



**ÇOK FONKSİYONLU İLETKEN POLİMERİN ELEKTROKROMİK VE
AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR UYGULAMALARI**

Melek AKTAŞ GEMİCİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
İLERİ TEKNOLOJİLER ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

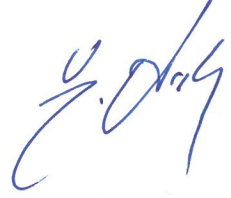
KASIM 2019

Melek AKTAŞ GEMİCİ tarafından hazırlanan “ÇOK FONKSİYONLU İLETKEN POLİMERİN ELEKTROKROMİK VE AMPEROMETRİK BİYSENSÖR UYGULAMALARI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi İleri Teknolojiler Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Yasemin ARSLAN UDUM

İleri Teknolojiler Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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



Başkan: Prof. Dr. Kadir PEKMEZ

Analitik Kimya Ana Bilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

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



Üye: Doç. Dr. Nurgül SEFEROĞLU

İleri Teknolojiler Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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



Tez Savunma Tarihi: 28/11/2019

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

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

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

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

.....

Melek AKTAŞ GEMİCİ

28/11/2019

ÇOK FONKSİYONLU İLETKEN POLİMERİN ELEKTROKROMİK VE AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR UYGULAMALARI

(Yüksek Lisans Tezi)

Melek AKTAŞ GEMİCİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kasım 2019

ÖZET

Konjuge yapılara sahip iletken polimerler geniş uygulama alanlarından dolayı büyük ilgi çekmektedir. Sentezlenen konjuge polimerler OLED’ler, fotovoltaiik hücreler, biyosensörler, metal sensörleri ve elektrokromik cihazlar gibi birçok endüstriyel uygulama alanında kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasının birinci bölümünde donör ve akseptör fonksiyonel grupları aynı molekül içinde bulunduran 5-floro-4,7-bis(4-hekziltiyofen-2 il)benzo[c] [1,2,5] tiyadiazol (DTFBT) monomeri elektrokimyasal olarak polimerleştirilmiştir. Sentezlenen elektrokromik polimerin elektrokimyasal ve spektroeletrokimyasal çalışmaları yapılmıştır. İletken polimerin düşük bant aralığı ve düşük tepki zamanına sahip olduğu ve multikromik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Tez çalışmasının ikinci bölümünde toksik fenolik bileşiklerin tespiti için iletken polimer tabanlı ucuz, taşınabilir ve kullanımı kolay yeni bir amperometrik biyosensör geliştirilmiştir. İletken polimer, poli(5-floro-4,7-bis(4-hekziltiyofen-2 il)benzo[c][1,2,5] tiyadiazol (poli(DTFBT)), grafit elektrot üzerine dönüşümlü voltametri tekniği ile biriktirilmiştir. Lakkaz enzimi immobilize edilmiş modifiye grafit elektrotların optimum pH, film kalınlığı ve enzim miktarı optimizasyonları yapılmış ve iletken polimer temelli biyosensörün kinetik parametreleri incelenmiştir. Amperometrik biyosensörün iyi bir tespit sınırı (LOD) ve duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir.

Bilim Kodu : 20115

Anahtar Kelimeler : İletken polimer, elektrokimyasal polimerizasyon, elektrokromik polimer, biyosensör, lakkaz, katekol

Sayfa Adedi : 73

Danışman : Prof. Dr. Yasemin ARSLAN UDUM

ELECTROCHROMIC AND AMPEROMETRIC BIOSENSOR APPLICATIONS OF MULTIFUNCTIONAL CONDUCTIVE POLYMER

(M. Sc. Thesis)

Melek AKTAŞ GEMİCİ

GAZI UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

November 2019

ABSTRACT

Conductive polymers with conjugated structures are of great interest due to their wide range of applications. The synthesized conjugated polymers are used in many industrial applications such as OLEDs, photovoltaic cells, biosensors, metal sensors and electrochromic devices. In the first part of this thesis, monomer, 5-fluoro-4,7-bis (4-hexylthiophen-2 yl) benzo [c] [1,2,5] thiadiazole (DTFBT), containing donor and acceptor functional groups in the same structure was electrochemically polymerized. Electrochemical and spectroelectrochemical properties of the synthesized electrochromic polymer have been investigated. It was determined that the conductive polymer has low band gap and low response time and showed multichromic properties. In the second part of the thesis, a new, amperometric biosensor is developed which is cheap, portable and easy to use based on conductive polymer for the detection of toxic phenolic compounds. The conductive polymer, poly (5-fluoro-4,7-bis (4-hexylthiophen-2 yl) benzo [c] [1,2,5] thiadiazole (poly (DTFBT)), was deposited onto the graphite electrode by cyclic voltammetry technique. The laccase was immobilized on a modified graphite electrode. Optimum pH, film thickness and enzyme amount of the electrodes were optimized and kinetic parameters of conjugated polymer based biosensor were investigated. The amperometric biosensor showed good sensitivity and low limit of detection (LOD)

ScienceCode : 20115

KeyWords : Conductive polymer, electrochemical polymerization, electrochromic polymer, biosensor, laccase, pyrocatechol.

PageNumber : 73

Supervisor : Prof. Dr. Yasemin ARSLAN UDUM

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bana rehberlik eden, destek, tavsiye veren, her zaman dinleyen ve yardım eden, bilimsel katkıları ile beni aydınlatan bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli danışmanım Prof. Dr. Yasemin ARSLAN UDUM'a teşekkür eder, saygı ve şükranlarımı sunarım. Araştırma Laboratuvarlarının kapılarını bana açarak çalışmama izin verdiği için, çok değerli fikirlerini esirgemeyip her durumda en iyi şekilde rehberlik ve yönlendirme yaptığı için Prof. Dr. Levent TOPPARE'ye en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım. Ayrıca, tüm laboratuvar çalışmalarımda bana yardım eden Ordu Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim elemanı Dr. Saniye SÖYLEMEZ ve Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Toppare Araştırma Grubu üyelerinden başta Ece BUBER olmak üzere ekibin tüm üyelerine teşekkürlerimi sunarım. Bana inanarak hayatımın hiçbir döneminde desteklerini esirgemeyen, ellerini hürmetle öptüğüm annem Emine AKTAŞ ve babam Mehmet AKTAŞ ile ablam Meral AKTAŞ'a ve eşim Ramazan GEMİCİ'ye ne kadar teşekkür etsem azdır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1.GİRİŞ.....	1
2.KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. İletken Polimerler.....	3
2.2. İletken Polimerlerde İletkenlik.....	6
2.2.1. İletken polimerlerde iyonik iletkenlik.....	6
2.2.2. İletken polimerlerde elektronik iletkenlik.....	6
2.2.3. Band teorisi	7
2.2.4. Donör-akseptör teorisi	9
2.2.5. İletken polimerlerde doping işlemi	10
2.3. İletken Polimerlerin Sentez Yöntemleri.....	11
2.3.1. Kimyasal polimerizasyon.....	12
2.3.2. Elektrokimyasal polimerizasyon.....	12
2.4. İletken Polimerlerin Kullanım Alanları	14
2.4.1. Elektrokromizm uygulamaları	16
2.5. Biyosensör Uygulamaları.....	17
2.5.1. Biyosensörler ve çalışma prensibi	17

	Sayfa
2.5.2. Biyoreseptörler (Biyoajanlar)	19
2.5.3. Sinyal çevrici (Transduser)	20
2.5.4. Biyosensör dizaynında dikkat edilmesi gerekenler	20
2.5.5. İdeal bir biyosensörlerde bulunması gereken özellikler	20
2.6. Biyosensör çeşitleri.....	22
2.6.2. Elektrokimyasal esaslı biyosensörler.....	23
2.6.3. Amperometrik esaslı biyosensörler.....	23
2.6.4. Potansiyometri esaslı biyosensörler	24
2.6.5. Yarı iletken esaslı biyosensörler	24
2.6.6. Optik biyosensörler	24
2.6.7. Kalorimetri esaslı biyosensörler.....	25
2.6.8. Piezoelektrik biyosensörler	25
2.6.9. Enzim sensörleri.....	25
2.7. Biyobileşen İmmobilizasyonu	26
2.7.1. Kovalent bağlama	28
2.7.2. Çapraz bağlama	29
2.7.3. Tutuklama	30
2.7.4. Fiziksel Adsorpsiyon	30
2.8. Enzimler.....	30
2.8.1. Lakkaz enzimi.....	34
2.8.3. Lakkaz enziminin uygulama alanları	36
3. MATERYAL VE YÖNTEM	39
3.1. Bölüm A- Deneysel	39
3.1.1. Kullanılan malzemeler	39

	Sayfa
3.1.2. Kullanılan cihazlar	39
3.1.3. Kullanılan yöntemler	40
3.1.4. Elektrokimyasal polimerizasyon.....	46
3.2. Bölüm B – Deneysel	46
3.2.1. Kullanılan malzemeler	46
3.2.2. Kullanılan cihazlar	47
3.2.3. Biyosensörün hazırlanması	47
3.2.4. Amperometrik ölçümler.....	48
3.2.5. Lakkaz biyosensörün optimizasyonu	49
3.2.6. Elektroaktif yüzey alanının karakterizasyonu	49
3.2.7. Biyosensörün analitik ve kinetik karakterizasyonu	50
3.2.8. Girişimlerin araştırılması	50
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	51
4.1. Polimerin Karakterizasyonu.....	51
4.1.1. Monomerin dönüşümlü voltamogramı.	51
4.1.2. Polimer filminin akım yoğunluğuna tarama hızının etkisi.	52
4.1.3. Polimer filminin spektroeletrokimyasal analizi.	54
4.1.4. Polimer filminin kinetik analizi	55
4.1.5. Polimer filminin kolorimetrik analizi	56
4.2. Biyosensör Parametrelerinin Optimizasyonu	57
4.2.1. İletken polimer kalınlığının optimizasyonu	57
4.2.2. Enzim miktarının optimizasyonu	58
4.2.3. pH optimizasyonu	58
4.3. Biyosensör Tasarımının Yüzey Karakterizasyonu	59

	Sayfa
4.3.1. Farklı elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonu.....	59
4.3.2. Taramalı elektron mikroskobu.....	60
4.4. Girişimlerin araştırılması	61
4.5. Biyosensörün analitik ve kinetik karakterizasyonu	62
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	73

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları	28
Çizelge 4.1. Polimer filminin kolorimetrik analiz sonuçları.....	56
Çizelge 4.2. Polimer filminin spektroeletrokimya ve kinetik sonuçları	56
Çizelge 4.3. Farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen biyosensör cevapları	63
Çizelge 4.4. Literatür karşılaştırması	64

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Konjuge yapıya sahip poliasetilen	4
Şekil 2.2. Bilinen bazı iletken polimerlerin kimyasal yapıları.....	5
Şekil 2.3. Bazı iletken polimerlerin iletkenliklerinin metal, yarı iletken ve iletken malzemelerle karşılaştırılması	7
Şekil 2.4. Yalıtkan, yarı iletken ve iletken maddelerin band seviyeleri ve elektron dağılımları	8
Şekil 2.5. Poliasetilenin katkılanması sonucu oluşan yapılar	9
Şekil 2.6. Donör-Akseptör teorisine göre düşük band aralıklı polimerlerin eldesi	10
Şekil 2.7. Üçlü elektrot sistemi	12
Şekil 2.8. Tiyofenin elektrokimyasal olarak polimerleşmesine ait reaksiyon mekanizması	13
Şekil 2.9. İletken polimerlerin kullanım alanları	14
Şekil 2.10. Elektrokromik cihazların kullanım alanları.	15
Şekil 2.11. Tipik bir biyosensörün çalışması	18
Şekil 2.12. Biyosensör bileşenleri (şematik gösterimi) grafiği.....	19
Şekil 2.13. İdeal bir biyosensörde olması gereken parametreler	22
Şekil 2.14. Biyosensör çeşitleri.....	22
Şekil 2.15. Biyosensörlerde elektron transferinin şematik gösterimi	24
Şekil 2.16. İmmobilizasyon teknikleri	27
Şekil 2.17. Enzimin substrat ile etkileşimi.....	31
Şekil 2.18. Serbest enerji-reaksiyon akış yönü	32
Şekil 2.19. Reaksiyon hızı-substrat derişim grafiği	32
Şekil 2.20. Lineweaver- Burke grafiği.....	33
Şekil 2.21. Lakkaz enziminin yapısı	34

Şekil	Sayfa
Şekil 2.22. Lakkaz enziminin katekol ile ilişkisi	35
Şekil 2.23. Lakkazın kataliz şeması.....	35
Şekil 2.24. Aktif lakkaz merkezinin şematik diyagramı	36
Şekil 3.1. DTFBT monomeri	39
Şekil 3.2. Üç elektrotlu elektrokimyasal hücre.....	41
Şekil 3.3. Dönüşümlü voltametri yönteminde uygulanan potansiyelin zamanla değişimi	41
Şekil 3.4. Elektropolimerizasyon sırasında alınan dönüşümlü voltamogram.....	42
Şekil 3.5. Tekli potansiyel döngüsü sırasında tersinir redoks işlemi için dönüşümlü voltamogram.....	42
Şekil 3.6. Spektroelektrokimyasal deney düzeneği	44
Şekil 3.7. Optik kontrast ve tepki zamanın belirlenmesi için kullanılan deney düzeneği.....	45
Şekil 3.8. CIE Lab renk uzayı.....	45
Şekil 3.9. DTFBT monomerinin elektrokimyasal polimerizasyonu.....	46
Şekil 3.10. Lakkaz biyosensörün hazırlanması.....	48
Şekil 4.1. Monomerin 0,1 M LiClO ₄ /NaClO ₄ içeren DCM/ACN (5:95) çözeltisinden elde edilen dönüşümlü voltamogramı	52
Şekil 4.2. Elektrokimyasal olarak sentezlenen polimer filminin 50, 100, 150, 200, 250, 300 mV/s tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramları	53
Şekil 4.3. Polimer filminin tarama hızı-akım doğrusu.....	53
Şekil 4.4. Polimer filminin 0,1 M LiClO ₄ /NaClO ₄ destek elektrolit içeren ACN çözeltisinde 0,0 V ve 1,3 V arasındaki potansiyeller uygulanarak elde edilen UV-Vis-NIR spektrumu	54
Şekil 4.5. Polimer filminin 0,1 M LiClO ₄ /NaClO ₄ destek elektrolit içeren ACN çözeltisinde, 550 ve 1040 nm’de elde edilen % Geçirgenlik –Zaman grafiği.	55
Şekil 4.6. Döngü sayısının biyosensör cevabı üzerine etkisi (asetat tamponunda 50 mM pH 5,5; 25 °C, -0,3V, katekol:0,05 M)	57

Şekil	Sayfa
Şekil 4.7. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi (asetat tamponunda 50 mM, pH 5,5; 25°C, -0,3 V, katekol: 0,05 M).	58
Şekil 4.8. pH'ın biyosensör cevabı üzerindeki etkisi (sodyum asetat tamponunda, 50 mM, pH 5,0 ve 5,5; sodyum fosfat tamponunda, 50 mM, pH 6,0 ve 6,5; 25°C, -0,3 V, katekol: 0,05 M). Hata çubukları üç ölçümün standart sapmasını gösterir.....	59
Şekil 4.9. 0,1 M KCl içeren 5,0 mM Fe (CN) ₆ ^{3-/4-} içinde a (çıplak grafit elektrot), b (polimer / lakkaz enzim modifiyeli grafit elektrot) , c (polimer modifiyeli grafit elektrot) elektrotlarının dönüşümlü voltagramları.....	60
Şekil 4.10. SEM görüntüleri yoluyla iletken polimer filmin (sol) ve iletken polimer filmin biyomolekül immobilizasyonundan sonra (sağ) yüzey özellikleri ...	61
Şekil 4.11. Biyosensörün katekol ve olası girişim türlerine tepkisi (pH 5,5; 50 mM sodyum asetat tamponu, 25 °C, -0,3 V)	62
Şekil 4.12. Katekol için kalibrasyon eğrisi (pH 5,5; 50 mM sodyum asetat tamponu 25 °C, -0,3 V).....	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
m^3	metreküp
db	Desibel
hz	Hertz
m^2	Metrekare
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
$^{\circ}C$	Derece Celcius
M	Molar derişim
g	Gram
%	Yüzde
Km	Michaelis-Menten sabiti
Imaks	Maksimum hız
mg	Miligram
s	Saniye
mV	Milivolt
μA	Mikroamper
Ag	Gümüş
Pt	Platin
λ	Dalga boyu
V	Potansiyel
Π	Moleküller arası pi bağı
T	Kontrast
Eg	Bant aralığı

Kısaltmalar**ACN****CB****¹³C-NMR****CV****DCM****DMF****ECD****Eg****¹H-NMR****GA****HOMO****ITO****L, a, b****Lac****LUMO****OLED****PA****PPy****UV-Vis****VB****Açıklamalar**

Asetonitril

İletim bandı

Karbon-13 Nükleer Manyetik Rezonans Spektrumu

Dönüşümlü Voltamogram

Diklorometan

N,N'-Dimetilformamid

Elektrokromik cihaz

Bant aralığı

Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektrumu

Gluteraldehit

En yüksek dolu moleküler orbital

İndiyum kalay oksit

Parlaklık, renk tonu, doygunluk

Lakkaz

En düşük boş moleküler orbital

Organik ışık saçan diyot

Poliasetilen

Polipirol

Ultraviyole-Görünür Bölge

Valans bandı

1. GİRİŞ

Monomer olarak adlandırılan çok sayıda basit moleküllerin kimyasal bağlarla bağlanarak oluşturduğu uzun zincirli makromoleküllere polimer denir. Polimerler ilk keşiflerinden itibaren elektriksel yalıtkanlığı iyi malzemeler olarak bilinmekteydi. Alan Mac Diarmid, Alan Heeger ve Hideki Shirakawa tarafından poliasetilenin yüksek elektriksel iletkenlik gösterdiği keşfedildiğinde bu görüş ortadan kalkmıştır. Bu keşif ile iletken polimerlerle ilgili çalışmalar yoğunlaşmış ve polianilin, polipirol, politiyofen gibi birçok iletken polimer sentezlenmiştir.

İletken polimerler elektriksel, elektronik ve optik özellikleri açısından metalik özellik; sahip oldukları esneklik, dayanıklılık, işlenebilirlik ve mekanik özellikleri açısından ise polimerik özellik gösterdiğinden son yıllarda tüm dikkatleri üzerine çekmiş ve çok geniş uygulama alanı bulmuştur. Metallerin ve polimerlerin özelliklerinin tek malzemede toplandığı iletken polimerler “sentetik metaller” olarak da adlandırılır.

Konjuge π sistemlere sahip iletken polimerler, heterohalkalı organik monomerlerin elektrokimyasal yükseltgenmesi ile elde edilmektedir. Kimyasal ve elektrokimyasal olarak yükseltgenebilen ve indirgenebilen iletken polimerlerin elektriksel ve optik özellikleri değişebilmektedir. Son yıllarda yeni özelliklere ve işlenebilirliğe sahip çok çeşitli konjuge polimerler sentezlenmiştir. Sentezlenen konjuge polimerler sahip oldukları özelliklerden dolayı OLED, fotovoltaiik hücreler, biyosensörler, metal sensörleri ve elektrokromik cihazlar gibi birçok endüstriyel uygulama alanında kullanılmaktadır.

İletken polimerlerin önemli uygulama alanlarından biri olan elektrokromik cihazlarda tercih edilmesinin en önemli sebebi, inorganik malzemelerle karşılaştırıldığında daha üstün özelliklere sahip olmalarıdır. Elektrokromik cihazlar, uygulanan gerilime bağlı olarak tersinir bir renk değişimi gözlenen cihazlardır. Bu tersinir değişim “elektrokromizm” olarak adlandırılır. İletken polimerlerin elektrokromizm özelliklerinin keşfinden sonra elektrokromik cihazlar, dikiz aynaları, optik filtreler gibi birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır.

Elektrokromik özelliklere sahip iletken polimerlerin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmesi için yüksek kararlılık, hızlı yanıt verme süresi, optik kontrast, yüzde geçirgenlik, renk çeşitliliği sağlaması, çözünür olmaları, ucuza imal edilmeleri ve kimyasal

yapının kolayca modifiye edilebilmesi gibi özelliklere sahip olması gerekir. İstenilen fiziksel, mekanik ve elektrokromik özelliklere sahip iletken polimerlerin elde edilebilmesi büyük önem taşımaktadır.

İletken polimerlerin önemli uygulama alanlarından biri de biyosensörlerdir. Biyosensörler IUPAC tarafından, “ kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar” olarak tanımlanmıştır. Bir biyosensör iç içe geçmiş biri biyokimyasal (reseptör) diğeri ise elektrokimyasal özellikteki çevirici (dönüştürücü) olmak üzere iki ana bölümden oluşur: Biyomoleküllerin (biyoajan) katı bir yüzey üzerinde immobilize edildiği bir tanınma parçası(biyoreseptör) ve biyoreseptörde meydana gelen değişikliği ölçülebilen bir sinyale dönüştüren transduser (çevirici). Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek onu tanımadır. Analit ile biyoreseptör arasında gerçekleşen kimyasal reaksiyon sonucundaki değişimleri ölçülebilen bir sinyale dönüştüren cihazlara sinyal çevirici (transduser) denir. Biyomolekül olarak enzimlerin kullanılması ile hazırlanan sensörlere enzim biyosensörleri denir.

Çevre kirliliğın nedenlerinden biri olan fenolik bileşikler meyve suları, bira ve şaraplarda kararmaya ve bulanıklığa yol açar. Bu bileşiklerin tayininde kullanılan spektrofotometri ve kromatografi gibi geleneksel algılama yöntemleri zaman alıcı ve pahalı olduğundan fenolik bileşiklerin tespitinde alternatif yollar araştırılmaktadır. Bu alternatif yolların en önemlisini de enzim biyosensörlerdir.

Bu tez çalışmasının birinci bölümünde, donör (elektron verici) ve akseptör (elektron alıcı) fonksiyonel grupları aynı molekül içinde bulunduran 5-floro-4,7-bis(4-hekziltiyofen-2 il)benzo[c] [1,2,5] tiyadiazol (DTFBT) monomerinin dönüşümlü voltametri yöntemi ile elektrokimyasal polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen polimerin spektroeletrokimyasal çalışmaları yapılmış ve elektrokromik cihaz uygulamalarında kullanılabilirliği incelenmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde elektrokimyasal olarak sentezlenen polimerin biyosensör uygulaması gerçekleştirilmiştir. Fenolik bileşiklerin tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirilmiş ve optimizasyonları yapılmıştır. Polimerin optimize edilen şartlarda lakkaz sensöründe çevirici eleman olarak uygulanabilirliği araştırılmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER

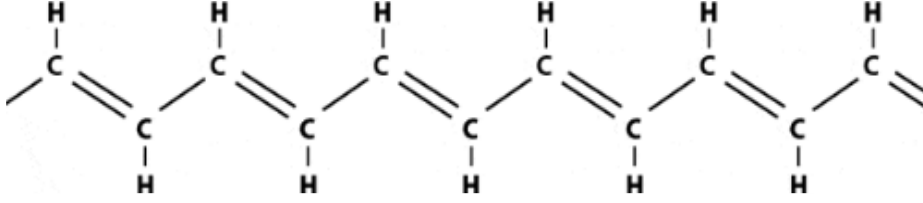
2.1. İletken Polimerler

Polimerler en küçük yapı birimi monomer olarak adlandırılan büyük mol kütleli uzun zincirli yapılardır. Yapı bakımından birbirinin aynı olan çok sayıda monomer kendi aralarında kovalent bağlarla bağlanarak yüksek molekül ağırlıklı polimerleri oluşturur.

Küçük mol kütleli monomer birimlerinden başlayarak polimer moleküllerin oluşmasına yol açan tepkimelere polimerizasyon tepkimesi, bu olaya da polimerleşme denir. Polimerler doğal ve yapay polimerler olarak sınıflandırılabilir. Doğal polimerlere selüloz, nişasta, doğal kauçuk; yapay polimerlere 66- Nylon örnek verilebilir.

1950'lerin başına kadar organik polimerler iyi bir yalıtkan olarak kabul edilmekteydi. Polimerlerin kolay işlenebilen, hafif, ucuz, esnek ve kimyasal açıdan nötr olduğu ancak iletken olmadıkları biliniyordu. Bu nedenle elektronik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmıştır. Polimerlerin aksine metallerin yüksek iletkenlik ve genleşme özelliği göstermeleri üstünlükleri arasında sayılabilirken ağır ve pahalı olmaları, zor işlenebilmeleri ve korozyona uğramaları dezavantajlarındandır. Plastiklerin yalıtkan olarak kabul edilmesi görüşü yarı iletkenlere yakın iletkenlik özelliği gösteren polimerlerin keşfi ile yıkılmaya başlamıştır.

1958 yılında Natta ve arkadaşları tarafından siyah toz halinde sentezlenen Poliasetilen (PA) yarı iletken özellik göstermekteydi [1]. Polimerlerin ve metallerin avantajlarını bir araya getiren iletken polimerler 1970'lerin sonlarına doğru çalışılmaya başlanmıştır. 1980'ler de poliheterosiklik yapılar sentezlenmeye başlanmıştır. İletkenliklerinin az olmasına rağmen kararlı oldukları ve diğer polimer zincirlerine göre renk çeşitliliği ve aktifliklerinin daha iyi olduğu tespit edilmiştir [2]. 1977 yılında Alan Mac Diarmid, Shirakawa ve Doktor Alan Heeger poliasetileni (Şekil 2.1) sentezlemiştir.

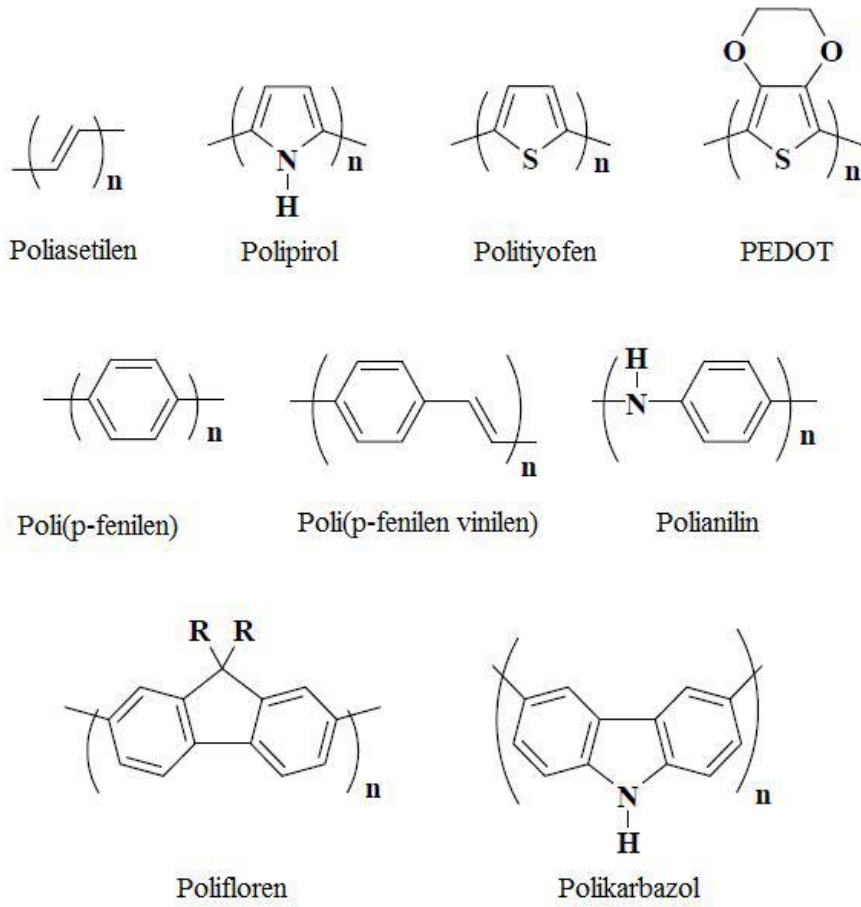


Şekil 2.1. Konjuge yapıya sahip poliasetilen

Shirakawa, MacDiarmid ve Heeger ile işbirliği yapmış ve poliasetileni iyot buharına maruz bırakılmıştır. Amaçları, polimere katkı maddesi ekleyerek yarıiletkenleri iletken materyaller gibi kullanabilmektir. Poliasetilenin yükseltgen ile katkılanması (dop edilmesi) sonucunda iletkenliğinin on milyon kat arttığı tespit edilmiştir [3]. Katkılanmış poliasetilenin iletkenliği 10^5 S/cm'e kadar çıkmıştır. İyi bir iletken olan gümüş ve bakırın iletkenliği ise yaklaşık 10^6 S/cm dir. Tokyo Üniversitesi öğrencisi Shirakawa'nın çalışmaları 2000 yılında beraber çalışan üç bilim adamına Nobel ödülü kazandırmıştır. Bu keşifle uygun maliyetli, hafif ve esnek özellikleri olan iletken polimerler tüm dünya tarafından ilgiyle karşılanmıştır. Bu süreçten sonra bilim dünyasında "Plastik Elektronik Devri" başlamıştır.

Sentetik metaller olarak da bilinen iletken polimerleri diğer polimerlerden ayıran en önemli özellik tek ve çift bağlardan oluşan konjuge zincir yapısına sahip olmalarıdır (Şekil 2.2). Sırasıyla değişen tek ve çift bağ yapısına konjugasyon denir. Bu bağlar "sigma" (σ) ve "pi" (π) bağlarıdır.

Konjuge yapıya sahip iletken polimerlere "konjuge polimerler" de denmektedir. Konjugasyon, polimeri iletken yapmak için yeterli değildir. Konjuge polimerler normal hallerinde yalıtkanlık düzeyine yakın iletkenlik gösterirler ancak yükseltgen ya da indirgen maddeler ile muamele edilerek tuzları hazırlandığında, metallerle kıyaslanacak düzeyde iletken polimerler elde edilebilir (Şekil 2.3).



Şekil 2.2. Bilinen bazı iletken polimerlerin kimyasal yapıları: poliasetilen(Shirakawa ve ark., 1977), polipirol (Diaz ve ark., 1980) ,politiyofen(Tourillon ve Garnier, 1981), poli(3,4-etilendioksitiyofen) (PEDOT), poli(p-fenilen)) (Ivory ve ark., 1979), poli(p-fenilen vinilen(Wnek ve ark., 1979)), polianilin(Diaz ve Logan, 1980), polifluoren, polikarbazol) [4].

İletken polimerlerin kararlılıkları ve işlenebilmeleri konusundaki ilerlemeler, akademik çevrelerin ve ticari firmaların bu konuya olan ilgilerini arttırmıştır. Bugün iletken polimerlerin değişik özelliklerinden yararlanılarak birçok ticari üründe kullanıldığı bilinmektedir.

İletken polimerler elektrokromik camlar, data depolama cihazların, ince-film transistörler, ışık yayan diyotlar, yapay kaslar, süperkapasitörler, OLED'ler, biyosensör uygulamalar, fotovoltaiikler ve elektrokromik cihazlar gibi birçok uygulamada kullanılmaktadır. Son yıllarda, iletken polimerlerin elektrokromik cihazlardaki uygulamaları bilim dünyasının ve ticari firmaların oldukça ilgisini çekmektedir. Bunun nedeni iletken polimerlerin inorganik elektrokromik malzemelere göre işlenebilirliğinin daha iyi olması ve daha geniş renk çeşitliliğine sahip olmasıdır [5,6].

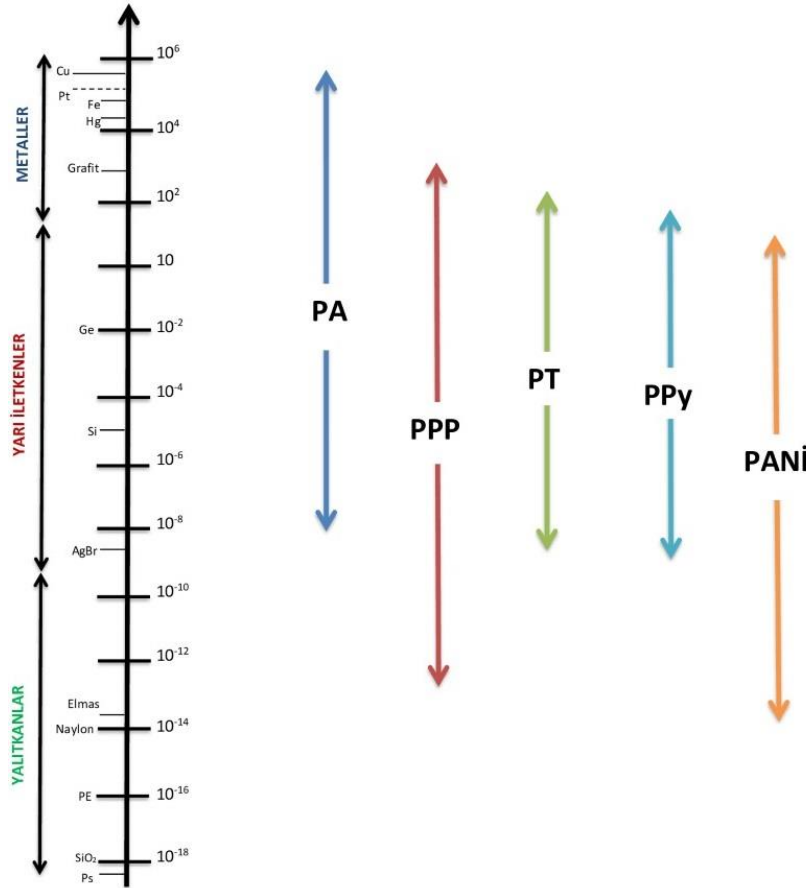
2.2. İletken Polimerlerde İletkenlik

2.2.1. Polimerlerde iyonik iletkenlik

Camsı geçiş sıcaklığı ve kristalinitesi düşük amorf polimerler tuzlar için katı özücüdürler. Kullanılan tuzun yeteri kadar iyonlarına ayrılması gerekir. Aksi takdirde polimer içerisinde özünmez. Tuzun anyon ve katyonu yük taşıyıcısı olarak görev yaparlar. İyonların her ikisi veya biri elektron verici koordinasyon yerleri olan polimerlere zayıfça bağlanır. Bu iyonlar polimerin ısı etkisi ile eğilip bükölme hareketi sonucu zincirler arasında taşınır. Polimere ısı değil de elektriksel potansiyel uygulanırsa iyon hareketi tek yönde olur [7].

2.2.2. Polimerlerde elektronik iletkenlik

Elektriksel iletkenliğine göre maddeler: iletken, yarı iletken ve yalıtkan olarak sınıflandırılır. Poliasetilen, polianilin, polipirol gibi polimerler elektriği elektronik yolla iletirler. Yarı iletkenlerin, metallerin ve delokalize elektron içeren polimerlerin elektriksel davranışları “band teorisi”ne dayanarak açıklanır.



Şekil 2.3. Bazı iletken polimerlerin iletkenliklerinin metal, yarı iletken ve yalıtkan malzemelerle karşılaştırılması [8].

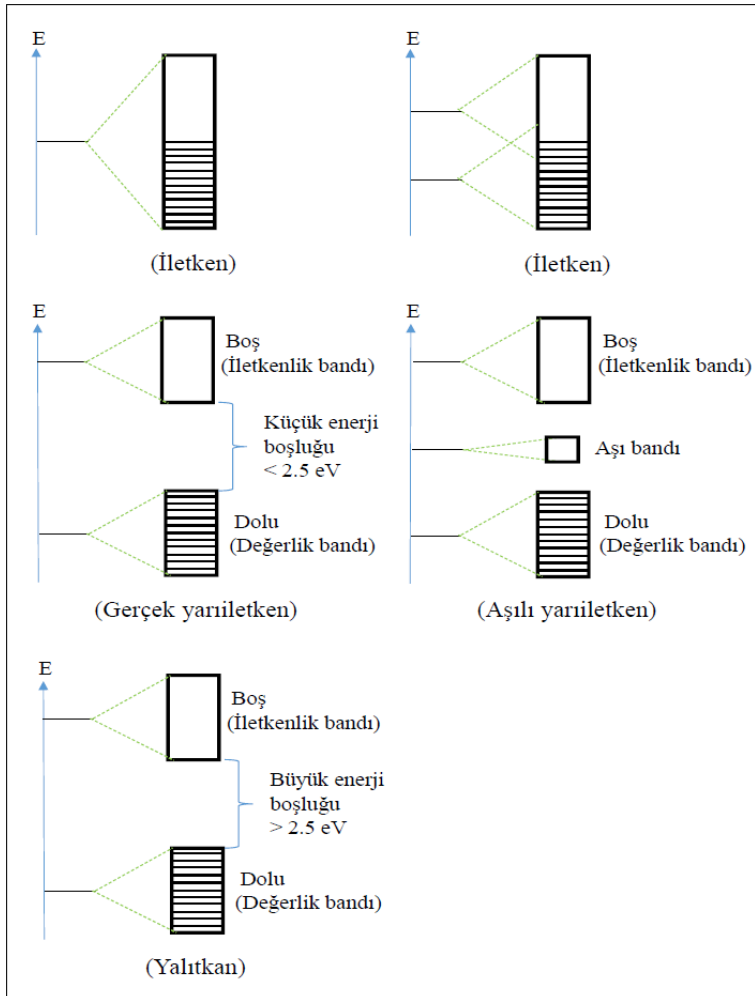
2.2.3. Band teorisi

Bant teorisi, maddelerin elektronik yapısını ve iletkenlik mekanizmasını açıklamaktadır. Elektriksel iletkenlikten eşleşmemiş elektronlar sorumludur. Sisteme uygulanan potansiyele bağlı olarak hareket eden bu elektronlar iletkenlik bandında bulunurlar.

İletkenlerde değerlik bandı ile iletkenlik bandı çakışmaktadır ya da değerlik bandı kısmen doludur. Yani en yüksek dolu moleküler orbital (HOMO) (Valans Bandı-VB) ve en düşük boş moleküller orbitalleri (LUMO) (İletim Bandı-CB) arasında önemli bir enerji aralığı yoktur. Bu yüzden elektron geçişi kolaylıkla gerçekleşir. Valans bandı ve iletkenlik bandı arası “Enerji Bant Aralığı”(Eg) (Boşluk Bandı) olarak adlandırılır. Enerji band aralığının geçilmesi için gerekli enerjiye “Band Eşik Enerjisi” denir. Maddelerin elektriksel iletkenliğine göre sınıflandırılmasında band eşik enerjisinin büyüklüğü önemlidir. Yalıtkanlarda değerlik bandı ve iletkenlik bandı arasında önemli bir enerji aralığı vardır. Enerji bant aralığı büyük olduğundan elektronlar serbest olarak hareket edebilecekleri bu

boş banda geçemez. Ayrıca yalıtkanlarda değerlik bandı doludur. Bu da elektron geçişini mümkün kılmaz (Şekil 2.4).

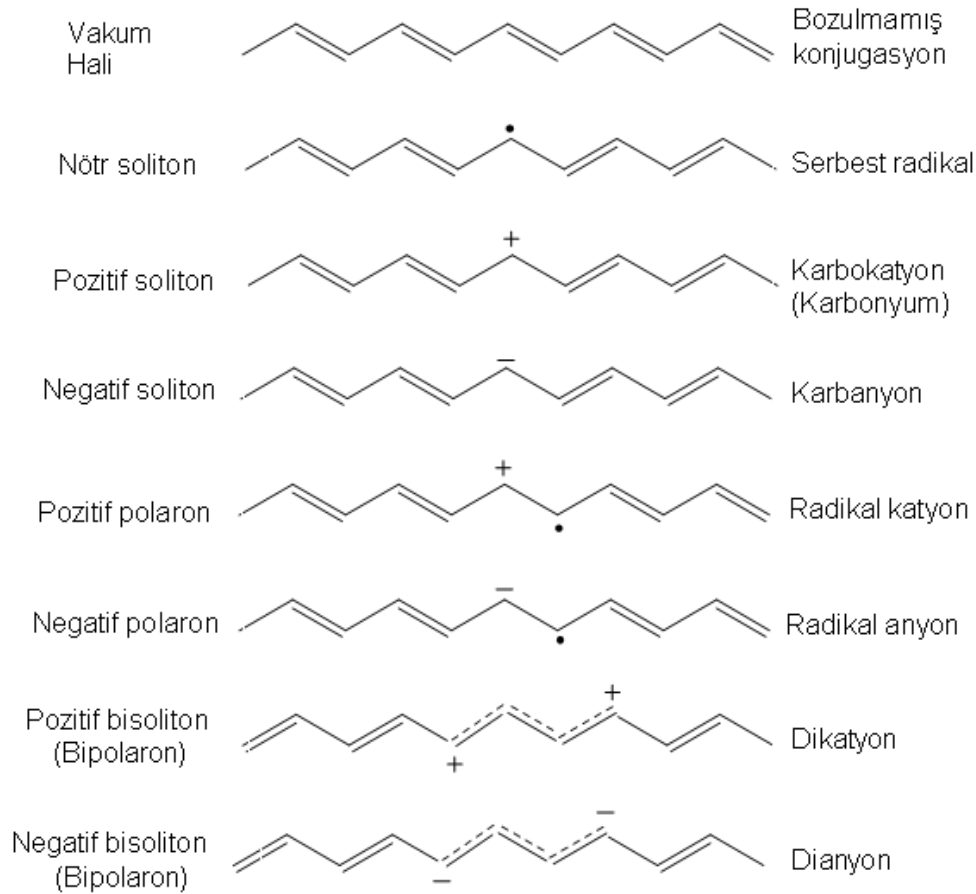
Yarı iletkenlerde iletkenlik bandı ve değerlik bandı arasındaki enerji seviyesi farkı, ısı veya ışık etkisi ile verilecek enerji ile aşılabilecek kadar küçüktür. Bu yüzden serbest elektronlar iletkenlik bandının en düşük enerji düzeyine geçebilirler. İletkenlik bandına geçen serbest elektronlar yük taşırlar. Değerlik bandı içerisinde oluşan pozitif yük boşluğu zincirin üzerinde elektrona ters yönde hareket eder.



Şekil 2.4. Yalıtkan, yarı iletken ve iletken maddelerin band seviyeleri ve elektron dağılımları

Konjuge polimerlerin iletkenliği elektron verilmesi veya uzaklaştırılması ile artırılabilir. Bu işleme “doplama (dop etme)” denir. Bu iş için kullanılan atom ya da moleküle ise dopant adı verilir.

Konjuge polimerin yükseltgenmesi ile oluşan eşleşmemiş elektronlar iletkenlik bandının en düşük seviyesine (LUMO) geçerek akım taşıyıcısı görevini yaparlar. Yükseltgenme işleminde değerlik bandının (HOMO) en dış seviyesindeki elektronlar uzaklaşarak pozitif yükler oluşturur. Geride kalan elektronlar taşıyıcı görevi yaparlar. Örneğin PA'nın yükseltgenmesinde HOMO'dan bir elektron uzaklaşarak pozitif polaron oluşur. Yükseltgenme işlemine devam edilirse bipolaron oluşur (Şekil 2.5). İletkenliğe katkıda bulunan bu yapılardır. Konjuge polimerlerin elektriksel iletkenliği, polaron ve bipolaron yapılarda polimer zinciri boyunca gerçekleşen elektron hareketliliğinden kaynaklanmaktadır.

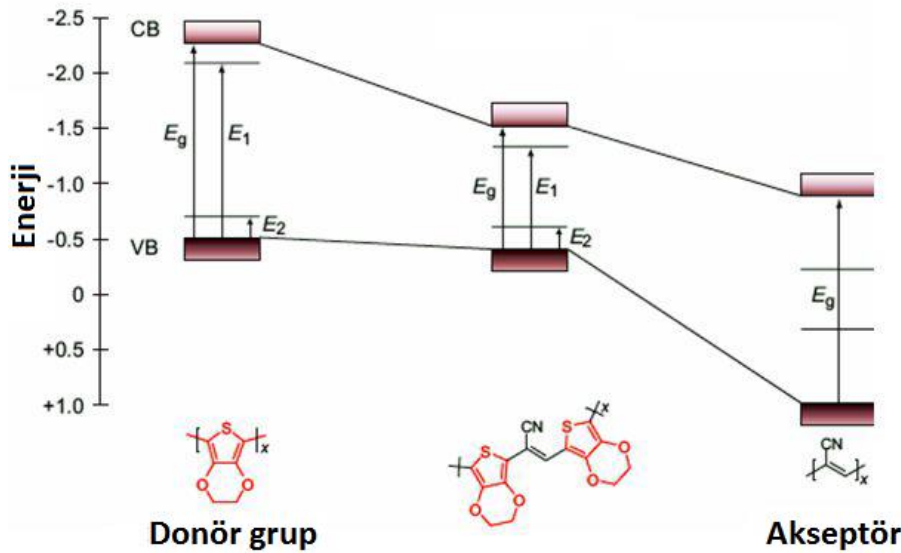


Şekil 2.5. Poliasetilenin katkılanması sonucu oluşan yapılar

2.2.4. Donör –akseptör teorisi

İletken polimerlerin çoğu, görünür ışık ve yakın kızılötesi bölge aralığında olan 1,0 ve 4,0 eV arasında bant boşluklarına sahiptir. Fotovoltaik malzemeler düşük bant boşluğuna sahip olmalıdır (E_g) (<1,8eV) [9]. Son yirmi yılda, düşük bant aralıklarına sahip olan yeni

organik iletken polimerlerin sentezi artmıştır. Bant aralığını etkileyen faktörlerden biri de donör-akseptör etkileşimidir. Bu parametrenin etkisi göz önünde bulundurularak istenilen band aralığına sahip çeşitli polimerler sentezlemiştir. Donör-akseptör teorisine göre donör ve akseptör grubun aynı molekül yapısında bulunması polimerin bant aralığının azalmasına sebep olmaktadır. Son yıllarda, donör-akseptör (DA) konjuge polimerleri düşük maliyeti, esnekliği ve büyük ölçekli uygulamalar açısından gelecek nesil elektronikler için umut vaat etmektedir. Çözülebilirliği ve iyi mekanik özellikleri nedeniyle D-A konjuge polimerler genellikle donör üniteleri ve akseptör üniteler olmak üzere iki kısımdan oluşur [10]. Donör grubun HOMO enerji seviyesinin yüksek olması istenirken, akseptör grubun LUMO enerji seviyesinin düşük olması istenir. Böylece sentezlenen D-A tipi polimerler düşük bant aralığına sahip olmaktadır. Kısacası güçlü bir donör monomer ile güçlü bir akseptör monomer kombine edilerek düşük bant aralıklı polimerler sentezlemek olasıdır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Donör-Akseptör teorisine göre düşük bant aralıklı polimerlerin elde edilmesi [11].

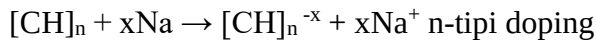
2.2.5. İletken polimerlerde doping işlemi

Doplama işleminin amacı konjuge polimerlerin bant aralığını değiştirmektir. Bu işlem valans bandından (HOMO) elektron alarak (p-doping) ya da iletim bandına (LUMO) elektron ekleyerek (n-doping) yapılır. Doplama sırasında doping molekülleri (dopant) sadece elektronların enerji kabuklarından geçişlerinde yardımcı olur [12]. Doplama işlemi konjuge polimerlerin uygun bir reaktif ile indirgenmesi ya da yükseltgenmesi ile gerçekleşir. Bunun için kullanılan dopantlar konjuge polimerler içerisinde hollerin

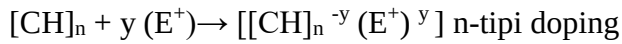
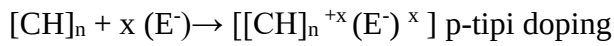
(elektron eksikliği, boşluk) sayısının artırılmasını sağlar. Elektronlar hollere atlayarak yeni hollerin oluşmasını sağlar. Bu durumun devam etmesi ile yük uzun mesafelere taşınır böylece iletkenlik oluşur. Kullanılan dopantlar elektronların sadece enerji kabuklarına geçişlerine yardımcı olur. Bu iletken polimerlerin kararlılıklarında önemli bir faktördür.

Doping sonucu iletken hale getirilen polimere dop edilmiş polimer denir. Poliasetilen, halojen dopantı ile yükseltgenme sonucu (p-tipi doping) iyi bir elektriksel iletkene dönüştürülmüştür. İndirgenme ile doping de mümkündür. Buna n-tipi doping adı verilir ve genelde alkali metaller için kullanılır.

Kimyasal Doping



Elektrokimyasal Doping



Polimerler aşağıdaki tekniklerle katkılanabilir [13].

- Gaz fazında doping
- Çözelti ortamında doping
- Elektrokimyasal doping
- Radyasyon kaynaklı doping
- İyon değişimi doping

2.3. İletken Polimerlerin Sentez Yöntemleri

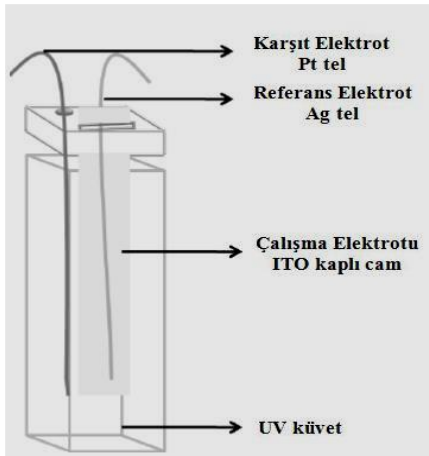
İletken polimer sentezinde çoğunlukla elektrokimyasal ve kimyasal polimerizasyon kullanılır. Kullanılan diğer yöntemler piroliz katalitik polimerizasyon, fotokimyasal polimerizasyon, meta tezi polimerizasyon ve plazma polimerizasyon teknikleridir.

2.3.1. Kimyasal polimerizasyon

Kimyasal polimerizasyon iki basamakta gerçekleştirilir. İlk basamakta monomer uygun bir çözücünde çözülür ikinci basamakta ise katalizör eşliğinde, bir yükseltgeme veya indirgeme aracı (genellikle bir asit, baz veya tuz) kullanılarak polimerleştirilir. Kimyasal polimerizasyonda çok miktarda ve düşük maliyetli ürün elde edilir. Elde edilen ürünün safsızlık içermesi, yükseltgenme basamağının kontrol edilememesi ve aşırı yükseltgenme nedeniyle polimerin parçalanması yöntemin dezavantajıdır.

2.3.2. Elektrokimyasal polimerizasyon

Elektrokimyasal polimerizasyon yönteminde monomer ve elektrolit içeren çözelti üç elektrotlu elektrokimyasal hücre konularak dönüşümlü voltametri (CV) tekniği ile istenilen potansiyel aralığında çalışma elektrodu üzerinde polimer filmi oluşturulur. Üç elektrotlu elektrokimyasal hücre çalışma elektrodu (Pt, Au, ITO kaplı cam elektrot...), karşıt elektrot ve referans elektrottan oluşmaktadır (Şekil 2.7).

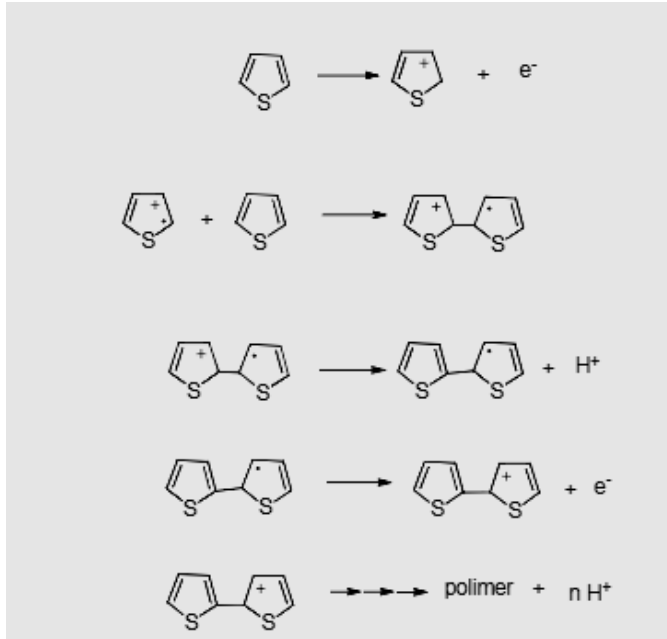


Şekil 2.7. Üçlü elektrot sistemi

Elektrokimyasal polimerizasyon diğer polimerizasyon çeşitlerine göre daha çok avantaja sahiptir. Diğer polimerizasyon yöntemlerine göre maliyeti düşüktür. Uygulanan potansiyelin kontrolü ile yan reaksiyonlar önlenabilir. Polimerleşmede başlangıç ve bitiş basamakları kontrol edilebilir. Kimyasal yönteme göre daha saf ürünlerin eldesi mümkün olur [14]. Kısa zamanda bile az miktarlarda alınan monomer polimerleştirilebilir. Kontrollü uygulanan potansiyelin tarama hızının ve zamanının değiştirilmesi ile polimer filminin kalınlığı ayarlanabilir [15].

Elektropolimerizasyon, ECE (elektrokimyasal-kimyasal-elektrokimyasal reaksiyon) mekanizmasına göre yürür. İlk basamakta monomer yükseltgenerek radikal kation oluşturur. Monomer yükseltgenmeye devam ederek ortamdaki radikal kation derişimi artar. İkinci basamakta iki radikal kationun eşleşme reaksiyonu gerçekleşebilir ya da monomer ile radikal kationun süstitüsyon reaksiyonu gerçekleşebilir. Eğer çalışılan yükseltgenme potansiyelinde, anot üzerindeki monomer ve oligomerlere ait radikal kationları konsantrasyonu yüksek, nötral türlerinki düşükse, radikal kationları dimerleşir. Oluşan dimer protonunu kaybettiğinde, aromatik dimeri üretecek olan dihidromer dikasyonunu oluşturur. Monomer ile radikal kationun süstitüsyon reaksiyonu gerçekleştiğinde radikalik kation, monomer ile reaksiyona girer, daha sonra elektron ve proton kaybederek nötral dimer oluşturur. Yükseltgenerek radikalik hale gelen bu dimer ortamdaki monomere bağlanarak trimer yapıyı meydana getirir. Bağlanmanın bu şekilde devam etmesi ile polimer zinciri uzar. Zincir uzandıkça polimer, elektrolit çözeltisinde çözünmez ve elektrot yüzeyine kaplanır (Şekil 2.8).

Bu teknikte yükseltgenme ve indirgenme sırasında akım oluşmaktadır yükseltgenme sırasında oluşan akıma anodik akım, indirgenme sırasında oluşan akıma ise katodik akım denilmektedir.



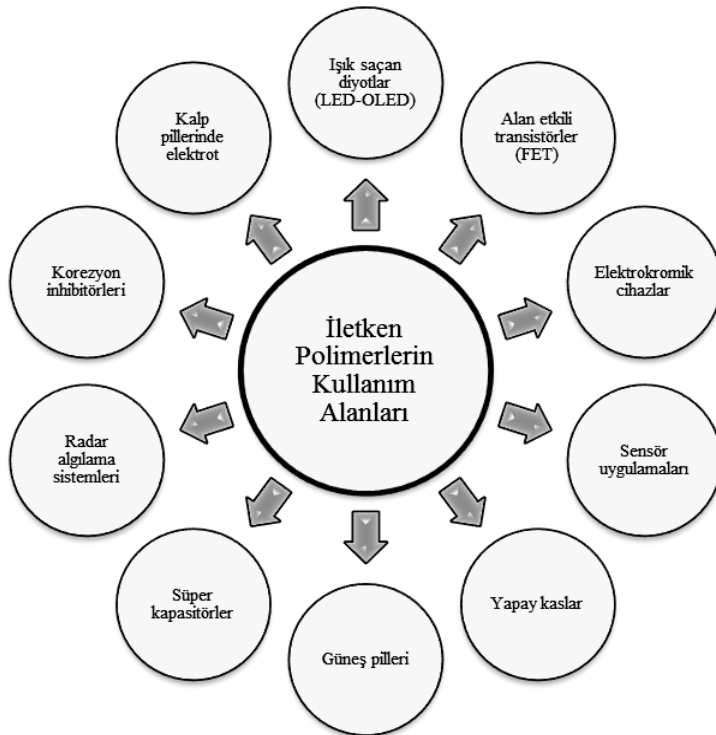
Şekil 2.8. Tiyofenin elektrokimyasal olarak polimerleşmesine ait reaksiyon mekanizması

Bu yöntemde oluşan iletken polimerlerin özellikleri çözücü, kullanılan elektrolit, monomerin derişimi ve kullanılan elektrotların cinsine bağılı olarak değışir. Polimer filminin kalınlığının kontrol edilmesi, kısa sürede ve oda sıcaklığında gerçekleştirilebilmesi, polimer filminin doğrudan doğruya elektrot yüzeyinde birikmesi bu yöntemin daha çok tercih edilmesine neden olmaktadır [16].

Elektrokimyasal olarak polimerleştirilmiş filmlerin yüzey kaplaması veya film kalınlığı kolayca polimerizasyon süresi değıştirilerek kontrol edilebilir. Elektrokimyasal olarak sentezlenmiş filmler stabil ve elektrokimyasal olarak etkindir. Bu özelliklerden dolayı, elektropolimerizasyon, çeşitli optoelektronik uygulamalarda önemli bir yöntem haline gelmiştir [17].

2.4. İletken Polimerlerin Kullanım Alanları

Yüksek teknolojik malzemeler olarak literatürde yerini alan iletken polimerler ile ilgili çalışmalar çok hızlı bir şekilde artmıştır. Optiksel, elektrokimyasal özellikleri, tersinir uyarılara cevap verebilme ve iletkenlikleri iletken polimerlere olan ilgiyi arttırmıştır. Dolayısıyla sanayinin ve elektronik dünyasının ihtiyaç duyduğu malzemeler olarak öne çıkmış ve geniş bir çalışma alanı oluşturmuştur (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. İletken polimerlerin kullanım alanları.

Elektrokimyasal olarak indirgenip yükseltgenirken optik özelliklerindeki, dolayısıyla renklerdeki değişim (elektrokromizm) sebebiyle iletken polimerlerin kullanım alanları arasında elektrokromik cihaz temelinde geliştirilen akıllı camlar ve görüntü cihazları, kasklar, güneş gözlükleri, reklam panoları, araba dikiz aynaları, hesap makineleri, uçak camları büyük ilgi çekmektedir. Polimerlerin düşük maliyet, hafif ağırlık, büyük ölçekte imalat kolaylığı ve esneklik gibi çeşitli avantajlarından dolayı polimerik elektrokromik polimerler ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır [18-19].

İletken polimerlerde, polimere uygulanan gerilime göre malzeme renk değiştirebilmekte; dolayısıyla camın ışık geçirgenliği ayarlanabilmektedir. Yani cama gerilim uygulandığında saydam olabildiği gibi, siyahlaşmakta veya renklenmektedir. Böylece bazı iletken polimerlerin elektrokromik özellikleri, bu polimerlerin güneş ışığı altında kararan akıllı pencerelerde kullanımına olanak sağlamaktadır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Elektrokromik cihazların kullanım yerleri

İletken polimerlerin önemli uygulama alanlarından bir diğeri de biyosensörlerdir. Elektrokimyasal olarak sentezlenen polimerler, hem biyosensörlerin hızını, duyarlılığını ve seçiciliğini geliştirdikleri hem de enzimlerin immobilizasyonu için uygun matriks ortamı oluşturdukları için sıklıkla kullanılmaktadırlar [20,21].

2.4.1. Elektrokromizm uygulamaları

Dış etkilere kaynaklanan absorpsiyon ve yansıma sonucunda malzeme renginin tersinir olarak değişmesine kromizm denir. Kromizme sebep olan etkilere sıcaklık değişimi (termokromizm), çözücü etkisi (solvatokromizm), elektromanyetik radyasyon (fotokromizm), pH değişimi (halokromizm), mekanik (piezokromizm) ve elektrokimyasal (elektrokromizm) olabilir.

Elektrokromizm, elektroaktif malzemenin elektrokimyasal yöntem ile yükseltildiğinde ya da indirildiğinde tersinir olarak optik özelliklerinde değişim göstermesi olarak tanımlanabilir [22-23].

Elektrokromik malzemeler, uygulanan potansiyele yanıt olarak geri dönüşümlü absorpsiyon spektral değişiklikler gösterir. Birden fazla redoks hali olan malzemelerde birden fazla renk geçişi gözlemlenebilir. Bunlara multikromik malzemeler denir. Yaygın elektrokromik malzemeler arasında inorganik metal oksitler, organik polimerler, metal kompleksleri ve koordinasyon metalopolimerler bulunmaktadır. Elektrokromik malzemelerle ilgili ilk çalışmaların inorganik yarı iletkenlerle (örneğin metal oksit malzemeler) başlamıştır. Ancak son zamanlarda organik yarı iletkenler, bazı üstün özellikleri nedeniyle inorganik olanlardan daha popüler olmuştur [24]. İletken polimerler kullanılarak üretilen elektrokromik malzemelerin işlenebilirliği daha yüksek, maliyeti ise daha düşüktür. İletken polimerlerde elde edilen renkler katkılama yüzdesine, seçilen monomere, uygulanan potansiyele göre değişir. Bu yüzden iletken polimerler kullanılarak çok daha fazla sayıda renk çeşitliliği ve daha yüksek kontrast elde etmek mümkündür.

Polimerlerin elektrokromik özellikleri moleküler yapılarına ve bant aralığı değerlerine bağlıdır. Donör – Akseptör tipi bir polimerde bant aralığı, elektron verici (donör) ünitesindeki en yüksek dolu moleküler orbital (HOMO) enerji seviyesi ile elektron alıcı (akseptör) ünite üzerindeki boş kalan en düşük moleküler orbital (LUMO) enerji arasındaki enerji farkını ifade eder. Elektrokromizm HOMO ve LUMO enerji seviyeleri arasındaki farktan ortaya çıkar fakat bu fark görünür bölgede olmalıdır. Katkılama ile malzemelerin optik özellikleri kontrol edilebilir. Katkılama ile yasak bant aralığının içine yeni enerji seviyeleri yerleştirilerek yeni elektronik seviyelerin oluşması sağlanır. Bu π - π^* geçişlerinde azalmaya sebep olurken daha düşük enerji geçişlerinin oluşması renk değişimine neden olur. Elektron verici kısım HOMO enerji seviyesini yükseltir ve elektron alıcı kısım

LUMO enerji seviyesini düşürür. Polimer omurgası içinde gerçekleşen donör-akseptör kısım arasındaki etkileşimler ve yük transferleri elektrokromik malzemelerin geliştirilmesine imkân sağlamıştır.

İletken polimerler elektrokimyasal olarak indirgenip yükseltgenirken polimer zincirleri üzerinde polaron ve bipolaron yapılar oluşur. İletken polimerlerin nötral, polaron ve bipolaron yapılarının ışık absorpsiyonları farklı olduğundan bu yapıların renkleri de farklı olmaktadır. Bu malzemelerde, uygulanan potansiyel ile farklı renklerin gözlemlenmesi dolayısıyla iletken polimerlerden elektrokromik cihazların üretimini mümkün hale getirmektedir. Organik elektrokromik maddeler arasında, konjuge polimerler, mükemmel renk verimi, hızlı renk değişim kapasitesi, aynı malzeme ile birçok rengin gözlemlenmesi ve kimyasal yapıyı değiştirerek bant boşluğu değerlerini ayarlama kabiliyeti nedeniyle üstün özelliklere sahiptir. Her ne kadar elektrokromik polimerler ile ilgili birçok çalışma gerçekleştirilmiş olsa da, bunların ticari bir ürüne dönüşmesi mümkün olamamıştır. Uzun vadeli stabilite, bu tür uygulamalarda kullanılan diğer polimerler gibi polimerik elektrokromik malzemelerin ana problemidir [17,23].

2.5. Biyosensör uygulamaları

2.5.1. Biyosensörler ve çalışma prensibi

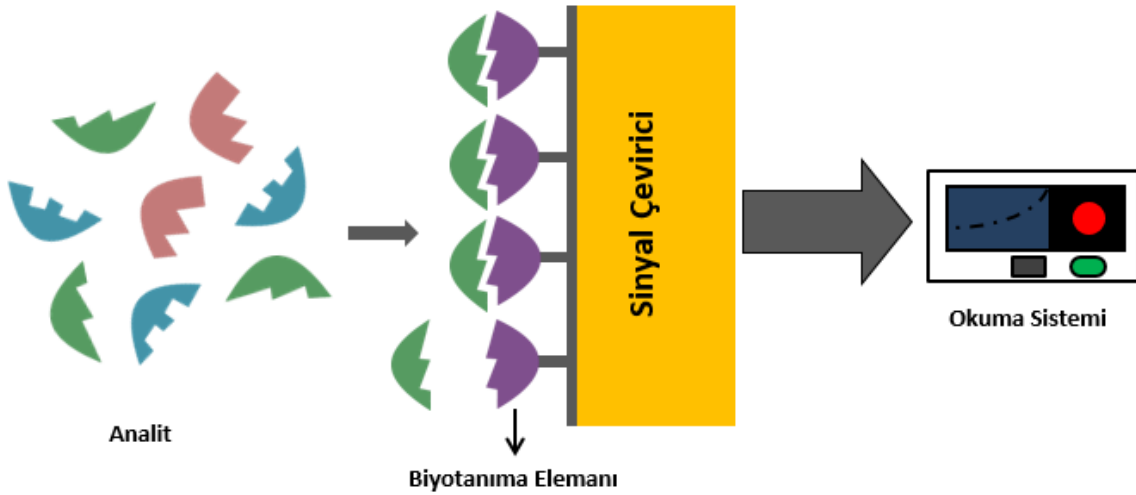
Biyosensörler IUPAC tarafından, “ kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar” olarak tanımlanmıştır [25]. Biyosensörler biyolojik olaylardaki biyokimyasal değişimleri algılayarak biyolojik ve sentetik süreçlerin izlenebilmesi ve anlaşılabilmesini sağlamıştır. Biyosensörlerin tarihi 1962'de Clark ve Lyson tarafından geliştirilen biyosensörün üre ve kandaki glikoz miktarını belirlemesi ile başlamıştır. Bu sensörde pH ve oksijen elektrodunda enzimatik membran kullanılmıştır. 1960'ların sonunda doğru Updike ve Hick glikoz oksidaz içeren bir jeli oksijen elektrot üzerinde polimerleştirerek bir enzim elektrot hazırlamıştır. Hazırlanan bu elektrot glikoz ve oksijen içeren çözeltiye daldırıldığında ortamdaki oksijeni kullanarak glikozu, glukonik aside oksitlemektedir.



Ticari olarak ilk üretilen glikoz oksidaz elektrodundan yola çıkarak yeni bir sensör sınıfı olan biyosensörler geliştirilmiştir [26].

Biyosensörler biyoorganik analitlerin tanınmasını kolaylaştırır. Biyolojik bir olayı elektrik sinyaline dönüştüren biyosensör farklı ortamlara uyarlanabilmeli ve çok çeşitli fizyolojik koşullara dayanıklı olmalıdır.

Bir biyosensör birbiri içine geçmiş iki ana bölümden oluşur. Bu bölümler, biyomoleküllerin (biyoajan) katı bir yüzey üzerinde immobilize edildiği bir tanınma parçası (biyoreseptör) ve biyoreseptörde meydana gelen değişikliği ölçülebilen bir sinyale dönüştüren transduser (çevirici) dir (Şekil 2.11) [27]. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek onu tanımadır.



Şekil 2.11. Tipik bir biyosensörün çalışması [28].

Biyosensörlerin, klinik teşhis, tıbbi uygulamalar, süreç denetleme, biyoreaktörler, gıdalarda kalite kontrol, tarım ve veterinerlikte tanı ve kalite kontrolü, bakteriyel ve viral teşhis kitlerinin hazırlanması, ilaç üretimi, endüstriyel atık su denetimi, madencilik, askeri savunma sanayi gibi alanlarda yaygın olarak kullanımı söz konusudur.

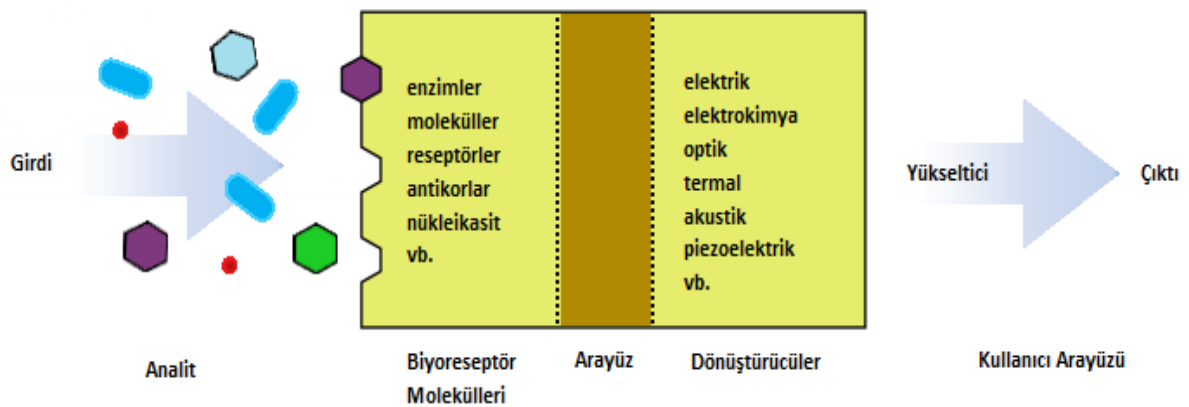
Biyosensörlerin en yoğun olarak kullanıldıkları alan bugün için medikal tanı ve teşhis alanıdır. Hiç kuşkusuz biyomedikal sektör biyosensörler için en iyi pazardır. Yaygınlaşan tıbbi biyosensörlere örnekler ise üre ve kolesterol elektrotlarıdır. Bu sensörler sayesinde çok önemli hastalıkların teşhisi sağlanabilir. Örneğin üre seviyesi böbrek işlevini takip etmekte, kolesterol seviyesinin gözetimde tutulması arteriyosklerozlarının engellenmesinde, değerlendirilmesinde kullanılır. Diyabet hastalığını teşhis etmekte kullanılan glikoz oksidaz enzim sensörü çok az miktar kanda ve idrarda glikoz tayinini çok hızlı yapar.

Protezlere yerleştirilen biyosensörler enfeksiyon kaynağını tespit eder ve enfeksiyon türemesinin önüne geçer [29]. Çevre takibinde biyosensörler gerek suların gerekse havanın çevresel atıklar, mikroorganizmalar ve toksinler yönünden takibi amacıyla kullanılmaktadır [30,31]. Gıda sektöründe biyosensörlerin kullanımı gerek gıdaların üretimi gerekse paketlenmesi ile markete sunulması aşamalarında gıdaların kalite ve kontaminasyon kontrolleri için tercih edilmektedir. Biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde başta glikoz olmak üzere bir çok monosakkarit, amino asitler, organik asitler (laktik asit) üre ve alkol tayinlerinde enzim sensörleri kullanılmaktadır [29, 27, 32, 33] .

2.5.2. Biyoreseptörler(Biyoajanlar)

Biyosensörlerde hedef analit ile seçici bir şekilde etkileşime giren maddeler biyoresöptör (biyoajan) olarak adlandırılır. Biyosensörün hassasiyetinde ve seçiciliğinde etkin olan biyoajanlar tek bir substrat ile etkileşmelidir ve diğer substratlara karşı hassasiyet göstermemelidir. Biyoreseptörler analizi yapılacak olan hedef maddeye özgü olmalıdır ve verilen biyolojik sistemde hedef maddeyi kolaylıkla tanımalıdır. Biyosensörlerin reseptör kısımlarında algılayıcı olarak en çok kullanılan maddelerden biri de yüksek spesifik özellik gösteren enzimlerdir [3].

Biyoresöptörler biyokatalistler (biyoafinite) ve biyoligandlar (biyokatalitik) olarak ikiye ayrılır. Enzimler, mikroorganizmalar ve doku malzemeleri biyokatalistlere; antikor, nükleik asit, lektin ve DNA ise biyoligandlara örnek verilebilir (Şekil 2.12) [34].



Şekil 2.12. Biyosensör bileşenleri (şematik gösterimi) [35].

2.5.3. Sinyal çevirici (transduser)

Analit ile biyoreseptör arasında gerçekleşen kimyasal reaksiyon sonucunda renk değişimi, ışıma, ısı değişimi, pH değişimi, sıcaklık değişimi, iletkenlik değişimi meydana gelebilir. Bu değişimleri ölçülebilir bir sinyale dönüştüren cihazlara sinyal çevirici (transduser) denir. Hedef analiz ile biyoreseptör arasındaki etkileşim sonucu oluşan fiziksel cevap, transduser tarafından potansiyometri, amperometri, termometri veya fotometri gibi fiziksel büyüklerin değişimine bağlı olarak elektrik sinyaline dönüştürülür. Sinyal çeviricilerde algılama fiziksel ya da kimyasal algılama şeklinde olabilir [34]. Transduserler sistemde kullanılan tekniğe göre sınıflandırılırlar.

2.5.4. Biyosensör dizaynında dikkat edilmesi gerekenler

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma sanayi ve birçok endüstriyel alanda önemli bir rol oynamaktadır. Yüksek duyarlılık, seçicilik, hızlılık doğruluk, taşınabilirlik, kompaktlık, tutarlılık gibi parametreler biyosensörlerin geleneksel analit uygulamalarının önüne geçmesinin en önemli nedenleri arasında sayılabilir (Şekil 2.13). İdeal bir biyosensör tasarlanırken ilk olarak biyosensörün hangi analite uygulanacağı ve analite uygun ajanın ne olacağına karar verilmelidir. Daha sonra biyoajan doğru bir immobilizasyon metodu ile dönüştürücüye sabitlenmelidir. Son olarak biyoajanın analiti tanımasıyla oluşan sinyali anlaşılabilir bir hale getirebilmesi için uygun bir dönüştürücü seçilmelidir. Ayrıca ölçüm aralığı, duyarlılığı ve ölçümleri etkileyecek etkenler göz önünde bulundurularak biyosensör bütün olarak düşünülmelidir.

2.5.5. İdeal bir biyosensörde bulunması gereken özellikler

Nitelikli ve pratikte kullanılabilir bir biyosensörü nitelendiren performans parametreler aşağıdaki gibi sıralanabilir.

Çalışma ömrü ve kararlılık

Kararlılık biyosensörün kullanım süresi hakkında bilgi verir. Aynı biyosensörle çok sayıda analiz yapılabiliyorsa biyosensörün kullanım süresi uzundur ve sensör kararlıdır. Bir sensörün kararlılığı işgücü ve maliyet açısından önemli avantajlar sağlar. Kararlılık biyosensörün kullanılabilirliğinin en önemli parametrelerindendir. Biyosensörün kararlılığı sensörün depolama ve çalışma koşullarına bağlıdır. Enzim sensörlerinde enzimin saflık

düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi enzim sensörlerinin kararlılığını önemli ölçüde etkiler [36].

Tayin aralığı ve tayin sınırı

Substrat derişimi ile sensör cevabı arasındaki ilişki kalibrasyon grafiğinde açık bir şekilde görülebilir. Kalibrasyon grafiğinde bu ilişkinin doğrusal olduğu bölgeye “doğrusal aralık” denir. Bu doğrusal aralığın en alt sınırı olarak tanımlanan tayin sınırı kesinlik ve doğruluk hakkında bilgi verir [3, 36] . Enzim sensörleri incelendiğinde pH, sıcaklık ve girişim yapıcı türler tayin aralığını değiştirebilir. Örneğin çalışma için belirlenen sıcaklık koşulları sağlanamadığında enzim sensörünün cevabı olumsuz yönde etkilenir. Amperometrik sensörlerinde substrat derişimi ile sensör yanıtı arasında doğrusal grafikler elde edilir. Tayin sınırı cihazın tespit edebilecek en düşük madde derişimini ifade eder. Seçicilik biyosensör parametrelerinin en önemli özelliklerinden biridir. Biyolojik bileşenler etkindir ancak bazen çeviricilerde seçiciliğe katkıda bulunur. Sensör sadece analite özgüdür başka reaktiflere duyarlı değildir [37].

Cevap süresi

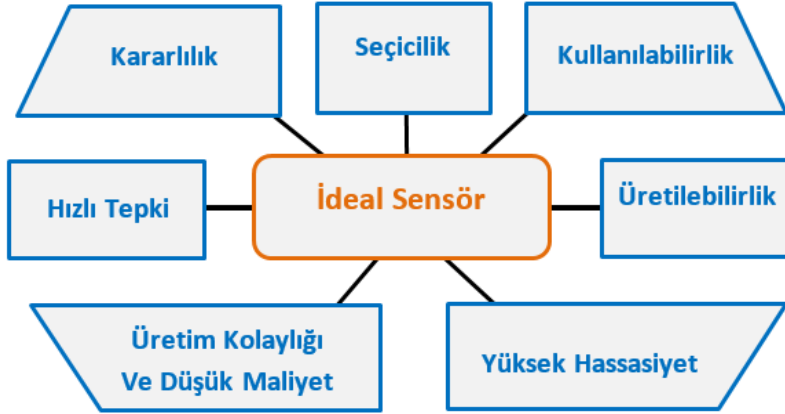
İdeal bir biyosensör kısa sürede cevap verebilmelidir. Bu süreyi etkileyen başlıca unsurlar substrat derişimi, karıştırma hızı, enzim derişimi ve sıcaklık, sensör yüzeyinde kullanılan membran özellikleri sayılabilir. Enzim miktarının arttırılması, karıştırma hızının arttırılması, ideal pH aralığında ölçüm alınması sensörün cevap süresini kısaltır. Substrat derişimindeki artış ve enzimin ideal çalışma sıcaklığından uzaklaşması cevap süresinde artışa neden olur. Bir biyosensörün cevap süresi biyosensör analite temas ettiği andan itibaren başlar ve cevabın okunduğu zaman biter.

Tekrarlanabilirlik

İdeal bir biyosensör aynı örnekle ardı ardına yapılan ölçümlerde birbirine yakın sonuçlar vermelidir. Tekrarlanabilirlik yapılan ardışık ölçümlerden elde edilen verilerin standart sapma ve korelasyon katsayısının hesaplanması ile ifade edilir.

Basit ve ucuzluk

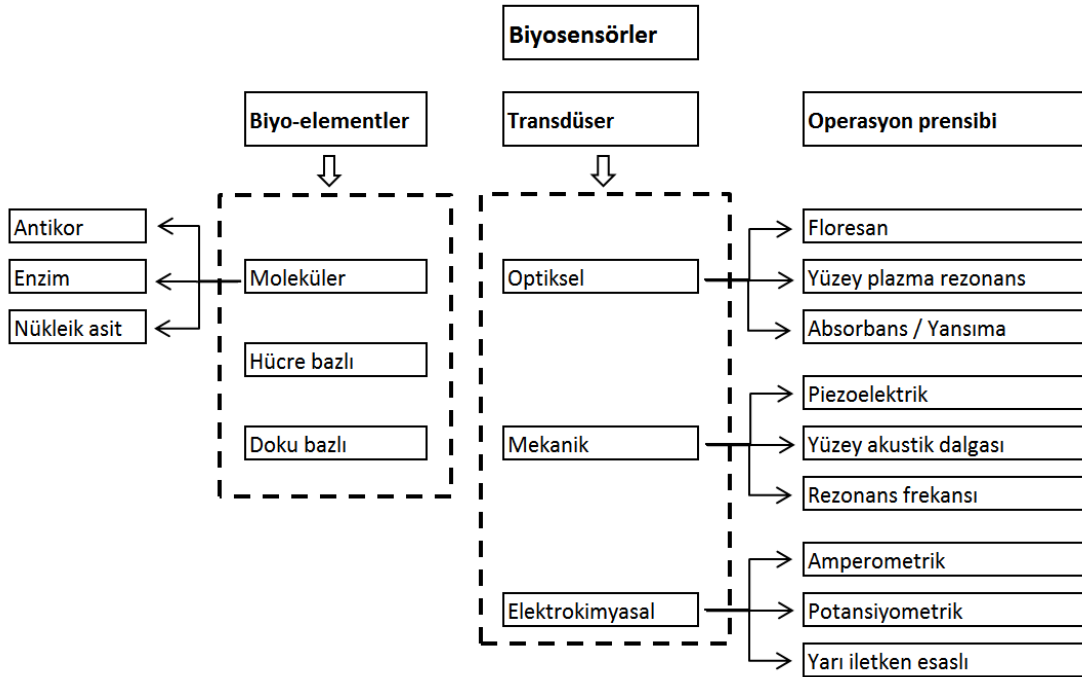
Biyosensörün maliyetinin düşük olması ticarileşmesinin hızlanmasında ve biyosensörün kullanımının yaygınlaşmasında önemli bir faktördür [3, 38].



Şekil 2.13. İdeal bir biyosensörde olması gereken parametreler.

2.6. Biyosensör Çeşitleri

Biyosensörler, sensör cihazına ve biyolojik maddeye dayanarak sınıflandırılır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Biyosensör çeşitleri

2.6.1. Elektrokimyasal esaslı biyosensörler

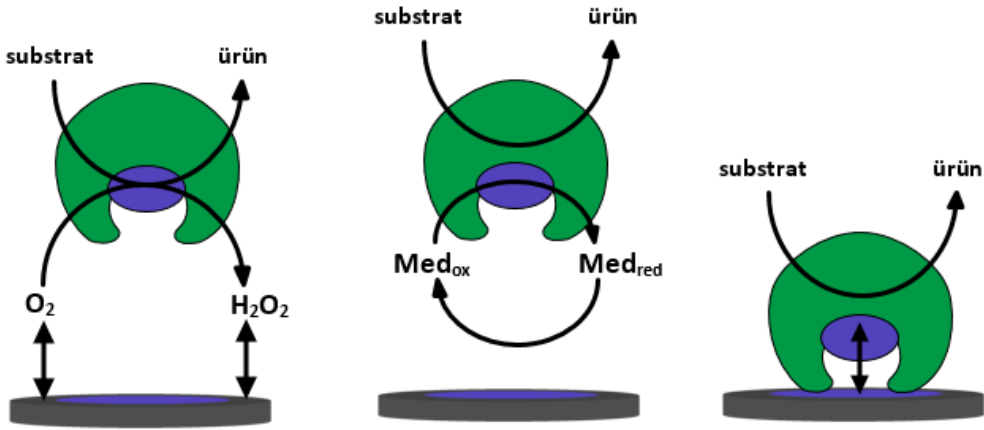
Elektrokimyasal biyosensör temel olarak iki parçadan oluşur: biyomelekülü tanıyan tanıma sistemi ve dönüştürücü olan dönüşüm sistemi. Sensörün ana işlevi, test edilecek analitlerle seçici olarak etkileşime girmek ve sistemdeki kimyasal parametrelerin değişimlerini tepkime sinyalleriyle dönüştürücüye iletmek iken, dönüştürücünün temel işlevi yanıt sinyalini tanımadır. Bir elektrokimyasal biyosensör, biyomoleküler tanıma ve hedefe oldukça spesifik cevap veren ve araçlarla analitik bilgi sağlayan, enzimler, antikorlar, nükleik asitler, mikroorganizmalar ve hücreler gibi biyolojik element sınıfı içeren entegre bir cihazdır [39]. Günümüzde, kanser biyobelirteçlerinin tespiti sıklıkla gen mutasyonu ve protein biyobelirteçlerini tarayan elektrokimyasal biyosensörler kullanılarak gerçekleştirilmektedir [40].

Elektrokimyasal biyosensörler amperometrik, potansiyometrik biyosensörler ve yarı iletkenleri esas alan biyosensörler olmak üzere üç grupta sınıflandırılır [38] .

2.6.2. Amperometri esaslı biyosensörler

Sabit gerilim altında elektrokimyasal hücreden geçen akım yoğunluğunun ölçülmesine dayanan ölçüme amperometrik ölçüm denir. Çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrot olmak üzere üç elektrot kullanılır. Elektrotlar deneysel sonuçların belirlenmesi için çok önemlidir. Elektrokimyasal reaksiyonlar çalışma elektrodu olarak bilinen elektrot yüzeyinde meydana gelir. Amperometrik biyosensörler, çalışma elektrodundaki elektroaktif türün yükseltgenmesi veya indirgenmesi ile ilgili akımı izlemeye dayanır. Amperometrik biyosensörler diğer tip elektrokimyasal biyosensörlere göre daha hassastır, kullanımı kolay, hızlı ve saha analizi için uygun, ucuz ve daha geniş doğrusal aralığa sahiptir. Bu nedenle, en popüler biyosensör çeşitlerinden biridir. Diğer yandan, aktiviteleri substratın redoks potansiyeli ile sınırlıdır [41,36].

Biyosensörlerin gelişimi öncelikle amperometrik transdüserlere dayandığından, amperometrik biyosensörler en çok kullanılan cihazlardır. Amperometrik biyosensör, çeşitli kimyasalların konsantrasyonunu ölçmek için gerçekten iyi bir cihaz olarak tercih edilmektedir. Redoks enzimlerinin kullanımı nedeniyle oldukça seçicidir [41].



Şekil 2.15. Biyosensörlerde elektron transferinin şematik gösterimi [42] .

2.6.3. Potansiyometri esaslı biyosensörler

Elektrokimyasal bir hücrede elektrot potansiyelini doğrudan analit konsantrasyonunun belirlediği, uygun bir çalışma elektrodu ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü temel alan nicel analize potansiyometri denir. Bu tür biyosensörlerde, iyonik konsantrasyonlardaki değişiklikler iyon seçici elektrotlar kullanılarak belirlenir. Potansiyometrik biyosensördeki transdüser solüsyondaki iyonlara duyarlıdır Bunlar pH, amonyum, iyot, siyanür, amonyak ve karbondioksit duyarlı enzim sensörlerdir. İyonların üretilmesi amacıyla enzimler biyoreseptörler olarak kullanılmaktadır. Ölçülen sinyal, logaritmik fonksiyon aracılığıyla analit konsantrasyonuyla ilişkilidir [40].

2.6.4. Yarı iletkenler esaslı biyosensörler

Temel sensör olarak metal oksit yarı iletken alan etki transistörlerini (MOSFET) ya da iyon duyar alan etki transistörlerini (ISFET) esas alan bu tür enzim sensörleri, enzim ile alan etki transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etki transistörleridirler (ENFET).

2.6.5. Optik biyosensörler

Biyokimyasal reaksiyonların sonucunda yayılan veya emilen ışığın ölçümünü temel olarak çalışır. Optik biyosensörler, bir biyo-tanım elemanından ve bir optik transdüserden oluşur. Optik biyosensörlerin uygulama alanları genellikle mikroelettronik, mikro/nano sistemler, biyoteknoloji ve mikroelettromekanik sistemlerdir.

2.6.6. Kalorimetri esaslı biyosensörler

Kalorimetri esaslı biyosensörler, enzim ve ısı sensörlerinin kombinasyonundan oluşur. Analit biyoelement ile reaksiyona girdiğinde, ortam sıcaklığındaki değişiklik, ısı salımı veya emilimi nedeniyle oluşur ve daha sonra termostatlar bunu ölçebilir. Kısacası termal biyosensörler olarakta bilinen kalorimetri esaslı biyosensörler temeli enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat konsantrasyonunu belirlemeye dayanır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca varılır. Bununla birlikte, termal biyosensörler düşük hassasiyete sahiptir çünkü reaksiyon sırasında ısı kaybı meydana gelir [38].

2.6.7. Piezoelektrik sensörler

Kütle hassasiyeti algılama prensibine dayalı bu tip biyosensörlere kütle bazlı biyosensörleri de denilmektedir. Analit ile piezoelektrik kristal üzerinde bulunan biyoreseptörün reaksiyonu sonucu kütlede bir değişim meydana gelir. Kristal yüzeyinde biriken kütle, titreşim frekansında değişime neden olur. Piezoelektrik biyosensörler kristalin rezonans frekansındaki değişimin ölçülmesi temeline dayanır.

2.6.8. Enzim Biyosensörleri

Tanıma elemanı (biyobileşen) olarak enzimlerin kullanan enzim sensörlerinin birçok alanda kullanımı yaygınlaşmıştır. Enzimler protein yapılı karakteristik katalizörlerdir. Çok düşük derişimlerde bile katalizör görevi yapar. Katalizledikleri reaksiyonlar için çok duyarlıdırlar. Yüksek duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle biyoanaliz için araştırmacıların ilgisini üzerine çekmiştir. Enzim sensörleri biyokatalizörler veya immobilize edilmiş malzemelerden oluşur. Enzim sensörleri genel olarak, biyoaktif tabaka, dönüştürücü (transduser) ve ölçüm sisteminden oluşmaktadır [37].

Bir enzim elektrodunda dönüştürücü, aktif tabakada gerçekleşen enzimin katalizlediği tepkime sonucu oluşan ürünün miktarındaki artışı tespit eder. Dönüştürücü, biyoaktif tabakada meydana gelen enzimatik reaksiyon sonucu substrat konsantrasyonundaki azalış veya artış miktarına uygun olarak seçilir. Biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka iletici ara yüzeyindeki derişimin hızlı bir şekilde denge ulaşması gerekir. Hızlı bir şekilde denge ulaşabilmesi için biyoaktif tabaka kalınlığı mümkün olduğunca ince olmalıdır.

Dönüştürücünün ölçme sistemine gönderdiği sinyal ölçme çözeltisinin derişimine bağıdır. Biyoaktif tabakada substrat derişiminin sabit olması için ölçme çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması gerekir [43].

Enzim elektrotlarının tercih edilmelerindeki en önemli faktör canlı sistemler sayesinde analiz işleminde kullanılacak bol miktarda enzimin bulunmasıdır [43]. Biyosensör hazırlamada enzimleri kullanmak spesifiklik bakımından avantajlı ancak saf enzimin pahalı oluşu da dezavantajdır. Enzimler hastalığın teşhisi, hastalığın seyri ve değerlendirilmesine dair bilgi verir. Enzim sensörleri yaygın hastalıkların teşhisinde kullanılabilir [44] .

2.7. Biyobileşen immobilizasyonu

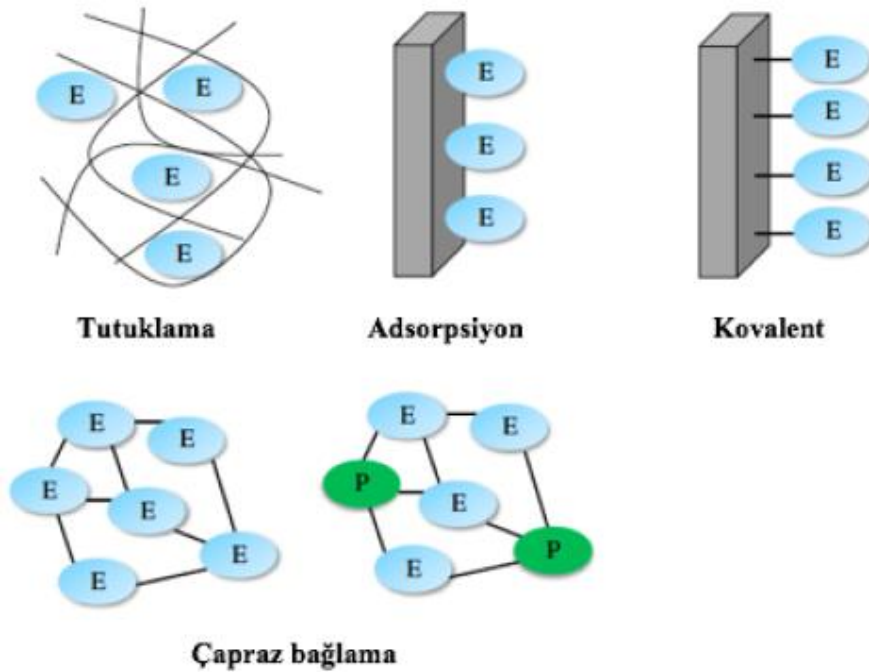
Biyoteknolojik işlemlerde enzimlerin kullanımını daha uygun hale getirmek için farklı yöntemler uygulanmaktadır ve immobilizasyon bunlardan biridir. Biyosensör üretiminde uygun matrisin belirlenmesi ve immobilizasyon yöntemi en önemli faktörlerdir.

Biyosensör performansı büyük ölçüde yüzey özelliklerine, enzim molekülü ve elektrot yüzeyi arasındaki etkileşime ve enzim molekülünün üç boyutlu yapısının korunmasına bağıdır. Enzim immobilizasyonu sensör yüzeyinde biyomoleküllerin faaliyetlerini kaybetmeden çözünmeyen bir destek malzemesine bağlanması olarak tanımlanmaktadır. Enzim immobilizasyonu, enzimin hareketini engelleyen bir yöntemdir. Bir yüzeye tutundurularak, üzerinden geçen substratların ürünlere dönüşmesini sağlayan enzimlere immobilize enzimler denir. Enzimin immobilizasyonu, katalitik etkinliğini artırabilir, depolama ve çalışma stabilitesini artırabilir. Ayrıca enzim geri kazanımına ve yeniden kullanılabilirliğe izin verir [42]. Yüksek enzim maliyeti, düşük kararlılık, çözücüler tarafından etkisiz hale getirme ve geri dönüştürülebilirlik eksikliği gibi bazı dezavantajlar, enzimlerin orijinal formlarda kullanılmasını sıklıkla engellemektedir. Enzimlerin farklı katı destekler üzerine immobilizasyonu ile bu dezavantajların üstesinden gelinebilir. Son on yılda araştırmacılar, aktivite, seçicilik, özgül olma ve inhibitörlere direnç gibi bir dizi endüstriyel enzimi geliştirmek için mühendislik teknolojisi olarak immobilizasyonu yoğun bir şekilde sürdürdüler. İmmobilize edilmiş biyokatalizörler, aşırı pH, sıcaklık ve organik çözücü koşullarında daha çok kararlılık sergilemiştir. Gelişmiş ürün kalitesi ve düşük işletme maliyeti, gıda ve ilaç endüstrisi için önemli olan immobilize edilmiş enzimlerin diğer faydalarıdır [45]. Bununla birlikte, serbest enzimlerin pratik uygulamaları sınırlıdır, çünkü kararsızdırlar, toksik reaksiyonlara neden olurlar ve sistemik dolaşımda kısa

ömürlüdürler. Bu nedenle, enzim immobilizasyonu, iyi kararlılık, yüksek hassasiyet, yüksek seçicilik, kısa tepki süresi ve tekrarlanabilirlik gibi uygun performansa sahip verimli biyosensörleri geliştirmek için anahtar faktör olarak görülmektedir [46].

Enzimlerin biyosensör yüzeyine immobilizasyonu için fiziksel adsorpsiyon, çapraz bağlama, kovalent bağlama ve tutunma olmak üzere dört temel teknik vardır (Şekil 2.16). Uygun destek matrisinin eşlik ettiği immobilizasyon tekniğinin seçimi, enzimin aktivitesini ve stabilitesini korumak için önemlidir. Enzimatik olarak aktif malzemelerin hareketsizleştirme teknolojisi ile imal edilmesi, hem biyokatalizörün hem de destek olarak kullanılan biyomateryalin uygulama perspektifini büyütür.

Birçok immobilizasyon tekniğinde, çapraz bağlama maddesi olarak glutaraldehid kullanılır. Çünkü glutaraldehid gibi çapraz bağlayıcılar sulu çözücüler içinde çözünür ve kovalent bağlar oluşturabilirler. Aynı zamanda, immobilizasyon sırasında enzimlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin korunmasına yardımcı olur ve biyokatalizörün kararlılığını artırır [45].



Şekil 2.16. İmmobilizasyon teknikleri [37].

Çizelge 2.1. Çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları

Çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları		
Yöntem	Avantajları	Dezavantajları
Emme	• Yürütülmesi kolay • Düşük maliyet • Gözenek açılım sınırlaması yoktur	• Enzimlerin desorpsiyonu • Düşük stabilite • Daha az verimlilik
Kovalent Bağlama	• Yüksek katalitik verimlilik • Yüksek stabilite • Sürekli reaksiyon için uygun • Enzim kaçağı yok	• Yüksek işleme maliyeti • Enzim fonksiyonel yapısında kayıp
Tuzak	• Yürütülmesi kolay • Düşük maliyet • Düşük enzim miktarı gerekliliği • Yüksek stabilite	• Sürekli enzim kaçağı • Gözenek difüzyon kısıtlanması • Büyük ölçekli veya endüstriyel işlemler için uygun değildir
Çapraz Bağlama	• Olağanüstü pH ve sıcaklık koşullarına karşı direnç • Dayanıklılık	• Yüksek fiyat • Zor reaksiyon kontrolü • Büyük enzim miktarı gerekliliği • Katalitik özelliklerin kaybı
Kapsülleme	• Büyük enzim miktarları hareketsiz hale getirilebilir • Kolay hazırlık • Düşük maliyet	• Kütle transferi sınırlaması • Enzim kaçağı • Yüksek enzim konsantrasyonu gerekli

2.7.1. Kovalent bağlama

Enzimin dönüştürücü yüzeyine kimyasal bir reaksiyon sonucu kovalent bağlarla bağlanmasıdır. Kovalent bağlanma sağlamak için yüzey veya biyolojik element kimyasal veya fiziksel işlemle etkinleştirilmelidir. Kovalent bağlar, biyoelement (amino asitlerdeki fonksiyonel gruplar) ve immobilizasyon yüzeyi arasında oluşur.

Enzim ve taşıyıcının kovalent olarak bağlanmasıyla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu biyosensör, iyi bir stabilite ve yeniden kullanılabilirlik gösterir. Bu yöntem en çok kullanılan enzim immobilizasyon yöntemidir. Araştırmacılar tarafından bu yöntemin daha fazla tercih edilmesinin nedeni yöntemin kontrol edilebilirliği ve sonucun öngörülmesi olmuştur. Kovalent bağlanmanın moleküler modifikasyonla birleştirilmesi, enzimi hareketsizleştirirken aktivite kaybını önleyebilir [47].

Jiabao Lyu ve arkadaşları, aldehit etiketli BsLA 8M, Fe₃O₄ monodispersed magnetit mikroküreleri üzerine kovalent bağlama yöntemini kullanarak immobilize etmişlerdir. Immobilizasyon verimliliği, % 90'ın üzerinde olduğu ve nanopartiküller üzerine iyi enzim yüklemesini olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, immobilize edilmiş lipazın yeniden kullanılabilirliği, serbest lipazinkinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu immobilizasyon stratejisi lipazın yarı ömrünü artırmıştır. Bu sonuçlar kovalent immobilizasyonun bir biyokatalizörün termostabilitesini artırmak için temel olduğunu göstermektedir [47].

Enzim immobilizasyonu, enzim termal stabilitesini, kimyasal maddelere karşı dayanıklılığını ve reaksiyon karışımından basit bir geri kazanımı iyileştirerek sürekli işlemlerde kullanımını kolaylaştırır. Enzimlerin kovalent immobilizasyonu, enzimlerin yavaş salınması ve daha iyi depolama kabiliyeti / raf ömrü ile sonuçlanır. Bu nedenle, uzun ömürlü, gerçek ölçekli ve sürekli uygulamalar için enzimlerin kovalent immobilizasyonu tercih edilir. Saeed Kashefi ve arkadaşları, Lakkazı grafen oksit nanosheets üzerine kovalent bağlama yöntemi ile immobilize etmiştir. Kullanılan immobilizasyon tekniğinin, pH ve sıcaklıktaki ciddi değişikliklere karşı enzimin stabilitesini arttırdığını rapor etmişlerdir [48]. Bir enzimin immobilizasyon yoluyla konformasyonel stabilitesinin artırılması, enzimatik teknolojinin uygulanması için en önemli adımlardan biridir. Mitra Naghdi ve arkadaşları çalışmalarında çam ağacından elde edilen biochar nanoparçacıklarına lakkazı kovalent bağlama yoluyla immobilize etmişlerdir. Immobilize lakkazın ısı ve pH stabiliteyi, serbest lakkazla karşılaştırıldığında iyileştirdiğini, immobilize edilmiş lakkazın tekrar kullanılabilirliğinin iyi olduğunu arka arkaya 4 döngüden sonra başlangıç aktivitesinin % 70'ini koruduğunu rapor etmişlerdir [49].

2.7.2. Çapraz bağlama

Kovalent bağlama yöntemi ile tutuklama yönteminin kombinasyonu şeklinde uygulanır. Genellikle glutraldehit, diflorodinitrobenzen, bismaleimidoheksen gibi bileşikler çapraz bağlayıcı reaktif olarak çok tercih edilmektedir. Kullanılan enzime, protein/reaktif derişim oranına ve ortam pH'sına, ortam sıcaklığına bağlı olarak enzim molekülleri arasındaki çapraz bağlama derecesi değişebilir.

Zahra Fathali ve arkadaşları çalışmalarında, lakkazı mesopoz silika içinde çapraz bağlama ve bileşik tutturma stratejisi kullanarak hareketsizleştirmişlerdir. Immobilize edilmiş biyokatalizör 20 ardışık ölçümden sonra başlangıç aktivitesinin %79 kadar muhafaza edilerek serbest enzime göre daha iyi pH ve sıcaklık kararlılığı ve yeniden kullanılabilirlik göstermiştir [50].

Fatiha Lassouane ve arkadaşları *T. pubescens*'ten elde edilen ham lakkaz, aljinat taneciklerine tutunmadan önce hapsolme ve çapraz bağlama ile başarıyla immobilize etmiştir. Tutma işleminden önce çapraz bağlama ile immobilize edilmiş lakkaz, sadece tutma ile immobilize edilmiş lakkazdan daha yüksek bir immobilizasyon verimi (>% 72) göstermiş ve enzim sızıntısının 7 kat azaldığı görülmüştür [51].

2.7.3. Tutuklama

Enzimin bir membran ya da tabaka içerisinde hapsedilmesidir. Poliakrilamid, polivinilalkol gibi bazı sentetik polimerler ve nişasta gibi doğal polimerler bu yöntem ile enzim immobilizasyonunda kullanılmaktadırlar. Enzim ve matriks arasında herhangi bir bağ oluşmadığından enzimin işlevselliğinde bozulma olmaz.

2.7.4. Fiziksel adsorpsiyon

Enzim immobilizasyonunda kullanılan en hızlı ve basit yöntem olan adsorpsiyonda biyobileşenin film veya tabakaya adsorbe olması sağlanır. Biyobileşen elektrostatik, hidrofobik, van der Waals etkileşimleri gibi kuvvetlerle taşıyıcıya tutunur. Bu yöntemle, enzimler aktivitelerini yitirmez, ancak fiziksel adsorpsiyon ile hazırlanan hareketsiz enzimler gevşek bir şekilde bağlanır ve yeniden kullanıldıktan sonra katı maddelerin yüzeyinden çözülme eğilimindedir. Bu nedenle, biyosensör operasyonel stabilitesini kaybedebilir.

2.8. Enzimler

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısında moleküllerdir [52]. 1897'de Eduard Buchner maya özütlerinin şekeri alkole dönüştürdüğünü keşfetmiştir. Daha sonra Frederick W. Kuhne bu moleküllere enzim adını verdi.

Organizmadaki organik moleküllerin yapımı, yıkımı, sindirim ve solunum gibi fizyolojik olaylar enzimler yardımıyla yürütülmektedir. Hücrelerin canlılığı için gerekli reaksiyonlar için vazgeçilmez olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir.

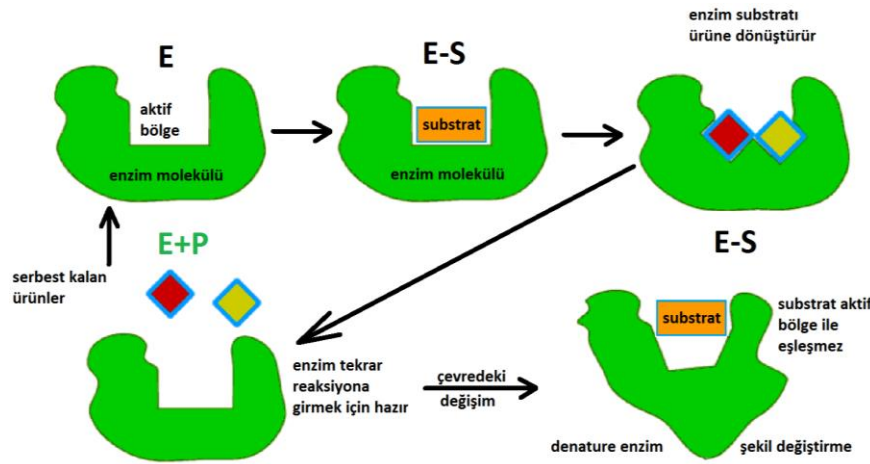
Bazı enzimler proteinlerin yanında protein olmayan bir kısım içerirler. Bu enzimlerin protein kısmına “Apoenzim” diğer kısma kofaktör ya da koenzim denir. Apoenzim ve koenzim birlikte holoenzim olarak adlandırılır. Enzimin hangi substrat ile çalışacağını belirleyen kısım apoenzimdir. Enzimlerle katalize edilen kimyasal moleküllere substrat adı verilir. Enzimler özgül moleküllerdir. Bir enzim sadece kendi aktif bölgesinin üç boyutlu yapısına uygun substrat ile tepkimeye girebilir. Enzimler yapılarında bir veya daha fazla

aktif bölgeye sahiptirler. Bu bölgeler belirli substratlar için spesifiktirler. Reaksiyonu katalizleyerek belirli bir ürüne dönüştürürler (Şekil 2.17) .

Enzimle katalizlenmiş bir tepkimenin ayırt edici özelliği tepkimenin enzim üzerinde bulunan ve aktif bölge olarak adlandırılan kısmın içerisinde gerçekleşmesidir. Basit bir enzimatik reaksiyon şu şekilde yazılabilir:



Burada E enzimi, S substratı, P ürünü temsil etmektedir; ES enzim-substrat kompleksi, EP enzim-ürün kompleksidir. Enzim-substrat kompleksi, enzim etkisi için temeldir.

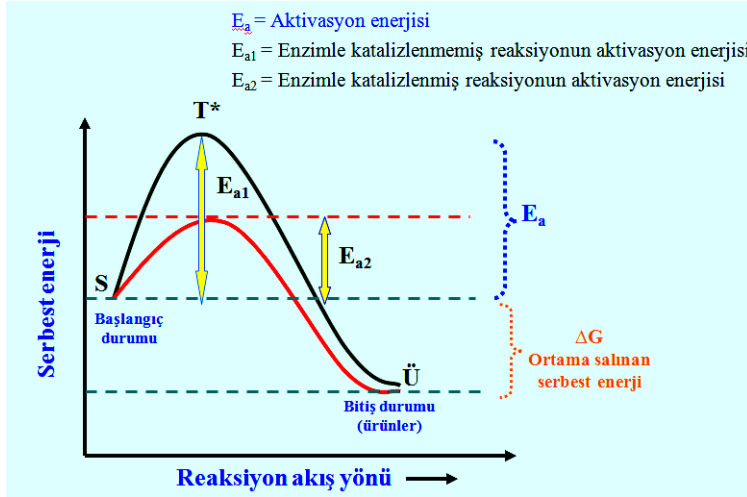


Şekil 2.17. Enzimin substrat ile etkileşimi

Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Enzimlerle katalize edilen ve tepkimeye katılan kimyasal moleküllere substrat adı verilir. Bir enzim sadece kendi aktif bölgesinin üç boyutlu yapısına uygun substrat ile tepkimeye girebilir. Bu yüzden her enzim sadece belirli tip substrata etki eder.

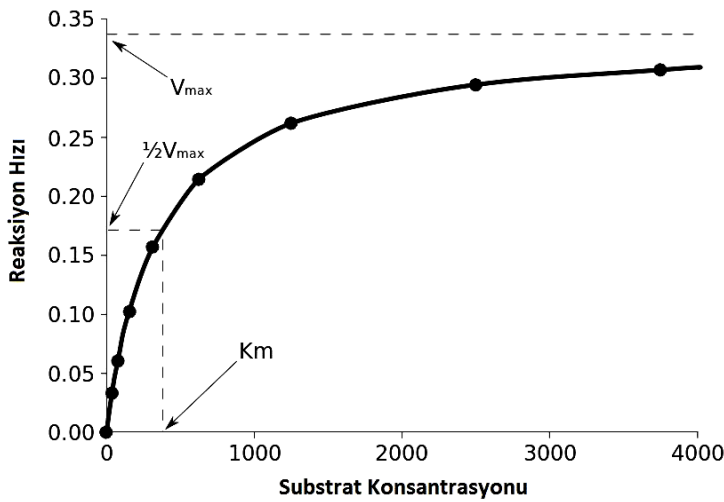
Enzimler kolaylıkla denatürasyona uğrar. Denatürasyon, proteinlerin doğal yapılarının bozulması sonucunda aktivitelerinin kaybolmasıdır. Enzim denatüre olduğunda aktif bölgesi de denatürasyona uğrayarak substratını bağlayamaz, bundan dolayı da etkili olamaz. Enzimler protein yapısında biyolojik katalizörlerdir. Reaksiyon hızını arttırırlar. Enzimlerin kimyasal reaksiyon hızını artırma nedenleri substratlarına spesifik olarak bağlanarak, substratın ürüne dönüşmesi için gerekli reaksiyonda aktivasyon enerjisini (E_a)

düşürmesinden kaynaklanır. Böylece enzim ve substratı, tranzisyon enerjisi daha düşük olan yeni bir reaksiyon yolu oluşturur (Şekil 2.18). Diğer katalizörlerle kıyaslandığında reaksiyon hızını 10^3 - 10^{11} kat, katalizlenmemiş reaksiyonlara oranla ise 10^8 - 10^{20} kat artırır.



Şekil 2.18. Serbest enerji-reaksiyon akış yönü grafiği

Enzimle katalizlenen reaksiyonlarda substrat konsantrasyonu yüksek miktarlarda ise, reaksiyonun başlangıç hızı (V_i), enzim konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Enzimle katalizlenen bir reaksiyonun hızı (V), ortamda enzim konsantrasyonunun sabit olması koşuluyla, substrat konsantrasyonu ile $[S]$ birlikte hızla artar ve maksimum hız (V_{max}) değerine ulaşmaya kadar artış devam eder. V_{max} değerine ulaştıktan sonra substrat konsantrasyonu ne kadar artarsa artsın, reaksiyon hızı artmaz (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. Reaksiyon hızı-substrat derişimi grafiği

Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

- ✓ Enzim konsantrasyonu,
- ✓ Substrat konsantrasyonu,
- ✓ Sıcaklık,
- ✓ pH,
- ✓ İnhibitör etkisi
- ✓ Reaksiyon ürünü şeklinde sıralanır.

Michaelis-Menten Denklemi

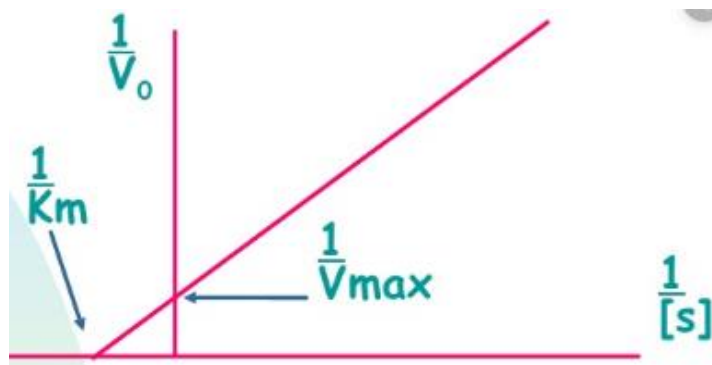
Michaelis-Menten denklemi reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile nasıl değiştiğini gösterir. K_m ; her enzim ve substrata özeldir ve o enzimin substrata ilgisini gösterir. Reaksiyon hızının $1/2V_{max}$ 'a eşit olduğu substrat konsantrasyonu değerine eşittir. K_m küçük ise enzimin ilgisi fazla, K_m büyük ise ilgi azdır.



Lineweaver-Burke grafiği

$$1/v_o = \frac{1 / v_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

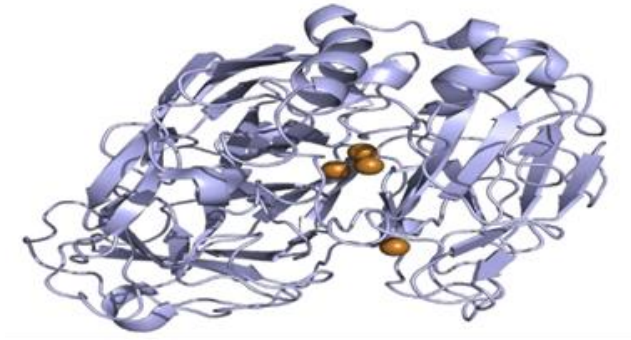
$1/V_0$, $1/[S]$ ye karşı reaksiyon hızı grafiğidir ve michaelis- menten grafiğindeki hiperbolik eğri yerine düz bir eğri elde edilir (Şekil 2.20) .



Şekil 2.20. Lineweaver-Burke grafiği

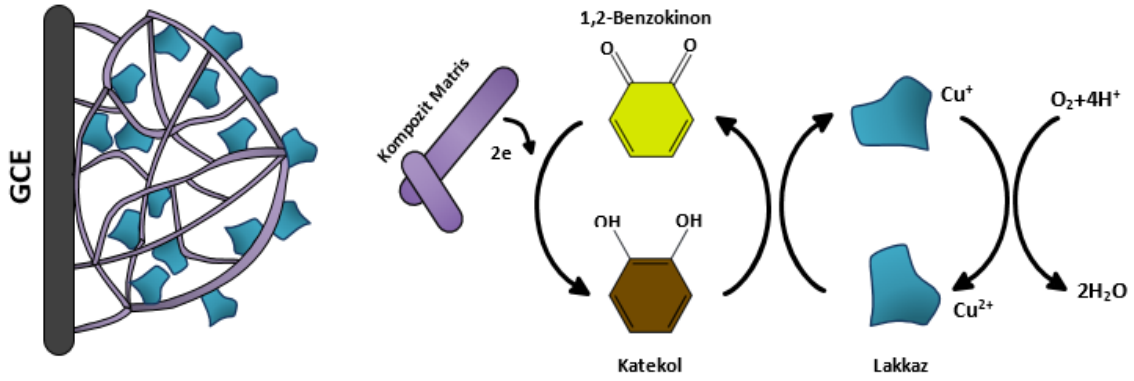
2.8.1. Lakkaz enzimi

Lakkaz(benzenediol: oksijenoksidoredüktaz; EC 1.10.3.2); polifenol oksidaz (PPO) sınıfına dâhil bir enzim olup aktif merkezinde birden fazla bakır içeren mavi proteinlerdir. Lakkaz enzimi şeftali, tütün, kavak gibi bitkilerde, mantarlarda ve bazı bakteri türlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu mavi enzimler dört bakır atom çekirdeğine sahiptir (Şekil 2.21). Bu bakır atom çekirdekleri redoks reaksiyonuna yardımcı olur.

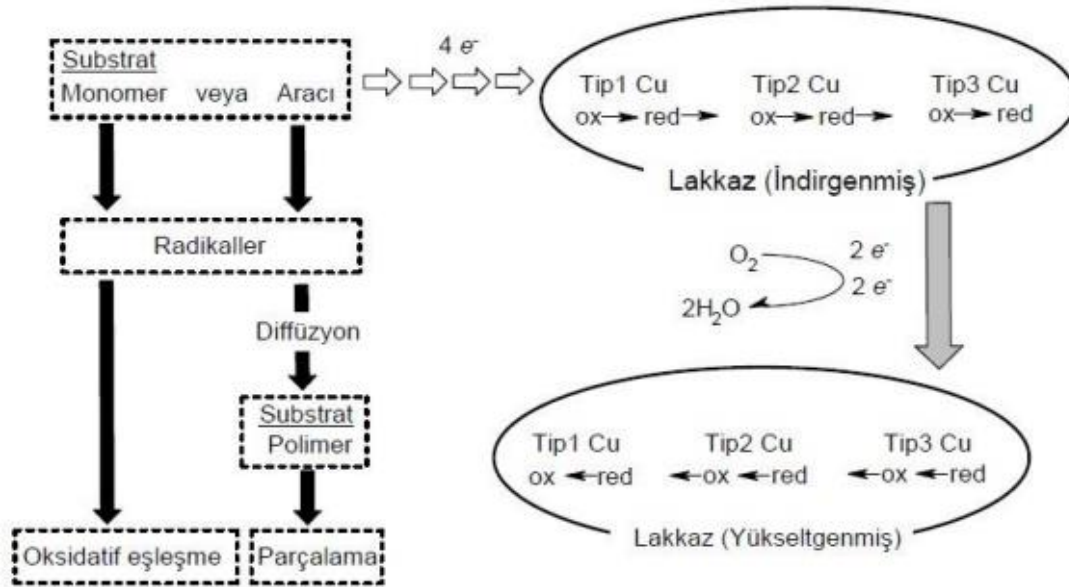


Şekil 2.21. Lakkaz enziminin yapısı

İlk olarak Yoshida tarafından 1883 yılında Japonya'daki *Rhus vericifera* vernik ağacında keşfedilen polifenol oksidazlar grubuna ait 3 enzim sınıfı bulunmaktadır: 1- Katekol oksidaz (E.C 1.10.3.1; o-difenol oksijen redüktaz), 2- Kresolaz (E.C 1.14.18.1; monofenol monooksijenaz) ve 3- Lakkaz (E.C 1.10.3.2; p-difenol: oksijen oksidoredüktaz).Çoklu bakır içeren enzimler arasında yer alan lakkaz, substratları okside ederken moleküler oksijenden faydalanmaktadır. Lakkaz enzimleri, hem fenolik hem de fenolik-olmayan ligninle ilişkili bileşikleri okside edebildiği gibi biyolojik yıkıma dirençli olan çevre kirleticilerini de oksitleyebilmektedirler. Lakkazlar onlarca biyoteknolojik uygulamaların çekiciliğinin temel nedeni olan olağanüstü bir doğal substrat aralığı sergilerler [53]. Lakkazlar, yapılarında bulundurdıkları kofaktör bakırlar yardımıyla para-, meta- ve or-difenoller, aromatik aminler gibi aromatik bileşikler, tiyoller ve iyot gibi inorganik bileşikler oksitleyebilirler. Aromatik veya aromatik olmayan substratlardan koparmış olduğu elektronları moleküler oksijene aktarır ve oksijen molekülünü indirgeyerek suya dönüşmesini sağlar (Şekil 2.22), (Şekil 2.23) [38, 54].



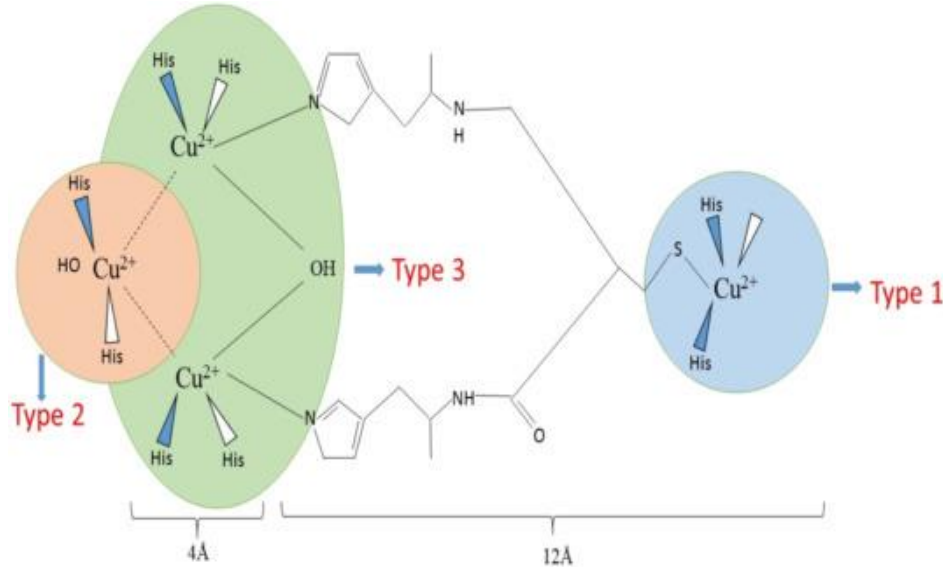
Şekil 2.22. Lakkaz enziminin katekol ile ilişkisi



Şekil 2.23. Lakkazın kataliz şeması [55].

Lakkazın yapısında bulunan bakır atomları Tip 1, Tip 2 ve Tip 3 olmak üzere gruplanmışlardır (Şekil 2.24). Tip 1 bölgesine bağlı olan bakır mavi bakır olarak adlandırılmaktadır. Tip 1 bakır atomunun 7 bulunduğu bölge mononükleer bölge, Tip 2 ve Tip 3 bakır atomlarının bulunduğu bölge ise trinükleer küme olarak adlandırılır. Mononükleer bölgede substratın oksidasyonu gerçekleşirken, trinükleer bölgede moleküler oksijenin suya indirgenmesi gerçekleşir. Ortamda bulunan moleküler oksijen suyla birlikte enzime trinükleer bölgedeki bakırlardan bağlanır. Tip 1 bölgesindeki bakır ise substrattan koparmış olduğu elektronla indirgenir ve substratı oksitler. Ortamdaki bir proton koparılan

elektrona birlikte indirgenme bölgesinde bağlı halde bulunan OH grubuna aktarılır. Enzimin farklı bir substrattan tekrar elektron almasıyla tekrarlanan işlem sonucunda moleküler oksijen su olarak ayrılır [54].



Şekil 2.24. Aktif lakkaz merkezinin şematik diyagramı [56].

Lakkaz enzimlerinin önemli bir özelliği ise protein kısma kovalent olarak bağlanmış olan ve proteinin toplam kütesinin %10-45'ini oluşturan bir karbonhidrat kısmının da bulunmasıdır. Karbonhidrat kısım enzimin yüksek kararlılık göstermesine katkıda bulunur. Lakkaz enzimlerinin aktiviteleri pH bağımlıdır ve yüksek sıcaklıklarda dahi etkinlik gösterirler.

2.8.2. Lakkaz enziminin uygulama alanları

Lakkaz enzimi oldukça geniş çeşitlilikteki substratları oksitleyebilme özelliğinden ve aktivitesini göstermedeki basitliği sebebiyle biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda tercih sebebi haline getirmiştir.

Lakkaz enziminin biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalardaki kullanımı;

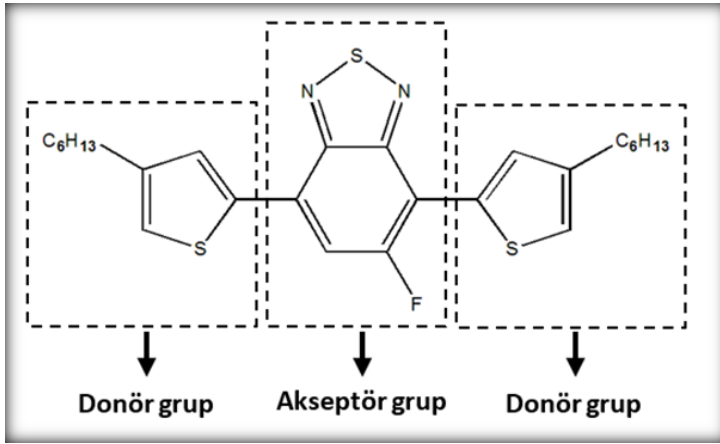
- Kâğıt endüstrisinde ağartma,
- Tekstil boyalarının renk giderimleri,
- Tekstil ve petrokimya endüstrisindeki uygulamalardan ileri gelen atık suların detoksifikasyonu,

- Meyve sularında, biralarda ve şaraplarda kararmaya, puslanmaya ve bulanıklığa yol açan istenmeyen fenolik bileşiklerin giderilmesi,
- Hamurun karışma özelliklerini ve hamur ürününün yapısal özelliklerini iyileştirmek amacıyla fırıncılıkta,
- Çeşitli fenolik bileşiklerin oksijenin veya azidlerin belirlenmesi amacıyla çeşitli biyosensörlerin yapılmasında,
- Anti kanser ilaçlarının etken maddelerinin sentezlerini katalizlemede,
- Kozmetik ürünlerde katkı maddesi olarak kullanılması, şeklinde sıralanabilir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bölüm A - Deneysel

Bu çalışmada donör ve akseptör fonksiyonel grupları aynı molekül içinde bulunduran 5-floro-4,7-bis(4-hekziltiyofen-2 il)benzo[c][1,2,5]triyadirazol (DTFBT) monomerinin dönüşümlü voltametri yöntemi ile sentezlenen polimerin elektrokimyasal ve spektroeletrokimyasal çalışmaları yapılmıştır. Şekil 3.1’de DTFBT monomerinin yapısı verilmiştir.



Şekil 3.1. DTFBT monomeri

3.1.1. Kullanılan malzemeler

İndiyumkalayoksit elektrot (ITO) (Delta Technologies), platin tel elektrot (Pt) (Aldrich), gümüş tel elektrot (Ag) (Aldrich), sodyum perklorat (NaClO_4) (Aldrich), lityum perklorat (LiClO_4) (Aldrich), diklorometan (DCM) (Aldrich),aseton (pure) (Aldrich), acetonitrile (ACN) fromMerck (Darmstadt, Germany).

Yukarıda adları verilen tüm kimyasallar ticari kaynaklardan satın alınmış ve temin edildikleri şekilde doğrudan kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Elektrokimyasal çalışmalar üç elektrotlu sistemde Gamry Reference 600 Potentiostat/Galvanostat ve Solartron 1285 potensiyostatı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu sistemde ITO kaplı cam çalışma elektrodu olarak, platin (Pt) tel karşıt elektrot olarak ve

gümüş (Ag) tel ise referans elektrot olarak kullanılmıştır. Varian Cary 5000 UV-Vis-NIR spektrofotometresi kullanılarak polimerin spektroeletrokimyasal çalışmaları yapılmıştır. Kolorimetrik analizler Conica Minolta CS-100 kolorimetresi kullanılarak yapılmıştır.

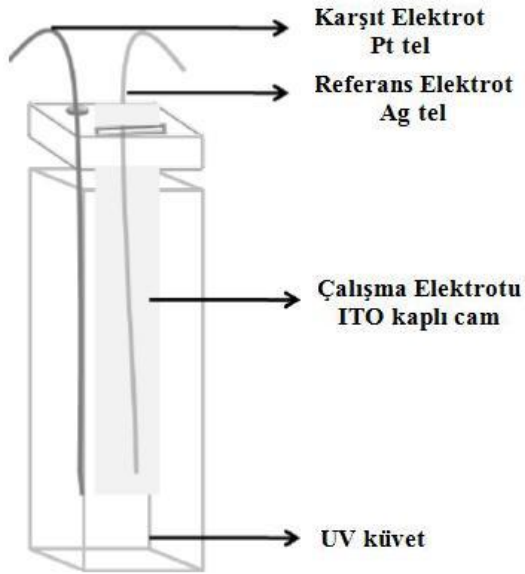
3.1.3. Kullanılan Yöntemler

Dönüşümlü voltametri (CV)

Dönüşümlü voltametri (CV), monomerlerin elektroaktivitesinin analizi, polimerlerin yükseltgenme-indirgenme pik potansiyelleri ve polimerizasyon ortamında bulunan diğer elektroaktif türlerin elektrokimyasal davranışlarını incelemeye kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde elektrota uygulanan potansiyel doğrusal şekilde arttırılır ve potansiyel tarama süresince potansiyostat, uygulanan potansiyel sonucu oluşan akımı ölçer. Elde edilen potansiyel-akım eğrisi voltamogram olarak adlandırılır. Potansiyel, çalışma ve referans elektrotları arasına uygulanır, çalışma ve karşıt elektrotları arasından geçen akım ölçülür.

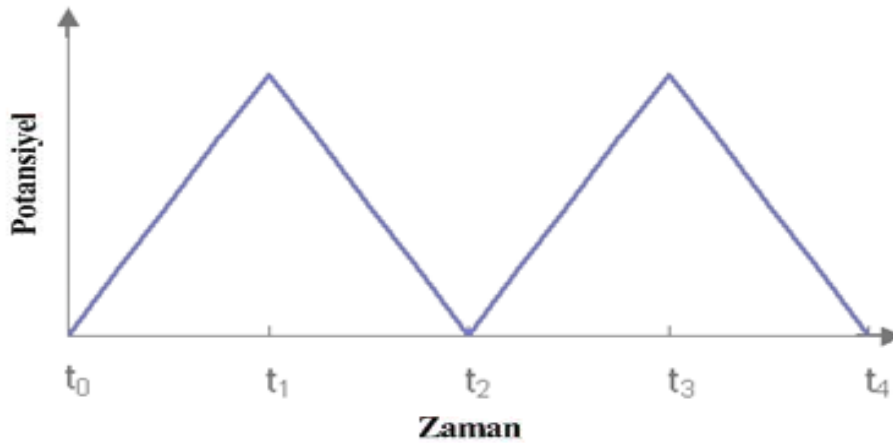
Bu metot tarama hızı, çözelti bileşimi, pH, sıcaklık gibi değişen deney şartlarında elektrot yüzeyine kaplanan filmin elektrokimyasal davranışlarının anlaşılmasını sağlar. Dönüşümlü voltamogramların incelenmesiyle; sistemin elektrokimyasal açıdan tersinir olup olmadığı, polimerin yüzeye tutunup tutunmadığı, redoks tepkimesi sonucu oluşan ürünün kararlı olup olmadığı, uygulanan gerilime bağlı olarak sistemin kaç adımda indirgenip yükseltgendiğini anlamak mümkündür.

Dönüşümlü voltametri tekniği üç elektrotlu elektrokimyasal hücrede gerçekleştirilmektedir. Potansiyeli zamanla değişen çalışma elektrodu olarak, civa, platin, altın, ITO, karbon elektrot yaygın olarak kullanılmaktadır. Potansiyeli deney süresince sabit kalan referans elektrot genellikle Ag/AgCl veya doymuş kalomel elektrot kullanılmaktadır. Elektrot sistemindeki üçüncü elektrot ise karşıt elektrottur. Karşıt elektrot olarak ise genellikle Pt tel kullanılır (Şekil 3.2).



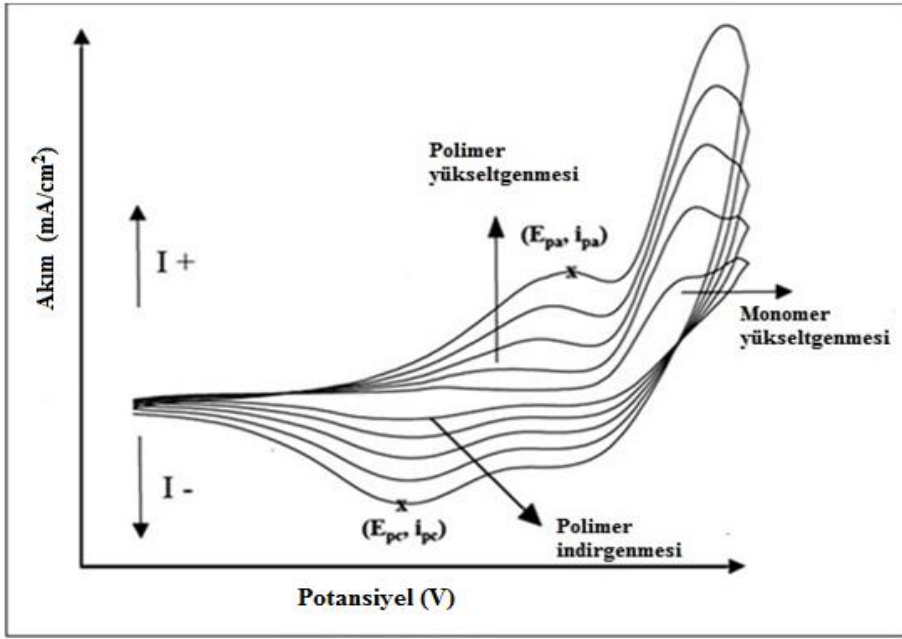
Şekil 3.2. Üç elektrotlu elektrokimyasal hücre

CV tekniği, şekil 3.3’de verildiği gibi üçgen dalga biçimi kullanarak sabit bir çalışma elektrodunun potansiyelini doğrusal olarak tarar ve aynı tarama hızıyla başlangıç noktasına kadar tarama yapılır.

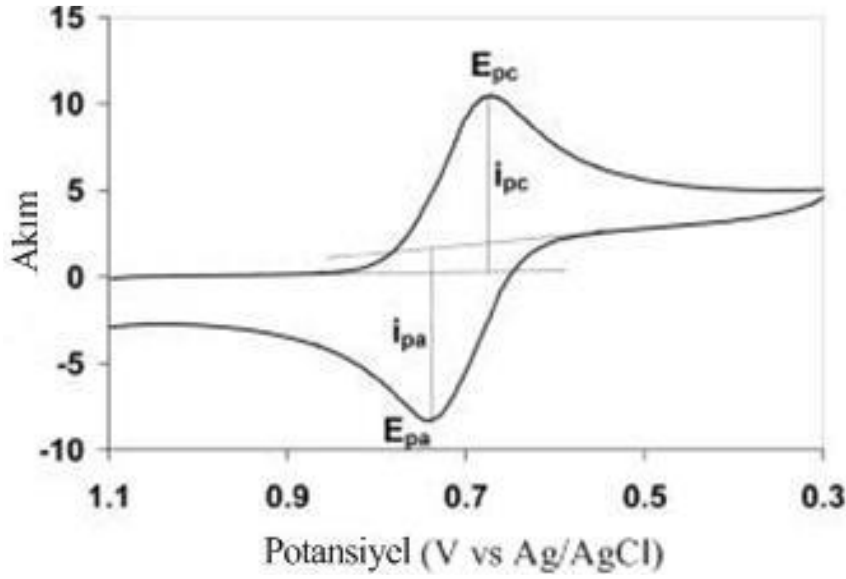


Şekil 3.3. Dönüşümlü voltametri yönteminde uygulanan potansiyelin zamanla değişimi

Dönüşümlü voltametri yönteminde, potansiyel taraması bir başlangıç potansiyeli (E ve farklı bir diğer potansiyel arasında yapılır ve diğer potansiyeline ulaştıktan sonra aynı tarama hızıyla ilk tarama yönüne ters yönde tarama yapılır. Potansiyel başlangıç potansiyelinde sonuçlanabileceği gibi farklı bir potansiyele de gidebilir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Elektropolimerizasyon sırasında alınan dönüşümlü voltamogram



Şekil 3.5. Tekli potansiyel döngüsü sırasında tersinir redoks işlemi için elde edilen dönüşümlü voltamogram

Çalışma elektrodu üzerinde maddelerin yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma anodik akım (i_{pa}), indirgenmeden dolayı oluşan akıma ise katodik akım (i_{pc}) denir (Şekil 3.5). Tersinir bir elektrot reaksiyonunun pik akımı 25°C sıcaklıkta Randles-Sevcik eşitliği ile gösterilir.

$$I_{pik} = (2,69.105) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2}$$

Bu eşitlikteki terimlerin anlamları aşağıdaki gibidir;

I_{pik} = P_{ik} akımı (A)

n = Reaksiyonda transfer edilen elektron sayısı

A = Elektrot alanı (cm^2)

C = Çözelti konantrasyonu (mol/cm^3)

D = Difüzyon katsayısı (cm^2/s)

V = Tarama hızı (mV/s)

Potansiyel taraması sırasında çözelti içindeki monomer önce radikal katyonlara yükseltgenir. Sonra bu radikal katyonlar kimyasal birleşme yoluyla sırasıyla dimer ve oligomerler oluşturur. Zincir uzandıkça polimer, elektrolit çözeltisinde çözünmeyen bir film şeklinde elektrot yüzeyine kaplanır. Dönüşümlü voltametrde deneyler bir destek elektrolit-çözücü sisteminde yapılır. Çözücünün ve destek elektrolitin safsızlık içermemesi önemlidir. Monomer seçilecek olan çözücüde iyi çözünmelidir. Çözücü elektrokimyasal ve kimyasal olarak inert olmalıdır.

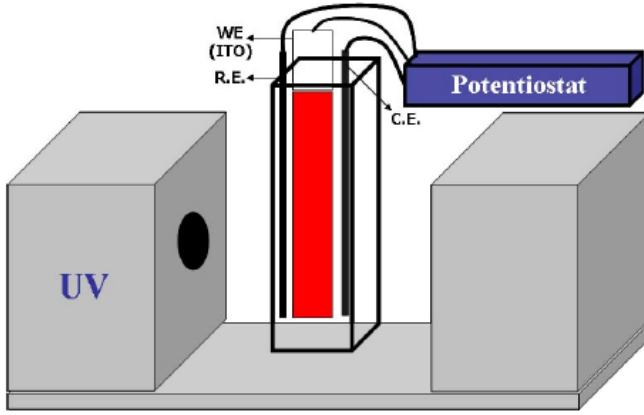
Çözücü olarak genellikle asetonitril, diklorometan, dimetilformamid ve dimetilsülfoksit kullanılır. Destek elektrolit olarak ise genellikle tetrabutilamonyum tetrafloroborat, tetrabutilamonyum perklorat, lityum klorür, sodyum klorür kullanılmaktadır.

Spektroelektrokimya

Spektroskopî, bir örnekteki atom, iyon, moleküllerin bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve değerlendirilmesidir. Spektroelektrokimya eş zamanlı olarak yapılan elektrokimyasal ve spektroskopik tekniklerin birleşmesidir. İletken polimerlerde elektronik geçişleri gözlemlmek için UV-Vis-NIR spektroskopisi kullanılır. İletken polimerlerin redoks geçişleri sırasında, absorbansda meydana gelen değişiklikler konjuge polimerleri birçok uygulama alanlarında (akıllı camlar, dikiz aynaları) önemli hale getirmektedir.

Spektroelektrokimyasal çalışmalar sırasında çalışma elektrodu olarak ITO elektrot üzerine kaplanmış polimer filmi, referans elektrot olarak Ag tel ve karşıt elektrot olarak Pt tel

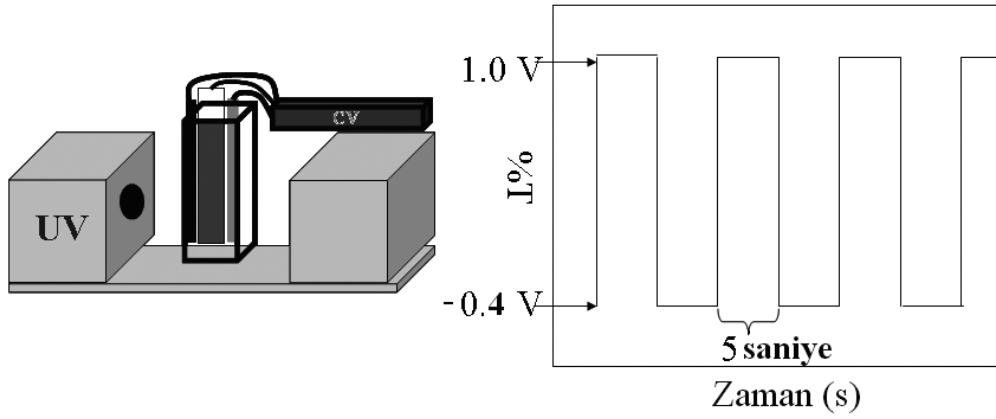
kullanılmıştır (Şekil 3.6). Sabit potansiyeller uygulanarak ITO kaplı cam yüzeyine kaplanan polimer filmin optik özelliklerindeki değişim incelenmiştir. Böylece konjuge polimerin bant aralığı (E_g), λ_{max} , polaron ve bipolaron bantlarında potansiyele bağlı olarak meydana gelen değişimler belirlenmiştir.



Şekil 3.6. Spektroelektrokimyasal deney düzeneği

Optik kontrast ve tepki zamanı

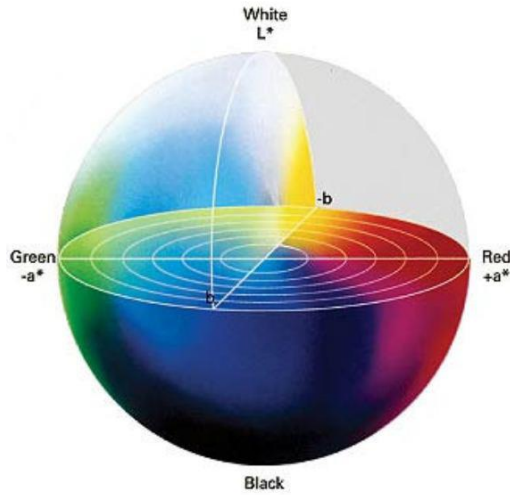
Elektrokromik polimerlerin en önemli özelliklerden biri de optik geçirkenlik ve keskin renk değişimidir. Ayrıca hızlı tepki zamanında elektrokromik bir polimer için çok önemlidir. Optik zıtlık, UV-Vis spektrumundan belirlenen dalga boyunda elektrokromik malzemeye yükseltgenme ve indirgenme potansiyeli uygulandığında sahip olduğu renkler arasındaki kontrast farkıdır ve $\% \Delta T$ olarak ifade edilir (Şekil 3.7). Polimerin iki renk arasındaki dönüşüm süresi (tepki zamanı) elektrodun iyon iletkenliği, uygulanan potansiyel, filmin kalınlığı ve morfolojisine bağlı olarak değişir.



Şekil 3.7. Optik kontrast ve tepki zamanının belirlenmesi için kullanılan deney düzeneği

Kolorimetri

Farklı renklere ve renk tonlarına sahip olan elektrokromik malzemelerin renklerini doğru şekilde ifade edebilmek için renkleri sayısal değerlerle nitelendiren bir renk sistemi kullanılmaktadır. Bu amaç için renkler, üç boyutlu uzayda koordinatlar verilerek tanımlayan kolorimetre cihazı kullanılmaktadır. Bu cihaz ile her renk ölçülen değerlere göre CIE 1931 Lab renk uzayında konumlandırılır (Şekil 3.8).

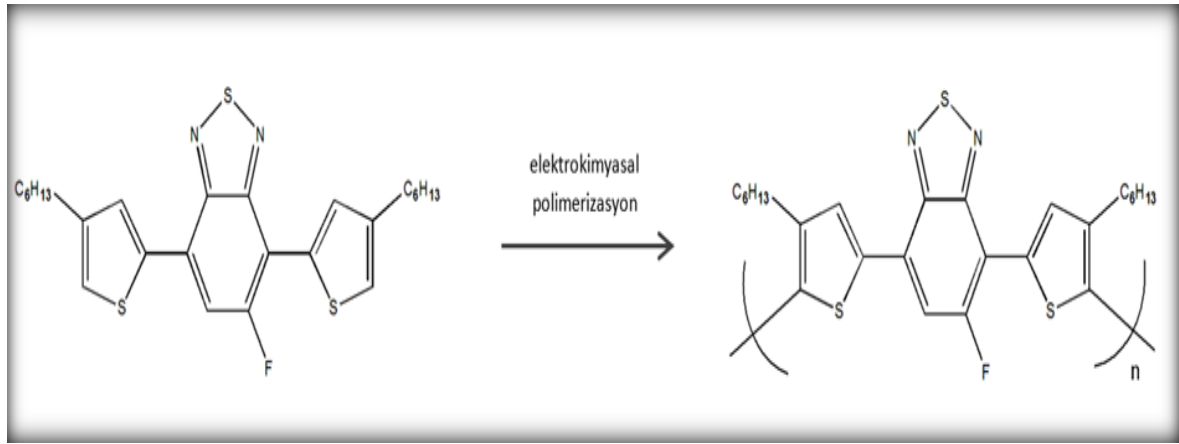


Şekil 3.8. CIE Lab renk uzayı

CIE Lab renk uzayında x , y ve z eksenleri sırasıyla renk büyüklüğü (a), yoğunluk (b) ve parlaklığa (L) karşılık gelen Y , x , y değerlerini kaydediyor. Parlaklık rengin ışıklılığını, renk tonu dalga boyunun maksimum olduğu yeri, doygunluk ise rengin yoğunluğunu ifade eder. Y , x , y değerleri bilgisayar programında L , a , b değerlerine çevrilerek verilebilir.

3.1.4. Elektrokimyasal polimerizasyon

Elektrokimyasal çalışmalarda üç elektrotlu sistem kullanılmıştır. Çalışma elektrotu olarak ITO kaplı cam elektrot, karşı elektrot olarak platin (Pt) tel ve referans elektrot olarak gümüş (Ag) tel kullanılmıştır. Monomerin elektrokimyasal polimerizasyonu 1×10^{-3} M monomer içeren 0,1 mL DCM/ 1,9 mL LiClO₄/NaClO₄/ACN destek elektrolit-çözücü karışımında polimerleştirilmiştir. Dönüşümlü voltametri tekniği ile polimerizasyon 0,0 V ile 1,3 V arasında 100 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.9. DTFBT monomerinin elektrokimyasal polimerizasyonu

3.2. Bölüm B - Deneysel

3.2.1. Kullanılan malzemeler

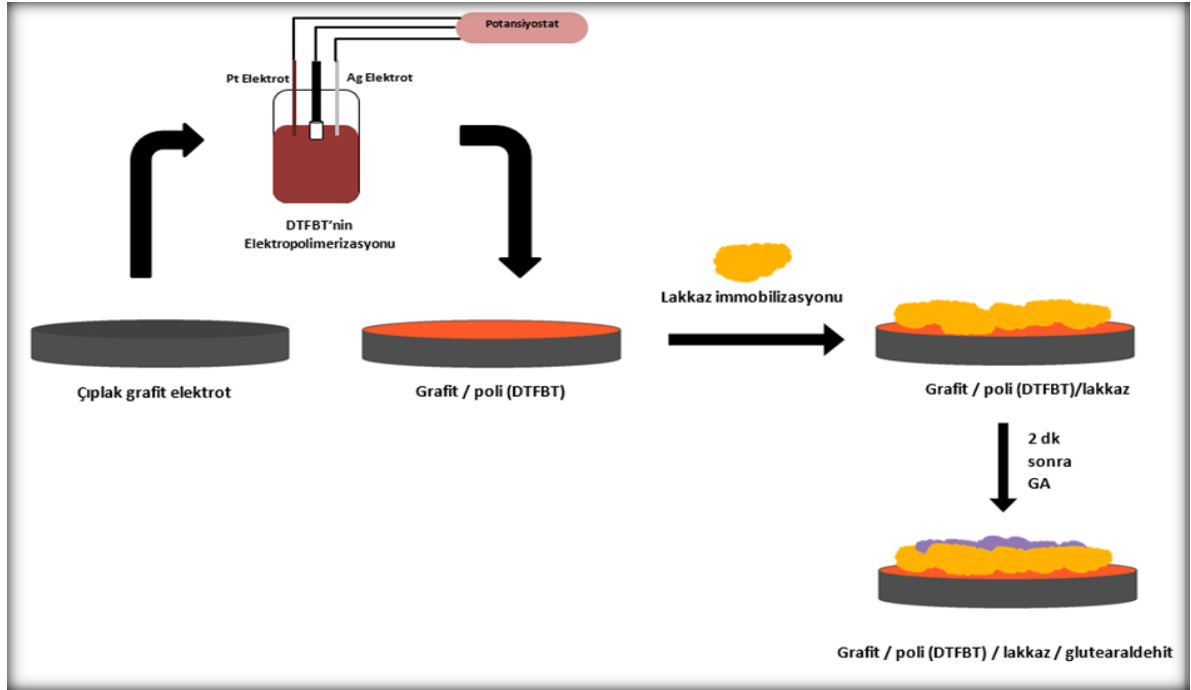
Lakkaz (oksijen oksidoredüktaz; EC 1.10.3.2, Trametes versicolor (21,8 U/mg katı), pyrokatekol(1,2-benzendiol), glutearaldehit (GA), NaClO₄, LiClO₄ Sigma-Aldrich firmasından satın alınarak saflaştırılmadan kullanılmıştır. Asetonitril (ACN) ve diklorometan (DCM) Merck (Darmstadt, Germany) firmasından satın alınmıştır. Enzim immobilizasyonu için 0,025 M sodyumbifosfat (Na₂HPO₄) (Fisher Scientific Company), sodyum fosfat (NaH₂PO₄) (Fisher Scientific Company) kullanılarak fosfat tampon çözeltisi (pH 7,0) hazırlanmıştır. pH 5,5 tampon çözeltisi hazırlamak için ise sodyum asetat (NaOAc) (Fisher Scientific Company) kullanılmıştır. Lakkaz çözeltisi 0,3 mg lakkazın 15 µL 50 mM pH 7,0 fosfat tampon çözeltisinde çözünmesiyle hazırlanmıştır.

3.2.2. Kullanılan cihazlar

Amperometrik ölçümler için, Palmsens potansiyostat (EmStat 3,Hollanda) kullanılmıştır. Elektrokimyasal çalışmalar üç elektrotlu sistemde Gamry Reference 600 Potentiostat/Galvanostat ve Solartron 1285 potansiyostatı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Polimer filminin immobilizasyon öncesi ve sonrası yüzey morfolojisi taralamalı elektron mikroskobu (SEM) (JEOL JSM-6400 model) tekniği ile incelenmiştir. pH-metre (Jenco, model:6173, Çin), distile su cihazları (Fistream, İngiltere ve Milli-Q Milipore, ABD)'dır.

3.2.3. Biyosensörlerinin hazırlanması

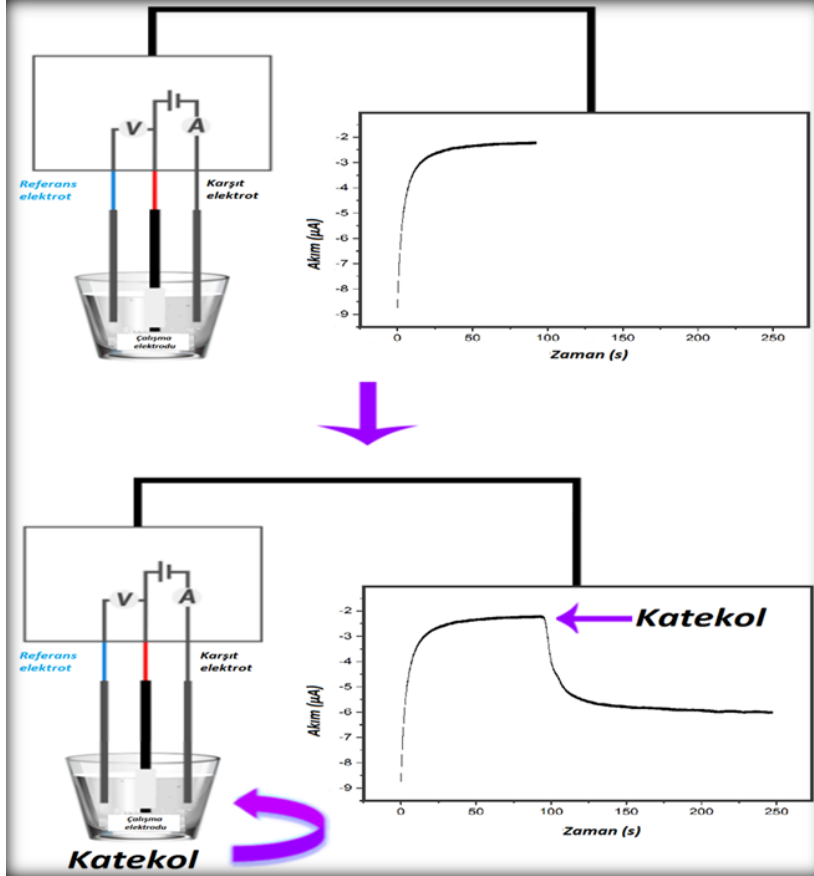
Lakkaz enzimiyle biyosensör hazırlanmasında aşağıdaki prosedür izlenmiştir. Öncelikle grafit elektrot yüzeyi üç farklı yapıdaki zımpara kağıdı ile pürüzsüzleştirilmiş ve parlatılmıştır. 1×10^{-3} M monomer içeren 0,1 M LiClO_4 / NaClO_4 / DCM/ACN (5:95, v/v) destek elektrolit çözeltisi elektropolimerizasyon sırasında kullanılmıştır. Grafit elektrot hazırlanan çözeltide dönüşümlü voltametri tekniği ile 0,0 V ile 1,3 V arasında 100 mV/s tarama hızında 40 döngü ile polimer filmi ile kaplanmıştır. Immobilizasyon öncesinde elektrot saf su yıkanmıştır. Lakkaz enzimi gluteraldehit kullanılarak iletken polimer üzerine immobilize edildi. 5 μL lakkaz çözeltisi (0,3 mg lakkaz, 15 μL 50 mM pH 7,0 PBS tampon çözeltisi) polimer kaplı grafit elektrot yüzeyine eklenmiş ve 2 dakika sonra 5 μL %1'lik glutearaldehit çözeltisi elektrot yüzeyine ilave edilmiştir. Daha sonra elektrot, oda sıcaklığında 2 saat kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.10). Kullanılmadan önce bağlanmayan enzim moleküllerini yüzeyden uzaklaştırmak için elektrot saf su ile yıkanmıştır. Substrat çözeltisi ölçüm yapılacağı gün taze olarak hazırlanmıştır.



Şekil 3.10. Lakkaz biyosensörün hazırlanması

3.2.4. Amperometrik ölçümler

Amperometrik ölçümler için, 10 ml sodyum asetat(NaOAc) (50 mM pH 5,5) tampon çözeltisi reaksiyon hücresine alınarak tüm elektrotlar (çalışma/referans/karşıtlar) yerleştirilmiştir ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak oda sıcaklığında 2 dk boyunca bekletildi. -0,3 V sabit potansiyelde izlenen çalışmada substrat ilavesi öncesinde sistemin dengeye gelmesiyle belirlenen akım değeri kaydedilmiş ve ardından substrat olarak katekol ilavesi yapılmıştır. Oluşan enzimatik reaksiyon tamamlandıktan sonra ve yeni bir denge durumuna ulaşılmıştır (Şekil 3.11). Her iki denge durumunda okunan akım değerinin farkı alınmıştır. Söz konusu farklanma, substrat konsantrasyonu ile orantılıdır. Her ölçümden sonra, reaksiyon hücresindeki tampon çözelti yenilenmiş ve elektrotlar saf su ile yıkanmıştır. Her amperometrik ölçüm en az üç kez tekrarlanmış ve ölçümlerin sonuçları bu ölçümlerin ortalaması alınarak kaydedilmiştir.



Şekil 3.11. Lakkaz biyosensörleri ile ölçüm ilkesi

3.2.5. Lakkaz biyosensörünün optimizasyonu

Kararlı, hassas, tekrar üretilebilir ve uzun ömürlü bir biyosensörün geliştirilmesi için optimizasyon çalışmaları çok önemlidir. Biyosensörün optimum koşullarının belirlenmesi amacıyla, pH, enzim miktarı, döngü sayısı gibi çeşitli parametreler incelenmiştir. Optimize edilecek parametre miktarı değiştirilmiş ve diğer parametreler sabit tutulmuştur. Bu yöntem uygulanarak farklı elektrotlar hazırlanmış ve sinyal değerleri ölçülmüştür. Biyosensörün en kararlı ve en yüksek tepkisi optimum değer olarak seçilmiştir. Tüm parametreler optimize edildikten sonra, biyosensörün en iyi kombinasyonu elde edilmiştir.

3.2.6. Elektroaktif yüzey alanının karakterizasyonu

Etkin elektroaktif yüzey alanını karakterize etmek için, döngüsel voltammetri (CV) tekniği kullanılmıştır. Bu yöntemde, gerçekleştirilen deneyler, 100 mV tarama hızı ile -0,4 ile 0,8 V arasındaki potansiyelde 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ - 0,1 M KCl ve 50,0 mM pH 5,5 NaOAc

tampon çözeltisi içeren bir çözeltide gerçekleştirilmiştir. Randles-Sevcik denklemi kullanılarak, her yüzey modifikasyonunun elektroaktif yüzey alanları hesaplanmıştır.

3.2.7. Biyosensörün analitik ve kinetik karakterizasyonu

Tüm optimizasyon çalışmalarından sonra biyosensörün analitik parametreleri hesaplanmıştır. Substrat katekol için bir kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve S / N (sinyal-gürültü oranı) kriteri kullanılarak eşit olarak eğrinin lineer aralığının sıfıra sabitlenmesiyle tespit limiti (LOD) ve hassasiyet değerleri belirlendi. Kinetik karakterizasyonlar için Michaelis-Menten enzim kinetiği modeli kullanılmıştır. Bu model, enzimatik reaksiyon hızı ile substrat konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi tanımlayan bir denklem sunar.

Bu denklem şöyledir: $v = V_{max} [S] / K_M + [S]$

V_{max} , maksimum reaksiyon hızıdır ve K_M , substratına enzim afinitesidir ve bunlar biyokimyasal reaksiyon kinetiğini karakterize etmek için kullanılan parametrelerdir. V_{max} ve K_{Mapp} değerlerini elde etmek için, Michaelis-Menten grafiğinin doğrusal formu olan Lineweaver-Burk grafiği ($1 / I - 1 / [S]$) kullanılmıştır.

3.2.8. Girişimlerin araştırılması

Bazı değişkenler, katekol tespit testlerinin doğruluğunu etkileyebilir. Bu nedenle, önerilen biyosensörün sadece katekole olan seçiciliği, 0,5 mM konsantrasyonlarına sahip üre, glikoz ve etil alkol çözeltileri ile amperometrik ölçümler yapılarak doğrulanmıştır. Hafif karıştırma altında -0,3 V sabit potansiyelde reaksiyon ortamına üre, glikoz ve etil alkol çözeltileri eklenerek ölçümler yapılmış ve biyosensörün tepkisi kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar aynı Biyosensörün katekole verdiği sinyal ile karşılaştırılmıştır.

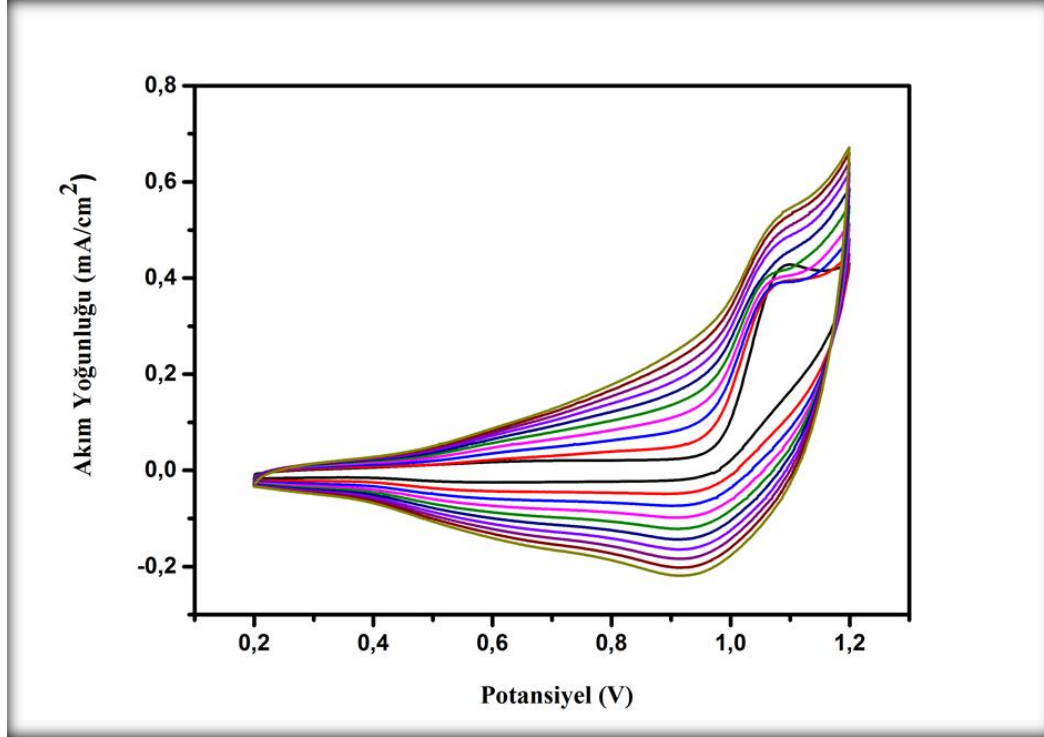
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Polimerinin Karakterizasyonu

4.1.1. Monomerinin dönüşümlü voltamogramı

Monomerinin dönüşümlü voltamogramı 0,1 M LiClO₄/NaClO₄ destek elektrolit ve 1x10⁻³ M monomer içeren çözeltide 100 mV/sn tarama hızıyla 0,0 V ile 1,3 V potansiyel aralığında alınmıştır. Çözücü olarak DCM/ACN (5:95, v/v) kullanılmıştır. Elde edilen dönüşümlü voltamogram Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Elektrokimyasal polimerizasyon sırasında çalışma elektrodu olarak ITO, karşıt elektrodu olarak Pt tel ve referans elektrot olarak Ag tel kullanılmıştır. ITO elektrot yüzeyinde polimer filminin sentezi sırasında, ilk döngü sonrası elde edilen dönüşümlü voltamogram monomere ait olan voltamogramdır.

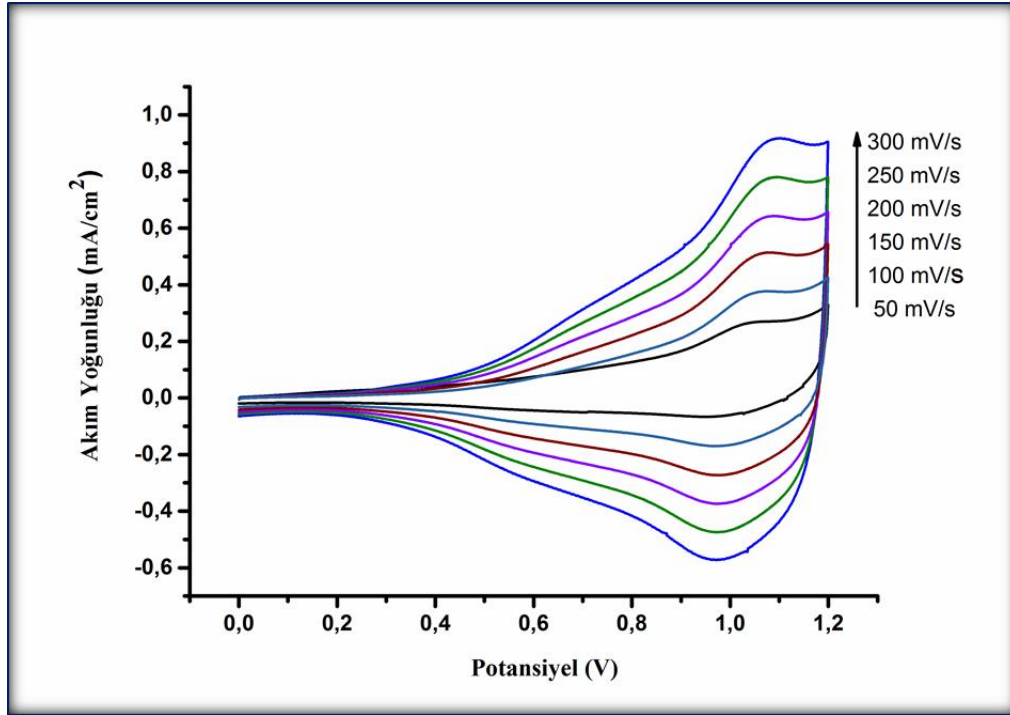
Elde edilen dönüşümlü voltamogramdan, monomerin yükseltgenme potansiyeli +1,1 V olarak tespit edilmiştir. Uygulanan potansiyel aralığında, her döngüde akım yoğunluğunda gözlenen artış, monomerin elektroaktif olduğunu ve elektrot yüzeyinde iletken polimer filminin oluştuğunu göstermektedir. Elde edilen polimerin yükseltgenme potansiyeli 1,04 V ve indirgenme potansiyeli 0,98 V olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). Alınan dönüşümlü voltamogramlar sırasında sentezlenen polimer filminin elektrokromik özelliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Polimer filmi indirgenmiş halde mor, yükseltgenmiş halde mavi renktedir.



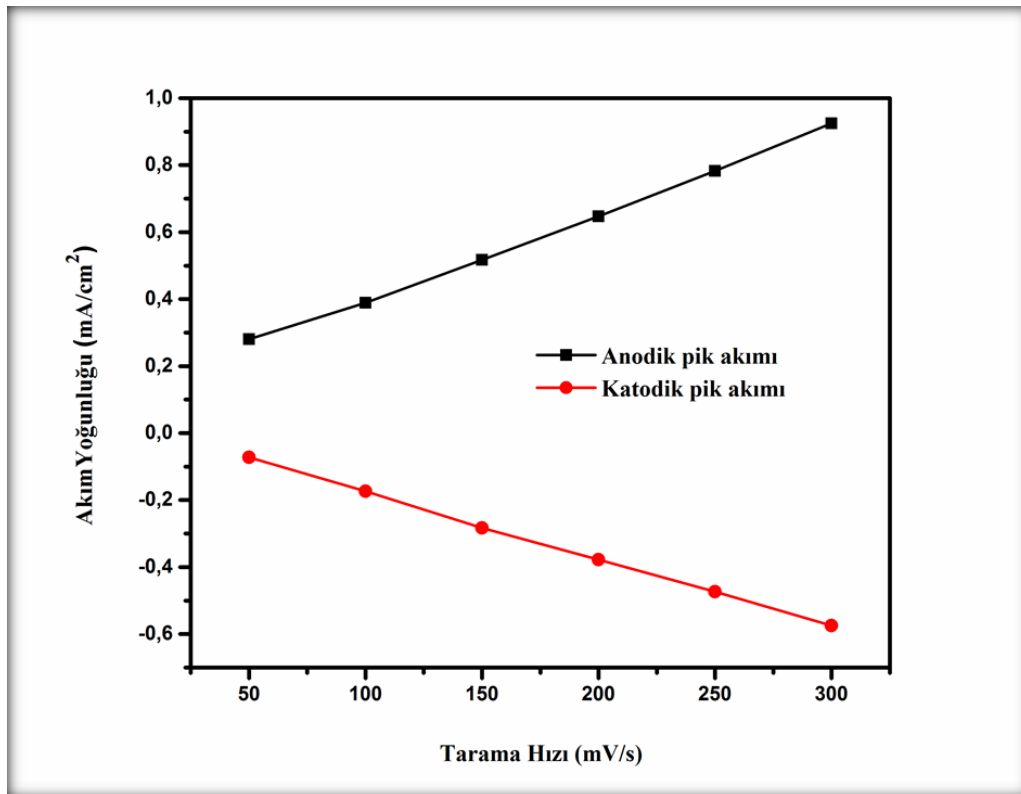
Şekil 4.1. Monomerin 0,1 M $\text{LiClO}_4/\text{NaClO}_4$ içeren DCM/ACN (5:95) çözeltisinden elde edilen dönüşümlü voltamogramı

4.1.2. Polimer filminin akım yoğunluğuna tarama hızının etkisi

Monomer elektrokimyasal olarak polimerleştirilmiş ve elde edilen polimer filminin anodik ve katodik pik akımları monomerin olmadığı elektrolit çözeltisinde farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltamogram alınarak incelenmiştir (Şekil 4.2). Modifiye edilmiş Randles – Sevcik eşitliğine göre, akım değerlerinin tarama hızlarıyla doğru orantılı olması elektrot yüzeyinde elektroaktif ve tersinir özellik gösteren polimer filminin olduğunu ve göstermektedir. Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’ de anodik ve katodik pik akımları tarama hızının bir fonksiyonu olarak doğrusallık göstermektedir. Bu sonuç elektrokimyasal sürecin difüzyonun kontrollü olmadığını ve tersinir bir reaksiyon olduğu kanıtlamaktadır.



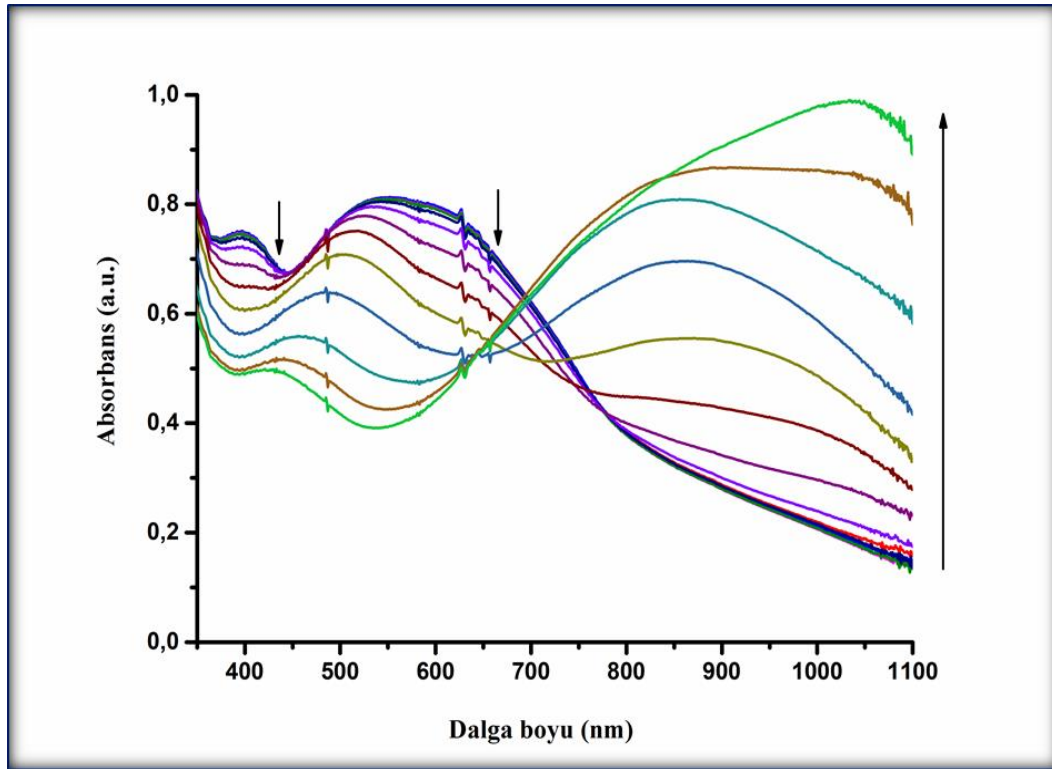
Şekil 4.2. Elektrokimyasal olarak sentezlenen polimer filminin 50, 100, 150, 200, 250, 300 mV/s tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramları



Şekil 4.3. Polimer filminin tarama hızı-akım doğrusu

4.1.3. Polimer filminin spektroeletrokimyasal analizi

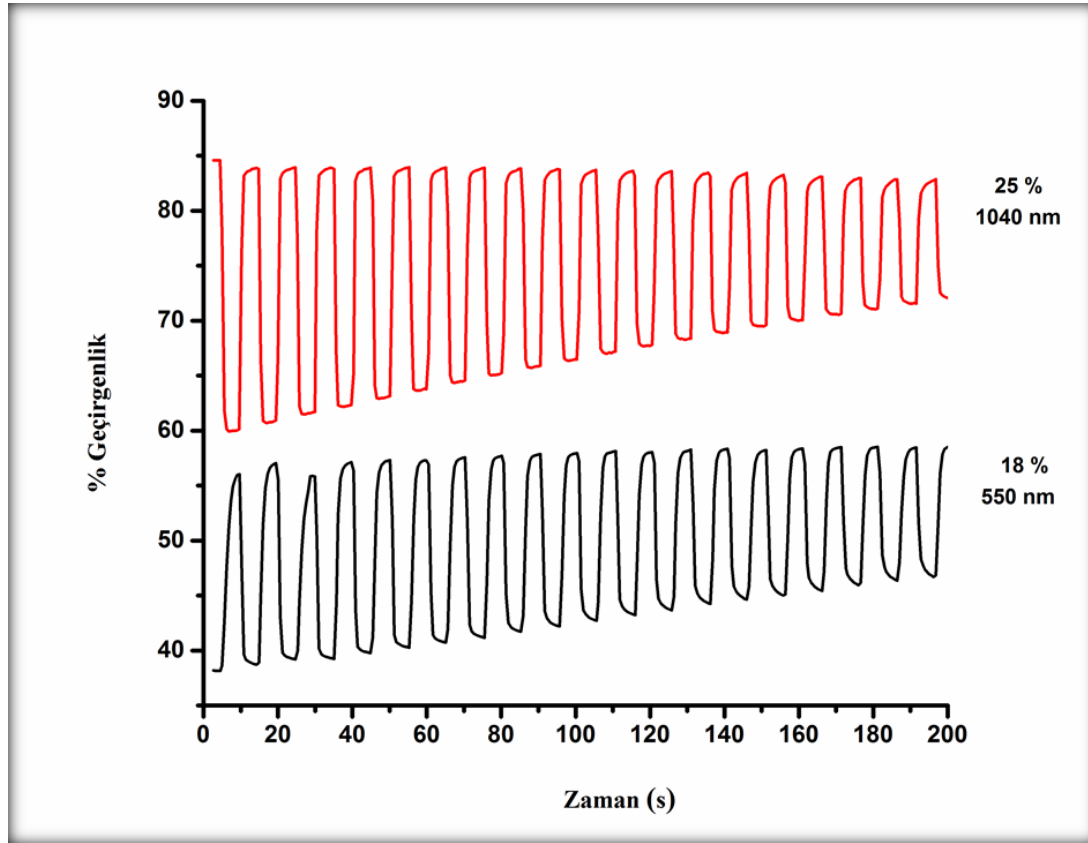
İletken polimerlerin potansiyel değişimi ile optik özelliklerini incelemenin en iyi yolu spektroeletrokimya'dır. Ayrıca bant aralığı (E_g) polimerin elektronik yapısı hakkında bilgi verir. Bu çalışmada 1×10^{-3} M monomer 0,1 M $\text{LiClO}_4/\text{NaClO}_4$ / DCM/ACN (5:95, v/v) destek elektrolit çözeltisinden dönüşümlü voltametri yöntemi ile polimer filmi sentezlenmiştir. Bu polimer filmi daha sonra monomer içermeyen destek elektrolit çözeltisine alınmış, 0,0 V ile 1,3 V aralığında potansiyeller uygulanarak eş zamanlı UV-Vis-NIR spektrumları elde edilmiştir. $\pi-\pi^*$ geçişlerine ait maksimum dalga boyları (λ_{max}) ölçülmüştür. Elde edilen spektrumdan, polimer filminin indirgenmiş haline ait $\pi-\pi^*$ geçişi 550 nm olarak belirlenmiştir. 850 nm’de polaron ve 1040 nm’de bipolaron bantlarına ait pikler gözlenmiştir. Polimer filminin $\pi-\pi^*$ geçişine ait olan 550 nm’deki pikten filmin bant aralığı enerjisi 1,3 eV olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.4. Polimer filminin 0,1 M $\text{LiClO}_4/\text{NaClO}_4$ destek elektrolit içeren ACN çözeltisinde 0,0 V ve 1,3 V arasında sabit potansiyeller uygulanarak elde edilen UV-Vis-NIR spektrumu

4.1.4. Polimer filminin kinetik analizi

Kinetik çalışmalar elektrokromik polimerin hem görünür, hem de NIR bölgesindeki optik kontrast (%T) ve dönüşüm zamanını incelemek için gerçekleştirilir. Renk dönüşüm zamanı ve optik kontrast elektrokromik polimerler için önemli özelliklerdir. Bu amaçla ITO kaplı cam elektrot üzerine kaplanmış polimer filminin spektroeletrokimyasal çalışmalardan belirlenen maksimum dalga boylarında uygulanan potansiyellerde %T değerleri elde edilir. Polimerin bu özelliklerin belirlenebilmesi için kare dalga yöntemi uygulanarak, UV-Vis-NIR spektrofotometresi ve potansiyostat cihazı birlikte kullanılmıştır. Polimere maksimum dalga boylarında indirgenme ve yükseltgenme potansiyelleri 5 saniye aralıklarla uygulanarak elde edilen %T değerleri Şekil 4.5’de verilmiştir. Polimer filmi 550 nm’de % 18 ve 1040 nm’de % 25 optik kontrast göstermiştir. Polimerin dönüşüm zamanı bu dalga boylarında sırasıyla 1,5 sn ve 1,0 sn olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2).



Şekil 4.5. Polimer filminin 0,1 M $\text{LiClO}_4/\text{NaClO}_4$ destek elektrolit içeren ACN çözeltisinde, 550 ve 1040 nm’de elde edilen % geçirgenlik–zaman grafiği

4.1.5. Polimer filminin kolorimetrik analizi

Conica Minolta CS-100 kolorometresi kullanılarak polimer filminin renk karakterizasyonu yapılmış ve L, a, b değerleri belirlenmiştir. Çizelge 4.1’de polimerin renk değiştirdiği potansiyeller ve bu potansiyellerde tespit edilen L, a, b değerleri verilmiştir. Polimer filminin 0,2 V’da mor; 1,3 V’da mavi renge sahip olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. Polimer filminin kolorimetrik analiz sonuçları

0,0 V $\longrightarrow$ 1,3 V			
			
L:40,67 a:6,46 b:-12,74	L:44,02 a:9,18 b:-5,83	L:52,39 a:6,93 b:-1,62	L:66,47 a:-9,62 b:-1,03

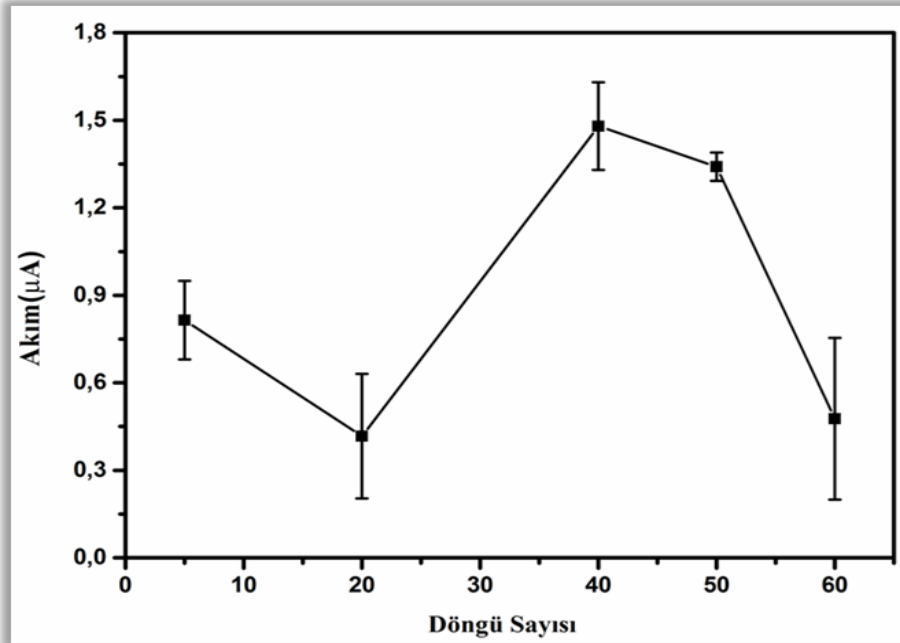
Çizelge 4.2. Polimer filminin spektroeletrokimya ve kinetik sonuçları

E_{yükseltgenme}	1,04 V
E_{indirgenme}	0,98 V
HOMO (eV)	-5,50
LUMO (eV)	-4,20
E_{gop} (eV)	1,3
λ_{max} (nm)	550 nm / 1040 nm
Optik Kontrast (% T)	%18 / %25
Tepki Zamanı	1,5 s / 1,0 s

4.2. Biyosensör Parametrelerinin Optimizasyonu

4.2.1. İletken polimer kalınlığının optimizasyonu

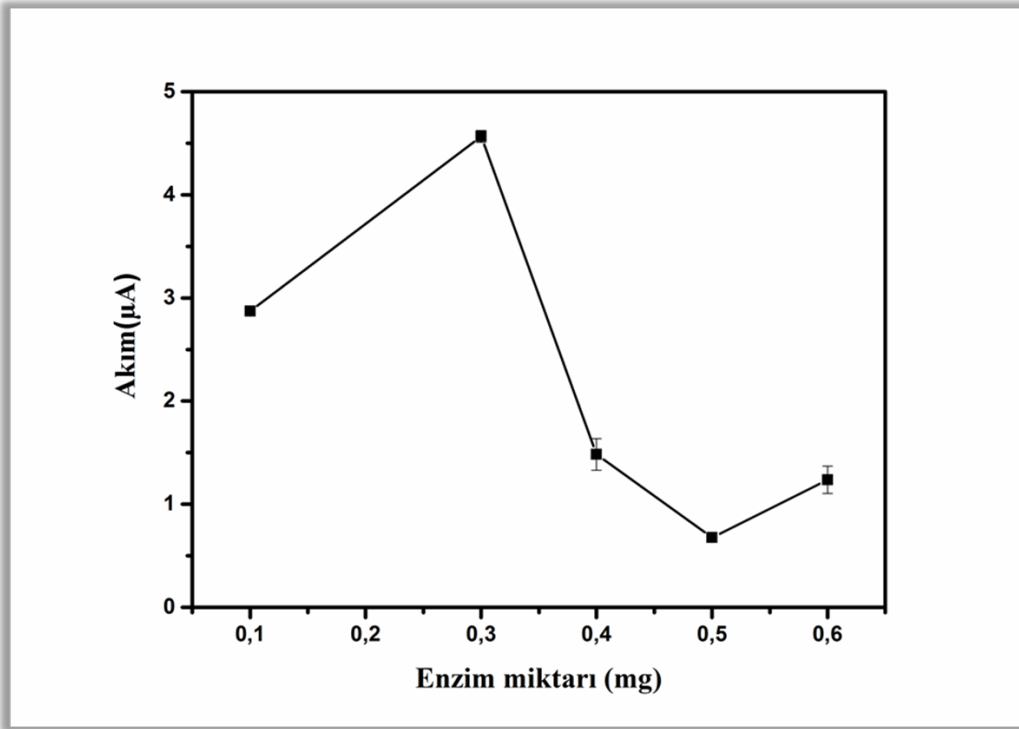
Elektrokimyasal olarak üretilen polimerler, enzim moleküllerinin üç boyutlu yapısını korumak ve enzim immobilizasyonu için iyi bir ortam sağlamak için kullanılır. Polimer filminin optimum kalınlığı biyosensör üretimi için daha iyi bir morfoloji ve film kalitesi sağlar. Polimer film kalınlığı, enzimin elektrot yüzeyindeki oryantasyonunu ve bağlanma etkinliğini etkiler ayrıca enzim ve elektrot arasındaki elektron transferini de etkiler. Elektropolimerizasyon sırasındaki döngü sayısı değiştirilerek optimum polimer film kalınlığı belirlenmiştir. Bu nedenle, dönüşümlü voltametri tekniği ile farklı döngü sayısındaki filmler (5, 20, 40, 50, 60) grafit elektrot yüzeyine kaplanmıştır. Farklı film kalınlıklarına sahip bu elektrotlar ile amperometrik ölçümler alınmıştır. 40 döngü sayısı ile kaplanan elektrot ile en dengeli ve en yüksek biyosensör tepkisi elde edilmiştir ve sonraki deneyler için kullanılmıştır (Şekil 4.6). Elektrot yüzeyi ince ya da kalın polimer filmi ile kaplandığında okunan akım değeri farkının düşük olduğu gözlenmiştir. Elektrot yüzeyindeki polimer filmin çok kalın veya ince olması durumunda enzim immobilizasyonu tam anlamıyla gerçekleşmediğinden, biyosensör sinyalleri düşük çıkmaktadır.



Şekil 4.6. Döngü sayısının biyosensör cevabı üzerine etkisi (asetat tamponunda 50 mM, pH 5,5; 25°C, -0,3 V, katekol: 0,05 M) Hata çubukları üç ölçümün standart sapmasını gösterir.

4.2.2. Enzim miktarının optimizasyonu

Lakkaz miktarının amperometrik cevap üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Farklı enzim miktarları ile hazırlanan elektrotlar optimize edilmiştir: 0,1mg (2,18 U), 0,3 mg (6,54 U), 0,4 mg (8,72 U), 0,5 mg (10,9 U) ve 0,6 mg (13,08 U) lakkaz. Amperometrik ölçümlerden sonra elde edilen biyosensör cevapları karşılaştırılmış ve 0,3 mg lakkaz içeren biyosensörün en dengeli ve en yüksek yanıtı verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.7).

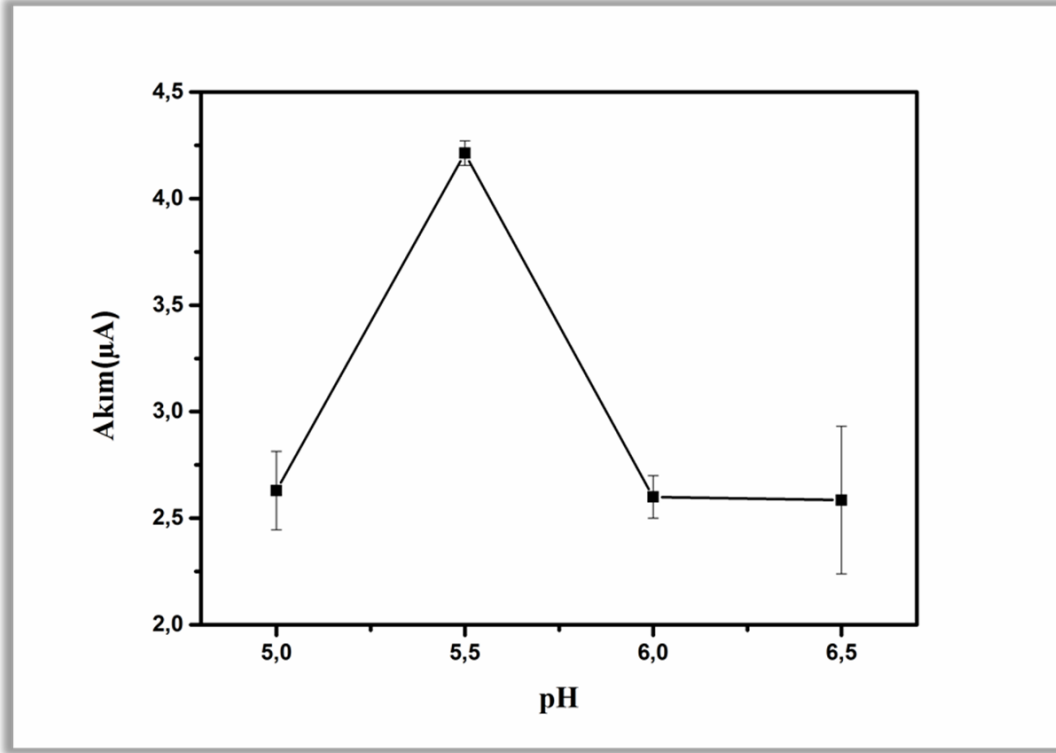


Şekil 4.7. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi (asetat tamponunda 50 mM, pH 5,5 / 25°C / -0,3 V, katekol: 0,05 M) Hata çubukları üç ölçümün standart sapmasını gösterir.

4.2.3. pH optimizasyonu

Enzimlerin biyoaktivitelerinin, çözeltinin pH değerinden etkilendiği ve pH değerinin enzimlerin doğal yapılarını bozabildikleri bilinmektedir. Literatür incelendiğinde optimum bir pH ortamında deneylerin gerçekleştirilmesin önem taşıdığı görülmektedir. Uygun olmayan pH değerlerinde yapılan biyosensör enzim moleküllerinin denatürasyonuna neden olabilir. Bu nedenle, pH 5,0-6,5 aralığında 50 mM tampon çözeltileri, (pH 4,0-5,5'te sodyum asetat tamponu, pH 6,0-7,5'te sodyum fosfat tamponu, 25°C) hazırlanmıştır. Bu tampon çözeltilerle amperometrik ölçümler diğer parametreler değiştirilmeden pH 5,0 ; 5,5 ; 6,0 ; 6,5 yapılmıştır. Lakkaz ile immobilize edilmiş grafit modifiye elektrot için en uygun

ortam pH değerinin belirlenmesi için 0,05 mM katekol kullanıldı. Ölçümlerden sonra, biyosensörün en dengeli ve en yüksek tepkisi pH 5,5 ile elde edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. pH'nin biyosensör cevabı üzerindeki etkisi (sodyum asetat tamponunda, 50 mM, pH 5,0 ve 5,5; sodyum fosfat tamponunda, 50 mM, pH 6,0 ve 6,5; 25°C, -0,3 V, katekol: 0,05 M). Hata çubukları üç ölçümün standart sapmasını gösterir.

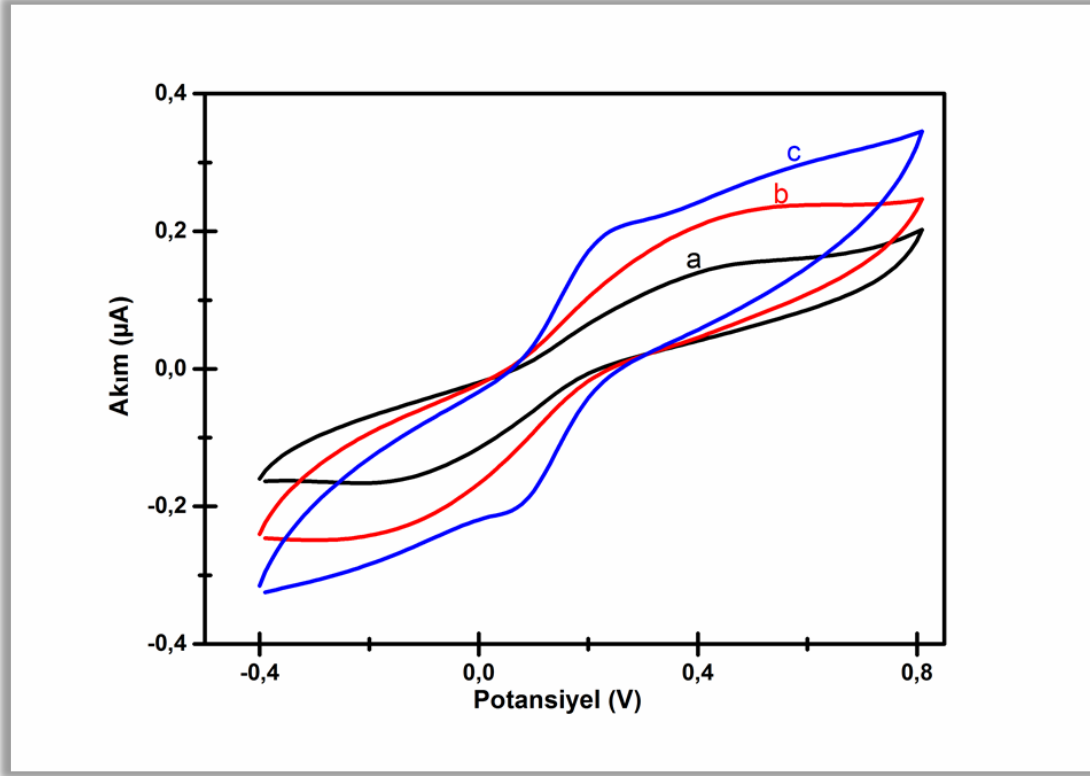
Literatür kaynaklarında lakkaz enzimin optimum pH çalışma aralığı 4,0 -7,5 arasında olduğu belirtilmiştir. Sodyum asetat ve sodyum fosfat ile pH'ları 4,5 ve 5,5 arasında farklı tampon çözeltilerle daha çok çalışma yapıldığı belirlenmiştir.

4.3. Biyosensör Tasarımının Yüzey Karakterizasyonu

4.3.1. Farklı elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonu

Çıplak grafit elektrot (a) - polimer/lakkaz enzim modifiye grafit elektrodun (b) - polimer modifiye elektrot (c) 0,1 M KCl içeren 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içerisinde dönüşümlü voltagramları alınmıştır. Dönüşümlü voltagramların tepe akımları (Şekil 4.9) sırasıyla 140 µA, 239 µA, 205 µA olarak tespit edilmiştir. Çıplak grafit elektrot polimer ile kaplandığında akımdaki artışın nedeni elektroaktif yüzey alanının artmasıdır. Polimer modifiye grafit elektrodun enzim immobilizasyonundan sonra akımındaki düşme enzimin

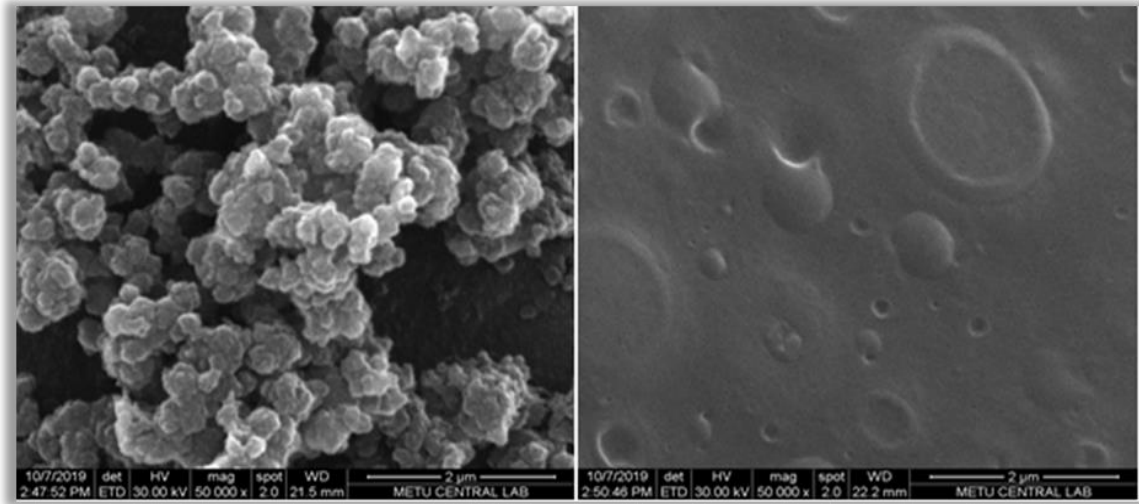
elektrot yüzeyine etkili tutunduğunu gösterir. Yüzeye tutunan enzim yalıtkan özellik gösterdiği için akımda azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.9. 0,1 M KCl içeren 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içinde a) (çıplak grafit elektrot), b) (polimer/lakkaz enzim modifiye grafit elektrot) c) (polimer modifiye grafit elektrot), elektrotlarının dönüşümlü voltajları

4.3.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

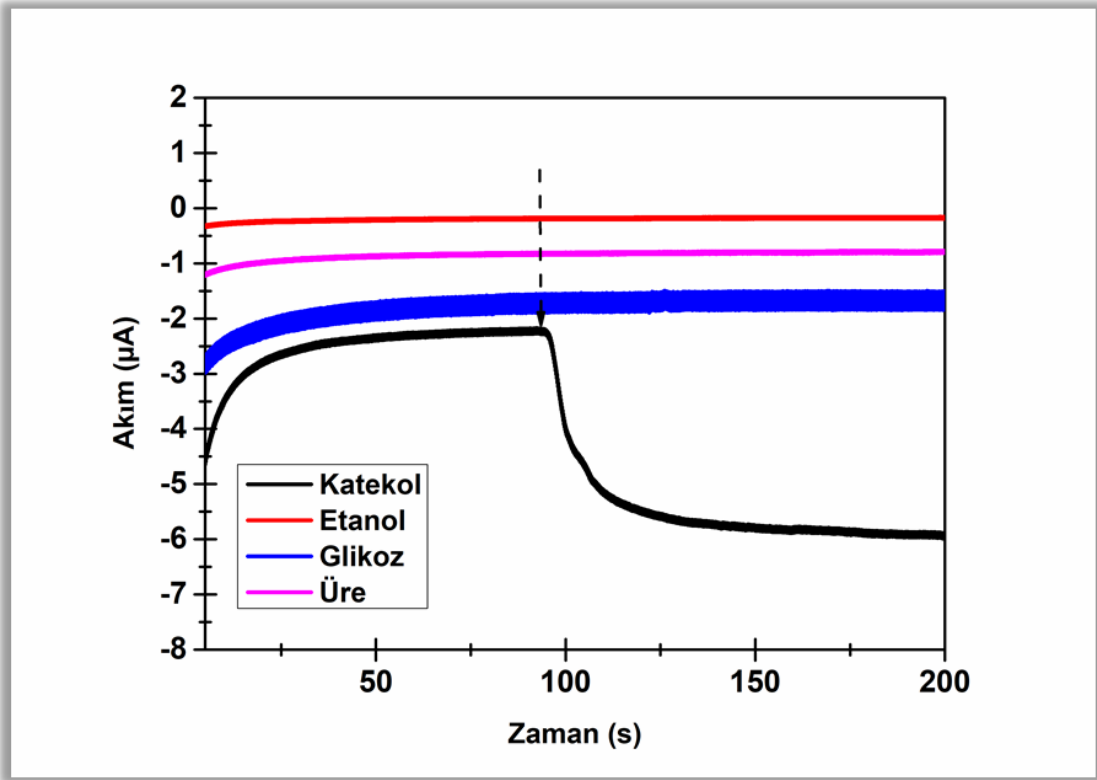
Lakkaz immobilizasyonundan önce ve sonra polimer filmin yüzey morfolojisi SEM tekniği ile görüntülenmiştir. Şekil 4.10 da grafit elektrot üzerine 40 döngü ile polimerizasyondan sonra görüntülenme yapılmıştır. Polimerin morfolojisi karnabakar görüntüsüne sahiptir. (Şekil 4.10 sol) Şekil 4.10 sağda polimer filminin biyomolekül immobilizasyonundan sonra yüzey morfolojisinin tamamen değiştiği gözlenmiştir. Bu değişim enzim molekülünün polimer yüzeyi ile iyi bir şekilde etkileşiminden kaynaklanabilmektedir. Polimer ve enzim molekülünün uygun bileşimi ve iyi etkileşimi sonucu enzim molekülleri elektrot yüzeyini düzgün bir şekilde kaplamaktadır. Morfolojideki bu değişim başarılı biyomolekül immobilizasyonun olduğunu göstermektedir. Elektrot yüzeyini homojen olarak kaplayan iletken polimerlerin, enzim immobilizasyonu için ideal malzemeler oldukları SEM görüntülerinden de anlaşılmaktadır.



Şekil 4.10. İletken polimer filmin (sol) ve iletken polimer film yüzeyine biyomolekül immobilizasyonundan sonra (sağ) alınan SEM görüntüleri

4.4. Girişimlerin Araştırılması

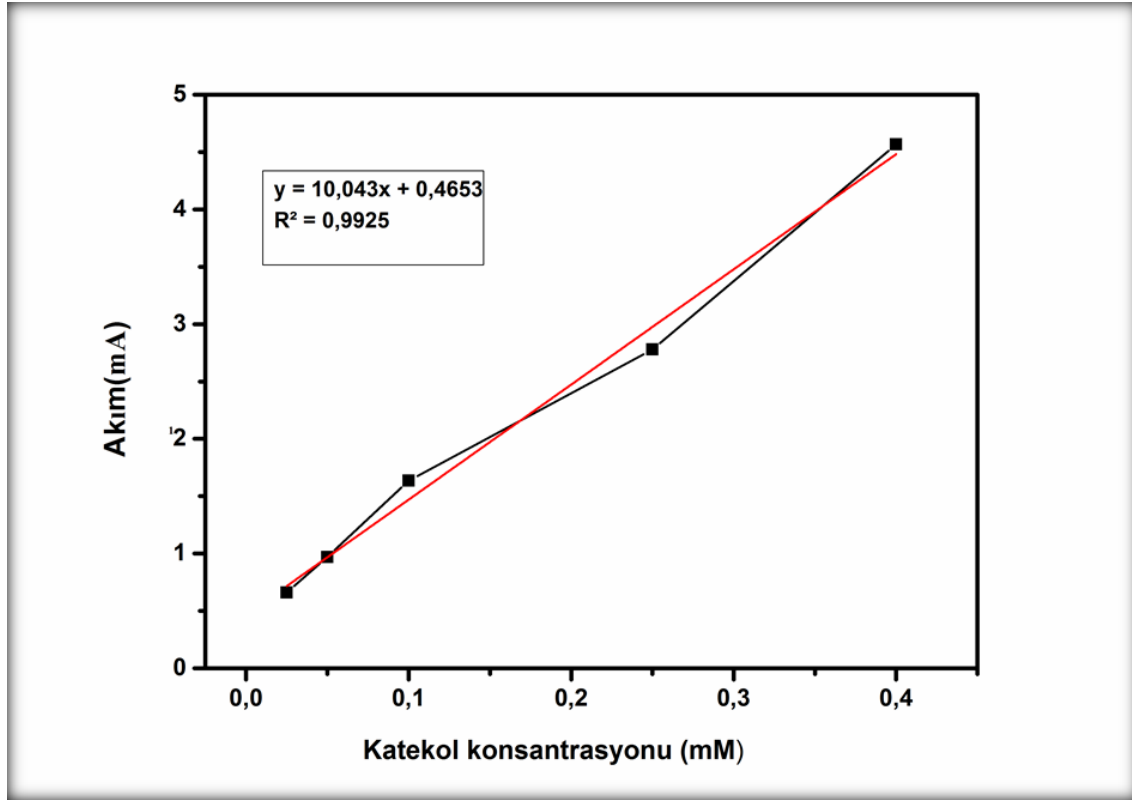
Optimizasyonu yapılan biyosensörün güvenilir, geçerli ve seçici olduğunu göstermek amacı ile farklı biyolojik moleküllerle biyosensör cevabı test edilmiştir. Konsantrasyonları 0,05 M olan glikoz, üre ve ethanol çözeltileri hazırlanmıştır. Etkileşimleri görmek için, amperometrik ölçümler sırasında katekol yerine bu maddeler enjekte edilmiştir. Biyosensörün cevabı kaydedilmiş ve Şekil 4.11'de gösterildiği gibi, biyosensörün, bu maddelerden hiçbirisine yanıt vermediği gözlenmiştir. Bununla birlikte, katekol eklenmesiyle net bir sinyal gözlemlenmiştir. Bu durum, biyosensörün böyle etkileşim verme ihtimali olan maddelerin varlığında bile seçici davranıp sadece katekole tepki verdiğini göstermektedir.



Şekil 4.11. Biyosensörün katekol ve olası girişim türlerine tepkisi (pH 5,5; 50 mM sodyum asetat tamponu, 25 °C, -0,3 V)

4.5. Biyosensörün Analitik ve Kinetik Karakterizasyonu

Lakkaz biyosensörünün analitik karakterizasyonu katekol için bir kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ile yapılmıştır. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen biyosensör cevapları kaydedilmiş ve bir doğrusal dizi ile kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 4.12). Substrat konsantrasyonu ve akım değişimi arasındaki ilişki ile edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak 0,025-0,4 mM konsantrasyon aralığında mükemmel bir doğrusallık elde edilmiştir. Geniş bir doğrusallık aralığı her biyosensör için aranan bir özelliktir.



Şekil 4.12. Katekol için kalibrasyon eğrisi (pH 5,5; 50 mM sodyum asetat tamponu 25 °C, -0,3 V)

Ölçüm alınabilen en küçük derişim sınırı (tayin sınırının) (LOD), sinyal /gürültü oranı 3 olarak düşünüldüğünde, LOD değeri 0,014 mM olarak hesaplanmıştır. Michaelis-Menten sabiti (K_M) reaksiyon kinetiğinin anlaşılması için kullanılır ve enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür. İmmobilizasyondan sonra enzim aktivitesini ya da biyokararlılığını anlamak için kullanılabilir. Tasarlanan biyosensörün kinetik parametreleri, K_M^{app} ve I_{max} değerleri Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak sırasıyla 0,11 mM ve 3,42 μA olarak hesaplandı. Duyarlılık değeri 166,74 $\mu A/mM.cm^2$ olarak hesaplanmıştır. Modifiye edilmiş polimer matrisinin yardımıyla mmobilize enzim molekülleri, katekole karşı yüksek afinite sergilemektedir.

Çizelge 4.3. Elde edilen biyosensör cevapları

K_M^{app} (mM)	$I_{max}(\mu A)$	LOD (mM)	Duyarlılık ($\mu A/mM$)	Standart sapma
0,11	3,42	0,014	166,74	1,717

Çizelge 4.4. Literatür karşılaştırması

Biyosensör	Doğrusal aralık (μM)	LOD (En düşük tayin sınırı) (μM)	Duyarlılık ($\mu\text{Amm}^{-1}\text{cm}^{-2}$)	R^2	Referans
Ppy/Lac/AuNPs/SPCE	1 -250	0,83	-	0,998	[56]
GCE/Lac/PANI	3,2 - 19,6	2,07	70	0,989	[57]
Cu-OMC/chitosan (CS)	0,67 - 15,75	0,67	-	-	[58]
SPEs/Lac	-	10	3,02-0,216	0,984	[59]
NTC/ Lac/GA	0,5-150	0,5	2,81		[60]
TVL bazlı sensör	0,2-1	-	17,45	0.991	[63]
Graphite electrode/ LACC	1-10	0,6	-	0,999	[64]
Lac/Fe ₃ O ₄ NPs/cMWCNT/PANI/Au	0,1-500	0,03	-	0,999	[61]
Lac/MnO ₂ NP/cMWCNT/PANI/Au	10-500	0,04	-	0,999	[62]
LACC/AuNPs/GNPIs/SPCE	2-120	0,6	-	0.998	[65]
P(DTFBT) / GCE / Lac	25-400	14	166,742	0,992	Bu çalışma

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Konjuge π sistemlere sahip iletken polimerler geniş uygulama alanlarından dolayı büyük ilgi görmektedir. Son yıllarda yeni özelliklere ve işlenebilirliğe sahip çok çeşitli konjuge polimerler sentezlenmiştir. Sentezlenen konjuge polimerler sahip oldukları özelliklerden dolayı OLED, fotovoltaiik hücreler, biyosensörler, metal sensörleri ve elektrokromik cihazlar gibi birçok endüstriyel uygulama alanında kullanılmaktadır.

Yüksek optik kontrast, kararlılık, işlenebilirlik ve hızlı dönüşüm zamanı Elektrokromik polimerlerin en önemli özellikleridir. Bu çalışmada flor içeren monomerin (5-floro-4,7-bis(4-hekziltiyofen-2 il)benzo[c][1,2,5] tiyadiazol)elektrokimyasal polimerizasyonu ile elde edilen polimerin elektrokimyasal ve spektroeletrokimyasal çalışmaları yapılmıştır. Monomerin elektrokimyasal yükseltgenmesi ile elde edilen polimerin düşük bant aralığına ve düşük tepki zamanına sahip olduğu ve multikromik özellik gösterdiği belirlenmiştir.

Polimer düşük tepki zamanlarına ve özellikle NIR bölgesinde yüksek optik kontrasta sahiptir. Bu özellikler sayesinde sentezlenen polimerler elektrokromik cihazlarda uygulama alanı bulabilecektir.

Son yıllarda hızla artan endüstriyel faaliyetler, tarımda kullanılan suni gübre ve ilaçlar ile kentsel atıklar nedeniyle ağır metallerin aşırı birikimi çevre ve insan sağlığını tehdit etmektedir. Bu kirliliğin nedenlerinden biri de fenolik bileşiklerdir. Meyve sularında biralarda ve şaraplarda kararmaya uslanmayan ve bulanıkla yol açan fenolik bileşiklerdir. Bileşiklerin tayininde kullanılan spektrofotometri ve kromotografi gibi geleneksel algılama yöntemleri zaman alıcı ve pahalıdır. Fenolik bileşiklerin tespitinde alternatif yolların en önemlisini de enzim biyosensörlerdir. Donör ve akseptör fonksiyonel grupları aynı molekül içinde bulunduran (5-floro-4,7-bis(4-hekziltiyofen-2 il)benzo[c][1,2,5] tiyadiazol monomerinin polimerleri lakkaz tutuklamaları için kullanılmıştır. İmmobilizasyon şartları bir seri sistematik deney sonucu optimize edilmiştir. Biyosensör yüzey morfolojisi, ölçüm aralığı, tespit sınırı, kararlılık ve afinite açılarından karakterize edilmiştir.

Biyosensörün Km^{app} değeri, 0,11 mM olarak bulunmuştur. Literatürdeki diğer lakkaz biyosensörlerine ait Km^{app} değerleri ile kıyaslandığında tez çalışması kapsamında tasarlanan biyosensöre ait değerin düşük olduğu görüldü (Çizelge 4.4). Km^{app} değerinin küçük olması enzimin immobilize edildiği yüzeyin substrata karşı ilgisinin fazla olduğunu

göstermektedir. Biyosensörün katekole karşı duyarlılık ve afinite gösterdiği belirlenmiştir. Çalışılan biyosensörün, duyarlılık ve LOD değerine bakıldığında performansının yeterlilik göstermesi biyosensör matrisine ve biyosensörün hazırlanma tekniğine bağlanabilir.

Literatür ile karşılaştırıldığında hazırlanan biyosensörün çalışma aralığı sensörün fenolik bileşiklere karşı hassas olduğu göstermektedir. Bu çalışmada toksik fenolik bileşiklerin tespit edilmesinde geleneksel yollara alternatif, lakkaz enzimini kullanarak ucuz, taşınabilir ve kullanımı kolay bir biyosensör inşa edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Kulak Taştemürlü, A. D. (2010). *İletken Polimer Sentezi Ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 7.
2. Coşkun, K. (2009). *Kimyasal ve Elektrokimyasal Yöntemlerle İletken Polimerlerin Sentezi Ve Membran Uygulamaları*, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
3. Aydın, Y. (2012). *İletken Polimerlerin İçerisinde Enzim Tutuklamasıyla Yapılan Biyosensörler*, Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Karaman.
4. Akgül, E. (2014). *Diaminobenzo[C]Sinnolin Temelli Polimer Ve Metal Katkılanmış Polimer Kompozitlerinin Spektroskopik Ve Elektrokromik Karakterizasyonları*, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
5. Soganci, T., Ak, M., Giziroglu E., Soyleyici H. C., (2016). Smart window application of hydrazide type new SNS derivative. *RSC Advances*, 6 (3), 1744-1749.
6. Güler, E., Soyleyici, H. C., Demirkol Odaci, D., Ak, M., and Timur, S. (2014). A novel functional conducting polymer as an immobilization platform. *Materials Science and Engineering C*, 40, 148–156.
7. Şahmetlioğlu, E. (2004). *İletken Aşı Kopolimerlerin Sentezi ve Bunların Enzim Tutuklama Matrisleri Olarak Kullanımları*, Doktora Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde.
8. Esmer, E. (2012). *Sentezlenen Donör-Akseptör-Donör Tipi İletken Polimerlerin Elektrokimyasal Ve Optik Özellikleri*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
9. Ünal Cıvır, P. (2018). Computational modelling of donor-acceptor-donor conjugated polymers based on benzothiadiazole. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1128, 70-82.
10. Wang, Z., Wang, J., and Jian Pei, J. (2019). Embedding pyridine units in acceptors to construct donor-acceptor conjugated polymers. *Chinese Chemical Letters*, 30 (1), 25-30.
11. Günbaş, E. G. (2007). *Novel Donor-Acceptor Type Polymers Towards Excellent Neutral State Green Polymeric Materials For Realization of Rgb Based Electrochromic Device Applications*, Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 21-25.
12. Demirtaş, E. (2007). *Sodyum Bentonit ile Bazı İletken Polimerlerin Kompozitlerinin Sentezi ve Özelliklerinin İyileştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 5-16.

13. Bernasik, A., Haberkow, J., Wlodarczyk-Miskiewicz, J., Raczkowska, J., Luzny, W., Budkowski, A., Kowalski, K., and Rysz, J. (2005). Influence of humid atmosphere on phase separation in polyaniline-polystyrene thin films. *Synthetic Metals*, 155 (3), 516-522.
14. Batır, G.G., (2009). 3-[(2,5-Dimetil-4-Brom)Fenil] Tiyofenin Elektrokimyasal Polimerizasyonu, Karakterizasyonu ve Glikoz Biyosensör Olarak Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
15. Çarbaş B.B. (2016). İletken Polimerler Ve Enerji Uygulamaları.. *Küresel Mühendislik Çalışmaları Dergisi*, 3, (1), 46-60.
16. Rustamlı, E. (2014). Donör-Akseptör Tipi Tiyofen Ve Tiyenotiyofen İçeren İletken Polimerlerin Sentezi, Elektrokromik Ve Optik Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
17. Durmuş, S. (2016). Adrenalin Tayini İçin Yeni Bir Biyosensörün Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
18. O. Hacıoglu, Ş., A. Unlu, N., Aktaş, E., Hizalan, G., D. Yıldız, E., Cirpan, A., and Toppare, L. (2017). A triazoloquinoxaline and benzodithiophene bearing low band gap copolymer for electrochromic and organic photovoltaic applications. *Synthetic Metals*, 228, 111-119.
19. Cevher, Ş. C., Keleş, D., Hizalan, G., Cirpan, A., and Toppare L. (2018). Alkyl-end phenanthroimidazole modification of benzotriazole based conjugated polymers for optoelectronic applications. *Synthetic Metals*, 244, 1-9.
20. Gerard, M., Chaubey, A., and Malhotra, B.D. (2002). Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 345-359.
21. Rahman, M. A., Kumar, P., Park, D. S., and Shim, Y. B. (2008). Electrochemical sensors based on organic conjugated polymers. *Sensors*, 8, 118-141.
22. Ak, M., Soğancı, T., Gümüşay, O., ve Çukurluoğlu S. (2017). Yeşil kimya ile iletken polimer sentezi ve elektrokromik özellikleri. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilim Dergisi*, 23 (6), 753-758.
23. Liu, X., Kong, L., Du, H., Zhang, Y., Zhao, J., and Xie, Y. (2019). Synthesis and electrochromic properties of electrochromic polymers based on propylenedioxythiophene, diketopyrrolopyrrole and benzodithiophene units. *Organic Electronics*, 64, 223-235.
24. Colak, B., Büyükkoyuncu, A., Koyuncu F. B., Koyuncu, S., (2017). Electrochromic properties of phenantrene centered EDOT polymers. *Polymer*, 123, 366-375.
25. Bulut, Y. (2011, 16-18 Mayıs). *Biyosensörlerin Tanımı Ve Biyosensörlere Genel Bakış*. 6th International Advanced Technologies Symposium, Elazığ.

26. Coulot, P. R., (1991). Biosensor Principles And Applications., Blum, L. J., and Coulot, P. R., (Eds.). *What is a biosensor?* 1st Edition. France. CNRS Universite Claude Bernad and Marcel Dekker, pp. 6-10.
27. Soylemez, S., Kanik, F. E., Ileri, M., O. Hacıoglu, Ş., and Toppare L. (2014). Development of an ovel biosensor based on a conducting polymer. *Talanta*, 118, 84–89.
28. Vaidya, A. M., and Annapure, U.S., (2019). Enzymes in Biosensors for Food Quality Assessment, *Enzymes in Biotechnology Food*, 659-674.
29. Kökbaş, U., Kayrın, L., Tuli, A., (2013). Biosensors and their Medical Applications. *Archives Medical Review Journal*, 22 (4), 499-513.
30. Sánchez-Paniagua López, M., López-Ruiz, B., (2018,May). Electrochemical biosensor based on ionic liquid polymeric microparticles. An analytical platform for catechol. *Microchemical Journal*, 138, 173-179.
31. Ejeian, F., Etedali, P., Mansouri-Tehrani, H., Soozanipour, A., Low, Z., Asadnia, M., Tahari-Kafrani, A., and Razmjou A. (2018, October). Biosensors for wastewater monitoring: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 118, 66-79.
32. Turan, J., Kesik, M., Soylemez, S., Goker, S., Coşkun, S., Unalan H. E., Toppare L. (2016). An effective surface design based on a conjugated polymer and silvernanowires for the detection of paraoxon in tap water and milk. *Sensors and Actuators B:Chemical*, 228, 278–286.
33. Büber, E., Söylemez S., A.Udum, Y. and Toppare L. (2018). Fabrication of a promising immobilization platform based onelectrochemical synthesis of a conjugated polymer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 167, 392–396.
34. Sağbaş, B., ve Durakbaş, N. (2010). Tıbbi ölçüm ve analizlerde kullanılan biyosensörler. *Mühendis ve Makine Dergisi*, 51, (600), 16-23.
35. Gazel N. (2016). *Ditiyenopirol (DTP) Tip İletken Polimerleri Kullanarak Özgün Kolesterol Biyosensörlerin Yapımı*, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 24-42.
36. Çil, B. (2014). *Duyarlı Potansiyometrik Mikro Biyosensörler Ve Uygulamalar*, Yüksek Lisans Tezi, Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Giresun.
37. Bilir, K. (2012). *Deteksiyonu Temelli Lakkaz Biyosensörleri Yapımı*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
38. Shi, Z., Li G., and Hu Y. (2019, September). Progress on the application of electrochemiluminescence biosensor based on nanomaterials. *Chinese Chemical Letters*, 30 (9), 1600-1606.

39. Mavrič, T., Benčina M., Imani R., Junkar I., Valant M., Kralj- Iglič V., and Iglič A. (2018). Electrochemical Biosensor Based on TiO₂ Nanomaterials for Cancer Diagnostics. *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*, 27, 63-105.
40. Kawai, H., Kitazumi Y., Shirai O., and Kano K. (2019,May). Performance analysis of an oxidase/peroxidase-based mediatorless amperometric biosensor. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 841, 73-78.
41. Jun, L. Y., Yon L. S., Mubarak N. M., Bing C. H., Pan S., Danguah K., Abdullah E.C., and Khalid M. (2019, April). An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7 (2).
42. Tüylek Z. (2017). Biyosensörler ve Nanoteknolojik Etkileşim. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 6 (2), 71-80.
43. Singh R. S. Singh T. Singh K. A.,(2019). Enzymes as Diagnostic Tools, Biomass, Biofuels, Biochemicals, *Advances in Enzyme Technology*, 225-271.
44. Bilal, M., Iqbal H. M. N. (2019, June). Naturally-derived biopolymers: Potential platforms forenzyme immobilization, *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 462-482.
45. Jakhar, S., and Pundir C. S. (2018, February). Preparation, characterization and application of urease nanoparticles for construction of an improved potentiometric urea biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 242-250.
46. Lyu, j., Li Z., Men J., Jiang R., Tang G., and Gao R. (2019, June). Covalent immobilization of Bacillus subtilis lipase A on Fe₃O₄ nanoparticles by aldehyde tag: An ideal immobilization with minimal chemical modification. *Process Biochemistry*, 81, 63-6.
47. Kashefi, S., Borghei S. M., Mahmoodi N. M. (2019, February). Molecular Liquids, Covalently immobilized laccase onto graphene oxide nanosheets: Preparation, characterization, and biodegradation of azo dyes in colored wastewater. *Journal of Molecular Liquids*, 276, 153-162.
48. Nahgdi, M., Taheran M., Brar S. K., Kermanshahi-pour A., Verma M., and Surampalli R. Y. (2018, August). Pinewood nanobiochar: A unique carrier for the immobilization of crude laccase by covalent bonding. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 563-57.
49. Fathali, Z., Rezaei S., and Faramarzi M. A., and Rezaei M. H. (2019, February). Catalytic phenol removal using entrapped cross-linked laccase aggregates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 359-366.
50. Lassouane, F., Aït-Amar H., Amrani S. and Couto S. R., (2019, January). A promising laccase immobilization approach for bisphenol a removal from aqueous solutions. *Bioresource Technology*, 271, 360-36.

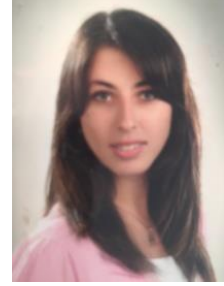
51. Pomeranz Y., (1991). Enzymes, Food Science And Technology. Taylor S. L. (Eds), *Functional Properties Of Food Components*. Second Edition. Academic Press, pp. 299-32.
52. Kunamneni A., Camarero, S., Burgos, C. G., Plou, F. J., Ballesteros A., ve M. Alcalde, (2008). Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis, *Microbial Cell Factories*, 7 (32).
53. Başoğlu, E. (2013). *Mantar Lakkaz'ının Alginat Jellerde Tutuklanması ve Atık Sularda Boyar Madde Giderilmesinde Kullanılması*, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
54. Tuncer, M., (2010). Lakkaz, Kısım 1: Yapısı, Katalitik Özellikleri ve Dağılımları - Lakkaz, Kısım 2: Potansiyel Endüstriyel ve Biyoteknolojik Uygulamaları, *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22, 19-63.
55. Ghosh, B., Saha R., Bhattachary D. and Mukhopadhyay M., (June 2019). Laccase and its source of sustainability in an enzymatic biofuel cell. *Bioresource Technology*, 6, 268-278.
56. Mohtar L. G., Aranda P., Messina G. A., Nazareno M. A., Pereira S. V., and Raba J. (2019). Amperometric biosensor based on laccase immobilized onto a nanostructured screen-printed electrode for determination of polyphenols in propolis, *Microchemical Journal*, 144, 13-18.
57. Nazari, M., Kashanian, S. and Rafipour, R. (2015). Laccase immobilization on the electrode surface to design a biosensor for the detection of phenolic compound such as catechol. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 145, 130–138.
58. Xu, X., Guo, M., Lu, P., and Wang, R. (2010). Development of amperometric laccase biosensor through immobilizing enzyme in copper-containing ordered mesoporous carbon (Cu-OMC)/chitosan matrix, *Materials Science and Engineering C*, 30, 722–729.
59. Montereali, M. R., Seta, L. D., Vastarella, W., and Pilloton R. (2010). A disposable laccase-tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 64 (3), 189-194.
60. Arcos, M. R., Romo, M. G., and Flores H. E. (2017). Characterization of amperometric laccase biosensor based on carbon nanotube, *Procedia Technology*, 27, 279 -281.
61. Ravval, R., Devender, S. C., Pundir, C. S. (2012). An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto Fe₃O₄NPs/cMWCNT/PANI/Au electrode for determination of phenolic content in tea leaves extract, *Enzyme and Microbial Technology*, 51 (4), 179-185.
62. An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto MnO₂NPs /cMWCNT /PANI modified Au electrode, *International Journal of Biological Macromolecules*, 51 (1-2), 175-181.

63. Timur, S., Pazarlıoğlu N., Pilloton, R., and Telefoncu, A. (2004). Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix, *Sensors and Actuators B*, 97, 132–136
64. Wilkołazka, A. J., Ruzgas, T., and Gorton, L. (2005). Amperometric detection of monoand diphenols at cerena unicolor laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure, *Talanta*, 66, 1219–1224.
65. Zrinski, I., Pungjunun, K., Martinez, S., Zavašnik, J., and Mehmeti, E. (2020). Evaluation of phenolic antioxidant capacity in beverages based on laccase immobilized on screen-printed carbon electrode modified with graphene nanoplatelets and gold nanoparticles, *Microchemical Journal*, 152, 104282.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : GEMİCİ AKTAŞ, Melek
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 20.02.1990, Ankara
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0544 442 28 23
 e-mail : worldofangels@windowlive.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/İleri Teknolojiler	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Kimya Öğretmenliği	2012
Lise	Çubuk Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2013-2014-	Halime Serinçay	Ar-Ge Elemanı
2014-2015	Doğan Yayn. Dağ. ve Eğit. Kur. Ltd. Şti.	Kimya Öğretmeni
2015-	Kamu	Kimya Öğretmeni

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Kitap okumak, doğa yürüyüşü, film seyretmek



GAZİ GELECEKTİR..