

**İLETKEN POLİMERLERİN İÇERİSİNDE
ENZİM TUTUKLAMASIYLA YAPILAN
BİYOSENSÖRLER**

Yavuz AYDIN

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Doç. Dr. H. Bekir YILDIZ

Mart - 2012

T.C
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İLETKEN POLİMERLERİN İÇERİSİNDE ENZİM TUTUKLAMASIYLA
YAPILAN BİYOSENSÖRLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yavuz AYDIN

Anabilim Dalı: KİMYA

Programı : BİYOKİMYA

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ

KARAMAN – 2012

TEZ ONAYI

Yavuz AYDIN tarafından hazırlanan “İLETKEN POLİMERLERİN İÇERİSİNDE ENZİM TUTUKLAMASIYLA YAPILAN BİYOSENSÖRLER” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Jüri Üyeleri

İmza:

Tez Savunma Tarihi:/..../.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Yavuz AYDIN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İLETKEN POLİMERLERİN İÇERİSİNDE ENZİM TUTUKLAMASIYLA YAPILAN BİYONSENSÖRLER

Yavuz AYDIN

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ

Mart, 2012, 66 sayfa

PEO olarak kodlanan tiyofen sonlu poli(etilen oksit) ve 3-metiltiyenil metakrilat ve p-vinilbenziloksi poly (etilen oksit) birimleri içeren ve CP olarak kodlanan kopolimerin sabit potensiyel altında yapılan elektroliz yardımıyla su-sodyum dodesil sülfat (SDS), su-paratoluen sülfonik asit (PTSA) ve asetonitril (AN)-tetrabütülamonyum tetrafloroborat (TBAFB) solvent-elektrolit çiftleri kullanılarak PEO ve CP'nin pirol (Py) ile kopolimerleri sentezlendi. CP ve PEO'nun pirol kullanılarak elde edilen kopolimerleri glukoz oksidaz tutuklamaları için kullanıldı. Enzim elektrotlarının optimum pH ve sıcaklıkları, çalışma kararlılıkları ve raf ömürleri tayin edildi. Bu enzim elektrotlarının kinetik parametreleri de ayrıca incelendi. Hazırlanan biyosensörler ile Türkiye'de iki farklı firmaya ait portakal sularındaki glukoz miktarı ölçüldü.

Anahtar Kelimeler: İletken Polimerler, Elektrokimyasal Polimerleşme, Enzim Tutuklaması, Biyosensör, Glukoz Oksidaz

ABSTRACT

Ms Thesis

ENZYME IMMOBILIZATION BIOSENSOR WITH IN CONDUCTING POLYMERS

Yavuz AYDIN

Karamanoğlu Mehmetbey University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ

March, 2012, 66 pages

Graft copolymerization of Thiophene ended poly(ethylene oxide) (PEO) and random copolymer (CP) of 3-methylthienyl methacrylate and *p*-vinylbenzyloxy poly(ethyleneoxide) CP and PEO with pyrrole (Py) were achieved in H₂O - sodium dodecylsulfate (SDS), H₂O - *p*-toluenesulphonic acid (PTSA) and acetonitrile (AN) - tetrabutylammonium tetrafluoroborate (TBAFB) solvent electrolyte couples via constant potential electrolyses. Immobilizations of glucose oxidase enzyme were performed in the matrices obtained via copolymerization of PEO and CP with pyrrole. Immobilization was carried out via entrapment of enzyme in matrices during the polymerization of pyrrole. Temperature optimization, operational stability and shelf-life of the enzyme electrodes were investigated. Maximum reaction rate (V_{max}) and Michaelis-Menten constant (K_m) were determined. The amount of glucose in orange juices of Turkey was investigated by using enzyme electrodes.

Keywords: Conductive Polymers, Electrochemical Polymerization, Enzyme Immobilization, Biosensor, Glucose Oxidase

ÖN SÖZ

Tez konusunun belirlenmesi, çalışmanın yürütülmesi ve tez yazımı aşamasında beni yönlendiren ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Hüseyin Bekir YILDIZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yavuz AYDIN

Mart, 2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖN SÖZ	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. İletken Polimerler	2
2.2. İletken Polimerlerde İletkenlik	3
2.2.1. İletken Polimerlerde İyonik İletkenlik	3
2.2.2. İletken Polimerlerde Elektronik İletkenlik	5
2.3. İletken Polimerlerde İletkenlik Teorisi	6
2.3.1. Band teorisi	7
2.3.2. İletken Polimerlerde Doping İşlemi	10
2.3.3. İletken Polimerlerde Atlama (hopping) Olayı	12
2.4. İletken Polimerlerin Sentez Yöntemleri	13
2.4.1. Kimyasal Yöntem	13
2.4.2. Elektrokimyasal Yöntem	14
2.4.3. Piroliz	14
2.4.4. Kondenzasyon Polimerizasyonu	15
2.4.5. Emülsiyon	15
2.4.6. Gaz fazı yöntemi	16
2.4.7. Ara-yüzey polimerizasyonu	16
2.5. İletken Polimerlerin Kullanım Alanları	16
2.6. Polipirol	17
2.7. Enzimler	19

2.7.1. Enzimlerin Genel Özellikleri	19
2. 7.2. Enzimlerin Normal Katalizörlerden Maddelerden Farkı	21
2.7.3. Enzimlerin Çalışma Mekanizması	22
2.7.4. Enzim Reaksiyonlarının Kinetiği	22
2.7.5. Elektrotların Kimyasal Modifikasyonu	26
2.7.6. Glikoz Oksidaz Enzimi	28
2.7.6.1. GOD'nin Genel Özellikleri	29
2.7.6.2. Glikoz Oksidaz Elektrotu ile Glukoz Tayini	30
2.8. Glikoz Elektrodu	31
2.9. Biyosensörler	33
2.9.1. Biyosensörlerin Çalışma Mekanizması	36
2.9.2. Biyosensörlerin uygulama alanları	36
2.9.3. Biyobileşenler	37
2.9.4. Biyobileşen İmmobilizasyonu	38
2.9.4.1. Kovalent bağlama	38
2.9.4.2. Tutuklama	38
2.9.4.3. Çapraz bağlama	39
2.9.4.4. Adsorpsiyon	40
2.9.5. İletken polimerlerle enzim immobilizasyonu	41
2.10. Performans Faktörleri	41
2.10.1. Kararlılık	41
2.10.2. Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı	42
2.10.3. Seçimlilik	43
2.10.4. Cevap Süresi	45
2.10.5. Tekrarlanabilirlik	47
2.10.6. Diğer Performans Faktörleri	47
3. MATERYAL ve METOT.....	48
3.1. Materyal	50
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	50

3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	50
3.2. Metod	51
3.2.1. Elektrotların hazırlanması	51
3.2.2. Glikoz Oksidaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi	51
3.2.3. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	52
3.2.4. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	52
3.2.5. Optimum pH Değerinin Belirlenmesi	52
3.2.6. Raf Ömrünün Belirlenmesi	52
3.2.7. Çalışma Kararlılığının Belirlenmesi	52
3.2.8. Filmlerin Yüzeylerinin İncelenmesi	53
3.2.9. Enzim Elektrotlarında Protein Tayini	53
3.2.10. Portakal Sularındaki Glikoz Miktarının Lane-Eynon ve Enzim Elektrotlarının Kullanarak Belirlenmesi	53
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	54
4.1. Enzim Elektrotları İçin Protein Tayini	54
4.2. Kinetik Çalışmalar	54
4.3. Sıcaklık Etkisi	55
4.4. pH Etkisi	56
4.5. Enzim Elektrotların Kullanım Kararlılığı ve Raf Ömrü	57
4.6. Portakal Suyu İçerisindeki Glikoz Miktarı Tayini	59
4.7. Enzim Elektrotlarının Yüzey Yapılarının İncelenmesi	61
5. SONUÇLAR.....	62
6. KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : Değişik asitlerle dop edilmiş polianilin'in iletkenlik değerleri	10
Çizelge 2.2 : Dop edilmiş bazı iletken polimerlerin yapıları ve iletkenlikleri	11
Çizelge 2.3 : Biyosensörlerle tayin edilebilen bazı maddeler	35
Çizelge 4.1 : Serbest ve İmmobilize Glukoz Oksidaz için kinetik parametreler	55
Çizelge 4.2 : Enzim elektrotları tarafından D ve M markalarına ait portakal sularında (g/100 mL) tayin edilen glikoz miktarları	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 : Konjuge yapıya sahip Poliasetilen	3
Şekil 2.2 : Sulu çözeltideki NaCl tuzunun iyonik iletkenliğinin polimerde çözünmüş bir tuzun iyonik iletkenliği ile karşılaştırılması	4
Şekil 2.3 : Konjugasyon hatalarının poliasetilen üzerinde gösterimi	6
Şekil 2.4 : Orta büyüklükteki polimer molekülünde bağ ve anti bağ orbitallerinin oluşumu	7
Şekil 2.5 : İletken (a), yarı iletken (b) ve yalıtkan (c) maddelerde band aralığı	8
Şekil 2.6 : a) Zincir üzerinde yükün taşınması b) Zincirler arasında yükün taşınması c) Partiküller arasında yükün taşınması	12
Şekil 2.7 : Pirolün elektrokimyasal yükseltgenme ile polimerleşme mekanizması	18
Şekil 2.8 : E enzimi, S substratı, ES ara bileşiği ve P ürünü göstermektedir	23
Şekil 2.9 : Reaksiyon hızının substrat derişimi ile değişimi	24
Şekil 2.10 : Lineweaver-Burk grafiği	24
Şekil 2.11 : Sıcaklıkla reaksiyon hızının değişimi	26
Şekil 2.12 : Aktivasyon enerjisinin belirlenmesi	26
Şekil 2.13 : Glikoz oksidaz enziminin reaksiyonu	28
Şekil 2.14 : GOD immobilize edilmiş POAF'ün PPy-Pt nanokompozit filmi üzerine kaplanmasıyla oluşturulmuş glukoz sensörü ve işleyiş mekanizması	30
Şekil 2.15 : O ₂ varlığında glikoz ve glikoz oksidaz arasındaki enzimatik reaksiyonu	32
Şekil 2.16 : Bir biyosensörün genel şematik gösterimi	34
Şekil 2.17 : Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri	39
Şekil 2.18 : Direkt bağlama ile enzim immobilizasyonu(a) Enzim çözeltisi b) çapraz bağlayıcı reaktif ilave edilmesi	40
Şekil 3.1 : CP-co-PPy iletken kopolimer yapısı	48
Şekil 3.2 : PEO-co-polipirol kopolimer iletken yapısı	49
Şekil 4.1 : PPy (◆), PEO-co- PPy (■) CP-co- PPy (▲) için glikoz oksidaz aktivitesi üzerinde sıcaklık etkisi.....	56
Şekil 4.2 : PEO-co-polipirol (■), CP-co-polipirol (▲) polipirol (◆) için glikoz oksidaz aktivitesi üzerine pH etkisi	57
Şekil 4.3 : PEO-co-PPy/GOD çalışma kararlılığı (◆); CP-co-PPy/GOD (■) elektrotlar	58

Şekil 4.4 : PEO-co-PPy/GOD raf ömrü (◆); CP-co-PPy/GOD (■) elektrotlar	59
Şekil 4.5 : PEO-co-PPy' ye ait SEM görüntüsü	61
Şekil 4.6 : PEO-co-PPy/GOD' ye ait SEM görüntüsü	61

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

GOD

Glikoz oksidaz

POD

Peroksidaz

K_m

Michaelis-Menten sabiti

NMR

Nükleer Manyetik Rezonans

PAn

Polianilin

PT

Politiyofen

PPy

Polipirol

PEO

Polietilenoksit

S

İletkenliğin birimi (siemens)

[S]

Substrat derişimi

V

Reaksiyon hızı

V_{max}

Reaksiyonun maksimum hızı

1. GİRİŞ

Canlıların çevrelerindeki değişimi algılama ve yanıt verme mekanizmaları, biyosensörlerin geliştirilmesi için temel oluşturmaktadır. Biyosensörler; genelde biyolojik analizler için kullanılan bir çeşit özel sensördür ve "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) tarafından, "kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar" olarak tanımlanmaktadır.

Biyosensörler, birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal (reseptör) diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden (dönüştürücü) oluşmaktadır. Biyosensörlerin reseptör kısımlarında algılayıcı olarak kullanılan maddelerden biri de enzimlerdir.

Enzimler kimyasal tepkimelere katıldıklarında birçok ölçülebilir reaksiyon ürünü (proton, elektron, ışık ve ısı gibi) meydana getirdiklerinden, biyoreseptör olarak kullanılan popüler biyomoleküllerdir.

Bu çalışmada, biyobileşen olarak glikoz oksidaz enzimi kullanıldı ve glukoz tayini için yeni bir biyosensör geliştirildi. Enzimlerin dış etkenlerden etkilenmesi ve pahalı oluşlarından dolayı tekrar kullanılmaları amacıyla, polimerizasyon tepkimesi esnasında monomerlerin bulunduğu ortama enzimlerde ilave edilerek, enzimlerin polimer zincirleri arasında immobilize edilmesi sağlandı. Bu sayede immobilize edilen enzimler tekrar kullanılabilir ve istenildiği anda reaksiyona son verilebilir hale getirildi.

Elde edilen bu biyosensör ile Türkiye'de üretilen iki farklı firmaya ait portakal suyu numunelerindeki glikoz miktarı analiz edilmiş olup, biyosensörde reseptör olarak görev yapan glikoz oksidaz enziminin K_m ve V_{max} gibi kinetik parametrelerinin yanında, optimum sıcaklık, optimum pH, raf ömrü ve çalışma kararlılığı gibi değerler de incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. İletken Polimerler

Polimer, monomer denen küçük moleküllü yapıların polimerizasyon tepkimesi sonucu yan yana gelerek oluşturdukları büyük mol kütleli, uzun zincirli yapılara denir. Polimerler metallerle kıyaslandığında, polimerlerin genellikle metallerden daha hafif ve ucuz olduğu, kolay şekil alabildiği fakat iletken olmadıkları göze çarpmaktadır. Metallerin ise zor işlenebilen, ağır, pahalı olmalarının aksine iletkenlikleri yüksek maddeler olduğu bilinmektedir. Polimerler ile metallerin üstün özellikleri bir araya getirilerek iletkenlik özelliği taşıyan polimerlerin elde edilmesi mümkün olmuştur. Bu amaçla hazırlanan polimerler, iletken polimerler olarak isimlendirilmiştir (Coşkun, 2009).

“İletken polimerler” terimi elektriği dağıtabilen veya iletebilen özel polimerler olarak geniş manasıyla tanımlanmıştır, fakat bu terim gerçekte tamamıyla farklı iki tür polimerleri içerir. Birinci tür polimerler karbon siyahı, metal tabakaları ve metal fiberleri gibi iletken dolgu maddeleri ile birleştirilmiş polimerleri içerirler ve bunlar ticari olarak kullanılan polimerlerin çoğunu oluştururlar. İkinci tür polimerler ise kendiliğinden iletken polimerler (KİP) olup, kimyasal yapıları nedeniyle kendi molekül zincirleri boyunca elektriği dağıtabilen veya iletebilen polimerlerdir (Kalaycı, 2008).

İletken polimerler konusundaki çalışmalar 1950’lerde başlamıştır. İletkenlikleri oda sıcaklığında 10^{-5} S/cm olan yarı iletken polimerler 1950-1960 yılları arasında üretilmiştir. Günümüzdeki anlayışa uygun iletken polimerler 1970’lerin sonunda ortaya çıkmaya başlamıştır. Shirakawa yöntemiyle üretilen poliasetilenin yükseltgen ile dop edilmesi sonucunda iletkenliğinin 10^8 kat arttırıldığı görülmüştür (Akbulut, 1999). İletkenlik konusunda en önemli adım 1979’da Diaz’ın pirolü elektrokimyasal yöntemle yükseltgeyerek polipirolü üretmesiyle atılmıştır. Polipirol anot üzerinde üretilebilmiş ve güçlü bir film olarak yüzeyden çıkarıldığında iletkenliği 100 S/cm’ye ulaşabilmiştir. Benzer şekilde, elektro yükseltgenme yöntemiyle iletken politiyofen anot üzerinde üretilebilmiştir (Muhammet, 2008).

İletken polimerler, ana iskelet zincirlerinde zayıf bağlı elektronlar içeren polimerler olarak tanımlanırlar. Polimerlerin elektronik iletkenlik gösterebilmesi için, polimer örgüsünde, elektronların zincir boyunca taşınmasını sağlayan uygun yerlerin bulunması gerekir. Bu koşulu ana zincirinde konjuge çift bağlar bulunan polimerler sağlar. İletken polimerleri, diğer polimerlerden ayıran temel özellik, sırayla değişen tek ve çift bağlardan oluşan bir zincir yapısına sahip olmalarıdır. Bu şekilde sırayla değişen bağ yapısına; “konjügasyon” denir. Bu nedenle iletken polimerlere “konjüge polimerler” de denmektedir.



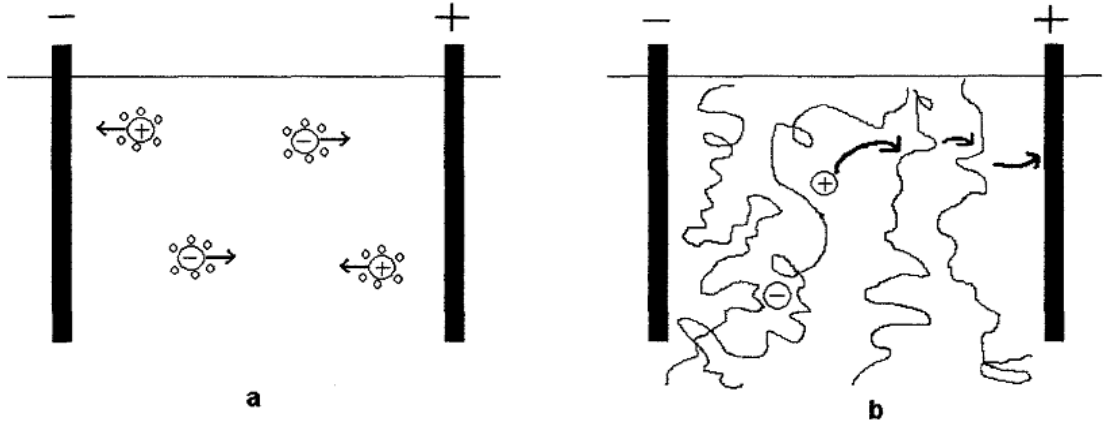
Şekil 2.1. Konjuge yapıya sahip poliasetilen

İletken bir polimerin temel özelliği polimerin omurgası (ana zincir) boyunca konjuge (ardışık sıralanmış) çift bağların olmasıdır. Konjugasyonda, karbon atomları arasındaki bağlar birbiri ardı sıra değişen tek ve çift bağlar şeklinde dizilmişlerdir. Her bir bağ kuvvetli bir kimyasal bağ olan “sigma” (σ) bağı içerir. İlaveten, her çift bağda daha zayıf (% 30) ve daha az lokalize olmuş bir “pi” (π) bağı vardır. Bunlara rağmen, konjugasyon, polimer maddeyi iletken yapmak için yeterli değildir. Fakat bunlara dopant maddeleri girtilerek iletkenliği artırılabilir. Dopantların yaptığı şey malzeme içerisinde elektron ve “hole” lerin sayısını arttırmaktır. Bir elektron eksikliğinin olduğu konuma bir hole denir. Böyle bir “hole” komşu bir konumdan atlayan bir elektronla doldurulduğunda yeni bir hole oluşturulur ve bu durumun böyle devam etmesiyle yükün uzun bir mesafeye göç etmesi sağlanır.

2.2. İletken Polimerlerde İletkenlik

2.2.1. İletken Polimerlerde İyonik İletkenlik

Bazı polimer molekülleri tuzlar için katı çözücüdürler. Bu özellikten yararlanarak elektriği iyonik mekanizma üzerinden ileten polimerler hazırlanabilmektedir. Suda çözünen NaCl’ nin elektriği iletme mekanizmasına dayanarak bu tür polimerlerdeki iyonik iletkenlik açıklanabilmektedir.



Şekil 2.2. Sulu çözeltideki NaCl tuzunun iyonik iletkenliğinin polimerde çözülmüş bir tuzun iyonik iletkenliği ile karşılaştırılması, a) Sulu NaCl çözeltisi, b) Polimerde çözülmüş tuz

NaCl çözeltisinde Na^+ ve Cl^- iyonlarının elektrik potansiyeli altında zıt elektrotlara göçü ile elektrik iletir (Şekil 2.2a). Ortamdaki çözücü moleküllerin çözünen iki iyonu solvatize etme yeteneğine bağlı olarak iyonların birbirinden ayrılması kolaylaşır. Genelde iyonik iletkenlik gösteren polimerlerin yapısında elektron verici bir grup bulunmaktadır. Polimerin yapısında yer alan bu gruplar tuzun katyonik bileşiği ile zayıf bağlar oluştururlar. Böylece polimer, tuzun her iki iyonunu veya birini solvatize eder ve iyonların ayrılmasını kolaylaştırır. İyonlar birbirinden yeterince uzaklaşmadığı sürece iyon çifti olarak kalmayı tercih edeceklerinden yük taşıyıcı olarak görev yapmayacaklardır.

Ancak solvatizasyon ile iyonlar yeterince birbirinden ayrılırsa da uygun elektroda göç etmek için yeterli hareketliliğe sahip değilseler, böyle bir sistem zayıf iletkendir. Bu nedenle polimerlerin yeterince esnek olması ve iyon göçüne izin verecek yeterli serbest hacme sahip olması gerekir kısaca, polimerin camsı geçiş sıcaklığı ve kristallik derecesi düşük olmalıdır.

Polimerlerde iyonik iletkenliğin mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen şu şekilde açıklama getirilebilir. Ortamda kullanılan elektrolitin anyon veya katyonlarının her ikisi veya biri polimer zinciri üzerindeki gruplara zayıfça bağlanırsa, bu gruplar polimerin ısı etkisi ile yapacağı eğilip bükülme hareketi ile zincirler arasında taşınacaklardır. Bu taşınma polimer üzerindeki bir grubun bir başka polimer zincirindeki benzer gruba iyon transferi şeklindedir. Eğer ortama elektriksel potansiyel

uygulanırsa iyon difüzyonu tek yönde olacaktır. Örneğin, katyon, bir polimer molekülünden diğerine atlayarak katoda doğru göç edecektir (Şekil 2.2b).

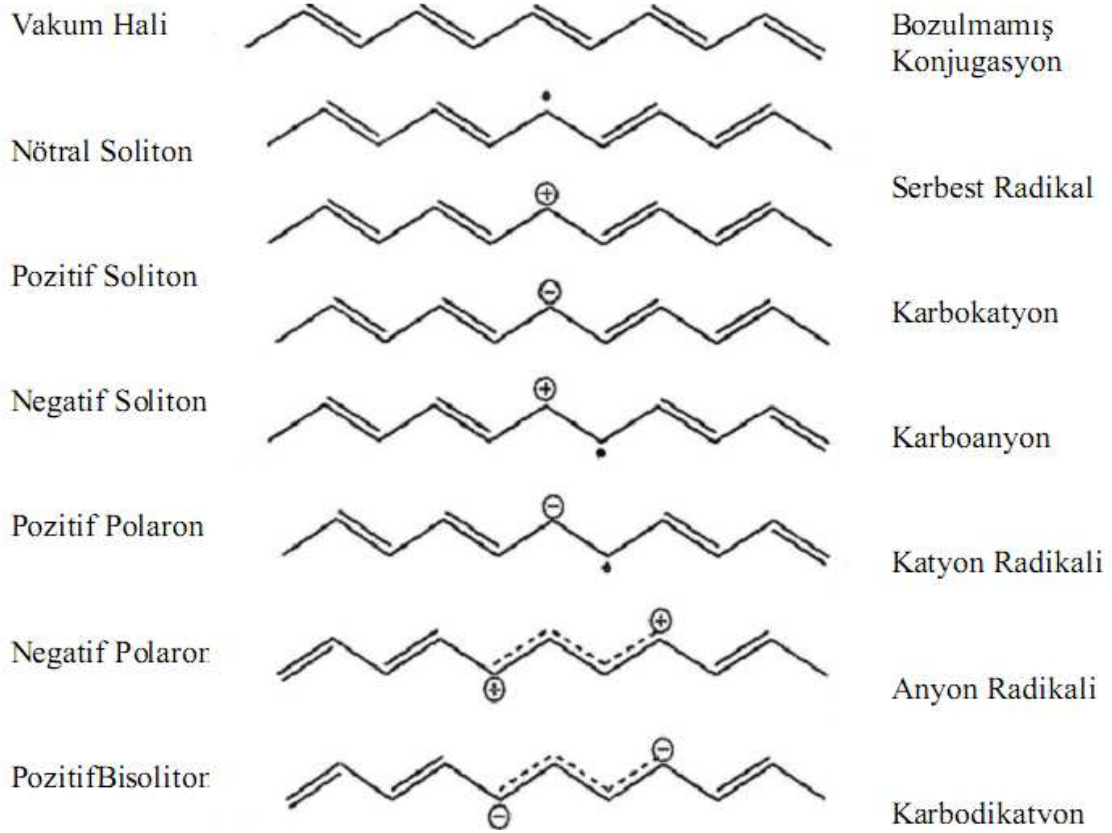
Burada iyon difüzyonuna olanak sağlayan serbest hacmin, iyon taşınmasındaki önemi ortaya çıkmaktadır. Bu mekanizma, amorf polimerin, elektriksel iletkenliğini açıklamada niçin daha uygun olduğunu ve sıcaklığın yükselmesiyle iletkenliğin niçin arttığını açıklamaktadır (Şahmetlioğlu, 2004).

2.2.2. İletken Polimerlerde Elektronik İletkenlik

Elektriği, elektronik yolla ileten poliasetilen, polianilin, polipirol gibi polimerlerde iletkenlik mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Elektronik iletkenliğin açıklanmasına yönelik kuramsal yaklaşımlardan birisi band kuramıdır. Birer elektronu bulunan benzer iki atomun bir araya gelerek oluşturduğu iki atomlu bir bileşiğin (H_2), bağ yapmadan önceki ve bağ yaptıktan sonraki elektron düzeyleridir (Batır, 2009). Polimerlerde delokalize elektronlar tarafından sağlanan elektriksel iletkenlik metallerde ve yarı iletken sistemlerde olduğu gibi Band Teorisi ile açıklanır. Bu teoriye göre organik maddeler yüksek enerjili elektronlar ile iletkenlik bandı arasında geniş enerji aralığına sahip delokalize elektronlara sahiptirler ve bu nedenle yalıtkanlardır (Kittel, 1986). Elektriksel iletkenliğin olabilmesi için elektronların serbestçe hareket etmesi gerekir. Bu da dolu ve boş bantların birbirine bitişik olması ile sağlanabilir. Eğer bir maddede enerji bantlarından biri elektronlarla tamamen dolu ve kendisinden sonra gelen boş enerji bandı ile arasındaki enerji farkı büyük ise, madde yalıtkanlıktır. Metallerde ise bu enerji bandı olmadığı için elektronlar kolayca hareket edebilecek ve böylece iletkenlik sağlanmış olacaktır. Buna göre bazı polimerler, metallere yalıtkanlar arası bir iletkenliğe sahiptir. Bu polimerlere iletken polimerler denir. Bir polimerin iletkenliğinin büyüklüğü, örgüsündeki yük taşıyıcıların sayısı (n) ve bunların hareket yetenekleriyle (μ) yakından ilişkilidir. Bu ilişki, e elektron yükünü göstermek üzere, $\sigma = n \cdot \mu \cdot e$ şeklindedir. Artı yük taşıyıcıların (katyon veya artı yüklü boşluklar) bulunduğu tuz çözeltilerinde ve yarı iletkenlerde, artı yük taşıyıcıların iletkenliğe olan katkısı yukarıdaki bağıntıya eklenmelidir (Saçak, 2004).

2.3. İletken Polimerlerde İletkenlik Teorisi

Poliasetilen, polianilin ve polipirol gibi konjuge polimerlerin optik absorpsiyon çalışmaları sonucunda, bu polimerlerin değerlik bandını iletkenlik bandından ayıran yasak enerji aralığının yarı iletkenlerde olduğu gibi 1,4-3 eV arasında olduğu anlaşılmıştır. Bir yarı iletkende elektronun, değerlik bandından iletkenlik bandına çıkması ile sistemin yapısı değişmez. Konjuge çift bağ yapısına sahip polimerlerde ise elektronik uyarma, örgünün relaksasyonuna neden olmaktadır. Polimerlerde iki tür yapısal relaksasyon olduğu kabul edilmektedir. Birincisi polimer zinciri boyunca oluşan tek düze relaksasyon, ikincisi ise lokal olarak yapısal deformasyona neden olan relaksasyondur. Bunların sonucunda polimer zinciri üzerinde serbest radikal (soliton) olarak isimlendirilen farklı spin yük konfigürasyonuna sahip hata merkezleri oluşturulabilmektedir. Şekil 2.3'de oluşabilecek hata türleri, poliasetilenin yapısı üzerinde iletkenlik teorilerinde kullanılan katı hal fiziği terimleri (solda) ile kimyasal isimlendirmeler (sağda) birlikte verilerek gösterilmiştir (Can, 2010).

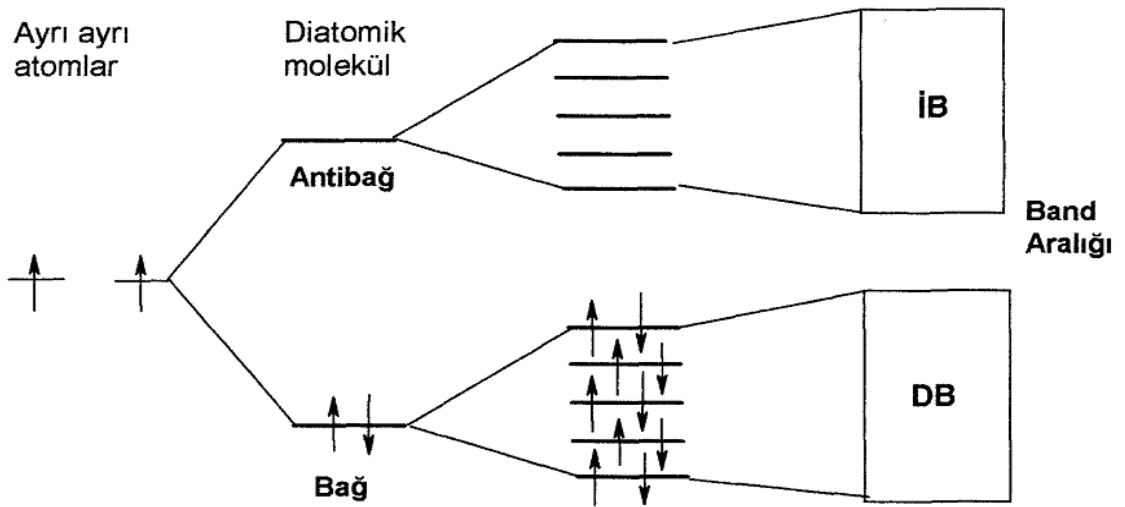


Şekil 2.3. Konjugasyon hatalarının poliasetilen üzerinde gösterimi

Katkılama sonucu oluşan solitonun enerji düzeyi, poliasetilenin yasak enerji aralığının ortasında yer alır. Poliasetilen ve diğer konjuge polimerlerde katkılama ile polaronik hatalar da oluşur ve polaronun elektronik enerji düzeyleri yasak enerji aralığında simetrik olarak, iletkenlik ve değerlik bandına yakın konumlarda bulunur. Katkı maddesinin fazla eklenmesi durumunda veya elektrokimyasal olarak katkılama miktarının dolayısıyla polaronların derişimi daha da artırılırsa, polaronlar kendi aralarında etkileşerek bipolaronları oluştururlar. Soliton türü hataların sadece zincir boyunca aktarımının mümkün olmasına karşılık bipolaronik hataların bir zincir üzerinden diğerine atlayabilecekleri belirtilmiştir. Sonuç olarak katkılama ile yasak enerji aralığındaki enerji düzeylerine yerleşen soliton, polaron ve bipolaron gibi yapılar polimerlere iletkenlik kazandırmaktadır (Aydın, 2002).

2.3.1. Band teorisi

Elektriği, elektronik yolla ileten poliasetilen, polianilin, polipirol gibi polimerlerde iletkenlik mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. İletken polimerlerde elektronik iletkenlik kuramsal yaklaşımlardan biri olan band kuramı ile açıklanmaktadır. Birer elektronu bulunan benzer iki atomun bir araya gelerek oluşturduğu iki atomlu bir bileşimin (H_2), bağ yapmadan önceki ve bağ yaptıktan sonraki elektron enerji düzeyleri Şekil 2.4’de görülmektedir.

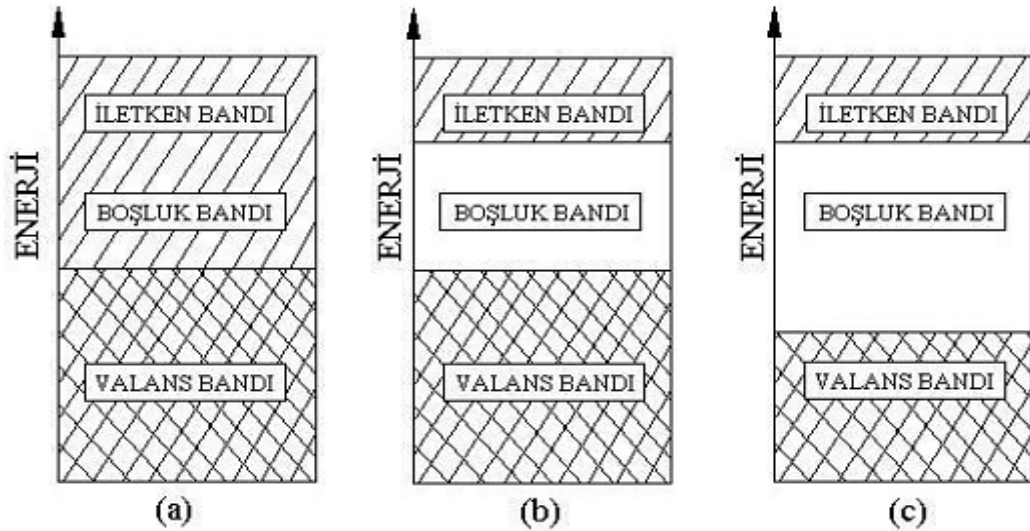


Şekil 2.4. Orta büyüklükteki polimer molekülünde bağ ve anti bağ orbitallerinin oluşumu (Şahmetlioğlu, 2004)

Bağ oluşumu sırasında iki yeni enerji düzeyi ortaya çıkar. Bunlar, iki elektronun bulunduğu bağ enerji düzeyi (bağ orbitali) ve boş olan antibağ enerji düzeyidir (antibağ orbitali). Bağ enerji düzeyindeki elektronlar, ısı veya ışık etkisiyle yeterli enerji alarak daha yüksek enerjili antibağ enerji düzeyine çıkabilirler. Daha karmaşık moleküller (birden fazla elektronu olan moleküller) arasında bağ oluşumu da aynı şekilde açıklanabilir. Moleküle her yeni atom katılmasında, molekülün elektronik yapısına yeni bir bağ ve anti bağ enerji düzeyi eklenir. Bu durum, yine Şekil 2.4'de orta büyüklükte bir molekül için gösterilmiştir.

Molekül büyüklüğü arttıkça bağ orbitallerinin sayısı artar ve orbital enerji düzeyleri arasındaki fark azalır. Bir noktada birbirinden net ayrılmış enerji düzeyleri yerine sürekli görünümdeki bir enerji bandı oluşur. Bu banda, bağ bandı veya valens bandı denilir. Bağ bandı içerisinde bulunan elektronlar kolayca yerlerini değiştirerek band içerisinde hareket edebilirler.

Bağ bandı oluşumuna benzer şekilde sayıları sonsuza yaklaşan antibağ orbitalleri de başka bir enerji bandı oluşturur (iletkenlik bandı). Yüksek mol kütleli polimerlerde yüzlerce, binlerce atom bulunacağı için molekül orbitallerinin sayısı oldukça fazladır. Bağ bandı ve iletkenlik bandı arasındaki aralığa band eşiği veya band aralığı, bu aralığın geçilmesi için gerekli enerjiye ise band eşik enerjisi adı verilir. Maddelerin yalıtkan, yarı iletken, iletken şeklinde elektriksel iletkenlikleri açısından gruplandırılmasında band eşik enerjisinin büyüklüğü önemlidir.



Şekil 2.5. İletken (a), yarı iletken (b) ve yalıtkan (c) maddelerde band aralığı

Elektriksel iletkenlikten, iletkenlik bandında, bağ bandında veya bağ eşiğindeki yeni bir enerji düzeyinde bulunan çiftleşmemiş elektronlar sorumludur. Bu tür serbest elektronlar, sisteme uygulanan potansiyele bağlı olarak uygun yönde hareket ederler. Bağ bandı enerji düzeyleri tamamen elektronlarca dolu olduğunda elektronların bir yöne akımını sağlamak zordur. Böyle bir sistemde ısı veya ışık uyarısıyla serbest elektronlar oluşturulabilir. Yeterli enerjiye ulaşan bağ bandının en üst düzeyindeki elektronlar, band eşiğini geçerek iletkenlik bandının en alt düzeyindeki enerji seviyesine yerleşirler. Yalıtkanlarda bağ eşiği bu geçişe izin vermeyecek kadar geniştir. Geleneksel polimerlerin çoğu benzer davranış gösterdikleri için yalıtkanlardır. Yarı iletkenlerde band eşik uyarısı, yalıtkanlardan daha küçüktür ve iletkenlikleri 10^{-6} - 10^2 S/cm aralığında değişir. Bu düzeydeki elektriksel iletkenlik düşük gibi gözükse de, yeterli elektrik akımı sağlayacak büyüklüktedir. Ana zinciri üzerinde ardı ardına tek ve çift bağ sıraları içeren konjüge polimerler yarı iletkenlik gösterebilirler.

Yarı iletken polimerlerde valans bandı ve iletkenlik bandı arasındaki enerji seviyesi yeterince düşük olduğunda, ısı veya ışık etkisiyle serbest elektronlar iletkenlik bandının en düşük enerji düzeyine geçebilirler. Bu elektronlar iletkenlik bandı içerisinde hareket ederek yük taşıyıcı işlevi yapar ve zincir boyunca ilerleyerek artı yüklü yöne doğru yönelir. Bu sırada bağ bandı içerisinde kalan artı yük boşluğu, polimer zinciri üzerinde elektrona ters yönde hareket eder. Elektriği bu yolla ileten maddelere intrinsik yarı iletkenler denir ve iletkenlikleri sıcaklık ya da ışık yoğunluğunun artışıyla yükselir.

Serbest elektron oluşturma yollarından ikincisi, dıştan yapılan bir etkiyle polimerden elektron almak veya polimere elektron vermektir. İndirgen ya da yükseltgen kimyasallar veya elektrokimyasal yöntem bu amaçla kullanılabilir. Önceden tanımlandığı gibi, bir polimere uygun yöntemlerle elektron verilmesine veya elektron uzaklaştırılmasına doplama veya dop etme denir. Doplama amacıyla kullanılan kimyasal maddelere dopant adı verilir. Polimer sentezinde kullanılan dopantın türü polimerin iletkenlik düzeyini etkiler. Dop işlemiyle yük taşıyıcıların sayısı artırılır. Polimere elektron verilmiş ise, bu elektronlar band bağ eşiğinde yeni bir enerji düzeyine yerleşebilir ve band eşik enerjisini düşürür.

Çizelge 2.1. Değişik asitlerle dop edilmiş polianilin'in iletkenlik değerleri (Batr, 2009)

Asit	İletkenlik (S/cm)
Hidroklorik asit	$1,7 \times 10^{-1}$
Fosforik asit	$4,5 \times 10^{-2}$
Formik asit	$3,3 \times 10^{-4}$
<i>p</i> -toluen sülfonik asit	$4,6 \times 10^{-6}$

Çoğu metal atomu tek elektrona sahiptir, komşuluğundaki bir başka metal atomuyla da kovalent bağ yapmaz. Bu nedenle Şekil 2.5’de görülebileceği gibi metallerin bağ bandı kısmen dolu, iletkenlik bandı ise boştur. Ayrıca, elektron hareketi için engel oluşturan bir band eşiği de söz konusu değildir. Metal elektronları, valens bandın düşük enerjili orbitallerinde yüksek olasılıkla bulunurlar ve aynı band içerisinde veya aynı band ile örtüşmüş iletkenlik bandında geçebilecekleri daha üst enerji düzeyli boş yerler her zaman vardır. Elektron iletimini kısmen dolu valens ya da iletkenlik bandı üzerinden veya band eşiği geçişiyle kolayca sağlarlar (Saçak, 2006).

2.3.2. İletken Polimerlerde Doping İşlemi

Doping yapma işlemi, iletken polimerler hazırlamak için konjuge π bağlarına sahip olan bir polimeri uygun bir reaktif ile indirgemek veya yükseltmek ile gerçekleştirilir (Trung ve ark., 2005).

Polimerler aşağıdaki tekniklerle doplanabilirler (Bernasik ve ark., 2005):

1. Gaz fazında doping,
2. Çözelti ortamında doping,
3. Elektrokimyasal doping,
4. Radyasyon kaynaklı doping,
5. İyon değişimi dopingi.

Bu tekniklerden ilk üçü daha az maliyetli olduğu için tercih edilmektedir. Gaz fazında doping işleminde, polimerler vakum altında dopantın buharına maruz bırakılır. Çözelti ortamında doping işlemi ise; doping maddesinin çözünebildiği bir çözücünün kullanılması ile gerçekleştirilebilir. Doping yoluyla iletkenliğin sağlanabilmesi şu şekilde açıklanabilir: Polimerlerde değerlik kabuğundaki elektronlar ya yükseltgen bir reaktif ile koparılabilir ve değerlik kabuğu pozitif hale gelir veya indirgen bir reaktif ile boş iletkenlik bandına bir elektron verilebilir. Bu işlemler, yükseltgenmeye karşılık olmak üzere p-türü doping, indirgenmeye karşılık olmak üzere n-türü doping olarak isimlendirilir. Doping işlemi sırasında doping moleküllerinin hiç birisi polimer atomları ile yer değiştirmez, doping molekülleri yalnızca elektronların enerji kabuklarından geçişlerine yardımcı olurlar. Doping yapıcı maddeler veya dopantlar ya güçlü indirgen veya güçlü yükseltgen maddelerdir. Bunlar kolaylıkla iyon oluşturabilen inorganik tuzlar veya bileşikler, nötral moleküller, organik dopantlar ve polimerik dopantlar olabilirler (Randriamahazaka ve ark., 2005). Dopantların yapısı iletken polimerlerin kararlılığında önemli rol oynar.

Çizelge 2.2. Dop edilmiş bazı iletken polimerlerin yapıları ve iletkenlikleri

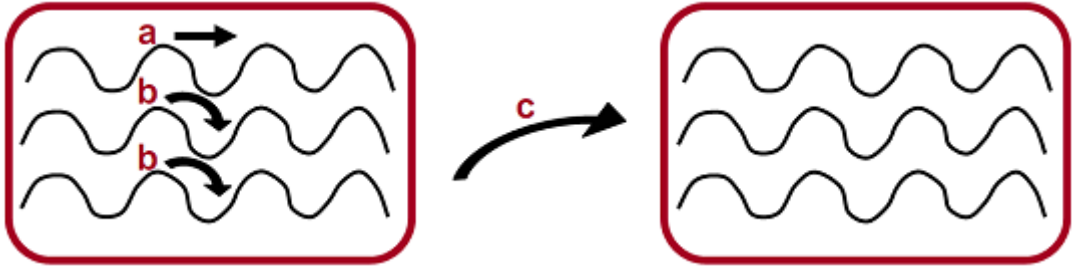
Polimer	Tekrareden birim	Doping maddeleri	Renk	
			doyurulmamış	doyurulmuş
Poliasetilen (trans) (PA)		I ₂ , Br ₂ , Li, Na, AsF ₅		
Polipirol (PPyr)		BF ₄ ⁻ , ClO ₄ ⁻ , Cl ⁻ , tosilat	sarı- yeşil	mavi- siyah
Politiyofen (PT)		BF ₄ ⁻ , ClO ₄ ⁻ , Cl ⁻ , tosilat, FeCl ₄ ⁻	kırmızı	mavi
Poliparafenilen (PPP)		AsF ₅ , Li, K		
Polianilin (PANI)		HCl, asitler	mavi	yeşil
Poli(parafenilen vinilen) (PPV)		AsF ₅		
Polifenilen sulfid (PPS)		AsF ₅		

2.3.3. İletken Polimerlerde Atlama (hopping) Olayı

Son yıllarda iletken polimerlerde iletkenliğin yalnızca uzun konjuge zincirler sayesinde oluşmadığı, fakat polimer zincirinde elektronik yükün hareketini açıklayan başka bir faktörün rol oynadığı belirlenmiştir. Buna atlama (hopping) denilmektedir (Wang ve ark., 1992).

Polimer zincirinde elektronik yükün hareketi üç şekilde olmaktadır:

- Kristal bir yapıda zincir üzerinde
- Kristal bir yapıda zincirden zincire
- Amorf bir bölgede zincirden zincire



Şekil 2.6. a) Zincir üzerinde yükün taşınması, b) Zincirler arasında yükün taşınması, c) Partiküller arasında yükün taşınması

Buradan yola çıkılarak ve konjuge sistemlerden biraz taviz verilerek yukarıda bahsedilen hopping olgusunun arttırılmasına çalışılmaktadır. Bu ise, son yıllarda aşırı ve karışım türü polimerlerin ele alınmasına yol açmıştır.

2.4. İletken Polimerlerin Sentez Yöntemleri

İletken polimerleri sentezlemek için belli başlı dört metot kullanılmaktadır. Bunlar; elektrokimyasal polimerizasyon, kimyasal polimerizasyon, piroliz ve katalitik polimerizasyon teknikleridir. Bu polimerizasyon metotlarından sıkça kullanılanları elektrokimyasal polimerizasyon ve kimyasal polimerizasyondur.

İletken polimerlerin sentezinde, başlangıçta kullanılan monomerler sonuçta oluşan polimerin yapısında korunabilen tipik aromatik veya çoklu konjuge bağ yapısına sahiptirler. Örneğin asetilenin polimerizasyonu sonucu konjuge etilen birimleri içeren polietilen oluşmaktadır. Benzenin polimerizasyonunda ise birbirine kovalent bağlı aromatik zincirli poli(p-fenilen) oluşur. Bu şekilde elde edilen iletken polimerlerin yapısında π – konjugasyonunun uzatılması çok önemlidir.

2.4.1. Kimyasal Yöntem

Kimyasal yöntemde, uygun bir çözücüde çözülen monomer bir yükseltgenme veya indirgenme aracı olarak kullanılan bir kimyasal madde ile etkileştirilerek polimerleştirilir. Bu yöntemde yükseltgenme basamağının kontrol edilememesi ve oluşan ürünün saf olmaması dezavantaj oluşturmaktadır. Kimyasal polimerizasyon yönteminin istenilen miktarda ve makul bir maliyetle ürün elde etmek gibi avantajları vardır. Kimyasal yöntemde, kullanılacak olan doping maddesi ve katalizörün elde edilecek iletken polimerin elektriksel iletkenliği üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır (Toshima ve Hara 1995). Toshima tarafından yapılan poli(p-fenilen)'in sentezi çalışmasında doping maddesi olarak CuCl_2 ve katalizör olarak AlCl_3 'ün kullanılması ile elde edilen polimer elektriksel iletkenlik göstermemiştir. Ancak doping maddesi olarak AsF_5 veya Li gibi maddelerin kullanılması ile $0,3 \text{ S.cm}^{-1}$ - 500 S.cm^{-1} arasında değişen iletkenlik gözlenmiştir. Konjuge polimerlerin tümü kimyasal yöntemle sentezlenebilmektedir. Başka bir çalışmada, çözücü olarak metanol, doping maddesi olarak 2,5 M FeCl_3 kullanılarak pirolün kimyasal yöntemle polimeri hazırlanmış ve iletkenliğinin 190 S.cm^{-1} 'e ulaştığı belirlenmiştir (Toptaş, 2006).

2.4.2. Elektrokimyasal Yöntem

Elektrokimyasal yöntem, iletken polimer sentezinde eskiden beri bilinen bir yöntem olup, değişik tekniklerle beraber günümüzde de sıkça uygulanmaktadır. Bu metotta, monomer uygun bir çözücü veya destek elektrolitle beraber polimerleşme hücresine konularak yapılan elektroliz sonucunda, elektrot yüzeyinde veya çözeltide polimer elde edilebilmektedir. Polimerleşme hücresi genellikle, çalışma, karşı ve referans elektrottan oluşan üç elektrotlu bir sistemdir. Hücre içine konulan sulu veya susuz ortamdaki monomer çözeltinin, dönüşümlü voltametri (CV) tekniği ile uygun bir voltamogramı alınarak sabit akım veya sabit potansiyelde polimerleşme gerçekleştirilmektedir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, monomerin yükseltgenme veya indirgenme potansiyelinde çözücü olarak, destek elektrolit ve elektronların reaksiyon vermemesidir. Monomerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi ile oluşan radikal anyon veya radikal kation zinciri büyümekte ve bunlar da iletken polimer zincirleri oluşturmaktadır. Elektrokimyasal polimerleşmede kontrollü potansiyel veya akım uygulaması (sabit potansiyel ve sabit akım elektroliz), başlangıcı ve bitiş basamaklarının kontrol edilebilmesi gibi üstünlükleri vardır. Bu yüzden kimyasal yönteme göre daha saf, yan ürünlerden ve kirlilikten arınmış ürünler elde etmek mümkündür (Batır, 2009).

2.4.3. Piroliz

Piroliz, iletken organik materyaller elde etmek için bilinen en eski yöntemdir. Bu yöntemde uzun bir aromatik yapı oluşturmak için ısıtma ile polimerden halojen, oksijen ve azot gibi hetero atomlar uzaklaştırılır pirolizin bu safhasında yapıda meydana gelen küçük değişimler karbon atomları üzerinde zincir boyunca devam eder. Böylece taşıyıcı yük hareketliliği artar ve serbest radikalleri oluşturarak yük taşıyıcıların sayısını da artırır. Isısal uyarma ile oluşan radikaller konjuge yapıda sürekli olarak bulunurlar. Serbest radikaller kationlar oluşturmak için elektron verici veya anyonlar oluşturmak için elektron alıcı olarak etki edebilirler. Polimer hidroliz ürünü, piroliz şartlarını içeren kararlı polimerin doğasına ve şekline bağlı olarak bir film, toz veya lif şeklinde olabilmektedir (Mac Diarmid ve ark. 1987).

2.4.4 Kondenzasyon Polimerizasyonu

Kondenzasyon polimerleri benzer veya farklı yapıdaki poli-fonksiyonel monomerlerin, genellikle küçük bir molekül çıkararak reaksiyona girmesiyle elde edilir. Burada en önemli koşul monomerlerin poli-fonksiyonel oluşudur. OH, COOH, NH₂, gibi fonksiyonel gruplardan en az iki tane taşıyan monomerler esterleşme, amidleşme, vb. gibi reaksiyonlarla, küçük moleküller çıkararak, kondenzasyon polimerlerini oluşturular. İletken polimerlerden poliparafenilen (PPP) kondenzasyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Bu tip polimerizasyonda polimer zincirinin tekrar eden biriminin molekül formülü, polimerin oluşumunda yer alan monomerde bulunan atomlardan yoksundur. Elde edilen PPP'nin iletkenlik değeri 10⁻⁴ S/cm olarak ölçülmüştür. Bu değer I₂, AsF₅, SbCl₆, IF₅ ve SO₃F gibi uygun dopantlar ile 10² S/cm artırılmıştır (Toptaş, 2006).

2.4.5. Emülsiyon

Emülsiyon polimerizasyonunda birbiri ile karışmayan iki faz söz konusudur. Monomer fazı dağıtıcı faz içinde emülsiyon halinde dağıtılmıştır. Çeşitli emülsiyon yapıcı maddeler kullanılarak monomer fazı dağıtma fazı içinde emülsiyon halde kararlı olarak tutulur. Emülsiyon polimerizasyonunda, emülsiyon ortamı olarak genellikle su kullanılır. Monomer emülsiyon yapıcı bir madde yardımı ile bu ortamda dağıtılır. Polimerizasyon başlatıcısı suda çözünen bir maddedir ve serbest radikalleri üretir. Emülsiyon yapıcı aktif bir madde olup, hidrofil ve hidrofob gruplar içerir. Monomerin az bir kısmı misellerin içine girer, büyük bir kısmı ise monomer damlacıkları halinde dağılır. Polimerizasyon bir serbest radikalın misel içinde difüzyonu ile başlar ve misel aktiftenmiş olur. Damlacıklardan difüzyon yoluyla geçen monomer, polimer taneciklerini sürekli olarak besler. Polimer tanecikleri büyürken monomer damlacıkları küçülür. Polimerleşme %50-80 ilerlediğinde monomer damlacıkları tükenir. Geri kalan monomerlerin tümü polimer tanecikleri içinde bulunur. Genellikle %100 polimerleşmeye erişilir. Emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile de iletken polimerler sentezlemek mümkündür (Österholm ve ark. 1994). Bu yöntemde monomer, apolar veya zayıf polar bir çözücü ve asidik bir tuz, emülsiyon oluşturan dedosilbenzensülfonik asit (DBSA) gibi bir yüzey aktif madde ile eş zamanlı olarak

karıştırılmakta, belli sıcaklık ve süre sonunda viskoz bir emülsiyon oluşmaktadır. Bu emülsiyon da çöktürülerek saflaştırılmakta ve böylece iletken olabilen polimerler elde edilmektedir.

2.4.6. Gaz fazı yöntemi

Gaz fazı polimerizasyonunda, polimerizasyon reaksiyonları genellikle fotokimyasal olarak monomer buharında başlatılır. Yüksek mol kütleli polimer uçucu olmadığından büyümekte olan polimer tanecikleri bir sis oluşturur. Monomer molekülleri, gaz fazından büyümekte olan tanecik içine difüzlenir. Bu yöntemle, genellikle yalıtkan bir polimer matrisi ve bir yükseltgen madde karışımına belli bir sıcaklıkta maruz bırakılan monomer, buhar fazında polimerleştirilerek çöktürülmekte ve bu şekilde iletken polimer veya kompozitler hazırlanmaktadır.

2.4.7. Ara-yüzey polimerizasyonu

Bu yöntemde, iki fazlı bir sistemin ara yüzeyinde iletken polimer sentezlenmektedir. Bir tuzun sulu çözeltisi ve bir asit çözeltisinin karışımından oluşan polar bir faz ile, monomer ve benzen, toluen gibi çözücülerin karıştırılmasıyla oluşan apolar bir faz arasındaki ara yüzeyde iletken polimer sentezlenmektedir (Genies ve ark. 1990).

2.5. İletken Polimerlerin Kullanım Alanları

1980'lerde iletken polimerlerin kararlılıkları ve işlenmeleri konusunda kaydedilen ilerlemeler, akademik çevrelerin ve ticari firmaların bu konuya olan ilgileri arttırmıştır. İletken polimerler çeşitli elektrokimyasal özelliklerinden dolayı çok değişik alanlarda kullanılabilirler. Özellikle, sensörler, şarj olabilen piller, fotokimyasal hücreler, elektrokromik aletler ve iyon seçici elektrotların yapımında kullanım potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir.

İletken polimerler kimyasal ve elektrokimyasal yöntemlerle sentezlenebilmeleri, metallere yakın elektriksel iletkenlik göstermeleri ve kolay işlenebilirliklerinden dolayı çok geniş uygulama alanına sahiptirler. İletken polimerler, çok düşük akımlar üretmeleri ve çok uzun ömürlü olmaları nedeniyle kalp pillerinde elektrot olarak kullanılmaktadır. Radyo frekansı ya da kızılötesi dalgalar, gönderilen bütün radyasyonu emdikleri için bu polimerler radar dalgalarına karşı görünmez cihazların yapımında kullanılan materyallerdir (Toppare, 2003).

2.6. Polipirol

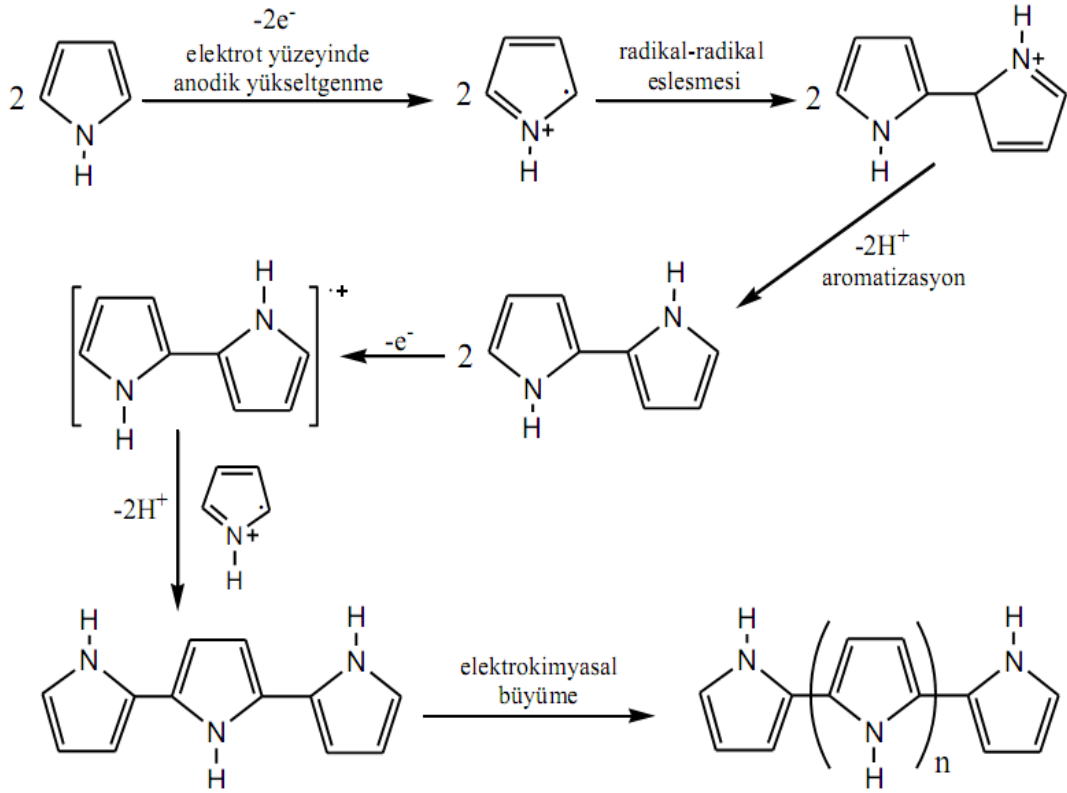
Polipirolün elektrokimyasal oluşma mekanizması Şekil 2.7’de verilmektedir. Reaksiyon sulu veya susuz çözeltilerde ve oksijensiz ortamlarda anodik indirgenme ile başlar ve devam eder. Polipirol kimyasal olarak da üretilebilir. Şekil 2.7’de görüldüğü gibi radikal katyonlar dimerleşip tekrar yükseltgenme veya başka monomere katılıp sonra yükseltgenmektedir.

Oluşan dikatyon iki proton kaybedip nötrleştikten sonra yükseltgenme ile başlayan basamağa tekrar dönmekte ve bu mekanizma polimerleşme duruncaya kadar tekrarlanmaktadır. Elde edilen polimerin yapısı, mol kütlesi, iletkenliği ve fiziksel dayanıklılığı deney koşullarına göre değişkenlik gösterir.

Çözücü olarak genellikle dielektrik sabiti yüksek olan ancak nükleofilik karakter göstermeyen organik çözücüler tercih edilir. Anot olarak platin levha, camsı karbon veya indiyum kalay oksit (ITO) camı kullanılır. Elektrolitlerin yüksek potansiyelerde bozunmaması istenir ve tetra alkilerin BF_4^- veya ClO_4^- tuzları tercih edilir.

Bu anyonlar polimerler için en uygun dopantlardır. Anot potansiyelinin de aşırı yükseltgenmeye neden olmayacak şekilde düşük tutulması gerekir. Aşırı yükseltgenen polimerin ana zincirindeki konjuge çift bağlar kırılır ise konjugasyon kesintiye uğrar ve iletkenlik düşer. Örneğin polipirol sulu çözeltide Ag/AgCl referans elektroduna göre +0,8 volttan daha yüksek potansiyelerde aşırı oksitlenerek iletkenliğini kaybedebilir.

İlk olarak elektrot yüzeyinde pirol katyon radikali oluşur. Bunu proton çıkışıyla dimerizasyon takip eder. Dimer monomerden biraz daha kolay yükseltgenir ve bu yüzden sonraki eşleşme reaksiyonlarına izin vermek için yeniden yükseltgenir. Polimerin yükseltgenme gerilimi daima monomerinkinden daha düşüktür. Polimer elektrokimyasal olarak iletken bir hale iyonlaşır ve neticede destek elektrolitin karşı iyonuyla eşleşerek elektriksel nötrallik sağlanır. Elektrokimyasal polimerleşme işlemi sırasında elektrolitik çözeltide anyonlar gibi negatif yüklü moleküller de bulunabilir. Pozitif yüklü polimer iskeletine pek çok biyolojik tür katkılanabilir veya polimer içinde tutuklanabilir. Elektrokimyasal polimerleşme sırasında katkılanma işleminin eşzamanlı olarak gerçekleşmesi de mümkündür (Özcan, 2008).



Şekil 2.7. Pirolün elektrokimyasal yükseltgenme ile polimerleşme mekanizması

2.7. Enzimler

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen, protein yapısında olan ve biyolojik aktiviteye sahip moleküllerdir. Temelde bütün biyokimyasal reaksiyonlar enzimler tarafından katalizlenir.

Enzimler, ileri derecede organize olmuş protein moleküllerdir. Hayat canlı hücre içerisinde zincirleme devam eden biyokimyasal reaksiyonlar dizisi sonunda ya hücre gerekli olan makro moleküllerin inşa edildiği ya da büyük moleküllerin parçalanarak enerjinin açığa çıkarıldığı bir süreçtir. Bunların dışında hücrenin gereksinim duyduğu daha küçük moleküllerde yapılabilir. Burada enzimlerin görevi gerek büyük moleküllerin yıkımında, gerekse büyük moleküllerin yapım süreci olan biyokimyasal reaksiyon olan basamaklarında substrat dediğimiz moleküllere kimyasal bir grubu eklemektir.

Bu kimyasal gruplar çok farklı ve değişik olabilir. Metilen (CH_3), amin (NH_2), hidroksit (OH), hidrojen (H), aldehit ($\text{O}=\text{C}-\text{H}$) ve karbondioksit (CO_2) bu kimyasal gruplara örnek olarak gösterilebilir.

Biyokimyasal reaksiyonların her basamağında bu kimyasal gruplar eklenerek büyük moleküller inşa edilir. Ya da bu kimyasal gruplar kopartılarak, büyük moleküller küçük parçalara ayrılırlar. Enzimler bu görevi sırasında başka organik moleküllere veya bazı kofakörlere gereksinim duymaktadırlar. Biyokimyasal reaksiyon basamaklarında enzimler tarafından koparılan ya da eklenen bu kimyasal grupların taşıyıcı moleküllerine gereksinim vardır. Bu kimyasal grupların taşıyıcısı olan moleküller koenzimlerdir. Koenzimler olmadan biyokimyasal reaksiyonların devamlılığı sağlanamaz (Şahmetlioğlu, 2004).

2.7.1 Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler canlı hücrede meydana gelen kimyasal tepkimeleri katalizleyen veya düzenleyen biyokatalizörlerdir. Organizmadaki organik moleküllerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve solunum gibi fizyolojik olaylar enzimler yardımıyla yürütülmektedir. Bu sebeple hayat enzimatik tepkimelerin tümüdür denilebilir.

Enzimler dört temel açıdan çok güçlü katalizörlerdir:

1. Enzimler son derece etkilidirler.

Sıradan kimyasal katalizörlere göre tepkimeleri 10^8 – 10^{11} kez daha hızlı gerçekleştirebilmektedirler. Enzimler gösterdikleri bu hıza ulaşırken pH, sıcaklık, basınç açısından oldukça ılımlı koşullarda çalışabilmeyi mümkün kılarlar. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar fazla enerji gerektirmezler. Ayrıca en kolay bulunan, en ucuz, en emniyetli çözücü olan su içerisinde çalışmak enzimler için mümkün olmaktadır. Mesela amonyak elde etmek için kullanılan haber prosesinde azot bağlamak için 200-1000 atm basınç ve 500 °C sıcaklık gereklidir. Ama azot bağlayan bir bakterinin bu işlemi yaparken yüksek basınç ve sıcaklığa ihtiyacı yoktur.

2. Enzimler kimyasal katalizörlere göre çok daha değişik kimyasal reaksiyonları katalizleyebilirler.

3. Enzimler reaksiyonun tipine ve substrata son derece spesifiktirler. Böylece yüksek verim ve çok az sayıda yan ürün meydana gelir.

4. Enzimlerin çok çeşitli doğal kontrol mekanizmaları vardır.

Enzimlerin aktivitesi, içinde buldukları şartlara göre düzenlenebilir. Ayrıca kontrol edici küçük moleküller de enzimatik aktiviteyi azaltabilir ya da arttırabilir.

Enzimler tepkimenin başlaması için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürürler. Bir enzim daima bir çeşit tepkimeyi kontrol eder. Biyosensör yüzeyi arttıkça enzim aktivitesi de artar. Hücre içinde üretilmelerine rağmen hücre dışında da etki gösterebilirler. Enzimlerin kontrol ettiği tepkimelerin çoğu çift yönlüdür. Genellikle protein yapılı olmalarından dolayı proteinlerin etkilendiği faktörlerden etkilenirler (Telefoncu, 1986).

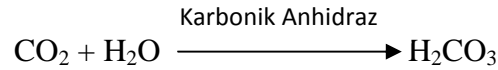
Enzimlerde proteini oluşturan amino asitlerin sayısı, diziliş sırası ve moleküllerin yapısı belirli bir düzen içindedir. Bu düzen enzimin substrata seçiciliğini sağlar. Bazı enzimler yalnızca proteinden oluşurken bazıları protein yanında protein olmayan bir kısım içerirler. Bu tip enzimlerde enzimin protein kısmına “Apoenzim”, denir. Koenzim ya da kofaktör enzime kovalent bağlıysa “Prostetik grup“ adı verilir. Koenzimler genellikle vitamin türevleri ve organik moleküllerden oluşur. Apoenzim ve koenzim birlikte

“Holoenzim“ diye adlandırılır. Holoenzimin büyük bir kısmını apoenzim oluşturur. Apoenzim tek başına katalitik aktivite göstermez. Enzimin gerçek aktivitesi sadece koenzim ve apoenzim bir arada olduğunda gözlenir.

Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde belirli amino asitlerin oluşturduğu bir kısım bulunur. Protein zincirinin bu bölgesi enzimin katalitik etkisinden sorumlu olup “Aktif bölge“ olarak tanımlanır. Substrat ve eğer varsa koenzim, bu merkeze hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar veya kovalent bağlar ile bağlanır. Substratın dönüşümüne katılan ve katalitik prosesi yürüten amino asit yan zincirleri de aktif merkezi oluştururlar (Telefoncu, 1986).

2.7.2. Enzimlerin Normal Katalizör Maddelerden Farkı

Enzimler, organik katalizörlere oranla aktivasyon enerjisini çok daha fazla düşüren moleküllerdir. Enzimlerde çok büyük bir katalitik güç vardır. Örneğin CO₂'in hidrasyonu yani su alması gibi basit bir tepkime bile karbonik anhidraz denen bir enzim tarafından katalizlenir.



Bu enzim sayesinde, saniyede 10⁵ CO₂ molekülü hidratlaştırılabilir. Bu enzim olmadan da tepkime çok yavaş olarak meydana gelebilir. Fakat enzim varlığında tepkimenin hızı 10⁷ kat artar. Bu enzim olmasaydı dokularda yanma sonucu oluşan CO₂ kan ve içinden de akciğer alveollerine aktarması kısa sürede tamamlanmazdı ve hücreler CO₂ zehirlenmesinden ölebilirdi.

Enzimler, tepkimeleri özgül olarak katalize ederler. Katalizör maddeler, pek çok kimyasal tepkimede rol oynarken enzimler genellikle tek bir tepkimeyi katalize etmektedirler.

Bazı enzimler, yapı bakımından birbirine benzeyen substratların hepsini etkileyebilmektedir. Bu tip enzimlere gevşek özgüllük gösteren enzimler adı verilir. Örneğin, pepsin, tripsin, kimotripsin gibi enzimler her çeşit proteini substrat olarak kabul edip parçalayabilmektedirler. Bu enzimlerin birbirinden farkları protein polipeptid

zincirinde etkiledikleri peptid bağlarının farklı olmasıdır. Pepsin enzimi polipeptid zincirinde glutamik asit ve asparik asit arasındaki peptid bağı, tripsin enzimi ise arginin ve lizin arasında bağı kırılmaktadır. Lipazlar her çeşit lipidi substrat olarak kullanmaktadır. Bunlara karşılık diğer bir grup enzim ise kesin özgüllük göstermektedir. Örneğin üreaz enzimi yalnız sünik asiti etkilemektedir. Hatta bazı enzimlerde bu durum molekülün D ve L şeklini ayırt edecek kadar ileri derecededir. Enzimler, substratı ile etkileşmelerinde enzim-substrat oluşumunda aktif merkezleri kullanılmaktadırlar (Şahmetlioğlu, 2004).

2.7.3. Enzimlerin Çalışma Mekanizması

Enzimin hangi substratla çalışılacağını saptayan kısmı apoenzim kısmıdır. Demek ki apoenzim kısmıyla substrat arasında bir ilişki vardır. Alman kimyacı Emil Fischer tarafından bunun kilit anahtar uyumu gibi olacağı savunulmuştur. Koenzim kısmı daha çok kimyasal bağa yakın olarak işlev gösterir, örneğin ester bağlarını parçalar.

Enzimin apoenzim kısmı bir ya da birkaç yerinden (aktif bölgelerden) substrat molekülüne yapışır ya da bağlanır (yani bir enzim-substrat kompleksi oluşturuyor) ve bu arada koenzim kısmı substrat üzerindeki bağlarla gerçek anlamda birleşmeye veya bağlanmaya giderek onu parçalar. Enzimlerin kimyasal yapıları, özellikle üçüncül yapıları tam olarak bilinmediğinden (ilk yapısı açıklanan enzim ribonükleaz, 124 amino asitten meydana gelmiştir) çalışma mekanizmaları da halen tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır (Yavuz, 2005).

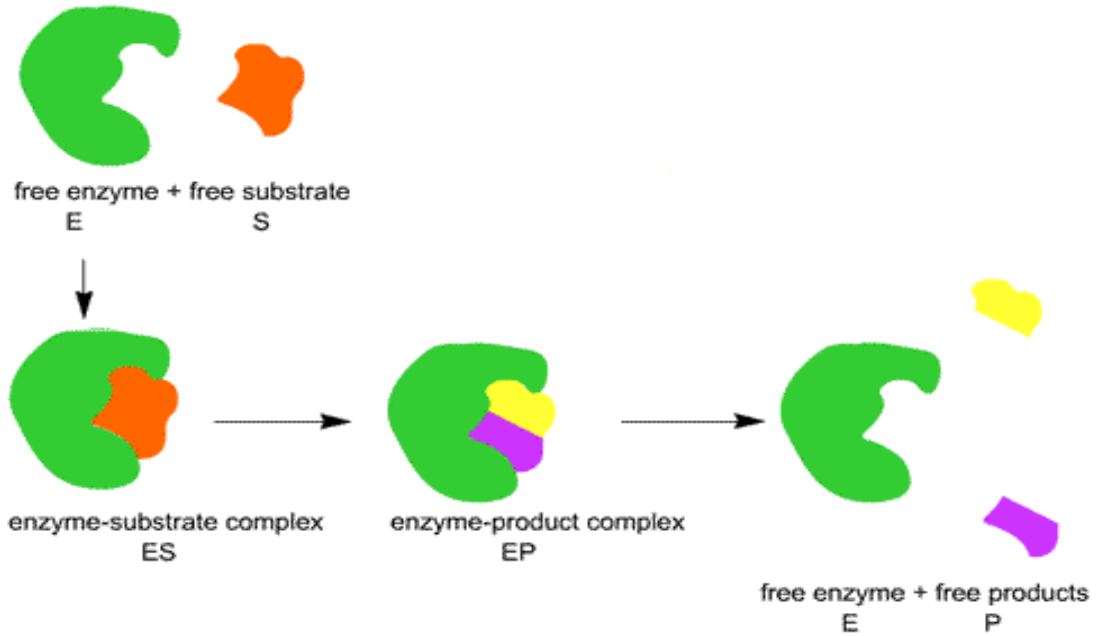
2.7.4. Enzim Reaksiyonlarının Kinetiği

Enzimler reaksiyon kinetiği ve mekanizması yönünden kimyasal katalizörlere benzerler. Reaksiyonda önce enzim ile substrat arasında bir ara bileşik oluşur. Bu kararsız ara bileşimin oluşma hızı enzim ve substrat derişimine bağlıdır. Reaksiyon koşulları ve enzim derişimi sabit tutulurken substrat derişimi artırılırsa reaksiyon hızı belli bir maksimum değere erişir. Bu değerden sonra, substrat derişimi artırılrsa bile reaksiyon hızında bir değişme gözlenmez. Bunun nedeni, ortamdaki enzim moleküllerinin ortam substrat moleküllerini karşılayamamasıdır. Başka bir deyişle enzim-substrat ara

bileşiminin oluşum hızında enzim derişiminin kısıtlayıcı rol oynamasıdır. Enzimlerin bu davranışı 1913 yılında L. Michaelis ve Menten tarafından önerilen bir mekanizmayla açıklanmıştır.



Burada; E enzimi, S substratı, ES arabileşigi ve P ürünü göstermektedir. Bu mekanizmanın kinetik analizi 1926’da Brips ve Haldane tarafından yapılmıştır.



Şekil 2.8. E enzimi, S substratı, ES ara bileşigi ve P ürünü göstermektedir

Reaksiyon hızı için;

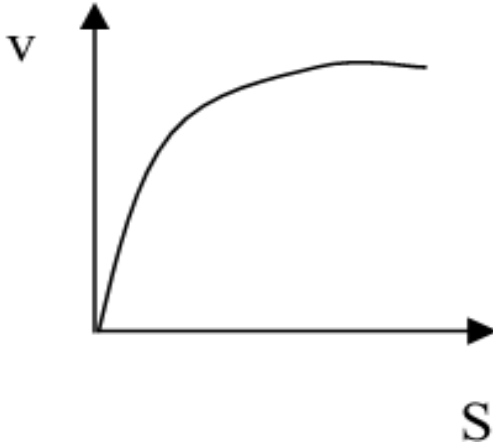
$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.2)$$

Eşitliği elde edilir. Bu eşitlik (2.2)’ de görüldüğü gibi belli bir değerden sonra substrat derişiminin artırılmasıyla tepkime hızının artmayıp sabit değerde kalmasını sağlar. Bu denklem Michaelis-Menten eşitliği ve “Km” de Michaelis-Menten sabiti diye tanımlanır. Fiziksel olarak Km katsayısı enzim ve substratın birbirine olan ilgisini göstermektedir. Enzim ve substrat arasındaki ilgi fazla ise oldukça düşük substrat derişimlerinde enzimi substrat ile doyurmak mümkün olur (Devlin, 1997).

Lineerleştirmek için eşitlik (2.2)'nin tersi alınır ve düzenlenirse;

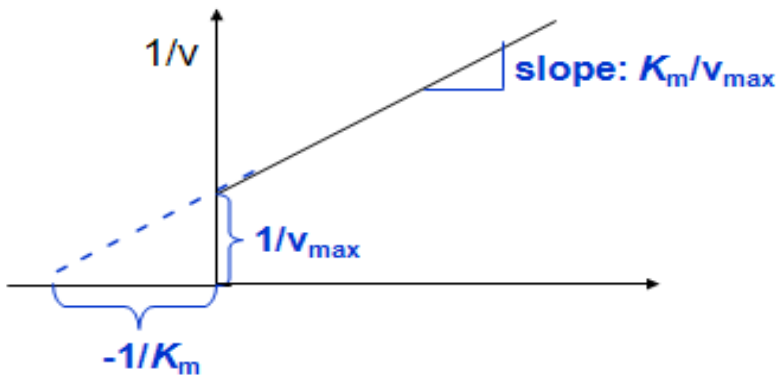
$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.3)$$

denklemini elde edilir. (1/[S]) değerine karşı (1/V) grafiği çizildiğinde aşağıdaki doğru elde edilir.



Şekil 2.9. Reaksiyon hızının substrat derişimi ile değişimi (Devlin, 1997)

Lineweaver-Burk Plot



Şekil 2.10. Lineweaver-Burk grafiği (Devlin, 1997).

Enzimin K_m değeri bulunurken Şekil 2.10'da görünen ve (2.3) denklemini ile tanımlanan Lineweaver-Burk çiziminden yararlanılır.

Michaelis-Menten eşitliği, çözülmüş substratlar ve kütle aktarım kısıtlaması olmayan sistemler için geçerlidir. Bu nedenle çözünmez substrat sisteminde ve immobilize enzimlerde difüzyon kısıtlamalarından dolayı görünür Km değerleri verilir (Bailey ve Ollis, 1997).

Enzim reaksiyonlarının hızı kimyasal kinetikten farklılık göstererek, sıcaklıkla önce artar; sonra azalır (Şekil 2.11). Başka bir deyişle enzim aktivitesi belirli bir optimum sıcaklığa kadar artar, sonra ısısal deaktivasyon nedeniyle düşer. Enzimatik reaksiyonlar, kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi bu optimumsıcaklığa kadar Arrhenius kanununa uyar. Bu bölgede reaksiyon hız sabiti ve maksimum hız için;

$$k = A.e^{-E_a/RT} \quad (2.4)$$

$$V_m = K_3[E]_0 \quad (2.5)$$

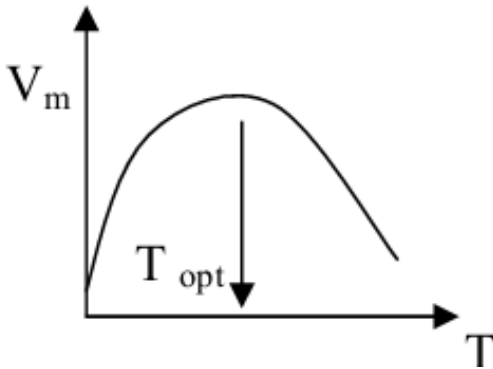
yazılabilir. Bu eşitlikler birleştirilirse;

$$V_m = E_0.A.e^{-E_a/RT} \quad (2.6)$$

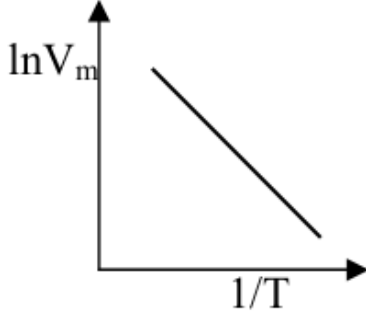
$[E_0].A = \alpha$ sabit ise

$$\ln V_m = \ln \alpha - E_a/RT \quad (2.7)$$

bulunur. Belirli sıcaklık değerlerine karşı gelen maksimum reaksiyon hızları eşitlik (2.7)'ye göre grafiğe geçirilirse elde edilen doğrunun eğiminden enzimin aktivasyon enerjisi hesaplanır (Şekil 2.12).



Şekil 2.11. Sıcaklıkla reaksiyon hızının değişimi (Devlin, 1997)



Şekil 2.12. Aktivasyon enerjisinin belirlenmesi (Devlin, 1997)

2.7.5 Elektrotların Kimyasal Modifikasyonu

Herhangi bir elektrot materyalinin istenen en temel özelliği yük transfer edebilmesi veya en azından yük transferinde sınırlayıcı olmasıdır. Yük transferi çeşitli şekillerde ortaya çıkar. Örneğin materyalde yük transferi iletkenlik bantlarındaki elektronların taşınması ile, yarı iletkenlerde iletkenlik bantları elektronlar veya Valens banlarındaki pozitif boşlukların taşınması ile gerçekleşir. Bazı oksit veya sülfürlerde ise yük transferi kristal örgüdeki iyonların hareketi ile sağlanır.

Elektro analitik kimyada elektrot/elektrolit ara yüzeyini geçen elektron sayısı ölçülerek pek çok analitik yöntemin uygulanabileceği bilinmektedir. Ancak, elektrotların elektron transfer edebilme yeteneği bazı spesifik olaylar sonucunda azalmakta ve bu tür olayların analitik uygulamaları sınırlanmaktadır.

Sözü edilen spesifik olaylar elektrot yüzeyinde istenmeyen çökeltme veya adsorpsiyon ile bir aşırı gerilimin uygulanmasını gerektiren yavaş reaksiyon olaylarıdır. Bu olaylar elektrot yüzeyinin hazırlanması ile kısmen kontrol edilebilirse de 1970 ortalarına kadar yaygın olarak kullanılan elektrot materyalleri C, Au, Pt ve Hg ile sınırlı kalmıştır.

Elektrot yüzeyinin kontrol edilebilmesi düşüncesi, modifiye elektrot yaklaşımını ortaya çıkarmıştır. Elektrot yüzeyine bilinçli olarak bazı kimyasal ajanların tutturulması ile elektrot yüzeyinin tutturulan ajanın kimyasal özelliklerine sahip olacağı düşünülmüştür. Böylece elektrokimyasal reaksiyonların hızlarının ve seçiciliklerinin kontrolü (elektrokataliz) sağlanmış, olumsuz adsorpsiyon engellenmiş ve bazı durumlarda

istenen optik özellikler kazandırılmış olabilecektir. Elektrokimyacılar tarafından elektrot modifikasyonu ile temelde dört kullanım alanı öngörülmektedir. Bunlar elektro kataliz, ön derişim, membran engeli ve elektro-salınmadır.

İmmobilize olan ajanlar genellikle ektroaktiftir. Polimer filmleri halinde elektroaktivite gerekli olmayabilir. Zira bu tür filmler ön derişim amacıyla veya substratın filmin permselektif özelliklerinden yararlanarak elektroda taşınması amacıyla kullanılabilir. Elektrot modifikasyonundaki ilk araştırmalar, elektroaktif ajanların nano moleküller katman halinde yüzeye adsorpsiyonu araştırmalarını içermiştir. Bu ilk kemisorpsiyon çalışmalarını ajanların belli kovalent bağlarla elektrot yüzeyindeki fonksiyonel gruplara tutturulması izlemiştir. Örneğın C veya Pt yüzeyleri kolaylıkla oksitlenerek yüzeyde zengin hidroksil grupları oluşur. Bu gruplarla da amid bağları oluşabilir.

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan kimyasal modifikasyon şeması elektroaktif polimer ve çok moleküllü katmam filmleridir. Bu tür ajanlar kovalent bağlı mono katmanlara kıyasla elektrot yüzeylerine çok daha kolaylıkla uygulanır. Bundan başka, bu polimer filmleri 10^5 monomoleküler katmana eşdeğerde elektroaktif merkezler içerebileceğinden elektrokimyasal özellikleri çok daha kolay gözlenir.

Polimer filmler elektrot yüzeyine polimer çözeltilisinin buharlaştırılmasıyla, polimerin elektrokimyasal çökertilmesiyle veya elektroaktif monomerin elektrokimyasal polimerizasyonu ile uygulanır.

Bu filmler yüzeye kemisorpsiyon kuvvetleri ile tutulurlar. Genel olarak, polimer filmlerin kararlılığı mono katmanlardan çok daha iyidir veya tabiatıyla, kararlılık elektroanalitik kimya uygulamalarında , özellikle sensör çabalarında çok önemlidir.

Elektroaktif polimer filmleri kendiliğinden hem iyonik hem de elektronik iletkenlik gösterir. Bu filmler genelde üç sınıfta ele alınabilir; redoks polimerleri, iletken polimerler ve iyon değıştirme polimerleri. Redoks merkezleri içeren polimer filmler, redoks polimerleri olarak tanımlanıp indirgenmiş ve yükseltgenmiş redoks merkezlerinde elektron sıçraması (hopping) ile elektriğı iletirler. o-kinon, pirol, sübstitüe porfirin ve ferrosen polimerleri bu polimerlerin en belirgin örnekleridir.

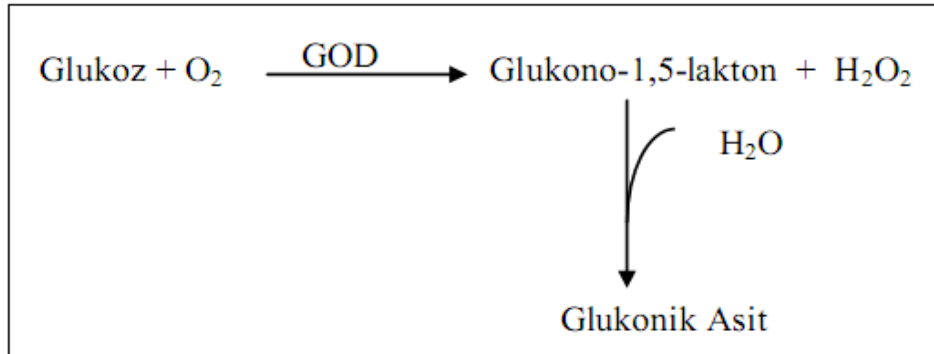
İletken polimerler veya diğeri bir adıyla organik metaller elektriğı redoks polimerlerden çok daha etkin olarak delokalize metal benzeri bantlar vasıtasıyla iletirler.

Polipirol bunlardan en çok bilineni olup, elektrokimyasal polimerizasyon ile kolayca elde edilebilir ve ftalosiyaninler ile enzimler gibi elektrokatalizörlerin tutuklanması amacıyla kullanılır.

İyon değiştirici polimer filmleri yüklerini dengeleyen karşı iyonların elektroaktif iyonlarla yer değiştirmesiyle elektroaktif yapılabilir. Örneğin; protonlu polivinilpridin filmindeki $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$, ClO^{-4} iyonu ile yer değiştirerek elektroaktif yapılabilir.

2.7.6 Glukoz Oksidaz Enzimi

Glukoz oksidaz (GOD) (EC 1.1.3.4, β -D-glukoz: oksijen oksidoredüktaz) glukozun moleküler oksijen ile yükseltgenip glukono-1,5-lakton ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) olduğu reaksiyonu katalizler. Lakton sulu ortamda herhangi bir enzime ihtiyaç duymaksızın hidroliz olarak glukonik aside dönüşür. Reaksiyon aşağıdaki gibidir:



şekil 2.13. Glikoz oksidaz enziminin reaksiyonu

GOD aktivitesi ilk defa 1904'de Maksimow tarafından *Aspergillus Niger* (A.Niger)'de saptanmıştır. Enzimin oksidatif etkisi olduğunu belirleyen Müller (1928), saflaştırılan enzimin sahip olduğu sarı rengin, bünyesindeki prostetik grupta (flavin adenin dinükleodit, FAD) kaynaklandığını öne sürmüştür. Keilin ve Hartree (1948), oksidasyonun FAD tarafından gerçekleştirildiğini; enzimin açığa çıkardığı H_2O_2 ile antimikrobiyel aktivite gösterip antibiyotik olarak davrandığını belirlemişlerdir. Enzim ticari olarak ilk kez 1952 yılında üreilmeye başlanmıştır. Önceleri enzim kaynağı olarak *Penicillum notatum* ve *Pencillum glaucum* kullanılmış olup, günümüzde *Aspergillus niger* veya *Pencillum amagasakienese* kullanılmaktadır (Özyılmaz, 2005).

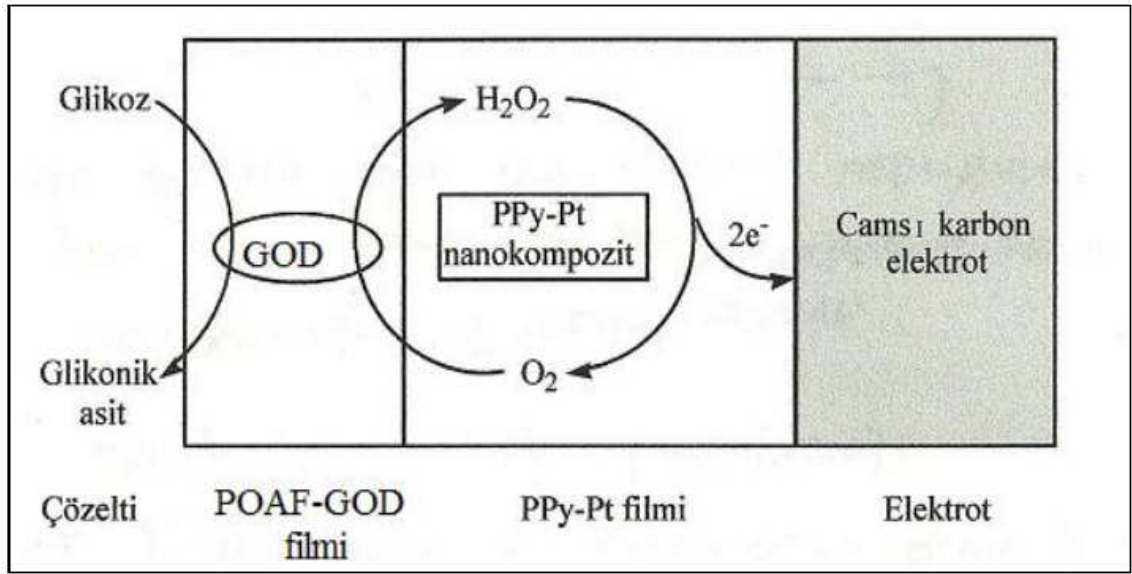
2.7.6.1 GOD'nin Genel Özellikleri

Katalizledikleri reaksiyonlar aynı olsa da, değişik kaynaklardan saflaştırılan GOD molekülleri farklı kimyasal özellikler gösterir. Örneğin A. Niger, kaynaklı GOD molekül ağırlıkları 80 kD olan, birbirine disülfid köprüleri ile bağlı 2 eşdeğer alt üniteden meydana gelmiştir. A. Niger GOD' nun her alt üniteye 1 mol FAD içermektedir. GOD molekülünde yaklaşık olarak % 74 protein, % 16 nötral şeker ve % 2 amino şekeri bulunmaktadır. Enzim yapısında bulunan karbohidratın % 80'ini mannoz oluşturmaktadır. Mannoza, enzimin protein kısmına Asn amino asit artığının R grubundaki amino azotu, Thr ve Ser amino asit artıklarının R gruplarındaki hidroksil oksijeni üzerinden glukozidik bağ ile bağlanmıştır. Ayrıca enzimdeki FAD molekülü flavin-hipoksantin dinükleotid ile yer değiştirdiğinde GOD aktivitesinde bir değişim gözlenmemektedir. FAD molekülü ile apoprotein arasında kovalent bağ bulunmadığından enzim tamamen denatüre edilerek FAD molekülü enzimden uzaklaştırılabilir. Enzimin yapısında bulunan karbohidrat tamamen uzaklaştırılsa bile aktivite göstermeye devam eder; ancak termal stabilitesi azalır. GOD β -D-glukoz için oldukça spesifik olup β -D-glukoz'u α -D-glukoza göre 157 kez daha hızlı okside eder. Ayrıca enzim 2-deoksi-D-glukoz, D-mannoza ve D-galaktoza için çok düşük de olsa aktivite göstermektedir. GOD' nun başlıca inhibitörleri Ag^+ , Hg^+ ve Cu^{+2} olarak belirlenmiştir (Özyılmaz, 2005).

2.7.6.2 Glikoz Oksidaz Elektrotu İle Glukoz Tayini

Hidrojen peroksit üretimine neden olan oksidaz enzimi temelli biyosensörler yaygın olarak kullanılmaktadır (Cosnier ve ark., 1999). Son zamanlarda iletken polimerlere biyokatalizörlerin immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar dikkate değer bir şekilde artmaktadır. Polipirol, polianilin, politiyofen ve türevlerini içeren iletken polimerler ise elektrokimyasal olarak üretilen enzimatik elektrotların başlıcalarıdır (Retama ve ark., 2004). Bunlardan polipirol ile düşük yükseltgenme gerilimine sahip olması nedeniyle çok ilgilenilmiştir. Elektrokimya açısından önemli olan bu özellik sayesinde pek çok biyolojik sistemle uyumlu olan sulu çözeltilerden film oluşumu mümkün olmaktadır.

Pek çok iletken polimer biyosensörü ile glukoz derişiminin belirlenmesi enzimatik reaksiyon sırasında tüketilen oksijenin indirgenme akımının veya açığa çıkan hidrojen peroksitin yükseltgenme akımının izlenmesiyle gerçekleştirilmektedir (Adeloju ve ark., 2001). Li ve Lin'in (2007), yaptıkları polipirol ve poli-o-aminofenol (POAF) modifiye elektrot çalışmalarında bir sensörün çalışma prensibini ve işleyiş mekanizmasını şematik olarak göstermişlerdir (Şekil 2.14).

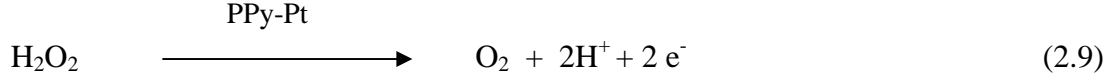


Şekil 2.14. GOD immobilize edilmiş POAF'ün PPy-Pt nanokompozit filmi üzerine kaplanmasıyla oluşturulmuş glukoz sensörü ve işleyiş mekanizması (Can, 2010)

Burada öncelikle H₂O₂ yükseltgenmesini katalizlemek amacıyla polipirol-Pt (PPy-Pt) nanokompozit bir iç tabaka oluşturulmuş ve bu tabaka üzerine biriktirilen poli-o-aminofenol filmine glukoz oksidaz enzimi (GOD) immobilize edilmiştir. Glukoz oksidazın tutturulduğu poli-o-aminofenol filmi (POAF-GOD) çözeltideki glukoz ile temas ettiğinde oksijen varlığında GOD enziminin etkisiyle glikonik asit ve H₂O₂ oluşmaktadır.



Ardından oluşan H₂O₂ PPy-Pt üzerinde elektrokatalitik olarak yükseltgenmekte ve pik akımları H₂O₂ ile orantılı akım değerlerinin elde edilmesini sağlamaktadır.



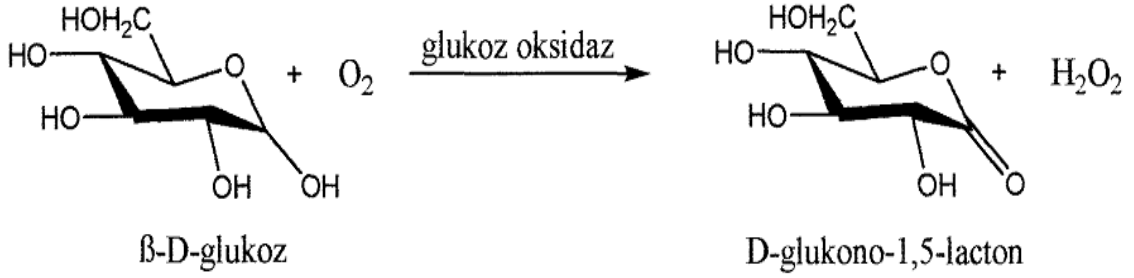
Elde edilen bu değerler dolaylı olarak glukoz miktarıyla ilişkilidir. Böylece glukoz duyarlı modifiye bir elektrot elde edilmiş olmaktadır. Kullanılan enzim glukozla spesifik cevap verdiği için tasarlanan elektrot girişim yapan türlerin varlığından en az etkilenecek şekilde hazırlanmıştır.

2.8. Glikoz Elektrodu

Glikoz için geliştirilen ilk elektrot, Updike ve Hicks tarafından sunulan enzim esaslı glikoz elektrotudur. Bu yaklaşımda, glikoz enzimatik reaksiyon esasındaki oksijen harcanması ya da hidrojen peroksit oluşumu ile ölçülebilir. Daha düşük zemin akımı sebebiyle, enzimatik ürün hidrojen peroksitin izlenmesi oksijen harcanmasından daha hassas bir yöntemdir. Bu yöntemin en büyük avantajı ise glikoz oksidazın glikozla karşı oldukça seçici davranmasıdır. Bununla birlikte, kullanılan potansiyelde diğer yükseltgenebilir örnek bileşenlerin oksidasyonu bir dezavantaj olarak değerlendirilebilir.

Bu dezavantaj, yüzeyin uygun bir membran ile kaplanması sonucu ortadan kaldırılabilir. Glikoz ölçümü için kullanılacak olan diğer elektrokimyasal enzimatik prob, Nagy ve arkadaşları tarafından geliştirilen iyot-iyon seçici elektrot bazlı potansiyometrik glikoz elektrotudur. Bu yöntemde, örnek çözeltiye konan iyot iyonları enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen hidrojen peroksit tarafından yükseltgenmek suretiyle, iyodaki değişim sensör yüzeyinde ölçülmektedir. Son zamanlarda, amperometrik glikoz ölçümü için tek basamakta uygulanabilirliği ve özellikle film kalınlığı ve immobilize olmuş enzim miktarının kontrol edildiği değişik polimerik matrislerde glikoz oksidazın immobilize edilmek suretiyle hazırlanabileceği polimer bazlı biyosensörler geliştirilmiştir.

Bu yöntemde, elektrokimyasal polimerizasyon esnasında glikoz oksidaz enzimi polimerik matris içerisinde immobilize olmaktadır. Elektron akseptör olarak kullanılan O₂ varlığında glikoz ve glikoz oksidaz arasındaki enzimatik reaksiyon aşağıdaki denklemde gösterilebilir.



Şekil 2.15. O₂ varlığında glikoz ve glikoz oksidaz arasındaki enzimatik reaksiyon

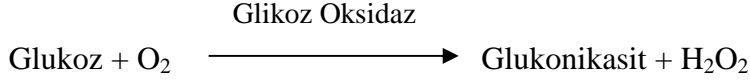
GOD (β-D- glikoz: oksijen-oxidareduktoz) β-D- glikozu elektron akseptörü olarak moleküler oksijeni kullanarak D-glucano-1,5-lakton ve hidrojen perokside oksidasyonunu katalizler. GOD kandaki şekerin ve yiyecek maddeleri ile içeceklerdeki oksijen ve fazla şekerin ayrılmasının belirlenmesi için geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Değişik matrislerde glikoz oksidazın immobilizasyonu birkaç literatürde rapor edilmiştir. Bu enzim için immobilizasyon metotları geniş olarak çapraz bağlama ve kovalent bağlama esasına dayanır. Ayrıca glikoz konsantrasyonuna dayalı birkaç biyosensör yapılmıştır (Şahmetlioğlu, 2004).

2.9. Biyosensörler

Bütün canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin hücre dışı [invitro] kullanımı için temel oluşturmuştur. Biyosensör, biyolojik olaylardaki biyokimyasal değişimleri algılayarak, biyolojik olayın teşhisine imkan tanıyan bir ölçme sistemi olarak tanımlanabilir (Telefoncu, 1999).

Biyosensörlerin tarihi 1950'li yılların ortalarında L.C. Clark'ın kandaki glukoz seviyesini ölçmesiyle başladı. Clark ve Lyons'un geliştirdiği birinci nesil

biyosensörlerde elektron alıcı olarak oksijen kullanılırken, ikinci nesil biyosensörlerde elektron alıcı olarak redoks medyatörleri kullanılmaya başlanmıştır (Telefoncu, 1999).



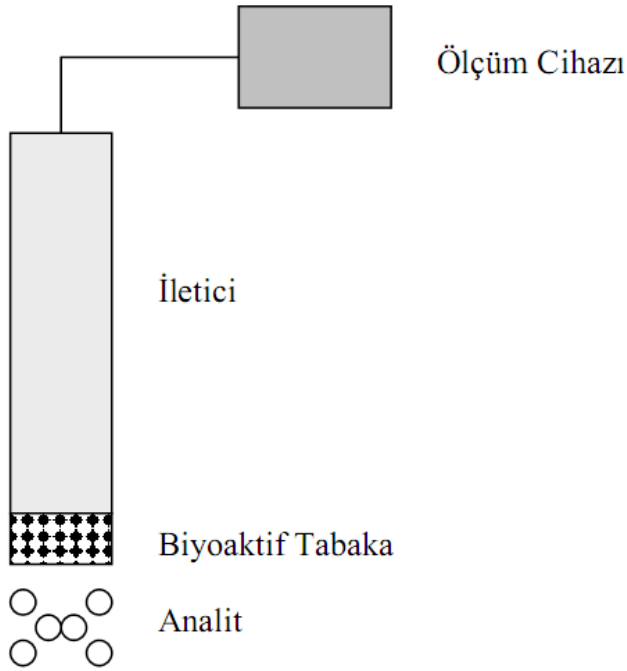
Üçüncü nesil biyosensörlerde enzimin indirgenme yükseltgenme merkezi ile elektrot yüzeyi arasında doğrudan elektriksel iletişim sağlanmış ve indirgenme yükseltgenme medyatörlerine gereksinim kalmamıştır. Biyosensörlerde biyobileşen olarak enzimler yanında doku kültürleri, mikroorganizmalar, organeller, antikolar ve nükleik asitler de kullanılabilmekte ve ölçme tekniğine göre amperometrik, potansiyometrik, termal, piezoelektrik, akustik veya optik sensörler olarak adlandırılmaktadırlar (Telefoncu, 1999).

Biyosensörlerin yüksek spesifikliğı yanında, renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir derişim aralığında doğrudan ölçmeye olanak sağlamak gibi üstünlükleri vardır. Fakat reseptör olarak adlandırılan biyobileşenlerin pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenmesi biyosensörün kullanım ömrünü kısaltmaktadır (Telefoncu, 1999). Medyatörler ve özellikleri: Medyatörler oksidoredüktazların koenzimlerinin yenilenmesinde önemli rol oynarlar. Enzim çözülmüş şekilde değilse koenzimin hareketi azalır ve elektronların elektrot ve koenzim arasında taşınması için bir medyatöre gereksinim duyulur.

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

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

Ferrosen yukarıda belirtilen bütün şartları sağlayan bir maddedir. Medyatörler inert veya elektroaktif bir polimer ile immobilize edilir. İyon değiştirici polimerler (nafyon gibi) ve iletken polimerler (polipiroller, polianilinler, poliindoller gibi) bu amaçla kullanılır . Son zamanlardaki yapılan çalışmalarda biyosensörlerde enzimin indirgenme yükseltgenme merkezi ile elektrot yüzeyi arasında doğrudan elektriksel iletişim sağlamış olduğundan redoks medyatörlerine gereksinim kalmamıştır (Telefoncu, 1999).



Şekil 2.16. Bir biyosensörün genel şematik gösterimi

Biyosensörler çeşitleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

1. Elektrokimyasal Biyosensörler

- a. Amperometrik Biyosensörler
- b. Potansiyometrik Biyosensörler
- c. Kondüktometrik Biyosensörler

2. Optik Biyosensörler

3. Kalorimetrik Biyosensörler

4. Piezoelektrik Biyosensörler

Çizelge 2.3. Biyosensörlerle tayin edilebilen bazı maddeler (Pişkin, 1986)

<u>Analizi Yapılan Maddeler</u>	<u>Örnekler</u>
Amino Asitler	Alanin, arginin, asporjin, aspartik asit, sistin, glutamin, glutamik asit, glutation histidin, levsin, lizin, metionin, fenil alenin, sarkosin, serin, tayrosin, teitofan, valin
Gazlar	NH ₃ , H ₂ , CH ₄ , SO ₂ , NO
Kofaktörler	AMPT, ATP, NAD(P)H
Amidler ve aminler	Aminopirin, anilin, aromatik aminler, asetil kolin, kreatin, kreatinin, guanidin, guanosin, penisilin, spermin, ürik asit, üre, zantin
Karboksilik asitler	Asetik asit, formik asit, glukonik asit, izositrik asit, askorbik asit, laktik asit, malik asit, okzalik asit, pruvik asit, süksinik asit
Kompleks maddeler	Antibiotikler, mutojenler, vitaminler
İnorganik iyonlar	F ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₃ ⁻² , SO ₃ ⁻² , SO ₄ ⁻² , Hg ⁺² , Zn ⁺²

2.9.1. Biyosensörlerin Çalışma Mekanizması

Biyosensörlerin çalışması sırasında ilk önce substratın çözelti içerisinde biyosensör yüzeyine taşınması gerçekleşir. Substratın taşınması difüzyon, karıştırma vb. gibi çeşitli şekillerde olabilir. Substrat biyokatalizörün aktif bölgesine difüzenir. Biyokatalizör polimerik gözenekli membrana (selülozik diyaliz membranı gibi) emdirilmiş veya algılayıcı ile polimerik membran (selofan, selüloz asetat/nitrat, polivinil alkol, poliüretan vb) arasına sandviç edilmiş veya polimerik bir jel içinde hapsedilmiş olabilir. Bu hapsetme işlemi için poliakrilamid, jelatin, kalojen, agaroz vb. gibi doğal veya sentetik polimerler kullanılabilir. Biyokatalizör ve substrat arasında reaksiyon meydana gelen bu etkileşme sonucu gaz molekülleri (O₂, CO₂, NH₃, vb) salınabilir veya

kullanılabilir, seçimli iyonlar (H^+ , NH_4^+ , diğer tek değerlikli anyon ve katyonlar) oluşabilir, ısı ortaya çıkar veya kaybolur, optik yoğunluk değişebilir, elektron salınabilir veya kullanılabilir. Biyokatalizör ve substrat reaksiyonu sonucu oluşan ürün algılayıcı yüzeyine taşınır. Algılayıcı yüzeyinde yukarıda bahsedilen değişimler algılanıp elektriksel devrelerle ölçülebilecek bir boyuta dönüştürülür. Ölçülen elektriksel sinyal analit derişimiyle orantılıdır.

2.9.2. Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma sanayi ve birçok endüstriyel alanda özellikle otomasyon ve kalite kontrolünde çok önemli rol oynar. Bugüne kadar 180'den fazla farklı madde için biyosensör hazırlanmış olup, bunlardan ancak 25 kadarı ticari olarak üretilmektedir. Biyosensörlerin uygulama alanlarının bazıları aşağıda verilmiştir (Telefoncu, 1999). Biyosensörler; gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler ile bazı anorganik bileşikler yanında enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar (Telefoncu, 1999). Hiç kuşkusuz biyomedikal sektör biyosensörler için en iyi pazardır. Bu alanda uygulama olanağı bulunan ilk biyosensörler enzim sensörleridir. Ticari olarak üretilen ilk biyosensör ise şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayininde kullanılan glukoz oksidaz elektrodudur (Telefoncu, 1999).

Biyosensörler için bazı uygulama olanakları aşağıda yer almaktadır.

- Klinik teşhis, biyomedikal sektör
- Proses kontrolü
- Gıda üretim ve analizi
- Tarım ve veterinerlik
- Bakteri ve virüs teşhisi
- İlaç analizi
- Endüstriyel atık su kontrolü
- Çevre koruma ve kirlilik kontrolü
- Maden işletmelerinde zehirli gaz analizleri

➤ Askeri uygulamalar

Son yıllarda tıbbi analizörlere enzim elektrotları takılarak yoğun bakım ünitelerinde kullanılmaya başlanmıştır. Biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde başta glukoz olmak üzere birçok monosakkarit, aminoasitler, organik asitler (laktik asit) üre ve alkol tayinlerinde enzim sensörleri kullanılmaktadır. Ayrıca, gıdalardaki yabancı maddeler (pestisitler, toksinler ve hormonlar vb.) yanında aroma ve tazelik gibi kompleks değişkenlerin tayininde de biyosensörler kullanılabilir. Toprak, hava ve su kirliliğinin kontrolünde mikrobiyal sensörler ve enzim sensörleri kullanılmaktadır. İlaçların kötü amaçla kullanımı ve uyuşturucu ile mücadelede biyosensörler kullanılabilir. (Telefoncu, 1999).

2.9.3. Biyobileşenler

Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar , nükleik asitler ve biyolojik zarlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler, sensörlerde biyobileşen olarak kullanılırlar. Biyoreseptörler analiz edilecek maddeyi dönüşüme uğratar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler dönüştürücü tarafından algılanır. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyo materyallerdir. Uygun bir enzimin bulunamaması veya enzimin kararsız olması ve birden çok sayıda maddenin tayini durumlarında hücre sistemleri ve tercihen mikroorganizmalar kullanılır (Telefoncu, 1999).

2.9.4. Biyobileşen İmmobilizasyonu

Biyosensörler farklı özellikteki iki elemanın [dönüştürücü ve biyobileşen] kombinasyonu ile oluşurlar. Uygun biyoreseptör ve dönüştürücü seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması aşılması gereken en önemli sorundur. Bu bağlama işlemi biyoreseptör immobilizasyonu olarak tanımlanır. Bağlama işleminde çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen dönüştürücü ve biyoreseptöre göre belirlenir. İmmobilizasyon biyoreseptörün kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. Biyosensör immobilizasyonunda başlıca dört yöntem kullanılmaktadır (Telefoncu, 1999).

2.9.4.1. Kovalent bağlama

Enzimler doğrudan dönüştürücü veya önceden uygun bir film veya tabaka ile kaplanmış dönüştürücüye kovalent olarak bağlanabilirler. Enzimler aktifleştirilmiş dönüştürücü yüzeylerine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanarak immobilize edilen enzim preparatının dönüştürücü yüzeyinde bir film veya tabaka oluşturmasıyla da biyosensörler hazırlanabilir (Telefoncu, 1999).

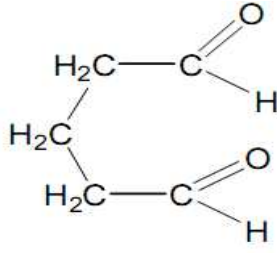
Enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için aktif merkezdeki amino asitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların sterik olarak rahatsız edilmemesidir. Kovalent bağlanma enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir (Telefoncu, 1999).

2.9.4.2. Tutuklama

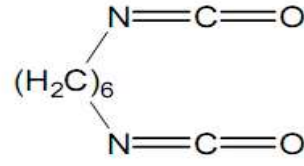
Biyoreseptörün bir membran veya tabaka içerisinde hapsedilmesidir. Enzimler makromoleküler yapılı proteinler olup polimer jel tabakalarda ve daha basit olarak diyaliz membranlarında tutuklanabilirler. Bu yöntem enzimler yanında organeller, hücreler ve antikolar için de uygulanabilir. Elektrokimyasal polimerleşme diğer bir tutuklama yöntemidir (Telefoncu, 1999).

2.9.4.3. Çapraz bağlama

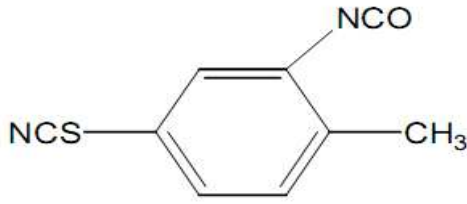
Bu yöntem biyosensör hazırlanmasında daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde uygulanır. Çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutraldehit, heksametilen diizosiyanat, diflorodinitrobenzen, bismaleimidoheksan, disüksinilsüberat sık kullanılır. İki fonksiyonlu reaktifler enzimler yanında organeller, hücreler ve antijenlerin immobilizasyonunda da uygulanır. Bazı çapraz bağlayıcıların formülleri Şekil 2.4 'de verilmiştir (Telefoncu, 1999).



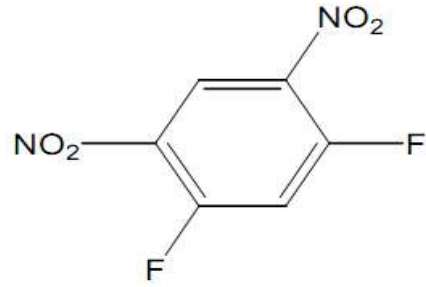
Glutaraldehit



Hekzametilendiizosiyanat



2-Izosiyanato-4-izotiyosiyanato-toluen



1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen

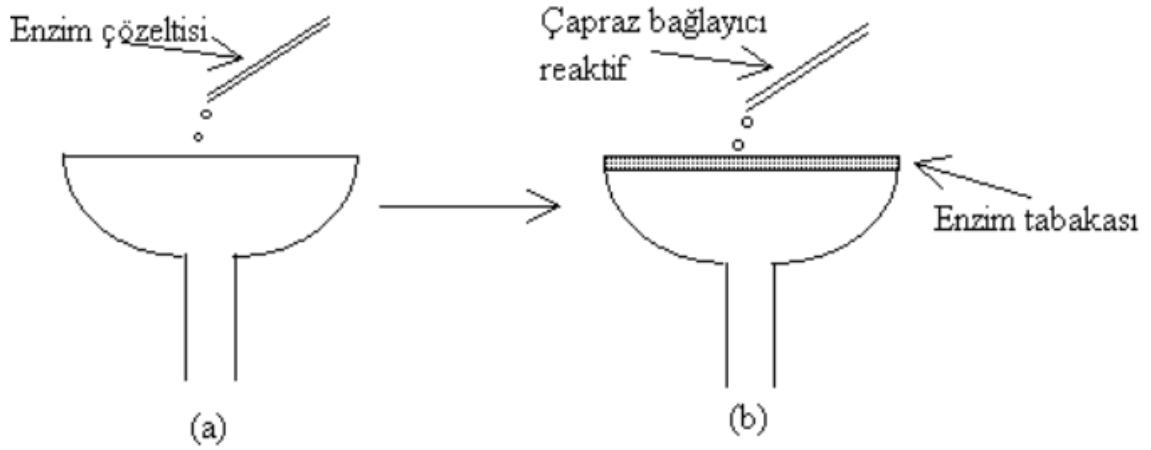
Şekil 2.16. Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri

Daldırma yöntemi

Elektrot önce enzim ve çapraz bağlayıcının bulunduğu karışıma veya enzim, albumin, jelatin gibi, suda çözünen protein ve çapraz bağlayıcının bulunduğu karışıma daldırılır, sonra kendi ekseni etrafında homojen bir enzim tabakası elde edilecek şekilde döndürülür. Bundan sonra elektrot glisin çözeltisine daldırılarak nötrleştirilir ve çapraz bağlayıcının fazlası ve diğer reaksiyona girmeyen maddeler yıkanarak uzaklaştırılır. Yöntem çok kolay ve özellikle küçük dönüştürücüler için çok uygundur (Telefoncu, 1999).

Doğrudan bağlama yöntemi

Bu yöntemde yaklaşık 10 µL enzim çözeltisi bir kılcal boru yardımıyla dönüştürücü yüzeyine ince bir tabaka oluşturacak şekilde damlatılır (Şekil 2.5a). Daha sonra çapraz bağlayıcı reaktif ilave edilir (Şekil 2.5b). Bu yöntem daldırma yöntemine göre daha az biyobileşen ile çalışılabilmektedir (Telefoncu, 1999).



Şekil 2.17. Direkt bağlama ile enzim immobilizasyonu (a) Enzim çözeltisi
 b) çapraz bağlayıcı reaktif ilave edilmesi (Telefoncu, 1999)

2.9.4.4. Adsorpsiyon

Bu yöntemde biyobileşenin film veya tabakaya adsorbe olması sağlanır. Biyobileşenlerin kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna göre immobilizasyon yöntemi belirlenir. Enzimler için uygulanan tüm immobilizasyon yöntemleri protein yapısındaki diğer biyoreseptörler için de uygulanabilir. Örneğin; hayvan ve bitki dokuları zar yapısında olduklarından farklı immobilizasyon yöntemleri uygulamak gerekir (Telefoncu, 1999).

İmmobilizasyon yöntemine göre biosensörlerin ortalama ömürleri aşağıda verilmiştir.
 Adsorpsiyon: 1 gün, Membranda tutuklama: 1 hafta Fiziksel tutuklama: 3-4 hafta
 Kovalent bağlama: 4-14 ay.

2.9.5. İletken Polimerlerle Enzim İmmobilizasyonu

İletken polimer elektrotların elektroanalitik uygulamalarında, enzim immobilizasyonuna sıklıkla rastlanılmaktadır. Enzim kullanılan biosensörlerin geniş bir uygulama alanı bulunmaktadır. Aizawa ve Foulds tarafından yapılan çalışmaların ardından enzimler çeşitli iletken polimerlerle immobilize edilmiştir. Enzim molekülüne monomer kimyasal

olarak bağlanabilmekte ve ardından iletken polimer elektrolizle üretilebilmektedir. Bu yöntem ile kovalent bağlı enzim elektrot elde edilmektedir. Birden fazla enzimin iletken polimerlere immobilize edilmesiyle de biyosensörler hazırlanabilmektedir. Laktat dehidrojenaz ve laktat oksidaz enzimlerinin poli (fenilendiamin) polimerine immobilize edilmesiyle çok hassas biyosensörler hazırlanmıştır (Akbulut, 1999).

2.10. Performans Faktörleri

Hazırlanan biyosensörün hedeflenen amaçlar çerçevesinde kullanılabilir olup olmadığına ancak performans faktörlerinin ayrıntılı bir şekilde belirlenmesinden sonra karar verilebilir (Dinçkaya, 1999).

2.10.1. Kararlılık

Bir enzim elektrodunun kararlılığı diğer faktörlerde yeterli koşullar sağlandıktan sonra onun pratik kullanılabilirliğinin en önemli belirteçlerinden biridir. Kararlılık biyosensör ömrünün uzunluğu hakkında fikir verir. Uzun ömür aynı materyalle çok sayıda analizin yapılabileceğini gösterir. Bu durum da iş gücü ve maliyet açısından önemli avantajlar sağlar (Dinçkaya, 1999). Doğanın temel ilkeleri çerçevesinde başta organik moleküller olmak üzere tüm maddeler kaçınılmaz bir yıkıma uğrarlar. Dolayısıyla biyosensörlerin de bir ömrü vardır. Söz konusu ömür onların depolama ve çalışma koşulları açısından başlıca iki durumda incelenir. Doğal olarak kullanılmadan ideal koşullarda depolandığındaki ömür ile sürekli çalışma koşullarındaki ömrü farklı olacaktır (Dinçkaya, 1999). Biyolojik materyal açısından enzim sensörünün kararlılığı incelendiğinde enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi gibi değişkenlerin önem taşıdığı görülür. Genelde fiziksel immobilizasyon yöntemlerinin kullanılması durumunda biyosensör ömrü kimyasal yöntemlere göre daha kısadır. Enzimin saflık düzeyi yükseldikçe doğal ortamındaki bileşenlerinden uzaklaştığı için kararlılıkta azalma söz konusu olabilir (Dinçkaya, 1999).

2.10.2. Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı

Kalibrasyon grafiğinde substrat derişimiyle sensör cevabı arasındaki ilişkisinin doğrusal olduğu derişim aralığına “doğrusal aralık” denir. Bu doğrusal grafiğin en alt sınırı tayin sınırı olarak tanımlanır. Bu değer bir kesinlik ve doğruluk ifade eder. Tayin sınırı kalibrasyon grafiğinin, doğrusal kısmının uzatılarak x eksenini kestiği nokta olarak tanımlanır (Dinçkaya, 1999).

Potansiyometrik enzim sensörlerinde kalibrasyon grafiği substrat (yada ürün) derişiminin logaritması ile potansiyel arasında çizilir. Buna karşılık amperometrik esaslı enzim sensörlerinde substrat (veya ürün) derişimiyle akım arasında doğrusal grafikler elde edilir. Ancak bütün grafikler Michaelis-Menten eşitliğinin kapsamı içindedirler. Genelde tayin sınırının 10^{-5} M’den daha düşük bir değer olmasının önemi vurgulanır. Amperometrik esaslı enzim sensörlerinde diğerlerine nazaran oldukça yüksek duyarlılıklara erişebilmek mümkündür. Doğal olarak doğrusal tayin aralığının ve tayin sınırının çalışma için uygunluğu, hedeflenen analizde analizlenecek maddenin analiz ortamındaki düzeyi ve girişim yapabilecek diğer maddelerle birlikteliğinden önemli ölçüde etkilenmektedir (Dinçkaya, 1999).

Bunun yanı sıra biyosensör cevabını etkileyen değişkenlerin doğrudan sensör kalibrasyonunu etkileyeceği gözden uzak tutulmamalıdır. Örnek olarak enzim sensörleri incelendiğinde başlıca pH sıcaklık ve girişim yapan maddeler sensör cevabını etkileyerek tayin aralığını değiştirebilirler. Çalışma pH’ından uzaklaşılmasıyla biyoaktif tabakadaki toplam enzim aktivitesinde değişimler olabilir. İkincisi ise enzimatik tepkime uyarınca tüketilen yada üretilen ve sinyal oluşumuna yol açan türlerin pH değişimiyle beraber disosiasyon değerlerinin değişmesidir. Bu durum tayin edilecek maddenin aktif türün derişiminde değişikliğe neden olarak sensör cevabında değişmeye yol açabilir. Böylece pH farklanmasıyla kalibrasyon eğrisinde değişimler ortaya çıkar. Sıcaklık, enzim sensörünün cevabını optimum sıcaklıktan uzaklaşılması durumunda olumsuz yönde etkiler. Bu, özellikle termal kararlılığı düşük enzimlerde geri dönüşümsüz bir denaturasyonla da sonuçlanabilir. Buna karşılık çeşitli kimyasal türlerin difüzyon hızlarının sıcaklıkla artması enzim sensör cevabında bir artışa neden olur (Dinçkaya, 1999).

Herhangi bir girişim yapan madde enzim sensörü cevabını başlıca üç şekilde etkileyebilir. Bu etkileşimlerden birincisi, girişim yapan maddenin etkisinin temel sensör üzerinde, ikincisi biyoaktif tabakadaki enzim üzerinde, üçüncüsü ise; enzimatik tepkimedeki bileşikler üzerinde göstermesiyle gerçekleşir. Söz konusu durumlara örnek olarak sırasıyla katyon seçici temel sensörlerin ortamdaki diğer katyonlardan etkilenmesi, inhibitör veya aktivatörlerin veya mutlak özgül olmayan enzimler için benzer substratların biyoaktif tabakadaki enzim aktivitesini etkilemesi ve ortamda bulunabilecek bazı indirgen veya yükseltgen maddelerin enzimatik reaksiyonu substrat veya ürünleriyle etkilemesi verilebilir. Sonuçta enzim sensörü cevabındaki değişim kalibrasyon grafiğinde değişmeye ve çoğu zaman tayin aralığında ve tayin sınırında değişmeye yol açar. Bu gibi problemleri ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için, temel sensör seçilirken analiz ortamında onu etkileyecek unsurların varlığı dikkate alınmalıdır. Enzim aktivitesi açısından aktivatörlerin maksimum düzeyde ilavesine buna karşılık inhibitörlerin uzaklaştırılmasına önem verilmelidir. Aktivatör ve inhibitör etkisi biyoaktif tabakadaki enzim aktivitesinin artırılmasıyla büyük ölçüde engellenebilir. Enzimatik tepkimenin substrat ve ürünleriyle girişim yapan maddelerin varlığı önemli bir problemdir. Bu problem girişim yapan maddenin bir ön işlemle uzaklaştırılması ya da tepkime bileşenlerinden girişim yapan maddenin etkilemediği bir tanesine duyar bir temel sensör kullanılmasıyla çözüme kavuşturulabilir (Dinçkaya, 1999).

2.10.3. Seçimlilik

Seçimlilik diğer analiz sistemleriyle kıyaslandığında biyosensörlerin varlık nedenlerinin en ön sıralarında gelmektedir. Kullanılan biyomateryal açısından bakıldığında enzimler genel anlamda seçimlilik sıralamasında antikör ve nükleik asitlerden sonra gelirler. Ancak bu genel yaklaşım mutlak özgül enzimler söz konusu olduğunda geçersizdir. Dolayısıyla mutlak spesifik bir enzim söz konusu olduğunda seçimlilik de en üst seviyelere yükselir. Buna karşılık özgüllüğü düşük enzimler, grup özgül enzimler, kısmi saflaştırılmış enzim preparatları, dokular ve mikroorganizmalar seçimlilik açısından bir takım olumsuzluklara sahiptirler (Dinçkaya, 1999).

Bir biyosensörün seçimliliği üzerinde başlıca, sensörle girişimler, biyokatalizörle girişimler ve pH etkili olmaktadır. Sensörde meydana gelebilecek girişimleri

engellemenin en iyi yolu örnekteki diğer maddelere cevap vermeyen ve yalnızca ilgilenilen biyokatalitik tepkimeyi izleyebilecek bir sensör kullanmaktır. Örneğin; kanda üre tayinine yönelik bir biyosensörde temel sensör olarak NH_4^{4+} 'a duyarlı bir iyon seçimli elektrodun kullanılması ortamda bulunan Na^+ ve K^+ iyonlarının girişimine neden olur. Buna karşılık temel sensör olarak NH_3 'e duyarlı bir sensör kullanılması bu istenmeyen durumu ortadan kaldırır (Dinçkaya, 1999).

Amperometrik sensörler potansiyometrik olanlara nazaran bir ölçüde daha özgüldürler. Seçilmiş sabit bir potansiyelde iş görmelerine rağmen, söz konusu koşullarda elektroaktif maddelerin varlığı girişime neden olabilir (Dinçkaya, 1999).

Seçimliliği etkileyen diğer önemli değişken biri olan biyokatalizatörle girişim, enzimler söz konusu olduğunda, iki başlık altında incelenebilir. Bunlar yarışmalı substratlar ve enzimi aktive veya inhibe eden maddelerdir. Eğer enzim üreaz [substrat :üre], ürikaz [substrat: ürik asit], aspartaz [substrat: aspartik asit] gibi yalnızca bir substratla tepkime verme özelliğine sahipse yarışmalı bir başka substrat girişimi söz konusu değildir. Ancak alkol oksidaz gibi grup özgüllüğüne sahip enzimler (substrat: düşük molekül kütleli primer alkoller) veya amino asit oksidazlar (substrat: amino asitler) söz konusuysa esas tayin edilecek türün yanında diğerlerinin de varolması girişim etkisine yolaçar. Bu durumda bazı ön işlemlerin yapılması gereksinimi doğar. Bir enzim sensöründe enzim aktivitesi ölçme ortamından gelen inhibitör ve aktivatörlerden de etkilenir. En önemli inhibitörler Ag^+ , Hg^{2+} ve Cu^{2+} gibi metal iyonları, organofosfatlar ve tiyol bileşikleridir. Başta oksidazlar olmak üzere pek çok enzimin aktif merkezinde yeralan serbest tiyol gruplarını bloke ederler. Ortamda bulunabilecek enzim aktivatör veya inhibitörleri, enzim aktivitesini değiştireceği için hatalı sonuçlara ulaşılmasına neden olurlar. Bu nedenle analizlenecek örnek içeriğinin iyi yorumlanması büyük önem taşır (Dinçkaya, 1999).

Ortamın pH'ı da seçimliliği etkileyen önemli değişkenlerden biridir. pH etkisi hem enzime hem de sensöre değişik şekillerde etkir. Bilindiği gibi her enzim en yüksek düzeyde aktivite gösterdiği bir optimum pH'a sahiptir. İmmobilizasyon sonucu bazı durumlarda taşıyıcının yapısına bağlı olarak optimum pH'da kaymalar olabilir. Bunun yanısıra ilgili enzimatik tepkimede yüklü substratların söz konusu olması durumunda

pH'a bağlı olarak bu substratların yük durumlarındaki değişimler de seçimlilik üzerine etki edebilir.

Ayrıca temel sensörün de, özellikle bazı tür elektrotlarda optimum cevap için belirli pH gereksinimleri vardır. İleriki faktör arasındaki uyum, teorik olarak pH zorlamalarının yerine, en pratik bir şekilde, hazırlanan biyosensörün en hızlı, en kararlı ve en duyarlı cevap verdiği optimum pH değerinin deneysel olarak belirlenmesiyle elde edilir (Dinçkaya, 1999).

Gerçekte tayin aralığının da seçimlilik üzerinde bir etkisi vardır. Örneğin; bir ölçme yapılacak ortamda analiz edilecek hedef maddenin yanında girişim yapabilecek bir başka maddenin var olması durumunda, hedef maddeye ilişkin tayin aralığı büyük önem taşır. Oldukça düşük tepkimelere inebilen bir tayin aralığında, örnekteki hedef maddenin önemli ölçüde seyreltilerek tayinine olanak varsa, girişim yapacak maddenin konsantrasyonunu bu işlemler sonucunda tayin sınırları dışına çıkarılması mümkün olabilmektedir. Bu durum sonuçta seçimliliğe önemli bir katkı sağlar (Dinçkaya, 1999).

2.10.4. Cevap Süresi

Biyosensörlerin büyük bir hızla yaygınlaşmasının en önemli nedenlerinden biri, ideal bir biyosensörün de temel niteliklerinden olan pratik bir işlemlerle kısa sürede sonuç verebilmesidir. Çok sayıda örneğin söz konusu olduğu rutin analizlerde mümkün olan en az ön işlemlerle en kısa sürede elde edilen sonuç büyük önem taşımaktadır. Cevap süresi ile kastedilen, biyosensörün, analizlenecek maddenin bulunduğu ortama temas ettiği andan itibaren ölçme düzeneğinden sonucun okunduğu ana kadar geçen süredir (Dinçkaya, 1999).

Bir biyosensörün cevap süresi 3 ana aşamada meydana gelen olaylar tarafından etkilenir. Bunlar;

1. Substratın analiz ortamından zar yüzeyine ne kadar hızlı, difüzlendiği,

2. Substratın zar içine ne kadar hızlı difüzlendiği ve biyokatalizörün aktif merkezi ile ne kadar çabuk tepkime verdiği,

3. Oluşan ürünün ölçüldüğü yer olan sensör yüzeyine ne kadar hızlı difüzlendiği.

Bu üç olayı etkileyen başlıca unsurlar da çözeltinin karıştırma hızı, substrat derişimi, enzim derişimi , optimum pH, sıcaklık ve sensör yüzeyinde veya biyoaktif tabaka yüzeyinde herhangi bir zarın kullanılıp kullanılmadığı ve kullanılıyorsa niteliğidir. Bu unsurlardan karıştırma hızının artışı cevap süresini kısaltırken, substrat derişimindeki artış uzamasına yol açar. Enzim miktarının artışı ve optimum pH'a yaklaşma cevap süresini kısaltır.

Ancak enzim miktarı artışı biyoaktif tabaka kalınlaşmasına yol açacağı için difüzyon problemini arttırabilir ve cevap süresi uzar. Bu sorun spesifik aktivitesi yüksek enzim preparatlarının kullanımıyla giderilebilir. Sıcaklık difüzyonu olumlu yönde etkileyerek cevap süresinin kısalmasına yol açar. Ancak enzimin optimum sıcaklığından uzaklaşmasının enzim aktivitesinde bir düşmeye neden olacağı gözden uzak tutulmamalıdır (Dinçkaya, 1999).

Biyosensörler için cevap süresi genel olarak birkaç saniye ile birkaç dakika arasında değişir. 5 dakikaya kadar olan değerler kabul edilebilir. Ancak 10 dakika gibi bir süre oldukça uzun kabul edilir. Doğal olarak bir biyosensörün en az sürede en çok sayıda analize imkan vermesi sadece cevap süresiyle sınırlı bir durum değildir. Yeni bir ölçüme hazır hale gelebilmesi için gereken polarizasyon, denge veya yenilenme gibi işlemlerin aldığı süre çoğu zaman cevap süresinden çok daha fazla bir süre alır (Dinçkaya, 1999).

2.10.5. Tekrarlanabilirlik

Hazırlanan bir biyosensör ile tekrarlanabilirlik denemelerinin en basiti aynı bir örnekle ardarda ölçme yapılması ve elde edilen değerlerden standart sapma ve korelasyon

katsayısının hesaplanmasıdır. Her zaman standart kalibrasyon grafiği çizme gereğinden kaçınılması durumunda, standart ilave yöntemlerinden yararlanır. Bu amaçla analizlenecek örnek ölçülür, ardından gerçek değeri bilinmeyen bu örneğin ölçme sonuçlarına göre yaklaşık iki katı derişimde bilinen bir standart eklenir ve ölçme işlemi gerçekleştirilir. Bu yöntem sensör cevabının örnek derişimiyle doğrusal değıştiğinin bilindiği durumlarda aşağıdaki bağıntı yardımıyla hesaplanır (Dinçkaya, 1999).

$$C_u = \frac{ruC_s}{(r(u+s) - ru)} \quad (2.10)$$

Bağıntıda C_u : Bilinmeyen örneğin derişimini, C_s : Eklenen standardın konsantrasyonunu, ru : bilinmeyen örneğin sensör cevabını, $r[u+s]$: bilinmeyen örnek ve eklenen standardın sensör cevapları toplamını ifade eder (Dinçkaya, 1999).

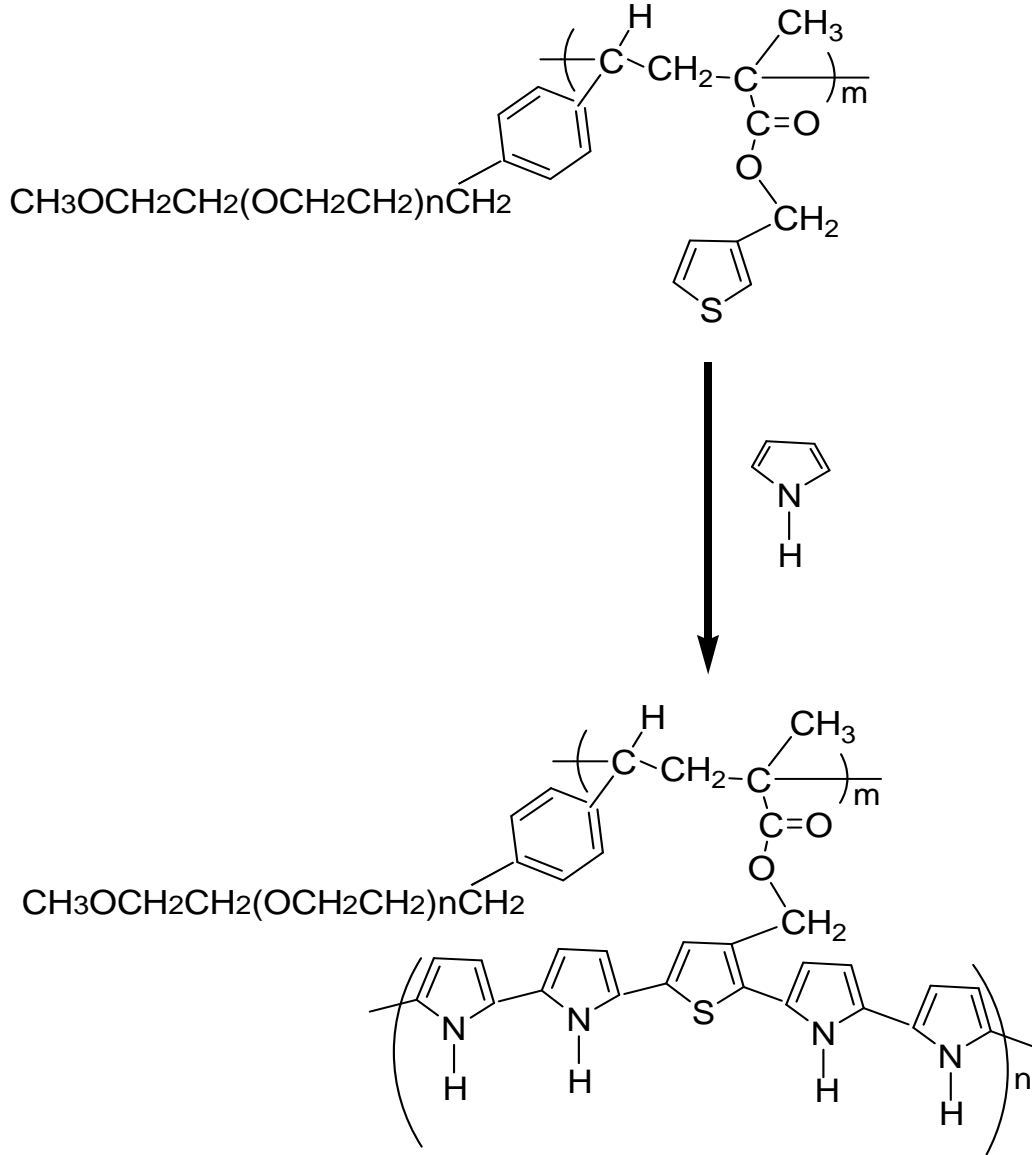
2.10.6. Diğer Performans Faktörleri

Bir biyosensörün performansını etkileyen diğer önemli faktörlerden biri de maliyettir. Maliyet genelde biyosensörün hazırlanması giderleri ile söz konusu biyosensörle yapılan bir analizin giderlerinin toplamıdır. Hazırlanma giderlerinin az olması durumunda genelde bu fasıldan analiz başına gelecek gider katkısı azalacaktır. Doğal olarak biyosensörün kullanılma kararlılığı bu faktörü büyük ölçüde etkileyecektir (Dinçkaya, 1999).

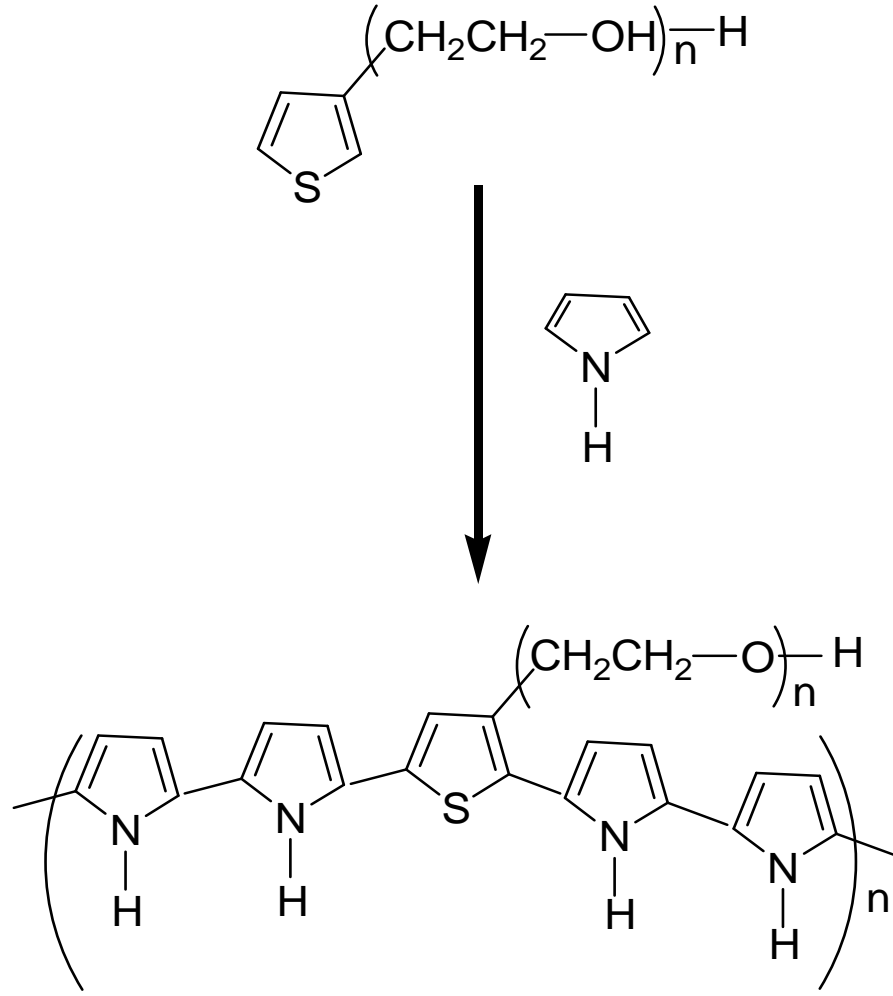
Özellikle çevre ve savunma gibi alanlarda kullanılacak bir biyosensör için taşınabilir olması büyük önem taşır. Taşınabilirlik beraberinde kullanım kolaylığını ifade edecek şekilde basit olma niteliğini de içeriyorsa daha yaygın kullanım olanağı ortaya çıkacaktır. Ancak pratik kullanım için basitleştirilmiş sistemlerin, çoğu zaman karışık sistemlere nazaran hatalı olabileceği gözden uzak tutulmamalıdır. Genelde bu gibi sistemlerden acil durumlarda bir fikir edinmek amacıyla ya da diğer türden bir analizin mümkün olmadığı koşullarda yararlanılmalıdır (Dinçkaya, 1999).

3. MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada glikoz oksidazın tiyofensönlu poli (etilenoksit) / Polipirol (PEO-co-PPy) ve 3-metiltiyenil metakrilat-co-p-vinil benziloksi poli (etilenoksit) / polipirol (CP-co-PPy) matrisleri içerisinde elektro polimerizasyon yoluyla tutuklanmasıyla meydana getirilen biyosensör çalışması yapılmıştır.



Şekil 3.1. CP-co-PPy iletken kopolimer yapısı



Şekil 3.2. PEO-co-PPy kopolimer iletken yapısı

CP ve PEO' nun sentez ve karakterizasyonu daha önceki çalışmalarda yapılmıştır. GOD' ın tutuklanması için optimum şartlar bu çalışmada belirlenmiştir. Sıcaklık, pH ve kinetik parametler (K_m ve V_{max}) gibi GOD' ın tutuklanması için optimum şartlar belirlenmiştir. Ayrıca raf ömrü ve çalışma kararlılığı deneyleri yapılmıştır. Bu biyosensörlerin çalışma kararlılığı ve raf ömrü belirlenmiştir. Türkiye'de üretilen üretilen iki farklı firmaya ait portakal sularındaki glikoz miktarı bu enzim elektrotları kullanılarak belirlenmiştir. Bulan glikoz miktarları Lane–Eynon metodu kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Glikoz oksidaz, (37.700 U / g) Tip II-S, (GOD, EC:1.1.3.4), peroksidaz enzimi Tip II, (POD, EC: 1.11.1.7), o-dianisidin, sodyum dodesil sülfat (SDS) Sigma firmasından alınmıştır. Merck firmasından temin edilen pirol kullanımdan önce distillenerek saflaştırılmış ve + 4 °C' de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Sülfürik asit ve hidrojen peroksit ise Merck firmasından satın alınmıştır.

3.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Cihazlar	Marka
UV- Görünür Bölge Spektrofotometresi	Shmadsu UW 160-A
SEM	Leon 440
Analitik Terazı	Sartorius BL 210 S
Etüv	Nüve FN 400
Saf Su Cihazı	Human Power I Scholar-UV
pH metre	Gnolab wtw Series
Potansiyostat	Wenkinck POS-73
Electrochemical Workstation	CHI 660b

3.2. Metod

3.2.1. Elektrotların hazırlanması

Glikoz oksidaz PEO-co-PPy matrisi içerisinde tutuklanması için, 2 mg/mL glikoz oksidaz, 2 mg/mL PEO, 1,2 mg/mL destek elektrolit (SDS) , 0,01 M pirol içeren 10 mL asetat tampon çözeltisi (pH 5,1) tipik üç elektrotlu hücreye konulmuştur. Bu üç elektrotlu hücre Pt çalışma elektrodu, Pt karşıt elektrot ve Ag/Ag + (0,01 M) referans elektrotlarıdır. Enzim tutuklaması işlemi oda sıcaklığında 20 dakika boyunca 1,0 V sabit bir potansiyelde gerçekleştirildi. Glikoz oksidazın CP-co-PPy matrisi içerisinde tutuklanması daha önce CP ile kaplanmış Pt elektrot (1cm^2) üzerine pirolün elektropolimerizasyonu ile meydana gelir. Enzim elektrodu 1,2mg/mL SDS destek elektroliti 0,01M pirol ve 2mg/mL GOD içeren 10 mL asetat tampon çözeltisi (pH 5,1) içerisinde hazırlanır. Enzim tutuklaması işlemi oda sıcaklığında 20 dakika boyunca 1,0 V sabit bir potansiyelde gerçekleştirildi. Hazırlanan enzim elektrotları kullanılmadıkları zaman asetat tampon çözeltisi içerisinde + 4 °C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Glikoz Oksidaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzim aktivitesinin belirlenmesinden Sigma yayınlarında belirtilen yöntem kullanıldı (Sigma Bülteni, 1993). Serbest glikoz oksidaz aktivitesinin tayini için, glikoz çözeltisi 15 mL' lik bir deney tüpüne alındı ve 25 °C' de termal dengeye gelinceye kadar su banyosunda bekletildi. 0,1 mL enzim çözeltisinin eklenmesinden sonra enzim-substrat arasındaki reaksiyonun gerçekleşmesi için 0, 2, 4, 6 dak. beklendi. Sonra 0,1 mL POD(60 PU/mL) H₂O₂ reaksiyonunu katalizlemek için ve 4 mL o-dianisidin renklendirici olarak ortama ilave edildi. Reaksiyon 0,5 mL 2,5 mol/L H₂SO₄ eklenerek durduruldu. Spektrofotometrik ölçümler 530 nm' de gerçekleştirildi. İmmobilize enzim aktivitesinin tayini için, enzim elektrodu glikoz çözeltisine yerleştirildi ve spesifik reaksiyon süreleri başlatıldı. Ölçümün devamı serbest enzim aktivitesinin belirlenmesinde olduğu gibi gerçekleştirildi. H₂O₂ standart kalibrasyon eğrisi enzim aktivitesini belirlemek için kullanıldı. Çözeltilerin absorbansı 530 nm dalga boyunda UV spektrofotometresinde belirlendi.

3.2.3. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimlerin kinetik parametreleri, Michealis-Menten (K_m) ve maksimum reaksiyon hızı (V_{max}), sabit pH ve sabit sıcaklıkta değişik substrat konsantrasyonlarında belirlenmiştir. Farklı derişimlerdeki glikoz oksidaz enzimi için Michealis-Menten kinetik parametreleri, Linewear – Burk noktalama yöntemi ile (K_m ve V_{max}) belirlendi.

3.2.4. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

İmmobilize glikoz oksidaz enziminin optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmesi için reaksiyon sıcaklığı 10 °C ile 80 °C arasında değiştirilip, glukoz konsantrasyonu her durum için 10 K_m olarak sabit tutulmuş ve immobilize glikoz oksidaz enziminin optimum reaksiyon sıcaklığının belirlenmiştir.

3.2.5. Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

İmmobilize glikoz oksidaz enziminin optimum pH değerinin belirlenmesi için 25 °C de glikoz oksidaz konsantrasyonu 10 K_m olarak sabit tutulmuş ve pH 4 ile 11 arasında değiştirilerek immobilize glikoz oksidaz enziminin optimum pH değeri saptanmıştır.

3.2.6. Raf Ömrünün Belirlenmesi

İmmobilize glikoz oksidaz enziminin raf ömrünün belirlenebilmesi için haftada 2 defa bölüm 3.2.2 de anlatıldığı üzere çalışma yapılmıştır. Enzim ve elektrotlar ile çalışılmadığın da bu materyaller tampon çözelti içerisinde buzdolabında saklandı.

3.2.7. Çalışma Kararlılığının Belirlenmesi

Enzim elektrotlar ile bir gün boyunca 40 defa, bölüm 3.2.2 de anlatıldığı üzere çalışma yapılarak enzim aktivitesi belirlenmiştir.

3.2.8. Film Yüzeylerinin İncelenmesi

Hem enzim tutuklanmış hem de enzim tutuklanmamış polimer filmlerin yüzeyleri incelendi. Elektrot yüzeyinde sentezlenen polimer filmler soyulduktan sonra tampon çözelti ve enzim tutuklanmamış filmler diklormetan veya su ile birkaç defa yıkanarak tutuklanmayan enzimler yüzeydeki destek elektrolitler, ortamdan uzaklaştırıldı ve SEM ile filmlerin çözelti yüzeylerinin mikro filmleri çekildi.

3.2.9. Enzim Elektrotlarında Protein Tayini

Protein belirlenme ölçümleri Bradford metodu kullanarak yapılmıştır. Bu ölçümler sırasında bir hacim stok çözelti ile 4 hacim saf su karıştırılmasıyla Bradford reaktif çözeltisi hazırlanmıştır. Protein kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için bovin serum albumin (BSA) kullanılmıştır. Değişik konsantrasyonlarda BSA 1 mL ve 2 mL Bradford çözeltisi katılarak hazırlanmıştır. Enzim elektrodu içerisinde tutuklanan protein miktarı direk ölçülemeyeceğinden, burada protein miktarı, elektroliz solüsyonu elektrolizden önce ve sonra ölçülerek bulunmuştur. Bu elektrolizden önceki ve sonra protein miktarlarının farkı bize enzim elektrodu içerisindeki protein miktarını verir.

3.2.10. Portakal Sularındaki Glikoz Miktarının Lane-Eynon ve Enzim Elektrotlarının Kullanarak Belirlenmesi

Bu belirlenme çalışmalarının ilkinde Lane-Eynon metodu kullanılmıştır. (Yıldız, 2005). Lane-Eynon metodu yüksek sıcaklık (yaklaşık 100 °C) ve bazik ortam altında glikozun Cu(II) ile titrasyonu sonucu indirgenmesidir. Enzim elektrotları yardımıyla portakal sularındaki glikoz miktarlarını bulunması deneylerinde bölüm 3.2.2 de anlatılan metot kullanılmıştır. Bu metot da substrat olarak β -D-Glikoz yerine portakal suyu kullanılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Enzim Elektrotları İçin Protein Tayini

Serbest enzimin aktivitesi için 11.9 $\mu\text{mol/dk.mg}$ protein miktarı bulunmuştur. Enzim elektrotları için protein tayini sonuçları PPy/GOD, PEO-co-PPy/GOD ve CP-co-PPy/GOD enzim elektrotları için protein tayini sonuçları sırasıyla 3.27×10^{-3} ve 3.32×10^{-3} ve 6.53×10^{-3} mg olarak bulunmuştur.

4.2. Kinetik Çalışmalar

Kinetik parametler, enzimin substrata karşı ilgisini tanımlayan Michaelis-Menten sabitiyle (K_m), enzimatik tepkimenin maksimum tepkime hızını (V_{max}) içerir. Düşük K_m değeri enzimin substrata karşı yüksek ilgisini tanımlar. Bu parametler $1/V_0$ a karşılık $1/[S]$ konsantrasyonuna karşı çizilen Lineweaver-Burk eğrisinden elde edilir. Bu sistem Michaelis-Menten eşitliğine uyar. Doğrusal olan bu eğri herhangi bir yerden doymun substrat konsantrasyonuna ekstrapole edilebilir. Hiç deney yapılmasa bile bu ekstrapole edilmiş grafikden V_{max} ve K_m değerleri bulunabilir.

PEO-co-PPy/GOD ve CP-co-PPy/GOD enzim elektrotlar için V_{max} değerleri sırasıyla $1.25 \mu\text{mol/dk.cm}^2$ ve $1.32 \mu\text{mol/dk.cm}^2$ olarak bulunmuştur. Bu iki enzim elektrodunun V_{max} değerleri birbirine çok olduğu gözlenmiştir.

PPy/GOD enzim elektrodunun V_{max} değeri $1.94 \mu\text{mol/dk.cm}^2$ olarak bulunmuştur. PEO-co-PPy/GOD ve CP-co-PPy/GOD elektrotların V_{max} değerleri PPy/GOD elektrodu ile karşılaştırıldığında, PPy/GOD elektrodunun V_{max} değerinin, PEO-co-PPy/GOD ve CP-co-PPy/GOD elektrotların V_{max} değerlerinden 2 kat daha fazla olduğu görülmektedir.

Bu sonuçlar PPy, PEO-co-PPy ve CP-co-PPy tarafından enzim elektrotları içerisinde tutuklanan sırasıyla 6.53×10^{-3} , 3.27×10^{-3} ve 3.32×10^{-3} mg protein miktarı olarak desteklenmektedir.

Bu çalışmada serbest enzime kıyasla enzim elektrotlarının K_m değeri çok yüksek bulunmuştur. K_m değerlerinin değişimi enzimin kendi substratına ilgisini gösterir.

Bu çalışmada kullanılan matrislerin içerisindeki mikro çevre K_m değerlerinin yükselmesine neden olmuştur. Böylelikle enzimin substratla ilişkisi daha zor olmuştur.

PEO ve CP kopolimerlerinin K_m değerlerinin PPy matrisinin K_m değeri ile karşılaştırıldığında bu kopolimerlerin K_m değerlerinin daha küçük olduğu görülmüştür. Bu da kopolimerlerin enzim için daha uygun bir mikro çevre yarattığını göstermektedir.

Çizelge 4.1. Serbest ve İmmobilize Glukoz Oksidaz için kinetik parametreler

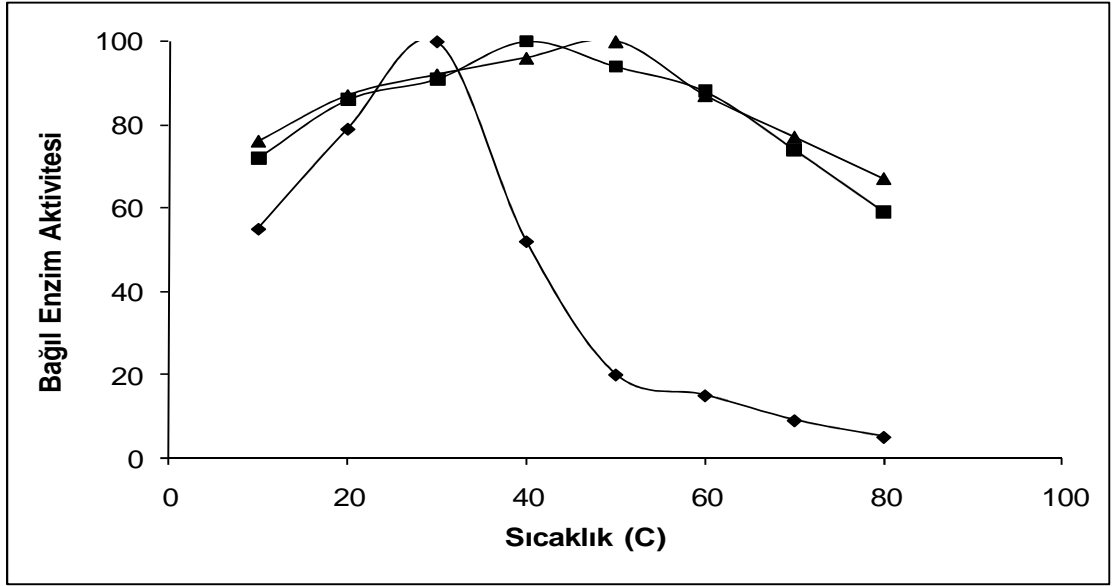
	K_m	V_{max}
Serbest GOD	8.70 mM	11.9 $\mu\text{mol/dk.mg protein}$
PPy/GOD	32.0 mM	1.94 $\mu\text{mol/dk.cm}^2$
PEO-co-PPy/GOD	15.0 mM	0.94 $\mu\text{mol/dk.cm}^2$
CP-co-PPy/GOD	19.0 mM	0.96 $\mu\text{mol/dk.cm}^2$

4.3. Sıcaklık Etkisi

10 °C ile 80 °C arasında ki sıcaklığın çalışılan bağıl enzim aktivitesine etkisi Şekil 4.1' de görülmektedir. Serbest enzim ve PPy/GOD enzim elektrodu için maksimum aktivitenin gösterdiği sıcaklık 30 °C olarak belirlenmiştir.

PEO-co-PPy matris için maksimum enzim aktivitesi 40 °C ve CP-co-PPy matris için 50 °C olarak ölçülmüştür. Bu sıcaklıklardan 80 °C' ye doğru çıkıldıkça enzim elektrotları aktivitelerinin % 40'ını kayıp ettikleri görülmüştür.

PEO-co-PPy/GOD ve CP-co-PPy/GOD elektrotları PPy/GOD elektrodundan düşük sıcaklıklardan daha kullanışlıdır. Çünkü 10 °C de bile bu enzim elektrotlarının aktivitesi yüksektir.



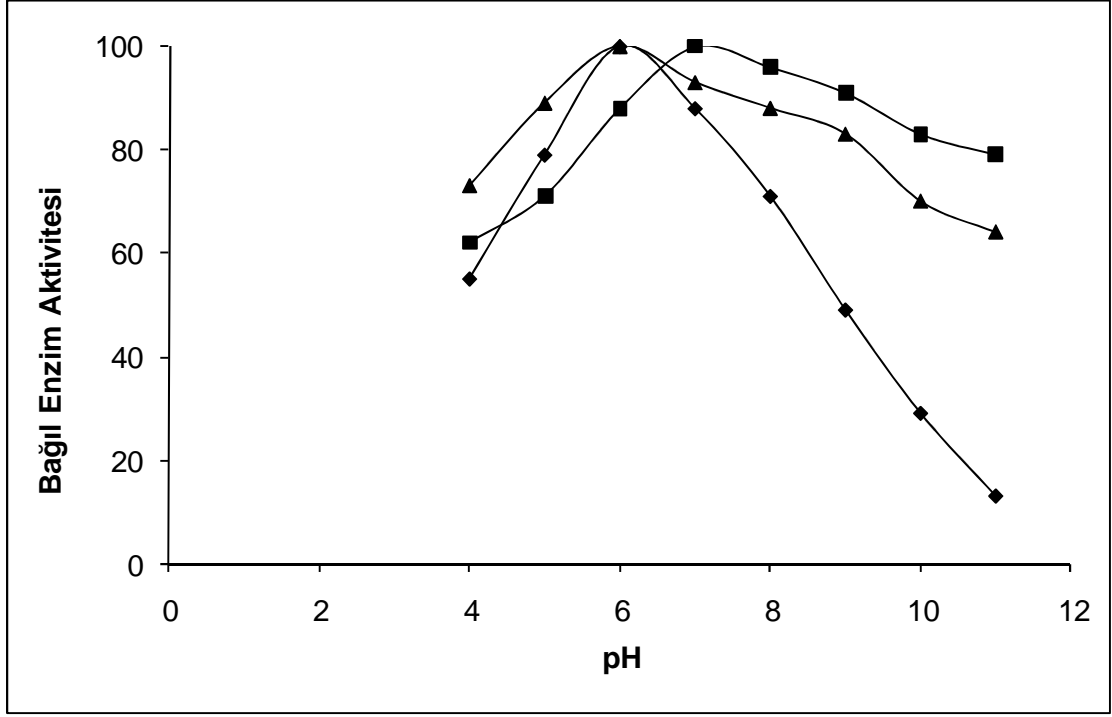
Şekil 4.1. PPy (◆), PEO-co- PPy (■) CP-co- PPy (▲) için glikoz oksidaz aktivitesi üzerinde sıcaklık etkisi

4.4. pH Etkisi

Serbest glikoz oksidaz enzimi için maksimum aktivite pH 5,5' de görülmüştür. PPy ve CP-co-PPy matrisleri için maksimum aktivitenin görüldüğü pH değeri 6 ve pH 7' de PEO-co-PPy matrisinin enzim aktivitesi maksimum seviyede olduğu gözlenmiştir. Bütün bunlar Şekil 4.2 de gösterilmiştir.

25 °C' de ki pH optimizasyonları için ortamın pH değeri 4 ile 11 arasında değiştirtmiştir. Glikoz oksidazın pH 4,0' dan düşük asidik ortam içerisinde denatürize olmasından dolayı pH optimizasyonları enzim elektrotları için pH 4,0'dan başlatılmıştır. Matrisin negatif yüklenmiş grupları, protonların konsantre olmasına neden olur. Buda enzimin etrafındaki pH değerinin düşmesine neden olmaktadır. Bunun sonucunda ise enzim etrafındaki pH değerinden daha düşük olacaktır. PEO-co-PPy ve CP-co-PPy matrisleri pH 11'e yükseldiğinde sırayla aktivitelerinin %20 ve %40' ını kaybetmişlerdir. Bunun yanı sıra PEO-co-PPy matrisinin ise pH 7 ile 10 aralığında enzim aktivitesi sabittir.

Dolayısıyla bu matris, enzim reaksiyonları için, yüksek pH değerlerinde güvenilir bir şekilde kullanılabilir.

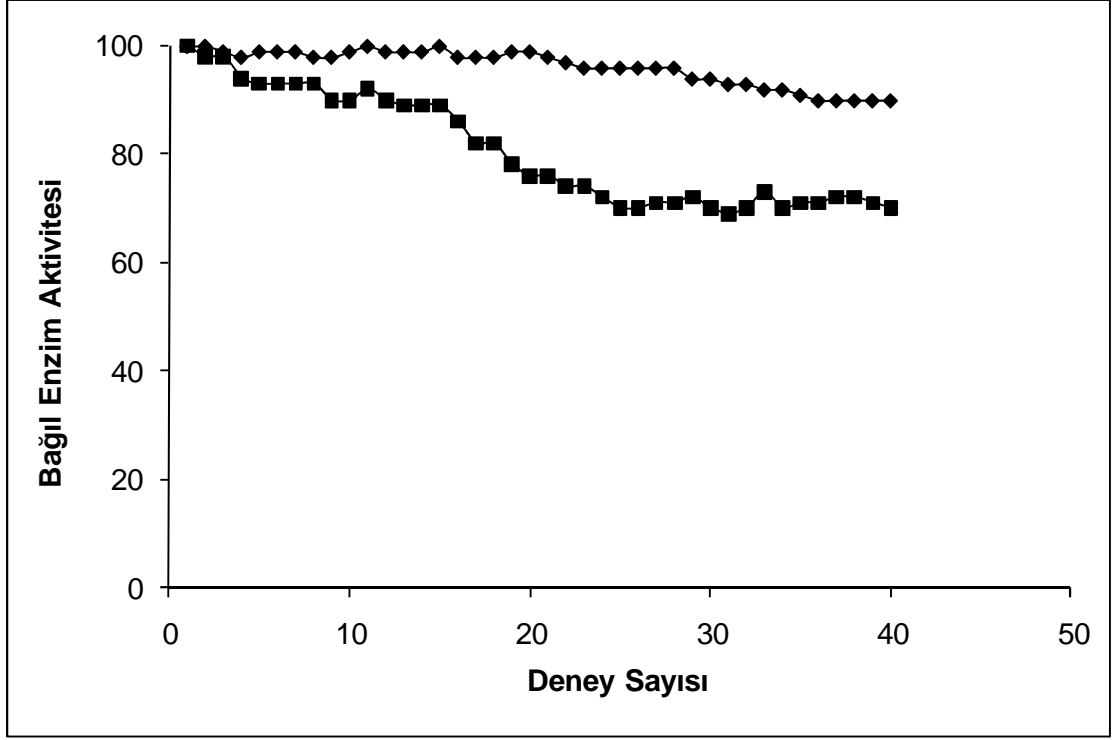


Şekil 4.2. PEO-co-polipirol (■), CP-co-polipirol (▲) polipirol (◆) için glikoz oksidaz aktivitesi üzerine pH etkisi

4.5. Enzim Elektrotların Kullanım Kararlılığı ve Raf Ömrü

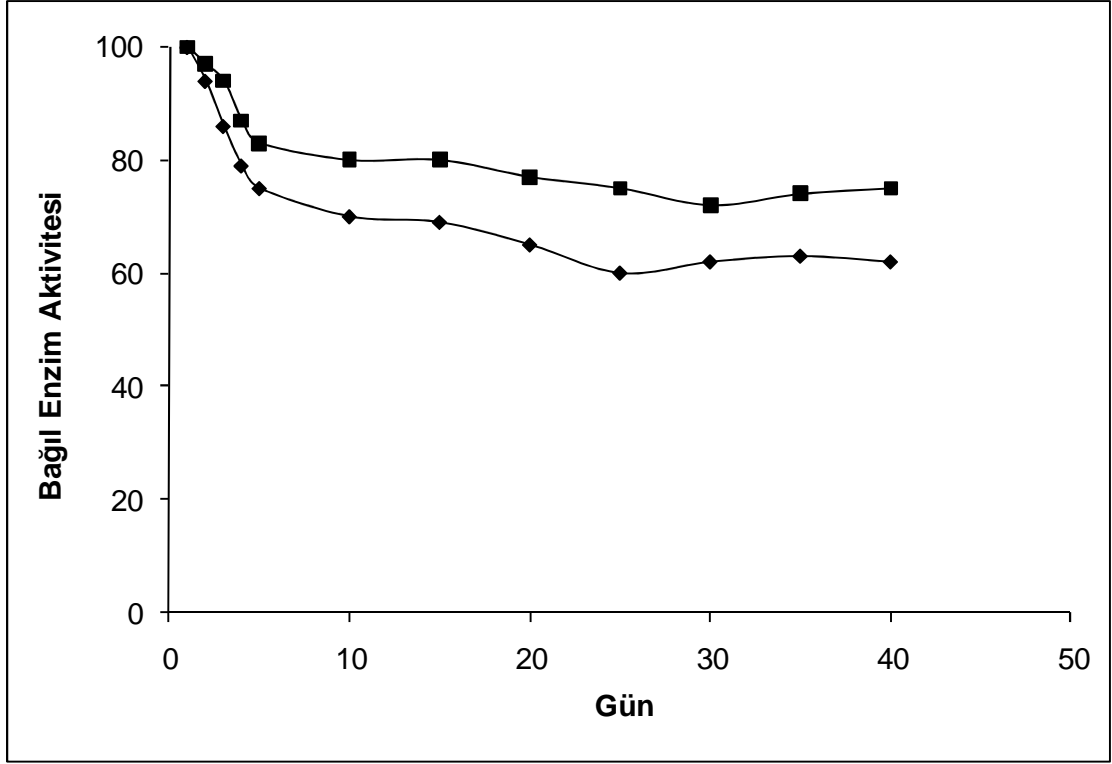
Enzimler kendi katalitik aktivitelerini çok kolay kaybettikleri ve denatüre oldukları için enzimlerin dikkatli depolanması ve bakımı çok önemlidir. Enzim elektrotlarının tekrar kullanılabilirlik bakımından stabilitesi 1 günde 25 °C' de 40 başarılı ölçüm yapılarak çalışılmıştır.

CP-co-PPy/GOD elektrodunun bağıl aktivitesi 25. kullanıma kadar düzenli bir şekilde düşmüş ve kendi aktivitesinin %70' inde sabit kaldığı gözlenmiştir. Sıcaklık ve pH kararlılıklarında olduğu gibi CP-co-PPy/GOD elektrodu yüksek kullanım kararlılığı göstermiş olup 40. kullanımda bile % 90 aktivite göstermektedir. Bu bulgular Şekil 4.3' de yer almaktadır.



Şekil 4.3 PEO-co-PPy/GOD çalışma kararlılığı (◆); CP-co-PPy/GOD (■) elektrotlar

Enzim elektrotlarının raf ömrü tayini için aktiviteler 1 hafta boyunca her gün kontrol edilmiş olup 40 gün boyunca 5 günde bir, aktivitelerinin kontrolüne devam edilmiştir. PEO-co PPY matrisin PPY/GOD enzim elektrodu 25 gün sonra % 60 aktivitede kalmış olup 40. güne kadar bu aktivitede kalmıştır. CP-co-PPy/GOD enzim elektrodu ise kendi aktivitesinin % 75' inde olup 40. güne kadar bu değerinde sabit kalmıştır (Şekilde 4.4).



Şekil 4.4 PEO-co-PPy/GOD raf ömrü (◆); CP-co-PPy/GOD (■) elektrotlar

4.6. Portakal Suyu İçerisindeki Glikoz Miktarı Tayini

Daha önceki yapılan çalışmalar göstermiştir ki 100 mL portakal suyunda bulunan glikoz miktarı genel olarak 2,22g ile 2,42g arasındadır (Park, 1983). Türkiye’de üretilen iki farklı meyve suyu firmasına (D Markası ve M Markası) ait portakal suyundaki glikoz miktarı PPy/GOD, PEO-co-PPy/GOD ve CP-co-PPy/GOD enzim elektrotlarıyla Lane Eynon metodu kullanılarak bulunmuştur. Lane Eynon metodu ile olan çalışmalar sonucunda 100 mL M markasındaki portakal suyu içerisinde 4,69 g indirgeniş şeker ve 1,97 g şeker bulunmuştur. Aynı şekilde Lane Eynon metodu kullanılarak 100 mL D markasındaki portakal suyu içerisinde indirgenmiş şeker ve glikoz miktarı sırasıyla 3,57g ve 1,5 g olarak bulunmuştur.

Enzim elektrotları kullanılarak tayin edilmiş glikoz miktarı 100 mL M markası için 1,44g ile 1,97 g aralığında olduğu saptanmıştır. Yine aynı şekilde 100 mL D markası için enzim elektrotları kullanılarak tayin edilmiş glikoz miktarı 1,45g ile 1,53g aralığında olduğu bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar Lane Eynon metodu ile bulunan glikoz değerleriyle iyi bir uyum göstermektedir.

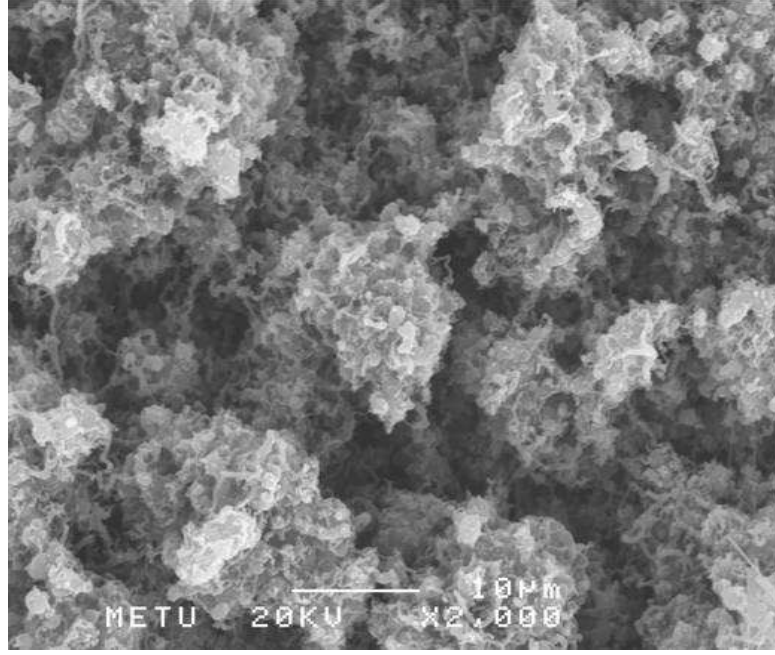
Çizelge 4.2. Enzim elektrotları tarafından D ve M markalarına ait portakal sularında (g/100 mL) tayin edilen glikoz miktarları

	Lane-Eynon Method	PPy/GOD	PEO-co-PPy/GOD	CP-co-PPy/GOD
M Markası	2.15	1.44	1.90	1.97
D Markası	1.50	1.45	1.48	1.53

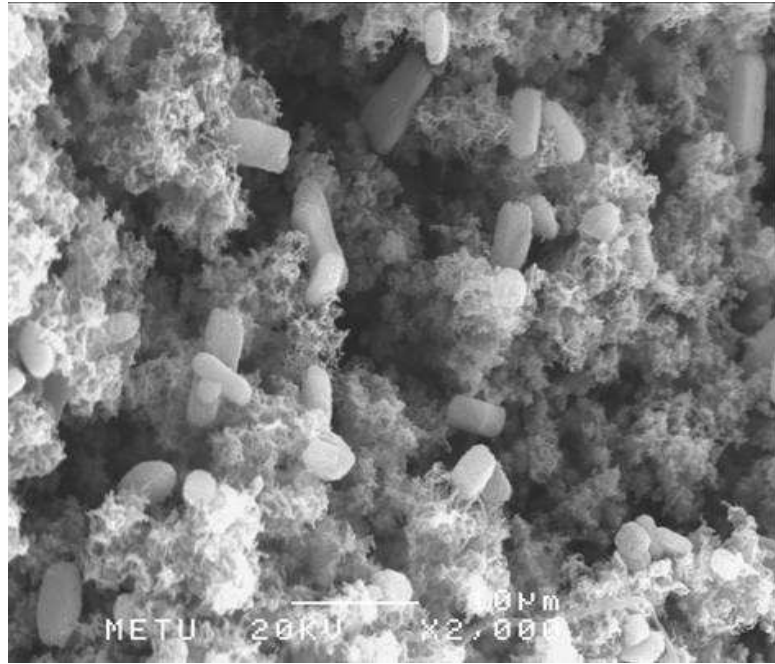
Lane Eynon metoduna göre M markasındaki portakal suyu, D markasındaki portakal suyuna göre daha fazla glikoz içermektedir. Bulunan bu sonuçlar enzim elektrotları tarafından doğrulanmıştır.

4.7. Enzim Elektrotlarının Yüzey Yapılarının İncelenmesi

PEO-co-PPy/GOD enzim elektrodunun taramalı elektron mikroskobu (SEM) tarafından elde edilen mikrografikler Şekil 4.5’de, PEO-co-PPy kopolimerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) tarafından elde edilen görüntüleri ise Şekil 4.6’da görülmektedir. Bu bulgular bize glikoz oksidaz enziminin PEO-co-PPy kopolimerinin içerisinde başarılı bir şekilde tutuklandığını göstermektedir.



Şekil 4.5. PEO-co-PPy' ye ait SEM görüntüsü



Şekil 4.6. PEO-co-PPy/GOD' ye ait SEM görüntüsü

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada glikoz oksidaz enzimi, PEO-co-PPy, CP-co-PPy ve PPy iletken kopolimer matrisleri içerisinde fiziksel yöntemle başarılı bir şekilde tutuklanarak, PPy/GOD, PEO-co-PPy/GOD ve CP-co-PPy/GOD enzim elektrotları elde edildi.

Yapılan çalışmalarda bu PPy/GOD, PEO-co-PPy/GOD ve CP-co-PPy/GOD enzim elektrotlarının sıcaklık, pH, raf ömrü ve kullanım kararlılıklarına göre çok iyi sonuçlar verdiği gözlemlendi.

Glikoz oksidaz enziminin iletken kopolimerler içerisinde tutuklanmasıyla yapılan PPy/GOD, PEO-co-PPy/GOD ve CP-co-PPy/GOD bu enzim elektrotları sayesinde meyve suları içerisindeki glikoz miktarını tayini için alternatif bir biyosensör üretimi yapılmıştır.

Elde edilen bu sonuçlar sayesinde biyosensörlerin yakın gelecekte klasik metotlar ile yer değiştirebilecek olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Akbulut, U., 1999. İletken Polimerlerle Transduser Hazırlanması. Biyosensörler, Telefoncu A., *Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu*, Kuşadası, 10-16.
- Aydın, A., 2002. Pirolün Elektrokimyasal Polimerizasyonuna Organik Asit Etkilerinin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir.
- Batır, G.G., 2009. 3-[(2,5-Dimetil-4-Brom)Fenil] Tiyofenin Elektrokimyasal Polimerizasyonu, Karakterizasyonu ve Glikoz Biyosensörü Olarak Geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta.
- Bernasik, A., Haberko, J., Wlodarczyk-Miskiewicz J., Raczkowska, J., Luzny, W., Budkowski, A., Kowalski, K. ve Rysz, J., 2005. Influence of humid atmosphere on phase separation in polyaniline-polystyren thin films. *Synthetic Metals*, 53, 516-522.
- Can, F., 2010. Glukoz Oksidaz Enziminin İletken Polimerlere İmmobilizasyonu Ve Karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Hatay.
- Coşkun, K., 2009. Kimyasal ve elektrokimyasal yöntemlerle İletken polimerlerin sentezi ve Membran Uygulamaları . *Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta.
- Devlin, T., 1997. Text book of Biochemistry with clinical correlations 136-139.
- Dinçkaya, E., 1999. Biyosensörler. *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları*, 81 s, İzmir.
- Erdem, H.A., 1997. Pirolün Akrilik Asit ile Kopolimerizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul.
- Kalaycı, G., 2008. Polianilin/Aktif Karbon Kompozit Maddesinin Sentezi, Karakterizasyonu Ve İletken Film Yapımı . *Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kahramanmaraş.
- Li, J. ve Lin, X., 2007. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in poly (o-aminophenol) film on polypyrrole Pt nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 2898–2905.
- Macdiarmid, A. G., Somasiri, N. L. D., Wu, Q. ve Mu, S. L., 1985. Electrochemical Characteristics of Polyaniline Cathodes and Anodes in Aqueous-Alectrolytes. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 121 (1-4) 187-190.
- MacDiarmid, A.G., Chiang, J.C., Richter, A.F. ve Epstein, A.J. 1987. Polyaniline: A new concept in conducting polymers. *Synthetic Metals*, 18; 285-290.

- Muhammet, S.M., 2008. Kolesterol Tayini İçin Biyosensör Hazırlanması. *Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Özcan, L., 2008. Polipirol İletken Polimerinin Biyosensör Olarak Kullanımı. *Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir.
- Özyılmaz, G., 2005. Glukoz Oksidaz ve Katalazın Ayrı Ayrı ve Birlikte İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. *Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana.
- Pişkin, E., 1986. Biyosensörler. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları*, İzmir. 205-223.
- Randriamahazaka, H., Noel, V., Guillerez, S. ve Chevrot, C., 2005. Interpenetrating organic conducting polymer composites based on polyaniline and poly(3,4-ethylenedioxythiophene) from sequential electropolymerization. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 585, 157-166.
- Saçak, M., 2004. Polimer Kimyası. *Gazi Kitabevi*, 525 s, Ankara.
- Saçak, M., 2006. Polimer Kimyası. *Gazi Kitabevi*, 525s. Ankara.
- Şahmetlioğlu, E., 2004. İletken Aşı Kopolimerlerin Sentezi ve Bunların Enzim Tutuklama Matrisleri Olarak Kullanımları. *Doktora Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Niğde.
- Telefoncu A., 1986. İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri. *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu*, İzmir, 1-16, 193-249.
- Telefoncu A., 1999. Biyoreseptör immobilizasyonu. *Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu*, Kuşadası, 42-61.
- Topbaş, N., 2006. Anilin ve Poliakrilonitril Kullanarak Kimyasal Polimerizasyon Yöntemi İle İletken Kompozit Lif Hazırlanması. *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Toppare, L., 2003. *Bilim ve Teknik Dergisi Yayınları*, Kasım, 86-87.
- Toshima, N. ve Hara, S., 1995. Direct synthesis of conducting polymers from simple monomers. *Progress in Polymer Science*, 20, 155-183.
- Trung, T., Trung, T.H. ve Ha, C., 2005. Preparation of cyclic voltammetry studies on nickel-nanoclusters containing polyaniline composites having layer-by-layer structures. *Electrochimica Acta*, 51, 984-990.
- Yavuz, A.G., 2005. Polivinil Ferrosen Modifiye Elektrodunu Temel Alan Glukoz Biyosensörünün Geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Niğde.
- Yıldız, H.B., Kiralp, S., Toppare, L. ve Y. Yagci, 2005. *Int. J. Biol. Macromol.* 37, 174-178.

Wang, Z.H., Scherr, E.M., Mac Diarmid, A.G. ve Epstein, A.J., 1992. Transport and EPR studies of polyaniline: A quasi-one-dimensional metallic states. *Physical Review B.*, 45, 4190-4202.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Yavuz AYDIN
Doğum Tarihi ve Yer : 01.09.1984 / ARTVİN
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 5079874534
e-mail : varzelli@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmetbey Ünv.	2012
Lisans	Harran Ünv.	2009
Lise	Ş.Ü. Selçuk Esedoğlu Lisesi (YDA)	2003

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev

Yayımlar