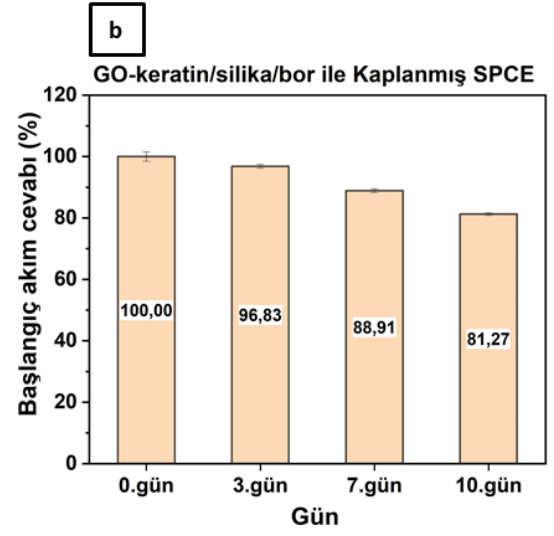
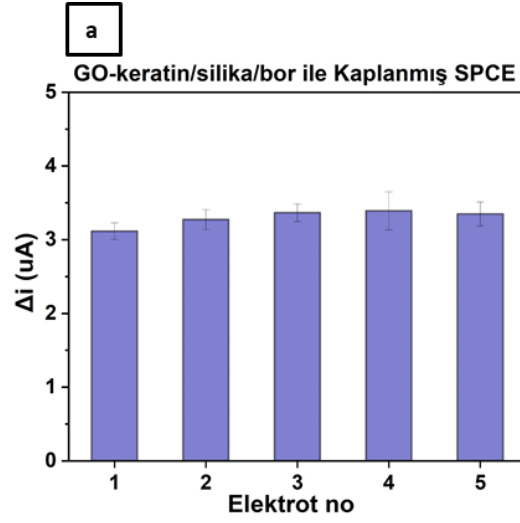
5.7.5 Yeniden üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve raf ömrü testleri

Tekrarlanabilirlik testleri neticesinde Cu, TiO₂ ve GO-keratin/silika/bor kserojellerle kaplanmış SPCE'lerin %RSD değerleri sırasıyla 9,21; 7,46 ve 8,21 olarak belirlenmiş olup değerler birbirine oldukça yakındır. Tek kullanımlık olmalarına rağmen bazı ekran baskılı elektrot (SPE) üreticileri bu sensörlerin atılmadan önce birkaç kez kullanılabileceğini iddia etmektedir (Finşgar vd. 2018). Yapılan birçok çalışmada ise SPE

ile yapılan uygulamalar neticesinde bozulma veya hassasiyet kaybı belirtisi olmadan geniş bir ölçüm seti için kullanılabilceği sonucuna varılmıştır (Finşgar vd. 2018, Pérez-Ràfols vd. 2016, Sosa vd. 2015). Finşgar vd. (2018) Sb ile modifiye edilmiş ve edilmemiş SPCE için yaptıkları tekrar kullanılabilirlik testleri sonucunda % RSD değerlerini sırasıyla %8,7 (n = 6) ve %22,7 (n = 6) olarak bulmuşlar ve yüzeyin Sb ile kaplanması sonucunda çalışma kararlılığının arttığını bildirmişlerdir. Tüm bu bulgular ışığında, üretilen tüm sensör alt taşlarının yüzeyin stabilitesini arttırarak sensörün kararlılığına pozitif katkı sağladıkları ve tekrar kullanılabilir oldukları sonucuna varılmıştır.

Sensörler için diğer önemli parametreler olan tekrar üretilebilirlik ve stabilite testleri sonucunda elde edilen grafikler **şekil 5.45**'te verilmiştir. Stabilite testine ilişkin grafikler incelendiğinde (**Şekil 5.45-b**) 10 günün sonunda Cu, TiO₂ ve GO-keratin/silika/bor kserojel ile kaplanmış SPCE'lerin H₂O₂'ye olan başlangıç amperometrik yanıtlarını sırasıyla %98,77; %99,37 ve %81,7 oranında korudukları görülmektedir. 10 günün sonunda en fazla oranda akım kaybı yaşanan yüzey ise GO-keratin/silika/bor kserojelle kaplı SPCE olup, optimal sonuçlar elde etmek için elektrotun 10 günden daha fazla kullanılmaması gerektiği sonucuna varılmıştır.

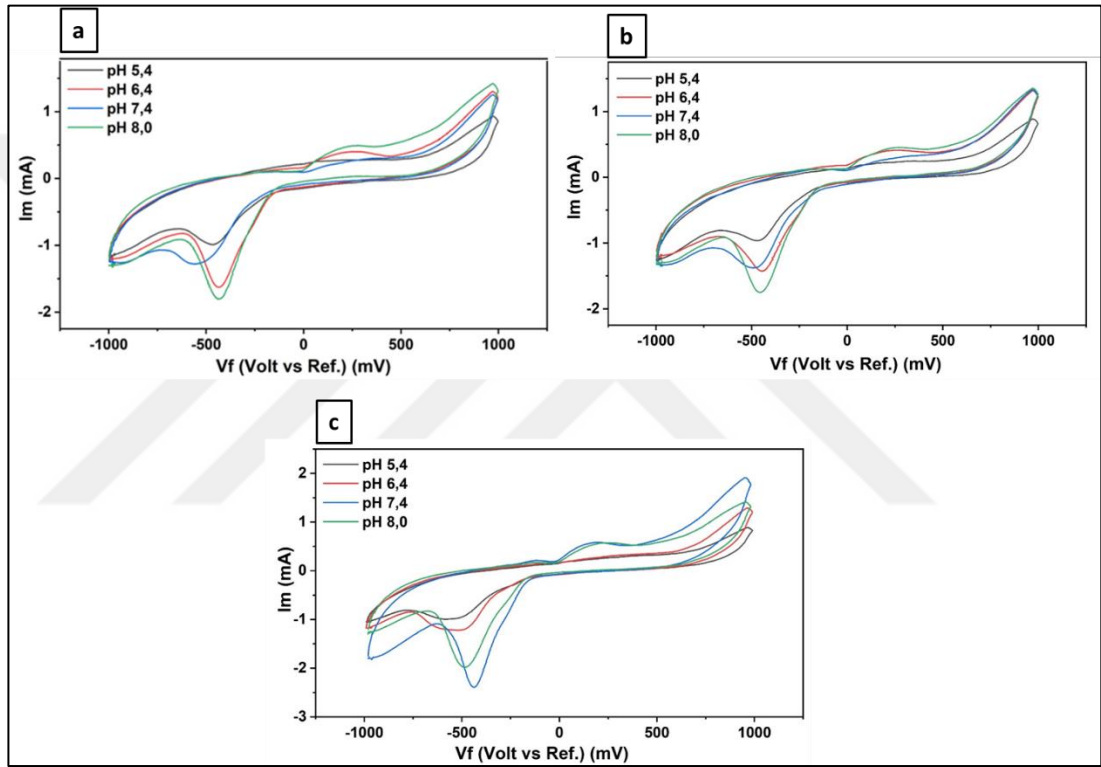
Tekrar üretilebilirlik, farklı koşullar altında (farklı sensörler kullanılarak) aynı yöntemle elde edilen sonuçlar (sinyaller) arasındaki uyumun yakınlığını açıklamak için kullanılmaktadır. Bu bağlamda, farklı günlerde hazırlanan 5 farklı elektrot ile aynı şekilde ölçümler alınmış ve elde edilen ortalama akım değişimini gösteren grafikler **şekil 5.45-a**'da verilmiştir. İlaveten, Cu, TiO₂ ve GO-keratin/silika/bor kserojel ile kaplanmış SPCE'ler için % RSD değerleri sırasıyla %3,82; %3,83 ve %3,69 olarak hesaplanmış olup, tekrar üretilebilirlik özelliklerinin iyi olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 5.45 Tüm kserojellerle kaplanmış SPCE'lerle yapılan a. yeniden üretilebilirlik, b. stabilite testlerine ilişkin grafikler

5.7.6 Tüm kserojellerle modifiye edilmiş SPCE'lerin H_2O_2 varlığında elektrokatalitik performanslarının değerlendirilmesi

H_2O_2 'nin tüm kserojellerle modifiye edilmiş SPCE'ler üzerindeki elektrokimyasal davranışı CV çalışmalarıyla araştırılmıştır. Öncelikle, pH'nın ölçümlere olan etkisini araştırılmıştır. Bu bağlamda, farklı pH'larda PBS içerisinde ve 0,025mM H_2O_2 varlığında elde edilen voltamogramlar **şekil 5.46**'da verilmiştir.



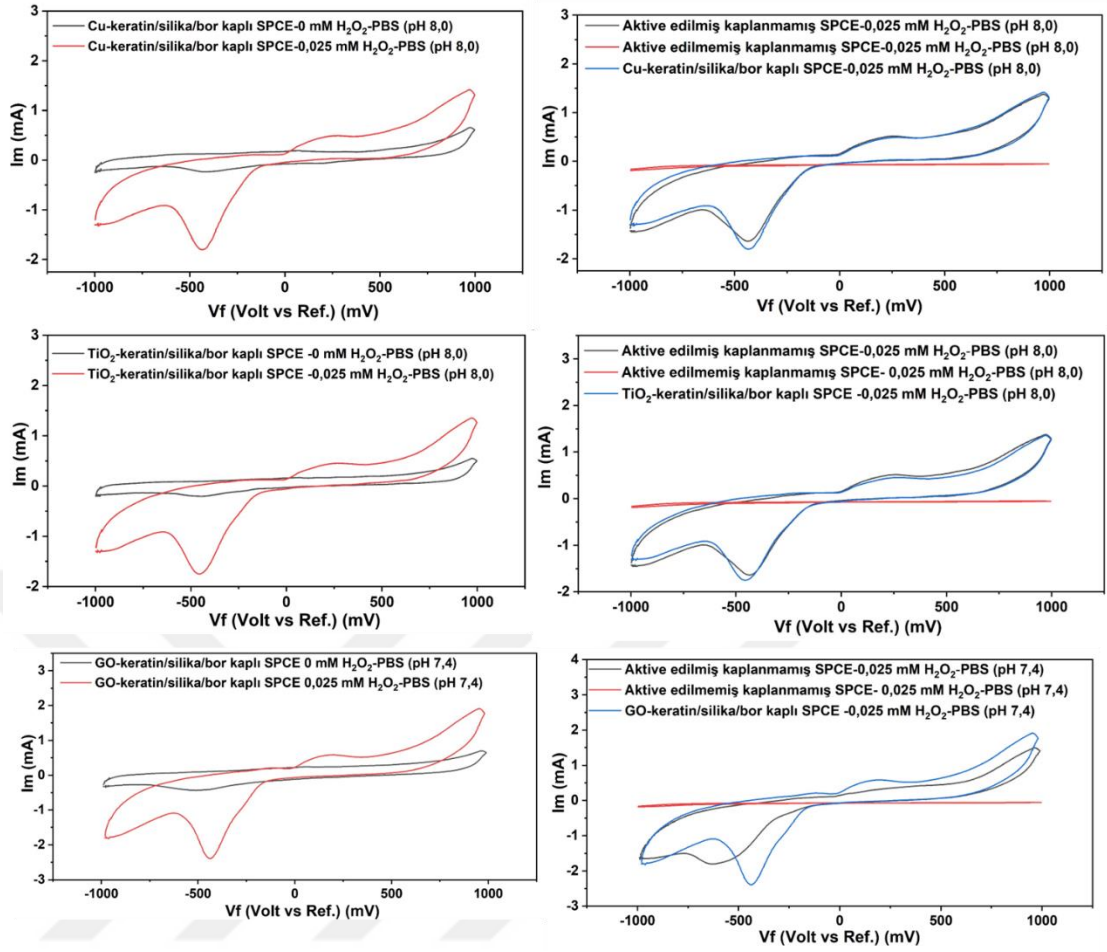
Şekil 5.46 Farklı pH'larda PBS içerisinde a. Cu-keratin/silika/bor, b. TiO_2 -keratin/silika/bor, c. GO-keratin/silika/bor kserojel ile modifiye edilmiş SPCE'ler ile 0,025 mM H_2O_2 varlığında elde edilen voltamogramlar

GO-keratin/silika/bor kserojelle kaplı SPCE'nin farklı pH'larda elde edilmiş voltamogramları incelendiğinde, pH arttıkça yaklaşık -0,43V'da gözlemlenen katodik pik akımının arttığı, pH 7,4 'te maksimum değerine ulaştığı görülmektedir. pH 8'deki ölçümde ise akımın azaldığı, dolayısıyla optimum pH'nın 7,4 olduğu belirlenmiştir. Cu ve TiO_2 -keratin/silika/bor kserojellerle kaplanmış SPCE'lerde ise yaklaşık -0,43V'daki en yüksek katodik akım pH 8,0'de elde edilmiştir. Her bir yüzey için anodik bölgede

+0,6V'da farklı pH'larda yapılan amperometrik ölçümlerle de aynı sonuç elde edilmiştir. İlâveten pH 7,4 ve pH 8,0'deki ölçümlerde katodik pik akımlarıyla beraber bir de +0,25V'da anodik pik akımları ortaya çıkmıştır. Bu pik tüm kserojellerle kaplı SPCE'lerde ve aynı derişimlerde H₂O₂ ile ölçümler neticesinde ortaya çıktığından kserojellerin içeriğinden bağımsız olduğu düşünölmüştür.

Şekil 5.47-a incelendiğinde, tüm kserojellerle kaplı SPCE'lerde H₂O₂ yokluğunda herhangi bir redoks piki bulunmadığı, 0,025mM H₂O₂ varlığında yine -0,43V'da katodik ve +0,25V'da anodik pik akımlarının ortaya çıktığı görölmektedir. Kaplanmamış aktive edilmiş ve edilmemiş SPCE'lerin H₂O₂ varlığında elde edilen voltamogramlarının karşılaştırıldığı **şekil 5.47-b** 'de ise aktive edilmeyen SPCE'nin H₂O₂'ye hiçbir tepki vermediği, aksine aktive edilmiş SPCE'nin hayli yüksek bir redoks akımı oluşturduğu açıkça görölmektedir. Yani, SPCE yüzeyinin 0,1N H₂SO₄ ile CV kullanılarak gerçekleştirilen ön temizleme ve aktivasyon işlemi, sensörün elektrokatalitik aktivitesini de iyileştirmiştir. İlâveten kserojellerle kaplanmamış SPCE'lerde de H₂O₂ varlığında yüksek bir redüksiyon pikinin yanında yine anodik bölgede +0,25V'da bir pik oluştuğu görölmektedir. Aktivasyon işlemi sırasında, yüzeyde çeşitli fonksiyonel gruplar (karbonil, karboksil, kinon vb.) oluşturulmuş, bu gruplar H₂O₂'nin indirgenmesi için elektron transfer aracısı olarak görev yapmış ve elektrokatalitik aktiviteyi arttırmıştır (Murugan vd. 2022). İlâveten, +0,25V'daki anodik pik akımının, özellikle pH 7,4 ve 8,0'de PBS ile alınan CV ölçümleri sırasında yüzeyde oluşturulan bu gruplar ile H₂O₂ arasında çeşitli oksidasyon reaksiyonları neticesinde ortaya çıktığı tahmin edilmektedir.

Murugan vd. (2022) camısı karbon elektrot (GCE) ve SPCE'ye benzer bir ön işlem gerçekleştirmiş ve H₂O₂'nin bu yüzeyler üzerinde elektrokatalitik etkisini araştırmışlardır. 0,1M PBS içerisinde yapılan CV ölçümleri neticesinde aktive edilmeyen yüzeylerde akım elde edilmezken, -0,4V'da H₂O₂ redüksiyonundan kaynaklanan kuvvetli bir pik elde edilmiştir. İlâveten voltamogramda -0,1V'da başka kuvvetli bir pik daha ortaya çıkmış ve bu pikin yüzeyde oluşan fonksiyonel gruplardan kaynaklandığı bildirilmiştir.



Şekil 5.47 Tüm kserojellerle kaplanmış ve kaplanmamış SPCE'ler ile optimum pH'larda PBS içerisinde, H₂O₂ varlığında ve yokluğunda elde edilen voltamogramlar

Ayrıca, Cu ve TiO₂-keratin/silika/bor kserojellerle modifiye edilmiş SPCE'lerde elde edilen redüksiyon akımının kaplanmamış SPCE'lere göre biraz daha arttığı, en fazla artışın GO-keratin/silika/bor kserojelle modifiye edilmiş SPCE'de elde edildiği görülmektedir. Bu bağlamda, GO-keratin/silika/bor kserojelin H₂O₂ indirgemesi üzerinde nispeten daha yüksek elektrokatalitik etki gösterdiği söylenebilir.

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sol-jel matrisleri, üretim kolaylığı, ayarlanabilir gözeneklilik derecesi ve gözenek boyutu, düşük sıcaklıkta enkapsülasyon, biyolojik bozunmalara karşı direnç göstermeleri ve mekanik olarak sağlam olmaları gibi çekici özelliklerinden dolayı kimyasal sensörlerin ve biyosensörlerin üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bunlar arasında özellikle silika içeren gözenekli matrisler, iç içe geçmiş ağ yapıları sayesinde biyomoleküllerin etkili bir şekilde enkapsülasyonunu sağlarken, makromoleküler taşınmayı ve sızmayı da engellemektedirler. İlaveten elde edilen bu silika çerçeve, sensör uygulamaları sırasında önemli olan tampon iyonlarının, analitlerin, ağ yapısı içinde ve dışında bulunan küçük moleküllerin sınırsız taşınmasına da imkan tanımaktadır. Yüksek adsorplama kapasiteleri, geniş yüzey alanları, kararlılıkları ve ayırt edici elektrokimyasal aktiviteleri ile karakterize edilen çeşitli nanomalzemeler ve nanokompozitlerin (metal oksit nanoparçacıklar, karbon malzemeler vb.) matris tasarımında kullanımı, sensör hassasiyeti ve seçiciliği açısından önemli olup, bu materyaller sol-jel reaksiyonları ile gözenekli ağ yapısına kolaylıkla ilave edilebilmektedir. Bu bağlamda, gerçekleştirilen tez çalışması ile sol-jel temelli GO-keratin/silika/bor, Cu-keratin/silika/bor ve TiO_2 -keratin/silika/bor kompozit kserojellerin sentezi, karakterizasyonu ve enzimatik olmayan H_2O_2 sensörleri olarak etkinliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında öncelikle, biyomedikal alanlarda film, hidrojel ve biyoiskele olarak sıklıkla kullanılan keratin koyun yününden ekstrakte edilmiş ve biyokimyasal yöntemlerle karakterize edilmiştir. Ekstraksiyon sülfitolizis reaksiyonuyla yaklaşık %36 verimle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen keratin ekstraktların SDS-PAGE paterninde 6-7kDa'da belirgin bir bant elde edilmiş olup, yüksek alkali ortamda gerçekleştirilen ekstraksiyon neticesinde, polipeptit omurgasının zarar görerek küçük boyutlarda keratin fraksiyonları şeklinde elde edildiği sonucuna varılmıştır (Cal vd. 2021, Shavandi vd. 2017, Vineis vd. 2019). Keratinde bol miktarda bulunan karakteristik sistin kökleri, sistein amino asitlerinin oksidasyonu ile oluşmaktadırlar ve içerdikleri disülfid bağları nedeniyle keratine mekaniksel, termal ve kimyasal dayanımlılık kazandırmaktadırlar. Alkali ortamda disülfid bağlarının tekrar indirgenmesiyle disülfid bağları kırılmış ve keratin çözülebilir formda elde edilmiştir. Reaksiyon sırasında açığa çıkan serbest -SH

grupları ise Ellman's reaktifiyle $0,0243 \pm 0,001$ mmol SH/g keratin olarak belirlenmiştir. Keratin ekstraksiyonu ve karakterizasyonu için daha önceki çalışmalarda uygulanan metotlar kullanılmış olup, elde edilen sonuçlar benzerdir (Cal vd. 2021, Sezgin Arslan 2017). İçerdikleri fonksiyonel gruplar (-OH, -COOH, -NH₂) ve reaktif -SH grupları ile küçük peptitler halindeki keratin sol-jel reaksiyonları için ideal organik bir biyopolimerdir. Film oluşturulabilmesi, yüksek şeffaflık ve düşük sıcaklıkta işlenmesi gibi temel özellikleri nedeniyle keratin, gözenek oluşturuca makromoleküler katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Sol-jel reaksiyonlarında sıklıkla kullanılan TEOS asidik ortamda hidroliz edildikten sonra (rTEOS), keratin ile kondenzasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Yüzeyden dökülmeyen, kararlı ve stabil film yüzeylerinin elde edilmesi için rTEOS ve keratin oranlarının optimizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Filmlerin esnekliğini ve dayanımını arttırabilmek için sol-jel reaksiyonları esnasında gliserol, plastikleştirici olarak ilave edilmiş ve optimum oran araştırılmıştır. Hem gözenekli organik-inorganik kompozit ağı genişletmek hem de istenilen nanoparçacıkların yapıya dahil edilmesini daha kolay sağlamak için borik asit sol-jel reaksiyonlarına dahil edilmiştir. Optimum, rTEOS, keratin, gliserol ve borik asit oranları belirlendikten sonra elde edilen inorganik-organik hidrojel 45-50 °C'de kurutularak kserojeller üretilmiştir. BET analizi sonucunda, keratin/silika/bor kserojellerin gözeneklilik ve yüzey alanının keratin/silika kserojellere kıyasla yaklaşık 100 kat fazla olduğu belirlenmiştir. Borun yapıya girmesiyle hedeflenen geniş inorganik-organik ağı elde edilmiş olup, iletkenliğin ve hassasiyetin arttırılması için GO, TiO₂ ve Cu'nun bu polimerik ağı dahil edilmesi işlemine borik asitle gerçekleştirilen reaksiyonlar üzerinden devam edilmiştir. Kapsamlı bir şekilde gerçekleştirilen yapısal ve fizikokimyasal karakterizasyonlar neticesinde inorganik-organik kompozit tüm kserojellerin başarılı bir şekilde sentezlendiği belirlenmiştir.

Elektrotların üretimi esnasında kullanılan yalıtkan özellikteki polimerik bağlayıcılardan, çözücülerden ve bazı katkı maddelerinden arındırılıp elektrotransfer özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla, SPCE'ler aşırı anodik ve katodik potansiyellerde ve asidik ortamda (0,1N H₂SO₄) CV ölçümleri yapılarak ön temizleme işlemine tabi tutulmuştur. Yapılan temas açısı ve SEM-EDS analizleri neticesinde, temizlenen ve aktive edilen SPCE'lerin yüzeyinde karbon-oksijen fonksiyonel gruplarında ve hidrofilik özelliğinde

artış gözlemlendiği belirlenmiştir. Bu durum elektrotların elektrotransfer özelliklerini iyileştirmesinin yanı sıra, modifikasyonu sırasında kserojel çözeltilerin yüzeye homojen olarak yayılması ve oluşan filmlerin yüzeye tutunmasında pozitif katkı sağlamıştır. Alkali ortamda hazırlanan 5mg/ml konsantrasyondaki kserojel çözeltileri, son konsantrasyon 2 mg/ml olacak şekilde 0,3MGA ile karıştırıldıktan sonra SPCE yüzeylere 10µl hacimde damlatılarak modifikasyon sağlanmıştır. Modifiye edilen SPCE yüzeylerinin pürüzlülük parametreleri ve mikromimarisi sırasıyla AFM ve SEM analizleri ile belirlenmiştir. Keratin/silika/bor temelli kompozit kserojeller elektrot yüzeyini pürüzlendirerek kaplamış, Cu, TiO₂ ve GO'nin yapıya dahil olmasıyla birlikte pürüzlülük derecesi artmıştır. Sensör yüzeylerinin pürüzlülüğü arttıkça çok daha fazla biyomolekülün yüzeye immobilize edildiği yapılan bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Sakti ve Santjojo 2012, L. Song vd. 2015, Woeppel vd. 2018). Bu bağlamda geliştirilen kompozit kserojel temelli filmlerin biyomolekül immobilizasyonu arttırarak sensör hassasiyeti ve etkinliği üzerinde olumlu etkiler yaratabileceği düşünülmektedir. GO, TiO₂ ve Cu'ın bu yüzeyler üzerindeki varlığı SEM mikrografileri ve EDS spektrumları ile kanıtlanmış olup yapılan elementel haritalama neticesinde katkılanan tüm nanoyapıların yüzeylerde nispeten homojen olarak dağıldığı belirlenmiştir. Tüm kserojellerin iletkenlik özellikleri EIS ve CV teknikleri kullanılarak araştırılmış olup, Rct değerlerindeki azalma, iletkenlik özelliklerindeki artma olarak değerlendirilmiştir. Keratin/silika/bor kserojellerin SPCE'ler iletkenliğini düşürmüş olup, Cu, TiO₂ ve GO nanoparçacıklar ile katkılандığında redoks pik akımlarının nispeten arttığı görülmüştür. En belirgin artışın ise GO-keratin/silika/bor kserojelde olduğu belirlenmiştir. H₂O₂ bazı enzimatik biyokimyasal reaksiyonlarda üretilen elektroaktif bir tür olmakla beraber tayini birçok alanda çok önemlidir. Bu bağlamda geliştirilen sensör alt taşlarının H₂O₂'ye karşı elektrokatalitik aktivitesi yapılan amperometrik ölçümler ve CV analizleri ile araştırılmıştır. İlâveten, sensör performansını belirleyen lineer aralık, dedeksiyon limiti (LOD), tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve raf ömrü gibi çeşitli parametreler de araştırılmıştır. Tüm bu analizler neticesinde, nispeten daha iletken özellik gösteren ve artan H₂O₂ derişimlerine karşı akım cevapları oluşturan GO-keratin/silika/bor kserojeller ile modifiye edilmiş SPCE'lerin enzimatik olmayan H₂O₂ sensörleri olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Ancak, ilerleyen çalışmalarda daha iletken olarak bilinen indirgenmiş GO (rGO) ile yapılacak olan rGO-keratin/silika/bor kserojelin iletkenlik özelliklerinin arttırılarak sensör hassasiyetinin de iyileştirilebileceği öngörülmektedir.

Çalışma kapsamında, sol-jel reaksiyonları kullanılarak keratin/silika/bor kserojelin Cu, TiO₂ ve GO ile modifikasyonları sağlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu unsurların yapıya katılmasıyla beraber biyosensörler için önemli olan gözeneklilik, yüzey alanı ve pürüzlülük gibi bazı parametrelerde artış sağlanmıştır. Ancak iletkenliğe olan katkıları zayıf kalmıştır. İlerleyen zamanlarda, iletkenlik özelliklerini ayrı ayrı incelediğimiz Cu, TiO₂ ve GO'nin yine sol-jel metodu kullanılarak hepsinin bir arada olduğu Cu/TiO₂/GO-keratin/silika/bor kserojellerin elektrokatalitik aktivitesi araştırılabilir. Tao vd. (2021) yaptıkları bir çalışmada, Ca²⁺ ile katılanmış TiO₂ kullanılarak grafen temelli Ca²⁺-TiO₂/GO yüzeyler geliştirmişlerdir. Ca²⁺ ile katılama işleminin TiO₂ ile grafen arasındaki ara yüzey temas alanını arttırarak iletkenliğe katkı sağladığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde Cu/TiO₂/GO 'nun sinerjik etkisinin (özellikle GO yerine rGO kullanıldığında) de iletkenliği arttırabileceği düşüncesindeyiz. Çalışma kapsamında kullanılan keratin yün gibi hayvansal bir atıktan elde edilmiş ve böylece biyoteknoloji alanında kullanılabilecek potansiyele sahip bir ürünün sentezi gerçekleştirilmiştir. Keratin ekstraktların biyouyumluluk özellikleri ve su tutma kabiliyeti sayesinde biyotanıma elemanlarının (antikor, enzim, DNA, aptamer vs.) sensör yüzeyine immobilizasyonunu kolaylaştıracağı öngörülmektedir. Yenilikçi olmaları sebebiyle, sentezlenen GO-keratin/silika/bor, Cu-keratin/silika/bor ve TiO₂-keratin/silika/bor kserojellerin literatüre katkı sağlayacağı kanaatindeyiz. Keratinin doğal kaynaklı olması ve sentez için kullanılan yöntem maliyetinin de düşük olması, ilerleyen çalışmalar neticesinde özellikleri daha da gelişmiş kompozit kserojeller ile oluşturulan sensörlerin ticarileşmesinin ve klinik ortamlarda kullanımlarının mümkün hale gelebileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

- Ahtzaz S., Sher Waris T., Shahzadi L., Anwar Chaudhry A., Yar M. 2020. Boron for tissue regeneration-it's loading into chitosan/collagen hydrogels and testing on chorioallantoic membrane to study the effect on angiogenesis. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. Vol. 69(8); pp. 525–534.
- Al-Amin M., Chandra Dey S., Rashid T. U., Shamsuddin S. M. 2016. Solar Assisted Photocatalytic Degradation of Reactive Azo Dyes in Presence of Anatase Titanium Dioxide. *International Journal of Latest Research in Engineering and Technology*. Vol. 2(3); pp. 14–21.
- Alhazmi H. A. 2019. FT-IR spectroscopy for the identification of binding sites and measurements of the binding interactions of important metal ions with bovine serum albumin. *Scientia Pharmaceutica*. 87(1).
- Alothman Z. A. 2012. A review: Fundamental aspects of silicate mesoporous materials. *Materials*. Vol. 5(12); pp. 2874–2902.
- Aluigi A., Tonetti C., Rombaldoni F., Puglia D., Fortunati E., Armentano I., Santulli C., Kenny J. M. 2014. Keratins extracted from Merino wool and Brown Alpaca fibres as potential fillers for PLLA-based biocomposites. *Journal of Materials Science*. Vol. 49(18); pp.6257–6269.
- Anaya-Esparza L. M., la Mora Z. V. De, Rodríguez-Barajas N., Sandoval-Contreras T., Nuño K., López-De la Mora D. A., Montalvo-González E. 2020. Protein-tio₂: A functional hybrid composite with diversified applications. *Coatings*, 10(12), 1–29.
- Angeli F., Charpentier T.,Cailleteau C. 2010. Boron speciation in soda-lime borosilicate glasses containing zirconium. *Journal of the American Ceramic Society*. Vol. 93(1); pp. 2693–2704.
- Arslan F., Kiliç E. 2006. Preparation of Pt/polypyrrole-ferrocene hydrogen peroxide sensitive electrode for the use as a biosensor. *Russian Journal of Electrochemistry*, Vol. 42(2); pp.137–140.
- Arslan Yavuz Emre, Sezgin Arslan T., Derkus B., Emregul K. C. 2017. Fabrication of human hair keratin/jellyfish collagen/eggshell-derived hydroxyapatite osteoinductive biocomposite scaffolds for bone tissue engineering: From waste to regenerative medicine products. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Vol.154; pp. 160–170.
- Bakirhan N. K. Ozkan S. A. 2017. Sensitive and Selective Assay of Antimicrobials on Nanostructured Materials by Electrochemical Techniques. *Nanostructures for Antimicrobial Therapy: Nanostructures in Therapeutic Medicine Series*. Elsevier Inc.

- Balinski A. Kelly N. 2021. Solvent extraction of boric acid: Comparison of five different monohydric alcohols and equilibrium modeling with numerical methods. *Processes*. Vol. 9(2); pp. 1–15.
- Baran E. J. 2004. Spectroscopic and magnetic behaviour of the copper (II) complex of L-tryptophan. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. Vol.23(3); pp. 339–342.
- Berechet M. D., Simion D., Stanca M., Alexe C. A., Răpă M. 2020. Keratin hydrolysates extracted from sheep wool with potential use as organic fertilizer. *Leather and Footwear Journal*. Vol. 20(3); pp. 267–276.
- Bertel L. García-martín J. M. 2021. Nanostructured titanium dioxide surfaces for electrochemical biosensing. *Sensors*. vol. 21(18); pp. 1–24.
- Bilgi Kamac M. Yilmaz M. 2020. A novel non-enzymatic amperometric H₂O₂ sensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide, polyneutralred and gold nanoparticles. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. Vol. 100(4)pp. 408–418.
- Bodur O. C., Dinç S., Arslan F. 2021. A sensitive amperometric detection of neurotransmitter acetylcholine using carbon dot-modified carbon paste electrode. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. Vol. 68(1); pp. 20–29.
- Bokov D., Turki Jalil A., Chupradit S., Suksatan W., Javed Ansari M., Shewael I. H., Kianfar E. 2021. Nanomaterial by Sol-Gel Method: Synthesis and Application. *Advances in Materials Science and Engineering*.
- Bouibed A. Poncot M. 2019. An easy and innovative one-step in situ synthesis strategy of silica nanoparticles decorated by graphene oxide particles through covalent linkages. *Materials Research Express*. Vol. 6(12).
- Brennan J. D. 2002. Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 461(1); pp. 1–36.
- Cal F., Sezgin Arslan T., Derkus B., Kiran F., Arslan Y. E. 2021. Synthesis of silica-based boron-incorporated collagen/human hair keratin hybrid cryogels with the potential bone formation capability. *ACS Applied Bio Materials*. Vol. 4(9).
- Centre N. Kong H. 2008. Self-Cleaning Keratins. Vol. (3); pp. 1242–1244.
- Chang G., Tatsu Y., Goto T., Morigaki K. 2010. Glucose concentration determination based on silica sol-gel encapsulated glucose oxidase optical biosensor arrays. *Talanta*, 83(1), 61–65.
- Chen L., Xue X., Jiang D., Yang J., Zhao B., Mee Jung Y. 2016. A Turn-On Resonance Raman Scattering (BCS/Cu⁺) Sensor for Quantitative Determination of Proteins. *Applied Spectroscopy*. Vol. 70(2); pp.355–362.
- Chen Y., Qian W., Chen R., Zhang H., Li X., Shi D., Dong W., Zhao Y. 2017. One-Pot Preparation of Autonomously Self-Healable Elastomeric Hydrogel from Boric

Acid and Random Copolymer Bearing Hydroxyl Groups. ACS Macro Letter. Vol. 6(10); pp. 1129–1133.

Choi C. K. 2010. Comparison between SiOC thin films fabricated by using plasma enhance chemical vapor deposition and SiO₂ thin films by using fourier transform infrared spectroscopy. Journal of the Korean Physical Society. Vol.56(4); pp. 1150–1155.

Choi J.-W. 2020. Review—Non-Enzymatic Hydrogen Peroxide Electrochemical Sensors Based on Reduced Graphene Oxide. Journal of The Electrochemical Society. Vol. 167(3); 037531.

Danks A. E., Schnepf Z. 2016. The evolution of “sol-gel” chemistry as a technique for materials synthesis. Materials Horizons. Vol. 3(2); pp. 91–112.

de Faria R. A. D., Douaud A., Soares R. B., Heneine L. G. D., Matencio T., ... Messaddeq Y. 2020. Electrochemical Behavior of Screen-Printed Carbon Electrodes as Transducers in Biosensors. Corrosion, Vol. 76(6); pp.553–561.

Derkus B., Arslan Y. E., Bayrac A. T., Kantarcioglu I., Emregul E. 2016. Development of a novel aptasensor using jellyfish collagen as matrix and thrombin detection in blood samples obtained from patients with various neurodisease. Sensors and Actuators, B: Chemical. Vol. 228; pp. 725–736.

Derkus B., Emregul E., Yucesan C. 2014. Alginate and alginate-titanium dioxide nanocomposite as electrode materials for anti-myelin basic protein immunosensing. Sensors and Actuators, B: Chemical. Vol. 192 pp. 294–302.

Derkus B., Emregul K. C., Mazi H., Emregul E., Sinag A. 2014. Protein a immunosensor for the detection of immunoglobulin G by impedance spectroscopy. Bioprocess and Biosystems Engineering. Vol. 37(5); pp. 965–976.

Derun E. M., Tugrul N., Senberber F. T., Piskin S. 2014. The Optimization of Copper Sulfate and Tincalconite Molar Ratios on the Hydrothermal Synthesis of. Vol. 8(10); pp. 1152–1156.

Djambaski P., Aleksieva P., Emanuilova E., Chernev G., Spasova D., Nacheva L., Kabaivanova L., Samuneva B. 2009. Sol-gel nanomaterials with algal heteropolysaccharide for immobilization of microbial cells, producing a-galactosidase and nitrilase. Biotechnology and Biotechnological Equipment. Vol. 23(2); pp. 1270–1274.

Dong R., Wang L., Zhu J., Qian Y. 2019. A novel SiO₂–GO/acrylic resin nanocomposite: fabrication, characterization and properties. Applied Physics A: Materials Science and Processing, Vol.125(8).

Elbeyli I. Y. 2015. Production of crystalline boric acid and sodium citrate from borax decahydrate. Hydrometallurgy. Vol. 158; pp. 19–26.

Emregul E., Kocabay O., Derkus B., Yumak T., Emregul K. C., Polat K. 2013. A novel

carboxymethylcellulose-gelatin-titanium dioxide-superoxide dismutase biosensor; electrochemical properties of carboxymethylcellulose-gelatin-titanium dioxide-superoxide dismutase. *Bioelectrochemistry*. Vol. 90; pp. 8–17.

Esposito S. 2019. “Traditional” sol-gel chemistry as a powerful tool for the preparation of supported metal and metal oxide catalysts. *Materials*. Vol. 12(4); pp. 1–25.

Fan J., Yu M. Y., Lei T. da, Wang Y. H., Cao F. Y., Liu Y. 2018. In Vivo Biocompatibility and Improved Compression Strength of Reinforced Keratin/Hydroxyapatite Scaffold. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Vol. 15(2); pp. 45–154.

Fild C., Shantz D. F., ... Koller H. 2000. Cation-induced transformation of boron-coordination in zeolites. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2(13), 3091–3098. doi:10.1039/b002134m

Finšgar M., Majer D., Maver T. 2018. Reusability of SPE and Sb-modified SPE sensors for trace Pb(II) determination. *Sensors (Switzerland)*. Vol. 18(11); pp. 1–18.

Gamo I. 1961. Infrared Absorption Spectra of Water of Crystallization in Copper Sulfate Penta- and Monohydrate Crystals. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. Vol 34(6); pp. 764–766.

Gavalas V. G., Law S. A., Ball J. C., Bachas L. G. 2004. Carbon nanotube aqueous sol-gel composites: enzyme-friendly platforms for the development of stable biosensors. *Analytical Biochemistry*. Vol. 329(2); pp. 247–252.

González-Sánchez M. I., Gómez-Monedero B., Agrisuelas J., Valero E. 2018. Highly activated screen-printed carbon electrodes by electrochemical treatment with hydrogen peroxide. *Electrochemistry Communications*. Vol. 91; pp. 36–40.

Gutt G. 2019. Screen-printed voltammetric biosensors for the determination of copper in wine. *Sensors (Switzerland)*. Vol. 19(21).

Hamouche H., Makhlouf S., Laghrouche M. 2018. Humidity Sensor Based on Keratin bio Polymer Film. *Sensors and Actuators, A: Physical*. Vol. 282; pp.132–141.

Hattori Y., Ogaki T., Ishimura M., Kirihata M. 2017. Development and elucidation of a novel fluorescent boron-sensor for the analysis of boronic acid-containing compounds. *Sensors (Switzerland)*. Vol. 17(10).

He S., Zhang B., Chen W. 2014. Non-enzymatic hydrogen peroxide electrochemical sensor based on a three-dimensional MnO₂ nanosheets/carbon foam composite. *RSC Advances*. Vol. 4(90); pp. 49315–49323.

Herrmann A. Schedler U. 2021. Hydrogels and Their Role in Biosensing Applications. *Advanced Healthcare Materials*. Vol. 10(11); pp.1–25.

- Hintze C., Morita K., Riedel R., Mera G. 2016. Facile sol-gel synthesis of reduced graphene oxide/silica nanocomposites. *Journal of the European Ceramic Society*, Vol. 36(12); pp. 2923–2930.
- Hughes L. B., Labban N., Conway G. E., Leopold M. C. 2019. Adaptable xerogel-layered amperometric biosensor platforms on wire electrodes for clinically relevant measurements. *Sensors (Switzerland)*. Vol. 19(11).
- Ivanova Y.Figueira M. H. 2006. Si-O-C-B amorphous materials from organic-inorganic hybrid precursors. *Vaz Fernandes Journal of the University of Chemical Technology and Metallurg*. Vol. 41(4); pp.417–422.
- Jatuphorn W. 2020. Investigation of Morphology and Photocatalytic Activities of Electrospun Chicken Feather Keratin/PLA/TiO₂/Clay Nanofibers. *E3S Web of Conferences*. Vol. 141; pp. 1–6.
- Jiang S. D., Bai Z. M., Tang G., Song L. 2014. Fabrication and characterization of graphene oxide-reinforced poly(vinyl alcohol)-based hybrid composites by the sol-gel method. *Composites Science and Technolog*. Vol. 102; pp. 51–58.
- Jiménez-Pérez R., Almagro L., González-Sánchez M. I., Valero E. 2020. Non-enzymatic screen-printed sensor based on PtNPs@polyazure A for the real-time tracking of the H₂O₂ secreted from living plant cells. *Bioelectrochemistry*. Vol. 134.
- Ju H. Wang J. 2011. Biosensors Based on Sol–Gel Nanoparticle Matrices. pp. 305–332.
- Kandimalla V. Ju H. 2006. Immobilization of biomolecules in sol-gels: Biological and analytical applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. Vol.36(2); pp. 73–106.
- Kaya N. 2019. Sol-Jel Yöntemiyle Üretilen Alümina Alkojelin Fizikokimyasal ve Yapısal Özellikleri Üzerine Kurutma Türünün Etkisi. *Journal of Polytechnic*. Vol. 0900(3); pp. 657–669.
- Kıymaz Onat E.Yılmaz M. 2023. A disposable non-enzymatic dual sensor for simultaneous amperometric determination of NADH and H₂O₂. *Journal of Applied Electrochemistry*.
- Koivisto B. 2019. A flexible and highly selective non-enzymatic H₂O₂ sensor based on silver nanoparticles embedded into Nafion. *Applied Surface Science*, 467–468(October 2018), 112–118.
- Kumar A. Kumar S. 2013. Synthesis and spectroscopic investigations of CuSO₄·5H₂O doped poly (m-Toluidine). *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. Vol. 62(8); pp. 433–436.

- Labban N., Wayu M. B., Steele C. M., Munoz T. S., Pollock J. A., Leopold M. C. 2019. First generation amperometric biosensing of galactose with xerogel-carbon nanotube layer-by-layer assemblies. *Nanomaterials*. Vol. 9(1); pp. 1–15.
- Li D., Zang J., Zhang J., Ao K., Wang Q., Wei Q. 2016. Sol-gel synthesis of carbon xerogel-ZnO composite for detection of catechol. *Materials*. Vol.9(4): pp.1–11.
- Liang R. Qiu J. 2008. An amperometric glucose biosensor based on titania sol-gel/prussian blue composite film. *Analytical Sciences*. 24(11); pp. 1425–1430.
- Lin Q., Hao S., Hu W., Wang M., Zang Z., Zhu L., Tang X. 2019. Human hair keratin for physically transient resistive switching memory devices. *Journal of Materials Chemistry C*. Vol. 7(11); pp. 3315–3321.
- Liu B., Cao Y., Chen D., Deng J. 2003. Amperometric biosensor based on a nanoporous ZrO₂ matrix. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 478(1); pp. 59–66.
- Liu X. Li H. 2012. Electrochemical biosensor based on reduced graphene oxide and Au nanoparticles entrapped in chitosan/silica sol-gel hybrid membranes for determination of dopamine and uric acid. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. Vol. 682; pp. 158–163.
- Liu X., Nie Y., Meng X., Zhang Z., Zhang S. 2017. DBN-based ionic liquids with high capability for the dissolution of wool keratin. *RSC Advances*. Vol. 7(4); pp. 1981–1988.
- Madhan B. 2016. Fabrication of keratin-silica hydrogel for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*. Vol. 66; pp. 178–184.
- Magar H. S. Mulchandani A. 2021. Electrochemical impedance spectroscopy (Eis): Principles, construction, and biosensing applications. *Sensors*. Vol. 21(19).
- Mihailova I., Gerbreder V., Krasovska M., Sledevskis E., Mizers V., Ogurcovs A. 2022. A non-enzymatic electrochemical hydrogen peroxide sensor based on copper oxide nanostructures. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. Vol. 13; pp. 424–436.
- Mujahid A. Dickert F. L. 2010. Chemical sensors based on molecularly imprinted sol-gel materials. *Materials*. Vol. 3(4); pp. 2196–2217.
- Murugan P., Nagarajan R. D., Sundramoorthy A. K., Ganapathy D., Atchudan R., ... Khosla A. 2022. Electrochemical Detection of H₂O₂ Using an Activated Glassy Carbon Electrode. *ECS Sensors Plus*. 1(3), 034401.
- Narayanan S. S. 2007. Electrochemical sensor for H₂O₂ based on thionin immobilized 3-aminopropyltrimethoxy silane derived sol-gel thin film electrode. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 125(1), 195–201.

- Natali M., Campana A., Posati T., Benvenuti E., Prescimone F., Ramirez D. O. S., Varesano A., Vineis C., Zamboni R., Muccini M., Toffanin S. 2019. Engineering of keratin functionality for the realization of bendable all-biopolymeric micro-electrode array as humidity sensor. *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 141
- O'Brien K. B., Killoran S. J., Lowry J. P. 2007. Development and characterization in vitro of a catalase-based biosensor for hydrogen peroxide monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 22(12); pp. 2994–3000.
- Ognjanović M., Stanković V., Knežević S., Antić B., Vranješ-Durić S., Stanković D. M. 2020. TiO₂/APTES cross-linked to carboxylic graphene based impedimetric glucose biosensor. *Microchemical Journal*. Vol. 158.
- Owens G. J., Singh R. K., Foroutan F., Alqaysi M., Han C. M., Mahapatra C., Knowles J. C. 2016. Sol-gel based materials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*. Vol. 77; pp.1–79.
- Pang L., Shen Y., Hu H., Zeng X., Huang W., Gao H., Wang D. 2019. Chemically and physically cross-linked polyvinyl alcohol-borosilicate gel hybrid scaffolds for bone regeneration. *Materials Science and Engineering C*. Vol. 105.
- Peng H., Huang Z., Zheng Y., Chen W., Lin X. 2014. A novel nanocomposite matrix based on graphene oxide and ferrocene-branched organically modified sol-gel/chitosan for biosensor application. *Journal of Solid State Electrochemistry*. Vol. 18(7); pp.1941–1949.
- Pérez-Ràfols C., Serrano N., Díaz-Cruz J. M., Esteban M. 2016. New approaches to antimony film screen-printed electrodes using carbon-based nanomaterials substrates. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 916; pp.17–23.
- Perumbilavil S., Sankar P., Philip R. 2015. White light Z-scan measurements of ultrafast optical nonlinearity in reduced graphene oxide nanosheets in the 400-700 nm region. *Applied Physics Letters*,. Vol. 107(5); pp. 10–15.
- Phoohinkong W. Kitthawee U. 2018. Keratin Protein Modified Anatase TiO₂ Nanoparticle – Characterizations of Protein Functionalized Surface, 3(1), 1–9.
- PINE RESEARCH. 2016. Electrochemical-Enzymatic Determination of Glucose in Beverages. Vol. 10003; pp. 1–10.
- Piest M., Zhang X., Engbersen J. F. J. 2011. PH-responsive, dynamically restructuring hydrogels formed by reversible crosslinking of PVA with phenylboronic acid functionalised PPO-PEO-PPO spacers (Jeffamines®). *Soft Matter*. Vol.7(23); pp.11111–11118.
- Politi M. J. 2019. Sol-Gel Chemistry-Deals With Sol-Gel Processes. *Nano Design for Smart Gels*. Elsevier Inc.

- Praveen P., Viruthagiri G., Shanmugam N. 2014. Structural, optical and morphological analyses of pristine titanium di-oxide nanoparticles - Synthesized via sol-gel route. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Vol. 117; pp. 622–629.
- Preda G. Vlad-Oros B. 2011. Sol-gel technology in enzymatic electrochemical biosensors for clinical analysis. *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*.
- Prieto-Simón B., Armatas G. S., Pomonis P. J., Prodromidis M. I. 2004. Metal-Dispersed Xerogel-Based Composite Films for the Development of Interference Free Oxidase-Based Biosensors. *Chemistry of Materials*. Vol. 16(6); pp. 1026–1034.
- Pujari S. P., Scheres L., Zuilhof H. 2014. Covalent surface modification of oxide surfaces. *Angewandte Chemie - International Edition*. Vol 53(25); pp. 6322–6356.
- Rashed M. A., Faisal M., Harraz F. A., Jalalah M., Alsareii S. A. 2021. A Highly Efficient Nonenzymatic Hydrogen Peroxide Electrochemical Sensor Using Mesoporous Carbon Doped ZnO Nanocomposite. *Journal of The Electrochemical Society*. Vol. 168(2). 027512.
- Rocha Plácido Moore G., Maria Martelli S., Gandolfo C. Borges Laurindo J. 2006. Influence of the glycerol concentration on some physical properties of feather keratin films. *Food Hydrocolloids*. Vol. 20(7); pp. 975–982.
- Sahin O. G. 2015. Microwave-assisted synthesis of PtAu@C based bimetallic nanocatalysts for non-enzymatic H₂O₂ sensor. *Electrochimica Acta*. Vol. 180; pp. 873–878.
- Sándor M., Nistor C. L., Szalontai G., Stoica R., Nicolae C. A., Alexandrescu E., Fazakas J., Donescu D. 2016. Aminopropyl-silica hybrid particles as supports for humic acids immobilization. *Materials*. Vol. 9(1); pp. 1–16.
- Santjojo D. J. D. H. 2012. Improvement of Biomolecule Immobilization on Polystyrene Surface by Increasing Surface Roughness. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*. Vol. 03(03).
- Satvekar R. K., Rohiwal S. S., Tiwari A. P., Raut A. V., ... Pawar S. H. 2015. Sol-gel derived silica/chitosan/Fe₃O₄ nanocomposite for direct electrochemistry and hydrogen peroxide biosensing. *Materials Research Express*. Vol. 2(1).
- Sezgin Arslan, T. 2017. Keratin temelli iskele üretimi ve doku mühendisliği uygulamaları için etkinliğinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı.
- Shavandi A., Silva T. H., Bekhit A. E. D. A. 2017. Keratin: dissolution, extraction and biomedical application. *Biomaterials Science*. Vol. 5(9); pp. 1699–1735.

- Silva A. D., Paschoalino W. J., Kubota L. T. 2020. Structure, Properties, and Electrochemical Sensing Applications of Graphene-Based Materials. *ChemElectroChem*. Vol. 7(22); pp. 4508–4525.
- Song L., Zhao J., Luan S., Ma J. Yin J. 2015. High-efficiency immunoassay platforms with controllable surface roughness and oriented antibody immobilization. *Journal of Materials Chemistry B*. Vol. 3(38); pp.7499–7502.
- Song M. J. Whang D. 2010. Non-enzymatic electrochemical CuO nanoflowers sensor for hydrogen peroxide detection. *Talanta*. Vol. 80(5); pp.1648–1652.
- Soraru G. D., Dallabona N., Babonneau F. 1999. Organically modified SiO₂-B₂O₃ gels displaying a high content of borosiloxane (=B-O-Si≡) bonds. *Chemistry of Materials*. Vol.11(4); pp.910–919.
- Sosa V., Barceló C., Serrano N., Ariño C., Esteban M. 2015. Antimony film screen-printed carbon electrode for stripping analysis of Cd(II), Pb(II), and Cu(II) in natural samples. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 855; pp.34–40.
- Souza J. C., Machini W. B. S., Oliveira-Brett A. M. 2020. Human Hair Keratin Direct Electrochemistry and In Situ Interaction with p-Toluenediamine and p-Aminophenol Hair Dye Precursors using a Keratin Electrochemical Biosensor. *ChemElectroChem*. Vol. 7(5); pp. 277–1285.
- Spallino L., Vaccaro L., Sciortino L., Agnello S., Buscarino G., ... Gelardi F. M. 2014. Visible-ultraviolet vibronic emission of silica nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics*. Vol. 16(40); pp. 22028–22034.
- Stănilă A., Braicu C., Pop R. M. 2011. Antibacterial activity of copper and cobalt amino acids complexes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. Vol.39(2); pp. 124–129.
- Stebbins J. F. 2003. Nature of silicon-boron mixing in sodium borosilicate glasses: A high-resolution ¹¹B and ¹⁷Si NMR study. *Journal of Physical Chemistry B*. vol. 107(37).
- Stoll S., Hwang J. H., Fox D. W., Kim K., Lee W. H. 2022. Cost-effective screen-printed carbon electrode biosensors for rapid detection of microcystin-LR in surface waters for early warning of harmful algal blooms. *Environmental Science and Pollution Research*. 1–18.
- Su C., Gong J. S., Ye J. P., He J. M., Li R. Y., Jiang M., Geng Y., Zhang Y., Chen J. H., Shi J. S. 2020. Enzymatic Extraction of Bioactive and Self-Assembling Wool Keratin for Biomedical Applications. *Macromolecular Bioscience*. Vol. 20(9); pp.1–11.
- Su P. G. Tsai M. S. 2015. Flexible humidity sensor based on Au nanoparticles/graphene oxide/thiolated silica sol-gel film. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, Vol. 216; pp. 467–475.

- Tan S. N. 2001. Amperometric hydrogen peroxide biosensor with silica sol-gel/chitosan film as immobilization matrix. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 437(1); pp. 87–93.
- Tan X., Li M., Cai P., Zou X. 2005. An amperometric cholesterol biosensor based on multiwalled carbon nanotubes and organically modified sol-gel/chitosan hybrid composite film. *Analytical Biochemistry*. Vol. 337(1); pp.111–120.
- Tao E., Ma Z., Cai D., Li Y. 2021. Enhancement of Interfacial Charge Transfer of TiO₂/Graphene with Doped Ca²⁺ for Improving Electrical Conductivity. *ACS Applied Materials and Interfaces*. Vol. 13(35); pp. 41875–41885.
- Thatikayala D., Ponnammma D., Sadasivuni K. K., Cabibihan J. J., Al-Ali A. K., ... Min B. 2020. Progress of Advanced Nanomaterials in the Non-Enzymatic Electrochemical Sensing of Glucose and H₂O₂. *Biosensors*. Vol. 10(11).
- Thomas A. 2019. Emerged carbon nanomaterials from metal-organic precursors for electrochemical catalysis in energy conversion. *Advanced Nanomaterials for Electrochemical Energy Conversion and Storage*. Elsevier Inc.
- Tong L., Wu L., Su E., Gu N. 2023. Recent Advances in the Application of Nanozymes in Amperometric Sensors: A Review. *Chemosensors*. Vol. 11(4).
- Tonin C., Aluigi A., Vineis C., Varesano A., ... Ferrero F. 2007. Thermal and structural characterization of poly(ethylene-oxide)/keratin blend films. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. Vol. 89(2); pp. 601–608.
- Tripathi V. S. Ju H. 2006. Preparation of ormosil and its applications in the immobilizing biomolecules. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. Vol. 114(2); pp. 1071–1082.
- Tunç A. T, Arslan F. 2016. Development of an acetylcholinesterase–choline oxidase based biosensor for acetylcholine determination. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. Vol. 44(7); pp.1659–1664.
- Vázquez L. 2017. Handbook of Sol-Gel Science and Technology. *Handbook of Sol-Gel Science and Technology*.
- Villanueva M. E., Puca M., Pérez Bravo J., Bafico J., Copello G. J. 2020. Dual adsorbent-photocatalytic keratin-TiO₂ nanocomposite for trimethoprim removal from wastewater. *New Journal of Chemistry*. Vol. 44(26); pp.10964–10972.
- Vineis C., Varesano A., Aluigi A. 2019. Extraction and characterization of keratin from different biomasses. Springer International Publishing.
- Walcarius A. 2018. Silica-based electrochemical sensors and biosensors: Recent trends. *Current Opinion in Electrochemistry*. Vol. 10; pp 88–97.
- Wang G., Xu J. J., Lu Z. H. 2003. Amperometric hydrogen peroxide biosensor with sol-gel/chitosan network-like film as immobilization matrix. *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 18(4); pp. 335–343.

- Wang J., Chen X. jiao, Liao K. ming, Han M. 2015. Pd nanoparticle-modified electrodes for nonenzymatic hydrogen peroxide detection. *Nanoscale Research Letters*. Vol. 10(1).
- Wei M., Qiao Y., Zhao H., Liang J., Li T., Luo Y., Lu S., Shi X., Sun X. 2020. Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: recent progress and perspectives. *Chemical Communications*. Vol. 56(93); pp.14553–14569.
- Woepfel K. M. Cui X. T. 2018. Enhancing surface immobilization of bioactive molecules via a silica nanoparticle based coating. *Journal of Materials Chemistry B*. Vol.6(19); pp. 3058–3067.
- Wu M., Shen S., Tang R. 2017. Preparation and study on the structure of keratin/PVA membrane containing wool fibers. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, Vol. 254(4).
- Xu S., Sang L., Zhang Y., Li X. 2013. Biological evaluation of human hair keratin scaffolds for skin wound repair and regeneration. *Materials Science and Engineering C*. Vol. 33(2); pp. 648–655.
- Yang X., Hua L., Tan S. N. 2003. Covalent immobilization of an enzyme (glucose oxidase) onto a carbon sol-gel silicate composite surface as a biosensing platform. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 478(1); pp. 67–75.
- Yilmaz H. D., Cengiz U., Arslan Y. E., Ceylan A. 2021. From a plant secretion to the promising bone grafts: Cryogels of silicon-integrated quince seed mucilage by microwave-assisted sol-gel reaction. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 131(4); pp.420–433.
- Yuan C.Y. and Ho W.J.2004. Application of teos/pdms ormosil in the fabrication of amperometric biosensor. *IEEE International Workshop on Biomedical Circuits & Systems*.
- Zhang L. M. 2006. Using novel polysaccharide - silica hybrid material to construct an amperometric biosensor for hydrogen peroxide. *Journal of Physical Chemistry B*. Vol. 110(49); pp. 24864–24868.
- Zhou L. T., Yang G., Yang X. X., Zhou M. H. 2014. Preparation of regenerated keratin sponge from waste feathers by a simple method and its potential use for oil adsorption. *Environmental Science and Pollution Research*. Vol. 21(8) pp. 5730–5736.
- Zhu H., Li L., Zhou W., Chen X. 2016. Advances in non-enzymatic glucose sensors based on metal oxides. *Journal of Materials Chemistry B*. Vol. 4(46); pp. 7333–7349.