

T.C.

AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİ[(METOKSİETOKSİ)ETOKSİ-*ko*-3-
FORMİLFENOKSİ]FOSFAZEN'İN SENTEZİ VE
BİYOSENSÖR UYGULAMALARINDA KULLANIMI**

Didem UÇAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

KIRŞEHİR 2015

T.C.

AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİ[(METOKSİETOKSİ)ETOKSİ-*ko*-3-
FORMİLFENOKSİ]FOSFAZEN'İN SENTEZİ VE
BİYOSENSÖR UYGULAMALARINDA KULLANIMI**

Didem UÇAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Yunus KARATAŞ

KIRŞEHİR 2015

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafındanAnabilim Dalında YÜKSEK LİSANS
TEZİ / DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan(İmza)

Akademik Ünvanı, Adı-Soyadı

Üye.....(İmza)

Akademik Ünvanı, Adı-Soyadı

Üye.....(İmza)

Akademik Ünvanı, Adı-Soyadı

Üye.....(İmza)

Akademik Ünvanı, Adı-Soyadı

Üye.....(İmza)

Akademik Ünvan, Adı-Soyadı

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../

.../20..

(İmza Yeri)

Akademik Ünvan, Adı-Soyadı

Enstitü

Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Didem UÇAN

POLİ[(METOKSİETOKSİ)ETOKSİ-*KO*-3-
FORMİLFENOKSİ]FOSFAZEN’İN SENTEZİ VE BİYOSENSÖR
UYGULAMALARINDA KULLANIMI

(Yüksek Lisans Tezi)

Didem UÇAN

Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

HAZİRAN 2015

ÖZET

İletken bir polimer olan poli[4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)benzenamin] (poli(SNS-NH₂)) ve yeni esnek hidrofilik bir polimer olan poli[(metoksietoksi)etoksi-*ko*-3-formilfenoksi] fosfazen (PPA) kullanılarak yeni bir amperometrik glukoz biyosensörü başarılı bir şekilde hazırlanmıştır. İletken bir matris elde ederek dönüştürücü yüzeyindeki enzimin tutuklanmasını iyileştirmek amacıyla, poli(SNS-NH₂) elektrokimyasal polimerizasyon yöntemiyle grafit bir elektrot yüzeyinde polimerleştirilmiştir. Ayrıca enzim tutuklamasını daha da güçlendirmek için fonksiyonel aldehit grubu taşıyan bir polifosfazen türeği sentezlenmiş ve glukoz oksidazın tutuklanmasında kullanılmıştır. Sadece poli(SNS-NH₂)’deki amino grupları değil PPA’daki aldehit grupları da tutuklama işlemi esnasında hem biyomolekülün PPA ağı içerisinde hapsedilmesine hem de kovalent bağ ile enzimin tutuklanmasına katkıda bulunmuştur. Bu sayede glukozun etkili ve uzun ömürlü analizi sağlanmıştır. Amperometrik ölçümler, pH 4.5’de 50 mM sodyum asetat tamponu içinde Ag/AgCl referansına göre -0,7V’da gerçekleştirilmiştir. K_M^{app} (0.677 mM), I_{max} (20.91 μ A) ve LOD (1.3 μ M) olarak belirlenmiştir. Ayrıca, bu amaç için sentezlenmiş, oldukça esnek hidrofilik polifosfazen tutuklama matrisi sayesinde biyosensör, (237,1 μ A mM⁻¹ cm⁻²) son derece yüksek hassasiyet göstermiştir. Son olarak, hazırlanan biyosensör çok sayıda içecek örneğinde glukoz içeriğinin belirlenmesinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Bilim Kodu: polifosfazen, iletken polimer, glukoz biyosensör, kovalent bağ, immobilizasyon

Sayfa Adedi: 62

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Yunus KARATAŞ

SYNTHESIS AND BIOSENSOR APPLICATION OF
POLY[(METHOXYETHOXY)ETHOXY-*CO*-3-FORMYLPHENOXY]
PHOSPHAZENE

(Master's Thesis)

Didem UÇAN

Ahi Evran University, Institute of Science

JUNE 2015

ABSTRACT

An amperometric glucose biosensor was prepared successfully based on a conducting polymer; poly[4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)benzenamine] (poly(SNS-NH₂)) and a new flexible hydrophilic polyphosphazene polymer, poly[(methoxyethoxy)ethoxy-*co*-3-formylphenoxy]phosphazene (PPA). Poly(SNS-NH₂) was electrochemically polymerized on a graphite electrode to achieve a conducting immobilization matrix to improve the enzyme immobilization on the transducer surface. Moreover, to enhance the immobilization, a polyphosphazene derivate bearing functional aldehyde group was designed, synthesized and used in the immobilization of glucose oxidase. Not only the amino groups in the structure of poly(SNS-NH₂), but also the aldehyde groups in PPA were contributed to the covalent immobilization as well as the entrapping the biomolecules in PPA network during the immobilization process. This afforded an effective and long-life analysis to glucose. Amperometric measurements were conducted at -0.7 V vs. Ag/AgCl in 50 mM sodium acetate buffer at pH 4.5. K_M^{app} (0.677 mM), I_{max} (20.91 μ A) and LOD (1.3 μ M) values were determined. Moreover, biosensor showed an extremely high sensitivity as 237.1 μ A mM⁻¹ cm⁻² owing to the newly synthesized and combined highly flexible hydrophilic polyphosphazene immobilization matrix. Finally, the proposed biosensor was successfully applied for determination of glucose content in several beverages.

Science Code: Polyphosphazene, conducting polymer, glucose biosensor, covalent immobilization

Number of Pages: 62

Thesis Advisor: Assoc. Prof. Dr. Yunus KARATAŞ

TEŞEKKÜR

Bu konuyu yüksek lisans tezi olarak öneren, çalışmalarım bana öncü olan, çalışmalarım sırasında her türlü destek ve ilgisini gördüğüm, bilgi ve tecrübeleriyle bana rehberlik eden değerli danışman hocam Doç. Dr. Yunus KARATAŞ'a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ODTÜ'deki çalışmalarım boyunca bana her türlü imkânı sağlayan bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Levent TOPPARE'ye teşekkür ederim.

ODTÜ'de çalışmalarına başladığım günden itibaren her zaman yanımda olan her konuda bana yardımcı olan çok değerli hocam Dr. Fulya EKİZ KANIK'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen hep yanımda olan aileme ve bu çalışmaya başlamama sebep olan iyi kötü her an yanımda olup benim en doğru kararları almama sebep olan hayat arkadaşım Enes KARA'ya teşekkür ederim.

Önce lisans sonrada yüksek lisans çalışmalarım boyunca pozitif enerjileriyle yanımda olan çok değerli arkadaşlarım Betül KÜÇÜKSARI, Sinem KAVUK ve Esra EREN'e teşekkür ederim.

Labaratuvarda birlikte çalıştığım arkadaşlarım Rabia DELİKUŞ ve Saniye SÖYLEMEZ'e teşekkür ederim.

Didem UÇAN

İÇİNDEKİLER

TEZ BİLDİRİMİ.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLoların LİSTESİ	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xii
EKLERİN LİSTESİ.....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. POLİMERLERİN TANIMI	3
2.2. POLİFOSFAZENLER	3
2.2.1. Polifosfazenlerin Tarihsel Gelişimi.....	3
2.2.2. Doğrusal Poli(Organo Fosfazen)'lerin Elde Ediliş Yöntemleri	6
2.2.3. Makromoleküler yer değiştirme reaksiyonları:	9
2.4. İLETKEN POLİMERLERİN SENTEZİ	11

2.4.1. Kimyasal Polimerleşme.....	12
2.4.2. Elektrokimyasal Polimerleşme.....	12
2.5. BİYOSENSÖR UYGULAMALARI	14
2.5.1. Biyosensörlere Genel Bakış	14
2.5.2. Biyosensörler ve Bileşenleri.....	14
2.5.3. Biyoajanlar	15
2.5.4. Sinyal İleticiler (Transduserler)	15
2.5.5. Biyoaktif Tabakanın Elektrot Yüzeyine İmmobilizasyonu.....	16
2.5.6. Enzim Biyosensörleri	17
2.7. POLİFOSFAZENLERİN BİYOSENSÖR OLARAK KULLANIMI.	24
2.8. ARAŞTIRMA MOTİVASYONU.....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	28
3.1 KİMYASALLAR VE CİHAZLAR	28
3.2. SENTEZLENEN MALZEMELER.....	29
3.2.1. SNS-NH ₂ Monomerinin Sentezi.....	30
3.2.2. Trikloro(trimetilsilil)fosforimin (Monomer) Sentezi	30
3.2.3 Poli(dikloro fosfazen) Sentezi	31
3.2.3. Poli[(metoksietoksi)etoksi- <i>ko</i> -3-formilfenoksi] fosfazen Sentezi	31

3.2.4. Poli(SNS-NH ₂)/PPA/GOx Biosensor hazırlanması.....	32
3.2.5.Elektrokimyasal Ölçümler.....	34
3.2.6. Örnek Uygulama	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	36
4.1. POLİFOSFAZENİN(PPA) KARAKTERİZASYONU	36
4.2. BİYOSENSÖRDE OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI	40
4.3.KARAKTERİZASYON.....	47
4.4. KARARLILIK VE GİRİŞİM ÇALIŞMASI	51
4.5. ÖRNEK UYGULAMA.....	52
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR.....	55
EKLER:.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	62

TABLÖLARIN LİSTESİ

Tablo 1. İçeceklerde glikoz tespiti (Tüm ölçümler üç kez yapılmıştır; Standart sapmaları hesaplanmış ve $\pm$ olarak verildi).....	53
---	----

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 2.1. Polifosfazenlerin genel yapısı	3
Şekil 2.2. (a) $(N=PCl_2)_3$ trimeri ve (b) $(N=PCl_2)_4$ tetramerinin yapıları.	4
Şekil 2.3. Halkalı trimerin polimerleşmesi ve çapraz bağlanması.....	5
Şekil 2.4. Trimerin ısıl halka açılma reaksiyonu	7
Şekil 2.5. Poli(dikloro fosfazen) oluşum basamakları	8
Şekil 2.6. $OC_2PN=PCl_3$ sentezi ve kondenzasyon polimerleşmesi.....	8
Şekil 2.7. <i>N</i> -Sililfosforaninin $(Me_3SiN=PCl_3)$ monomerinin sentezi ve polimerizasyonu	9
Şekil 2.8. Tek ve karışık süstitüentli polifosfazenler. ²	10
Şekil 2.9. Tiyofenin elektrokimyasal olarak polimerleşmesine ait reaksiyon mekanizması.....	14
Şekil 2.10. Biyosensörün genel şematik gösterimi	15
Şekil 2.11. Enzim substrat kompleksi	19
Şekil 2.12. Substrat konsantrasyonunun tepkime hızına etkisi.	20
Şekil 2.13. pH'nın enzim aktivitesine etkisi.	21
Şekil 2.14. Glukoz oksidazın katalizlediği reaksiyon	23
Şekil 2.15. Glukoz oksidaz enziminin yapısında bulunan FAD grubu	23

Şekil 2.16. Poli(difenoksifosfazen) sentezi.....	25
Şekil 3.1. Glukoz biyosensör hazırlanması	30
Şekil 3.2. Trikloro(trimetilsilil)fosforimin sentezi.....	31
Şekil 3.3. Oda sıcaklığında yaşayan katyonik polimerizasyon ile PCl_5 katalizörlüğünde poli(dikloro fosfazen) sentezi.	31
Şekil 3.4. Poli[(metoksietoksi)etoksi-ko-3-formilfenoksi] fosfazen'in sentezi	32
Şekil 3.5. SNS-NH ₂ 'nin grafit üzerinde 100 mVs^{-1} tarama hızında elektrot yüzeyine $0,1 \text{ M NaClO}_4/\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ elektrolit-çözücü sisteminde polimerleşmesinin döngüsel voltamogramı (20 döngü).....	33
Şekil 4.1. Poli[(metoksietoksi)etoksi-ko-3-formilfenoksi] fosfazen'in CDCl_3 içerisindeki ^1H NMR spektrumu.	36
Şekil 4.2. Poli[(metoksietoksi)etoksi-ko-3-formilfenoksi] fosfazen'in CDCl_3 içerisindeki ^{31}P NMR spektrumu.	37
Şekil 4.3. Poli[(metoksietoksi)etoksi-ko-3-formilfenoksi] fosfazen'in kızılötesi spektrumu.	38
Şekil 4.4. Poli[(metoksietoksi)etoksi-ko-3-formilfenoksi] fosfazen'in DSC termogramı	39
Şekil 4.5. Poli(SNS-NH ₂) kalınlığının biyosensöre etkisi ($\text{pH} = 5,5$, 50 mM sodyum asetat tamponu, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $-0,7 \text{ V}$, $[\text{Glucose}]$: $0,7 \text{ mM}$). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir.....	41

- Şekil 4.6.** Biyosensörün üzerinde polifosfazen miktarının etkisi (pH 4,5, 50 mM sodyum asetat tamponu 25 ° C, -0,7 V). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir. 43
- Şekil 4.7.** Enzim miktarının biyosensör yanıtına etkisi (pH = 4,5, 50 mM sodyum asetat tamponu, 25 ° C, -0,7 V). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir. 44
- Şekil 4.8.** Biyosensör yanıtına çapraz bağlayıcı (GA) etkisi (pH 4,5, 50 mM sodyum asetat tamponu, 25 ° C, -0,7 V, [Glukoz] = 0,7 mM). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir. 45
- Şekil 4.9.** pH değişiminin biyosensöre etkisi (pH = 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 için 50 mM sodyum asetat tamponu ve pH = 6,0, 6,5 için 50 mM fosfat tamponu 25 °C'ta kullanılmıştır. -0,7 V, [Glucose] = 0,7 mM). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir. 46
- Şekil 4.10.** Optimize edilmiş koşullar altında biyosensör üzerinde immobilizasyon matris etkisi (pH 4,5, 50 mM sodyum asetat tamponu 25 ° C, -0,7 V). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir. 47
- Şekil 4.11.** Yüzey karakterizasyonu; (A) Sadece polifosfazen (PPA) ve GO_x'in B) PPA, C) poli(SNS-NH₂) ve D) poli(SNS-NH₂) / PPA üzerine tutuklanmaları sonrası SEM görüntüleri. 48
- Şekil 4.12.** Glukoz için kalibrasyon eğrisi (pH = 4,5, 50 mM sodyum asetat tamponu 25 °C, -0,7 V). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir. (Glukoz için tipik bir biyosensör yanıtı 0,70 mM glukoz pH = 4,5 50 mM sodyum asetat tamponunda). 50

Şekil 4.13. 37 gün boyunca biyosensör yanıtları ($\text{pH} = 4,5$, 50 mM sodyum asetat tamponu, Glikoz: [0,5 mM], 25 °C, -0,7 V). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir. 51

Şekil 4.14. Biyosensörün glukoz ve olası girişim türlerine tepkisi ($\text{pH} = 4,5$, 50 mM sodyum asetat tamponu, 25 °C, -0,7 V). 52

EKLERİN LİSTESİ

Ek 1. Yüksek Lisans çalışmasından üretilen makalenin ilk sayfası 60

Ek 2. Yüksek Lisans çalışmalarından üretilen poster 61

SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
ACN	Asetonitril
Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş klorür
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
GA	Gluteraldehit
GO _x	Glukoz oksidaz
GPC	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
I _{max}	Maksimum akım değeri
KCl	Potasyum klorür
K _M ^{app}	Michaelis-Menten sabiti
LOD	Tayin sınırı
NaH	Sodyum hidrür
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PCl ₅	Fosfor pentaklorür
PPA	Poli[(metoksietoksi)etoksi- <i>ko</i> -3-formilfenoksi] fosfazen
Poli(SNSNH ₂)	Poli[4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)benzenamin]

SD	Standart sapma
SNSNH ₂	4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)benzenamin
TBAPF ₆	Tetrabütilamonyum hekzaflorofosfat
THF	Tetrahidrofuran
TMS	Tetrametilsilan

1. GİRİŞ

Polimer kimyası ve teknolojisi, molekül ve malzeme biliminin temel araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır. Bu alan elektronik teknolojisinden tıbbı, film, fiber, elastomer ve diğeryapı malzemelerine kadar yaşamın her alanında etkisini hissettirmektedir.

Günümüzde kullanılan sentetik plastiklerin ve elastomerlerin hemen hemen hepsi organik polimerlerdir. Ana zincirlerinde karbon atomu bulunduran bu polimerlerin ana kaynağı petrol olmakla birlikte, az miktarda bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan da elde edilmektedir. Bu polimerler, üretim kapasiteleri yüksek, işlenmeleri kolay, maliyetleri düşük, sert ve hafif malzemelerdir. Ancak oksijen ve azot ortamında bozulmaları, organik çözücülere ve sıcaklığa olan duyarlılıkları, bu malzemelerin kullanımı sırasında problemlere neden olmaktadır. Organik polimerlerin sahip olduğı bu dezavantajlar ve petrole bağılı olmaksızın üretim arayışları “ anorganik polimerleri” gündeme getirmektedir.

Anorganik polimerlerin geliştirilmesinde ilk olarak; bor, silisyum, azot, kükürt, fosfor, kalay, oksijen, antimon, arsenik, selenyum ve tellür gibi ana grup elementleri kullanılmıştır. Sentezlenen ilk anorganik polimer polisülfür olup, ticari açıdan bir önemi bulunmamaktadır. Ana zincirinde silisyum ve oksijen atomları içeren polisiloksan üretilen ilk ticari öneme sahip anorganik polimerdir. Ana zinciri azot ve fosfor atomlarından oluşan polifosfazenler ise yan gruplarının, basit sentez teknikleri kullanılarak çok geniş bir yelpazede çeşitlendirilmesiyle; elastikiyet, ısı kararlılık, reaktif kimyasallara ve çözücülere karşı direnç gibi özellikler kazanabilmektedir. Bu nedenle polifosfazenler çok farklı uygulamalar için polimer kimyasında özel bir yere sahiptirler.^{1,2}

Bugüne kadar 700’den fazla fosfazen polimer ve kopolimer çeşidi bulunmaktadır. Bu sayede, kimyasallara, yanmaya, radyasyona, ısıya, indirgen ve yükseltgenlere karşı dayanaklı vb. çeşitli polimerler tasarlanmış ve sentezlenmişlerdir. Polifosfazen polimerlerin biyomalzemeler, ışığa duyarlı

substratlar (fotokromikler, fotoresistörler, fotostabilizörler, fotoinhibitörler), membranlar, sıvı kristaller, lineer olmayan optik maddeler, yanmaz fiberler, filmler, hibrid malzemeler, katalizörler, yüksek performanslı elastomerler, lityum-iyon ve proton-iletken membranlar (bataryalar ve yakıt hücreleri), elektronik malzemelerde biyosensör ve organometalik kimyada reaktif olarak kullanımı gibi birçok uygulama alanları vardır.^{1,2}

Bu çalışmada yaşayan katyonik polimerleşme yöntemini kullanarak enzim tutuklamasında platform olarak kullanılmasına yönelik amacıyla yeni bir polifosfazenin sentezi hedeflenmiştir. Sentezlenen polimerin sulu ortamda enzimin aktivitesini kısıtlaması amacıyla adına ana zincirinde suyu seven yan gruplar barındıran ve enzim ile kovalent olarak etkileşerek tutuklama işleminin daha iyi gerçekleşebilmesini sağlayan aldehit grupları da içeren yeni bir polifosfazen tasarlanmıştır. Bu amaçla poli[(metoksietoksi)etoksi-*ko*-3-formilfenoksi] fosfazen (PPA) polimeri sentezlenmiş ve biyosensör hazırlanmasında kullanılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. POLİMERLERİN TANIMI

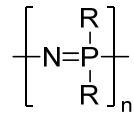
Polimerler, çok yüksek molekül ağırlığına sahip maddelerdir. Birbiri ile kovalent bağlarla bağlı çeşitli yapı birimlerinden oluşurlar. Polimerde tekrar eden bu birimlere ‘mer’ ‘segment’ gibi isimler verilir.

Polimerler, monomer olarak adlandırılan maddelerin uygun şartlarda birbirleriyle reaksiyonu sonucu oluşurlar. Bu reaksiyonlara polimerleşme reaksiyonları denir.

2.2. POLİFOSFAZENLER

Fosfazenler, yapılarında tekrarlayan –P=N– birimleri içeren, her bir fosfor atomunda iki yan grubun, (R) bağlı bulunduğu düşük molekül kütleli oligomerlerden yüksek molekül kütleli polimerlere kadar birçok bileşiği kapsayan düz zincirli ve halkalı bileşiklerdir.³

Ana zincir yapısı inorganik olan polifosfazenlerin; yan grupları organik, organometalik veya inorganik üniteler olabilir. Organik yan grup içeren bu polifosfazenler inorganik-organik makromoleküller olarak bilinen polimer sınıfının bir bölümüdür⁴. Polifosfazenler ya bir polimerin ana zincir yapısında ya da yan gruplarında Şekil 2.1’de görülen iskelet yapısına sahip makromoleküllerdir.

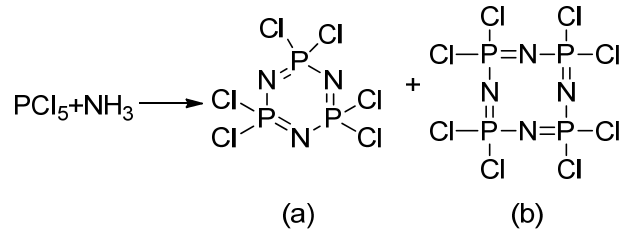


Şekil 2.1. Polifosfazenlerin genel yapısı

2.2.1. Polifosfazenlerin Tarihsel Gelişimi

Sentezlenen ilk fosfazen bileşiği, amonyumklorür ve fosforpentaklorür arasındaki reaksiyon sonucunda, 1834 yılında Liebg⁵ ve Rose⁶ tarafından elde edilen

heksaklorosiklotrifosfazendir. Ancak, kristallendirdikleri ve organik çözücülerde çözünen bu bileşiğin yapısını tam olarak açıklayamamışlardır. 19. yüzyılın sonlarına doğru Gerhardt⁷, Laurent⁸, Gladstone⁹ ve Wichelhaus¹⁰ yaptıkları çalışmalar sonucunda trimeri (NPCl₂)₃ izole ederek yapısını açıklamış ve mol kütlesini bulmuşlardır. Stokes,¹¹ 1895-1898 yılları arasında yaptığı çalışmalarda, (N=PCl₂)₃ ve (N=PCl₂)₄ (Şekil 2.2) siklik yapılarını önermiş ve ayrıca (NPCl₂)_n yapısındaki bu bileşiklerden n=4, 5, 6 ve 7 bileşiklerini ayırmıştır.



Şekil 2.2. (a) (N=PCl₂)₃ trimeri ve (b) (N=PCl₂)₄ tetramerinin yapıları.

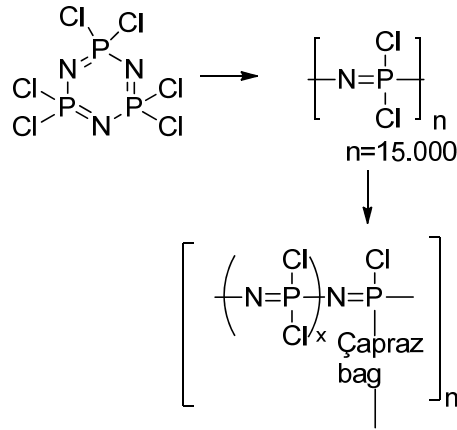
Bu türlerin polimerik formu ilk kez Stokes tarafından hazırlanmıştır. 1897 yılında Stokes heksaklorosiklotrifosfazen bileşiğinin ısıtıldığında çözünmeyen, hidrolitik olarak kararsız ve “inorganik kauçuk” olarak isimlendirilen elastomerik polimerlere dönüştüğünü bulmuştur.^{11d} Aynı zamanda elde ettiği bu inorganik kauçuğu tekrar ısıttığında trimer veya tetramere dönüştüğünü (depolymerizasyon) gösterebilmiştir. Çapraz bağ içeren bu polimer daha sonraki reaksiyonlarda kullanılamamıştır. Hidrolitik olarak kararsız olan ve çözücülerde şişen fakat çözünmeyen çapraz bağlı bu materyallerin geliştirilmesi; çözünebilir ve çapraz bağlı olmayan formlarının sentezine kadar beklemek zorunda kalmıştır.¹²

Meyer, Lotmar ve Pankow¹³ 1936 yılında X-ışınları difraksiyonu deneyleri ile bu materyalin Şekil 2.3’deki tekrar eden üniteleri içeren doğrusal polimerik zincirler olduğunu önerdiler. Fakat bu polimerlerin bilinen çözücülerde çözünmemesi ve atmosferdeki hidrolitik kararsızlığı bu materyallere olan ilgiyi azaltmıştır.

Allcock, 1960’lı yılların ortalarında yaptıkları çalışmalarla şu sonuçlara ulaşmışlardır.¹⁴

i) İnorganik elastomerin hidrolitik kararsızlığı fosfor-klor bağlarının yüksek reaktivitesini gösterir. Bu reaktiviteden, yararlanılarak klor atomlarıyla organik gruplar yer değiştirebilir ve böylece hidrolitik kararlı türevleri elde edilebilir. Örneğin suya karşı tepkisiz organometalik bileşikler ile klor atomları yer değiştirirse polimer hidrolize dayanıklı ya da istemsiz hale getirilebilir. Bu şekilde halojenik polimere istenen özellikler yer değiştirme reaksiyonu ile verilebilir ve organik polimerler gibi geniş bir alanda kullanımı sağlanabilir. Fakat bu malzemelerin genel çözücülerde çözünmemesi nedeniyle yer değiştirme tamamlanamamıştır.

ii) Çözünmeme ve şişme çapraz bağlı polimerlerin bir özelliğidir. Bu yüzden çapraz bağlı olmayan polimerlerin hazırlanmasına ihtiyaç vardır. Sıcaklık ve zamanın kontrolü, halkalı trimerin yüksek saflığı ve polimer dönüşümünün yaklaşık % 70'e ulaşmadan reaksiyonun sonlandırılmasıyla benzen, toluen veya tetrahidrafuran gibi organik çözücülerde çözünebilen yüksek molekül kütleli doğrusal polimerler elde edilmiştir. Fakat bu polimerlerin daha yüksek sıcaklıklara ısıtılması çapraz bağlı türevlerin oluşumuna neden olabilmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Halkalı trimerin polimerleşmesi ve çapraz bağlanması

iii) Çapraz bağlı olmayan poli(dikloro fosfazen) uygun bir çözücüde çözündüğünde, iyi bir makromoleküler reaktif olarak davranmaktadır. Alkol veya fenollerin sodyum tuzları gibi organik nükleofiller ile veya primer ve sekonder aminlerle muamele edilerek, klor atomlarının tamamı polimer zinciri boyunca organik birimlerle yer değiştirebilmektedir.

iv) Farklı yan grupların varlığı ile türetilmiş polimerler ise hidrolitik kararlılık ve birçok kullanışlı özellikler sağlar. Bu polimerlerin ısıtma ve yüksek enerjili ışınlarla karşı kararlı olduğu bulunmuştur. Çapraz bağlı olmayan poli(dikloro fosfazen)'in sentezi polifosfazen kimyasının gelişmesindeki en önemli ilk gelişmedir. Fosfor-klor bağlarının organik polimerlerdeki karbon hidrojen veya karbon klor bağlarına göre nükleofilik ataklar için daha reaktif olması bu polimerlerin önemini arttırmıştır.

2.2.2. Doğrusal Poli(Organo Fosfazen)'lerin Elde Ediliş Yöntemleri

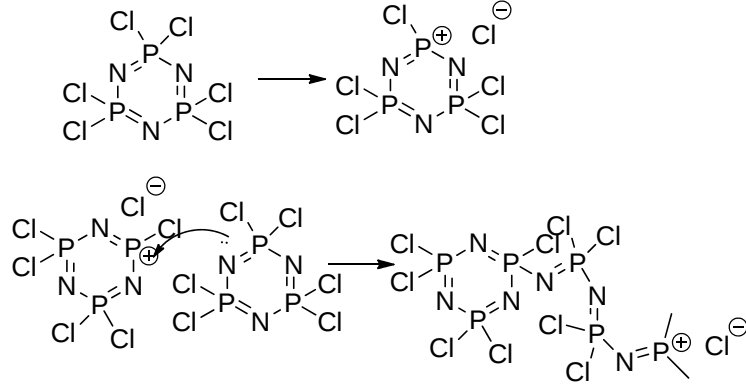
Doğrusal poli(organo fosfazen)'ler farklı yöntemlerle sentezlenebilir. Bunlar: (i) $(\text{NPCl}_2)_3$ 'ün halka açılma polimerleşmesi ve makromoleküler yerdeğiştirme yöntemi, (ii) Organometalik veya organo grubu bulunduran siklofosfazatrienin halka açılma polimerleşmesi, (iii) Kondenzasyon reaksiyonları ile poli(organo fosfazenler)'in sentezi, (iv) Organosüstitüe N-sililfosforaninin ($\text{Me}_3\text{SiN}=\text{PR}_2\text{Cl}$) organosüstitüe polimerler vermek üzere kondenzasyon polimerizasyonu, (v) R_2PN_3 gibi organofosforazidlerin bozunma reaksiyonları, (vi) Polifosfazen zincirlerinde var olan organik yan gruplar üzerinden yürütülen ikincil reaksiyonlar.

Bu şekilde, farklı yöntemlerle doğrusal poli(dikloro fosfazen) veya doğrudan poli(organo fosfazen) sentezi gerçekleştirilmektedir. Poli(dikloro fosfazen), yapısında reaktif P-Cl bağları içermektedir ve kararsızdır. Bu nedenle uygun yan grup(lar) kullanarak makromoleküler yer değiştirme yöntemiyle hedeflenen polimer yapısı elde edilmektedir. Doğrusal polifosfazenlerin sentezinde yukarıda açıklanan yöntemlerden en yaygın kullanılanları ısıl halka açılma polimerleşmesi ve kondenzasyon polimerizasyonu yöntemleridir ve aşağıda kısaca özetlenmişlerdir.

2.2.2.1. Halka açılma polimerleşmesi

Hekzaklorosiklotrifosfazen endüstriyel ölçekte, fosfor pentaklorür ile amonyum klorürün klorobenzen gibi organik bir çözücündeki reaksiyonuyla elde edilir. Bu bileşik dikkatlice saflaştırılır. Atmosferik korozyondan iyice izole edilir ve eriyik fazda 210-250 °C aralığında polimerleşmeye bırakılır.¹⁴⁻¹⁵ Polimerleşmenin

fosfordan klor atomunun ayrılması ve bunu takip eden katyonik zincir büyümesi şeklinde gerçekleştiği düşünülmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Trimerin ısıl halka açılma reaksiyonu

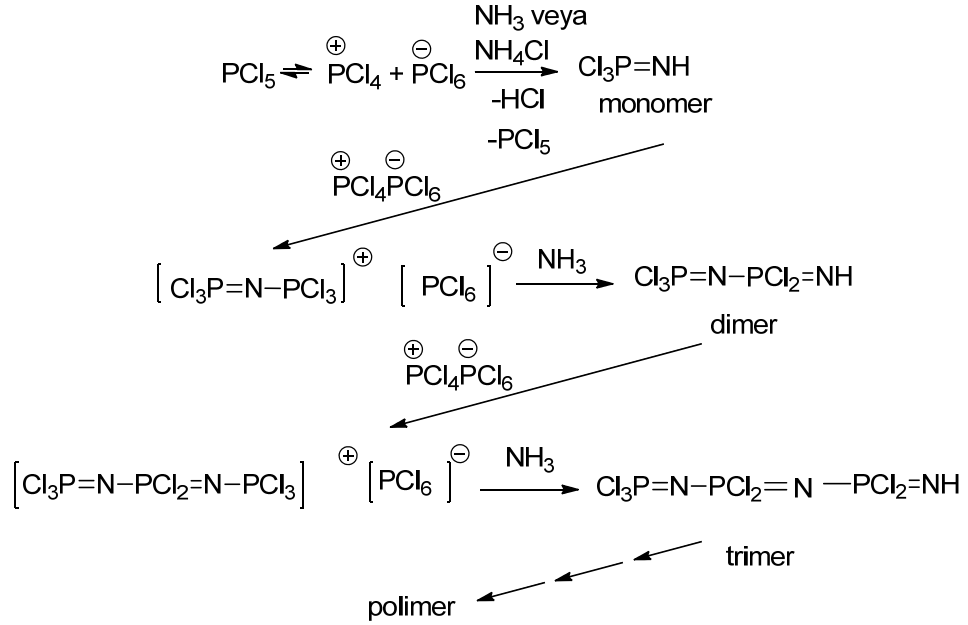
Dolayısıyla burada iki nokta çok önemlidir. Birincisi, polimerleşme işleminin başlaması için yapıdan ayrılacak olan halojen atomlarının halkada bulunması gerekmektedir. Bu nedenle bir, iki veya üç organik yan grup içeren halkalı bileşikler kolaylıkla polimerleşebilirken, altı organik yan grubun bulunduğu trimer bileşiklerinin, halka gerginliği nedeniyle inorganik yapısı kararsız hale gelmedikçe polimerleşemedikleri belirlenmiştir. Halkadaki gerginliğe karbon, sülfür gibi heteroelementlerin veya trans-annüler organik veya organometalik yan grupların yapıda bulunması neden olmaktadır.¹⁶

Birçok spiro-siklotrifosfazen bileşiklerinin ısıtıldıklarında polimerleşmeye karşı direnç gösterdikleri bilinmekle birlikte, eğer halka açılması gerçekleşirse, çapraz bağ içermeyen polimerlerin oluştuğu saptanmıştır.²

2.2.2.2. Kondenzasyon polimerizasyonu ile poli(dikloro fosfazen) sentezi

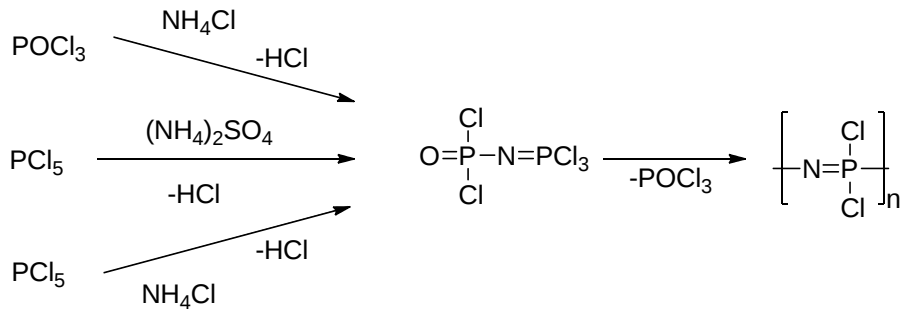
PCl₅ ile amonyakın kondenzasyonu: Fosforpentaklorür ile amonyak (veya amonyum klorür) arasındaki reaksiyon basamaklı bir biçimde ilerler ve hidrojen klorür'ün ortamdan uzaklaştırılmasıyla monomer oluşur. Doğrusal dimer, trimer, tetramer oluşarak reaksiyon ilerler (Şekil 2.5). Dimer oluşumundan sonra reaksiyonun herhangi bir basamağında halkalı klorofosfazen vermek üzere halkalaşma reaksiyonu meydana gelebilir. Pratikte belirli bir zincir uzunluğundan

sonra zincirlerin daha fazla büyümesi daha düşük bir ihtimaldir. Bu işlem nispeten daha düşük moleküler ağırlıklı poli(diklorofosfazen) eldesi için kullanılabilir. ¹⁻²



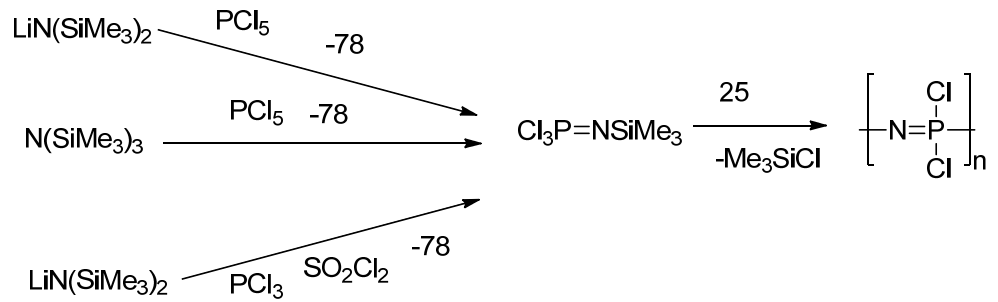
Şekil 2.5. Poli(dikloro fosfazen) oluşum basamakları

OCl₂PN=PCl₃'ün kondenzasyonu: De Jaeger ve arkadaşları OCl₂PN=PCl₃ monomerinin polimerleşmesi üzerine kapsamlı çalışmalar yürütmüştür. ^{1,17} Farklı yöntemlerle hazırladıkları monomerden 240-290 °C arasında ve atmosferik basınçta fosforiklorür, (POCl₃), ayrılması ile poli(diklorofosfazen) hazırlamışlardır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. OCl₂PN=PCl₃ sentezi ve kondenzasyon polimerleşmesi

***N*-Sililfosforanimin'in ($\text{Me}_3\text{SiN}=\text{PCl}_3$) monomerinin yaşıyan katyonik polimerizasyonu:** Poli(dikloro fosfazen) sentezlemek üzere, Allcock ve arkadaşları tarafından geliştirilen en yeni kondenzasyon reaksiyonu; *N*-Sililfosforanimin monomerinin oda sıcaklığında, başlatıcı olarak çok az miktarda lewis asitlerinin kullanıldığı kütle (bulk) veya çözelti polimerleşmesidir.¹⁸ Bu monomer Şekil 2.7'de gösterilen üç farklı yöntemle sentezlenebilmektedir. Bu monomerin polimerleştirilmesiyle elde edilen başlangıç polimerinin heterojenlik indisinin küçük olması ve başlatıcı oranı ile molekül kütlesinin ayarlanabilmesi nedeniyle, araştırma amaçlı birçok çalışma grubu tarafından kullanılmaktadır. Bu çalışmada da polifosfazenlerin sentezleri için bu yöntem kullanılacaktır.

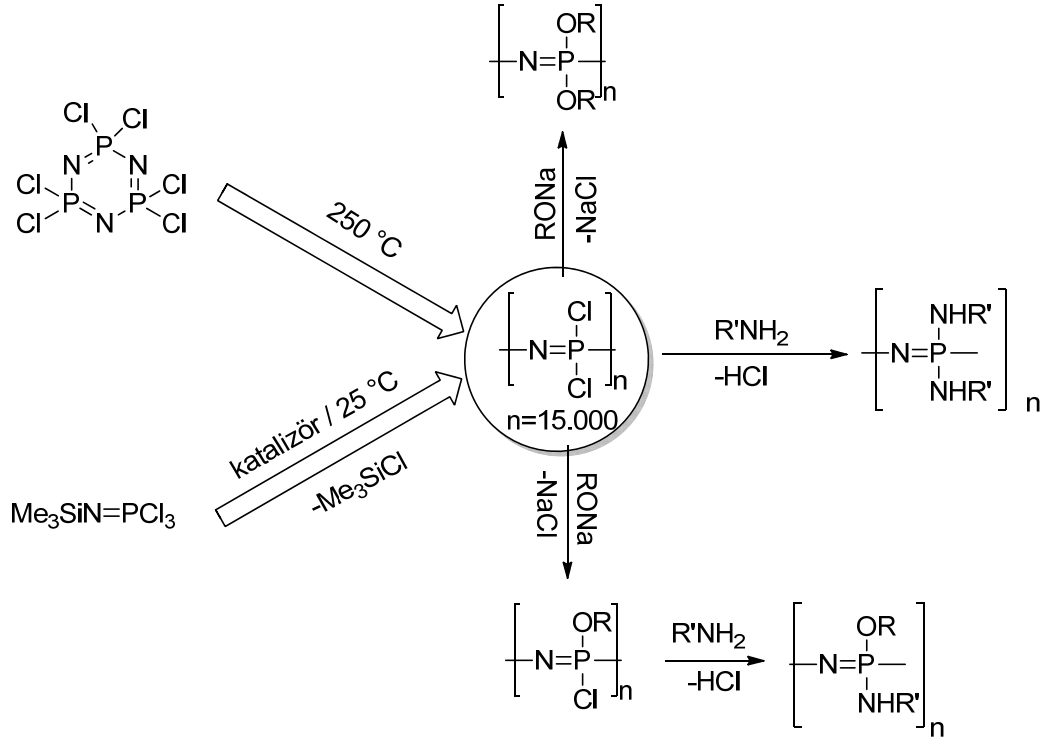


Şekil 2.7. *N*-Sililfosforanimin ($\text{Me}_3\text{SiN}=\text{PCl}_3$) monomerinin sentezi ve polimerizasyonu

2.2.3. Makromoleküler yer değiştirme reaksiyonları:

Polidiklorofosfazen benzen, toluen ya da THF gibi aprotik bir çözücü içerisinde, nükleofiller ile hızla reaksiyona girebilmektedir. Bütün halojen atomlarının organik gruplarla yer değiştirmesi gerekmektedir. Çünkü yapıda kalan klor veya flor atomları polimerin kararsız olmasına neden olmaktadır. Eğer klor grupları ile yer değiştirecek grup trifloroetoksit, n-propiloksit veya metoksietoksietanol'ün sodyum tuzu gibi küçük yapılar ise her bir zincir boyunca bütün halojen atomlarının bu gruplar ile tamamen yer değiştirmesi mümkündür. Fakat gelen nükleofil dietilamin, sodyum-2-feniloksit gibi büyük gruplar ise sterik engellilikten dolayı bütün halojen atomlarının bu nükleofiller ile tamamen yer

değiştiremedikleri bulunmuştur. Bu gruplar genellikle bir halojen atomunun yerine geçebilir, diğer halojen atomları küçük ve daha reaktif olan alkoksit veya amin grupları ile yer değiştirirler ve sonuçta karışık süstitüentli polimerler elde edilir (Şekil 2.8).²



Şekil 2.8. Tek ve karışık süstitüentli polifosfazenler.²

Poliflorofosfazenler, organometalik bileşikler veya Grignard reaktifleri gibi güçlü nükleofiller ile fosfor atomu üzerinden yer değiştirme reaksiyonları verebilirler. Örneğin poli[bis(fenil) fosfazen] sentezlenirken, poli(dikloro fosfazen) kullanıldığında organometalik bileşikler, başlangıç polimeri ana zincirindeki fosfor azot (P=N) bağlarının kırılmasına sebep olur. Bu da polimerleşme derecesini düşürür. Bu nedenle poli(dikloro fosfazen) kullanılabilmesine rağmen bu reaksiyon için daha çok poli(difloro fosfazen) tercih edilmektedir. Flor atomlarının elektronegatifliği fazla olduğu için fosfora bağlı azot atomlarındaki elektronları kendisine çekerek oluşan elektron boşluğunu giderir. Fosfor ile azot arasındaki bağ kuvvetlenir. Dolayısıyla organometalik bileşik bağı kıramaz ve polimerleşme derecesi yüksek olan polimerler elde edilir.¹⁹

2.4. İLETKEN POLİMERLERİN SENTEZİ

Elektrik, elektronik, manyetik ve optik karakterleriyle metal özellikleri gösteren organik malzemeler “İletken Polimer” olarak adlandırılır. “Sentetik Metaller” olarak da bilinen iletken polimerler konjüge yapıya sahiptirler. Bu sayede zincir üzerindeki elektron fazlalığı veya eksikliği küçük bir gerilimle tüm zincir boyunca hareket ederek polimere iletkenlik özelliğini kazandırır. İletken polimerleri metallardan ayıran en önemli özellik ise bu tür malzemelerin iletkenlik değerine müdahale edilebilmesidir. İletkenlik değeri istenilen değerde tutulabilir ya da uygulanan gerilim değiştirilerek yeni bir iletkenlik değeri elde edilebilir.²⁰

İletken polimerler konusundaki ilk çalışmalar anilinin yükseltgenmesi ile başlamış ve sentezlenen polianilin için ilk defa "anilin siyahı" terimi kullanılmıştır.²¹ Birkaç yıl sonra, aromatik aminlerin kimyasal yükseltgenmesi ile polimerler sentezlenmiştir.

Daha sonraki yıllarda sülfirik asit (H_2SO_4) çözeltisinde anilin elektrokimyasal olarak yükseltgenerek platin elektrot üzerinde koyu kahverengi bir polianilin elde edilmiştir.²²

Shirakawa, 1974'te Ziegler-Natta katalizörü kullanarak gümüş renginde ancak yeterince iletken olmayan poliasetilen film sentezlemiştir. 1977 yılında yine Shirakawa, poliasetilen filmlerin iyot, flor veya klor buharlarına tutularak yükseltgendiğinde, iletkenliğini 10^{12} kat arttırarak 10^5 S/cm düzeyine çıktığını gözlemişler ve böylece bu yüksek iletkenlik sayesinde “Plastik Elektronik” devrini başlatmış ve “İletken Polimer” terimi ortaya atılmıştır. Elde edilen iletkenlik değeri, gümüş bakır gibi metallerin iletkenliği olan 10^6 S/cm düzeyine yakındır.²³

Poliasetilen yüksek iletkenlik değerine sahip olmasına karşın oksijen ortamında çabuk bozulduğundan, çalışmalar farklı iletken polimerlerin sentezine kaymış ve bu çalışmalarda özellikle polipirol, politiyofen, polianilin ve benzeri polimerler sentezlenmiştir. Örneğin politiyofen her ne kadar iletkenlik değeri olarak poliasetilenin iletkenlik değerine ulaşamamış olsa da hava ortamında oldukça

dayanıklı ve kararlı bir davranış göstermektedir. Ancak sentezlenen bu tür malzemelerin çözünmemeleri ve bundan dolayı da endüstride kullanım alanlarının sınırlı olması büyük bir dezavantajdır. Bu nedenle özellikle günümüzdeki çalışmalar kararlı, iletken ve çözünür polimerler sentezi üzerinde yoğunlaşmıştır.²⁰ İletken polimerler kimyasal veya elektrokimyasal yöntemlerle sentezlenebilirler. Kimyasal yöntemde tetikleyici madde monomerin bir zincir halkası gibi açılıp bir sonraki halkaya kapanmasını sağlar. Elektrokimyasal yöntemde ise bu tetikleyici maddenin yerini bir potansiyel veya akım değeri alır

2.4.1. Kimyasal Polimerleşme

Kimyasal polimerleşme yöntemi monomerin uygun bir çözücü ve katalizör kullanılarak yükseltegenip indirgenmesiyle oluşan anyon yada katyonların uç uca eklenmesi esasına dayanır. Çok fazla miktarda polimerin üretilmesi amaçlanıyorsa kimyasal polimerleşmenin kullanılması avantajlıdır. Kimyasal polimerizasyonun en önemli dezavantajı ortamdan dolayı meydana gelen kirlilik nedeniyle, polimerin süzülmesi, yıkanması ve kurutulması işlemlerinin zorluğudur.

2.4.2. Elektrokimyasal Polimerleşme

Elektrokimyasal yöntem, iletken polimer sentezinde sıkça kullanılan eski bir yöntemdir günümüzde de değişik tekniklerle uygulanmaktadır. Bu metotta, monomer uygun bir çözücü veya destek elektrolitle beraber polimerleşme hücresine konularak yapılan elektroliz sonucunda, elektrot yüzeyinde veya çözeltide polimer elde edilebilmektedir.²⁰

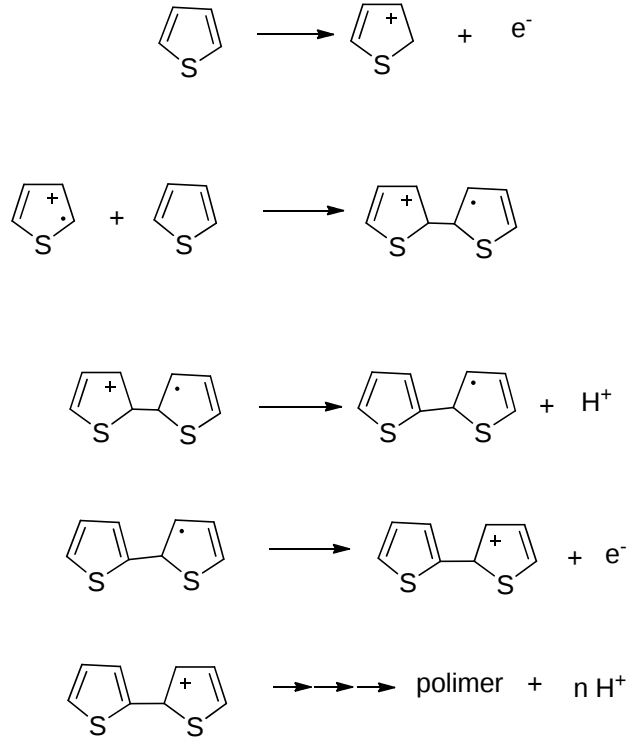
Elektrokimyasal polimerleşmenin diğer yöntemlere göre birçok avantajı vardır: Bu avantajlar şöyle sıralanabilir: (i) Reaksiyonlar oda sıcaklığında gerçekleştirilir, (ii) filmin kalınlığı gerilim ve akımın zamanla değişimi ile kontrol edilebilir ve (iii) polimer filmleri doğrudan doğruya elektrot yüzeyinde elde edilebilir. Böylece elde edilen polimerin ayrıştırılması gibi bir işlem gerekmemektedir, (iv) homojen filmler oluşturmak mümkündür, (v) istenen iyonla polimerin katılanması aynı anda gerçekleşir, (vi) kopolimer elde edilmesi

mümkündür. (vii) herhangi bir çözücünde çözünmeyen iletken polimerlerin, elektrot yüzeyinde film oluşumu sırasında spektroskopik yöntemlerle karakterize edilebilmesi mümkündür.²⁰

Çok sayıda potansiyel uygulama biçimleri vardır. İletken polimerin sentezinde, ortamda bulunan maddelerin çalışma elektrotuna uygulanan potansiyelde elektroaktif olmaması gerekir. Bu koşullar sağlandığında polimerleşme doğrudan monomerin anot ya da katotta vereceği tepkimeler üzerinden kontrollü bir şekilde başlar.²⁴

Sabit akım metodunda ise iki elektrotlu hücre kullanılır ve elektroliz boyunca akım sabit tutulur. Yalnızca anot ve katot arasına doğrudan akım uygulanır. Metot, uygulamada basit olmasına rağmen, bazı dezavantajlara sahiptir. Potansiyel kontrolü olmadığından ortamda monomer dışında bulunan çözücü ve elektrolit gibi maddelerin yükseltgenmesi sonucu istenmeyen ürünler oluşabilmektedir. Ayrıca ortamda oluşan ürünün daha ileri yükseltgenmesi veya indirgenmesi de mümkündür.²⁴

Birçok konjüge polimer elektrokimyasal olarak sentezlenebilir. Uygun bir çözücü elektrolit ortamında monomer optimum bir gerilimde yükseltgenerek anot üzerinde elektropolimerizasyon ile polimer filmi biriktirilebilir (Şekil 2.9).²⁰



Şekil 2.9. Tiyofenin elektrokimyasal olarak polimerleşmesine ait reaksiyon mekanizması

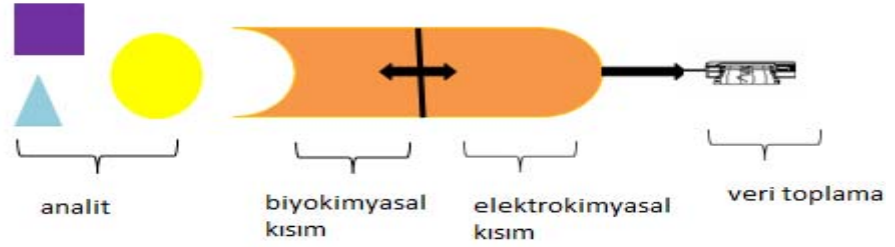
2.5. BİYOSENSÖR UYGULAMALARI

2.5.1. Biyosensörlere Genel Bakış

Genel anlamda biyosensörler, biyoloji, fizik, kimya, biyokimya, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden yararlanılarak ve biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlar olarak tanımlanabilirler. 1960'lı yıllardan sonra hızla gelişen biyosensör teknikleri farklı biyomateryaller de kullanılmasıyla çok sistemli hale gelmiştir.

2.5.2. Biyosensörler ve Bileşenleri

Biyosensörler biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmının görevi analiz edilecek maddeyi tanımdır elektrokimyasal kısmının görevi ise bu tanıma işlemine uygun bir sinyal vererek sonucu ölçülebilir değerlendirilebilir bir hale getirmektir (Şekil 2.10)



Şekil 2.10. Biyosensörün genel şematik gösterimi

2.5.3. Biyoajanlar

Biyoajan bir analitin tanınmasında biyosensörün biyolojik hassasiyete sahip olan kısmıdır. Biyosensörün hassasiyeti ve seçiciliğinde etkilidir. Bu reseptörler tek bir substratı bağlayacak ve diğer substratlara bağlanmayacak özellikte olmalıdır; temel olarak biyoajanlar biyokatalitik ve biyoaffinite olmak üzere 2 grup altında incelenirler.²⁵

2.5.4. Sinyal İleticiler (Transduserler)

Biyolojik ve biyokimyasal sinyalleri veya cevabı belirlenebilir sinyale dönüştürebilen sistemlere transduser denir. Bir substrat için komponentin aktivitesi O_2 tüketimiyle, H_2O_2 oluşumuyla, NADH konsantrasyonundaki değişimle, floresans, absorpsiyon, pH değişimiyle, iletkenlik, sıcaklık ya da kütledeki değişimle izlenebilmektedir.²⁶

Transduserler temelde dört grup altında toplanırlar; elektrokimyasal transduserler (amperometrik, potansiyometrik veya kondüktometrik), optik transduserler, akustik transduserler ve termal transduserler.²⁷

Bu tez çalışmasında amperometrik esaslı bir biyosensör kullanılmıştır.

2.5.5. Biyoaktif Tabakanın Elektrot Yüzeyine İmmobilizasyonu

Genel olarak biyoajanlar uygun bir şekilde immobilizasyonla transdusere bağlanır. İmmobilizasyon metodu immobilize edilecek biyoajanın yapısına göre belirlenir. Kullanılan transdüksiyon elementi ve analitin fiziksel durumu da seçilecek immobilizasyon metodu için önemli faktörlerdir. Genel olarak 4 yaygın immobilizasyon metodu kullanılmaktadır. Bunlar aşağıda açıklanmıştır.

1-Adsorbsiyon: Hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri, van der Waals bağları ve elektron tranzisyon kompleksleri oluşumu sayesinde bağlanma gerçekleşir. Kararlılığı az olduğundan biyosensörlerde pek tercih edilmeyen bir immobilizasyon metodudur.

2-Tutuklama: Biyomolekülü içeren çözelti içinde polimerik jel hazırlandığı zaman jelin donmasıyla biyomolekül jel matriks içinde tutuklanmış olur. Poliakrilamid, nişasta, naylon ve silastik jel biyomoleküllerin tutuklanması için biyosensörlerde kullanılabilir.

Bu tez çalışmasında yukarıda bahsedilen polifosfazen tutuklama için kullanılmıştır.

3-Çapraz bağlama: Glutaraldehit, heksametilen di-izosiyanat, 1,5-difloro, 2,4 nitrobenzen ve bis-diazobenzidin-2,2-disülfonik asit gibi bifonksiyonel ve multifonksiyonel reaktiflerin kullanılmasıyla biyomoleküllerin intermoleküler çapraz bağlanması sağlanır. Bu reaktifler, katı desteklere biyomolekülleri bağlayabilirler. Bu nedenle de biyosensörlerde sık kullanılan immobilizasyon yöntemlerinden biridir.

4-Kovalent bağlama: Enzimde katalitik aktivite için gerekli olmayan fonksiyonel grupların bağlanması yoluyla gerçekleştirilir. Genellikle proteinlerin aminoasit yan zincirlerinde bulunan amino, karboksil, imidazol, tiyol, hidroksil gibi nükleofilik fonksiyonel gruplarla kovalent bağlama yapılır.²⁸

2.5.6.Enzim Biyosensörleri

Enzimler kimyasal tepkimelere katıldıklarında birçok ölçülebilir reaksiyon ürünü meydana getirdiklerinden, (proton, elektron, ışık ve ısı gibi) biyoreseptör olarak kullanılan popüler biyomoleküllerdir.²⁹ Biyosensör hazırlamada enzimleri kullanmak spesifiklik bakımından avantajlı ancak saf enzimin pahalı oluşu da dezavantajlıdır.

Bilinen enzimlerin yanı sıra bilinmeyenlerin potansiyel varlığı, piyasada yüzlerce ticari enzim preparatının bulunabilirliği ve bu sayının her geçen gün yükselmesi enzim sensörlerinin tartışılmaz üstünlüğünün devam edeceğinin bir göstergesidir.³⁰

2.5.6.1.Enzimler

Enzimler, organizmada hemen hemen bütün kimyasal tepkimelere katılarak, tepkimeyi hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Başka bir deyişle, enerji açısından normal koşullarda hiç gerçekleşmeyecek ya da çok yavaş gerçekleşebilecek kimyasal tepkimelere katılarak, kendileri bir değişikliğe uğramadan, bu tepkimelerin çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlarlar. Kuramsal olarak bir enzim belli bir tepkimeye girip bir değişikliğe uğramadan çıktığı için, sürekli olarak aynı türden tepkimelere katılabilmelidir. Ancak gerçekte durum böyle değildir, çünkü enzimlerin de bir ömrü vardır.³¹

Enzimlerin en önemli özelliklerinden birincisi, katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifik olmalarıdır. Bundan dolayı enzimler hücre içinde reaksiyonların hatasız ve hiçbir yan ürün oluşturmadan yürümelerini sağlarlar. İkincisi ise laboratuvar şartlarında gerçekleşmesi çok zaman alan ve birçok basamağa ihtiyaç duyan, bazen de yüksek sıcaklık, yüksek basınç, aşırı bazik ve asidik ortam gerektiren reaksiyonların, enzimler sayesinde hücre içi şartlarda çok kısa bir zamanda meydana gelmesini sağlayan katalizleme güçleridir.³²

İnsanlar gerçekte binlerce yıl öncesinden bu yana enzimlerden yararlanmışlardır. Örneğin; alkol fermantasyonu, bira ve ekmek yapımı gibi işlemler ilk biyoteknolojik çalışmalar olarak tanımlanabilir. Buna karşılık enzimler hakkında bilimsel denebilecek araştırma ve bulgular ancak geçtiğimiz yüzyılda görülmeye başlanmıştır. 1783 yılında Spallanzani'nin atmaca mide suyunun eti çözebileceğini bulması, 1811 yılında Kırchoff'un buğday nişastasının zamanla dekstrin ve diğer bileşiklerine dönüştüğünü belirlemesi enzimoloji konusundaki ilk çalışmalar olarak gösterilebilir.³⁰

Enzimlerin Yapısı: Enzimler protein yapılı maddelerdir ve her enzimde proteini oluşturan aminoasitlerin sayısı, dizilişi ve moleküllerin konformasyonu belirli bir düzen içindedir.

Enzimlerde ısıya dayanıksız protein kısma 'apoenzim' adı verilir. Enzim bu durumda inaktif haldedir. Bazı enzimler yalnızca protein yapısıyla aktivite sağlarken, bazı enzimlerin aktif hale geçebilmeleri için protein yapıda olmayan bir aktivatöre ihtiyacı vardır. Apoenzimi aktive eden ve protein yapıda olmayan bu yapılara 'prostetik grup' denir. Prostetik grup bir metal iyonu ise 'kofaktör' , ısıya dayanıklı organik bir bileşik ise 'koenzim' olarak adlandırılır. Oluşan apoenzim-kofaktör bütününe 'haloenzim' denir. Apoenzim, enzimin hangi substrata etki edeceğini belirler. Kofaktör ve koenzim ise enzimi aktive eder. Bu prostetik grupların gerekliliği, enzimin verimliliği ve sürekli proseslerde kullanımı için oldukça önemlidir. Klinik vakaların büyük bir kısmı enzimlerin işlevini gerçekleştirmemesinden veya koenzimlerin yetersiz ya da işlevsiz oluşundan kaynaklanmaktadır. Örnek olarak A vitamini görme tepkimelerini katalizleyen enzimin parçası olduğundan, yokluğunda ya da eksikliğinde gece körlüğü ortaya çıkar.³³

1959 yılında Koshland, indüklenmiş uyum modeliyle anahtar-kilit teorisine katkıda bulunmuştur. Bu teori, enzimin aktif alanının sert, katı (rigid) bir yapıda olduğunu reddeder. Enzim, substrata bağlandığında bir uyum elde etmek için bazı yapısal değişiklikler gösterir. Buda enzimin aktif alanının esnek bir yapıda olduğunu kanıtlar.³⁴

Günümüzde enzimler, “International Union of Biochemists (IUB)” tarafından altı ana fonksiyonel sınıfa ayrılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre enzimler, sırasıyla tepkime türü, spesifik tepkime, substrat veya substratları niteleyen dört basamaklı bir numara ile tanımlanır.^{33a}



Şekil 2.11. Enzim substrat kompleksi

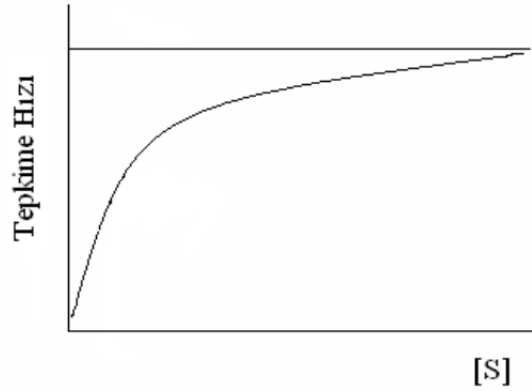
Enzimlerin Katalitik Özellikleri: Enzimler, inorganik katalizörlerle karşılaştırıldıklarında, enzim molekülünün belirli bir bölgesinde belirli aminoasitlerin oluşturduğu bir kısım bulunur. Enzimin katalitik aktiviteden sorumlu olan bu kısmına ‘aktif bölge’ denir.^{33a}

Enzimler, hücrede bulunan substratı değişikliğe uğratarak ürüne dönüştürürler. Dolayısıyla ortamda substrat konsantrasyonu azalması konsantrasyonunun artması enzimin aktivitesini gösterir. Enzimlerin katalitik aktiviteleri, katalizledikleri tepkimenin hızı saptanarak belirlenir ve enzim aktivitesi enzim birimi olarak ifade edilir. Enzim birimi International Unit (IU) olarak bilinmektedir ve standart koşullarda 1 dakikada 1 μmol substratın ürüne dönüşmesi için gerekli olan enzim miktarıdır.³⁵

Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler: Enzimle katalize edilen bir tepkimede rol oynayan başlıca faktörler; (i) enzim konsantrasyonu, (ii) substrat konsantrasyonu, (iii) sıcaklık, (iv) pH, (v) inhibitör etkisi ve (vi) reaksiyon ürünü şeklinde sıralanır.

Enzim Konsantrasyonu: Ortamda yeteri kadar substrat varsa enzimatik reaksiyonun hızı enzim konsantrasyonu ile doğrusal olarak artar.

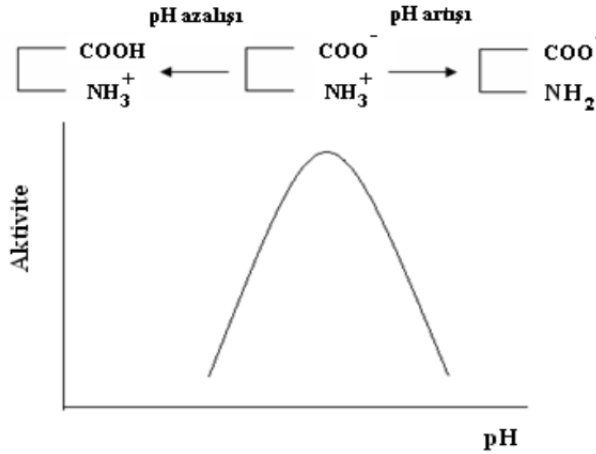
Substrat Konsantrasyonu: Belirli bir miktarda enzim bulunduran reaksiyonun hızı, substrat konsantrasyonuna bağlı olarak artar. Enzim reaksiyonu bu durumda birinci dereceden bir kinetik gösterir. Başlangıçta bu artış doğrusal olarak devam ederken, bir süre sonra substrat konsantrasyonu ne kadar artırılırsa artırılınsın enzim aktivitesinde bir değişiklik gözlenmez. Böyle bir durumda enzim substrata karşı doymuş demektir. Bu durumda ise enzim reaksiyonu sıfırıncı dereceden bir kinetik gösterir. Bu noktada enzim tepkime hızı, maksimum hıza (V_{max}) ulaşmıştır (Şekil 2.12). Enzim moleküllerinin yarısı enzim-substrat kompleksi halinde iken yani yarısı çalışırken gözlenen tepkime hızı, maksimum tepkime hızının yarısıdır. Bu maksimum hızın yarısını veren substrat konsantrasyonuna Michaelis-Menten sabiti (K_M) denir. Bir enzimin K_M değeri, enzimin substrata olan afinitesini (ilgisini) gösterir. Enzimin substrata olan ilgisi yüksekse K_M değeri küçüktür^{33c}



Şekil 2.12. Substrat konsantrasyonunun tepkime hızına etkisi.

Sıcaklık: Birçok kimyasal reaksiyona benzer şekilde, enzim-kataliz reaksiyonlarının hızı da sıcaklıkla birlikte artar. Sıcaklığın her 10 °C artmasına karşılık enzim reaksiyonu bir kat daha hızlanır. Ancak, belli bir sıcaklık değerine ulaşıldığında enzim molekülleri yapısal bazı değişikliklere uğrar ve reaksiyon ya yavaşlar ya da tamamen durur. Hayvansal kaynaklı enzimler genel olarak 40–50 °C arasında optimum sıcaklığa, enzimin en iyi çalıştığı sıcaklığa, erişirken, bitkisel kaynaklı enzimler 50–60 °C’de optimum sıcaklığa erişir. Bu sıcaklıkların üstünde enzim aktivitesi azalma gösterir. Bu durumun sebebi, enzimin protein yapısının ısıya bağlı olarak denatüre olmasıdır.^{33b,c,36}

pH: Enzimlerin katalitik olayları pH'ya bağımlıdır. Enzimler protein yapıları maddeler olduklarından amin ve karboksil grupları ortamın pH derecesine göre az veya çok miktarda iyonlaşırlar. Meydana gelen bu iyonlaşmalar enzimin sekonder (ikincil) ve tersiyer (üçüncül) yapılarının kararlılığını etkiler. Dolayısıyla enzimin aktif bölgesinde bir değişim meydana gelir. Bunun sebebi, enzimlerin yalnızca belirli pH aralığında aktivite göstermeleridir. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'ya o enzimin optimum pH'sı denir (Şekil 2.13). Optimum pH'nın her iki tarafında da enzim reaksiyonu yavaşlamaktadır. Bu sebeple enzim çalışmalarında pH'yı optimumda tutmak için tamponlar kullanılmaktadır. Birçok enzim çan eğrisi şeklinde bir pH-aktivite grafiği verir. Grafikte negatif ve pozitif yükler arasında aktivitenin maksimum olduğu değer optimum pH'yı verir. Enzimin optimum pH' sınır tahmini için, enzimin aktif bölgesinin karakteristiği bilinmelidir. Fakat bu oldukça zordur. Bu yüzden optimum pH genellikle deneysel olarak belirlenir.^{33c,36-37}



Şekil 2.13. pH'nın enzim aktivitesine etkisi.

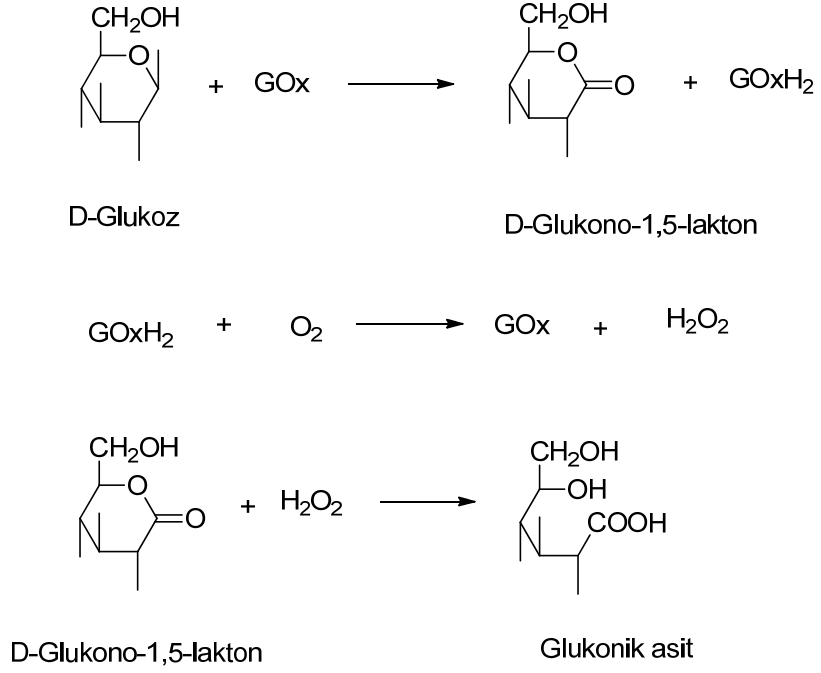
Inhibitör Etkisi: Tepkime ortamında bulunduklarında, enzimatik tepkimenin hızını yavaşlatan maddelere 'inhibitör' denir. İnhibitörler tersinir ve tersinmez olarak ikiye ayrılır. Tersinmez inhibitörler, enzim molekülünün konformasyonunu değiştirerek veya enzimin aktif bölgesine doğrudan bağlanarak, aktif bölgeyi tamamen bozarlar. Bu maddeler enzimin etkinliğini tümüyle yok ederler. Tersinir inhibitörler ise, enzimle ara bileşik oluştururlar ve Michaelis-Menten sabitini ya da maksimum tepkime hızını azaltıcı etki yaparlar.³⁸

Reaksiyon Ürünü: Ürün konsantrasyonunun giderek artması, belirli konsantrasyon değerlerinden sonra geriye dönük bir kontrol mekanizmasıyla reaksiyonun durdurulmasına neden olduğundan tepkime hızını düşürücü işlev görür.

Glukoz Oksidaz Enziminin Özellikleri Ve Glukoz Tayininin Önemi: Glukoz oksidaz, moleküler kütlesi ve kaynağına bağlı olarak 120 kDa ile 290 kDa arasında çeşitlilik gösteren, dimerik veya tetramerik bir proteindir. Kaynağına ve türüne bağlı olarak enzim molekülü %10-24 aralığında değişim gösteren karbonhidrat bileşimine sahiptir. Karbonhidrat birimlerinin yaklaşık %80'ini mannoz birimi oluşturur. Mannoza Asparagin (Asn), Treonin (Thr) ve Serin (Ser) artıkları üzerinden N ve O atomlarına bağlıdır.³⁹

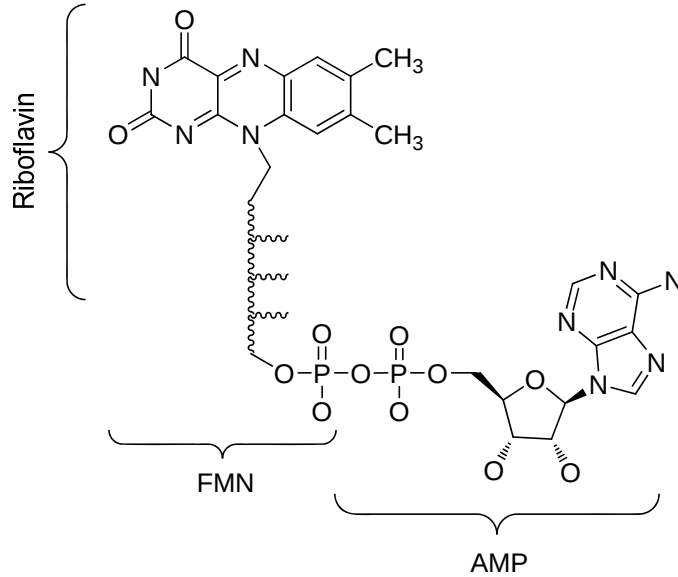
Glukoz oksidaz (GOx) enziminin aktivitesi ilk defa 1904 de Maksimow tarafından *Aspergillus niger*'de saptanmıştır. Enzimin oksidatif etkisi olduğunu belirleyen Müller (1928), saflaştırılan enzimin sahip olduğu sarı rengin, bünyesindeki prostetik gruptan (flavin adenin dinükleotid, FAD) kaynaklandığını öne sürmüştür. Keilin ve Hartree (1948) oksidasyonun FAD tarafından gerçekleştirildiğini; enzimin açığa çıkardığı H₂O₂ ile antimikrobiyal aktivite gösterip antibiyotik olarak davrandığını belirlemişlerdir.⁴⁰

GOx'nin glukozu glukonik aside oksitlediği reaksiyon Şekil 2.14'de görülmektedir. Reaksiyon flavoenzimin önce indirgendiği ve sonra da yükseltgenmesinin meydana geldiği iki basamak üzerinden yürür. İndirgenme yarı basamağında glukoz 2 proton ve elektronu enzime aktararak glukonolaktone dönüşür. Yükseltgenme yarı basamağında ise enzim moleküler oksijen ile yükseltgenir ve hidrojen peroksit oluşur.⁴¹



Şekil 2.14. Glukoz oksidazın katalizlediği reaksiyon

Şekil 2.14’de verilen tepkime Glukoz oksidaz enziminin bünyesinde bulunan FAD grubu üzerinden yürümektedir. Şekil 2.15’de FAD molekülünün kimyasal yapısı verilmiştir.^{11b}



Şekil 2.15. Glukoz oksidaz enziminin yapısında bulunan FAD grubu

FAD'nin indirgenme özelliği riboflavin molekülünün indirgenmesi esasına dayanır. FAD elektron akseptörü olarak davranarak glukozu yükseltir; ardından moleküler oksijeni indirgeyerek hidrojen perokside dönüştürür ve kendisi tekrar oksitlenmiş formuna dönüşür^{11b}

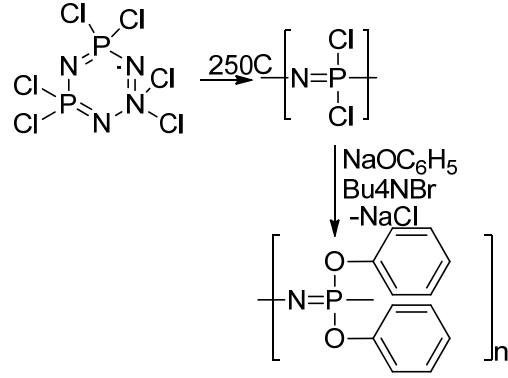
Glukoz oksidaz, glukoz tayininde analitik reaktif olarak, özellikle enzim elektrot uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Başta vücut sıvılarında olmak üzere, içeceklerde ve diğer bazı gıdasal ürünlerde, glukoz tayini glukoz enzim elektrotları kullanılarak yapılmaktadır^{14a}.

2.7. POLİFOSFAZENLERİN BİYOSENSÖR OLARAK KULLANIMI

İnorganik ana zincire sahip polimerler, üstün özelliklerinden ötürü geçtiğimiz yıllarda büyük ilgi toplamıştır. Her bir yinelenen birime iki tane farklı yan grubun takılabildiği polifosfazenler de, bu özelliklerinde dolayı diğer inorganik polimerlere göre özel bir yere sahiptirler. Yan gruplardaki bu esneklik, farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip polifosfazenlerin sentezine imkan sağlamaktadır.¹⁻²

Polifosfazenlerin bu özelliği, sentezlenen farklı mimarideki bu malzemelerin çok farklı uygulama alanlarında kullanılmasına imkan sağlamıştır. Bunlardan bir tanesi de biyomedikal uygulamalar olup konuyla ilgili çeşitli derlemeler ulaşmak mümkündür.⁴² Fakat bu zamana kadar yapılan enzim immobilizasyonları çalışmalarında, polifosfazen kullanılarak yapılan çalışmalarının sayısı oldukça az sayıdadır ve aşağıda özetlenmiştir:

Glukoz-6-Fosfat dehidrojenez ve tripsin enzimlerinin poli(difenoksifosfazen) ile immobilizasyonu: Bu çalışmada glukoz-6-dehidrojenez ve tripsin enzimlerinin alümina yüzeyine ince bir film olarak kaplanmış poli(difenoksi fosfazen)'de immobilizasyonu araştırılmıştır. Bu bağlamda ilk olarak poli(diklorofosfazen) den başlanarak polidifenoksifosfazen sentezlenmiştir.(Şekil 2.16).⁴³



Şekil 2.16. Poli(difenoksifosfazen) sentezi

Glutarik dialdehit eşliğinde, maksimum immobilizasyon oranı glukoz-6-fosfat için %8-10 ve tripsin için %50-60 bulunmuştur. Her ikisi için de enzim aktivitelerinin birçok döngü sonrasında korunduğu bulunmuştur. Bu enzimlerin, polifosfazen kaplanmamış alümina yüzeyinden kolayca yıkanıp atıldığı da belirlenmiştir. Ayrıca immobilizasyon sonucunda enzimlerin, çözelti içerisinde muhafaza edilen serbest enzimden çok daha uzun bir süre saklanabileceği de rapor edilmiştir

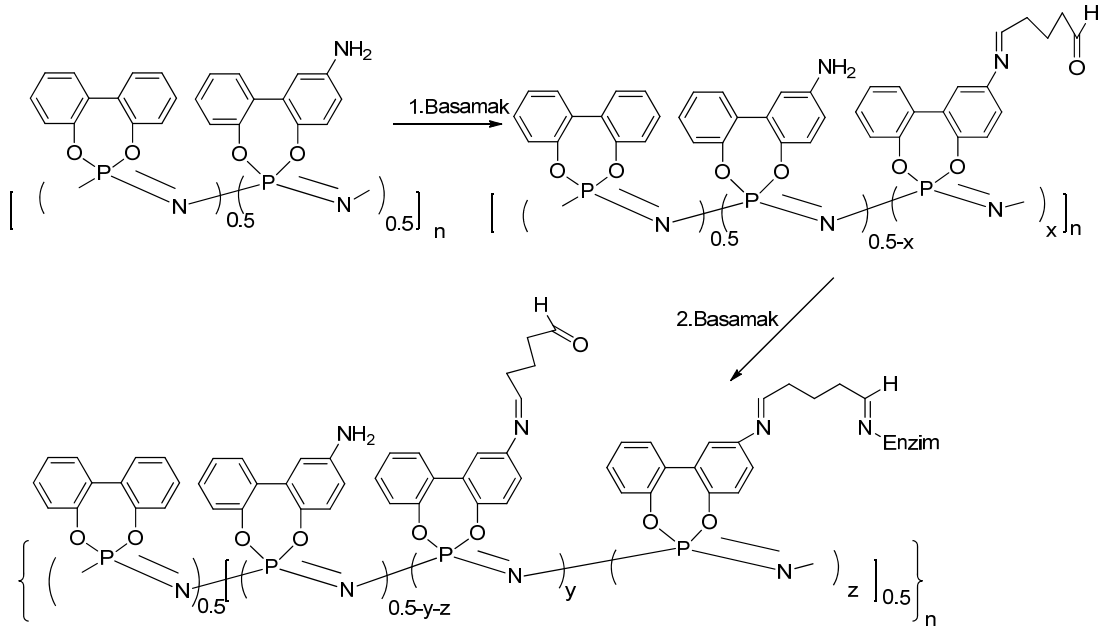
Biyolojik aktif maddelerin polifosfazen taşıyıcılara immobilizasyonu:

Matsuki⁴⁴ tarafından yapılmış bu patent çalışmasında, enzim, antibadi ve reaktif olmayan hidrofilik grupların üzerinde uygun fonksiyonel gruplar barındıran polifosfazenler ile bağlanabileceği ve bu polimerlerin potansiyel platform olarak kullanılabileceğine dikkat çekilmiştir. Örneğin NaOCH₂CH₂NH₂ ile aktifleştirilmiş poli[bis(trifloroetoksi) fosfazen] [NP(OCH₂CF₃)] yüzeyinde immobilizasyon sonucunda yüksek invertaz aktivitesi elde edilmiştir.

Üre aminohidrolazın poli[bis(metoksietoksi) fosfazen] jellerinde

tutuklanması: Bu çalışmada poli[bis(metoksietoksi) fosfazen] ve üre enzimi pH=7'de sulu çözeltide homojen olarak karıştırılmış ve çözücü uzaklaştırıldıktan sonra ⁶⁰Co γ -ışınlarına maruz bırakılmıştır. Bu şekilde üre enzimi çapraz bağlanmış matris içerisinde hapsedilmiştir. Daha sonra bu malzemeden alınan örnekler su içerisinde şişirilip hidrojeller elde edilse de enzim aktivitelerinin birkaç döngü sonrasında azaldığı rapor edilmiştir.⁴⁵

Alkol dehidrojenaz ve lipaz enzimlerinin polifosfazen platformunda immobilizasyonu: Üzerinde amin grubu barındıran polifosfazen $\text{NP}[\text{O}_2\text{C}_{12}\text{H}_{7,5}(\text{NH}_2)_{0,5}]_n$ sentezlenmiş ve alol dehidrojenaz ve lipaz enzimleri bu platforma kovalent olarak bağlanmış ve biyokatalizör özellikleri incelenmiştir. Hazırlanan sistemin hem sulu hem de organik çözücü ortamlarında kullanım potansiyeli savunulmuştur. Özellikle alkol dehidrojenaz sisteminin sulu çözeltilerde keton çözeltilerinin seçici indirgenmelerinde kullanılan diğer ticari katalizör kadar etkili çalıştığı ve üç ay saklama sonrasında bile ciddi bir aktivite kaybı olmadığı rapor edilmiştir. Ayrıca bu şekilde hazırlanan lipaz enzim sisteminin organik çözücülerde kinetik çözünürlüğünün serbest enzimden daha iyi olduğu da belirtilmiştir.⁴⁶



Baeyer-Villiger monooksijenaz enziminin polifosfazen platformunda immobilizasyonu: Yine Cueto tarafından yapılan başka bir çalışmada Baeyer-Villiger monooksijenaz enzimi yine yukarıdaki şekilde verilen polifosfazene kovalent olarak bağlanarak biyokatalizör hazırlanmıştır. Immobilizasyon sonucunda bu sistemin serbest monooksijenaz ile benzer seçicilik gösterdiği bulunmuş olsada döngü kararlılığının geliştirilme gerekliliği vurgulanmıştır.⁴⁷

2.8. ARAŞTIRMA MOTİVASYONU

Bu araştırmada ilk defa iletken bir polimer ve suyu seven bir polifosfazen eşliğinde glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bugüne kadar polifosfazenlerle ilgili yapılmış ve yukarıda özetlenmiş az sayıdaki çalışmada iletken polimer kullanımına rastlanmamıştır. Buna ek olarak kullanılan polifosfazenler genelde aromatik ve suyu sevmeyen örneklerden seçilmiştir. Su ile etkileşen tek polifosfazen örneğinde ise çalışılan enzim hazırlanan polifosfazen jel içerisinde fiziksel olarak hapsedilmiş ve dolayısıyla uzun vadeli bir enzim aktivitesi elde edilememiştir.⁴⁵

Bu çalışmada, iletken polimer amperometrik ölçümlerde elektron transferini geliştirme görevi olsa da üzerinde barındırdığı amin grupları ile de enzimin kovalent olarak bağlanmasını sağlamaktadır. Buna ek olarak hem enzim ile kovalent bağ oluşturabilecek hem de sulu ortamda şişip genişleyebilecek yeni bir polifosfazen yapısı tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Bu polimer mimarisindeki amaç, enzimin hem kovalent olarak immobilizasyonu hem de hedeflenen sistemin sulu ortamda şişerek fiziksel olarak enzimin serbest ortamına benzer bir ortamda daha serbest çalışmasını sağlamak olmuştur. Bu hedef doğrultusunda yapılan çalışmalar ve sonuçları sonraki bölümlerde detaylı olarak verilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 KİMYASALLAR VE CİHAZLAR

Aspergillus niger'den elde edilen glukoz oksidaz (β -D-glukoz: oksijen 1-oksidoredüktaz, EC 1.1.3.4, 17,300 birim/g), D-glukoz (% 99.5, Sigma-Aldrich), asetonitril (ACN, % 99,8, Sigma-Aldrich), glutaraldehit (Sigma-Aldrich) ve tetrabütilamonyum heksaflorofosfat (TBAPF₆, %99, Sigma-Aldrich) alındığı gibi kullanıldı.

Polifosfazen sentezinde bütün reaksiyonlar kuru azot atmosferinde vakum altında Schlenkline tekniği ile gerçekleştirildi. Tetrahidrofuran (THF,% 99,0, Merck), toluen (% 99,8, Sigma-Aldrich) ve pentan (% 99,0, Merck), kullanımdan önce sodyum benzofenon ketil üzerinde damıtılmıştır. Sodyum hidrit (NaH, mineral yağ içinde % 60 dispersiyon Sigma-Aldrich), fazlası petrol eteri (kaynama aralığı 40-60 °C, Merck), ile yıkanmış, kurutulmuş ve kuru argon gazı altında Glove-box içinde saklandı. Fosfor pentaklorür (PCl₅,% 99,0, Merck), süblimleştirildi ve Glove-box da saklandı. 3-Hidroksibenzaldehit (% 97, Sigma-Aldrich) argon gazı altında Glove-Box'da saklandı. Dietilen glikol metil eter (% 98,0, Merck), aktive edilmiş moleküler elekler (4A tipi) içinde muhafaza edildi ve daha fazla arıtılmadan kullanıldı.

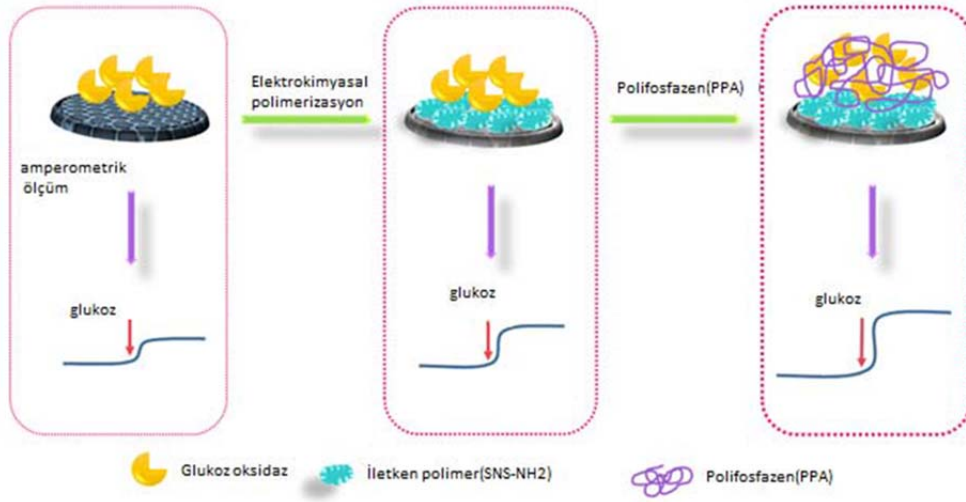
Amperometrik çalışmalar ve siklik voltametri ölçümleri için, Palm Enstrüman potansiyostat (PalmSens, Houten, Hollanda) kullanıldı.

Tüm elektrokimyasal ölçümlerde çalışma elektrodu olarak grafit elektrot (Ringsdorff Werke GmbH, Bonn, Almanya, tip RW001, 3,05 mm çapında ve 13% gözenekli), karşıt elektrot olarak platin elektrot, referans elektrot olarak Ag / AgCl elektrot (AgCl ile doymuş 3 M KCl) (Metrohm, İsviçre) kullanıldı. Amperometrik analizlerde, ölçüm sonuçları üç ölçümün ortalaması olarak verildi ve standart sapmalar $\pm$ SD olarak kaydedildi. Bütün ölçümler oda koşullarında (25°C) gerçekleştirildi. Yüzey görüntüleme çalışmaları için taramalı elektron mikroskobu (SEM), JEOL JSM-6400 modeli kullanıldı.

NMR spektrumları, Bruker Spectrospin Avance DPX-400 spektrometre ve Bruker Biospin Ultrashield TM 300 MHz spektrometre kullanılarak ölçüldü. Spektrumlarda çözücü olarak $CDCl_3$ ve standart referans olarak tetrametilsilan (TMS) kullanıldı. Polimerlerin molekül ağırlıkları ve moleküler ağırlık dağılımları (GPC) jel geçirgenlik kromatografisi, Viscotek TDA Maks (Malvern Instruments) ile tespit edildi kolon polistiren standartları ile kalibre edildi. Akış hızı tetrahidrofur içinde 1 mL/dak idi. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ile polimerin camsı geçiş sıcaklığı (T_g) ve polimerin temel geçişleri belirlendi. DSC termogramları, kuru azot atmosferi altında, $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $+150\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasında 10 K/dakikalık bir ısıtma oranında bir Perkin Elmer elmas, diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) kullanılarak kaydedildi. İkinci ısıtma çalışması camsı geçiş sıcaklığı (T_g) belirlenmesi için kullanılmıştır. Polimer ve polimer elektrolit FT-IR spektrumları, Varian 1000 FTIR spektrometre ile ölçülmüştür.

3.2.SENTEZLENEN MALZEMELER

Bu çalışmada grafit elektroda glukoz oksidaz (GOx) enziminin immobilizasyonu için bir iletken polimer 4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)benzenamin (poli(SNS-NH₂)) ve esnek hidrofilik polifosfazen polimer, poli[(metoksietoksi)etoksi-ko-3-formilfenoksi] fosfazen (PPA) sentezlendi. (GOx) kovalent bağlama immobilizasyon tekniği ile polimer içeren transduser yüzeyine tutuklandı. Amperometrik ölçümler sırasında elektron transferini artırmak için iletken polimer poli(SNS-NH₂) kullanıldı; bunun yanı sıra polifosfazendeki aldehit gruplarının olmasıyla da biyosensörün kararlılığı ve duyarlılığı desteklendi. Ayrıca suda çözünebilen PPA polimeri ile enzim molekülleri arasında daha iyi bir etkileşim sağlandı böylece kolay ve verimli bir immobilizasyon gerçekleşti. Immobilizasyon sırasında enzim molekülleri polifosfazen jeline hapsedildi polimer de bulunan aldehit grupları ile enzimde bulunan amin grupları kovalent bağ ile birbirine tutundu kararlı ve etkili bir immobilizasyon gerçekleşti. Yapılan biyosensör optimize edildi ve karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Önerilen biyosensör glukoz miktarı bilinen bazı içecekler için uygulandı referans değerlere yakın sonuçlar bulundu.



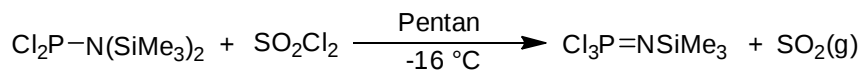
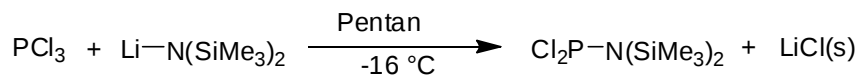
Şekil 3.1. Glukoz biyosensör hazırlanması

3.2.1.SNS-NH2 Monomerinin Sentezi

4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il) (SNS-NH2) monomeri literatüre göre sentezlenmiştir.⁴⁸ 1,4-di(2-tienil)-1,4-butandion ile başlanarak ve propiyonik asit varlığında, benzen-1,4-diamin ile tepkime gerçekleştirilmiş, kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Ürün, açık sarı bir katı olarak elde edilmiştir.

3.2.2. Trikloro(trimetilsilil)fosforimin (Monomer) Sentezi

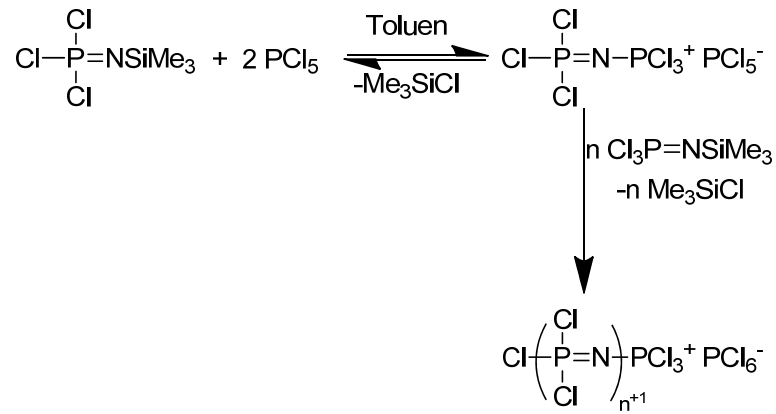
Trikloro(trimetilsilil)fosforimin bir kapta ticari olarak temin edilebilen reaktif maddeler kullanılarak sentezlendi. Lityum bis(trimetilsilil)amit, bir deney kabında tartıldı ve daha sonra bir buz + tuz karışımı içine batırıldı pentan ile çözüldü ve sıcaklık, sentezin sonuna kadar muhafaza edildi. Yeni damıtılmış fosfor triklorür (PCl_3) çözeltiye damla damla eklendi. (Şekil 3.2). Elde edilen çözeltiye sülfürlü klorür (SO_2Cl_2) de damla damla ilave edildi ve yarım saat karıştırıldı. Oluşan tuzu ortadan kaldırmak için selit üzerinde süzüldü. Çözücü inert ortamda uzaklaştırıldı.



Şekil 3.2. Trikloro(trimetilsilil)fosforimin sentezi

3.2.3 Poli(dikloro fosfazen) Sentezi

Polimerizasyon Allcock ve çalışma arkadaşları tarafından detaylı olarak araştırılmıştır. Polimerizasyona sıcaklık, monomer konsantrasyonu, başlatıcı oranı, kullanılacak çözelti gibi çeşitli parametrelerin etkisini incelemişler. Bu çalışmaya göre PCl_5 polimerizasyon başlatıcısı olarak seçilmiş, monomer başlatıcı oranı 350:1 ve başlatıcı konsantrasyonu 0,027 mol/L'dir. Polimerizasyon toluen içerisinde gerçekleştirilmiş poli(dikloro fosfazen) elde edilmiştir.(Şekil 3.3).

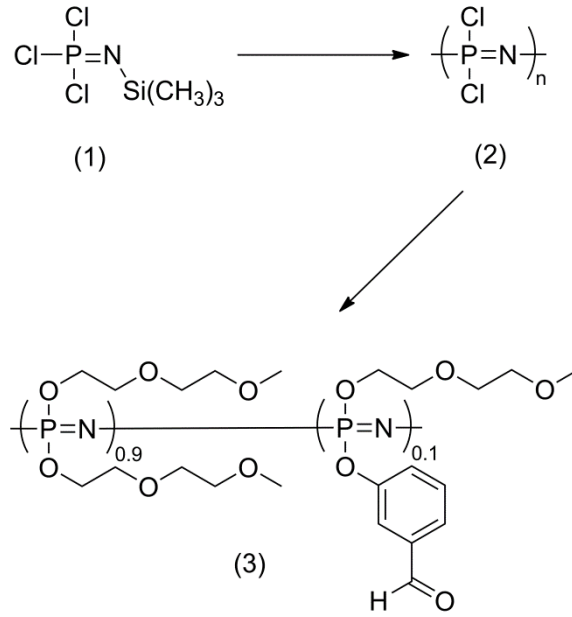


Şekil 3.3. Oda sıcaklığında yaşayan katyonik polimerizasyon ile PCl_5 katalizörlüğünde poli(dikloro fosfazen) sentezi.

3.2.3. Poli[(metoksietoksi)etoksi-ko-3-formilfenoksi] fosfazen Sentezi

3-Hidroksi-benzaldehit (0,437 g, 3,59 mmol), 10 mL THF içinde çözülmüş ve NaH 5 mL THF içindeki bir süspansiyonu (0,086g, 3,59 mmol) buz banyosunda yavaş yavaş 250 mL yuvarlak tabanlı üç boyunlu şişeye ilave edilmiştir. Daha sonra karışım, reaksiyonun tamamlandığından emin olmak için, oda sıcaklığında yarım saat süre ile karıştırılmıştır. Bu çözeltiye 40 mL THF içinde bulunan poli (dikloro fosfaze) (4,15 g, 35,85 mmol) ilave edilmiş ve reaksiyon karışımı, 6 saat boyunca reflux edilmiş ve sonrasında oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. 65 ml THF içindeki NaH(1.96 g, 81.7 mmol) dispersiyonu üzerine dietilen glikol metil eter (10,3 g, 88,5 mmol) buz banyosu eşliğinde yavaş yavaş eklenmiş ve şeffaf bir çözelti elde edene kadar (30 dakika) refluks edilerek sodyum tuzu hazırlanmıştır. Bu çözelti daha

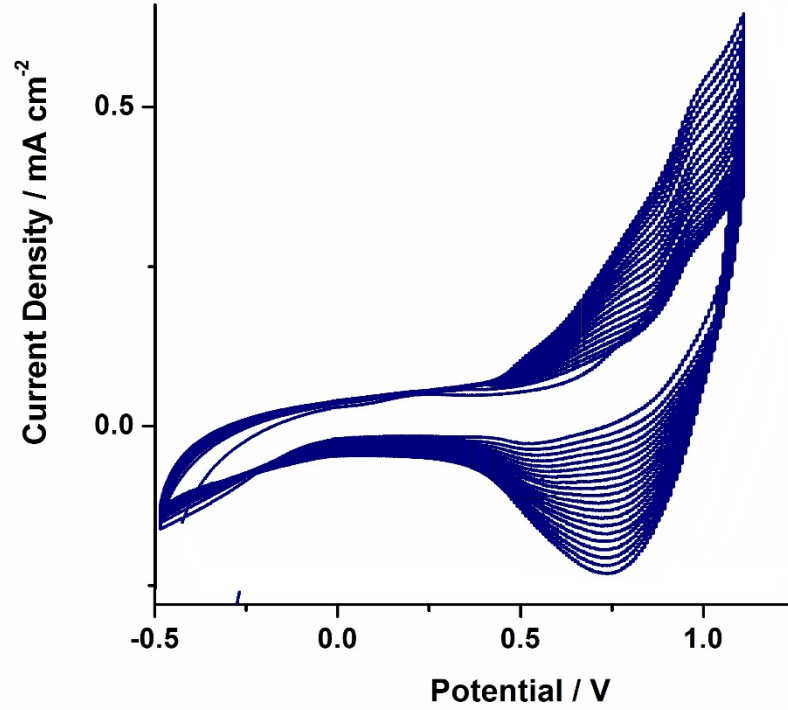
sonra yavaş yavaş reaksiyon karışımına ilave edilmiş ve 18 saat daha refluksa devam edilmiştir. Elde edilen çözelti iki gün suda iki gün 0.1 M NaOH çözeltisinde sonra bir gün tekrar suda diyaliz işlemine sokuldu. Çözelti filtre edildi ve çözücü vakum altında uzaklaştırıldı. Elde edilen polimer THF içinde çözöldü petrol eter içinde çöktüröldü ve sabit bir ağırlık elde edilene kadar, en az iki gün boyunca yüksek vakum altında kurutuldu.



Şekil 3.4. Poli[(metoksietoksi)etoksi-ko-3-formilfenoksi] fosfazen'in sentezi

3.2.4. Poli(SNS-NH₂)/PPA/GOx Biosensor hazırlanması

İletken polimer, poli(SNS-NH₂), elektrokimyasal polimerizasyon yöntemi ile daha önce zımparalanmış ve temizlenmiş grafit elektrotlar üzerinde sentezlenmiştir. Polimer döngüsel voltametre ile 0,1 M NaClO₄/LiClO₄/ACN elektrolit/çözücü içerisinde elektrot üzerine -0,5V ve +1.2V arasında 40 döngü yaptırıldı. Polimerizasyondan sonra polimer kaplı elektrot yüzeyi organik safsızlıklardan kurtulmak için deiyonize su ile yıkandı. Polimerizasyonun ilk 20 döngüsü Şekil 3.5'de gösterilmiştir.

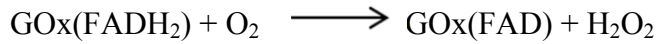
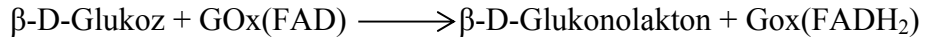


Şekil 3.5. SNS-NH₂'nin grafit üzerinde 100 mVs⁻¹ tarama hızında elektrot yüzeyine 0,1 M NaClO₄/LiClO₄/ACN elektrolit-çözücü sisteminde polimerleşmesinin döngüsel voltamogramı (20 döngü).

GOx'ın immobilizasyonu için, önce PPA saf suda çözünerek 91,5mg/mL PPA çözeltisi hazırlanmış, berrak bir çözelti elde etmek için 15 dakika ultrasonik banyoda tutulmuştur. PPA çözeltisi 50 mM fosfat tamponu ile 1:1 oranında seyreltilmiştir. Bu çözelti her bir immobilizasyondan önce taze olarak hazırlanmıştır. GOx'ın immobilizasyonu için 5,0 µL PPA çözeltisi GOx çözeltisi (5,0 µL içerisinde 2,60 mg 45,0 U GOx, 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7.0)) ile vial içerisinde karıştırılmış ve 5.0 µL 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içinde %1.0'lik glutaraldehit çözeltisi eşliğinde, poli(SNS-NH₂) kaplı grafit elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Hazırlanan elektrot, çözücünün uzaklaşması için oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Enzim elektrot, serbest enzim ve çapraz bağlayıcı ajandan kurtulmak için saf su ile yıkanmıştır. Elektrotlar bir gece boyunca 4 °C'de bir buzdolabında muhafaza edilmiştir. Çözeltiler, biyosensörlerin hazırlanmasının öncesinde taze hazırlanmıştır.

3.2.5. Elektrokimyasal Ölçümler

Amperometrik ölçümler, içerisinde 10 mL 50 mM sodyum asetat tamponu bulunan bir hücrede gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan biyosensör hücre içerisinde hafifçe karıştırılmış ve ölçümler sabit bir potansiyel altında (-0.7 V'da Ag/AgCl'ye karşı) yapılmıştır. Akım denge durumuna ulaştığında substrat çözeltisi (glukoz) uygun miktarda hücre içerisine yavaşça enjekte edilmiş ve akım değişimi takip edilmiştir. Bu reaksiyonda, β -D-glukoz asit ilk olarak glukonolaktone yükseltgenmekte ve sonrasında glukonik asite hidroliz olmaktadır. Aynı zamanda, oksijen, hidrojen peroksit oluşturmak için tüketilir.⁴⁹



Belirlenen potansiyelde, oksijen tüketimi takip edilmiş ve biyosensörün aktivitesini gösteren amperometrik ölçümlerle ilişkilendirilmiştir. Hücrede kullanılan tampon çözeltisi her ölçümden sonra yenilenmiş ve biyosensör her ölçümden sonra saf su ile yıkanmıştır. Stok glukoz çözeltisi tampon çözelti içerisinde hazırlanmış ve ölçümden sonra karanlıkta ve buzdolabında saklanmıştır.

3.2.6. Örnek Uygulama

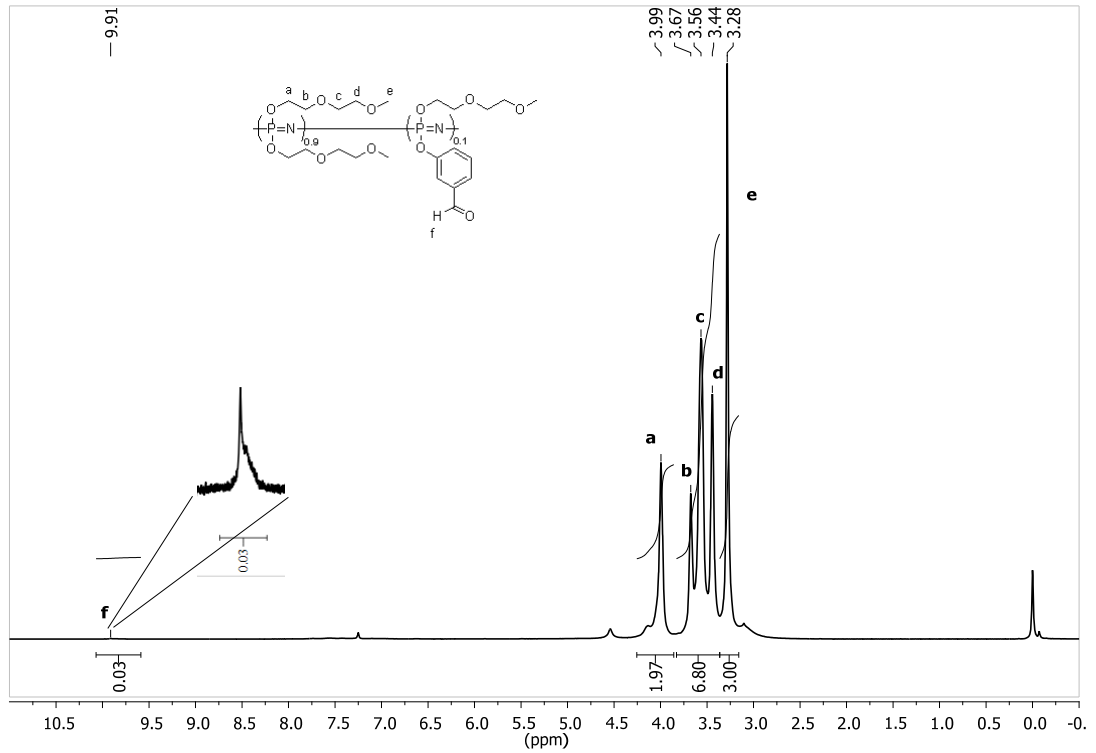
Biyosensör çeşitli içeceklerin glukoz miktarını test etmek için kullanılmıştır. Kullanılan içeceklere herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Test esnasında daha önce bahsettiğimiz hücre içerisine glukoz yerine ölçümü yapılacak içecekten enjekte edilmiş, sabit bir potansiyel uygulanarak grafikler takip edilmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir. Glukoz için bir kalibrasyon eğrisi çizilerek glukoz miktarları hesaplanmıştır. Aynı örnekler, glukoz ölçümü için ticari enzim kitleri (HUMAN 10260, Glucose Liquicolor, Wiesbaden, Germany) kullanarak da test edilmiştir. Enzim kiti GOx-PAP yöntemine göre glukoz oksidaz, peroksidaz, fenol ve 4-aminofenazon'u da içermektedir. Kolorimetrik test, glukozun glukoz oksidaz eşliğinde enzimatik oksitlenmesine bağlıdır. Hidrojen peroksit (ürün), peroksidaz

eşliğinde fenol ve 4 aminofenazon ile tepkimeye girerek kinonimine renk indikatörü sayesinde kırmızı-menekşe renk vermektedir.⁵⁰

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. POLİFOSFAZENİN(PPA) KARAKTERİZASYONU

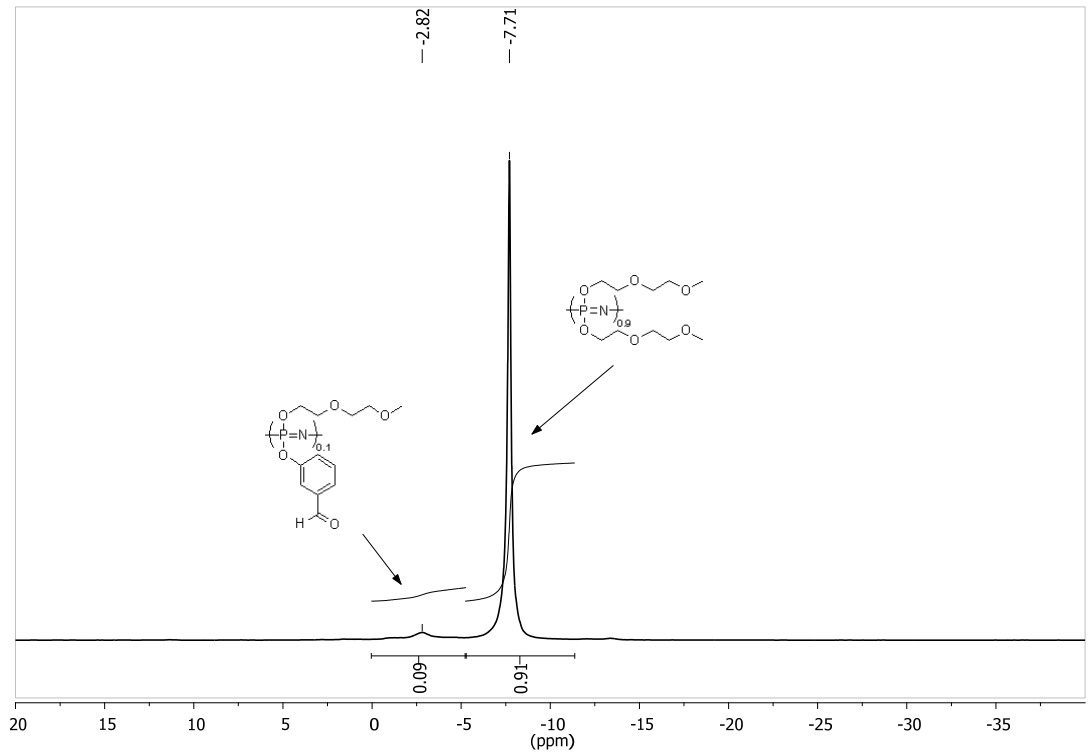
Polimerin NMR, FT-IR, DSC ve de GPC ile incelenmiştir. Hedeflenen polimer yapısındaki oligoeter yan gruplar suda çözünürlüğü garanti ederken, az miktarda bulunan aldehit grupları da enzim ile kimyasal etkileşimi sağlamıştır. ^1H NMR spektrumunda, beklendiği üzere başlıca oligoeter yan grubun karakteristik sinyalleri gözlenmiş, 3-formilfenoksi yan grubunun sinyalleri oldukça zayıf görünmektedir (Şekil 4.1). ^1H NMR’da metil gruplarının 3.28 ppm’de, aldehit gruplarının ise 9.9 ppm’de sinyal verdiği görüldü ve bu iki grup arasındaki istatistiksel oran (metil/aldehit=30), NMR sinyallerinin integrasyonu ile belirlemiştir.



Şekil 4.1. Poli[(metoksietoksi)etoksi-ko-3-formilfenoksi] fosfazen’in CDCl_3 içerisindeki ^1H NMR spektrumu.

Proton NMR sinyalleri, sentezlenmiş polifosfazen yapısı hakkında fikir veriyor olsa da ^{31}P NMR sonuçları hedeflenen polimerin yapısı, yan grupların bağlanma düzeni ve daha da önemlisi makromoleküler yerdeğiştirme tepkimelerinin

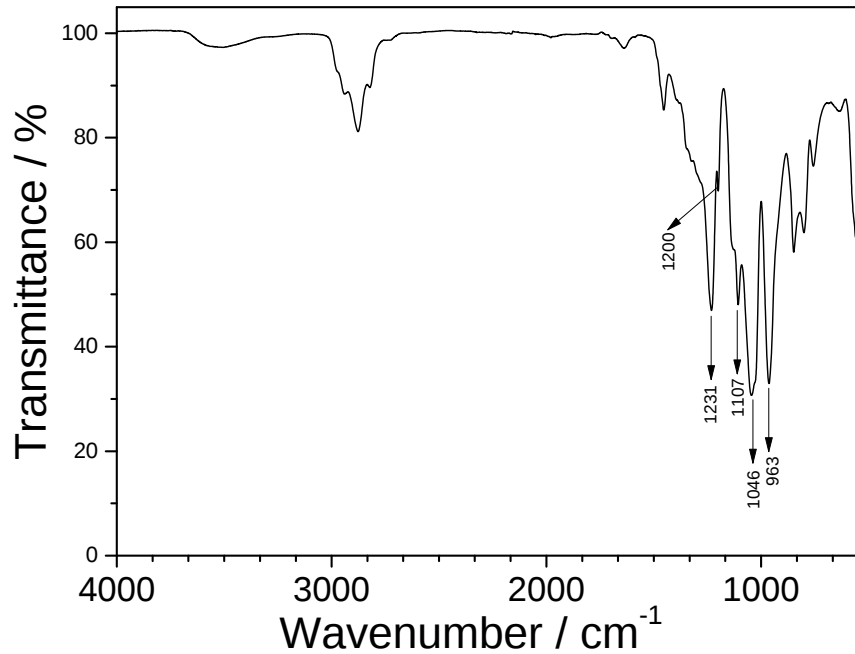
tamamlanıp tamamlanmadığı konularında çok daha faydalı bilgiler içermektedir (Şekil 4.2). Öncelikle, başlangıç polimerine ait olan -18 ppm'deki sinyalin tamamen kaybolması bütün klor atomlarının anazincirden ayrıldığını göstermektedir. Buna ilaveten beklendiği üzere yaklaşık -2,82 ppm ve -7,71 ppm'de iki yeni fosfor sinyali ortaya çıkmıştır. Fosfor NMR'ında görünen büyük sinyal tamamen oligoeter yan grupları bağlanmış fosfor atomlarına ait olup,^{2a} beklendiği üzere çok daha küçük görünen -2,82 ppm'deki sinyal ise iki farklı yan grup içeren fosfor atomlarına atanmıştır. Tekrarlanan birimlerin oranı bu iki sinyalin integrasyon değerlerinden yola çıkılarak 0,91/0,09 olarak hesaplanmış ve bu değer hedeflenen polimerin istatistiksel olarak olması gereken 0,90/0,10 oranına çok yakın bulunmuştur.



Şekil 4.2. Poli[(metoksietoksi)etoksi-ko-3-formilfenoksi] fosfazen'in CDCl_3 içerisindeki ^{31}P NMR spektrumu.

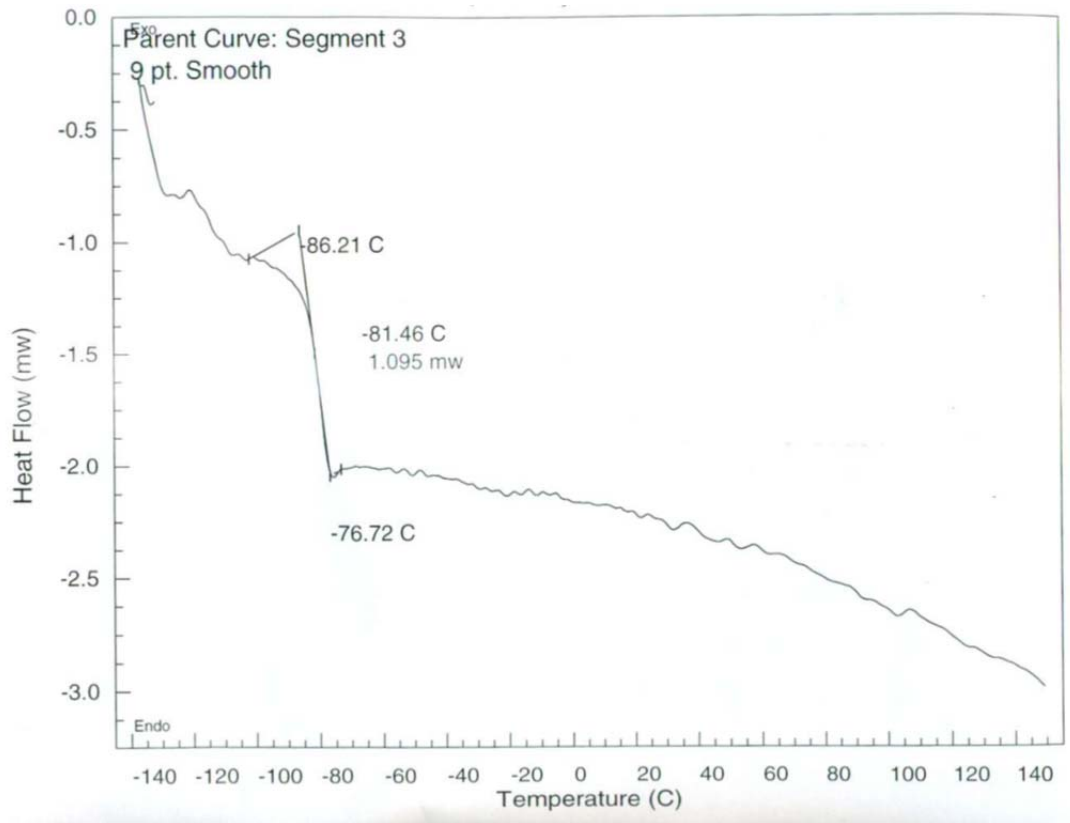
Sentezlenen polifosfazenlerin sayı ve ağırlık ortalama molekül kütleleri GPC ile polistrene bağlı olarak hesaplanmıştır. Yaşayan katyonik polimerizasyon yöntemiyle sentezlenen ve monomer:başlatıcı oranı 350:1 olarak ayarlanan polimerleşme sonrasında polimer zincirlerinin dar bir dağılıma sahip olması ve her bir zincirin istatistiksel olarak (her iki başlatıcı ancak bir zincir oluşturduğundan) 700

yenilenen birim içermesi beklenmektedir. Bu varsayıma göre mol kütesinin yaklaşık olarak 2×10^5 D olması beklense de GPC ölçümleri sonucu çok daha yüksek bir mol kütesi tahmin edilmiştir (6×10^5 D). Polifosfazenlerde, gerçek mol kütesi değerinin istatistiksel orandan çok daha yüksek çıktığı bilinmektedir. Bu durum ya polimerleşme esnasında başlatıcının belirli bir kısmının aktifliğini yitirmesi (bu durumda zincir başına başlatıcı oranı düşeceğinden mol kütesi artar) ya da makromoleküler yer değiştirme tepkimeleri sırasında genellikle su vb. reaktif safsızlıklardan dolayı ziincirlerin çapraz bağlanmasından (ki bu durumda da hem mol kütesi hem de heterojenlik indisi artar) kaynaklanabilmektedir. GPC ölçümleri sonucunda heteojenlik indisinin 1,06 gibi oldukça düşük bir değer olarak ölçülmesinden dolayı, yukarıdaki açıklamalardan sadece birincisinin mevcut durum için geçerli olacağı düşünülebilir. Elde edilen polimerin, THF, dioksan ve kloroform gibi genel organik çözücülerde ve suda tamamen çözünmesi bu öngörüğü ayrıca desteklemektedir.



Şekil 4.3. Poli[(metoksietoksi)etoksi-ko-3-formilfenoksi] fosfazen'in kızılötesi spektrumu.

Yapı, aynı zamanda kızılötesi spektrumla da doğrulanmıştır (Şekil 4.3). 1231 cm^{-1} 'deki sinyal, P=N gerilmesi yüksek mol kütleli polifosfazenin varlığına işaret etmektedir. 1200 cm^{-1} ve 1046 cm^{-1} 'de görünen sinyallerde beklendiği üzere P-O-C yapısına atanmıştır. Oligoeter yan grupların varlığı ise 1107 cm^{-1} 'de görünen güçlü C-O-C gerilme sinyallerine atanmıştır. 3-formil fenoksi yan grubu oranı oldukça düşük olduğundan, aldehit grupları için 1700 cm^{-1} civarında beklenen sinyal, 1640 cm^{-1} civarında gelen geniş oligoeter sinyalinin yanında küçük de olsa kendini göstermektedir.



Şekil 4.4. Poli[(metoksietoksi)etoksi-ko-3-formilfenoksi] fosfazen'in DSC termogramı

Polimerin termal özellikleri ayrıca DSC kullanılarak incelenmiştir. Beklendiği üzere, polimerin termogramında herhangi bir kristallenme gözlenmemiştir. Polimerin T_g değeri, -81,5 °C olarak belirlenmiş ve bu değer sadece oligoeter yan grup içeren polifosfazen türevinin literatürde verilen T_g değerine çok yakın bir değerdir.^{2a}

4.2. BİYOSENSÖRDE OPTİMİZASYON ÇALIŞMALARI

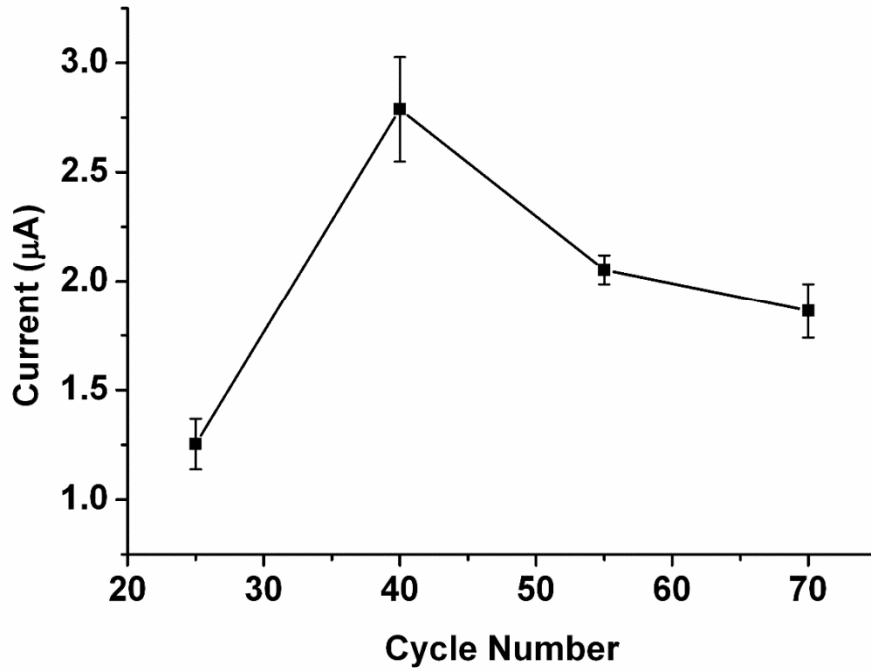
Bir biyosensör uzun vadede kullanıma yönelik tasarlanmış olup gerçek örnek uygulamalar için kararlı ve tekrar üretilebilir olmalıdır. Böyle bir biyosensör elde etmek için biyosensörün performansını etkileyen tüm koşullar (PPA miktarı, poli(SNS-NH₂) filminin kalınlığı, glutaraldehit miktarı, pH değeri) optimize edilmelidir. Bu nedenle, biyosensör aktivitesini etkileyen bütün parametreler optimize edilmiş ve ölçümler esnasında sabit tutulmuştur.

Özellikle enzim bazlı biyosensörlerde, immobilizasyon matrisi yani enzimin tutuklanacağı ajanın biyosensörün kalitesi ve performansı açılarından önemli bir yere sahiptir. İyi tasarlanmış bir matris onun hapsedtiği enzimlerin üç boyutlu yapısını koruyarak biyosensörün raf ömrünü uzatabilir. İletken polimerler, enzimi canlı tutabildikleri ve aynı zamanda transduser yüzeyinde sabitleyebildiklerinden bu bağlamda ideal adaylardır.⁵¹

Bu çalışmada, kovalent bağlanma ve hapsederek hareketsiz kılma teknikleri bir arada kullanılmıştır. Bir destek malzemesinin enzimle çok fazla kovalent bağ yapması, biyomolekülün doğal konformasyonunun tersizmez olarak değişmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle, kovalent bağ immobilizasyonunda enzimin tutuklanacağı malzemeyi seçmek nispeten zor olabilir. Membran benzeri malzemeler, hem biyomolekülleri elektrod yüzeyinde tutmalı hem de substratın kolay hareket ederek enzimin aktif bölgelerine ulaşabilmesine imkan sağlamalıdır. Her iki tekniğinde artıları ve eksileri vardır. Ancak uygun bir şekilde kombinasyon halinde bunların kullanılmalarının ayrı ayrı kullanıldıkları yöntemlere göre daha verimli sonuç üreteceği düşünülmüştür.

Enzimin, amino fonksiyonel grupları içeren poli(SNS-NH₂) iletken polimerinin yüzeyine bağlanması ve uygun yönlenmesini sağlamak için, polimer kalınlığı optimize edilmiştir. Bu olay, elektropolimerizasyon esnasında gerçekleşmiştir. Döngü sayısı, polimer yüzeyindeki yük sayısını dolayısıyla polimer filminin kalınlığını belirlemektedir. Optimum kalınlığı belirlemek için, diğer parametreler sabit tutulurken, poli(SNS-NH₂) grafit elektrot yüzeyine 25, 40, 55 ve

70 döngü yaptırılarak polimerleştirilmiştir (Şekil 4.5). Aynı miktarda glukozu karşı biyosensördeki yanıtları kaydedilmiş ve karşılaştırılmıştır. En yüksek biyosensör performansı, 40 döngüde elde edilen elektrotta sağlanmıştır. Bu durum, polimer filminin kalınlaşmasından dolayı yüzeyde artan amino grup sayısından kaynaklanan aşırı kovalent bağlanma sonucu aktivitenin düşmesi şeklinde açıklanabilir. Bunun tam tersine, polimer filmi beklenenden daha ince olduğunda ise immobilizasyon tam anlamıyla gerçekleşmediğinden, enzim aktivitesi yine düşük çıktığı düşünülmektedir. Sonuç olarak, 40 döngünün elektropolimerizasyonda optimum şartları sağladığı belirlenmiştir. Bu durumda elde edilen filmlerin kalınlığı 64,0 nm'ye (2.80 mC şarj eşdeğeri) karşılık gelmektedir ve bundan sonraki çalışmalara bu şartlar kullanılarak devam edilmiştir.

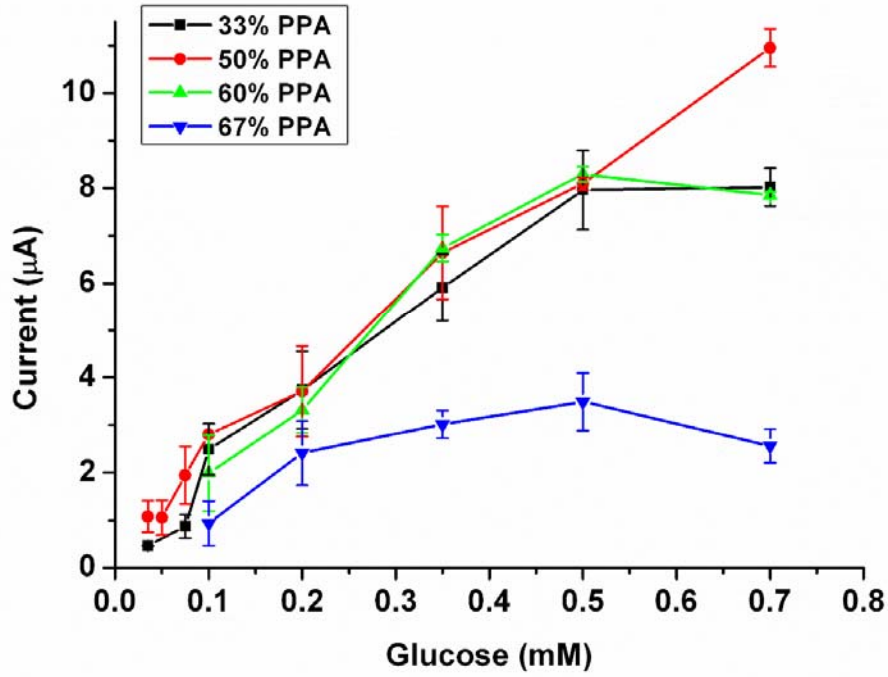


Şekil 4.5. Poli(SNS-NH₂) kalınlığının biyosensöre etkisi (pH = 5,5, 50 mM sodyum asetat tamponu, 25 °C, -0,7 V, [Glucose]: 0,7 mM). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir.

Enzim immobilizasyonunu daha etkili hale getirmek amacıyla bir polifosfazen türevi olan poli [(metoksietoksi) etoksi-*ko*-3-formilfenoksi] fosfazen (PPA), iletken polimer ile birlikte kullanılmıştır. PPA sahip olduğu serbest aldehit

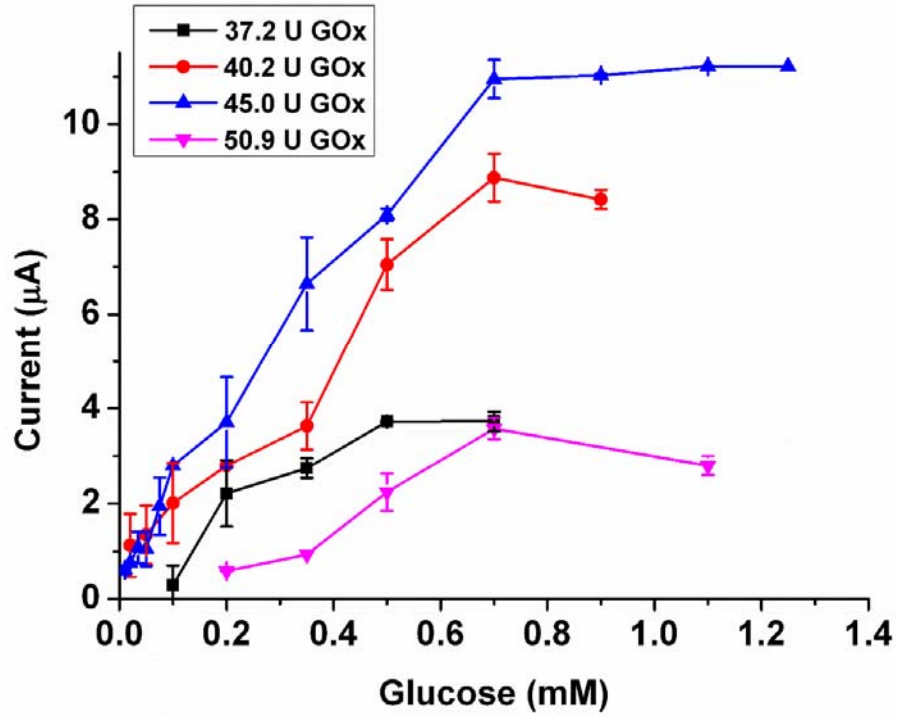
gruplarıyla ve suda çözünebilme özelliğiyle immobilizasyon için ideal bir polimer olabileceği düşünülmüştür. Suda kolayca çözünmesi enzim ile yüzeye kolay kombine edilmesi için bir avantaj olmuştur. Ayrıca enzim ile polifosfazenin aynı fazda homojen olarak karışması, yüzeye kolayca uygulanmasını sağlamıştır. Yüzeyindeki suyun buharlaşmasıyla enzim ile polimer arasında oluşan bağ enzimin yüzeyde uzun süre kalmasına ve yapı içerisindeki gözeneklerin enzimin polimer içinde kolay hareket etmesini sağlamıştır. Ayrıca, sentezlenmiş Polifosfazen de serbest aldehit grupları bulunmaktadır ve enzimde bulunan amin grupları ile polifosfazende bulunan aldehit grupları imin bağları oluşturur.⁵² Bu nedenle immobilizasyon kovalent bağ ile desteklenmektedir.

Biyosensörden en yüksek sinyalleri alabilmek için enzim ile karıştırılacak PPA miktarı optimize edilmiştir. Elektrot yüzeyi poli(SNS-NH₂) ile kaplandıktan sonra farklı miktarlarda PPA içeren elektrotlar hazırlanmıştır. 9,51 mg/mL PPA çözeltisi 50 mM fosfat tamponu (pH 7.0) ile 0,5:1, 1:1, 1,5:1, 2:1 oranlarında seyreltilmiştir. Bu şekilde % 33, 50, 60, 67 oranlarında PPA tampon çözeltileri elde edilmiştir. Bu çözeltilerden 5 µL alınıp 45.0 U GOx ile karıştırılmış ve immobilizasyonda kullanılmıştır. Farklı glukoz konsantrasyonları için kaydedilen biyosensör yanıtları Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Burada polifosfazenin biyosensör duyarlılığına oldukça yüksek bir katkı sağladığı görülmektedir. Ancak PPA oranları karşılaştırıldığında ilk üç oran için pek fark olmadığı tespit edilmiştir. % 50 PPA içeren biyosensörde diğerlerine göre daha yüksek sinyaller alınmış ve daha düşük glukoz konsantrasyonlarında bile tayin yapmanın mümkün olduğu bulunmuştur. Fazla çapraz bağlanma sonucu enzimin oldukça sıkı immobilizasyonundan kaynaklandığı düşünülen % 67 PPA içeren biyosensör daha düşük sinyal vermiştir. Bunun sebebinin, bu şartlardaki difüzyon ve muhtemel denatürasyon problemlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonuç olarak, % 50 PPA miktarı ideal PPA miktarı olarak belirlenmiştir.



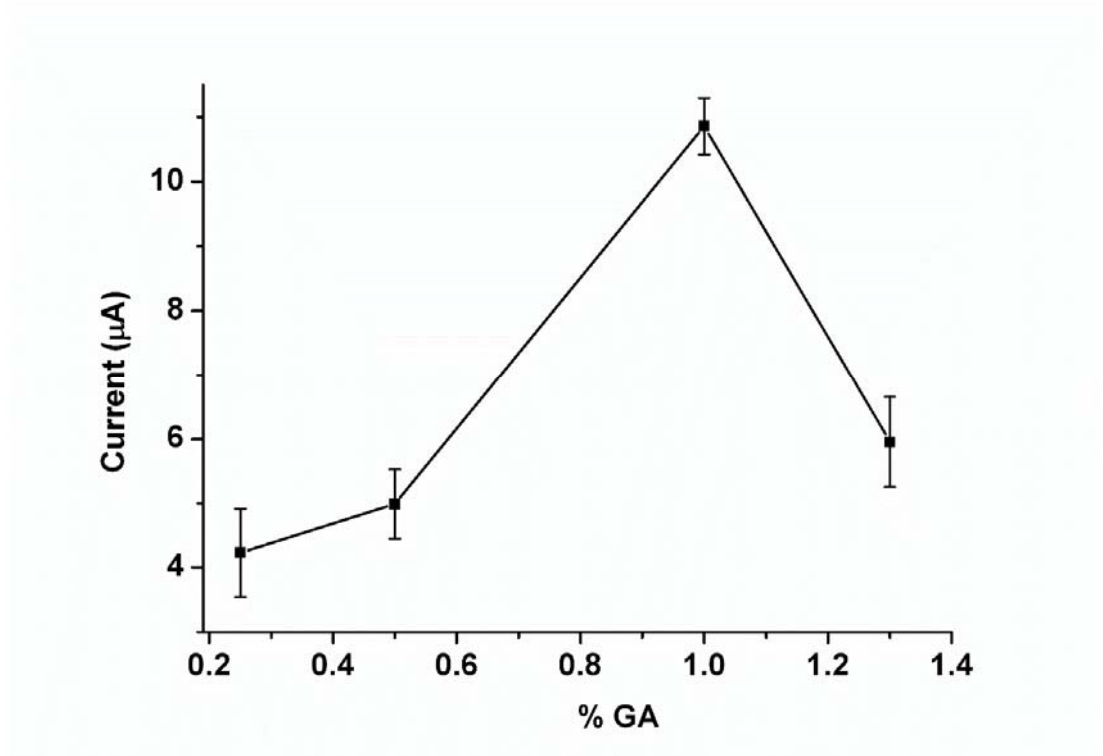
Şekil 4.6. Biyosensörün üzerinde polifosfazen miktarının etkisi (pH 4,5, 50 mM sodyum asetat tamponu 25 ° C, -0,7 V). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir.

Yüksek bir biyosensör sinyali elde etmek için enzim miktarı da optimize edilmelidir. İmmobilizasyon matrisi belli bir enzim kapasitesine sahip olduğu için aşırı enzim miktarında sinyaller düştü. Bunun aksine düşük enzim miktarlarında ise daha düşük bir tepki alınacağından, bu da düşük substrat miktarlarının belirlenmesi için yeterli olamayacaktır. Bütün bu durumlar göz önünde bulundurularak, enzim miktarları 37,2 U ve 50,9 U (2,15-2,94 mg) GOx arasında değişen dört farklı elektrot hazırlanmıştır. Ölçüm sonuçları Şekil 4.7’de görülmektedir. En yüksek ölçüm sonuçları, 45,0 U GOx kullanarak hazırlanan polimerik matris ile elde edilmiştir. Bu nedenle, 45,0 U enzim daha sonra yapılacak deneysel aşamalar için kullanılmıştır.



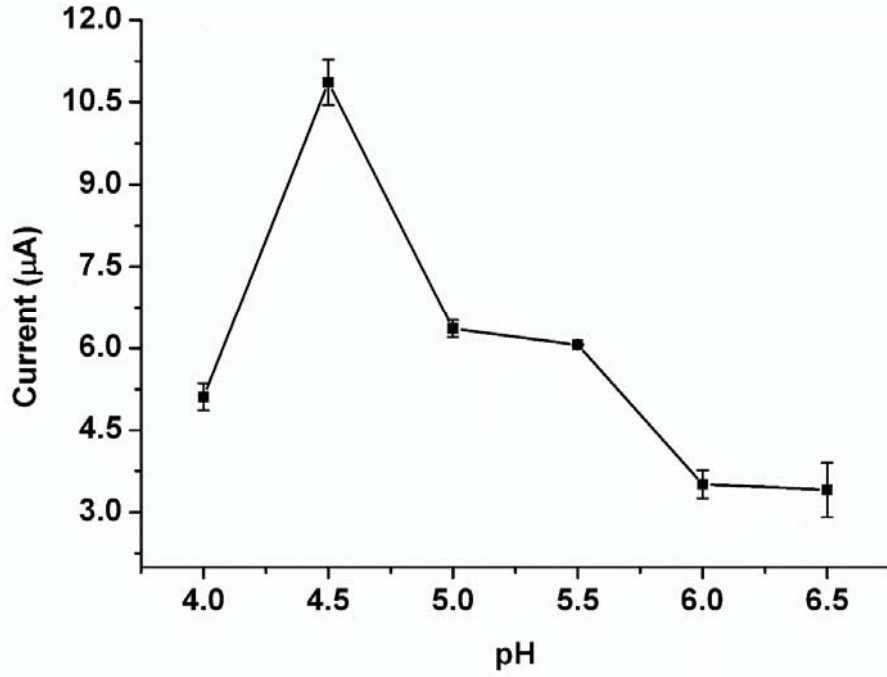
Şekil 4.7. Enzim miktarının biyosensör yanıtına etkisi (pH = 4,5, 50 mM sodyum asetat tamponu, 25 ° C, -0,7 V). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir.

Glutaraldehit (GA), biyosensör hazırlanmasında çapraz bağlama ajanı olarak kullanılmıştır. PPA matris ve enzimler arasındaki imin bağı oluşumuna ek olarak, yüksek aktiviteye sahip GA eşliğinde iletken polimerin amino fonksiyonel gruplarını bağlama yoluyla immobilizasyon desteklenmiştir. Dahası, uzun zincirli yapısıyla çapraz bağlama özelliği, immobilizasyon sonunda uygun enzim konformasyonunu engellemez ve enzimin moleküllerinin polimer üzerindeki kompakt yapısını bozmamaktadır. Yapılan deneylerle, % 0,25, 0,5, 1,0 ve 1,3 GA değerleri test edilmiş ve optimum değer % 1 GA ile elde edilmiştir (Şekil 4.8).



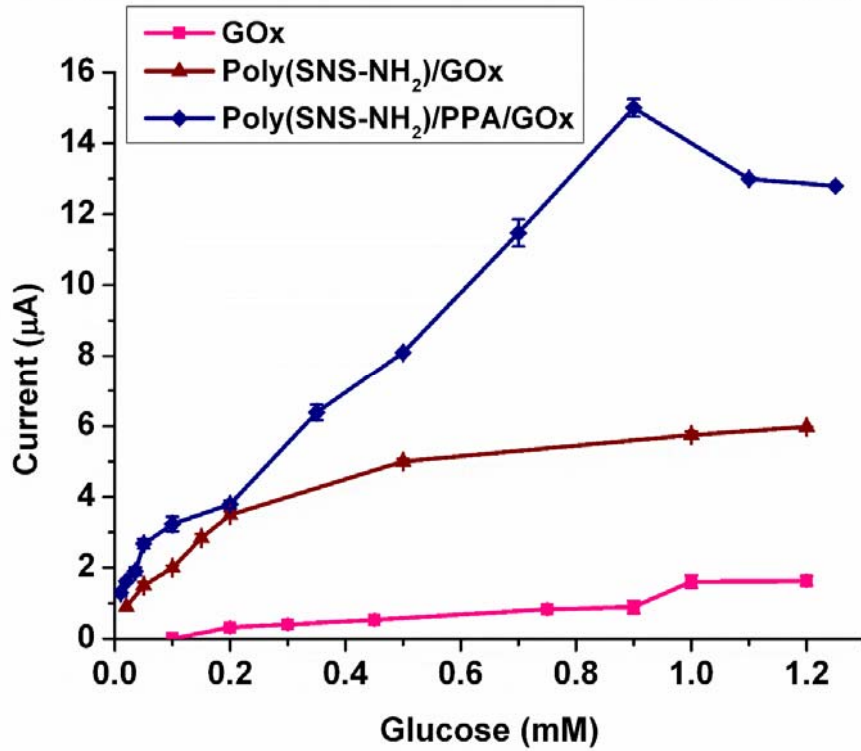
Şekil 4.8. Biyosensör yanıtına çapraz bağlayıcı (GA) etkisi (pH 4,5, 50 mM sodyum asetat tamponu, 25 ° C, -0,7 V, [Glukoz] = 0,7 mM). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir.

Bundan başka, çalışma ortamının pH değeri de biyosensör performansını etkiler. Uygun olmayan pH değerlerinde yapılan biyosensör enzim moleküllerinin denatürasyonuna neden olabilir. Biyosensör yanıtlarının pH'ya bağımlılığı 4,0-6.5 değerleri arasında 25 °C'ta incelenmiştir. Bu amaçla, pH = 4,0-5,5 aralığında 50 mM sodyum asetat tamponu, pH = 6,0-6,5 değerleri arasında ise 50 mM fosfat tamponu kullanılmıştır. Şekil 4.9'da gösterildiği gibi, en iyi sonuç, sodyum asetat tampon çözeltisiyle pH = 4,5'te elde edilmiştir.



Şekil 4.9. pH değişiminin biyosensöre etkisi (pH = 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 için 50 mM sodyum asetat tamponu ve pH = 6,0, 6,5 için 50 mM fosfat tamponu 25 °C'ta kullanılmıştır. -0,7 V, [Glucose] = 0,7 mM). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir.

Son olarak, immobilizasyon matrisin etkinliğini, diğer bileşenlerin önem ve katkılarını görmek için üç farklı biyosensör hazırlanmış ve sonuçlar Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Bunlardan sadece enzimin çıplak elektrot yüzeyine kaplandığında (GO_x elektrot) yeterli bir sinyal alınamamıştır. Poli (SNS-NH₂) tek başına kullanıldığı zaman, oldukça düşük sinyaller elde edilmiştir. PPA immobilizasyon matrisi içinde yer aldığı anda ise, sinyalleri büyük ölçüde belirgin hale gelmiştir. Elde edilen doğrusal aralık ve ölçümlerdeki hassasiyet, kombine immobilizasyon platform (Poli(SNS-NH₂)/PPA/ GO_x) kullanımının etkinliğini açıkça göstermektedir.

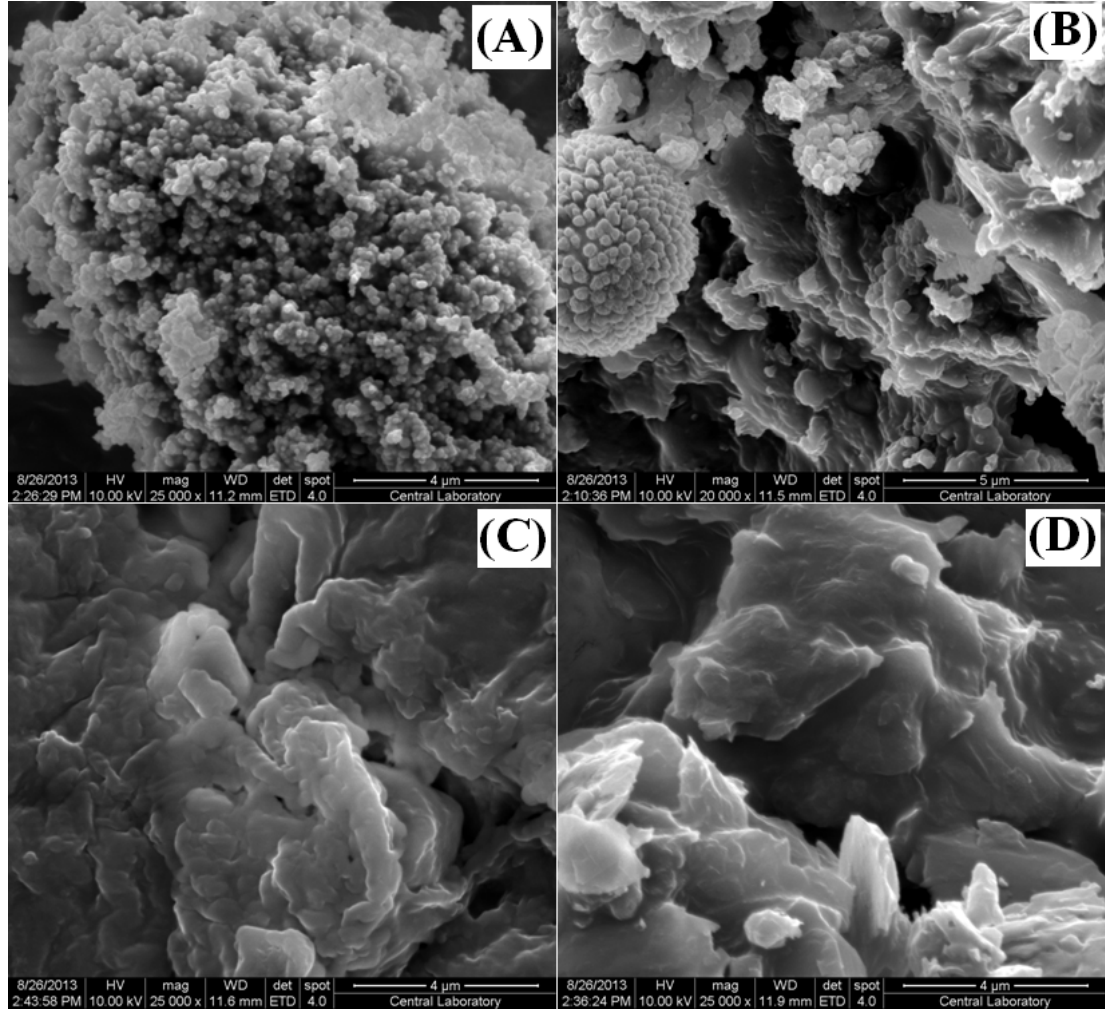


Şekil 4.10. Optimize edilmiş koşullar altında biyosensör üzerinde immobilizasyon matris etkisi (pH 4,5, 50 mM sodyum asetat tamponu 25 ° C, -0,7 V). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir.

4.3.KARAKTERİZASYON

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) tekniği, her değişikenden sonra biyosensör morfolojik özelliklerini analiz etmek için kullanılmıştır. Her bir modifikasyon basamağının malzeme morfolojisi üzerine etkisi incelenmiştir (Şekil 4.11); (A) Sadece polifosfazeni (PPA) göstermektedir, B) GO_x ve PPA birlikte görülmektedir. PPA'nın suda çözünürlüğü nedeniyle, GO_x ve PPA birbirini çok iyi entegre olmuş ve oldukça zengin bir ara yüzey etkileşimi görülmüştür, C) GO_x'in poli(SNS-NH₂) üzerine tutuklanması görülmektedir. Bir önceki resimle karşılaştırıldığında, daha homojen bir morfoloji elde edilmiştir. Elektrot yüzeyini homojen olarak kaplayan iletken polimerlerin, enzim immobilizasyonu için ideal malzemeler oldukları burada bir daha anlaşılmaktadır. D) poli(SNS-NH₂) / PPA üzerine tutuklanmaları sonrasında elde edilen SEM görüntüsüdür. Gözenekli ve girintili yapısı bu immobilizasyon platformda, enzimin serbestçe hareket ettiğini ve 3D yapısını immobilizasyon işleminden sonra koruduğunu göstermiştir. Bu immobilizasyonda matris olarak

platformun etkinliğini göstermektedir. İmmobilizasyon sonrası, biyosensörün çalışabilmesi için, enzimin aktivitesini ve dolayısıyla üç boyutlu yapısını koruması gerekmektedir. Ayrıca görüldüğü gibi PPA biyotabakayı çok fazla örtmek yerine enzimi uygun bir şekilde tutarak enzim aktivitesini desteklemektedir.



Şekil 4.11. Yüzey karakterizasyonu; (A) Sadece polifosfazen (PPA) ve GO_x 'in B) PPA, C) poli(SNS-NH₂) ve D) poli(SNS-NH₂) / PPA üzerine tutuklanmaları sonrası SEM görüntüleri.

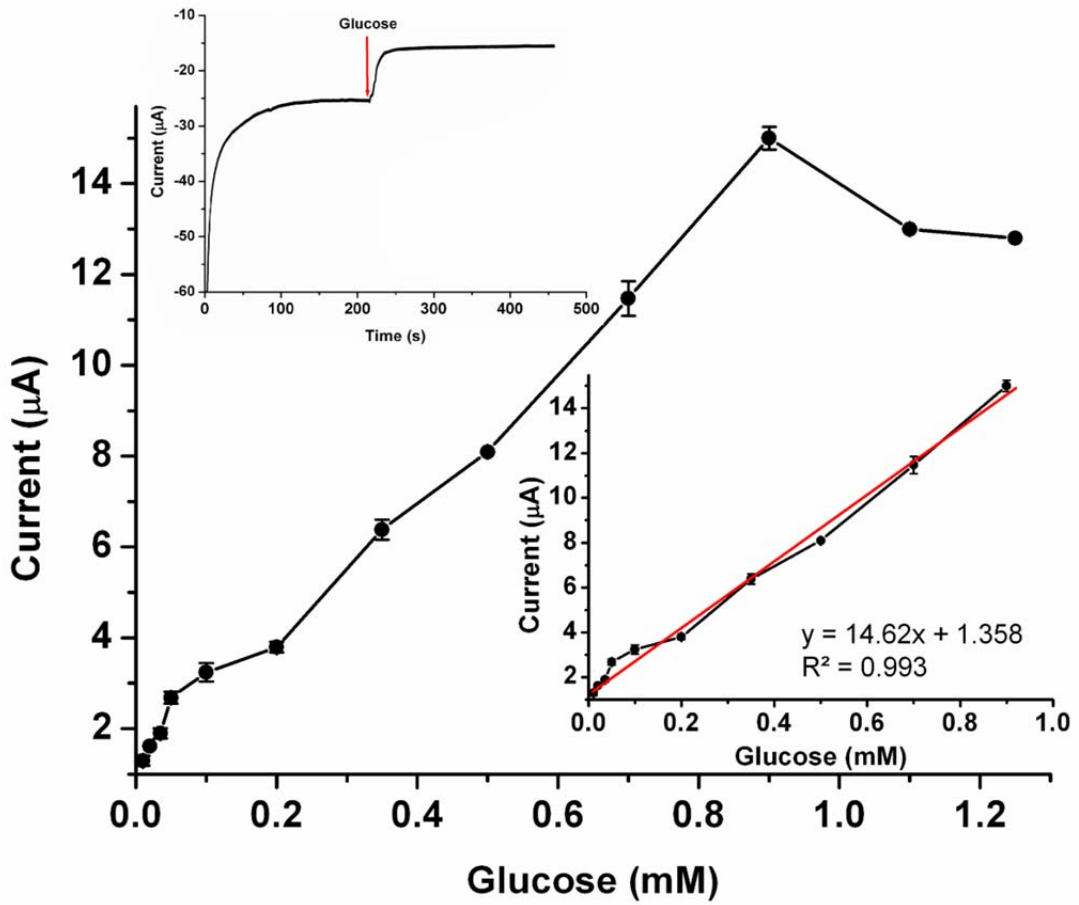
Glukoz biyosensörün analitik karakterizasyonu glukoz için bir kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ile yapılmıştır. Değişen glukoz konsantrasyonları için biyosensör yanıtları kaydedilmiştir ve bir doğrusal dizi ile kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir (Şekil 4.12). Biyosensör, 0,01-0,9 mM gibi geniş bir glukoz konsantrasyon aralığında çok mükemmel bir doğrusallık göstermiştir. Geniş bir doğrusallık aralığı her biyosensör için aranan bir özelliktir. Ru-Py-HRP- GO_x /Nafion mikrosensörünün

0,01-0,5 mM,⁵³ Nafion/GO_x/Ag-Pdop@CNT/GCE biyosensörünün 0,05-1,1 mM⁵⁴ ve GO_x-CS/AgNWs/GCE biyosensörünün 0,01-0,8 mM⁵⁵ değerleriyle karşılaştırıldığında, burada çalışılan poli(SNS-NH₂)/PPA/GO_x biyosensöründe elde edilen ölçüm aralığının oldukça tatmin edici olduğu söylenebilir.

Glukoz için tipik bir biyosensör yanıtı Şekil 4.12’de kalibrasyona ek olarak verilmiştir. İmmobilizasyonun matris üstünlüğü nedeniyle, substrat kolaylıkla elektrot yüzeyine enzim moleküllerinin etkin bölgelerine ulaşabilmekte ve reaksiyon, enzim ile katalize edilmektedir. Bundan dolayı, immobilizasyon matrisi yardımı ile substrata yanıt 19 saniyede görülebilmektedir. Tayin sınırının (LOD) da gösterdiği gibi biyosensör yüksek kapasite ile çok küçük miktardaki substratları bile tayin edebilmektedir. Sinyal /gürültü oranı 3 olarak düşünüldüğünde, LOD değeri 1,3 µM olarak hesaplanmıştır ki bu değer diğer çalışmalarla kıyaslandığında oldukça düşüktür. Örneğin düzenli mezogözenekli karbon ile desteklenmiş platin nanoparçacıklarıyla hazırlanmış bir glukoz oksidaz biyosensöründe LOD değeri 50 µM olarak verilmiştir.⁵⁶ Başka bir örnekte ise elektrokimyasal olarak yüzeyi polivinilferrosenyum ile kaplanmış platin nanoparçacıklar üzerinde *o*-fenildiamin ile GO_x immobilizasyonunda ise LOD değeri 18 µM olarak bulunmuştur.⁵⁷ Buna ek olarak, 237,1 mA/M cm² gibi oldukça yüksek duyarlılık elde edilmiştir. Bu değer, örneğin grafen-nano Au-GO_x-GCE biyosensörü⁵⁸ için 56,93 mA/M cm², GO_x-In₂O₃-çitosan/GCE biyosensörü⁵⁹ için 7,3 mA/M cm² ve GO_x/TCS-TiO₂/çitosan/GCE biyosensörü⁶⁰ için ise 23,2 mA/M cm² olarak belirlenmiştir.

Michaelis-Menten sabiti (K_M) reaksiyon kinetiğinin anlaşılması için kullanılır ve enzimin substratına afinite göstergesi olarak kabul edilir. İmmobilizasyondan sonra enzim aktivitesini ya da biyoyararlılığını anlamak için kullanılabilir. Poli(SNS-NH₂)/PPA/GO_x biyosensörü için, Michaelis-Menten sabiti (K_M^{app}) 0,676 mM ve I_{max} değeri 20,91 µA olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar, Lineweaver-Burk denkleminde göre yapılmıştır.⁶¹ Düşük K_M^{app} değeri iyi bir immobilizasyon olduğunu ve GO_x moleküllerin glukozu karşı yüksek afinitesinin olduğunu göstermektedir. Burada çalıştığımız biyosensör için elde edilen K_M^{app} değeri yapılan diğer benzer çalışmalarla kıyaslandığında elde edilen diğer 9,85 mM, 5,46 mM, 11,1 mM, 10,0 mM ve serbest GO_x değerlerinden çok daha düşük bir değere sahiptir.^{54,57,62}

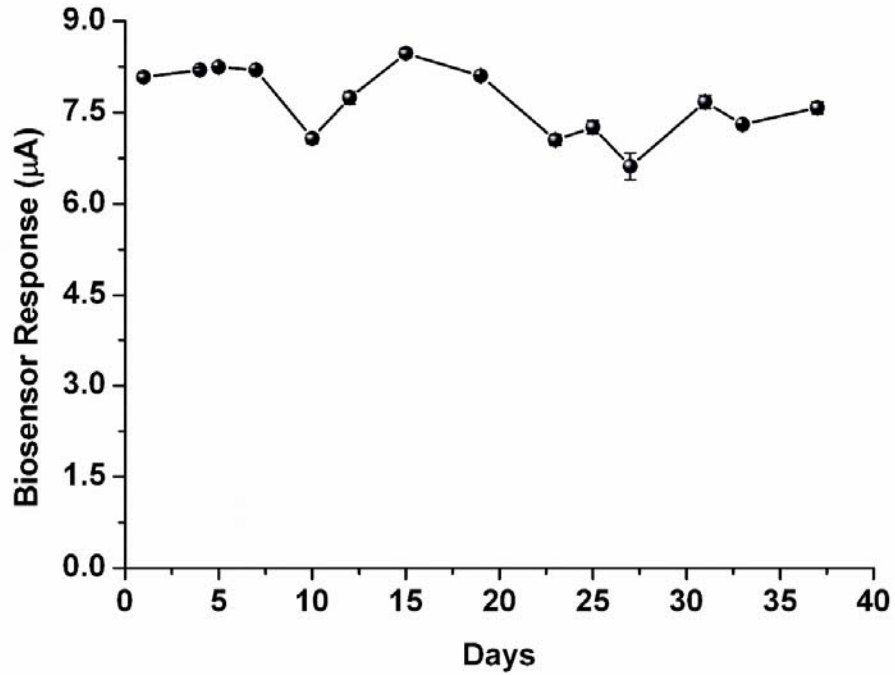
Çalışılan biyosensörün, duyarlılık, tepki süresi ve LOD değeri gibi açılardan üstün performans göstermesi biyosensör matrisine ve biyosensörün hazırlanma tekniğine bağlanabilir. İletken polimer, sadece elektrot yüzeyini büyüterek daha etkili bir immobilizasyon değil aynı zamanda elektroaktifliği sebebiyle elektrot yüzeyindeki katalitik tepkimelere de katkı sağlamaktadır. Bunun yanında, polifosfazen ise barındırdığı aldehit grupları ile enzime kovalent bağ yaparak çok daha etkili bir şekilde immobilizasyonu sağlamasının yanında suyu seven yan grupları sayesinde enzim molekülünün bulunduğu ortamda etkinliğini fazla kaybetmeden çalışmasına imkan vermektedir.



Şekil 4.12. Glukoz için kalibrasyon eğrisi (pH = 4,5, 50 mM sodyum asetat tamponu 25 °C, -0,7 V). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir. (Glukoz için tipik bir biyosensör yanıtı 0,70 mM glukoz pH = 4,5 50 mM sodyum asetat tamponunda).

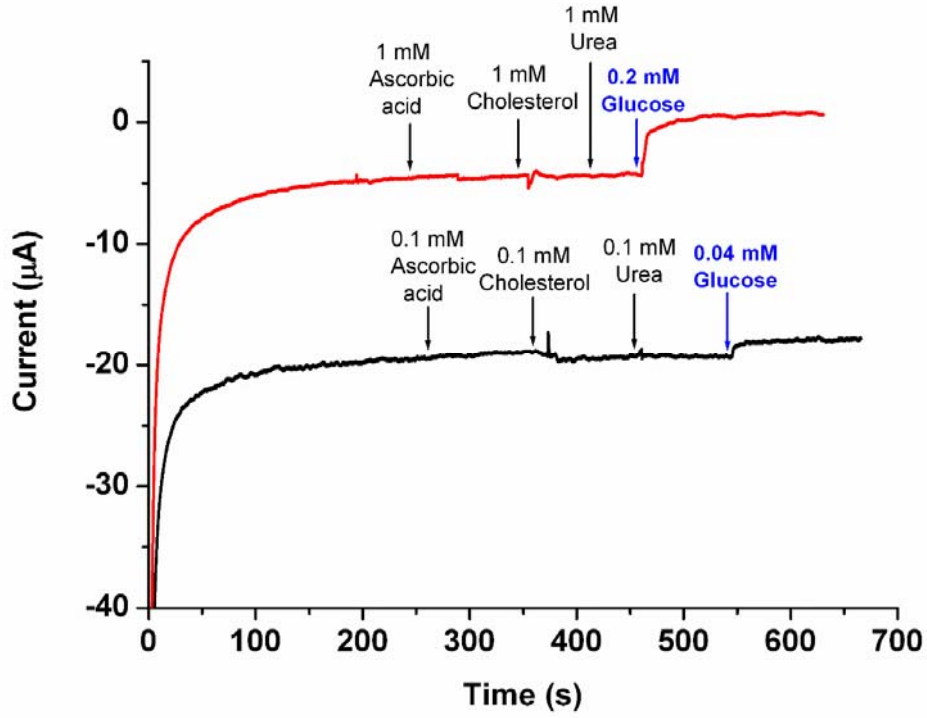
4.4. KARARLILIK VE GİRİŞİM ÇALIŞMASI

Poli(SNS-NH₂)/PPA/GO_x biyosensör optimize edildikten sonra biyosensörün kararlılığı ve tekrarlanabilirliği test edilmiştir. Bunun için 0,7 M glukoz çözeltisi ile 8 saat boyunca art arda 10 ölçüm yapılmış ve bağıl standart sapma değeri % 4,86 olarak bulunmuştur. Bu değer tekrarlanabilirlik açısından oldukça iyi bir değerdir. Biyosensörün raf ömrü ve depolama kararlılığı, 37 gün boyunca her gün 0,5 mM glukoz içinde biyosensör yanıtları kayıt edilerek belirlenmiştir. Ölçümler arasında, biyosensör 4 °C'de muhafaza edilmiştir. Bu süre sonunda, biyosensör aktivitesinin % 95'i korunmuştur (Şekil 4.13). Bu kararlılığın nedeni organik ve inorganik polimerlerin kombinasyonu ile temin edilen mükemmel mikro-ortam olabilir. Ayrıca polifosfazenin zar benzeri yapısı ve elektrot yüzeyindeki GO_x'in yapısı ve aktivitesine katkı sağlamıştır. Bütün bu bulgular, biyosensörün, uzun süreli çalışmalar için elverişli olduğu ortaya koymuştur.



Şekil 4.13. 37 gün boyunca biyosensör yanıtları (pH = 4,5, 50 mM sodyum asetat tamponu, Glikoz: [0,5 mM], 25 °C, -0,7 V). Hata çubukları, üç ölçümün standart sapmasını (SD) göstermektedir.

Güvenilir ve geçerli bir biyosensör, etkileşimlerden bağımsız çalışmalıdır. Bu etkiyi belirlemek için, 0,01 mM – 0,1 M konsantrasyon aralığında askorbik asit, kolesterol ve üre gibi yükseltgenmeye yatkın türlerin etkileşimleri çalışılmıştır. Etkileşimleri görmek için, amperometrik ölçümler sırasında glukoz yerine bu tür maddeler biyosensör hücresine enjekte edilmiştir. Biyosensör, enjekte edilen bu maddelerden hiçbirisine yanıt vermemiştir (Şekil 4.14). Bununla birlikte, glukozun çeşitli miktarlarda eklenmesiyle, glukozdan dolayı çok açık sinyal gözlenmiştir. Bu durum, biyosensörün böyle etkileşim verme ihtimali olan maddelerin varlığında bile seçici davranıp sadece glukozu tepki verdiği bulunmuştur.



Şekil 4.14. Biyosensörün glukoz ve olası girişim türlerine tepkisi (pH = 4,5, 50 mM sodyum asetat tamponu, 25 °C, -0,7 V).

4.5. ÖRNEK UYGULAMA

Biyosensör potansiyel bir dedektör olarak kullanılmış ve gerçek örneklerle uygulanabilirliğini belirlemek üzere çeşitli ticari içeceklerin analizinde kullanılmıştır. Numunelerin glukoz içeriği, herhangi bir ön işlem olmaksızın glukoz yerine hücreye enjekte edildikten sonra amperometrik ölçümler yapılarak belirlenmiştir. Tablo 1 'de

gösterildiği gibi, tespit edilen glukoz miktarları enzimatik katalitik spektrofotometre ile elde edilen değerlere yakın bulundu. Sonuçlar biyosensörün gerçek örnekler için uygulanabileceğini güvenilir ve doğru sonuçlara ulaşılabilirliğini gösterdi.

Tablo 1. İçeceklerde glikoz tespiti (Tüm ölçümler üç kez yapılmıştır; Standart sapmaları hesaplanmış ve $\pm$ olarak verildi)

Örnek	Glukoz(M)	
	Spektrofotometrik	Poli(SNS-NH ₂)/PPA/GO _x
Soda	0.076	0.077 ± 0.0071
Limonata	0.183	0.170 ± 0.0030
Soğuk çay	0.035	$0.052 \pm 0.0110+$
Portakal suyu	0.107	0.100 ± 0.0108

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, yeni esnek bir hidrofilik polifosfazen türevi olan poli[(metoksietoksi)etoksi-*ko*-3-formilfenoksi] fosfazen (PPA) sentezlenmiş ve iletken bir polimer olan poli[4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)benzenamin] (poli (SNS-NH₂)) ile enzim immobilizasyonunda birlikte kullanılmıştır. Grafit elektrot iletken polimerle kaplanmış ve sonrasında enzim, suda çözünür PPA ile birlikte elektrot yüzeyine enjekte edilmiştir. PPA'daki aldehit grupları ile GO_x'deki amino grupları kovalent bağ oluşturmuştur. Immobilizasyon şartları bir seri sistematik deney sonucu optimize edilmiştir. Biyosensör yüzey morfolojisi, ölçüm aralığı, tespit sınırı, kararlılık ve afinite açılarından karakterize edilmiştir. Bu denemeler sonucunda, biyosensörün glukozu karşı mükemmel duyarlılık ve afinite gösterdiğini bulunmuştur. Bu durumun, yeni tasarlanmış immobilizasyon matrisine etkinliği ve performansına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, hazırlanan bu biyosensör, glukoz içeren içecekler üzerinde de test edilmiştir, bulunan değerlerin spektroskopik değerlerle çok iyi örtüştüğü belirlenmiştir. Son olarak, askorbik asit, kolesterol ve üre gibi yükseltgenmeye yatkın türlerin glukoz ortamında biyosensörle etkileşimlerine bakılmış, sonuçta geliştirilen biyosensörün glukozu karşı seçici olduğu ve yeterli performans gösterdiği bulunmuştur.

Elde edilen bu sonuçlar, immobilizasyon matrisinin önemini bir daha ortaya çıkarmaktadır. Bu şekilde, uygun iki veya daha fazla polimer tasarlanarak immobilizasyon işleminin oldukça etkili bir şekilde gerçekleştirilebileceği ve çok iyi çalışabilecek biyosensörlerin tasarlanabileceği gösterilmiştir. Bu doğrultuda, farklı iletken polimerler ve uygun mimaride tasarlanacak inorganik polimerler kullanılarak, yeni biyosensör tasarımlarının gerçekleştirilebileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Gleria, M.; De, J. R.; Editors. *Phosphazenes: A Worldwide Insight*; Nova Science Publishers, Inc., **2004**, p 1047 pp.
2. (a) Allcock, H. R. *Chemistry and Applications of Polyphosphazenes*; John Wiley & Sons: New Jersey, **2003**; (b) Allcock, H. R. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2004**, *179*, 661-671.
3. Gleria, M.; R., J. *Journal Inorganic and Organometalic Polymers* **2001**, *11*, 1-45.
4. Mark, J. E.; Allcock, H. R.; West, R. *Inorganic Polymers*, **1992**.
5. Liebig, J. *Annalen der Pharmacie* **1834**, *11*, 139-150.
6. Rose, H. *Annalen der Pharmacie* **1834**, *11*, 129-139.
7. Gerhardt, C. *Ann. Chim. Phys.* **1846**, *18*.
8. Laurent, A. *Acad. Sci.*, **1850**, *3*.
9. Gladstone, J. H.; Holmes, J. D. *J. Chem. Soc.* **1864**, *17*, 225-237.
10. Wichelhaus, H. *Chem. Ber.* **1870**, *163*.
11. (a) Stokes, H. N. *American Chemistry* **1895**, *17*, 275; (b) Stokes, H. N. *Chem. Ber.* **1895**, *28*, 437; (c) Stokes, H. N. *American Chemistry* **1896**, *18*, 629; (d) Stokes, H. N. *American Chemistry* **1897**, *19*, 782.
12. Gırğıç, Ö. M. *Yeni Hibrit Fosfazen Polimerlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu*. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gebze, **2012**.
13. Meyer, K. H.; Lotmar, W.; Pankow, G. W. *Helv. Chim. Acta* **1936**, *19*.
14. (a) Allcock, H. R.; Kugel, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4216-4217; (b) Allcock, H. R.; Kugel, R. L.; Valan, K. J. *Inorg. Chem.* **1966**, *5*, 1709-1715; (c) Allcock, H. R.; Kugel, R. L. *Inorg. Chem.* **1966**, *5*, 1716-1718.
15. Allcock, H. R.; Mack, D. R. *J. Chem. Soc.* **1970**, *11*, 685.

16. (a) Manners, I.; Riding, G. H.; Dodge, J. A.; Allcock, H. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3067-3069; (b) Allcock, H. R.; Turner, M. L. *Macromolecules* **1993**, *26*, 3-10.
17. (a) De Jaeger, R.; Potin. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1993**, *76*, 483; (b) 4,977,558, **1983**; (c) Helioui, M.; Dejaeger, R.; Puskaric, E.; Heubel, J. *Makromol Chem* **1982**, *183*, 1137-1143.
18. (a) Allcock, H. R.; Reeves, S. D.; de Denus, C. R.; Crane, C. K. *Macromolecules* **2001**, *34*, 748-754; (b) Allcock, H. R.; Nelson, J. M.; Reeves, S. D.; Honeyman, C. H.; Manners, I. *Macromolecules* **1997**, *30*, 50-56; (c) Allcock, H. R.; Crane, C. A.; Morrissey, C. T.; Nelson, J. M.; Reeves, S. D.; Honeyman, C. H.; Manners, I. *Macromolecules* **1996**, *29*, 7740-7747; (d) Honeyman, C. H.; Manners, I.; Morrissey, C. T.; Allcock, H. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7035-7036.
19. (a) Allcock, H. R.; Chu, C. T. W. *Macromolecules* **1979**, *12*, 551-555; (b) Allcock, H. R.; Patterson, D. B. *Inorg. Chem.* **1977**, *16*, 197-200; (c) Evans, T. L.; Allcock, H. R. *J Macromol Sci Chem* **1981**, *A16*, 409-423.
20. Esmer, E. N. *Sentezlenen Donör-Akseptör Tipi İletken Polimerlerin Elektrokimyasal ve Optik Özellikleri*. Gazi Üniversitesi, Ankara, **2012**.
21. Çelikkan, H. *Polipirrol ile Modifiye Edilmiş Karbon Elektrot Kullanılarak AS Yöntemiyle Pb ve Cu Tayini*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, **2001**.
22. Başbilen, B. *Yüzeyi Polianilinle Kaplanmış Pirincin Klorürlü Ortamdaki Elektrokimyasal Davranışı*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Adana, **2006**.
23. (a) Chiang, C. K.; Fincher, C. R.; Park, Y. W.; Heeger, A. J.; Shirakawa, H.; Louis, E. J.; Gau, S. C.; Mac Diarmid, A. *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *39*; (b) Saçsk, M. *İletken Polimerler*, Gazi Kitapevi ed., **2004**; (c) Shirakawa, H.; Louis, E. J.; Mac Diarmid, A.; Chiang, C. K.; Heeger, A. J. *Chem. Soc. Rev.* **1977**, 578.
24. Ak, S. M. *Tiyofen ve Pirrol Esaslı Yeni Monomerlerin Sentezi, Polimerleştirilmesi ve Polimerlerin Özelliklerinin İncelenmesi*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, **2011**.
25. Mehrvar, M.; Bis, C.; Scharer, J. M.; Moo-Young, M.; Luong, J. H. *Anal. Sci.* **2000**, *16*, 677-692.
26. Mello, L. D.; Kubota, L. T. *Food Chem.* **2002**, *77*, 237-256.
27. Aykut, U.; Temiz, H. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* **2006**, *3*, 51-59.

28. Sharma, S. K.; Sehgal, N.; Kumar, A. *Curr Appl Phys* **2003**, 3, 307-316.
29. Chambers, J. P.; Arulanandam, B. P.; Matta, L. L.; Weis, A.; Valdes, J. J. *Current issues in molecular biology* **2008**, 10, 1-12.
30. Telefoncu, A. *İmmobilize Enzimler*. **1999**.
31. Schmidt-Dannert, C.; Arnold, F. H. *Trends Biotechnol.* **1999**, 17, 135-136.
32. (a) Stryer, L. *Introduction to Enzymes*; Biochemistry, W. H. Freeman and Company, **1981**; (b) Söyler, M. *Van Kedisi Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, **2006**; (c) Lehninger, A. M. *Principles of Biochemistry 2th Edition*; Worth Publishers Inc., **1993**.
33. (a) McKee, T. *Biochemistry*; McGraw-Hill, **2003**; (b) Yıldız, S. *Enzimler*; Fakülte Kitap Evi, **2007**; (c) Gözükar, E. *Biyokimya*; Nobel Tıp Kitapevleri, **2001**.
34. Palmer, T. *Understanding Enzymes*; Prentice Hall / Ellis Horwood, **1995**; Vol. 70.
35. Whitaker, J. R. *Principles of Enzymology For The Food Sciences*; Marce Dekker **1994**; Vol. 105.
36. Garret, R. H. *Biochemistry*; Thomson, **2005**.
37. Shuler, M. L. *Bioprocess Engineering*; Prentice Hall, New Jersey, **1992**.
38. Başçı, N. E. *Sakkarozun İnvertaz ile Hidroliz Kinetiğinin ve İnverta Deaktivasyonunun İncelenmesi*. Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **1985**.
39. (a) Witt, S.; Singh, M.; Kalisz, H. M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, 64, 1405-1411; (b) Egi, Y. *Çapraz Bağlı Baskılanmış Glukoz Oksidazın Hazırlanması ve Karakterizasyonu*. Ege Üniversitesi, İzmir, **2009**.
40. Özabacıgil, F. *İnsan Eritrosit 6-Fosfoglukonat Dehidrojenez Enziminin Saflaştırılması Bazı İlaçların Enzim Aktivitesi Üzerine invitro ve invivo Etkisinin İncelenmesi*. Atatürk Üniversitesi, Erzurum, **2005**.
41. Weibel, M. K.; Brights, H. j. *The Journal of Biological Chemistry* **1971**, 246, 2734-2744.

42. (a) Nair, L. S.; Lee, D.; Laurencin, C. T. In *Handbook of Biodegradable Polymeric Materials and Their Applications*, Mallapragada, S. K.; Narasimhan, B., Eds.; American Scientific Publishers: Los Angeles, **2006**, pp 277-306; (b) Nair, L. S.; Khan, Y. M.; Laurencin, C. T. In *Introduction to Biomaterials*, Guelcher, S. A.; Hollinger, J. O., Eds.; CRC Press: Boca Raton, **2006**, pp 273-290; (c) Andrianov, A. K. *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **2005**, *46*, 715; (d) Carenza, M.; Lora, S.; Fambri, L. In *Biomaterials: From Molecules to Engineered Tissues*, Hasirci, N.; Hasirci, V., Eds.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, **2004**, pp 113-122; (e) Heyde, M.; Schacht, E. In *Applicative Aspects of Poly(organophosphazenes)*, Gleria, M.; de Jaeger, R., Eds.; Nova Science Publishers: New York, **2004**, pp 1-32; (f) Laurencin, C. T.; Ambrosio, A. M. A. In *Biodegradable Polymers*, Arshady, R., Ed.; Citus Books: London, **2003**, pp 153-173; (g) Laurencin, C. T.; Nair, L. S. In *NATO Science Series, II: Mathematics, Physics and Chemistry*, Guceri, S.; Gogotsi, Y. G.; Kuznetsov, V., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, **2004**, pp 283-302.
43. Allcock, H. R.; Kwon, S. *Macromolecules* **1986**, *19*, 1502-1508.
44. Matsuki, T.; Saiki, N. *JP01030650A* **1989**.
45. Allcock, H. R.; Pucher, S. R.; Visscher, K. B. *Biomaterials* **1994**, *15*, 502-506.
46. Cuetos, A.; Valenzuela, M. L.; Lavandera, I.; Gotor, V.; Carriedo, G. A. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1291-1297.
47. Cuetos, A.; Rioz-Martinez, A.; Valenzuela, M. L.; Lavandera, I.; de, G. G.; Carriedo, G. A.; Gotor, V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *74*, 178-183.
48. Yildiz, E.; Camurlu, P.; Tanyeli, C.; Akhmedov, I.; Toppare, L. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, *612*, 247-256.
49. Yoshimoto, M.; Takaki, N.; Yamasaki, M. *Colloids Surf. B* **2010**, *79*, 403-408.
50. (a) Teuscher, A.; Richterich. *Schweiz Med. Wschr.* **1971**, *101*, 345-390; (b) Barham, D.; Trinder, P. *The Analyst* **1972**, *97*, 142-145.
51. (a) Kekec, N. C.; Kanik, F. E.; Udum, Y. A.; Hizliates, C. G.; Ergun, Y.; Toppare, L. *Sens. Actuators B: Chem.* **2014**, *193*, 306-314; (b) Gerard, M.; Chaubey, A.; Malhotra, B. D. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 345-359.
52. (a) Fernandez, R. E.; Bhattacharya, E.; Chadha, A. *Appl. Surf. Sci.* **2008**, *254*, 4512-4519; (b) Xu, X. Y.; Feng, Y.; Li, J. J.; Li, F.; Yu, H. J. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2324-2328.

53. Yamamoto, K.; Zeng, H. S.; Shen, Y.; Ahmed, M. M.; Kato, T. *Talanta* **2005**, *66*, 1175-1180.
54. Wang, Y. L.; Liu, L.; Li, M. G.; Xu, S. D.; Gao, F. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *30*, 107-111.
55. Wang, L. S.; Gao, X.; Jin, L. Y.; Wu, Q.; Chen, Z. C.; Lin, X. F. *Sens. Actuators B: Chem.* **2013**, *176*, 9-14.
56. Jiang, X. Y.; Wu, Y. H.; Mao, X. Y.; Cui, X. J.; Zhu, L. D. *Sens. Actuators B: Chem.* **2011**, *153*, 158-163.
57. Turkmen, E.; Bas, S. Z.; Gulce, H.; Yildiz, S. *Electrochim. Acta* **2014**, *123*, 93-102.
58. Wang, X. L.; Zhang, X. L. *Electrochim. Acta* **2013**, *112*, 774-782.
59. Yang, Z. J.; Huang, X. C.; Zhang, R. C.; Li, J.; Xu, Q.; Hu, X. Y. *Electrochim. Acta* **2012**, *70*, 325-330.
60. Yang, Z.; Tang, Y.; Li, J.; Zhang, Y.; Hu, X. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *54*, 528-533.
61. Scott, D. L.; Bowden, E. F. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1217-1223.
62. (a) Wong, C. M.; Wong, K. H.; Chen, X. D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *78*, 927-938; (b) de Jesus, C. G.; Lima, D.; dos Santos, V.; Wohnrath, K.; Pessoa, C. A. *Sens. Actuators B: Chem.* **2013**, *186*, 44-51; (c) Deng, H. M.; Teo, A. K. L.; Gao, Z. Q. *Sens. Actuators B: Chem.* **2014**, *191*, 522-528.



Synthesis and characterization of a novel polyphosphazene and its application to biosensor in combination with a conducting polymer



Didem Ucan^a, Fulya Ekiz Kanik^b, Yunus Karatas^{a,*}, Levent Toppare^{b,c,d,e,*}

^a Department of Chemistry, Ahi Evran University, Kirsehir 40200, Turkey

^b Department of Biotechnology, Middle East Technical University, Ankara 06800, Turkey

^c Department of Chemistry, Middle East Technical University, Ankara 06800, Turkey

^d Department of Polymer Science and Technology, Middle East Technical University, Ankara 06800, Turkey

^e The Center for Solar Energy Research and Application (GÜNAM), Middle East Technical University, Ankara 06800, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 March 2014

Received in revised form 6 May 2014

Accepted 10 May 2014

Available online 16 May 2014

Keywords:

Polyphosphazene

Conducting polymer

Glucose biosensor

Covalent immobilization

ABSTRACT

An amperometric glucose biosensor was prepared successfully based on a conducting polymer, poly(4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)benzenamine) (poly(SNS-NH₂)) and a flexible hydrophilic polyphosphazene polymer, poly[(methoxyethoxy)ethoxy-co-3-formylphenoxy]phosphazene (PPA). Poly(SNS-NH₂) was electrochemically polymerized on a graphite electrode to achieve a conducting immobilization matrix to improve the enzyme immobilization on the transducer surface. Moreover, to strengthen the immobilization, a polyphosphazene derivative bearing functional aldehyde group was designed, synthesized and used in the immobilization of glucose oxidase. Not only the amino groups in the structure of poly(SNS-NH₂), but also the aldehyde groups in PPA were contributed to the covalent immobilization as well as the entrapping the biomolecules in PPA network during the immobilization process. This afforded an effective and long-life analysis of glucose. Amperometric measurements were conducted at −0.7 V vs. Ag/AgCl in 50 mM sodium acetate buffer at pH 4.5. K_M^{app} (0.677 mM), I_{max} (20.91 μ A), LOD (1.3 μ M) values were determined. Moreover, biosensor showed an extremely high sensitivity as 237.1 μ A mM^{−1} cm^{−2} owing to the newly synthesized and combined highly flexible hydrophilic polymeric immobilization matrix. Finally, the proposed biosensor was successfully applied for determination of glucose content in several beverages, successfully.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the past decade, major advances have occurred in the development of enzymatic biosensors and they started to be used as alternatives or complementary devices in detection and quantification of certain substances. Biosensors are easy to construct and use, cheap, rapid, selective, sensitive and generally do not require sample pre-treatment. Nevertheless, the crux in the preparation of a new enzyme-based biosensor is the selection and fabrication of immobilization matrix for the enzyme molecules in order to have a long-life, sensitive and stable biosensor. Nowadays, material science is the heart of all scientific applications. The choice

of true material for an application is the most crucial step of the point of operation. In an enzyme-based amperometric biosensor, a convenient immobilization matrix must not only fix the enzyme molecules onto the transducer surface in a proper conformation for an efficient catalytic activity, but also keep the enzyme functional during the measurements as long as possible without denaturation or loss of activity. Immobilization matrix firstly has to serve as an appropriate platform for the enzyme, secondly transfer the electrons efficiently in electrochemical measurements. Hence, to provide and enhance the electron transfer between active site of enzymes and electrode, numerous materials such as metal nanoparticles [1,2], carbon nanotube derivatives [3,4] or inorganic or polymeric nanocomposite materials [5,6] were used in biosensor fabrications. Here, we developed a novel immobilization platform based on the polymers with organic and inorganic backbones for an efficient and durable enzymatic biosensor.

Polymers with inorganic backbone have attracted a growing interest during the last few decades due to their superior properties. Polyphosphazenes, bearing two side chains attached via macromolecular substitution reactions to each phosphorous atom

* Corresponding author at: Department of Chemistry, Middle East Technical University, Ankara 06800, Turkey. Tel.: +90 3122103251; fax: +90 3122103200.

** Corresponding author at: Department of Chemistry, Ahi Evran University, Asik Pasa Campus, Kirsehir 40200, Turkey. Tel.: +90 3862804605; fax: +90 3862804525.

E-mail addresses: ucandidem@gmail.com (D. Ucan), fulyaekiz@gmail.com (F.E. Kanik), ykaratas@ahievran.edu.tr, polyunus@gmail.com (Y. Karatas), toppare@metu.edu.tr (L. Toppare).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.05.040>

0925-4005/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Poli[(metoksietoksi)etoksi-co-3-formilfenoksi]fosfazen'in Sentezi, Karakterizasyonu ve Biyosensör Uygulamalarında Kullanımı

Didem Uçan¹, Fulya Ekiz Kanık², Yunus Karataş¹, Levent Toppare^{2,3}

¹ Ahi Evran Üniversitesi, Kimya Bölümü, Kırşehir

² Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoteknoloji Bölümü, Ankara

³ Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümü, Ankara
Tel: 0506 785 33 30

1. Giriş

- Polifosfazenler, polisiloksanlar gibi yüksek ısı ve kimyasal kararlılığa sahip olduklarından birçok araştırmacının ilgisini çekmekte ve yoğun bir şekilde çalışılmaktadır.^[1,2]
- Monomer $(C_6H_4P=NSi(CH_3)_3)$ sentezi uygun şartlarda yüksek verimle gerçekleştirilebilmektedir.^[1,2]
- Sentezlenen başlangıç polimeri (poli(dikloro fosfazen))nin reaktif fosfor-klor bağları çok değişik fonksiyonel gruplar yardımıyla yan grupların polimere takılabilmesini sağlamakta, bu şekilde çok farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerde polimerlerin sentezlenmesine imkan sağlamaktadır.^[1,2]
- Geçtiğimiz on yıl içinde enzimatik biyosensör uygulamaların büyük ilerlemeler yaşanmıştır. Polifosfazenin uygulama alanlarından biri de enzimatik biyosensör uygulamalarıdır.^[3]

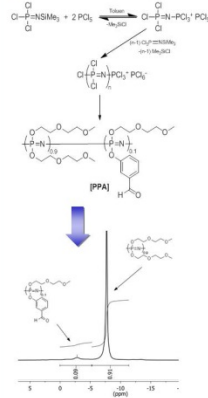
2. Biyosensör Uygulamaları

Biyosensörler, biyolojik tepkimelerde hedef analitleri denetlemek için kullanılan küçük algılayıcı cihazlardır. Birbirine içine geçmiş bir biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çevirici oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi analiz edilecek maddeyle etkileşerek onu tanımadır. Bu tanıma olayının sonucunda bir biyokimyasal ürün de oluşabilmektedir. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmekle görevlidir.

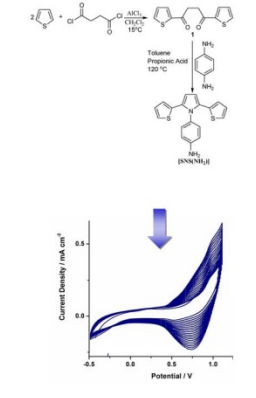


3. Sentez

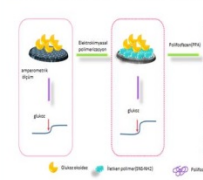
● Polifosfazen (PPA) Sentezi:



● İletken Polimer (SNS-NH₂) Sentezi:



● Biyosensör Hazırlama:



- Glikoz oksidaz enziminin, poli(SNS-NH₂) ve PPA matrisi içerisinde tutulması sonucu yeni bir amperometrik glikoz biyosensörü elde edilmiştir.
- Suda şişebilen, oldukça esnek hidrofilik PPA matrisi sayesinde yüksek enzim aktivitesi hedeflenmiştir.

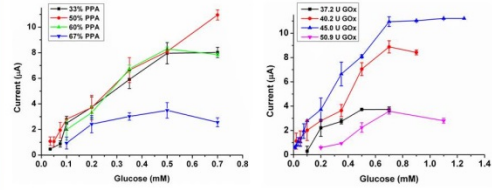
Kaynaklar:

- [1] H. R. Allcock, *Chemistry and Applications of Polyphosphazenes*, John Wiley & Sons, 2003
- [2] M. Gieris, R. de Jaeger, *Phosphazenes: A Worldwide Insight*, Nova Science Publishers, 2004
- [3] D. Uçan, F. Ekiz Kanık, Y. Karataş, L. Toppare, *Sensors & Actuators B: Chemical*, 2014, 201, 545-554

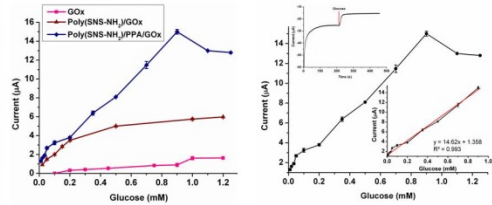
Teşekkür:

Bu proje kısmen Ahi Evran Üniversitesi PYO-FEN.4003/2.13.004 nolu projeden desteklenmiştir.

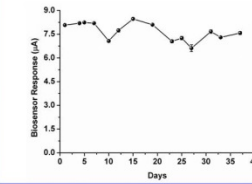
4. Deneyisel Bulgular



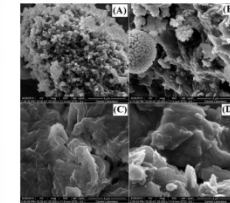
- Farklı glikoz derişimlerinde, biyosensör tepkisi ölçülmüş, optimum PPA oranı %50 olarak belirlenmiştir.
- Farklı enzim miktarlarına göre de optimizasyon deneyleri sonucu, 45.0 U (2.6 mg) glikoz oksidazın en yüksek biyosensör tepkisi verdiği bulunmuştur.



- Poli(SNS-NH₂) ve PPA'nın biyosensör tepkisine katkısı incelenmiştir.
- Hedef matrisin, biyosensörün hassasiyetini arttırdığı görülmüştür.
- Farklı glikoz derişimlerinde biyosensör tepkisi ve kalibrasyon eğrileri belirlenmiştir.
- Hazırlanan biyosensörün oldukça yüksek hassasiyet (237,1 $\mu\text{Amm}^{-1}\text{cm}^{-2}$) gösterdiği bulunmuştur.



- Hedef matris ile hazırlanan biyosensör, bir ay sonra başlangıç aktivitesinin % 95'ini korumuştur.



- Her bir modifikasyon basamağının malzeme morfolojisi üzerine etkisi incelenmiştir; (A) Polifosfazen (PPA), (B) Glikoz oksidazın PPA üzerine, (C) Glikoz oksidazın poli(SNS-NH₂) üzerine ve (D) poli(SNS-NH₂) / PPA üzerine tutulanları sonrası SEM görüntüleri.

5. Sonuç

- Yeni suda çözünür, esnek bir polifosfazenin (PPA), biyosensör uygulamalarında platform olarak kullanılmak amacıyla sentezi gerçekleştirilmiştir.
- Glikoz oksidazın, polifosfazen ve iletken bir polimerden oluşan matris içerisinde tutularak hazırlanan biyosensör, çok yüksek hassasiyet göstermiştir.
- Bir ay boyunca ard arda alınan ölçümlerde biyosensör aktivitesi %95 oranında korunmuştur.
- Hazırlanan biyosensör, glikoz dışındaki diğer substratlara tepki vermemiştir.
- Hazırlanan biyosensör, farklı içeceklerle uygulanmış ve glikoz içeriği başarılı olarak belirlenmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : Uçan Didem

Uyruğu : TC

Doğum Tarihi ve Yeri: 20.04.1991 Ankara

e-mail : ucandidem@gmail.com

Eğitim

Lise :Bağlum Lisesi

Lisans : Ahi Evran Üniversitesi

Yüksek Lisans : Ahi Evran Üniversitesi

Lisans Tezi : -

Yüksek Lisans Tezi : Poli[(metoksietoksi)etoksi-*ko*-3-formilfenoksi]fosfazen’in Sentezi ve Biyosensör Uygulamalarında Kullanımı

Yabancı Dil : -