DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİYOFEN ESASLI İLETKEN POLİMER SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOKİMYASAL SENSÖR UYGULAMALARININ ARAŞTIRILMASI

Türker DEMİRDÖVEN

Kasım, 2013
İZMİR

TİYOFEN ESASLI İLETKEN POLİMER SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOKİMYASAL SENSÖR UYGULAMALARININ ARAŞTIRILMASI

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Türker DEMİRDÖVEN

Kasım, 2013

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

TÜRKER DEMİRDÖVEN, tarafından **PROF. DR. ELİF ŞAHİN IŞGIN** yönetiminde hazırlanan **"TİYOFEN ESASLI İLETKEN POLİMER SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOKİMYASAL SENSÖR UYGULAMALARININ ARAŞTIRILMASI"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Elif ŞAHİN IŞGIN

Yönetici

Prof. Dr. Elif SUBAŞI

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Suna TIMUR

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Ayşe OKUR

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı bana öneren, tez çalışması boyunca danışmanlığımı yürüten, beni hep güler yüzle ve sabırla karşılayıp bana her konuda destek olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Elif ŞAHİN IŞGIN' a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ege Üniversitesi' nde laboratuvardaki yoğun deneysel çalışma sürecinde, yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Suna TİMUR ve Sayın Doç. Dr. Dilek DEMİRKOL' a teşekkür ederim.

Çalışmamda kullanılan monomerin sentezi esnasında benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Elif SUBAŞI' na teşekkür ederim.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan arkadaşlarım Nurdan ÖZTÜRK ve Başak SEVEN' e teşekkür ederim.

Sentezlemiş olduğum bileşiklerin yapılarının FT-IR analiziyle aydınlatılmasında laboratuvarlarını kullanmamı sağlayan PETKİM Kalite Kontrol ve Teknik Servis Müdürü Sayın Dr. Rahim İŞLER' e teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca çalıştığım Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü' nde Klinik Şefi olan Sayın Doç. Dr. Ümit BAYOL' a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan maddi ve manevi olarak her zaman desteklerini gördüğüm annem Nevser DEMİRDÖVEN, babam Enver DEMİRDÖVEN' e teşekkür ederim.

Bu çalışmayı 2012.KB.FEN.053 numaralı bilimsel araştırma projesi ile destekleyen Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü' ne teşekkür ederim.

Türker DEMİRDÖVEN

TİYOFEN ESASLI İLETKEN POLİMER SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOKİMYASAL SENSÖR UYGULAMALARININ ARAŞTIRILMASI

ÖZ

Tiyosemikarbazon matrisleri, biyosensör uygulamaları için grafit elektrot üzerinde biyomolekül immobilizasyonu ile matris özelliklerini araştırmak amacıyla elektrokimyasal oligomerizasyon ile inşa edilmiştir. Glukoz oksidaz (GOx) enzim immobilizasyonu için çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehit (GA) kullanarak amino grubu içeren oligomerik tiyosemikarbazonlar başarıyla uygulandı. Modifiye edilen yüzey SEM ve FT-IR ile karakterize edilmiştir. Glukoz biyosensör için elektrokimyasal ölçümler, enzim aktivitesinden kaynaklanan oksijen tüketimi izlenerek Ag/AgCl elektroduna karşılık -0,7 V ortam koşullarında yapıldı. Bunun yanı sıra pH, enzim miktarı, doğrusallık, kararlılık ve tekrarlanabilirlik için optimizasyonlar ayrıntılı şekilde incelenmiştir. Optimize edilmiş biyosensör 0,05 mM ile 1 mM glukoz miktarı arasında ve 10 sn' lik tepki süresince doğrusallık göstermektedir. Ayrıca K_m ve V_{max} gibi kinetik parametreler hesaplandı. Amperometrik sistemin yanı sıra sistemin analitik özellikleri Akış İnjeksiyon Analizi (FIA) ile analitik karakterizasyonu değerlendirildi. Elde edilen yeni biyosensör tasarımı ile gerçek bir numune içindeki glukoz miktarı analiz edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Enzim immobilizasyonu, immobilizasyon matris, tiyosemikarbazon

SYNTHESIS OF THIOPHENE BASED CONDUCTING POLYMER, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF BIOSENSOR APPLICATIONS

ABSTRACT

Thiosemicarbazone (TSC) matrices are constructed by electrochemically oligomerization on the graphite electrodes to investigate their matrix properties in terms of biomolecule immobilization for the biosensor applications. Amino functionalized oligomeric TSCs were successfully applied for the glucose oxidase (GOx) immobilization using glutaraldehyde (GA) as the crosslinker. Scanning electron microscopy (SEM) and fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) measurements are used to characterize the modified surface. Electrochemical measurements of the GOx biosensor were performed at ambient conditions at -0.7 versus Ag/AgCl electrode by following the oxygen consumption resulting from the enzyme activity, in the presence of glucose substrate. As well as optimization of pH and enzyme amount, linearity, operational stabilities and repeatability are investigated in detail. The optimized biosensor shows a very good linearity between 0.05 mM and 1.0 mM glucose with a 10 s response time. Kinetic parameters such as K_m and V_{max} are also calculated. Besides the batch configuration, the analytical characteristics of the system were also evaluated in flow injection analysis (FIA) mode. Finally, the new biosensor configuration was applied for glucose determination on a real sample.

Keywords: Enzyme immobilization, immobilization matrix, thiosemicarbazone

İÇİNDEKİLER

Sayfa

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZ iv
ABSTRACT v
ŞEKİLLER LİSTESİ viii

BÖLÜM BİR – GİRİŞ 1

1.1 İletken Polimerler 2
1.1.1 İletken Polimerlerin yapısı 3
1.1.2 İletken Polimerlerin Biyosensörlerde Kullanılması 3
1.2 Tiyosemikarbazonların Genel Özellikleri 4
1.2.1 Tiyosemikarbazidlerin Genel Özellikleri 6
1.3 Biyosensörler 6
1.3.1 Biyosensör Bileşenleri 11
1.3.2 Biyobileşenler 12
1.3.3 Biyobileşen İmmobilizasyonu 12
1.3.3.1 Kovalent Bağlama 12
1.3.3.2 Tutuklama 12
1.3.3.3 Çapraz Bağlama 13
1.3.3.4 Adsorpsiyon 14
1.4 Biyosensörlerin Çalışma Prensibi 15
1.5 Enzimler ve Özellikleri 16
1.5.1 Enzimlerin Çalışma Mekanizması 16
1.5.2 Enzimler Reaksiyonlarının Kinetiği 16
1.5.3 Glukoz Oksidaz Enzimi 20

BÖLÜM İKİ – DENEYSEL KISIM 21

2.1 Monomer Sentezi 21
2.2 Polimer Sentezi 21
2.3 Çapraz Bağlı Enzim Çözeltisinin Hazırlanması.....21
2.4 Enzim Elektrodunun Hazırlanması.....22
2.5 Biyosensörün Oluşturulması 23

BÖLÜM ÜÇ– DENEYSEL BULGULAR.....24

3.1 Kullanılan Kimyasallar 24
3.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar.....24
3.2.1 Fourier Transform Infrared Spektrometresi (FT-IR) 24
3.2.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) 24
3.2.3 Potansiyostat.....24
3.2.4 Elektroliz Hücresi 25
3.2.5 Kronoamperometri.....25
3.3 Deneysel Bulgular 25
3.3.1 FT-IR Analiz Sonuçları.....25
3.3.2 SEM Analiz Sonuçları 30
3.3.3 TSC/TBAPF_6' nın Glukoza Amperometrik Cevabı 31
3.3.4 Elektrokimyasal Sonuçlar 33
3.3.5 pH Etkisi.....35
3.3.6 Enzim Miktarı Etkisi.....36
3.3.7 Enzim Elektrotların Kullanım Kararlılığı 36

BÖLÜM DÖRT– TARTIŞMA VE SONUÇ 38

KAYNAKLAR.....40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Tiyosemikarbazonların genel eldesi 4
Şekil 1.2 Tiyosemikarbazonların oluşum mekanizması 5
Şekil 1.3 Tiyosemikarbazonların tion ve tiol tautomerleri 5
Şekil 1.4 Tiyosemikarbazonların genel sentez mekanizması.....6
Şekil 1.5 Tiyosemikarbazid molekülü 6
Şekil 1.6 Bir biyosensörün şematik gösterimi.....11
Şekil 1.7 Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi 12
Şekil 1.8 Bazı biyofonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri 13
Şekil 1.9 Doğrudan bağlama ile enzim immobilizasyonu 14
Şekil 1.10 Enzim-substrat ilişkisi 17
Şekil 1.11 Reaksiyon hızının substrat derişimi ile değişimi 18
Şekil 1.12 Lineweaver – Burk grafiği.....18
Şekil 1.13 Sıcaklıkla reaksiyon hızının değişimi 19
Şekil 1.14 Aktivasyon enerjisinin belirlenmesi 20
Şekil 2.1 Tiyofen-2-karbaldehit tiyosemikarbazon molekülü sentezi 21
Şekil 2.2 Gluteraldehidin bir enzim molekülüne bağlanışı 22
Şekil 3.1 Saf grafit elektrot için FT-IR 26
Şekil 3.2 TSC monomeri için FT-IR 27
Şekil 3.3 Oligomerik TSC için FT-IR.....28
Şekil 3.4 Modifiye GOx elektrot için FT-IR 29
Şekil 3.5 Saf grafit SEM görüntüsü.....30
Şekil 3.6 Saf grafit + TSC SEM görüntüsü.....30
Şekil 3.7 Saf grafit + TSC + enzim SEM görüntüsü 31

Şekil 3.8 TSC/$TBAPF_6$' nın glukoz konsantrasyonuna karşı amperometrik cevabı..32
Şekil 3.9 TSC/$TBAPF_6$' nın glukoz konsantrasyonuna karşı amperometrik cevabına ait kalibrasyon grafiği 32
Şekil 3.10 Akış injeksiyon analizi ile glukoz konsantrasyonuna karşı biyosensör cevabı 33
Şekil 3.11 Akış injeksiyon analizi ile glukoz konsantrasyonuna karşı biyosensör cevabına ait kalibrasyon grafiği 33
Şekil 3.12 Oligomerik TSC/GOx elektrodunun farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltametri grafiği 34
Şekil 3.13 Oligomerik TSC/GOx elektrodunun tarama hızlarının kareköküyle akımın değişimi 34
Şekil 3.14 Saf grafit, oligomer elektrot ve modifiye GOx elektrodun sabit tarama hızında voltamogramlarının karşılaştırılması 35
Şekil 3.15 TSC için glukoz oksidaz aktivitesi üzerine pH etkisi 35
Şekil 3.16 Enzim miktarının oluşturulan biyosensör cevabı üzerine etkisi 36
Şekil 3.17 TSC/GOx çalışma kararlılığı 37

BÖLÜM BİR
GİRİŞ

Bilim ve teknolojideki hızlı gelişmeler fiziksel ve kimyasal özellikleri farklı, üretimi kolay ve geniş kullanım alanı olan yeni malzemelerin üretilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Bu nedenle polimerler son yıllarda en çok çalışılan konulardan biri olmuştur.

Bir polimeri oluşturan en küçük moleküle monomer adı verilir. Monomerler birbirlerine kovalent bağlarla bağlanarak kendilerinden daha büyük moleküller oluştururlar. Orta büyüklükte oluşan moleküllere oligomer adı verilirken, yüzlerce monomerin birleşmesinden oluşan daha büyük makro moleküllere ise polimer adı verilir. Uygun koşullar altında birçok molekülün bir araya gelip birleşerek yüksek molekül ağırlıklı bileşikleri oluşturması işlemine de polimerizasyon denir (Davis, 2003).

Polimerlerin hafif olmaları, şekillendirebilme kolaylığı, esnek yapıları, düşük yoğunluklu olmaları, anti-korozyon özellik göstermeleri, kimyasal olarak inert oluşları, elde ediliş maliyetlerinin düşük olması, istenilen ısısal ve mekanik özelliklere sahip olarak sentezlenebilir oluşları ile bazılarının elektriği iletme özelliği bize sağladıkları avantajlardır. Bu avantajlar sayesinde geniş uygulama alanlarına sahiptirler (Uzun ve ark, 2013).

Polimerler metallerle kıyaslandığında; polimerlerin genellikle metallerden daha hafif ve ucuz olduğu, kolay şekil alabildiği fakat; iletken olmadıkları göze çarpmaktadır. Metallerin ise zor işlenebilen, ağır, pahalı olmalarının aksine iletkenlikleri yüksek maddeler olduğu bilinmektedir. Polimerler ile metallerin üstün özellikleri bir araya getirilerek iletkenlik özelliği taşıyan polimerlerin elde edilmesi mümkün olmuştur. Bu amaçla hazırlanan polimerler de iletken polimer olarak adlandırılmışlardır (Saçak, 2004).

Bu çalışmada tiyofen-2-karbaldehit tiyosemikarbazon (TSC) monomerinin sentezi, elektrokimyasal polimerleşmesi ve glukoz biyosensörü geliştirilmesi amaçlandı. Tiyofen-2-karbaldehit tiyosemikarbazon elektrokimyasal yöntemle asetonitril ortamında Tetrabütilamonyumhegzaflorofosfat ($TBAPF_6$) destek elektroliti kullanılarak polimerleştirildi. Polimer FT-IR, SEM ve iletkenlik ölçümleri ile analiz edildi. Glukoz oksidaz enzimi polimer kaplı grafit elektrot üzerine çapraz bağlayıcı ile tutuklandı ve enzim aktivitesi artan glukoz derişimi ile ortamda belirlendi. Enzim elektrot için Lineweaver-Burk grafiği çizilerek Michaelis-Menten sabiti hesaplandı. Hesaplanan K_m ve V_{max} gibi kinetik parametrelerin yanında biyosensörde reseptör olarak görev yapan glukoz oksidaz enziminin optimum pH ve çalışma kararlılığı gibi değerler de hesaplanmıştır (Seven ve ark, 2013).

1.1 İletken Polimerler

İletken polimerler; metallerin elektriksel iletkenliklerini polimerlerin kimyasal ve mekaniksel özellikleriyle birleştirerek, metallerle yarı iletkenler arasında iletkenliğe sahip olan polimerlerdir.

İletken polimerler konusundaki çalışmalar 1950' lerde başlamıştır. İletkenlikleri oda sıcaklığında 10^{-5} S/cm olan yarı iletken polimerler 1950-1960 yılları arasında üretilmiştir. Günümüzdeki anlayışa uygun iletken polimerler 1970' lerin sonunda ortaya çıkmaya başlamıştır. Shirakawa yöntemiyle üretilen poliasetilenin yükseltgen ile dop edilmesi sonucunda iletkenliğinin 108 kat arttırıldığı görülmüştür (Shirakawa ve ark, 1977). İletkenlik konusunda en önemli adım 1979' da Diaz' ın pirolü elektrokimyasal yöntemle yükseltgeyerek polipirolü üretmesiyle atılmıştır. Polipirol anot üzerinde üretilebilmiş ve güçlü bir film olarak yüzeyden çıkarıldığında iletkenliği 100 S/cm' ye ulaşabilmiştir. Benzer şekilde elektro yükseltgenme yöntemiyle iletken politiyofen anot üzerinde üretilebilmiştir (Sahmetlioğlu ve ark, 2013).

1.1.1 İletken Polimerlerin Yapısı

Bir polimerin iletken özellik gösterebilmesi için yapısında konjuge çift bağ içeren zincir bulunması gerektiği belirtilmiştir. Konjuge polimerlerde elektriksel iletkenliğin yapıda yer alan konjuge π bağları ile sağlandığı ise Berets ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüştür. Bu sebepten dolayı çıkış maddesi olarak kullanılacak polimer zincirinde korunabilen aromatik veya konjuge karbon- karbon çift bağları bulunduracak yapıda olması gerekmektedir (Tuncagil ve ark, 2009).

Ancak konjugasyon, iletkenliğin sağlanabilmesi için tek başına yeterli değildir ve polimerlerin iletkenliğinin doplama işlemi ile arttırılması gerekmektedir. Konjuge polimerlerdeki doping olayı, polimerin yükseltgenmesiyle veya indirgenmesiyle meydana gelen bir yük değişimi reaksiyonudur. Yükseltgenme ve indirgenme işlemi polimere iletkenlik özelliği kazandırır. Kimyasal türlerin neden olduğu yükseltgenme sonucunda pozitif yüklü polimer meydana gelir ve yapıya anyon girer. Aynı şekilde indirgenme ile oluşan negatif yüklü polimer yapısına katyon bağlanır.

1.1.2 İletken Polimerlerin Biyosensörlerde Kullanılması

İletken polimerler üzerine yapılan çalışmalar modern bilimin önemli bir parçası olmaktadır. İletken polimerler yalıtkan polimerlerle birlikte kullanılarak biyosensörlerde, pH sensörlerinde ve gaz sensörü olarak teknolojide birçok uygulama alanı bulmuştur. İletken polimerlerin kullanıldığı sensörlerin birçok türü hem kimyasal hem de biyolojik amaçlı olarak kullanılmaktadır. Biyolojik sensörler analitik, biyokimya ve mikroelektronik bilim dallarının birlikte uyumlu kullanılması ile oluşturulan cihazlardır. Bir biyosensör genel olarak uygun bir enerji iletim cihazı ile yakın temasta olan bir biyolojik bileşenin kullanılması ile oluşur. Analiz çözeltisi ile biyolojik bileşenin biyokimyasal reaksiyonu sonucunda oluşan sinyaller, dedektörde elektrik sinyaline çevrilerek okunur. Biyolojik çözeltinin pH' ındaki değişime cevap olarak ölçülen iletken polimerin elektronik iletkenliğindeki değişiklik, biyolojik moleküller için sensör amaçlı kullanılabilir (Ekiz ve ark, 2013).

İletken polimerlerin elektrokimyasal olarak üretilmeleri sırasında polimerlere mediatörler, enzimler, kompleks yapıcı ligandlar ve antikorlar bağlanabilir. İletken polimer kullanılan biyosensörler amperometri, potansiyometri ve çözelti iletkenliği ölçümü gibi yöntemlerden yararlanılarak kullanılırlar (Meerholz ve Heinze, 1995).

1.2 Tiyosemikarbazonların Genel Özellikleri

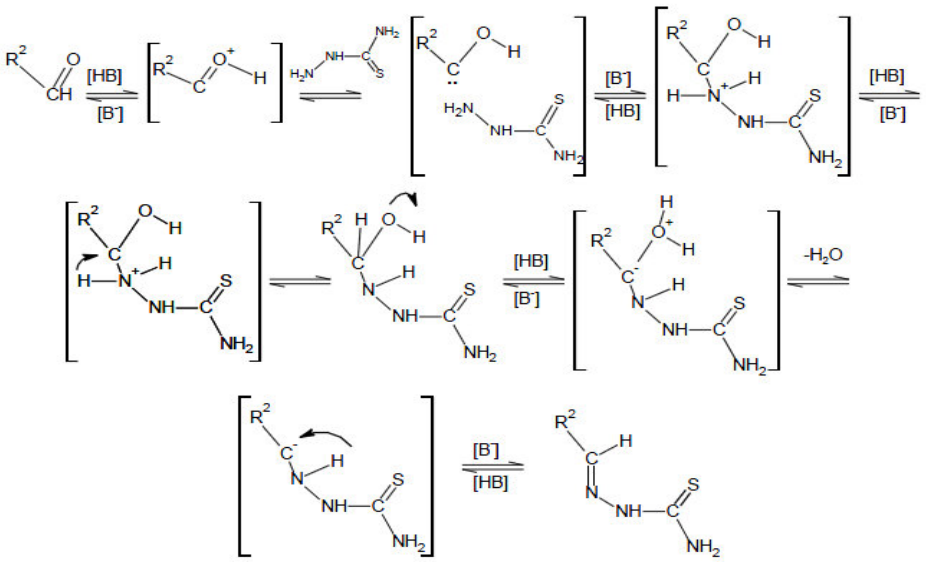
Bir çok tiyosemikarbazon ligantı aldehitlerle ve ketonlarla tiyosemikarbazid bileşiklerinin kondenzasyonu sonucu meydana gelir. Tiyosemikarbazonlar, karbonil bileşiği ve tiyosemikarbazidin etanol/su karışımında 1:1 oranında 1 saat geri soğutucu altında refluks edilmesiyle elde edilmektedir. Reaksiyon kondenzasyon reaksiyonudur ve su çıkışı gerçekleşir (Chen ve ark, 2002).

$$H_2N–NH–C(=S)–NH_2 + R–CHO \rightarrow R–CH=N–NH–C(=S) –NH_2 + H_2O$$

Şekil 1.1 Tiyosemikarbazonların genel eldesi

Tiyosemikarbazonların oluşum mekanizması Şekil 1.2 deki gibidir ve bu oluşum mekanizması şöyle açıklanabilir:

Reaksiyon, karbonil bileşiğinin bir kısmının tuz halinde olduğu ve H^+ iyonu konsantrasyonunun yüksek olduğu ortamda daha kolay gerçekleşir. Karbonil bileşiğindeki oksijen atomunun elektronegativitesi karbon atomundan çok daha yüksektir ve bundan dolayı C=O polardır. Bu polarlık $C^{\delta+}=O^{\delta-}$, elektronca zayıf bir merkez olan karbonil karbonunu nükleofilik saldırılara karşı açık bir pozitif merkez haline getirir. Düzlemsel yapıları nedeniyle nükleofillller karbon atomuna altından ve üstünden rahatlıkla saldırır (Siang ve ark, 1998). Katılma reaksiyonu başında trigonal yapıda olan bileşik, geçiş aşamasında tetragonal olmaya başlar ve oksijen atomu negatifleşir. Geçiş halinin ve ürünün oluşmasına negatif oksijen atomu neden olur. Ancak bu reaksiyona indüktif ve elektronik etkiler de etki etmektedir.



Şekil 1.2 Tiyosemikarbazonların oluşum mekanizması

Tiyosemikarbazon geniş tedavi edici özelliği olan bileşik sınıfına aittir. Bu sınıfın birçok üyesi antineoplastik, anti-inflammatory, tuberkulosik, anti-HIV aktiviteleri göstermektedir. Kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi hala araştırma konusudur (Odacı ve ark, 2008).

Tiyosemikarbazonlar çözeltide tion ve tiol tautomerlerinin bir denge karışımı halinde bulunurlar (Şekil 1.3).



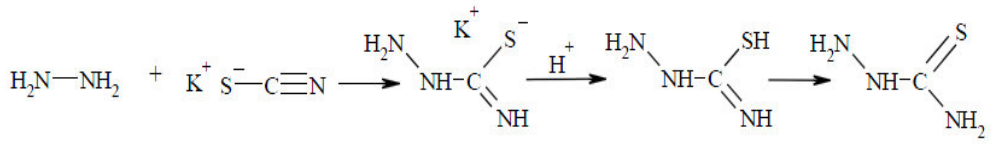
(a) Tion **(b)** Tiol

Şekil 1.3 Tiyosemikarbazonların tion ve tiol tautomerleri

Bu sebeple hazırlanma koşullarına göre (özellikle pH) kompleks, katyonik, anyonik ve nötral olabilir. Metal kompleksi oluştururken tion yapıdaki molekül (Şekil 1.3 a) nötral bidentat olarak davranır. Tiol yapıdaki molekül (Şekil 1.3 b) ise negatif yüklü bidentat olarak hareket eder (Wei ve ark, 2008). Bununla birlikte tiyosemikarbazonların birçok tion grubu metal kompleksleri tanımlanırken, tiol yapıdaki metal kompleksleri yeterince tanımlanmamıştır (Shailendra ve ark, 2006).

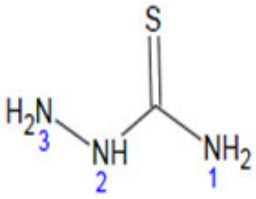
1.2.1 Tiyosemikarbazidlerin Genel Özellikleri

Tiyosemikarbazonların bileşenlerinden biri olan tiyosemikarbazidler, potasyumtiyosiyanat ile hidrazinin susuz alkoldeki reaksiyonu ile elde edilir (Tojal ve ark, 1999). Genel sentez mekanizması Şekil 1.4'deki gibidir.



Şekil 1.4 Tiyosemikarbazidlerin genel sentez mekanizması

Tiyosemikarbazidler, serbest halde su ve etanolde çözünebilen, renksiz, uzun, ince ya da plaklar halinde kristallerdir ve erime sıcaklığı 180-181°C' dir (Liu ve ark, 2007). Tiyosemikarbazid üzerinde üç ayrı azot atomu bulunmaktadır. Her bir azot atomu üzerinde de ortaklanmamış elektron çiftleri bulunmasına rağmen yalnız bir azot atomu karbonil grubuna saldırır. 1 ve 2 numaralı azot atomları üzerinde bulunan elektronlar karbonil grubu ile delokalize olduğundan bu atomlar nükleofilik özelliklerini kısmen kaybederler. 3 numaralı azot atomunda ise böyle bir delokalizasyon söz konusu olmadığından tiyosemikarbazid bu azot atomu ile karbonil gruplarına saldırır (Lobana ve ark, 2009).



Şekil 1.5 Tiyosemikarbazid molekülü

1.3 Biyosensörler

Canlıların çevrelerindeki değişimi algılama ve yanıt verme mekanizmaları, biyosensörlerin geliştirilmesi için temel oluşturmaktadır. Biyosensörler; genelde biyolojik analizler için kullanılan bir çeşit özel sensördür ve '' International Union of

Pure and Applied Chemistry'' (IUPAC) tarafından, ''kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar'' olarak tanımlanmaktadır.

Bütün canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin hücre dışı (in vitro) kullanımı için temel oluşturmuştur. Biyosensör, biyolojik olaylardaki biyokimyasal değişimleri algılayarak, biyolojik olayın teşhisine imkan tanıyan bir ölçme sistemi olarak tanımlanabilir (Gambhir ve ark, 2001).

Biyosensörlerin tarihi 1950'li yılların ortalarında L. C. Clark' ın kandaki glukoz seviyesini ölçmesiyle başladı. Clark ve Lyons' un geliştirdiği birinci nesil biyosensörlerde elektron alıcı olarak oksijen kullanılırken, ikinci nesil biyosensörlerde elektron alıcı olarak redoks medyatörleri kullanılmaya başlanmıştır (Telefoncu, Timur ve Odacı, 2009).

$$\text{Glukoz} + O_2 \xrightarrow{\text{Glukoz oksidaz}} \text{Glukonik asit} + H_2O_2$$

Üçüncü nesil biyosensörlerde enzimin indirgenme yükseltgenme merkezi ile elektrot yüzeyi arasında doğrudan elektriksel iletişim sağlanmış ve indirgenme yükseltgenme medyatörlerine gereksinim kalmamıştır.

Biyosensörlerin yüksek spesifikliği yanında, renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir derişim aralığında doğrudan ölçmeye olanak sağlamak gibi üstünlükleri vardır. Fakat reseptör olarak adlandırılan biyobileşenlerin pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenmesi biyosensörün kullanım ömrünü kısaltmaktadır. Enzim çözünmüş şekilde değilse koenzimin hareketi azalır ve elektronların elektrot ve koenzim arasında taşınması için bir medyatöre gereksinim duyulur (Guisan, 2006).

Medyatörün sahip olması gereken özellikler şu şekildedir :

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

İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler şunlardır:

- Seçicilik
- Kullanım ömrü
- Kalibrasyon gereksinimi
- Tekrarlanabilirlik
- Stabilite
- Yüksek duyarlılık
- Yeterli düzeyde tayin sınırı
- Geniş ölçüm aralığı
- Hızlı cevap zamanı
- Hızlı geriye dönme zamanı
- Basitlik ve ucuzluk
- Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik

a-) Seçicilik

İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden biri seçicilik özelliğidir. Eğer yeterli seçicilik mevcut değilse bu eksiği giderecek uzun ek işlemler gerekir.

b-) Kullanım Ömrü

Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca, biyosensörün kalibrasyon sıklığı, kararlılık, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametrelerini de etkilemektedir.

c-) Kalibrasyon Gereksinimi

İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Fakat bu özellik, teorikte planlandığı gibi pratikte gerçekleştirilememiştir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler sıklıkla kalibre edilmelidirler.

d-) Tekrarlanabilirlik

İdeal bir biyosensör için, elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerinde hemen hemen aynı sonuçların okunması istenir. Pratikte pek mümkün olmayan bu durum göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa biyosensörün uygulamalarının da o denli iyi olduğundan söz edilebilir.

e-) Kararlılık

Elektrot kararlılığının yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Kararlılık, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca; pH, ısı, nem, ortam, O_2 derişimi gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

f-) Yüksek Duyarlılık

Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması ideal biyosensörlerin özelliklerindendir.

g-) Yeterli Düzeyde Tayin Sınırı

Tasarlanan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir derişim değerinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu sınır, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeyle bağlantı kurma eğilimi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir.

h-) Geniş Ölçüm Aralığı

Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörlerden alınan akım-derişim eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır.

ı-) Hızlı Cevap Zamanı

Bir biyosensör elektrodunun cevap zamanı elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Örneğin elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun(yavaş) , tersi söz konusu ise cevap zamanı kısa(hızlı) dır.

i-) Hızlı Geriye Dönme Zamanı

Geriye dönme zamanı örneğin amperometrik çalışmalarda ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Yani ilk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa ikinci örnek de aynı süre sonra ilave edilebilecektir.

j-) Basitlik ve Ucuzluk

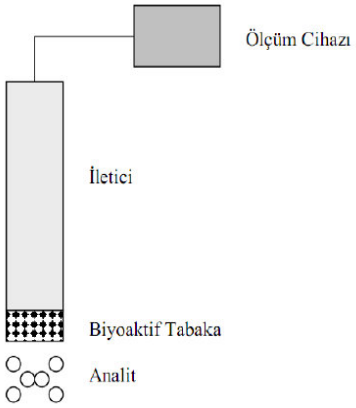
Tasarımı basit ve ucuz, kullanımı rahat biyosensörler ideal biyosensörlerdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve de pahalı olan yapılar daha sonra basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da maliyeti düşürülmüştür.

k-) Küçültülebilirlik ve Sterilize Edilebilirlik

Elektrotların sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir.

1.3.1 Biyosensör Bileşenleri

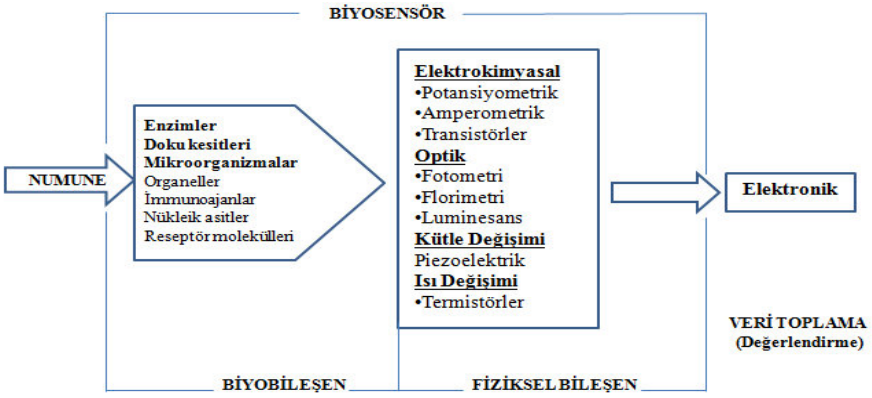
Biyosensörler, genel olarak analizlenecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemiyle kombinasyonuyla oluşturulurlar.



Şekil 1.6 Bir biyosensörün genel şematik gösterimi

Biyosensör teknolojisinde kullanılan analitlere örnek olarak; metaller, substratlar, aktivatörler, inhibitörler, enzimler, koenzimler, hormonlar, antikorlar, antijenler, nükleik asitler, mikroorganizmalar, makromoleküller, virüsler, organik ve anorganik maddeler verilebilir.

Biyosensörlerin ana görevi, biyolojik bir olayın elektrik sinyaline dönüştürülmesidir. Biyosensörler, biyobileşen (biyoreseptörler) ve fiziksel bileşen (transduserler) olmak üzere iki ana kısımdan oluşur (Ru ve ark, 1999).



Şekil 1.7 Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi

1.3.2 Biyobileşenler

Biyobileşenler, biyosensörler de kullanılan ve analiz edilecek madde ile spesifik bir etkileşime giren biyoaktif bileşenlerdir ve biyoreseptörler olarak da adlandırılırlar (Satija ve ark, 2011). Enzimler, doku kesitleri, mikroorganizmalar, organeller, immuno ajanlar, nükleik asitler ve reseptör molekülleri sensörler de biyobileşen olarak kullanılırlar.

1.3.3 Biyobileşen İmmobilizasyonu

Uygun biyobileşen ve fiziksel bileşen seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması en önemli sorundur. Bu bağlanma işlemi biyobileşen immobilizasyonu olarak adlandırılır. Bağlama işleminde çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen biyobileşen ve fiziksel bileşene göre belirlenir. İmmobilizasyon biyobileşenin kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. Biyobileşen immobilizasyonunda başlıca 4 yöntem kullanılmaktadır.

1.3.3.1 Kovalent Bağlama

Biyobileşenin doğrudan fiziksel bileşen yüzeyine ya da önceden uygun bir film veya tabaka ile kaplanmış fiziksel bileşene kimyasal bir reaksiyon sonucu kovalent bağlanmasıdır.

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

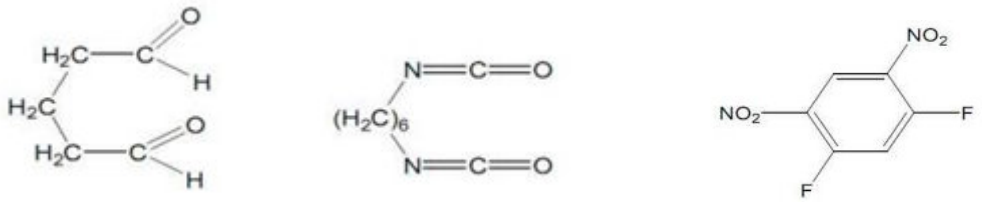
1.3.3.2 Tutuklama

Biyobileşenin bir membran veya tabaka içerisinde hapsedilmesidir. Enzimler makromoleküler yapılı moleküller olup polimer jel tabakalarda ve daha basit olarak

diyaliz membranlarında tutuklanabilirler. Elektrokimyasal polimerleşme diğer bir tutuklama yöntemidir.

1.3.3.3 Çapraz Bağlama

Bu yöntem biyosensör hazırlamasında daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde uygulanır. Çapraz bağlayıcı reaktif olarak gluteraldehit, heksametilen diizosiyanat, diflorodinitrobenzen, bismaleimidoheksan, disüksinilsuberat sık kullanılır. İki fonksiyonlu reaktifler enzimler yanında organeller, hücreler ve antijenlerin immobilizasyonunda da uygulanır. Bazı çapraz bağlayıcıların formülleri Şekil 1.8 ' de verilmiştir.



Gluteraldehit Hekzametilendiizosiyanat 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen

Şekil 1.8 Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri

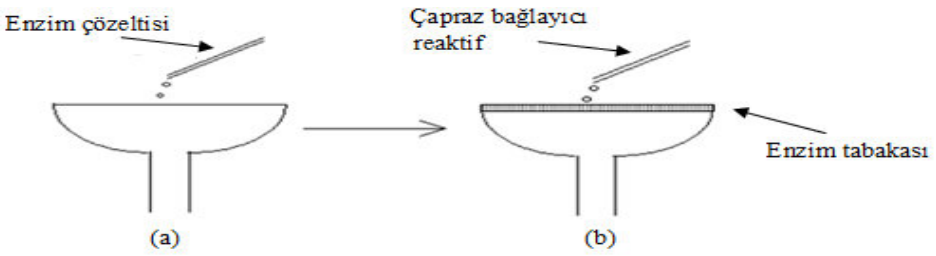
Çapraz bağlamada iki yöntem kullanılır:

a-) Daldırma Yöntemi

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

b-) Doğrudan Bağlama Yöntemi

Bu yöntemde yaklaşık 10 µl enzim çözeltisi bir kılcal boru yardımıyla dünüştürücü yüzeyine ince bir tabaka oluşturacak şekilde damlatılır. Daha sonra çapraz bağlayıcı reaktif ilave edilir. Bu yöntemde daldırma yöntemine göre daha az biyobileşen ile çalışabilmektedir.



Şekil 1.9 Doğrudan bağlama ile enzim immobilizasyonu a) Enzim çözeltisi (b) Çapraz bağlayıcı reaktif ilave edilmesi

1.3.3.4 Adsorpsiyon

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

İmmobilizasyon yöntemine göre biyosensörlerin ortalama ömürleri aşağıda verilmiştir.

Adsorpsiyon : 1 gün
Membranda tutuklama : 1 hafta
Fiziksel tutuklama : 3-4 hafta
Kovalent bağlama : 4-14 ay

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

Elde edilen bu biyosensör ile biyosensörde reseptör olarak görev yapan glukoz oksidaz enziminin K_m ve V_{max} gibi kinetik parametrelerinin yanında, optimum sıcaklık, optimum pH, raf ömrü ve çalışma kararlılığı gibi değerler de incelenmiştir.

1.4 Biyosensörlerin Çalışma Prensibi

Biyosensörlerin çalışması sırasında ilk önce substratın çözelti içerisinden biyosensör yüzeyine taşınması gerçekleşir. Substratın taşınması difüzyon, karıştırma vb. gibi çeşitli şekillerde olabilir. Substrat biyokatalizörün aktif bölgesine difüzlenir. Biyokatalizör polimerik gözenekli membrana (selülozik diyaliz membranı gibi) emdirilmiş veya algılayıcı ile polimerik membran (selofan, selüloz asetat/nitrat, polivinil alkol, poliüretan vb) arasına sandviç edilmiş veya polimerik bir jel içinde hapsedilmiş olabilir. Bu hapsetme işlemi için poliakrilamid, jelatin, kalojen, agaroz vb. gibi doğal veya sentetik polimerler kullanılabilir. Biyokatalizör ve substrat arasında reaksiyon meydana gelen bu etkileşme sonucu gaz molekülleri (O_2, CO_2, NH_3, vb) salınabilir veya kullanılabilir, seçimli iyonlar (H^+, NH_4^+, diğer tek değerlikli anyon ve katyonlar) oluşabilir, ısı ortaya çıkar veya kaybolur, optik yoğunluk değişebilir, elektron salınabilir veya kullanılabilir (Anik ve ark, 2008). Biyokatalizör ve substrat reaksiyonu sonucu oluşan ürün algılayıcı yüzeyine taşınır. Algılayıcı yüzeyinde yukarıda bahsedilen değişimler algılanıp elektriksel devrelerle ölçülebilecek bir boyuta dönüştürülür. Ölçülen elektriksel sinyal analit derişimiyle orantılıdır.

1.5 Enzimler ve Özellikleri

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

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

1.5.1 Enzimlerin Çalışma Mekanizması

Enzimin hangi substratla çalışılacağını saptayan kısmı apoenzim kısmıdır. Demek ki apoenzim kısmıyla substrat arasında bir ilişki vardır. Alman kimyacısı EMIL FISCHER tarafından bunun kilit anahtar uyumu gibi olacağı savunulmuştur. Koenzim kısmı daha çok kimyasal bağa yakın olarak işlev gösterir, örneğin ester bağlarını parçalar. Enzimin apoenzim kısmı bir ya da birkaç yerinden (aktif bölgelerden) substrat molekülüne yapışır ya da bağlanır (yani bir enzim-substrat kompleksi oluşturuyor) ve bu arada koenzim kısmı substrat üzerindeki bağlarla gerçek anlamda birleşmeye veya bağlanmaya giderek onu parçalar. Enzimlerin kimyasal yapıları, özellikle üçüncül yapıları tam olarak bilinmediğinden (ilk yapısı açıklanan enzim ribonükleaz, 124 aminoasitten meydana gelmiştir) çalışma mekanizmaları da halen tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır.

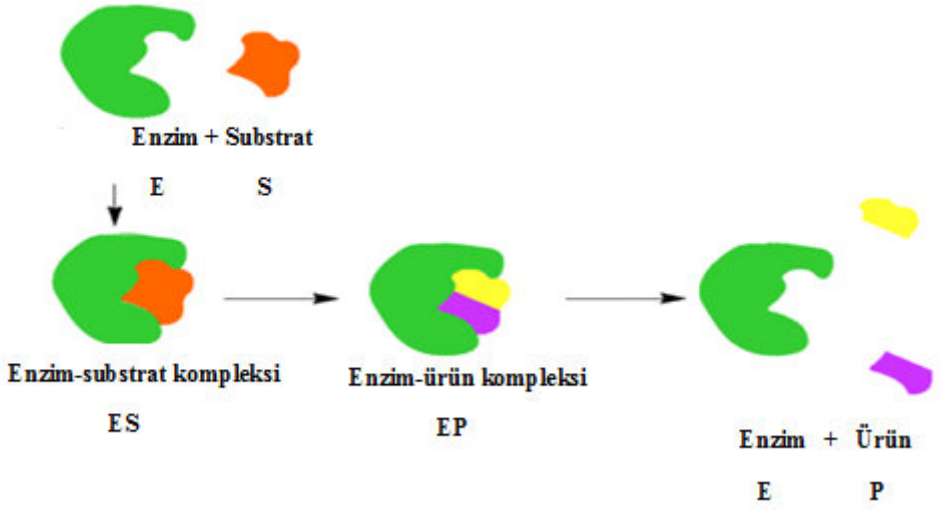
1.5.2 Enzim Reaksiyonlarının Kinetiği

Enzimler reaksiyon kinetiği ve mekanizması yönünden kimyasal katalizörlere benzerler. Reaksiyonda önce enzim ile substrat arasında bir ara bileşik oluşur. Bu kararsız ara bileşiğin oluşma hızı enzim ve substrat derişimine bağlıdır. Reaksiyon koşulları ve enzim derişimi sabit tutulurken substrat derişimi arttırılırsa reaksiyon

hızı belli bir maksimum değere erişir. Bu değerden sonra, substrat derişimi artırılsa bile reaksiyon hızında bir değişme gözlenmez. Bunun nedeni, ortamdaki enzim moleküllerinin ortam substrat moleküllerini karşılayamamasıdır. Başka bir deyişle enzim-substrat ara bileşiğinin oluşum hızında enzim derişiminin kısıtlayıcı rol oynamasıdır. Enzimlerin bu davranışı 1913 yılında L. Michaelis ve Menten tarafından önerilen bir mekanizmayla açıklanmıştır.

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons P + E \qquad (1.1)$$

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



Şekil 1.10 Enzim-substrat ilişkisi (E enzimi, S substratı, ES ara bileşiği ve P ürünü göstermektedir)

Reaksiyon hızı için;

$$Vo = \frac{Vmax.[S]}{Km+[S]} \qquad (1.2)$$

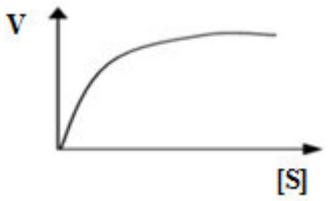
Eşitliğinde elde edilir. Bu eşitlik (1.2)' de görüldüğü gibi belli bir değerden sonra substrat derişiminin artırılmasıyla tepkime hızının artmayıp sabit değerde kalmasını sağlar. Bu denklem Michaelis-Menten eşitliği ve "K_m" de Michaelis-Menten sabiti diye tanımlanır. Fiziksel olarak K_m katsayısı enzim ve substratın birbirine olan

ilgisini göstermektedir. Enzim ve substrat arasındaki ilgi fazla ise oldukça düşük substrat derişimlerinde enzimi substrat ile doyurmak mümkün olur (Devlin, 1997).

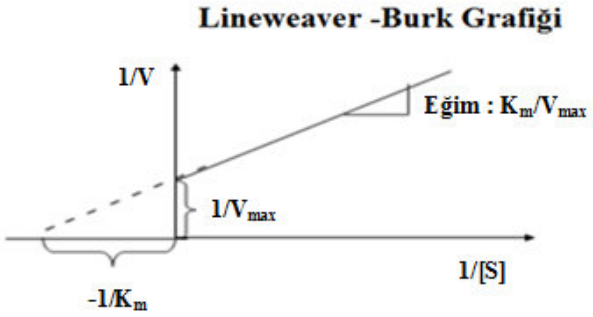
Lineerleştirmek için eşitlik (1.2) nin tersi alınır ve düzenlenirse ;

$$\frac{1}{Vo} = \frac{1}{Vmax} + \frac{Km}{Vmax} \cdot \frac{1}{[S]} \tag{1.3}$$

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



Şekil 1.11 Reaksiyon hızının substrat derişimi ile değişimi (Devlin, 1997)



Şekil 1.12 Lineweaver-Burk grafiği (Devlin, 1997)

Enzimin Km değeri bulunurken Şekil 1.12 'de görünen ve (1.3) denklemi ile tanımlanan Lineweaver-Burk çiziminden yararlanılır.

Michaelis-Menten eşitliği, çözünmüş substratlar ve kütle aktarım kısıtlaması olmayan sistemler için geçerlidir. Bu nedenle çözünmez substrat sisteminde ve immobilize enzimlerde difüzyon kısıtlamalarından dolayı görünür K_m değerleri verilir.

Enzim reaksiyonlarının hızı kimyasal kinetikten farklılık göstererek, sıcaklıkla önce artar; sonra azalır (Şekil 1.13). Başka bir deyişle enzim aktivitesi belirli bir optimum sıcaklığa kadar artar, sonra ısısal deaktivitasyon nedeniyle düşer. Enzimatik reaksiyonlar, kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi bu optimum sıcaklığa kadar Arrhenius kanununa uyar. Bu bölgede reaksiyon hız sabiti ve maksimum hız için;

$$k=A.e^{-Ea/RT} \quad (1.4)$$

$$V_m=k.[E]_0 \quad (1.5)$$

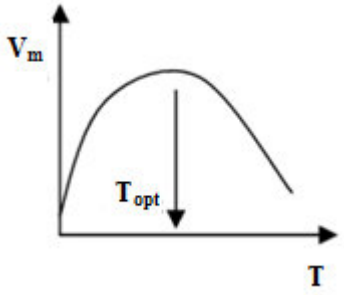
yazılabilir. Bu eşitlikler birleştirilirse ;

$$V_m= [E]_0.A.e^{-Ea/RT} \quad (1.6)$$

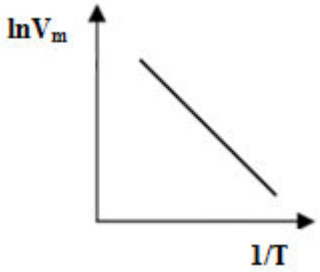
$[E_0].A=\alpha$ sabit ise

$$\ln V_m=\ln\alpha - Ea/RT \quad (1.7)$$

bulunur. Belirli sıcaklık değerlerine karşı gelen maksimum reaksiyon hızları son elde edilen eşitliğe göre grafiğe geçirilirse elde edilen doğrunun eğiminden enzimin aktivasyon enerjisi hesaplanır (Şekil 1.14).



Şekil 1.13 Sıcaklıkla reaksiyon hızının değişimi (Devlin, 1997)



Şekil 1.14 Aktivasyon enerjisinin belirlenmesi (Devlin, 1997)

1.5.3 Glukoz Oksidaz Enzimi

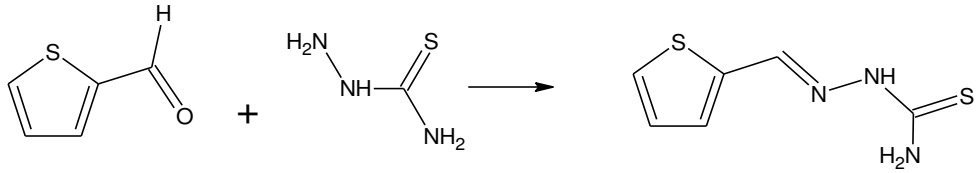
Glukoz oksidaz (GOx) aktivitesi ilk defa 1904'de Maksimow tarafından Aspergillus Niger (A.Niger)'de saptanmıştır. Enzimin oksidatif etkisi olduğunu belirleyen Müller (1928), saflaştırılan enzimin sahip olduğu sarı rengin, bünyesindeki prostetik grupta (flavin adenin dinükleodit, FAD) kaynaklandığını öne sürmüştür. Keilin ve Hartree (1948), oksidasyonun FAD tarafından gerçekleştirildiğini; enzimin açığa çıkardığı H_2O_2 ile antimikrobiyel aktivite gösterip antibiyotik olarak davrandığını belirlemişlerdir. Enzim ticari olarak ilk kez 1952 yılında üretilmeye başlanmıştır. Önceleri enzim kaynağı olarak Penicullum notatum ve Pencillum glaucum kullanılmış olup, günümüzde Aspergillus niger veya Pencillum amagasakienese kullanılmaktadır (Tirkeş ve ark, 2002).

Hidrojen peroksit üretimine neden olan oksidaz enzimi temelli biyosensörler yaygın olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda iletken polimerlere biyokatalizörlerin immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar dikkate değer bir şekilde artmaktadır. Polipirol, polianilin, politiyofen ve türevlerini içeren iletken polimerler ise elektrokimyasal olarak üretilen enzimatik elektrotların başlıcalarıdır.

BÖLÜM İKİ
DENEYSEL KISIM

2.1 Monomer Sentezi

Tiyosemikarbazonlar, tiyokarbonilhidrazinlerin sulu çözeltisi (10 mL suda 0,003 mol) ve tiyofen-2-karboksaldehidin etanoldeki çözeltisi (10 mL suda 0,003 mol) ile 25^0C' de 3 saat boyunca karıştırılmasıyla sentezlendi. Sentez sırasında sistemden sürekli olarak Argon gazı geçirildi. Soğumaya bırakıldıktan sonra çökelti süzüldü ve tekrar kristallendirildi (Sing ve ark, 2006).



Şekil 2.1 Tiyofen-2-karbaldehit tiyosemikarbazon molekülü sentezi

2.2 Oligomer Sentezi

Tiyofen-2-karbaldehit tiyosemikarbazon (TSC) monomeri elektrokimyasal olarak sabit potansiyelde polimerleştirildi. 0,005 g monomer ve 0,387 g $TBAPF_6$ 10 mL asetonitrilde çözüldü. Daha sonra bu karışım elektrokimyasal polimerleşme hücresine konuldu. Elektrokimyasal ölçümler üçlü elektrot sistemi ile yapılmıştır. Karşıt elektrot olarak Pt tel ; referans elektrot olarak, Ag/AgCl ; çalışma elektrodu olarak grafit elektrot kullanılmıştır. Grafit çubuk zımpara kağıdı ile iyice parlatılmış ve distile su ile iyice yıkanmıştır. Elektrokimyasal oligomerizasyon reaksiyonu, grafit elektrot üzerinde oda sıcaklığında 1 saat boyunca +2V sabit potansiyelde biriktirme yapılarak gerçekleştirildi.

2.3 Çapraz Bağlı Enzim Çözeltisinin Hazırlanması

Glukoz oksidaz enziminin çalışma elektrodu olan enzim elektroduna tutuklamak için çapraz bağlayıcıya ihtiyaç duyuldu. Bunun için çalışmamızda çapraz bağlayıcı

olarak glutaraldehit kullanıldı. Gluteraldehit, özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan biyofonksiyonel bir reaktiftir.

Gluteraldehit ilk olarak Quiocho ve Richards tarafından karbosipeptidaz enzimini stabilize etmek için kullanıldı. Gluteraldehit proteinleri birbirine bağlayarak stabilitesini arttırır.

Glutaraldehit ile bir enzim molekülü aşağıda gösterildiği şekilde bağlanır.

$$E\text{-}NH_2 + OHC(CH_2)_3CHO + E^1\text{-}H_2N$$

$$\downarrow$$

$$E\text{-}N{=}HC(CH_2)_3CH{=}N\text{-}E^1$$

Şekil 2.2 Gluteraldehidin bir enzim molekülüne bağlanışı

Gluteraldehit ile enzimlerin bağlanması genellikle nötral pH veya ona yakın bir değerde gerçekleştirilir.

Enzim ve çapraz bağlayıcı oranı %1 olacak şekilde hazırlandı. 5 µL gluteraldehit ve 5 µL glukoz oksidaz enzim çözeltisi karıştırılarak cevaba bakmak için gerekli olan çapraz bağlı enzim çözeltisi hazırlandı.

2.4 Enzim Elektrodunun Hazırlanması

Üçlü elektrot sistemi kullanılarak elektrokimyasal düzenek hazırlandı. Grafit elektrot üzerinde oda sıcaklığında potansiyostat cihazında +2V sabit potansiyelde biriktirme işlemi yapıldıktan sonra oligomerik TSC kaplı grafit elektrot üzerinde GOx immobilizasyonu için, GOx enzimi ve çapraz bağlayıcıdan 5 µL damlatılıp 2 saat kurumaya bırakıldı. İmmobilizasyondan sonra bağ yapmayan enzim moleküllerini uzaklaştırmak için grafit elektrot yüzeyi önce saf suyla sonra fosfat tamponu ile yıkandı. Hazırlanan çapraz bağlı enzim elektrot çalışma elektrodu olarak kullanıldı.

2.5 Biyosensörün Oluşturulması

Elektrokimyasal düzenek için pH 4,5 olacak şekilde 50 mM sodyum asetat tamponu içeren elektrokimyasal düzenek hazırlandı(Bard ve Faulkner, 1980). -0,7 V' a karşılık referans elektrot olarak Ag/AgCl ve karşıt elektrot olarak Pt kullanıldı. Her çalışmadan sonra bağ yapmayan molekülleri uzaklaştırmak için elektrot distile su ile yıkandı ve tampon çözelti yenilendi.Biyosensör cevapları akım yoğunluğu $\mu A/cm^2$ ve akım sinyali μA olacak şekilde elde edilmiştir.TSC/GOx matrisi dönüşümlü voltametri ile elektrokimyasal olarak incelenmiştir. Dönüşümlü voltametri ölçümlerinde daha iyi redoks davranışı elde etmek için 5 mM $(Fe(CN)_6)^{3-/4-}$ ve 50 mM asetat tamponu kullanılmıştır. Sinyaller -0,1 V ve 0,5 V potansiyel aralığında 10 mVs^{-1} dan 150 mVs^{-1}'a kadar farklı tarama hızlarında geri dönüşümlü olarak kaydedilmiştir.

BÖLÜM ÜÇ
DENEYSEL BULGULAR

3.1 Kullanılan Kimyasallar

Glukoz Oksidaz (EC 1.1.3.4, 50 U/mg), gluteraldehit çözeltisi (%25), tetra bütilamonyumhekzaflorofosfat (%98, TBAPF6) , D(+) glukoz Sigma-Aldrich firmasından, asetonitril (ACN) Merck firmasından temin edilmiştir. Ayrıca monomer sentezi için gerekli olan bütün kimyasallar Sigma-Aldrich firmasından sağlanmıştır. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

3.2.1 Fourier Transform İnfrared Spektrometresi (FTIR)

Perkin Elmer Paragon 1000 markalı FT-IR cihazıyla PETKİM Kalite Kontrol ve Teknik Servis Müdürlüğü Ar-Ge Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.2.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Grafit elektrot üzerinde elde edilen numunelerin yüzey analizi Dokuz Eylül Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü'nde JEOL JSM-6060 markalı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır.

3.2.3 Potansiyostat

Deneysel çalışmalar boyunca dönüşümlü voltametrik analizler (ACN/$TBAPF_6$) çözücü-destek elektrolit içeren elektrokimyasal hücrede Palmsens marka potansiyostat ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.4 Elektroliz Hücresi

Elektrokimyasal hücrede ; RW001 markalı ve 3,05 çapında çalışma elektrodu olarak grafit elektrot, Metrohm firmasından temin edilen ve karşıt elektrot olarak kullanılan Pt ve referans elektrot olarak Ag/AgCl kullanılmıştır.

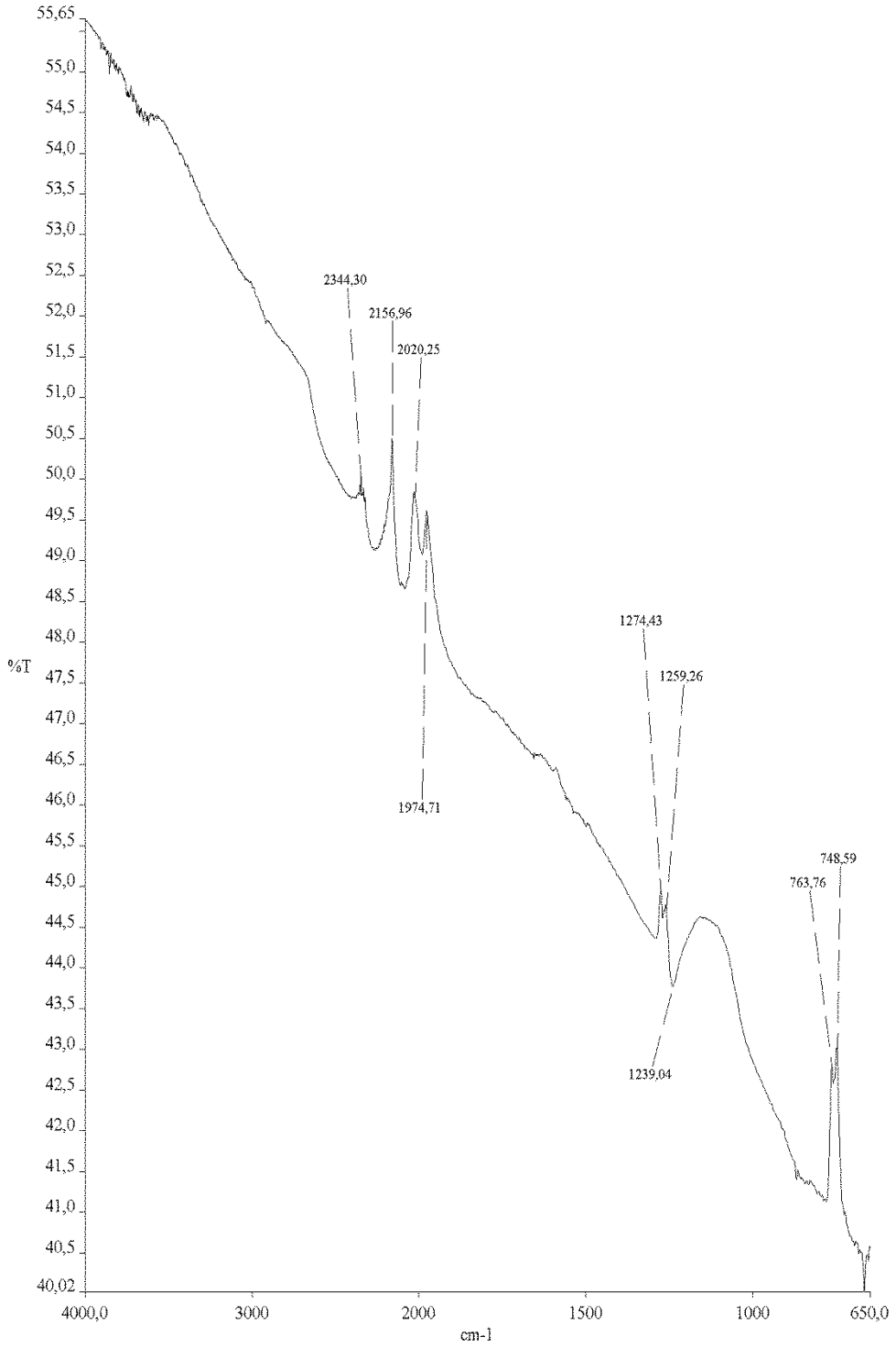
3.2.5 Kronoamperometri

Kronoamperometri ölçümleri Radiometer markalı elektrokimyasal ölçüm ünitesinde gerçekleştirildi.

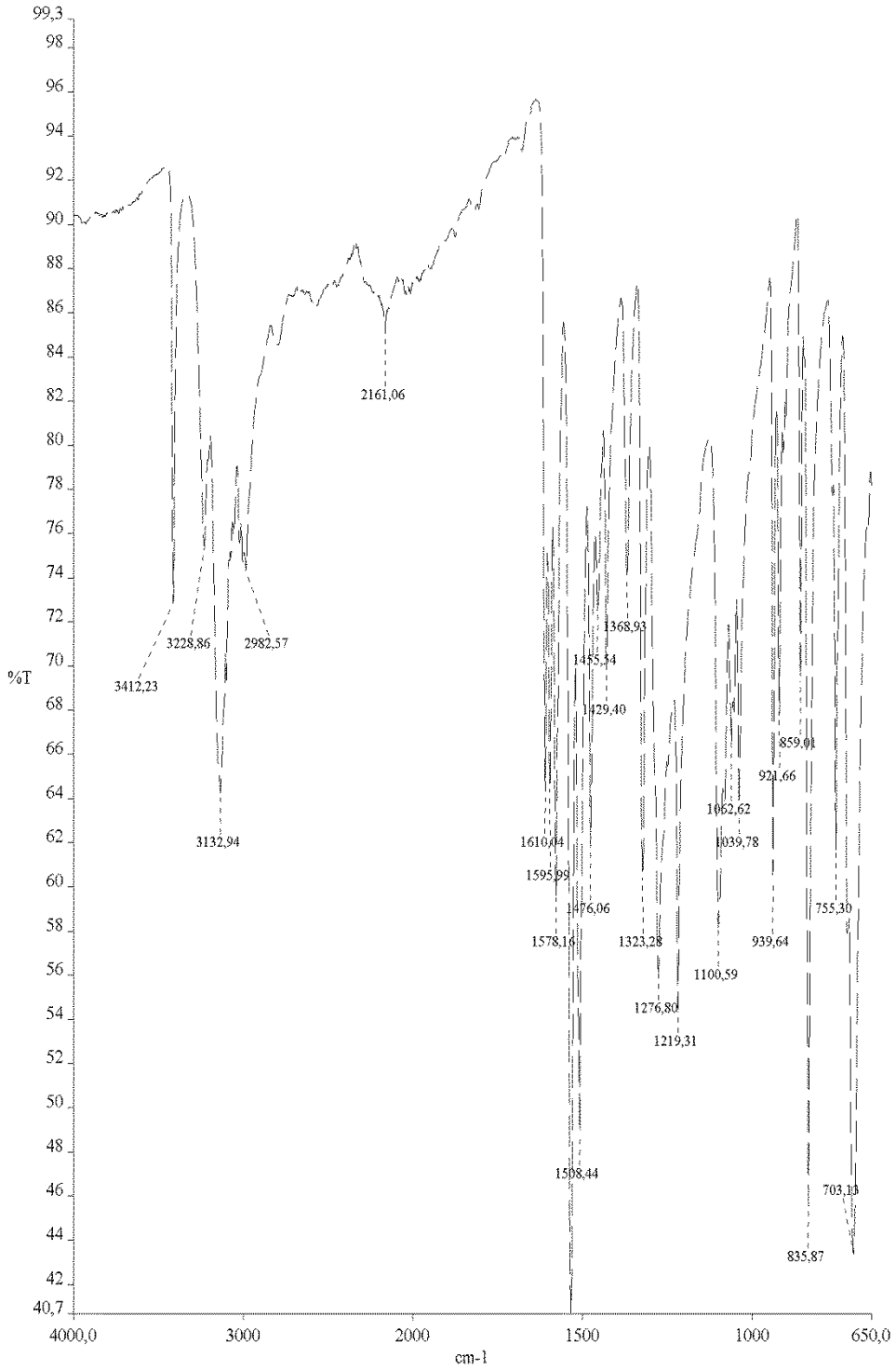
3.3 Deneysel Bulgular

3.3.1 FT-IR Analiz Sonuçları

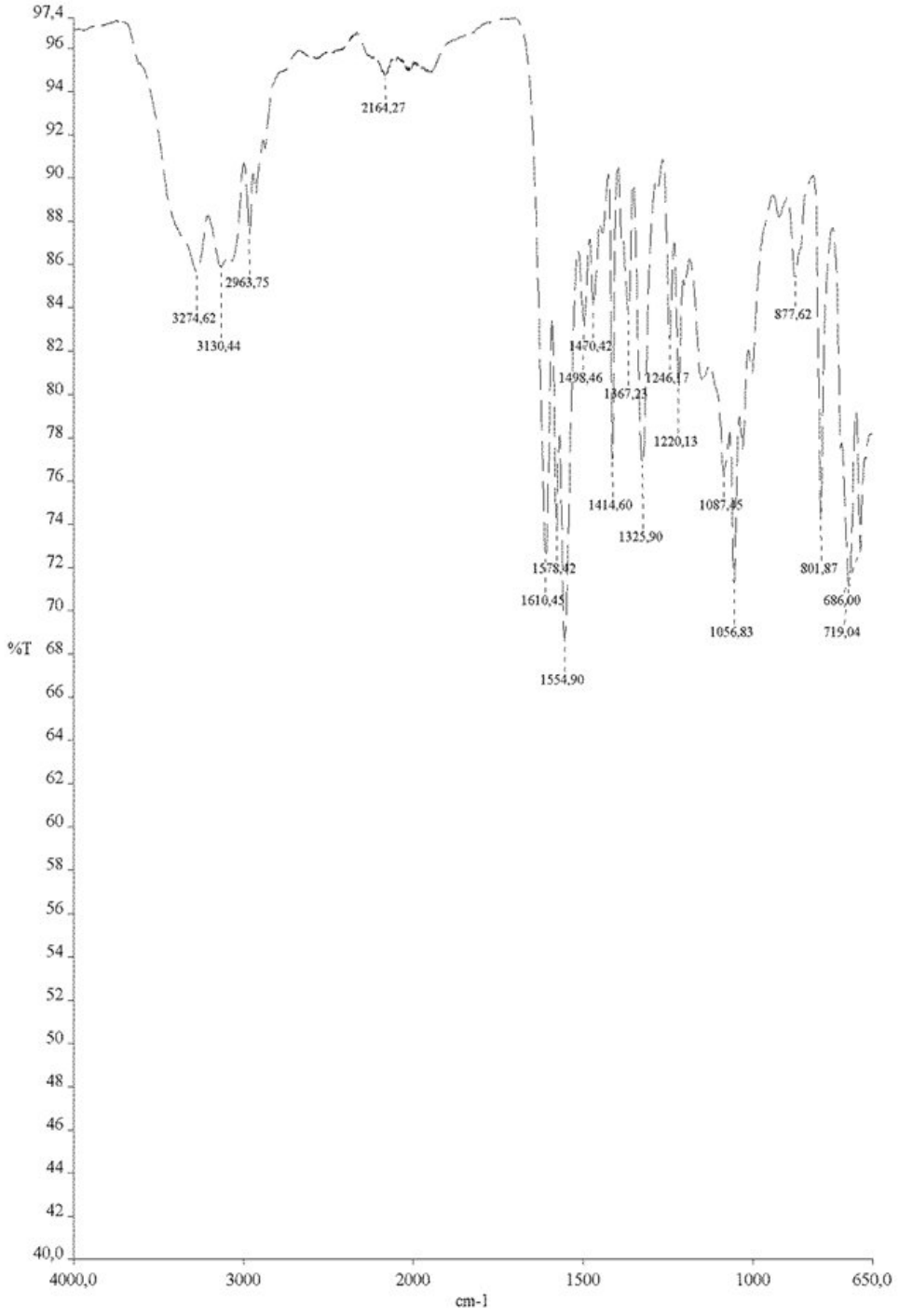
Sentezlenen monomer ve oligomerik TSC filmin yapısı FT-IR ile karakterize edilmiştir. Monomer çözeltide tion ve tiol tautomerlerinin bir denge karışımı halinde bulunur. 2570 cm^{-1} de gözlenen C-SH gerilmesi gözlenmediğinden dolayı 1018-1092 cm^{-1} aralığında C=S gerilmesi gözlenmektedir. Bu aralıkta gözlenen yoğun bantlar molekülün katı halde tion formunda olduğunu göstermektedir. 3147-3343 cm^{-1} de amin grubu titreşimi görülmektedir 1531-1653 cm^{-1} bölgesinde (C=N) azometin den dolayı yoğun pikler görülmektedir. Tiyosemikarbazon molekülünde 716-680 ve 605-597 cm^{-1} bölgelerindeki tiyofen halkasına ait pikler 703 cm^{-1} ve 755 cm^{-1}' de gözlenmiştir. 1087 cm^{-1} ve 1056 cm^{-1} de gözlenen yoğun bant dopant anyonu varlığını ve konjugasyon oluşumunu göstermektedir.



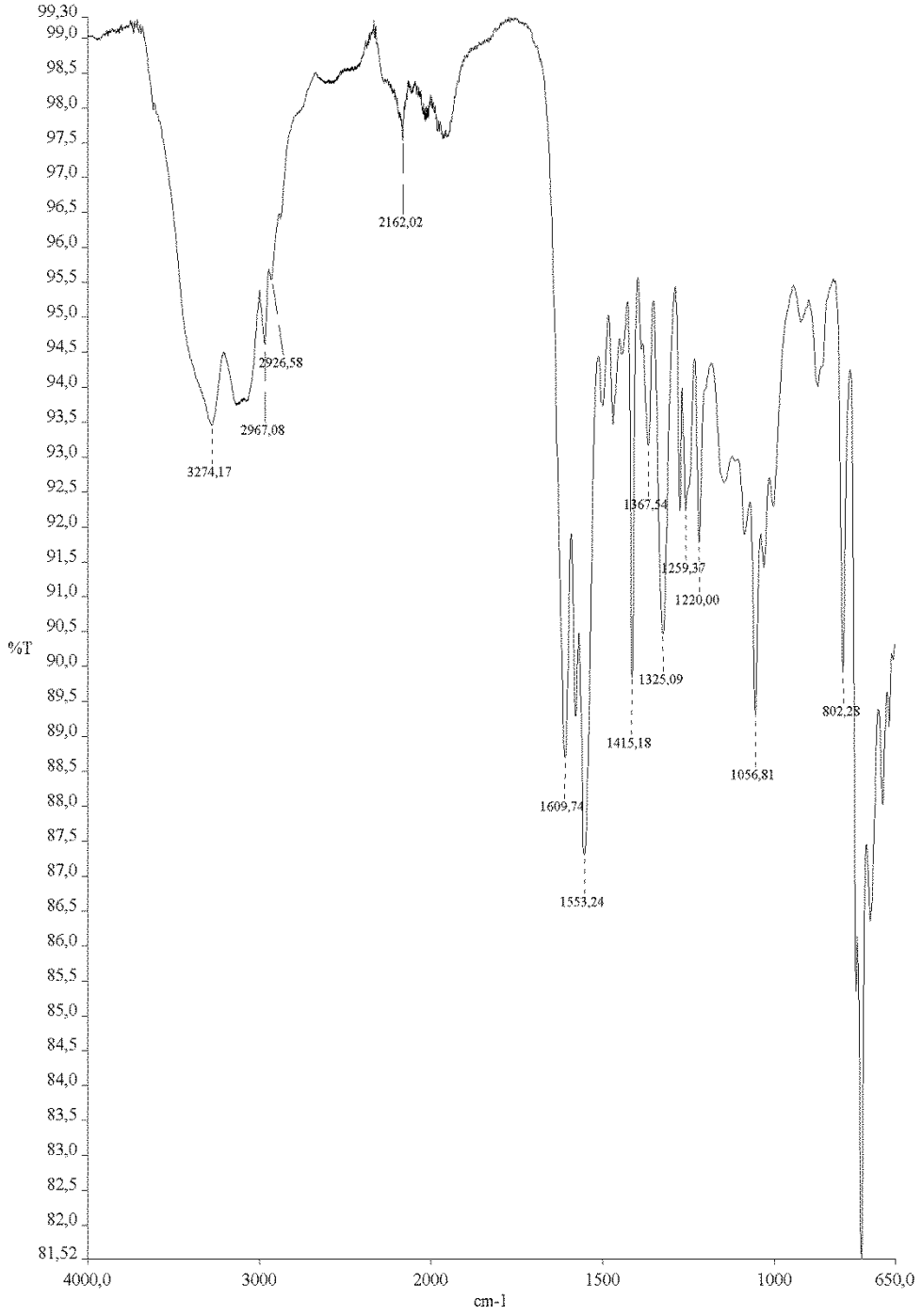
Şekil 3.1 Saf Grafit elektrot için FT-IR



Şekil 3.2 TSC monomeri için FT-IR



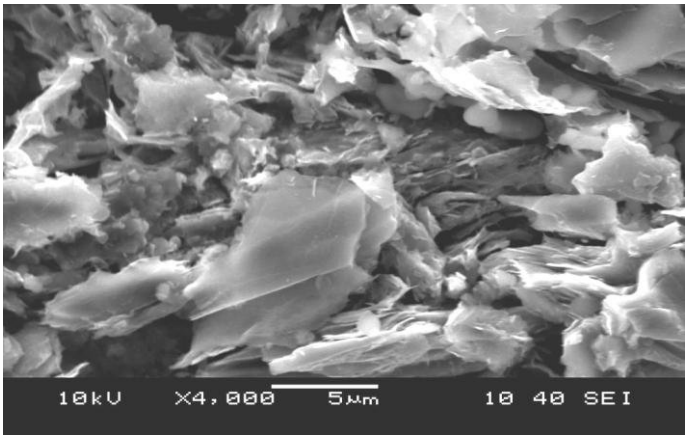
Şekil 3.3 Oligomerik TSC için FT-IR



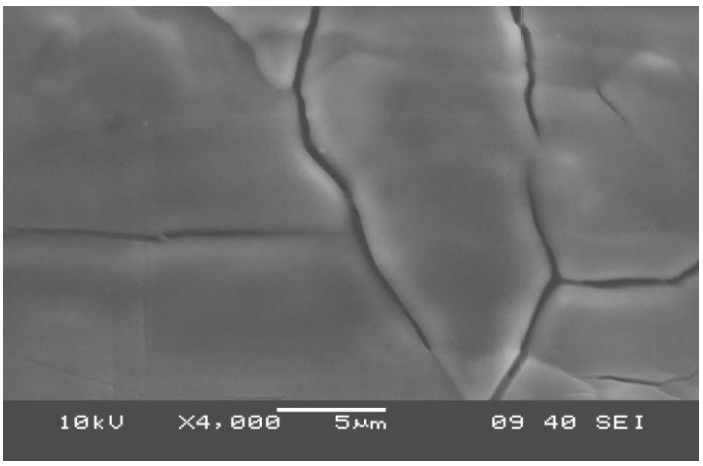
Şekil 3.4 Modifiye GOx elektrot için FT-IR

3.3.2 SEM Analiz Sonuçları

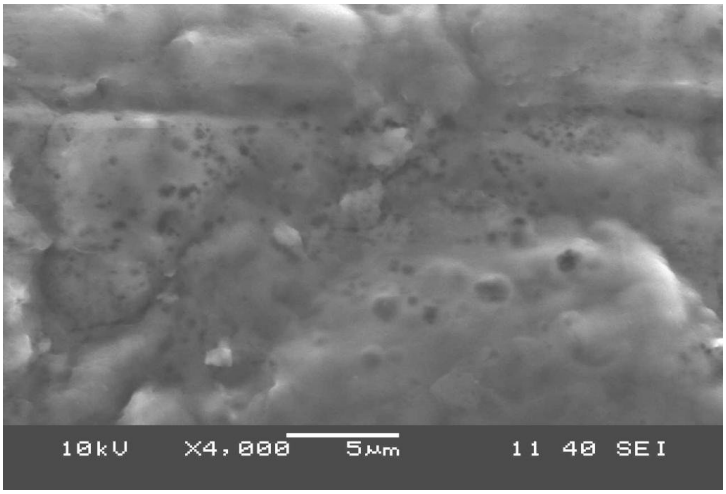
TSC/GOx enzim elektroduna ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri şekillerde görülmektedir. Bu bulgular bize glukoz oksidaz enziminin oligomerik TSC içinde başarılı bir şekilde tutuklandığını göstermektedir. Şekil 3.5 'de saf grafit elektrodun SEM görüntüsü görülmektedir. Şekil 3.6' da grafit elektrodu üzerinde elektrokimyasal olarak sentezlenen TSC molekülünün SEM görüntüsü görülmektedir. Şekil 3.7' de oluşan tabakanın düz bir yüzey olduğu görülmektedir. GOx enzimi yüzey üzerine immobilize edildiğinde yüzeydeki değişiklik enzimin varlığını göstermektedir.



Şekil 3.5 Saf grafit SEM görüntüsü



Şekil 3.6 Saf grafi t+ TSC SEM görüntüsü

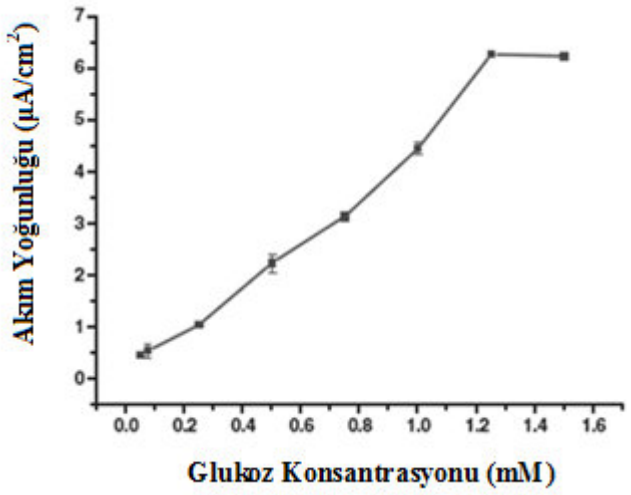


Şekil 3.7 Saf grafit + TSC + enzim SEM görüntüsü

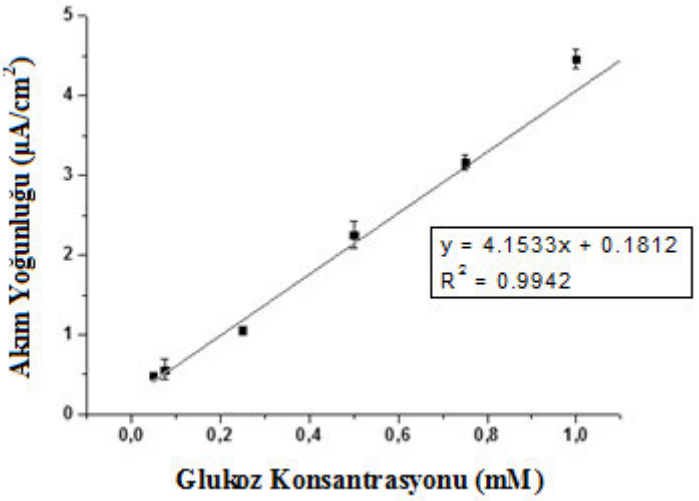
3.3.3 TSC/TBAPF$_6$' nın Glukoza Amperometrik Cevabı

TSC nin amperometrik cevap çalışmaları, grafit elektrot üzerinde kaplanmış TSC/GOx, karşıt elektrot olarak Pt tel ve referans elektrot olarak Ag/AgCl içeren üç elekrotlu bir sistem içinde ve tampon (pH:4,5) ortamında gerçekleştirildi. Deneye başlamadan önce çözeltiye sabit akış hızında oksijen gönderilip, böylece çözeltinin oksijence doygun hale gelmesi sağlandı (Dan ve ark, 2008). Çalışma voltajı -0,7 V' a ayarlanarak elektrot amperometrik olarak işleme alındı. Amperometrik akım -0,7 V' da GOx ve oligomer elektrot arasındaki indirgenme yükseltgenme olayı temeline dayanarak H_2O_2 yükseltgenmektedir.

Elektrodu kararlı hale getirmek için substrat içermeyen çözeltide kararlı hal akım değerine ulaşıncaya kadar sabit gerilimde elektroliz yapıldı. Kararlı hal akım değerine ulaştığı zaman ölçüm ortamına bilinen derişimlerdeki substrat (glukoz) çözeltisinden belli hacimde eklenerek, bu derişime karşılık gelen kararlı hal akım değeri (enzim elektrot aktivitesi) ölçüldü. Daha sonra glukoz çözeltisi ile ölçüm ortamındaki glukoz derişimi arttırılmış ve yeni kararlı hal akım değerinin eldesi için beklenmiştir. Deneyler sırasında manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırma işlemi yapıldı, karıştırıcı kapatılarak akımın sabitlenmesi beklendi. TSC/GOx enzim biyosensörünün cevap süresi 10 sn. olarak belirlendi.

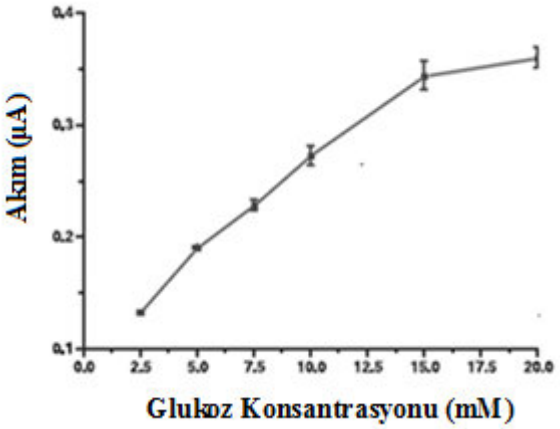


Şekil 3.8 TSC/$TBAPF_6$' nın glukoz konsantrasyonuna karşı amperometrik olarak cevabı

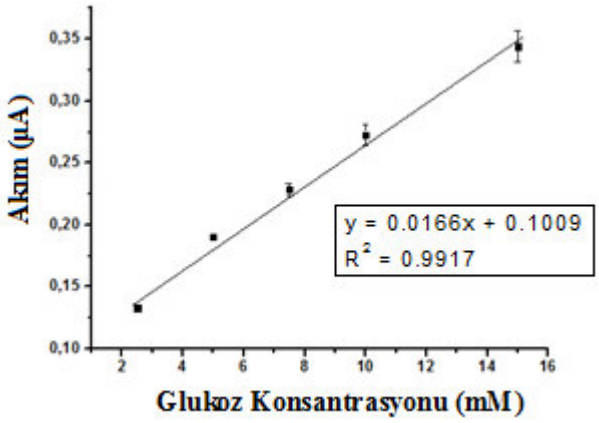


Şekil 3.9 TSC/$TBAPF_6$' nın glukoz konsantrasyonuna karşı amperometrik cevabına ait kalibrasyon grafiği

Ayrıca TSC/$TBAPF_6$' nın glukoza cevabı Akış injeksiyon analizi (FIA) ile incelendi. Akış injeksiyon analizi uygulaması amperometrik yöntem ile aynı deneysel koşullarda (optimum pH ve enzim miktarı gibi) gerçekleştirildi. FIA ile enzim biyosensör cevabı 25 sn. olarak gözlenmiştir.



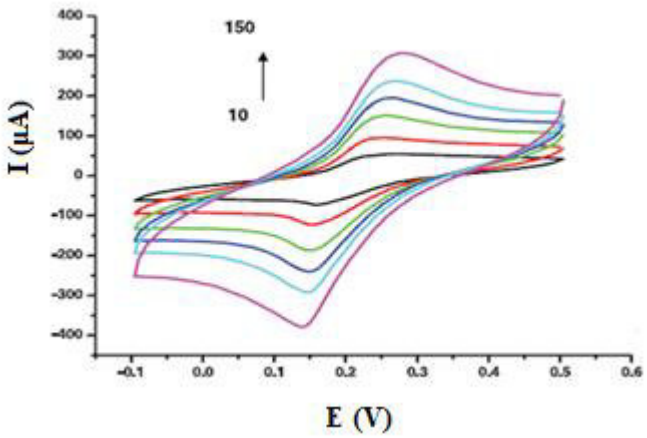
Şekil 3.10 Akış injeksiyon analizi ile glukoz konsantrasyonuna karşı biyosensör cevabı



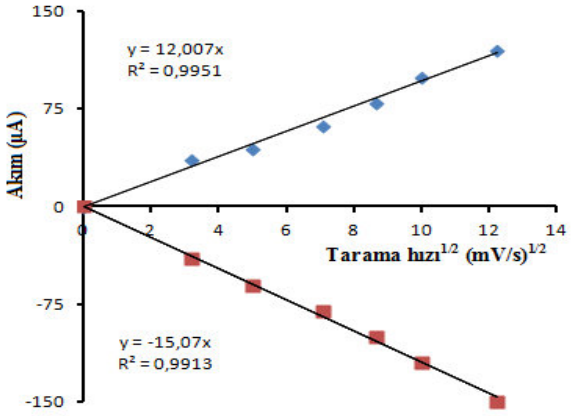
Şekil 3.11 Akış injeksiyon analizi ile glukoz konsantrasyonuna karşı biyosensör cevabına ait kalibrasyon grafiği

3.3.4 Elektrokimyasal Sonuçlar

Grafit elektrot üzerinde oligomerik TSC/Gox filminin elektrokimyasal aktivitesi 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ (HCF) ve 0,1 M KCl redoks sistemiyle dönüşümlü voltamogramları ile ölçülmüştür. +0,3 V da görülen pik HCF 'nin yükseltgenmesine karşılık gelmektedir. Geri dönüşümlü olan bir elektron transfer mekanizması elde edildi. Şekil 3.12' de 10 mVs^{-1} ' den 150 mVs^{-1} ' e artan tarama hızlarında katodik ve anodik pik potansiyelleri hemen hemen sabit değerleri muhafaza ederken CV pik akımlarının arttığı gözlenmektedir. Ayrıca ek olarak tarama hızının kareköküyle pik akımının doğrusal olarak değiştiği görülmektedir (Şekil 3.13).

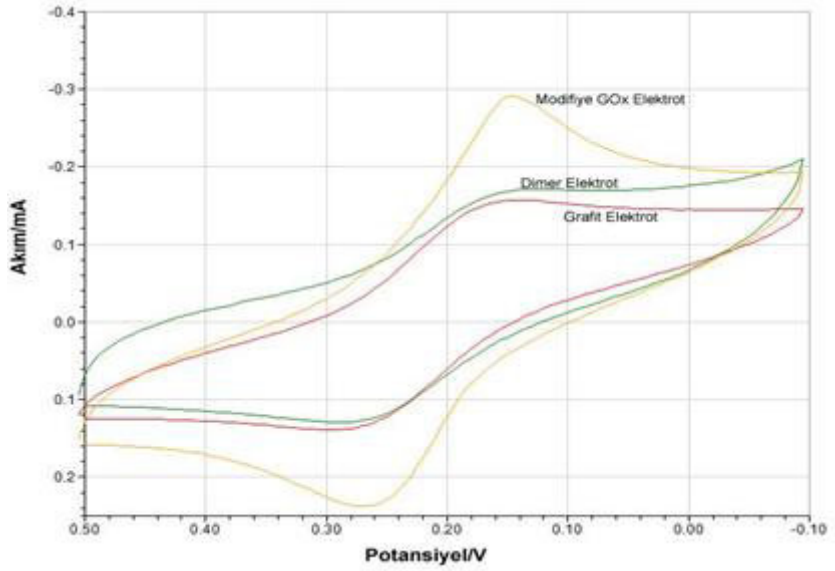


Şekil 3.12 Oligomerik TSC/GOx elektrodunun farklı tarama hızlarındaki dönüşümlü voltametri grafiği



Şekil 3.13 Oligomerik TSC/GOx elektrodunun tarama hızlarının kareköküyle akımın değişimi

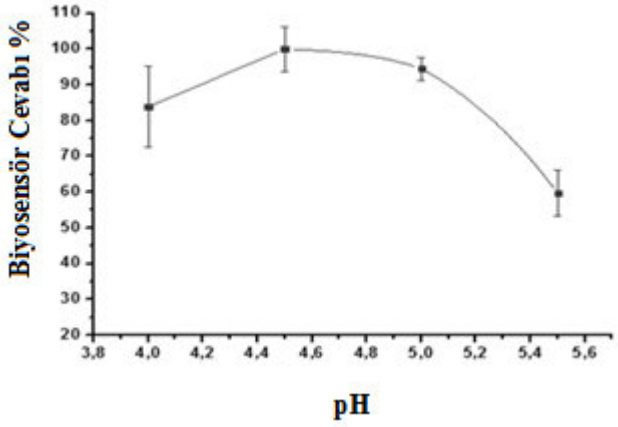
Şekil 3.14' de saf grafit elektrot, elektrokimyasal olarak dimerleşme gösteren elektrot yüzeyinde kaplanan TSC molekülü ve glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu sonucu oluşan grafit elektrodun 100 mV/s sabit tarama hızında elektrokimyasal davranışlarının karşılaştırmalı olarak görüldüğü dönüşümlü voltamogramlar görülmektedir.



Şekil 3.14 Saf grafit, oligomer elektrot ve modifiye GOx elektrodun sabit tarama hızında dönüşümlü voltamogramlarının karşılaştırılması

3.3.5 pH Etkisi

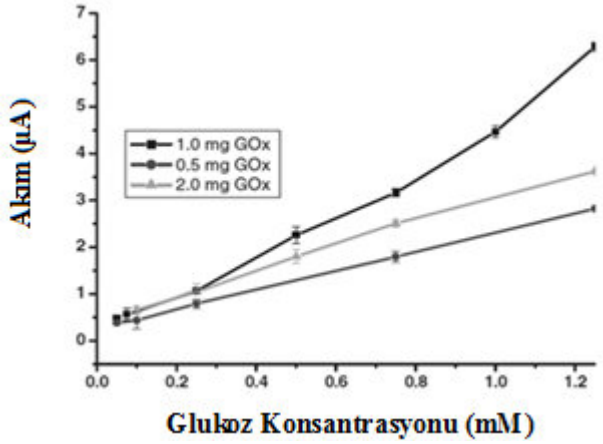
Serbest glukoz oksidaz enzimi için maksimum aktivite pH 4,5 ' de görülmüştür. 25^0C' deki pH optimizasyonları için ortamın pH değeri 4,0 ile 5,5 arasında değiştirilmiştir. Glukoz oksidazın pH 4 den daha düşük asidik ortam içerisinde denatürize olmasından dolayı pH optimizasyonları enzim elektrotları için pH 4,0' dan başlatılmıştır. Grafik incelendiğinde maksimum biyosensör cevabı pH 4,5 de gözlenmiştir.



Şekil 3.15 TSC için glukoz oksidaz aktivitesi üzerine pH etkisi

3.3.6 Enzim Miktarı Etkisi

Amino grubu içeren oligomeric tiyosemikarbazon üzerinde biyomolekülü immobilize etmek ve molekülün kararlılığını sağlamak amacıyla çapraz bağlayıcı olarak %1' lik gluteraldehit kullanılmıştır. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisini incelemek amacıyla gluteraldehit miktarı sabit tutularak glukoz oksidaz enziminin farklı miktarlarını içeren biyosensörler hazırlandı. En yüksek yanıt ve duyarlılık 1 mg GOx enzimi ile elde edilmiştir. Enzim miktarı 2 mg' dan daha düşük olduğunda uygun olmayan matris oluşumu ve homojen olmayan bir tabaka problemleriyle karşılaşılmıştır. Ölçümler 25^0C' de 50 mM sodyum asetat tamponu ile pH 4,5 da gerçekleştirilmiştir. Enzim miktarının akıma karşılık verdiği cevaplar Şekil 3.16' da görülmektedir.

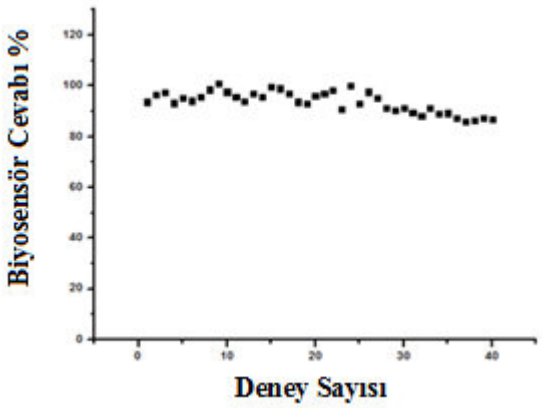


Şekil 3.16 Enzim miktarının oluşturulan biyosensör cevabı üzerine etkisi

3.3.7 Enzim Elektrotların Kullanım Kararlılığı

Enzimler kendi katalitik aktivitelerini çok kolay kaybettikleri ve denatüre oldukları için enzimlerin dikkatli depolanması ve bakımı çok önemlidir. Enzim elektrotlarının tekrar kullanılabilirlik bakımından stabilitesi 1 günde 25^0C' de 50 başarılı ölçüm yapılarak çalışılmıştır. Biyosensörün zamanla aktivitesinin çok fazla değişmemesi kullanılan immobilizasyon tekniğinin iyi olduğunu göstermektedir. Tekrarlanabilirlik biyosensör için çok önemli olup hazırlanan biyosensörle arka arkaya fazla sayıda analiz yapabileceğimizi göstermektedir. Rutin analizlerde tek

ölçmede kullanılan kitler maliyet açısından pahalı olduğu için bu şekilde hazırlanan bir biyosensör daha avantajlıdır.



Şekil 3.17 TSC/GOx çalışma kararlılığı

BÖLÜM DÖRT
TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında tiyofen-2-karbaldehit tiyosemikarbazon (TSC) monomerinin sentezi, elektrokimyasal polimerleşmesi ve glukoz biyosensörü geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla glukoz oksidaz enzimi oligomerik TSC esaslı matris üzerinde grafit elektrot yüzeyinde başarılı bir şekilde tutuklanarak TSC/GOx enzim elektrodu elde edildi.

Çalışmanın birinci aşamasında tiyofen-2-karbaldehit tiyosemikarbazon (TSC) molekülü sentezlendi.

Çalışmanın ikinci aşamasında sentezlenen TSC molekülü elektrokimyasal oligomerizasyon ile çalışma elektrodu olarak kullanılan grafit elektrot üzerinde asetonitril içinde +2V' da 1 saat boyunca biriktirme yapıldı. Daha sonra glukoz oksidaz enzimi çapraz bağlayıcı olarak kullanılan gluteraldehit ile grafit elektrot üzerinde immobilize edildi. Bu şekilde hazırlanan TSC/GOx elektrodu, immobilize edilen biyomolekülün biyosensör uygulamalarını incelemek amacıyla enzim elektrodu olarak kullanılmıştır. FT-IR sonuçlarında TSC molekülünün oligomer halde olduğu, SEM sonuçlarında ise tiyofen-2-karbaldehit tiyosemikarbazonun homojen bir yüzeye sahip olduğu ve glukoz oksidaz enziminin varlığı anlaşılmaktadır.

Geliştirilen glukoz biyosensörünün optimizasyon çalışmaları sonucunda uygun enzim miktarı ve pH değerleri sırasıyla 1 mg ve 4,5 olarak belirlenmiştir.

Son adım olarak TSC/GOx matrisinin çalışma kararlılığı, elektrokimyasal ve amperometrik ölçüm sonuçları değerlendirildi. Geliştirilen biyosensörün karakterizasyonuna ilişkin çalışmalarda glukoz için doğrusal tayin aralığı amperometrik çalışmalar sonucunda 0,05-1 mM konsantrasyonları arasında olduğu ve cevap süresinin 10 sn. olduğu belirlenmiştir. Elektrokimyasal ölçümler 100 mVs^{-1} sabit tarama hızında gerçekleştirilmiş olup anodik ve katodik akım değerlerinin

grafit elektrot, oligomerik TSC elektrot ve modifiye edilmiş GOx elektrotta sırasıyla arttığı gözlenmiştir. Modifiye GOx enzim elektrodunun 10 mVs^{-1}' den 150 mVs^{-1}' e artan tarama hızlarına bakarak elektrokimyasal ölçümler sonucunda GOx enziminin difüzyon şeklinde tutuklandığını söyleyebiliriz. Deney sonuçlarıyla ilgili kinetik parametreler değerlendirildiğinde bu çalışmada K_m değeri 0,75 mM ve V_{max} değeri 6,3 $\mu A/cm^2$ bulunmuştur ve 50 kullanım sonunda %13 aktivite kaybı gözlenmiştir. Bulunan sonuçlar literatürde film matrisi üzerinde oluşturulan GOx enzim immobilizasyonu içeren biyosensörler ile karşılaştırıldığında tiyofen ve pirol yan grubu ile vinil alkol kopolimerinde tutuklama yöntemiyle yapılan enzim immobilizasyonunda K_m değeri 22,58 mM ve V_{max} değeri 1,97 μmol/dk olduğu görülmüştür (Sahmetlioglu ve ark, 2006). Polifenantrolin ile yapılan çalışmada, glukoz oksidaz enziminin kovalent bağlanmasıyla oluşturulan biyosensörde Km değeri 0,64 mM ve glukoz için doğrusal tayin aralığı 0,05-2 mM olarak belirtilmiştir ve yapılan çalışmada polifenantroline ait çalışma kararlılığı belirtilmemiştir (Oztekin ve ark, 2011). Polianilin/poli(akrilonitril-akrilik asit kopolimeri) ile yapılan kompozit film ile glukoz oksidaz eniziminin adsorpsiyon ile tutuklanmasıyla oluşturulan biyosensörde Km değeri 18 mM, doğrusal tayin aralığı 5 μM- 5 mM ve 40 kullanım sonunda aktivite kaybının olmadığı gözlenmiştir (Arslan ve Ustabas, 2011). Km değerinin diğer yapılan çalışmalara göre düşük olduğunun gözlenmesi hazırlanan TSC/GOx enzim elektrot yapısında TSC molekülünün substrat olarak kullanılan glukoza yatkınlığını ve oluşturulan enzim elektrodunun biyosensör olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bütün sonuçlar değerlendirildiğinde TSC/GOx enzim elektrodu ile kolay ve hızlı uygulanabilir bir glukoz sensör sistemi kurulabileceği görülmüştür.

KAYNAKLAR

Anik, Ü., Timur, S., Çubukçu, M. ve Merkoçi, A. (2008). Usage of bismuth film electrode as biosensor transducer for alkaline phosphatase assay. M*icrochimica Acta, 69,* 269-273.

Arslan, F., Ustabas, S. ve Arslan, H. (2011). An amperometric biosensor for glucose determination prepared from glucose oxidase immobilized in polyaniline-polyvinylsulfonate film. *Sensors, 11* (8), 8152-8163.

Bard, A.J. ve Faulkner, L.R., (1980). *Electrochemical methods (Fundamentals and Applications)*. John Wiley & Sons, Inc.

Chen, J., Burrell, A.K., Collis, G.E., Officer., D.L., Swiegers, G.F. ve Wallace, G.G. (2002). Preparation, characterisation and biosensor application of conducting polymers based of ferrocene substituted thiophene and terthiophene. *Electrochimica Acta*, *47*, 2715-2724.

Chiu, J., Yu, C., Yen, M. ve Chen, L. (2009). Glucose sensing electrodes based on a poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/prussian blue bilayer and multi-walled carbon nanotubes. *Biosensors and Bioelectronics*, *24* (17), 2015-2020.

Dan, S., Shanxia, W., Yuanyuan, H. ve Huaiguo, X. (2008). Amperometric glucose biosensor based on in situ electropolymerized polyaniline/poly(acrylonitrile-*co*-acrylic acid) composite film. *Materials Science and Engineering*, *28* (2), 213-217.

Davis, F. (2003*). Polymer chemistry*. United States: Oxford University press

Denga, S., Jian, G., Lei, J., Hu, Z. ve Ju, H. (2009). A glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on nitrogen-doped carbon nanotubes. *Biosensors and Bioelectronics*, *25*, 373-377.

Emre, F.B., Ekiz, F., Balan, A., Emre, S., Timur, S. ve Toppare, L. (2011). Conducting polymers with benzothiadiazole and benzoselenadiazole units for biosensor applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *158*, 117-123.

Ekiz, F., Kolb, M., Timur, S., Bahadır, M. ve Toppare, L. (2013). An amperometric acetylcholine biosensor based on a conducting polymer. *International Journal of Biological Macromolecules*, *59*, 111-118.

Gambhir, A., Gerard, M.,Mulchandani, A. ve Malhotra, B.D. (2001). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *96*, 249.

Guisan, J. M. (Ed.). (2006). *Immobilization of enzymes and cells* (Second edition). New Jersey: Humana Press.

Guerrieri, A., Benedetto, G.E., Palmisano, F. ve Zambonin, P.G. (1998). Electrosynthesized non-conducting polymers as permselective membranes in amperometric enzyme electrodes: a glucose biosensor based on a co-crosslinked glucose oxidase/overoxidized polypyrrole bilayer. *Biosensors and Bioelectronics, 13* (1), 103-112.

Jung, S.K., Namgung, M.O., Oh, S. Y. ve Oh, B. K. (2009). Fabrication of self-assembled oligophenylethynylenethiol monolayer for electrochemical glucose biosensor. *Ultramicroscopy, 109*, 911-915.

Liu, C., Kuwahara, T., Yamazaki, R. ve Shimomura, M. (2007). Covalent immobilization of glucose oxidase on films prepared by electrochemical - copolymerization of 3-methylthiophene and thiophene-3-acetic acid for amperometric sensing of glucose: Effects of polymerization conditions on sensing properties. *European Polymer Journal, 43*, 3264-3276.

Lobana, T. S., Sharma, R. ve Butcher, R. J. (2009). Synthesis, spectroscopy and structures of halogen and sulfur-bridged dinuclear silver(I) complexes with N^1 -

substituted thiophene-2-carbaldehyde thiosemicarbazone. *Polyhedron, 28*, 1103-1110.

Meerholz, K. ve Heinze, J. (1995). Electrochemical solution and solid-state investigations on conjugated oligomers and polymers of the α-thiophene and the p-phenylene series. *Electrochimica Acta, 41,* 1839-1854.

Odacı, D., Kayahan, S.K., Timur, S. ve Toppare, L. (2008). Use of a thiophene-based conducting polymer in microbial biosensing. *Electrochimica Acta, 53* (12), 4104-4108.

Oztekin, Y., Ramanaviciene, A., Yazicigil, Z., Solak, A.O. ve Ramanavicus, A. (2011). 1,10-Phenanthroline modified glassy carbon electrode for voltammetric determination of cadmium(II) ions. *Sensors & Actuators: B. Chemical, 157* (1), 146-153.

Ru, Y. Chuanmin R., Weilin, D., Jiaqi, D. ve Jilie, K. (1999). Electropolymerization of thionine in neutral aqueous media and H_2O_2 biosensor based on poly(thionine). *Electrochimica Acta, 44* (10)*,* 1585-1596.

Sahmetlioglu, E., Yürük, H., Toppare, L., Cianga, I. ve Yagcı, Y. (2006). Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting copolymers of thiophene functionalized poly(vinyl alcohol) with pyrrole. *Reactive and Functional Polymer, 66* (3), 365-371.

Saçak, M. (2004). *Polimer kimyası*. Ankara: Gazi Kitabevi.

Satija, J., Sai, V.V.R., ve Mukherji, S. (2011). Dendrimers in biosensors: Concept and applications. *Journal of Materials Chemistry*, *21*, 14367.

Seven, B., Demirdöven, T., Işgın, E., Odacı, D., Subaşı, E. ve Timur., S. (2013). Oligomeric thiosemicarbazones as novel immobilization matrix in biosensing applications. *Journal of Macromolecular Science*, *50* (4), 392-398.

Shailendra, S., Fareeda, A. ve Mannar, R. (2006). Cyclooctadiene Ru(II) complexes of thiophene-2-carboxaldehyde-derived thiosemicarbazones: synthesis, characterization and antiamoebic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry, 41*, 592–598.

Shirakawa, H., Louis, E.J., MacDiarmid, A.G., Chiang, C.K. ve Heeger, A.J. (1977). Synthesis of electrically conducting organic polymers: Halogen Derivatives of Polyacetylene, $(CH)_x$. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications,* 578-580.

Siang-Guan, T., Show-Hing, A., Hoong-Kun, F. ve Chi-Wi, O. (1998). Synthesis, crystal structure and biological activity of thiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone and its tin complexes. *Journal of Organometallic Chemistry, 508*, 17-21.

Singh, S., Athar, F., Maurya M.R. ve Azam, A. (2006). Cyclooctadiene Ru(II) complexes of thiophene-2-carboxaldehyde-derived thiosemicarbazones: synthesis, characterization and antiamoebic activity. *European journal of Medicinal Chemistry, 41* (5)*,* 592-600.

Singhal, R., Takashima, W., Kaneto, K., Samanta, S.B., Annapoorni, S. ve Malhotra, B.D. (2002). Langmuir–Blodgett films of poly(3-dodecyl thiophene) for application to glucose biosensor. *Sensors and Actuators B*, (86), 42–48.

Telefoncu, A., Timur, S., Odacı, D. (2009). A microbial biosensor base on bacterial cells immobilized on chitosan matrix. *Bioelectrochemistry, 75* (1), 77-82.

Tirkeş, S., Toppare, L., Alkan, S., Bakir, U., Onen, A. ve Yagci, Y.(2002) Immobilization of glucose oxidase in polypyrrole/polytetrahydrofuran graft copolymers. *International Journal of Biological Macromolecules*, *30*, 81

Tojal, J., Orad, A., Serra, L., Pizarro, L., Luis, Lezama., L, Rojo, T. ve diğer (1999). Synthesis and spectroscopic properties of copper(II) complexes derived from thiophene-2-carbaldehyde thiosemicarbazone. Structure and biological activity of [Cu ($C_6H_6N_3S_2$) $_2$]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *75*, 45-54.

Tuncagil, S., Odacı, D., Varış, S., Timur, S. ve Toppare, L. (2009). Electrochemical polymerization of 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1 H-pyrrole as a novel immobilization platform for microbial sensing. *Bioelectrochemistry*, *76* (1), 169-174.

Uzun, S.D., Unlu, N.A., Sendur, M., Ekiz, F., Timur S. ve Toppare, L. (2013). A novel promising biomolecule immobilization matrix: Synthesis of functional benzimidazole containing conducting polymer and its biosensor applications. *Colloids and Sufaces B: Biointerfaces*, *112*, 74-80.

Wei, Z., Xu, J., Zeng, L., Le, Z., Shen, L. ve Pu, S. (2008). A free-standing poly(9-(6-(thiophene-3-yl)hexyl)-9H-carbazole) films: electrosyntheses from a novel carbazole monomer bearing thiophene moiety. *Journal of Materials Science*, *43*, 1008–1012.

Varis, S., Ak, M., Tanyeli, C., Akhmedov, I. M. ve Toppare, L. (2006). Synthesis and characterization of a new soluble conducting polymer and its electrochromic device. *Solid State Sciences*, *8*, 1477–1483.