DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENZİMATİK BİYOSENSÖR OLARAK KULLANILAN İLETKEN POLİMERLERİN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM İLE SENTEZLENMESİ VE SENSÖR ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Hatice YILDIRIM

Ekim, 2014
İZMİR

ENZİMATİK BİYOSENSÖR OLARAK KULLANILAN İLETKEN POLİMERLERİN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM İLE SENTEZLENMESİ VE SENSÖR ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Hatice YILDIRIM

Ekim, 2014

İZMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

HATİCE YILDIRIM, tarafından **PROF.DR. ELİF ŞAHİN IŞGIN** yönetiminde hazırlanan **"ENZİMATİK BİYOSENSÖR OLARAK KULLANILAN İLETKEN POLİMERLERİN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM İLE SENTEZLENMESİ VE SENSÖR ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ"** başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Elif ŞAHİN IŞGIN

Yönetici

Prof. Dr. İlgi Kaplan

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Seyda Ayşe Silo

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Ayşe OKUR
Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

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

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

Laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan arkadaşım Emine GÜLER' e teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan maddi ve manevi olarak her zaman desteklerini gördüğüm annem Filiz YILDIRIM, babam Yaşar YILDIRIM' a teşekkür ederim.

Bu çalışmayı 2012.KB.FEN.052 numaralı bilimsel araştırma projesi ile destekleyen Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

Hatice YILDIRIM

ENZİMATİK BİYOSENSÖR OLARAK KULLANILAN İLETKEN POLİMERLERİN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM İLE SENTEZLENMESİ VE SENSÖR ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZ

Bu çalışmada, tiyofen bazlı rutenyum kompleksini temel alan enzim biyosensörler geliştirilmiştir. Glukozoksidaz enzim biyosensörü ile glukoz tayini amaçlanmıştır. Döngüsel voltametrik yöntemle elektropolimerizasyon işlemi uygulanarak grafit elektrot yüzeyi iki farklı rutenyum kompleksi ile modifiye edilmiştir. Monomerlerin amino grupları arasında gluteraldehit vasıtasıyla kovalent bağlar oluşturularak glukoz oksidaz immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Batch (kesikli) sistemde hazırlanan biyosensöre ilişkin pH 4,0 azot gazından geçirilmiş 50 mM asetat tamponu optimum pH, monomerin elektrokimyasal polimerizasyonun süresi için en iyi biyosensör cevabının 50 döngü olduğu bulunmuştur. Glukoz tayinine yönelik elde edilen doğrusal tayin aralıkları belirlenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM), fourier transfer infrared spektroskopisi (FTIR) karakterizasyon için kullanılmıştır. Son olarakta biyosensörün tekrarlanabilirliği gerçekleştirilmiştir ve biyosensör gerçek bir örnek üzerinde glukoz belirlenmesi için uygulanmıştır.

Anahtar kelimeler: Biyosensör, iletken polimerler, tiyosemikarbazon.

ENZYMATIC BIOSENSOR BY ELECTROCHEMICAL METHOD OF CONDUCTING POLYMERS USED AS SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF SENSOR CHARACTERISTICS

ABSTRACT

At this study, enzyme biosensors has been developed. These biosensors are based on ruthenium complex with thiophene. It is aimed to examine to glucose with enzymatic biosensor of glucoseoxidase. By using cyclical voltametric method, process of electropolymerization has been applied an surface of graphite electode has been modified with two different complex of rutenium. Covalent bonds have been created among amino groups of monomers by means of glutardeyhte and so immobilization of glucose oxidase has been provided.

Related to biosensor which has been prepared in the system of batch, pH 4 optimum acetate buffer which has been carried from nitrogen gas it is found that the best reply is 50 cycle for the time of monomer's electrochemical polymerization biosensor. Interval of linear of appointment of glucose which has been obtained . Scanning electron microscobe (SEM) and fourier transfer infrared spectroscopy (FTIR) have been used for surface characterization. Finally, the repeatability of biosensor was applied on a real example to determine glucose.

Keywords: Biosensor, conducting polymer, thiosemicarbazone.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZ iv
ABSTRACT v
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
TABLOLAR LİSTESİ xi

BÖLÜM BİR – GİRİŞ 1

1.1 İletken Polimerler 1
1.1.1 İletken Polimerlerin Sentez Yöntemleri 3
1.1.1.1 Kimyasal Yöntem 3
1.1.1.2 Elektrokimyasal Yöntem 4
1.1.2 İletken Polimerlerin Kullanım Alanları 5
1.1.2.1 Şarj Edilebilir Piller 6
1.1.2.2 pH Sensörleri-Gaz Sensörleri 6
1.1.2.3 İyon Seçici Elektrotlar 7
1.1.2.4 Elektrokromik Cihazlar 7
1.1.2.5 Biyosensörler 7
1.1.3 Enzimler 7
1.1.4. Glukoz Oksidaz Enzimi 9
1.2 Biyosensörler 10
1.2.1 Biyokomponent Seçimine Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması 11
1.2.1.1 Enzimatik Biyosensörler 11
1.2.1.1.1 Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensörleri 12
1.2.1.1.1.1 Amperometrik Esaslı Enzim Sensörleri 12
1.2.1.1.1.2 Potansiyometrik Esaslı Enzim Sensörleri 13
1.2.1.1.1.3 Yarı İletken Esaslı Enzim Sensörleri 13
1.2.1.1.2 Optik Esaslı Enzim Sensörleri 13

1.2.1.1.3 Kalorimetrik Esaslı Enzim Sensörleri 13
1.2.1.1.4 Piezoelektrik Esaslı Enzim Sensörleri 14
1.2.1.2 Mikrobiyal Biyosensörler 14
1.2.1.3 İmmunosensörler 15
1.2.1.4 DNA Biyosensörleri 15
1.2.2 Biyosensörlerde Biyokomponentlerin İmmobilizasyonu 16
1.2.2.1 İmmobilize Enzim Kullanmanın Avantajları 16
1.2.3 Transduser Yüzeyinin Kaplanması 17
1.3 Rutenyum ve Tiyosemikarbazon Özellikleri 17

BÖLÜM İKİ - MATERYAL VE METOT 19

2.1 Sentezler 19
2.1.1 Tiyofen-2-karboksaldehit Tiyosemikarbozonun sentezi 19
2.1.2 (η^6-p-simen)klorobis (tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S) rutenyum(II)klorür Sentezi (1) 20
2.1.3 Trans-difenilkarbonilkloro(tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S) Rutenyum(II) Sentezi (2) 20
2.2 Kimyasallar 21
2.3 Ekipman 21
2.4 Yöntemler 22
2.4.1 Biyosensörlerin Hazırlanması 22
2.4.2 Biyosensörlerin ile Ölçüm İlkesi 22
2.5 Kesikli (batch) Sistem ile Yapılan Çalışmalar 23
2.5.1 Optimum pH'nın Belirlenmesi 23
2.5.2 Biriktirme Süresinin Optimizasyonu 23
2.5.3 Doğrusal Tayin Aralığı 23
2.5.4 Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği 23
2.5.5 Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri 24
2.5.6 Fourier Transform Infrared Spektrometresi (FTIR) 24
2.5.7 Örnek Uygulama 24

BÖLÜM ÜÇ – DENEYSEL VERİLER 25

3.1 Ru(II)TSCs Biyosensörlerin Optimizasyonuna İlişkin Veriler..... 25
3.1.1 Optimum pH'nın Belirlenmesi 25
3.1.2 Biriktirme Süresinin Optimizasyonu 26
3.2 Ru (II) TSC Biyosensörlerinin Karakterizasyonu 27
3.2.1 Doğrusal Tayin Aralığı..... 27
3.2 Biyosensörlerin Karakterizasyonu 28
3.2.1 SEM Görüntüleri 28
3.2.2 FTIR Analiz Sonuçları..... 29
3.3 Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği 33
3.3.1 Örnek Uygulama..... 33

BÖLÜM DÖRT – TARTIŞMA VE SONUÇ 34

KAYNAKLAR..... 37

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 İletken polimerlere ait kimyasal yapılar 2
Şekil 1.2 Elektrokimyasal polimerleşme hücresi 5
Şekil 1.3 İletken polimerlerin kullanım alanları 5
Şekil 1.4 Glikoz oksidaz enziminin reaksiyonu 9
Şekil 1.5 Bir biyosensörün şematik gösterimi 10
Şekil 1.6 Enzimatik biyosensörün şematik gösterimi. 11
Şekil 1.7 Enzim sensörlerinin sınıflandırılması. 12
Şekil 2.1 Tiyofen-2-karboksaldehit Tiyosemikarbozonun Oluşumu 19
Şekil 2.2 [(η6-p-simen) RuCITSC^{N-S}]Cl sentez reaksiyonu 20
Şekil 2.3 [Ru(CO)Cl(PPh_3)$_2$TSC^{N-S}] sentez reaksiyonu 21
Şekil 3.1 0,1 M Asetonitril çözeltisi içindeki elektrokimyasal polimerizasyon sırasında dönüşümlü voltogram A) [(η6-p-simen) RuCITSC^{N-S}]Cl monomerinin birikimi B) [Ru(CO)Cl(PPh_3)$_2$TSC^{N-S}] monomerinin birikimi 26
Şekil 3.2 Biyosensör cevabı üzerine pH'nın etkisi (50mM; sodyum asetat tamponu; oda sıcaklığı). 26
Şekil 3.3 Biyosensör cevabı üzerine biriktirme süresinin etkisi 26
Şekil 3.4 (η6-p-simen) klorobis (tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon- N,S) rutenyum (II)klorür monomeri ile hazırlanan biyosensörün glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği 27
Şekil 3.5 Transdifenilkarbonilkloro (tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S) Rutenyum (II) monomeri ile hazırlanan biyosensörün glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği 28
Şekil 3.6 [(η6-p-simen) RuCITSC^{N-S}]Cl monomeri için, A) Saf grafit elektrot, B) Ru (II) TSC oligomeri, C) Ru (II) TSC/Gox 28
Şekil 3.7 [Ru(CO)Cl(PPh_3)$_2$TSC^{N-S}] monomeri için, A) Saf grafit elektrot, B) Ru (II) TSC oligomeri, C) Ru (II) TSC/Gox 29
Şekil 3.8 Saf grafit elektrodu FTIR spektrumu. 31

Şekil 3.9 Grafit elektrot üzerine birikmiş (η6-p-simen) klorobis(tiyofen-2 karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S) rutenyum (II) klorür oligomerinin FTIR spektrumu. 31
Şekil 3.10 Enzim immobilizasyonu gerçekleşmiş (η^6-p-simen) klorobis(tiyofen-2 karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S) rutenyum (II) klorür oligomerinin FTIR spektrumu. 32
Şekil 3.11 Grafit elektrot üzerine birikmiş transdifenilkarbonilkloro (tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S) rutenyum (II) oligomerinin FTIR spektrumu. 32
Şekil 3.12 Enzim immobilizasyonu gerçekleşmiş transdifenilkarbonilkloro(tiyofen-2- karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S) rutenyum(II) oligomerinin FTIR spektrumu. 33

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 Deneyde kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri firmalar..... 21
Tablo 2.2 Referans metot prosedürü 24
Tablo 3.1 Örnek uygulama sonucu..... 34

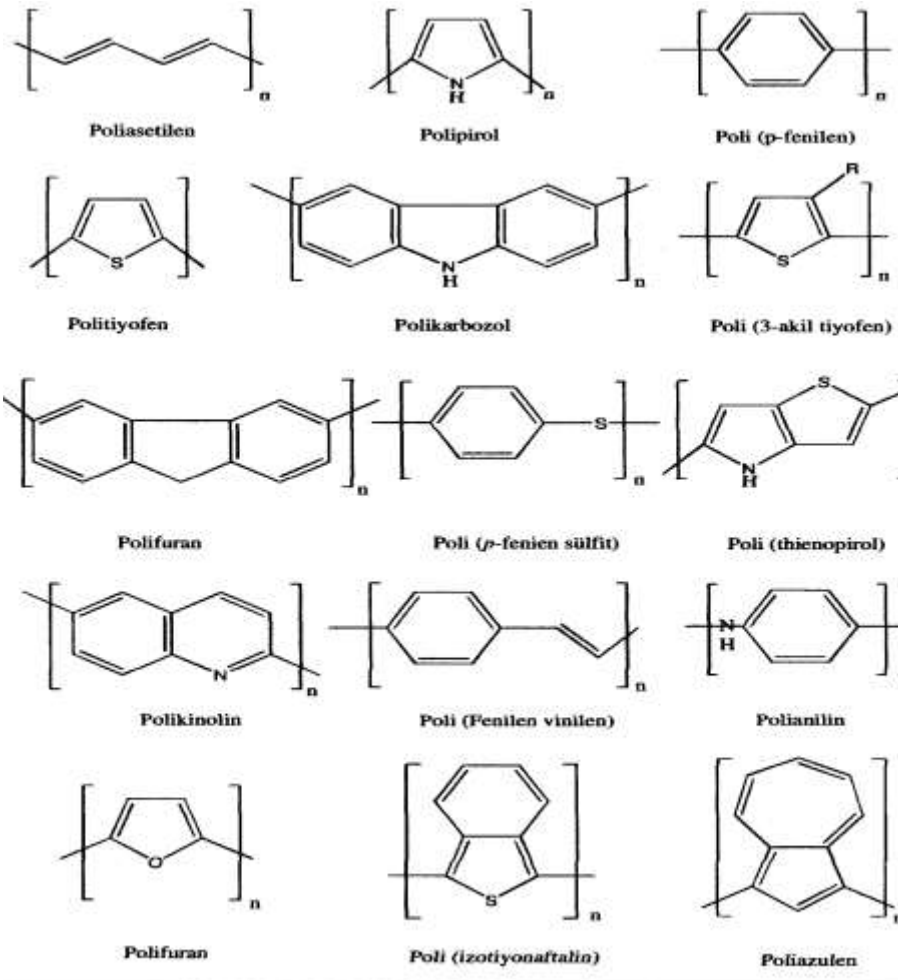
BÖLÜM BİR
GİRİŞ

1.1 İletken Polimerler

Yeni bir materyal sınıfı olan organik iletken polimerler, kolay sentezlenmeleri, yüksek çevresel kararlılık ve elektrokimyasal özellikleri nedeniyle 1977'den bu yana büyük ilgi çekmektedir (Tuncagil, ve diğer., 2009).

İletken polimerler, polimerik zincirler boyunca tek ve çift karbon-karbon bağlarının değişmesiyle oluşan fonksiyonel polimerlerin bir sınıfıdır (Xia, Wei ve Wan, 2010).

Bu polimerler polimer zinciri boyunca Π-konjugasyonuna sahiptirler. İletken polimerler (CP) polianilin (PANI), polipirol (Ppy), politiyofen, poli(fenilen), poli(fenilen vinilen) gibi poliaromatik ya da polienler sınıfına aittir. Başlıca iletken polimerlere ait kimyasal yapılar Şekil 1.1'de gösterilmiştir. Bunların arasından PANI bilinen eski iletken polimerdir ve 1862 yılında hazırlanmıştır. İletken polimerler kimyasal ya da elektrokimyasal oksidasyon yoluyla sentezlenebilir (Ahuja ve diğer., 2007).



Şekil 1.1 İletken polimerlere ait kimyasal yapılar (Saxena ve Malhotra, 2003).

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

İletken bir polimerin temel özelliği polimerin ana zincir boyunca tek ve çift bağlar vardır. Her bir bağ kuvvetli bir kimyasal bağ olan sigma (σ) bağı ve bir pi (π) bağı vardır. Materyal yapısının kararlılığı rezonans ile sağlanmaktadır. Bunlara rağmen,

konjugasyon polimer maddeyi iletken yapmak için yeterli değildir. Fakat bunlara dopant maddeleri eklenerek iletkenliği arttırılabilir. Dopantların yaptığı şey malzeme içerisinde elektron ve çukurların sayısını artırmaktır. Bir elektron eksikliğinin olduğu konuma bir çukur denir. Dopant maddeler eklenerek polimer yapısının kimyasal modifikasyonu boyunca polimer zincirinde yük taşınmasını oluşturur.

1.1.1 İletken Polimerlerin Sentez Yöntemleri

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

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

1.1.1.1 Kimyasal Yöntem

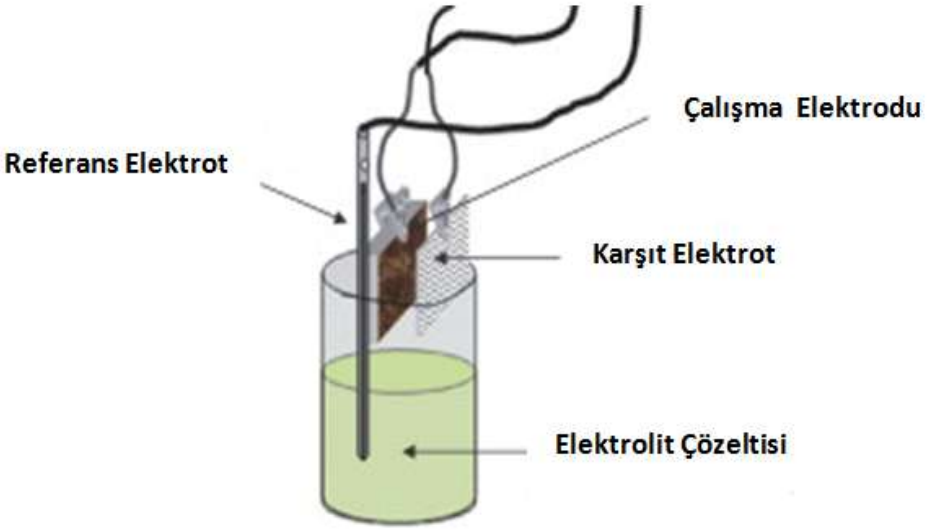
Kimyasal yöntemde, uygun bir çözücüde çözülen monomer bir yükseltgenme veya indirgenme aracı olarak kullanılan bir kimyasal madde ile etkileştirilerek polimerleştirilir. Bu yöntemde yükseltgenme basamağının kontrol edilememesi ve oluşan ürünün saf olmaması dezavantaj oluşturmaktadır. Kimyasal polimerizasyon yönteminin istenilen miktarda ve uygun bir maliyetle ürün elde etmek gibi avantajları vardır. Kimyasal yöntemde, kullanılacak olan doping maddesi ve katalizörün elde edilecek iletken polimerin elektriksel iletkenliği üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır (Toshima ve Hara, 1995). Toshima tarafından yapılan poli (p-fenilen)'in sentezi çalışmasında doping maddesi olarak $CuCl_2$ ve katalizör olarak $AlCl_3$'ün kullanılması ile elde edilen polimer elektriksel iletkenlik göstermemiştir.

Ancak doping maddesi olarak AsF_5 veya Li gibi maddelerin kullanılması ile 0,3 $S.cm^{-1}$ - 500 $S.cm^{-1}$ arasında değişen iletkenlik gözlenmiştir. Konjuge polimerlerin tümü kimyasal yöntemle sentezlenebilmektedir. Başka bir çalışmada, çözücü olarak metanol, doping maddesi olarak 2,5 M $FeCl_3$ kullanılarak pirolün kimyasal yöntemle polimeri hazırlanmış ve iletkenliğinin 190 $S.cm^{-1}$'e ulaştığı belirlenmiştir (Toptaş, 2006).

1.1.1.2 Elektrokimyasal Yöntem

Elektrokimyasal yöntemde, monomer uygun bir çözücü ve destek elektrolitle beraber polimerleşme hücresine konulmaktadır. Yapılan elektroliz sonucunda elektrot yüzeyinde film tabakası olarak ya da çözeltide polimer elde edilmektedir. Monomerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi ile oluşan radikal anyon veya radikal katyon zinciri büyümekte ve bunlar iletken polimer zinciri oluşturmaktadır. Bu yöntemde monomerin yükseltgenme veya indirgenme potansiyelinde çözücü, destek elektrolit ve elektrotlarla reaksiyon vermemesine dikkat edilmelidir.

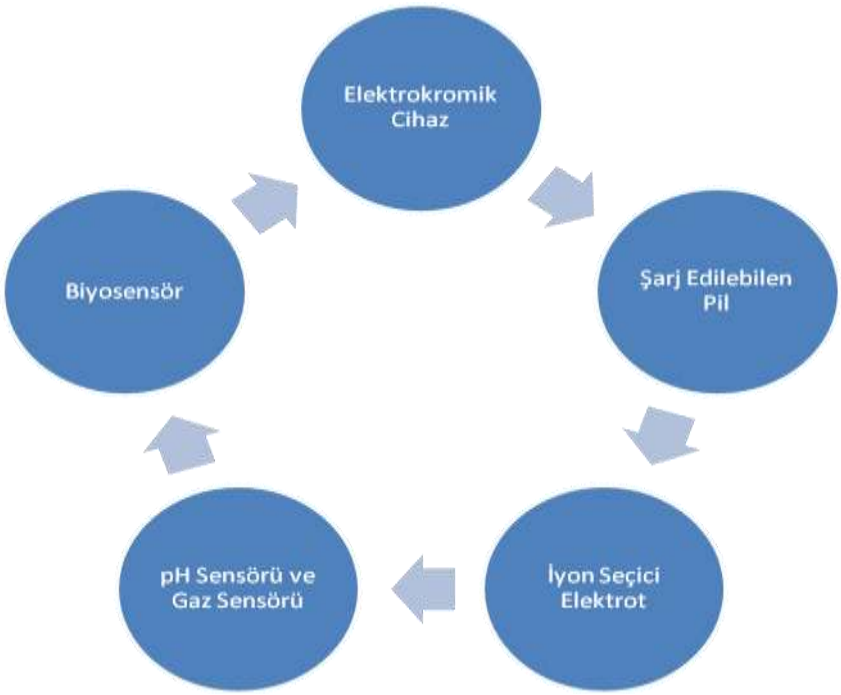
Elektrokimyasal polimerleşmenin kimyasal polimerleşmeye daha çok tercih edilir. Bunun en önemli nedenleri daha saf ve yan ürünlerden arınmış temiz ürün elde edilmesi, kontrollü potansiyel veya akım uygulaması (sabit potansiyel ve sabit akım elektroliz), başlangıcı ve bitiş basamaklarının kontrol edilebilmesidir (Batır, 2009).



Şekil 1.2 Elektrokimyasal polimerleşme hücresi

1.1.2 İletken Polimerlerin Kullanım Alanları

İletken polimerler çeşitli elektrokimyasal özelliklerinden dolayı çok değişik alanlarda kullanılabilmektedirler.



Şekil 1.3 İletken polimerlerin kullanım alanları

1.1.2.1 Şarj Edilebilir Piller

İletken polimerlere dayalı piller telefonlarda bilgi depolama hafıza elemanı RAM, FM alıcıları, faks makineleri, solar hesap makineleri için güç kaynağı olarak kullanılmaktadır. İletken polimerler doldurulabilir pillerde katot, anot veya aynı pilde hem anot hem katot elektrot malzemesi olarak kullanılmaktadır. Bu pillerden çok tercih edileni, yükseltgenmiş polimerlerin katot, metallerin ise anot elektrot malzemesi olarak kullanıldığı türlerdir. Bu tür pillerde polipirol, politiyofen ve poli anilin gibi iletken polimerler tercih edilmektedir.

İletken polimerlerin elektrot malzemesi olarak kullanıldığı doldurulabilir pillerin inorganik elektrot malzemelerinin kullanıldığı pillere (kurşun-asitli akü) göre çok hafif ve yüksek enerji yoğunluğuna sahip olması gibi üstünlükleri vardır. Ancak bazı istenmeyen durumlarla karşılaşılabilir. Bunların en önemlisi, bu pillerin yüksek potansiyellerde doldurulması sırasında iletken polimerlerin aşırı yükseltgenme ile bozulmasıdır (Uzun, 2006).

1.1.2.2 pH Sensörleri-Gaz Sensörleri

Bazı iletken polimerler çözeltilerinin iletkenliğine pH etkisi, üç elektrotlu sistemde farklı pH'lardaki asidik ve bazik ortamlardaki akım, direnç vb. iletkenlik özellikleri incelenerek pH sensörü olarak kullanılabileceği gözlemlenmiştir.

Çeşitli organik maddelerin buharlarına maruz bırakılan iletken polimerler filmlerinin iletkenliklerinde azalmalar görülmüştür. Tekrar hava ile temas ettirilen filmlerin iletkenliklerinin tekrar eski değerlerine ulaştığı gözlemlenmiştir. Gazlar kuvvetli yükseltgen ve indirgen özellik gösterdiklerinden, doğal olarak polimer filmlerinin iletkenliklerini etkiler. İletken polimerlerin bu özelliklerinden yararlanılarak çeşitli gaz sensörleri yapılmıştır (Ateş, 2009).

1.1.2.3 İyon Seçici Elektrotlar

İletken polimerlerin elektrokimyasal yöntemle çeşitli elektrotlar üzerinde sentezlenmelerinin yanında, inert elektrotlar üzerinde film halinde kaplanarak çeşitli organik, inorganik ve biyolojik molekül ve iyonlara karşı seçimli geçirgen olmaları çok sayıda modifiye elektrot yapımlarına imkân vermiştir.

1.1.2.4 Elektrokromik Cihazlar

Elektrokromik cihazlar, şarj ve deşarjın elektrokimyasal işlemi esnasında tersinir renk değiştiren materyaller olarak adlandırılırlar.

1.1.2.5 Biyosensörler

Biyolojik sensörler; analitik, biyokimya ve mikroelektronik bilim dallarının birlikte uyumlu kullanılması ile oluşturulan cihazlardır.

1.1.3 Enzimler

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

Enzimlerin görevi gerek büyük moleküllerin yıkımında, gerekse büyük moleküllerin yapım süreci olan biyokimyasal reaksiyon olan basamaklarında substrat dediğimiz moleküllere kimyasal bir grubu eklemektir. Bu kimyasal gruplar çok farklı ve değişik olabilir. Metilen (CH_3), amin (NH_2), hidroksit (OH), hidrojen (H), aldehit (O=C-H) ve karbondioksit (CO_2) bu kimyasal gruplara örnek olarak gösterilebilir.

Biyokimyasal reaksiyonların her basamağında bu kimyasal gruplar eklenerek büyük moleküller inşa edilir. Bu kimyasal gruplar kopartılarak da, büyük moleküller küçük parçalara ayrılırlar. Enzimler bu görevi sırasında başka organik moleküllere

gereksinim duymaktadırlar. Biyokimyasal reaksiyon basamaklarında enzimler tarafından koparılan ya da eklenen bu kimyasal grupların taşıyıcı moleküllerine gereksinim vardır. Bu kimyasal grupların taşıyıcısı olan moleküller koenzimlerdir. Koenzimler olmadan biyokimyasal reaksiyonların devamlılığı sağlanamaz (Şahmetlioğlu, 2004).

Enzimler dört temel açıdan çok güçlü katalizörlerdir:

1. Enzimler son derece etkilidirler.

Sıradan kimyasal katalizörlere göre tepkimeleri 108–1011 kez daha hızlı gerçekleştirebilmektedirler. Enzimler gösterdikleri bu hıza ulaşırken pH, sıcaklık, basınç açısından oldukça ılımlı koşullarda çalışabilmeyi mümkün kılarlar. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar fazla enerji gerektirmezler. Ayrıca en kolay bulunan, en ucuz, en emniyetli çözücü olan su içerisinde çalışmak enzimler için mümkün olmaktadır.

Örneğin amonyak elde etmek için kullanılan haber prosesinde azot bağlamak için 200-1000 atm basınç ve 500 ºC sıcaklık gereklidir. Ancak azot bağlayan bir bakterinin bu işlemi yaparken yüksek basınç ve sıcaklığa ihtiyacı yoktur.

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

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

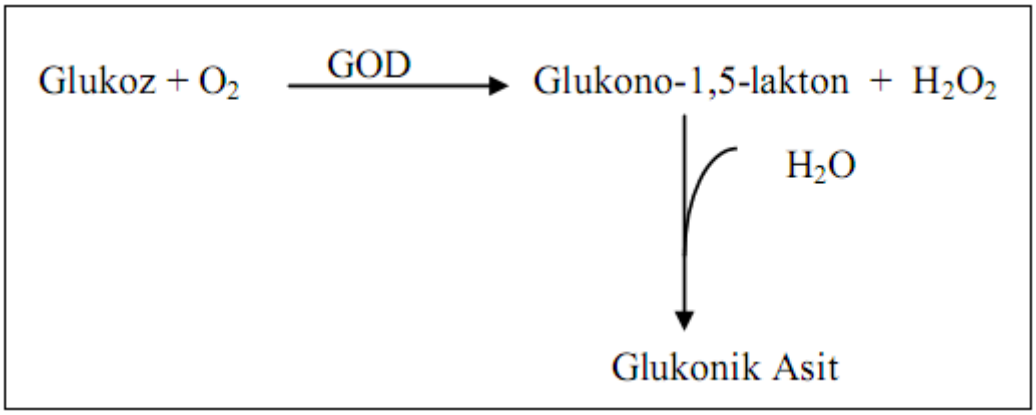
3. Enzimlerin çok çeşitli doğal kontrol mekanizmaları vardır.

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

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

1.1.4 Glukoz Oksidaz Enzimi

Glukoz oksidaz (GOD) (EC 1.1.3.4, β-D-glukoz: oksijen oksideredüktaz) glukozun moleküler oksijen ile yükseltgenip glukono-1,5-lakton ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) oluştuğu reaksiyonu katalizler. Lakton sulu ortamda herhangi bir enzime ihtiyaç duymaksızın hidroliz olarak glukonik aside dönüşür. Reaksiyon şekil 1.4 deki gibidir.



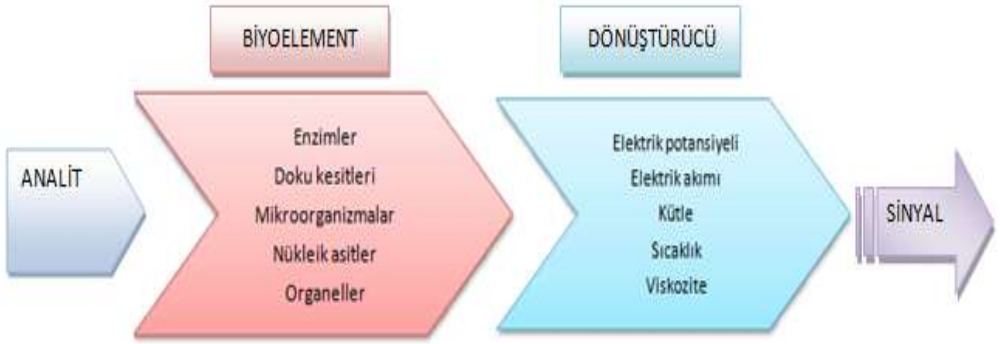
Şekil 1.4 Glikoz oksidaz enziminin reaksiyonu

GOD aktivitesi ilk defa 1904'de Maksimow tarafından *Aspergillus Niger* (A.Niger)'de saptanmıştır. Enzimin oksidatif etkisi olduğunu belirleyen Müller (1928), saflaştırılan enzimin sahip olduğu sarı rengin, bünyesindeki prostetik grupta (flavin adenin dinükleodit, FAD) kaynaklandığını öne sürmüştür. Keilin ve Hartree (1948), oksidasyonun FAD tarafından gerçekleştirildiğini; enzimin açığa çıkardığı H_2O_2 ile antimikrobiyel aktivite gösterip antibiyotik olarak davrandığını belirlemişlerdir. Enzim ticari olarak ilk kez 1952 yılında üretilmeye başlanmıştır.

Önceleri enzim kaynağı olarak *Penicullum notatum* ve *Pencillum glaucum* kullanılmış olup, günümüzde Aspergillus niger veya Pencullum amagasakienese kullanılmaktadır (Özyılmaz, 2005).

1.2 Biyosensörler

Biyosensörler, analit konsantrasyonu ile orantılı ölçülebilir bir sinyal oluşturmak için, bir biyolojik tanıyıcı ve bir fiziksel iletici sistemi birleştiren analitik cihazlardır. Bir biyosensör amaca uygun biyokomponent (biyobileşen,biyoelement) ve transduser (dönüştürücü) belirlendikten sonra bunların birbirine uygun bir immobilizasyon metodu kullanılarak oluşturulur. Bir biyosensörün genel prensibinde, biyolojik tanıyıcı hedef bileşiğe yanıt verir ve iletici sistem biyolojik cevabı, elektrokimyasal, optik, mekanik, kalorimetrik ve elektronik olarak ölçülebilen ve analit konsantrasyonu ile ilişkilendirilebilen bir sinyale çevirir (Sua ve diğer., 2011).



Şekil 1.5 Bir biyosensörün şematik gösterimi

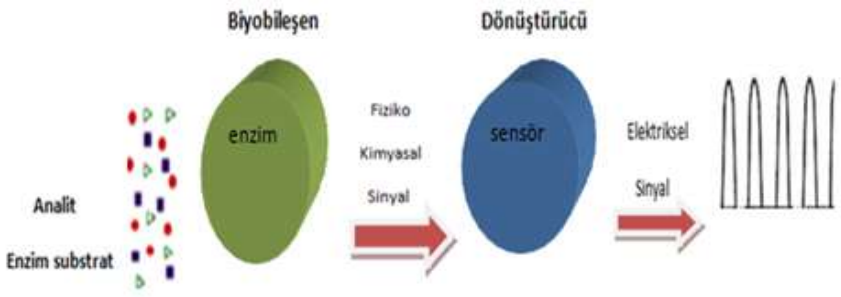
Şekil 1.5'de gösterildiği gibi bir biyosensör bir biyoelement (sensör elementi) ve bir iletici sistemden oluşur. Biyoelement enzim, nükleik asit, mikroorganizma, canlı hücre ya da doku olabilir. Ölçüm elementi ise kütle, sıcaklık elektrik olabilir.

1.2.1 Biyokomponent Seçimine Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar, nükleik asitler biyokomponent olarak kullanılmaktadırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılanları enzimler ve antikorlardır.

1.2.1.1 Enzimatik Biyosensörler

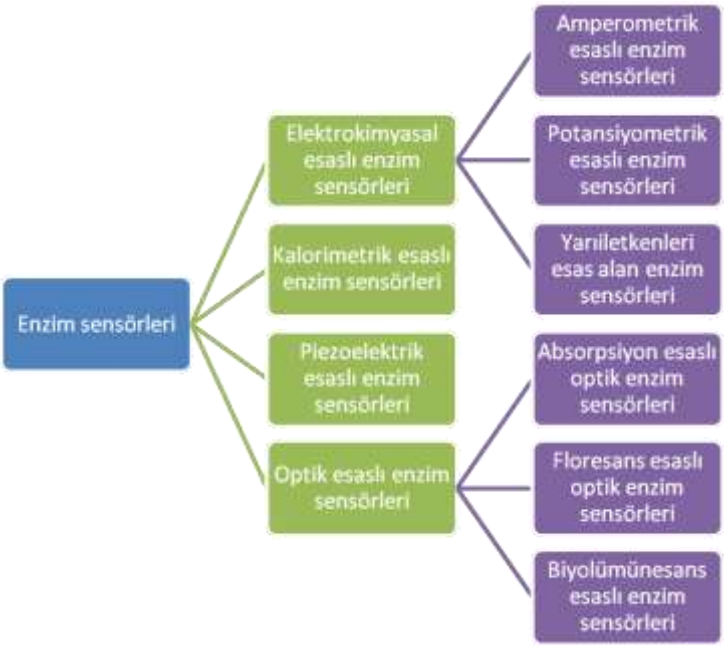
En genel anlamda bakıldığında diğer biyosensörlerde olduğu gibi enzim sensörleri de biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm sistemlerinden oluşur. Diğer biyosensörlerden tek fark biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimlerin yer almasıdır.



Şekil 1.6 Enzimatik biyosensörün şematik gösterimi.

Spesifikliği yüksek olan bu yapıların biyosensör cihazının bir parçası olarak kullanılması; sahip olduğu özelliklerin bir anlamda sisteme aktarılması demektir. Bu özelliklerin en önemlisi yüksek spesifikliğe sahip olmalarıdır. Şekilde de ifade edildi gibi transduser yüzeyine immobilize edilmiş enzim temelli bir biyosensör sisteminden ancak uygun substrat varlığında sinyal alınabilecektir (Mohanty ve Kougianos, 2006).

Enzim sensörlerinin sınıflandırılması en yaygın şekilde, reaksiyon uyarınca sinyalin belirlenme ilkesine göre yapılmaktadır (Dinçkaya, 1999).



Şekil 1.7 Enzim sensörlerinin sınıflandırılması.

1.2.1.1.1 Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensörleri. Elektrokimyasal biyosensörler kendi aralarında amperometrik, potansiyometrik ve yarı iletkenleri esas alan sensörler olmak üzere üçe ayrılırlar.

1.2.1.1.1.1 Amperometrik Esaslı Enzim Sensörleri. Amperometri en genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektro aktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrod referans elektrod olarak iş görür. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde yararlanılır (Dinçkaya, 1999).

Oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyen dehidrogenaz enzimleri monoenzimatik sistemlerde amperometrik enzim elektrodunda kullanılan genel enzimlerdir.

Substrat + Dehidrogenaz (yük.)	→ Ürün + Dehidrogenaz (ind.)	(1.1)
Dehidrogenaz (ind.) + NAD^+	→ Dehidrogenaz (yük.) + NADH	(1.2)
NADH + Mediatör	→ NAD^+ + Mediatör (ind.)	(1.3)
Mediatör (ind.) Elektrod Yüzeyi	→ Mediatör + e^-	(1.4)

1.2.1.1.1.2 Potansiyometrik Esaslı Enzim Sensörleri. Elektrokimyasal esaslı enzim sensörlerinin ikinci önemli grubunu potansiyometrik enzim elektrodları oluşturmaktadır. Potansiyometri bilindiği gibi en genel anlamda çalışma ve referans elektrod arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrod potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlar. Elde edilen sinyal Nerst Kanunu uyarınca konsantrasyonunun logaritması ile orantılıdır. Potansiyometrik enzim elektrodlarında kullanılan temel sensörler pH yada tek değerlikli iyonlara duyar cam elektrodlar, anyon yada katyonlara duyar iyon seçimli elektrodlar ve karbondioksit yada amonyağa yönelik gaz duyar elektrodlardır. Potansiyometrik esaslı enzim elektrodları söz konusu sensörler üzerine bir veya birden çok enzimin uygun immobilizasyon yöntemleriyle genelde pratik metodlarla monte edilmesiyle hazırlanır (Dinçkaya, 1999).

1.2.1.1.1.3 Yarı İletken Esaslı Enzim Sensörleri. Temel sensör olarak metal oksit yarı iletken alan etkili transistörleri yada iyon duyar alan etkin transistörleri esas alan bu tür enzim sensörleri, enzim ile alan etkin transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etkili transistörü olarak adlandırılır (Dinçkaya, 1999).

1.2.1.1.2 Optik Esaslı Enzim Sensörleri. Optik enzim sensörleri iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle enzim immobilize edilerek hazırlanan ölçüm aygıtlarıdır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alır. Sinyal ışık yansıması, saçılımı ya da yayımı sonucu meydana gelir. Dolayısıyla optik lifin üzerine enzim immobilizasyonuyla gerçekleştirilen optik esaslı enzim sensörleri temelde absorbsiyon, flouresans, biyolüminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde işlev görürler (Dinçkaya, 1999).

1.2.1.1.3 Kalorimetrik Esaslı Enzim Sensörleri. Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri, termal enzim sensörleri, enzim termistörleri ya da entalpik enzim sensörleri gibi değişik isimlerle tanımlanırlar. Temel ilkeleri bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanılarak substrat konsantrasyonunu

belirlemekten oluşur. Genel olarak enzimatik reaksiyonlarının ekzotermik doğasından yararlanılır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır ve oldukça küçük sıcaklık değişimleri termal olarak yalıtılmış ortamlarda termistör veya termofiller yardımıyla izlenir (Dinçkaya, 1999).

1.2.1.1.4 Piezoelektrik Esaslı Enzim Sensörleri. Piezoelektrik sensörler genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlesinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensör seçimliliği kristal yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir.

Bir piezoelektrik sensörün üzerinde enzim immobilizasyonuyla gerçekleştirilen piezoelektrik enzim sensörlerinde, enzim moleküllerine substratların bağlanmasından dolayı meydana gelen kütle değişimlerinin, piezoelektrik kuartz diskin vibrasyonunda sebep oldukları farklanmadan yararlanılarak madde miktarına ulaşılır (Dinçkaya, 1999).

1.2.1.2 Mikrobiyal Biyosensörler

Bir mikrobiyal biyosensör bir dönüştürücü ile canlı veya canlı olmayan mikrobiyal hücrelerin immobilize edilerek birleşmesi ile oluşur. Canlı mikroorganizmalar çeşitli organik bileşikleri aerobik veya anaerobik olarak metabolize ederek çeşitli ölçüm sistemleri ile izlenebilen amonyak, karbondiosit, asit vb. son ürünlerin oluşmasını sağlar (Riedel, 1998).

İmmobilize mikrobiyal hücreler biyoreaktörlerde, hidrojen üretiminde, amino asitler, organik asitler, antibiyotikler, steroidler, ekzopolisakkaritler gibi yararlı birçok bileşiğin sentezinde ve çevre ile ilgili endüstriyel ve bilimsel çalışmalarda kullanılmaktadır (Cassidy, Lee ve Trevors, 1996; Amin ve Talhi, 2007; Deo ve Gaucher, 2004; Jo, Sung Lee ve Park, 2008; Sauer, Porro, Mattanovich ve Branduardi, 2008; Jenkins ve diğer., 2004; Kapoor, Nair ve Kuhad, 2008; Singh,

Saini ve Kennedy, 2008). Aynı zamanda mikrobiyal hücrelerin biyobileşen olarak kullanıldığı mikrobiyal biyosensörlerin hazırlanmasındaki uygulamaları oldukça sık karşımıza çıkmaktadır (Reshetilov ve diğer., 2001).

1.2.1.3 İmmunosensörler

Yüksek seçimlilikte antijen-antibadi reaksiyonlarının duyarlı dedektörlerle kompozisyonu immunosensörleri oluşturur. Antibadiler (Ab) vücuda giren yabancı maddelere karşı üretilen ve immunoglobünler denen (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) bir glikoprotein ailesidir. Bir bağışık yanıt oluşturan yabancı makromoleküler maddelere antijen (Ag) veya immunojen denir.

İmmunolojik temelli sensörler çevre, klinik ve savunma amaçlı kullanılabilirler. İmmunosensörlerle hücreler, sporlar, toksinler, mikroorganizmalar, virüsler, pestisitler ve endüstriyel kirleticiler analizlenebilirler (Malhotra, 2003).

1.2.1.4 DNA Biyosensörleri

Kimyasal ve biyofiziksel özelliklerinden dolayı, DNA genetik kodun ve genom dizisinin keşfi için gerekli olan analizlerde önemli bir konu olmuştur (Diculescu, Paquim ve Brett, 2005).

DNA biyosensörleri reseptör ve iletici sistemin kombinasyonuyla oluşturulur. DNA biyosensörlerinin hazırlanmasında önemli parametrelerden bir tanesi, tek zincir probun doğru bir oryantasyonla yüzeyde immobilizasyonudur. Analizlenmek istenen DNA tek zincirinin probla hibridizasyonu sonrasında sinyal elde edilmiş olur (Palecek, 2009).

1.2.2 Biyosensörlerde Biyokomponentlerin İmmobilizasyonu

Bir biyosensörün en basit ihtiyacı biyolojik materyali fizikokimyasal değişimleri ölçmeye yarayan sistem ile başarılı bir şekilde kombine edilmesidir. Bu durumda immobilizasyon teknolojisi önemli role sahiptir. İmmobilizasyon sadece biyomateryal ve iletici sistemin arasındaki bağlantıyı sağlamaz aynı zamanda tekrar kullanım için stabilizasyonda yardımcı olur. Biyomateryaller adsorbsiyon, tutuklama, kovalent bağlama, çapraz bağlama ya da tüm bu tekniklerin kombinasyonu ile immobilize edilebilirler (Lei, Chen ve Mulchandani, 2006; D'Souza, 2001).

Biyokomponentin kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna ve ayrıca transduserin fiziksel yapısına göre immobilizasyon yöntemi belirlenir. Enzimler için uygulanan tüm immobilizasyon yöntemleri protein yapısındaki diğer biyokomponentler içinde uygulanabilir.

Biyokomponent immobilizasyonu için adsorpsiyon, tutuklama, kovalent bağlama, çarpraz bağlama yöntemleri kullanılmaktadır. Biyokomponentin film veya tabaka ile hidrofobik veya iyonik etkileşimler sonucu oluşması adsorpsiyondur. Tutuklama, biyokomponentin bir membran veya tabaka içerisinde hapsedilmesidir. Kovalent bağlama, biyokomponentin transduser yüzeyine kimyasal bir reaksiyon ile bağlanmasıdır. Tutuklama yöntemi ile kimyasal bağlamanın birleştirilmiş şekli olan bağlama ise çapraz bağlamadır.

1.2.2.1 İmmobilize Enzim Kullanmanın Avantajları

- Enzimler birçok kez ve uzun süre kullanılabilirler. Özellikle zor ve pahalı enzimler için bu önemlidir.
- Matriks enzimi fiziksel bir bariyer olarak koruduğundan, enzim pH ve sıcaklık gibi etkilere dayanıklı hale gelir.
- İmmobilize hücrelerle birçok enzim de immobilize olacağından aynı anda birden fazla reaksiyon gerçekleşebilir.

1.2.3 Transduser Yüzeyinin Kaplanması

Bu işlem değişik şekillerde gerçekleşir. Polimerizasyon doğrudan transduser yüzeyinde gerçekleştirilip bir film elde edilebilinir ya da önceden hazırlanan polimer ile transduser yüzeyi kaplanır. Polimer transduser yüzeyine adsorpsiyon veya kovalent bağlama ile tutturulur. Bu tutturma direkt bağlama, daldırma, aerosol kullanımı ve membran kullanımı ile gerçekleştirilir. Genellikle direkt bağlama ve daldırma yöntemi kullanılır.

1.3 Rutenyum ve Tiyosemikarbazon Özellikleri

Rutenyum çok farklı yükseltgenme basamaklarında (-2'den +8'e) bulunabildiği ve çeşitli koordinasyon sayılarında ve farklı geometrilerde kompleksler oluşturabildiği için son zamanlarda oldukça ilgi çeken ve çalışılan bir metaldir (Bell, Loncella ve Bessel, 2000).

Rutenyumun bazı koordinasyon bileşikleri elektron taşıyıcı özellik gösterir. Bu özellik, yapay fotosentezler, fotomoleküler aletler, biyolojik makromoleküller üzerindeki çalışmalar, platin ve palladyum metallerini sertleştirmek amacıyla, titan metaline eklenerek korozyana karsı direncini arttırmak amacıyla, katalizör olarak, kanser ilaçlarında, dolma kalem uçlarında, suyun ve organik maddelerin katalitik yükseltgenmesi ve çeşitli organik sentezler gibi farklı birçok araştırma alanında rutenyum komplekslerinin kullanım alanı bulmasına yol açmaktadır (Raveendran ve Pal, 2006).

Tiyosemikarbazon türevi bileşiklerin geniş spektrumlu biyolojik aktivitelere sahip olması sebebiyle günümüzde aktif olarak kullanılan bu fonksiyonel türev üzerine ilgi çekmektedirler. Tiyosemikarbazon türevlerinin sahip olduğu biyolojik aktiviteler arasında antimikrobiyal (Costello ve diğer., 2008), antitüberküloz (Singh ve diğer., 2010), antitümör (Li ve diğer., 2009), aktiviteler sayılabilmektedir. Tiyosemikarbazon türevleri özellikle metal kompleksleriyle kullanıldığında bu özelliklerinden dolayı oldukça ilgi çekmektedir. Platin grubu metallerinden biri olan

rutenyumun kompleksleri potansiyel antitümör maddeleri olarak önerilmektedir. Rutenyum sulu çözeltilerde çoğunlukla Ru(II) ve Ru(III) olarak bulunur. Her iki iyon da genel olarak 6 koordinasyon sayılı oktahedral geometride bulunmalarına rağmen, Ru(III) bileşikleri, platin içerikli ilaçlara benzer bir yolla, hipoksik tümor alanlarında daha aktif türlere indirgenebilir ve bu türler bir nükleobaz azotundan DNA hücresine hızla bağlanma yeteneğine sahiptir (Demas ve DeGraff, 2001).

BÖLÜM İKİ
MATERYAL VE METOT

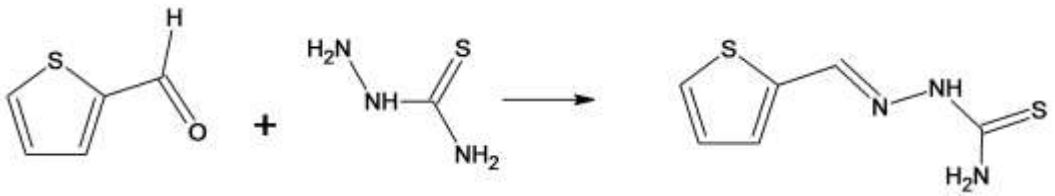
Bu çalışmada, tiyofen bazlı rutenyum komplekslerini temel alan enzim biyosensör geliştirilmiştir. Döngüsel voltametrik yöntemle elektropolimerizasyon işlemi uygulanarak grafit elektrot yüzeyi Rutenyum (II) monomerleri (Şekil 2.2/2.3) ile modifiye edildi. Monomerin amino grupları arasında gluteraldehit vasıtasıyla kovalent bağlar oluşturularak glukoz oksidaz immobilizasyonu gerçekleştirildi.

Batch sistemde glukoz tayini amacıyla hazırlanan biyosensörde optimum pH, monomerin elektrokimyasal polimerizasyon süresi ve doğrusal tayin aralığı ilk olarak incelendi. Daha sonra Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve karakterizasyonu için kullanıldı. Son olarak da biyosensör gerçek bir örnek üzerinde glukoz belirlenmesi için uygulandı.

2.1 Sentezler

2.1.1 Tiyofen-2-karboksaldehit Tiyosemikarbozonun Sentezi

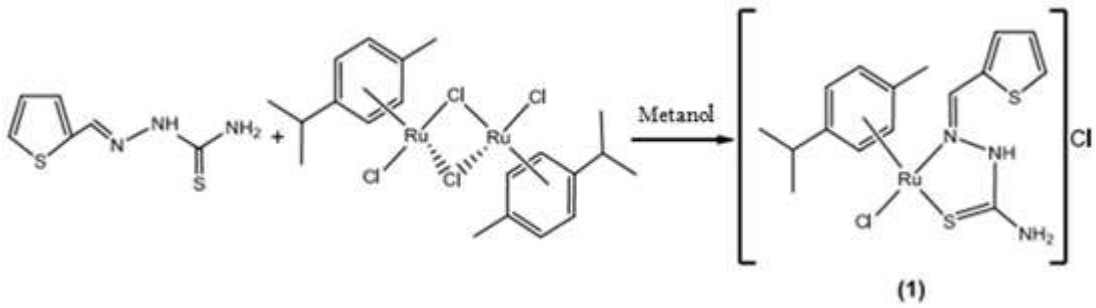
Tiyofen-2-karboksaldehit tiyosemikarbozon, tiyokarbonil hidrazinlerin bir sulu çözeltisi (420 mg, 10 mL içinde 3.0 mmol) ve tiyofen-2-karboksaldehitin etanol çözeltisi (273 mg, 10 mL içinde 3.0 mmol) 25 ° C de 3 saat sürekli karıştırılarak sentezlendi. Soğutulduktan sonra, çöken bileşik uygun bir çözücüde kristalize edildi ve süzüldü (Jayabalakrishnan ve diğer., 2002).



Şekil 2.1 Tiyofen-2-karboksaldehit Tiyosemikarbozonun Oluşumu

2.1.2 (η^6-p-simen) klorobis (tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S) rutenyum(II)klorür Sentezi (1)

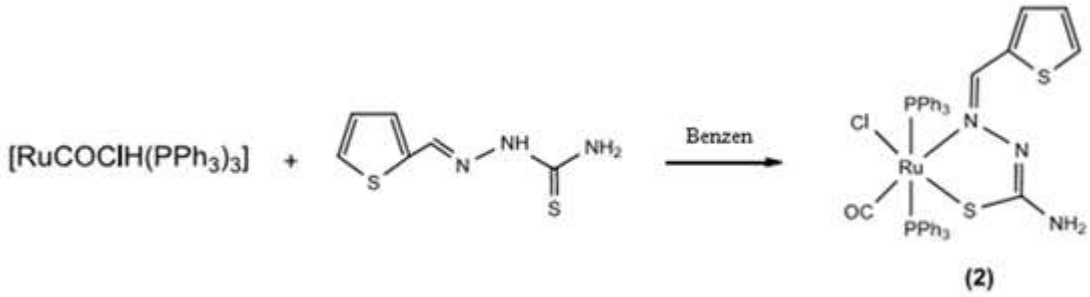
Başlangıç metal bileşiği [{(η6-p-simen)RuCl}$_2$(μ-Cl)$_2$] yayın (Thilagavathi ve diğer., 2009) de tanımlandığı gibi sentezlendi. Bu metal bileşiği basit bir işlem kullanılarak sentezlendi. Kuru metanol (10 ml) içinde bulunan tiyosemikarbazonun uygun bir çözeltisi (37 mg, 0,2 mmol), sıcak metanol içinde (10 ml) [{(η^6-*p*-simen)RuCl}$_2$(μ-Cl)$_2$] (34 mg, 0,1 mmol) çözeltisinin karıştırılmış bir süspansiyonuna ilave edildi. Elde edilen karışım 24 saat boyunca geri akış sisteminde ısıtıldı ve kompleks ayrılmaya başladı. 2 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra, reaksiyon şişesindeki kahverengi katı madde metanol ile yıkandı, süzüldü ve kurutuldu (Yildirim ve diğer., 2014).



Şekil 2.2 [(η6-p-simen) RuClTSC^{N-S}]Cl, sentez reaksiyonu

2.1.3 Trans-difenilkarbonilkloro(tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S) rutenyum(II) Sentezi (2)

Benzen (10 mL) içinde bulunan tiyosemikarbazonun uygun bir çözeltisi (18,5 mg, 0,1 mmol) benzen (20 mL) içindeki [RuH(CO)Cl(PPh$_3$)$_3$] (95 mg, 0,1 mmol) nin karıştırılmış bir süspansiyonunun içerisine damla damla ilave edildi. İçindekiler, 5 saat boyunca argon atmosferi altında geri akışa tabi tutuldu. Daha sonra, oda sıcaklığına soğumaya bırakıldı ve karışım, vakumla buharlaştırıldı. Sarı çökelti diklorometan / petrol eteri (1:3) ile yıkandı ve ürün kurutuldu (Yildirim ve diğer., 2014).



Şekil 2.3 [Ru(CO)Cl(PPh_3)$_2$TSC^{N-S}] sentez reaksiyonu

2.2 Kimyasallar

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri firmalar Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1 Deneyde kullanılan kimyasallar ve temin edildikleri firmalar

Kullanılan Malzeme	**Firma**
Asetonitril	Merck
$TBAPF_6$	Sigma-Aldrich
Glukoz	Sigma
Glukoz-oksidaz	Sigma
Gluteraldehit	Sigma-Aldrich
KIT	Humon GMBH

2.3 Ekipman

Denemeler sırasında Palmsens (Hollanda) Elektrokimyasal ölçüm sistemi kullanıldı. Biyosensör sistemlerine ait cevaplar akım (I, μA) olarak elde edildi. Amperometrik ölçümlerde, *Glukozoksidaz* biyosensörü için 50 mM, pH 4 sodyum fosfat tamponu kullanıldı. Ölçümler -0,9 V çalışma potansiyelinde gerçekleştirildi.

Ölçümler; çalışma elektrodu olarak grafit, karşıt elektrot olarak platin (Metrohm) ve referans elektrot olarak Ag/AgCl (Metrohm) kullanılarak 3'lü elektrot sistemi ile gerçekleştirildi.

2.4 Yöntemler

2.4.1 Biyosensörlerin Hazırlanması

Enzim biyosensörün hazırlanma aşamaları:

1. Grafit elektrot yüzeyi temizlendi. Daha sonra 0,382g $TBAPF_6$, 0,0052g monomer asetonitril çözeltisi içinde hazırlandıktan sonra döngüsel voltammetrik yöntemle -1,5 ile -0,5 V arasında 0,1 V/s tarama hızında 50 döngü ile elektropolimerizasyon işlemi uygulanarak elektrot yüzeyi monomer ile modifiye edildi.

2. 5 µl glukoz oksidaz ve 5 µl glutaraldehid çözeltisi (% 1'lik) (pH 7 sodyum fosfat tamponunda hazırlandılar.) elektrot yüzeyine damlatıldı ve yüzeyi kuruması için 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi.

3. Elektrot yüzeyi destile su ile yıkanarak çalışma sıcaklığı ve tamponunda 10 dakika bekletildi.

(Her iki monomer içinde aynı işlemler ayrı ayrı gerçekleştirildi.)

2.4.2 Biyosensörlerin ile Ölçüm İlkesi

Biyosensör hazırlandıktan sonra 10 dakika çalışma tamponunda bekletildi, sonra substrat (glukoz) ilave edildi. Substrat konsantrasyonu farklandıkça buna bağlı olarak değişen akım -0,9 V da izlendi. Buna bağlı olarak da ΔI değerleri µA olarak kaydedildi. Reaksiyon ortamındaki substratın miktarına bağlı olarak farklanan ΔI değerleri arasında kalibrasyon grafikleri oluşturuldu.

2.5 Kesikli (batch) sistem ile yapılan çalışmalar

2.5.1 Optimum pH'nın Belirlenmesi

Glukoz biyosensörünün optimum pH'sını belirlemek amacıyla 50 mM konsantrasyonda asetat tamponu ile pH'ları 3,5 ve 5,5 arasında farklanan tamponlar hazırlandı. En iyi biyosensör cevabının hangi pH değeri ile alındığı belirlendi.

2.5.2 Biriktirme Süresinin Optimizasyonu

Biyoaktif tabaka oluşturulmadan önce elektrot yüzeyinde monomerin elektrokimyasal polimerizasyon süreleri farklandırılarak biyosensörler hazırlandı. Bu amaç doğrultusunda 25, 50 ve 100 döngü ile yüzey modifiye edildi ve sabit enzim miktarı kullanılarak glukoz tayini için grafikler oluşturuldu.

2.5.3 Doğrusal Tayin Aralığı

Geliştirilen biyosensörlerin biyoaktif tabaka bileşenleri ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrası karakterizasyonu amacıyla standart grafikler çizilerek glukoz ölçüm aralığı belirlendi. Ölçümler oda sıcaklığında pH 4 asetat tamponunda gerçekleştirildi.

2.5.4 Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği

Optimize edilmiş çalışma koşullarında hazırlanan biyosensör ile doğrusal tayin aralığına giren bir glukoz konsantrasyonu seçilerek tekrarlı 10 ölçüm alındı. Kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptanarak standart sapma (S.D) ve varyasyon katsayıları (c.v) hesaplandı.

2.5.5 Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri

Enzim immobilizasyonun gerçekleştiğini göstermek için SEM görüntüleri alındı. Sadece grafit elektrodu, elektrot üzeri monomer modifikasyonu ve enzim immobilizasyonu ayrı ayrı yapılarak ölçümler alındı.

2.5.6 Fourier Transform Infrared Spektrometresi (FTIR)

Enzim immobilizasyonun gerçekleştiğini göstermek için FTIR spekturumları alındı. Sadece grafit elektrodu, elektrot üzeri monomer modifikasyonu ve enzim immobilizasyonu ayrı ayrı yapılarak ölçümler alındı.

2.5.7 Örnek Uygulama

Ticari olarak alınan gazlı içecekte, glukoz miktarını belirlemek amacıyla hem referans metod (Trinder reaksiyonu) hem de hazırlanan biyosensörler kullanıldı.

$$\text{D-Glukoz} + O_2 + H_2O \longrightarrow \text{D-Glukonat} + H_2O_2 \qquad (2.1)$$

$$2H_2O_2 + \text{4-klorofenol} + \text{Aminoantipirin} \longrightarrow \text{Kinonimin boya} + H_2O \qquad (2.2)$$

Tablo 2.2 Referans metot prosedürü

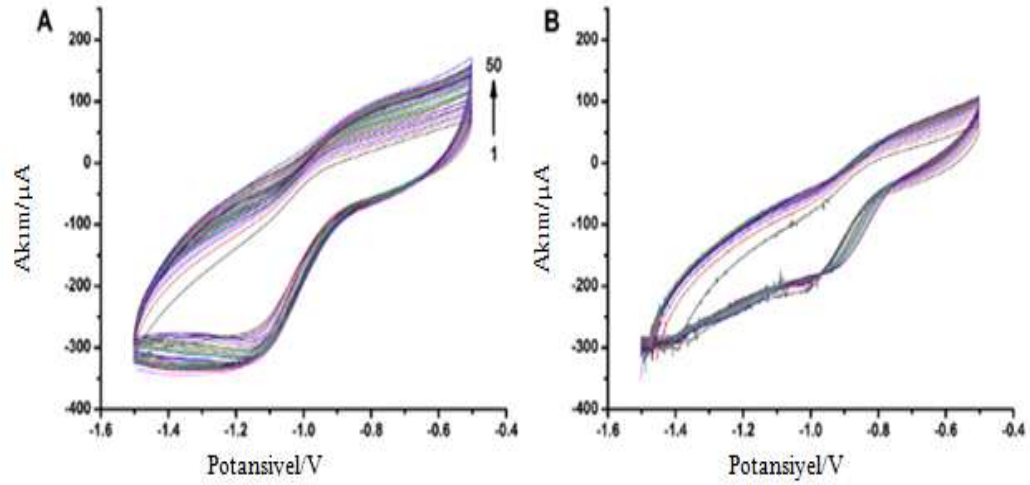
	Kör (µl)	**Standart (µl)**	**Örnek (µl)**
Reaktif	1000	1000	1000
Distile Su	10	-	-
Standart	-	10	-
Örnek	-	-	10

Köre karşı örnek ve standart absorbansları 510 nm de okundu.

BÖLÜM ÜÇ
DENEYSEL VERİLER

3.1 *Ru(II)TSCs* Biyosensörlerin Optimizasyonuna İlişkin Veriler

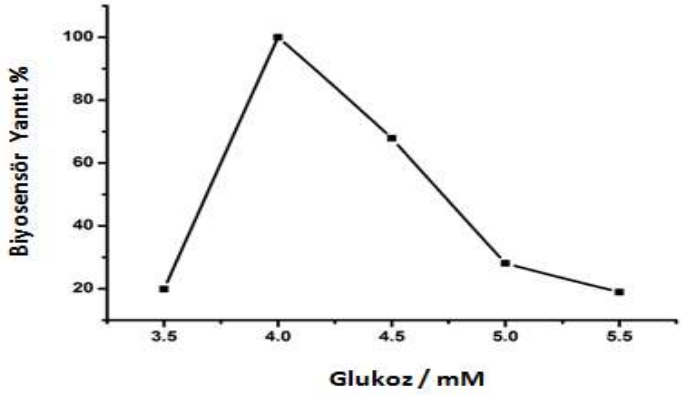
Ru(II) TSC biyosensörleri hazırlandıktan sonra çalışma pH'ı ve biriktirme süresi ilk olarak belirlendi. Şekil 3.1 de dönüşümlü voltogramlar yer almaktadır.



Şekil 3.1 0,1 M Asetonitril çözeltisi içindeki elektrokimyasal polimerizasyon sırasında dönüşümlü voltogram A) [(η6-p-simen) RuCITSCN-S]Cl monomerinin birikimi B) [Ru(CO)Cl(PPh_3)$_2$TSC^{N-S}] monomerinin birikimi (0,1 V/s tarama hızında, 50 döngü).

3.1.1 Optimum pH'nın Belirlenmesi

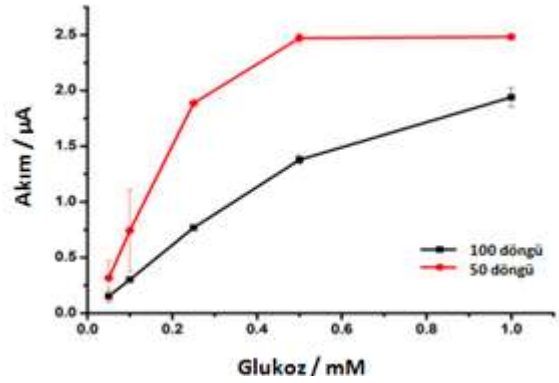
Ru(II) TSC biyosensörlerinin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 50 mM konsantrasyonda sodyum asetat ile pH'ları 3,5 ve 5,5 arasında farklanan tamponlar hazırlandı. En iyi cevap pH 4; 50 mM asetat tamponunda alındı. Grafik Şekil 3.2 de verilmiştir.



Şekil 3.2 Biyosensör cevabı üzerine pH'nın etkisi (50mM; sodyum asetat tamponu; oda sıcaklığı).

3.1.2 Biriktirme Süresinin Optimizasyonu

Ru(II)TSCs biyosensörlerinin optmizasyon çalışmalarında pH optimizasyounundan sonra iletken polimerin biriktirme süresinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada biriktirme süresinin biyosensör cevabı üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Bu amaca yönelik olarak; biyosensör hazırlanmasında kullanılan döngü sayısı ile biyosensör cevabı arasındaki ilişki Şekil 3.3'de verilmiştir. Aynı enzim miktarlarıyla hazırlanmış biyosensörlerle glukoz standart grafikleri çizildi. En iyi biyosensör cevabı 50 döngü ile hazırlanan biyosensör ile alındı.

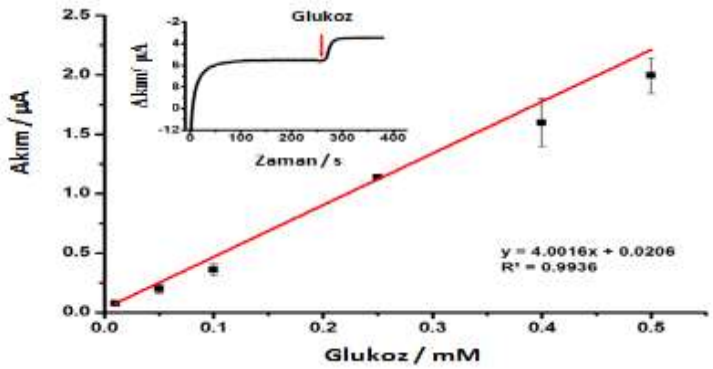


Şekil 3.3 Biyosensör cevabı üzerine biriktirme süresinin etkisi (Sodyum asetat tamponu; pH 4; 50 mM; oda sıcaklığı; -900mV, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

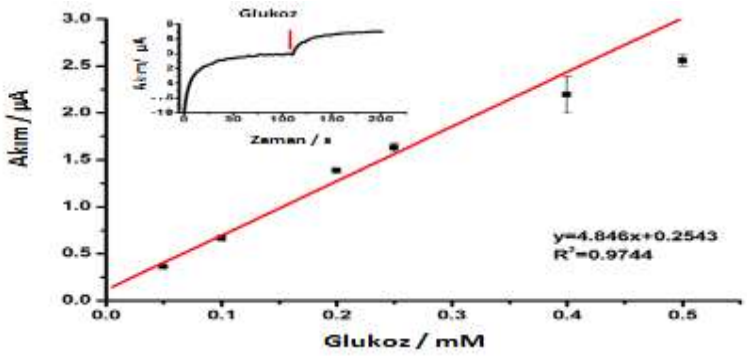
3.2 Ru (II) TSC Biyosensörlerinin Karakterizasyonu

3.2.1 Doğrusal Tayin Aralığı

Ru (II) TSC biyosensörlerinin farklı substrat konsantrasyonlarında biyosensör cevabını incelemek amacıyla glukozun farklı konsantrasyonları kullanıldı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen biyosensör cevapları her iki biyosensör içinde belirlenmiş Şekil 3.4 ve 3.5'te verilmiştir. Her iki biyosensörde 0,05-0,5mM glukoz konsantrasyonu aralığında doğrusallık gözlenmiştir.



Şekil 3.4 (η6-p-simen)klorobis(tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon N,S) rutenyum(II)klorür monomeri ile hazırlanan biyosensörün glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (Sodyum asetat tamponu; pH 4; 50 mM; oda sıcaklığı; -900mV, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

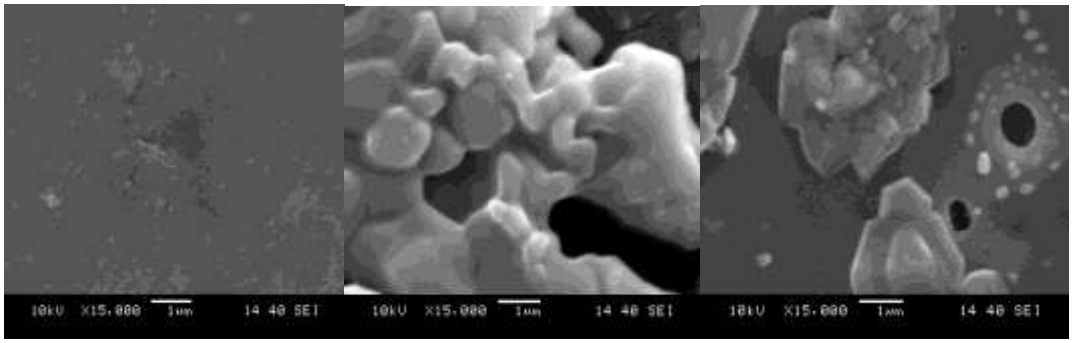


Şekil 3.5 Trans-difenilkarbonilkloro(tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S)Rutenyum(II) monomeri ile hazırlanan biyosensörün glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (Sodyum asetat tamponu; pH 4; 50 mM; oda sıcaklığı; -900mV, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

3.2 Biyosensörlerin Karakterizasyonu

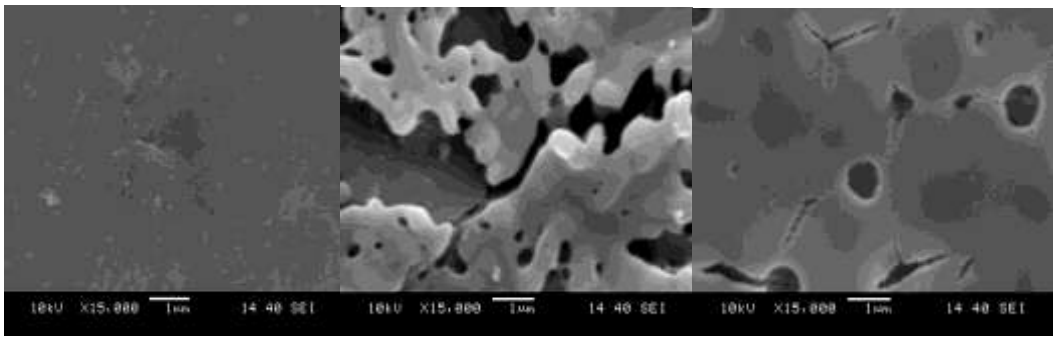
3.2.1 SEM Görüntüleri

Yüzey özelliklerini tanımlamak ve biyomoleküllerin immobilizasyon matrisi arasındaki etkileşimi göstermek için SEM görüntüleri kullanıldı. Bunun için saf grafit elektrot, elektrot üzerine kaplanmış Ru (II) TSC oligomeri ve oligomer ile enzim immobilizasyonu ayrı ayrı değerlendirildi. Oligomerin grafit elektroda biriktirme işleminden sonra ve GOx immobilizasyonundan sonra filmlerdeki farklılıklar görülmektedir. Yüzeydeki bu değişiklikler oligomer filmlerini ve enzim varlığını ifade eder.



A B C

Şekil 3.6 [(η6-p-simen) RuCITSC^{N-S}]Cl monomeri için, A) Saf grafit elektrot, B) Ru (II) TSC oligomeri, C) Ru (II) TSC/Gox



A B C

Şekil 3.7 [$Ru(CO)Cl(PPh_3)_2TSC^{N-S}$] monomeri için, A) Saf grafit elektrot, B) Ru (II) TSC oligomeri, C) Ru (II) TSC/Gox

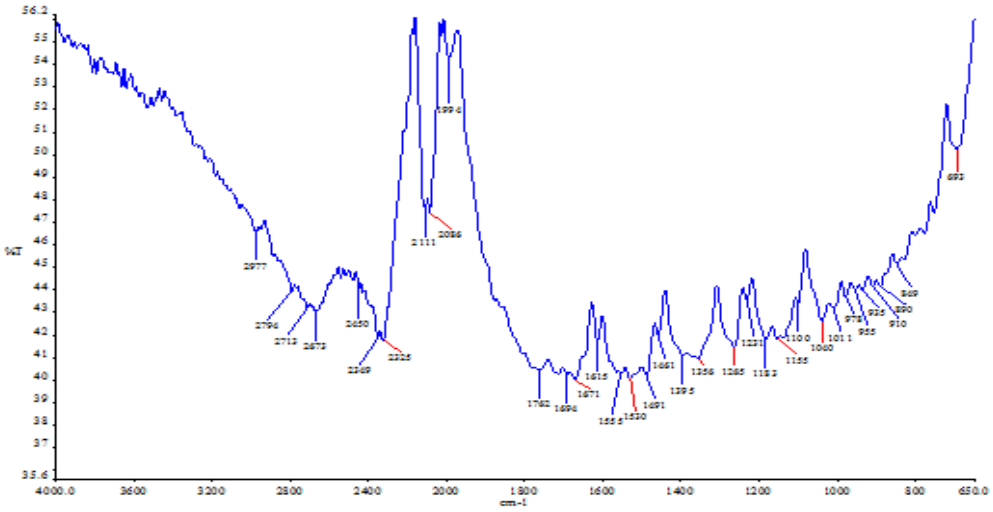
3.2.2 FTIR Analiz Sonuçları

Biyomoleküllerin immobilizasyon matrisi arasındaki etkileşimi daha ayrıntılı bir şekilde göstermek için FTIR spekturumları kullanıldı. Bunun için saf grafit elektrot, elektrot üzerine kaplanmış Ru (II) TSC oligomerleri ve oligomer ile enzim immobilizasyonu ayrı ayrı değerlendirildi. Her iki monomer içinde analiz ayrı ayrı gerçekleştirildi.

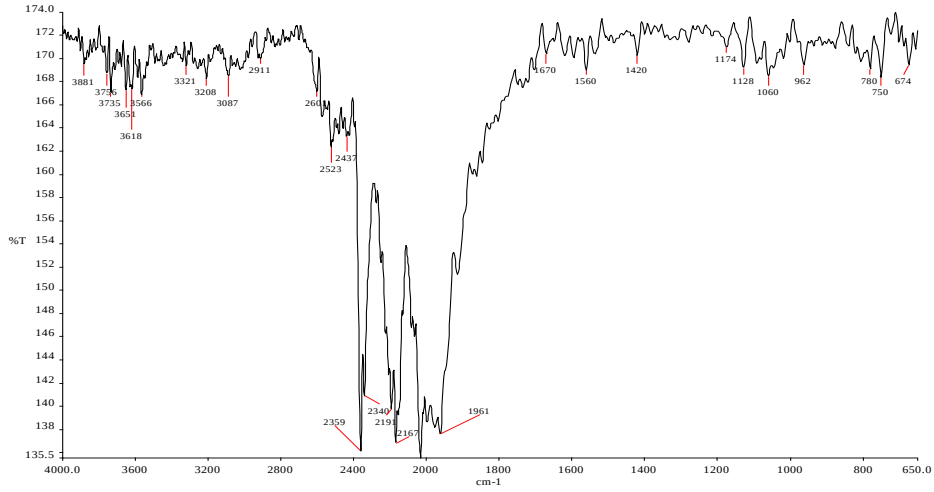
Serbest ligandlara IR spektrumu tiyosemikarbazon ligandın metale bağlanma modlarını incelemek amacıyla, metal bileşikler ile karşılaştırıldı. TSC ligand spektrumunda 3340 cm^{-1} civarında mevcut olan en yüksek frekans bağları NH_2 grup terminalinin ν_{asym} ve ν_{sym} titreşimine atanır. Aynı zamanda bu bağ koordineli bir şekilde bu grubun non-katılımını gösteren 1 ve 2 bileşiğinin spektrumunda mevcuttur. Bu ligandın ν(N-N) bağı 1058 cm^{-1} civarında bulunur. (1) ve (2) bileşiğinin spektrumunda sırasıyla 1066 ve 1078 cm^{-1} olan bu bağın sıklığındaki artış azometin nitrojen ile uyumu için kanıt sağlar (Raja ve Ramesh, 2010).

Tiyosemikarbazon ligandlar farklı şekilde bir dizi koordine edebilir. Çoğunlukla iki totometrik formlarında ya bir nötr tion form ya da tiol formdan anyon olarak tespit ettiler (Beckford ve diğer., 2011). Kızılötesi spektrofotometre (1) bileşiği için tion formu ve (2) bileşiği için tiol formu olarak koordinasyonu teyit etmek için

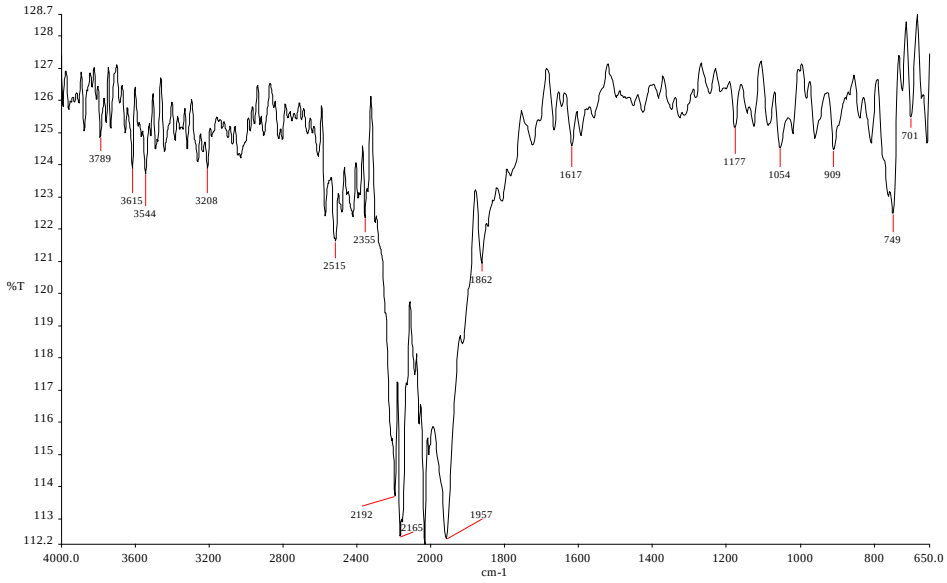
kullanıldı. TSC ligand ve 1 bileşiği ν (C = S) germek için sırasıyla 820 and 783 cm^{-1} de yoğun olarak kuvvetli bağlar gösterdi. Bileşik (1) de katı durumda tion formda elde kalan bu ligandların ν(C-SH) önerilmesi nedeniyle 2570 cm^{-1} yakınında bağ yoktur. (1) bileşiği içinde aşağıya doğru bağ (C=S) kayması (37 cm^{-1} de) tiokarbonil sülfür koordinasyonunu önerdi. (2) bileşiğinin spektrumunda ortadan kaybolan C=S çift bağının titreşimi nedeniyle 820 cm^{-1} de serbest TSC ligandı içerisinde bir bağ ortaya çıktı ve diğer koordinasyonun kükürt üzerinde deprotonasyon yoluyla takip edilen enolizasyonun ardından 747 cm^{-1} de tiolat kükürt aracılığıyla olduğunu kanıtlayan C-S yeni bir bağ ortaya çıktı. Serbest TSC liganddaki NH grubu gerilmesinin titreşimi nedeniyle 3149 cm^{-1} de gözlenen bağ aynı zamanda (1) bileşiğinin içinde etkisiz olarak kaldı. Bu bağ (2) bileşiğinin spektrumunda gözlenmemiştir. Tüm tiyosemikarbozonların spektrumu azometin bağlantısının ν(C=N) gerilimi nedeniyle 1582-1584 cm^{-1} bölgesinde kuvvetli bir bağ ortaya çıkarır (Raja ve Ramesh, 2010). Bileşiklerin içindeki bu bağ daha düşük bir frekansa (2-4 cm^{-1}) kaydırıldı. Kompleksasyonda bu ν(C=N) geriliminin düşüşü M-N bağ oluşumunun bir sonucu olarak C=N bağının düşüşüne atfedilebilir (Jayabalakrishnan ve diğer., 2002). Serbest ligandların azometin C=N gerilme sıklığı nedeniyle 1586 cm^{-1} de orta büyüklükte keskin bir bağ N atomunun koordinasyonunu gösteren 1584 ve 1582 cm^{-1} de bileşiklerin spektrumunda düşük frekansa kaydırıldı (Raja ve Ramesh, 2010). (1) ve (2) bileşiklerinde orta yoğunluktaki bağ sırasıyla 541 ve 522 cm^{-1} Ru-N ye atfedilir. (1) bileşiği için 843, 770, 664 ve (2) bileşiği için 844, 765, 676 cm^{-1} de görülen bağlar ligandlardaki tiyofen halka deformasyon modlarına atfedilir. Bu tiyofen halka deformasyon titreşimleri bu bileşiklerde etkili olmamıştır.



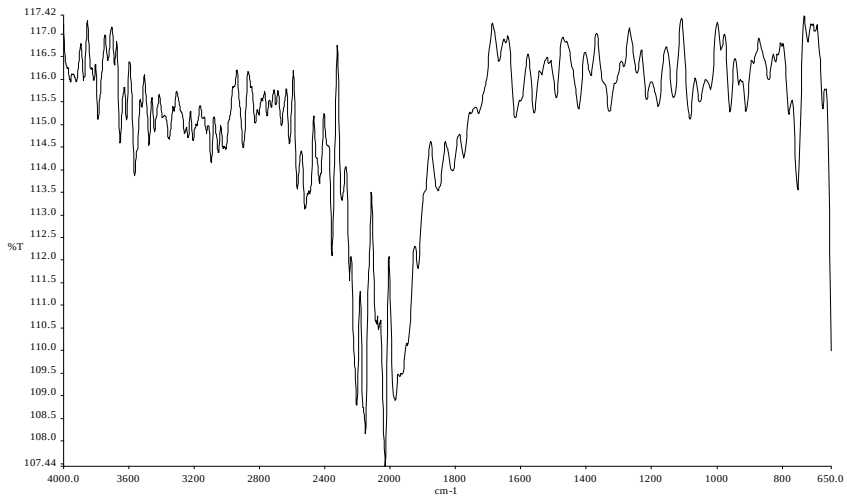
Şekil 3.8 Saf grafit elektrodu FTIR spektrumu.



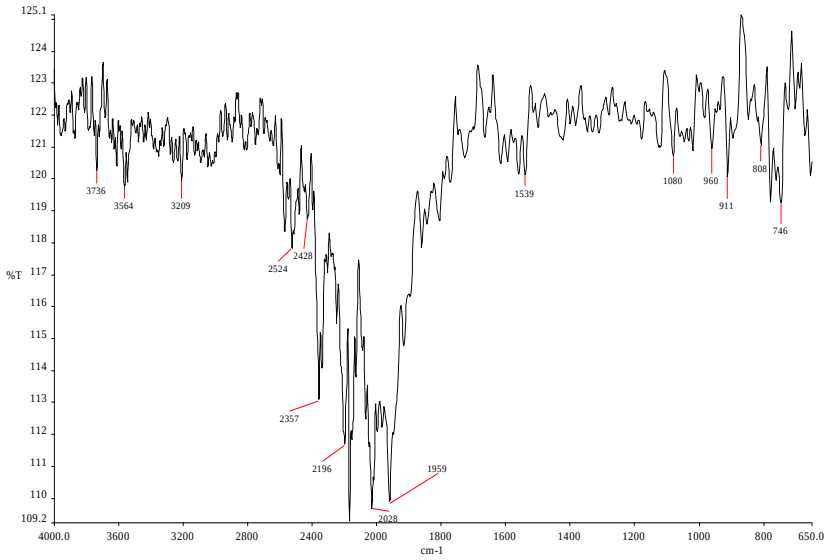
Şekil 3.9 Grafit elektrot üzerine birikmiş (η^6-*p*-simen)klorobis(tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S) rutenyum (II) klorür oligomerinin FTIR spektrumu.



Şekil 3.10 Enzim immobilizasyonu gerçekleşmiş (η^6-*p*-simen)klorobis(tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S) rutenyum (II)klorür oligomerinin FTIR spektrumu.



Şekil 3.11 Grafit elektrot üzerine birikmiş Trans-difenilkarbonilkloro(tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S)Rutenyum(II) oligomerinin FTIR spektrumu.



Şekil 3.12 Enzim immobilizasyonu gerçekleşmiş Trans-difenilkarbonilkloro(tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S)Rutenyum(II) oligomerinin FTIR spektrumu.

3.3 Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği

Hazırlanan biyosensörün belirli glukoz konsantrasyonlarında çalışma tamponu ve çalışma sıcaklığında tekrar kullanılabilirliği incelendi. Tekrarlanan ölçümler sonrasında ilgili substratın kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptandı. Bu işlemler sonrasında biyosensör ile glukoz için standart sapma (S.D) : ±0,035mM (n=10) ve varyasyon katsayısı (c.v) : % 1,87 olarak bulundu.

3.3.1 Örnek Uygulama

Ticari olarak temin edilen ve aynı glukoz içeriğine sahip olacak şekilde seyrelmeleri hazırlanmış gazlı içecek örneklerinde enzim biyosensör kullanılarak glukoz tayini yapıldı. Referans metod olarak Trinder reaksiyonu kullanılmıştır. Ölçümler 3'er kez tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlara ilişkin değerler tablo 3.1'de verilmiştir.

Vişne suyundaki (dimes) % geri dönüşümü hesaplama;

0,1	0,101
100	x

%geri kazanım x=101

Gazlı içecekdeki (yedigün) % geri dönüşüm hesaplama;

0,032	0,036
100	x

%geri kazanım x=110,4

Gazlı içecekdeki (fruko) % geri dönüşüm hesaplama;

0,063	0,061
100	x

%geri kazanım x=96,80

Tablo 3.1 Örnek uygulama sonucu.

	Biyosensör cevabı	**Referans metot**	**Geri kazanım %**
Vişne suyu (dimes)	0,101 M ± 0,0088	0,10 M ± 0,0026	101
Gazlı içecek (yedigün)	0,036 M ± 0,0081	0,032 M ± 0,0016	110,4
Gazlı içecek (Fruko)	0,061 M ± 0,0027	0,063 M ± 0,011	96,80

BÖLÜM DÖRT
TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma kapsamında, yüzeyleri iki ayrı Ru (II) TSC ile modifiye edilmiş grafit elektrotları temel alan enzim biyosensörler hazırlandı. İlk biyosensör (η^6-p-simen)klorobis(tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S) rutenyum (II) klorür monomeri ile ikinci biyosensör ise trans-difenilkarbonilkloro(tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S)rutenyum(II) monomeri ile hazırlandı. *GOx* enzimi, elektrot yüzeyinde elektrokimyasal polimerizasyonu gerçekleştirilmiş olan Ru (II) TSC monomerleri glutaraldehid yardımıyla immobilize edildi.

Glukoz tayini amacıyla hazırlanan biyosensörlerin ilk olarak çalışma koşulları (pH, monomerlerin elektrokimyasal polimerizasyon süresi) optimize edildi. Optimizasyon sonunca en iyi pH cevabı 4 (50 Mm asetat tamponu içinde) olarak belirlendi. Biriktirme süresi optimizasyonu en iyi sonuç 50 döngü olarak belirlendi. Daha sonra doğrusal tayin aralığı belirlendi. Her iki biyosensörde 0,05-0,5mM glukoz konsantrasyonu aralığında doğrusallık gözlenmiştir. (η^6-p-simen) klorobis(tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S) rutenyum (II) klorür oligomeri için R^2 değeri 0,9936, trans-difenilkarbonilkloro(tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S)rutenyum(II) oligomeri için R^2 değeri 0,9744 olduğu gözlemlenmiştir.

Biyosensörlere ait diğer karakterizasyon çalışmaları SEM ve FTIR ile belirlendi. SEM görüntülerindeki FTIR değerlerindeki farklılıklar immobilizasyonun gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.

Diğer çalışmalar ise tekrarlanabilirlik ve örnek uygulama sadece (η^6-p-simen) klorobis(tiyofen-2-karboksialdehittiyosemikarbazon-N,S) rutenyum (II) klorür oligomeri ile oluşturulan biyosensör ile gerçekleştirildi. Bunun nedeni ise bu biyosensörün diğerine göre daha kararlı olmasıdır. Tekrarlanabilirlik için biyosensör

ile glukoz için standart sapma (S.D) : ±0,035mM (n=10) ve varyasyon katsayısı (c.v) : % 1,87 olarak bulundu.

Bu sistemi diğer glukoz biyosensörlerinden farklı kılan stabiliteyi, hızı ve duyarlılığı arttıran iletken polimerlerin kullanılmasıdır. Aynı zamanda enzim biyosensörlerin de kattığı bazı avantajlar vardır. Enzim sensörleri ilgili substratlarına karşı yüksek spesifiklik gösterir. Biyomoleküller için uygun bir matriks olan ve bu nedenle biyosensör uygulamalarında stabiliteyi, hızı ve duyarlılığı artırmak amacıyla kullanılabilen iletken polimerler aracılığıyla hazırlanan enzim biyosensörün doğrusal tayin aralığının geniş olması, sensör sistemi ile tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilmesi geliştirilen biyosensörün biyoteknolojik uygulamalarda kullanım alanına sahip olabileceğini göstermektedir. Bulunan sonuçlar literatürde yer alan benzer çalışmalarla kıyaslandığında birincil nesil biyosensörlere göre tasarlanan ikincil nesil biyosensör oksijen yerine başka bir elektron alıcısı (medyatör) kullanarak gerçekleştiğinden reaksiyon açısından üstünlük taşımaktadır. Bazı durumlarda ortamdaki oksijen varlığı analiz sonuçlarını etkilemektedir ve ortamda oksijen istenmemektedir. Böyle durumlarda mediyatörlü biyosensörler seçilmelidir.(Seven ve diğer., 2014). Örnek uygulama olarak kan numuneleri kullanılan Ferrosen içeren medyatörlü biyosensör ikincil biyosensörlere iyi bir örnek olmuştur fakat biyosensör tekrarlanabilirliği belirtilmemiştir (Cass ve diğer., 1984). Ferrosenil ditiyofosfonat içeren iletken polimerle tasarlanan medyatörlü biyosensörde varyasyon katsayısı (cv) % 6,02 (n:15) bulunmuştur (Sogancı, Demirkol, Ak ve Timur, 2012). Biyosensör tekrarlanabilirlik ve geri kazanım açısından diğer ikincil nesil biyosensörler kıyaslandığında üstün avantaj göstermektedir.

Sonuç olarak tez kapsamında, batch (kesikli) ile hazırlanan enzim biyosensör, etkin, stabil çalışan ve doğal örneklere uygulama potansiyeli yüksek olan bir sistem olması ile diğer elektrokimyasal sistemlere alternatif oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

Ahuja, T., Mir, A. ve Kumar, D. (2007). Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. *Biomaterials, 28*, 791–805.

Amin, G. A. ve Talhi, A. A. (2007). Production of L-glutamic acid by immobilized cell reactor of the bacterium Corynebacterium glutamicum entrapped into carrageenan gel beads. *World Applied Science Journal, 2*, 62–67.

Ateş, M. ve Saraç, A. S. (2009). Conducting polymer coated carbon surfaces and biosensor applications. *Organic Coating, 66*, 337-358.

Batır, G. G. (2009). *3-[(2,5-Dimetil-4-Brom)Fenil] Tiyofenin elektrokimyasal polimerizasyonu, karakterizasyonu ve glikoz biyosensörü olarak geliştirilmesi.* Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

Beckford, F., Dourth, D., Shaloski Jr., M., Didion, J., Thessing, J., Woods, J. ve diğer. (2011). Half-sandwich ruthenium arene complexes with thiosemicarbazones: Synthesis and biological evalution. *Journal Inorganic Biochemistry, 105*, 1019–1029.

Bell-Loncella, E.T. ve Bessel, C.A. (2000). *Cis* Bis(bipyridine)(dimethylglyoxime) ruthenium(II): An electrochemical and spectroscopic investigation of proton-coupled electron transfer. *Inorganica Chimica Acta, 303*, 199-205.

Cass, A. E., Davis, G., Francis, G. D., Aston, J. W., Higgins, J., Plotkin, E. V. ve diğer. (1984). Ferrocene mediated enzyme electrode for amperometric determinationof glucose. *Analitical Chemistry, 56*, 667-671.

Cassidy, M. B., Lee, H. ve Trevors, J. T. (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology, 16*, 79-101.

Costello, C., Karpanen, T., Lambert, P. A., Mistry, P., Parker K. J., Rathbone, D. ve diğer. (2008). Thiosemicarbazones active against Clostridium difficile. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 18,* 1708-1711.

D'Souza, S.F. (2001). Microbial biosensors. *Biosensor and Bioelectronic, 16,* 337–353.

Demas, J. N. ve DeGraff, B. A. (2001). Applications of luminescent transition platinum group metal complexes to sensor technology and molecular probes. *Coordinations Chemistry Reviews, 211,* 317–351.

Deo, Y. M. ve Gaucher, G. M. (2004). Semicontinuous and continuous production of penicillin-G by Penicillium chrysogenum cells immobilized in carragenan beads. *Biotechnology and Bioengineering, 26,* 285–295.

Diculescu, V. C., Paquim, A. M. C. ve Brett, A. M. O. (2005). Electrochemical DNA sensors for detection of DNA damage. *Sensors, 5,* 377-393.

Dinçkaya, E. (1999). Enzim sensörleri. *Biyosensörler,* 81-142.

Jenkins R. L., Wilson, E. M., Angus, R. A., Howell, W. M., Kirk, M., Moore, R. ve diğer. (2004). Production of androgens by microbial transformation of progesterone in vitro: A model for androgen production in rivers receiving paper mill effluent. *Environmental. Health Perspect*ives, *112,* 1508–1511.

Jo, J. H., Sung Lee, D., Park, D. ve Park, J. M. (2008). Biological hydrogen production by immobilized cells of Clostridium tyrobutyricum isolated from a food waste treatment proces. *Bioresource Technology, 99,* 6666-6672.

Kapoor, M., Nair, L. M. ve Kuhad, R. C., (2008). Cost-effective xylanase production from free and immobilized Bacillus pumilus strain MK001 and its application in

saccharification of Prosopis juliflora. *Biochemical Engineering Journal, 38*, 88–97.

Lei, Y., Chen, W. ve Mulchandani, A. **(**2006). Microbial biosensors. *Analytica Chimica Acta, 568,* 200-210.

Li, M. X., Chen, C. L., Ling, C. S., Zhou, J., Ji, B. S., Wu, Y. J. ve diğer. (2009). Cytotoxicity and structure-activity relationships of four α-N-heterocyclic thiosemicarbazone derivatives crystal structure of 2-acetylpyrazine thiosemicarbazone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *19*, 2704-2706.

Liang, S., Wenzhao, J., Changjun, H., ve Yu, L., (2011). Microbial biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics, 26,* 1788–1799.

Malhotra, B.D. (2003). Biosensors for clinical diagnostics industry. *Sensors and Actuators B, 91*, 117- 127.

Mohanty, S. P. ve Kougianos, E. (2006). Biosensors: A tutorial review. *Potential Biosensors, 25* (2), 35-40

Odenthal, K. J. ve Gooding, J. (2007). An introduction to electrochemical DNA biosensors. *Analyst*, *132*, 603.

Özyılmaz, G. (2005). *Glukoz oksidaz ve katalazin ayrı ayrı ve birlikte immobilizasyonu ve karakterizasyonu*. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Palecek, E. (2009). Fifty years of nucleic acid electrochemistry. *Electroanalytical*, *21,* 239–251.

Raveendran, R. ve Pal, S. (2006). Synthesis, structure and properties of di- and mononuclear ruthenium(III) complexes with N –(benzoyl)-N'-salicylidene)hydrazine and its derivatives. *Inorgonica Chimica Acta, 359*, 3212-3220.

Reshetilov, A. N., Trotsenko, J. A., Morozova, N. O., Iliasov, P. V. ve Ashin, V. V. (2001). Characteristics of Gluconobacter oxydans B-1280 and Pichia methanolica MN4 cell based biosensors for detection of ethanol. *Process Biochemistry, 36*, 1015–1020.

Riedel, K. (1998). Microbial biosensors based on oxygen electrodes. *Enzyme and Microbial Biosensors: Techniquis and Protocols, 7*, 199-223.

Sassolas, A., Blum, L. J. ve Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances, 30*, 489–511.

Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D. ve Branduardi, P., (2008). Microbial production of organic acids: Expanding the markets. *Trends Biotechnology, 26*, 100–108.

Seven, B., Demirdoven, T., Yildirim, H., Demirkol, O. D., Subası E., Sahin, E. ve diğer. (2013). Oligomeric thiosemicarbazones as novel ımmobilization matrix in biosensing applications. *Journal of Macromoleculer Science, 50* (4), 392-398.

Singh, R. S., Saini, G. K. ve Kennedy, J. F. (2008). Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers, 73*, 515-531.

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*, 592–598.

Singh, S., Mandal, P. K., Singh, N., Misra, A. K., Singh, S., Chaturvedi, V. ve diğer. (2010). Substituted hydrazinecarbothioamide as potent antitubercular agents: Synthesis and quantitative structure-activity relatonship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 20,* 2597-2600.

Sogancı, T., Timur, S., Demirkol, D. ve Ak, M. (2012). A novel organic-inorganic hybrid conducting copolymer for mediated biosensor applications. *Royal Society Chemistry Publishing,* 1-7.

Şahmetlioğlu, E. (2004). *İletken aşı kopolimerlerin sentezi ve bunların enzim tutuklama matrisleri olarak kullanımları.* Doktora Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde.

Telefoncu. A. (1986). *İmmobilize enzimler ve immobilizasyon yöntemleri.* Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu Ders Notu, İzmir, 1-16, 193-249.

Thilagavathi, N., Manimaran, A., Priya, N. P., Sathya, N. ve Jayabalakrishnan, C. (2009). Ruthenium (II) based antimicrobials: Looking beyond organic drugs. *Transition Metal Chemistry, 34,* 725–732.

Topbaş, N. (2006). *Anilin ve poliakrilonitril kullanarak kimyasal polimerizasyon yöntemi ile iletken kompozit lif hazırlanması.* Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Toshima, N. ve Hara, S. (1995). Direct synthesis of conducting polymers from simple monomers. *Progress in Polymer Science, 20,* 155-183.

Tuncagil, S., Odaci, D., Varis, 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,* 169–174.

Uzun, S. (2006). *Anilin 3-metiltiyofen ve Pirol Monomerinin Asidik Ortamdaki Davranışları ve Kimyasal Polimerizasyonu.* Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Tokat.

Yildirim, H., Guler, E., Yavuz, M., Ozturk, N., Yaman, K. P., Sahin, E. ve diğer. (2014). Ruthenium (II) complexes of thiosemicarbazone: Synthesis, biosensor applications and evalution as antimicrobicrobial agents. *Materyals Science & Engineering., 44*, 1-8.

Xia, L., Wei, Z. ve Wan, M. (2010). Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. *Journal of Colloid and Interface Science, 341*, 1–11.