ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yonca TOGAY

GLUKOZ KONSANTRASYONU ÖLÇÜMÜ İÇİN BİR ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR TASARIMI VE MODELLENMESİ

BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

ADANA-2022

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GLUKOZ KONSANTRASYONU ÖLÇÜMÜ İÇİN BİR ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR TASARIMI VE MODELLENMESİ

Yonca TOGAY

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Çetin CANPOLAT
Yıl: 2022 Sayfa: 67
Jüri : Doç. Dr. Çetin CANPOLAT
: Doç. Dr. Ahmet AYDIN
: Doç. Dr. N. Filiz ÖZDİL

Biyokimyasal olayların incelenmesinde ve oluşan değişimlerin algılanmasında biyosensörler yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bir biyosensör biyoaktif tabaka, sinyal iletici sistem, kaydedici olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır. Biyosensörler yüksek duyarlılıklı, hızlı, basit ve ucuz cihazlardır. Biyosensörlerin tasarımında enzimler, biyomateryaller, dokular kullanılabilmektedir. Enzimler protein yapısında olup tepkimeleri belirli koşullarda gerçekleştiren biyokatalizörlerdir. Bu çalışmada glukozun enzim bağımlı oksidasyon ve redüksiyon tepkimeleri incelenmiştir. Bu amaçla bir mikro kanal yüzeyine bir elektrot yerleştirilmiştir. Elektrot üzerinde oluşan redoks tepkimeleri sonucu akım değişimleri çevrimsel voltammetri ile izlenmiştir. Mikrokanala entegre biyosensörün tasarımı ve sonlu elemanlar analizi için Comsol Multiphysics v3.5a kullanılmıştır. Matematiksel modelleme öncelikli olarak mikrokanal boyunca sıvı akışı olmadan gerçekleştirilmiştir. Analizlere mikrokanal girişine laminer akış koşulları altında bir sıvı girişi tanımlanarak devam edilmiştir. Bu çalışmada laminer akış varlığında çevrimsel voltammetriden elde edilen maksimum akımın yükseldiği gözlemlenmiştir. Simülasyonlar, sıvı akış hız şiddetinin arttırılmasının biyosensörün etkinliğinin arttırdığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Glukoz, Çevrimsel Voltammetri, Biyosensör, Sonlu Elemanlar Analizi

ABSTRACT

MSc THESIS

DESIGN AND MODELING OF AN ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR MEASUREMENT OF GLUCOSE CONCENTRATION

Yonca TOGAY

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Çetin CANPOLAT
Year: 2022, Pages: 67
Jury : Assoc. Prof. Dr. Çetin CANPOLAT
: Assoc. Prof. Dr. Ahmet AYDIN
: Assoc. Prof. Dr. N. Filiz OZDIL

Biosensors are widely used in the analysis of biochemical events and the detection of changes. A biosensor consists of three basic components: a bioactive layer, a signal-transmitting system, and a recorder. Biosensors are high-sensitivity, fast, simple, and inexpensive devices. Enzymes, biomaterials, and tissues can be used in the design of biosensors. Enzymes, which are biocatalysts performing reactions under certain conditions are in protein structure. In this study, the enzyme-dependent oxidation and reduction reactions of glucose were investigated. For this purpose, an electrode is placed on a microchannel surface. Current changes as a result of redox reactions on the electrode were monitored by cyclic voltammetry. Comsol Multiphysics v3.5a was used for the design and finite element analysis of the microchannel integrated biosensor. Mathematical modeling was first performed without fluid flow through the microchannel. Analyzes were continued by defining a liquid flow to the microchannel inlet under laminar flow conditions. In this study, it has been observed that the maximum current obtained from cyclic voltammetry increases in the presence of laminar flow. Simulations have shown that increasing the magnitude of liquid flow velocity increases the efficiency of the biosensor.

Keywords: Glucose, Cyclic Voltammetry, Biosensor, Finite Element Analysis

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Biyosensör, biyokimyasal reseptör ve dönüştürücü kullanarak analitik bilgi sağlayabilen bir cihazdır. Genellikle biyosensörler multidisipliner bilim alanının bilgilerinden yararlanır. Bu bilim alanları mühendislik, biyokimya, biyoloji, fizik, kimya, gibi alanlardır. Biyosensörler bu alanlara ait sistemlerin seçimlilik özellikleri veya biyolojik moleküllerin modern teknikler kullanılarak yeniden oluşturulmasıyla yapılan biyoanalitik tasarımlardır.

Biyosensörler sayesinde hem insan vücudunda hem de çevre ile ilgili birçok tepkimelerde biyolojik analizler yapılabilmektedir. Biyosensörlerin hassasiyet, taşınabilirlik, biyouyumluluk, az yer kaplama ve maliyetinin düşük olması gibi avantajları bulunmaktadır. Biyosensörler ölçüm prensiplerine ve iletici türüne göre elektrokimyasal esaslı, optik esaslı, piezoelektrik esaslı ve kalorimetri esaslı olmak üzere dörde ayrılmaktadır. Elektrokimyasal esaslı biyosensörler ile elektrokimyasal ileticiler yardımı ile amperometri/ potansiyometri/voltametri ilkeleriyle ölçümler alınabilir. Voltametrik esaslı biyosensörler, elektrokimyasal analizlerdeki diğer tekniklere göre çok yönlüdür. Bu teknikte, gerçekleşen reaksiyonun akımı ve potansiyeli ölçülüp kaydedilmektedir. Kaydedilen bu akım ve potansiyele göre voltammetri grafiği elde edilmektedir. Voltammetri grafiğinin bir ekseni akımı gösterirken diğer eksen potansiyeli göstermektedir. Akımdaki tepe noktası, belirli bir kimyasal ile o kimyasalın konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösterir. Kimyasalın konsantrasyonu arttıkça akım doğrusal bir şekilde artış göstermektedir. Voltametrik esaslı biyosensörlerden en yaygın olanı Çevrimsel Voltammetri (Cyclic Voltammetry)'dir. Çevrimsel voltammetride (CV) elektrot voltajı, bir potansiyelden birkaç milisaniyede oksitlenen bir potansiyele dönüşümlü olarak değiştirilir.

Optik esaslı biyosensörler ise iki genel sınıfa ayrılır. Işığın iletimindeki değişimin ölçülmesi esasına dayanan tipleri absorbsiyon esaslı biyosensörler olarak isimlendirilmektedirler. Diğer türü ise floresanın ölçümü esasına dayanır. Piezoelektrik esaslı biyosensörler piezoelektrik kristallerini kullanarak rezonans

frekansındaki değişimle nano seviyede kütlenin değişimini ölçen biyosensörlerdir. Kalorimetrik esaslı biyosensörler ise enzim reaksiyonlarında entalpi değişiminden yararlanıp substrat konsantrasyonunu belirlemekte kullanılırlar.

Kandaki glukozun düzenlenmesinde karaciğerler ve hormonlar görev almaktadır. İnsülin hormonu parçalanmış olan glukozun hücrelerde kullanılması için kandan geçişinden sorumlu bir hormondur. Bireylerde diyabete sebep olan insülin hormonu yetersizliği veya bu hormonun etki göstermemesi durumu kandaki glukoz seviyesini arttırmaktadır. Diyabet, ileri dönemlerde organlarda kalıcı hasarlara hatta ölüme sebep olduğu için kan ve idrardaki glukoz seviyesi düzenli olarak takip edilmelidir. Glukoz ölçümü ve takibi bireylerin sağlığı açısından oldukça önemli olup teşhis ve tedavilerde erken tanı konulmasını sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında çevrimsel voltammetri (cyclic voltammetry) kullanılarak glukoz ölçümü için bir biyosensör tasarlanmıştır. Biyosensörün elektrodu bir mikro kanalın tabanına yerleştirilmiştir. Öncelikle ortamda sıvı akışı olmadığı durumda, sonrasında laminer akış koşullarında biyosensörün etkinliği sonlu elemanlar yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Simülasyonlar Comsol Multiphysiscs v5.3a kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada glukoz konsantrasyonu, debi, elektrot boyutu gibi parametreler değiştirilerek mikro kanalın tabanında yer alan elektrottaki akım değişimi incelenmiştir. Öncelikle, matematiksel modelleme mikro kanal boyunca sıvı akışının olmadığı durumda gerçekleştirilmiştir. Analizlere mikro kanal girişine laminer akış koşulları altında bir sıvı girişi tanımlanarak devam edilmiştir. Elde edilen sıvı akışı olmadan ve laminer akış varlığındaki grafikler yorumlanmıştır. Bu çalışmada laminer akış varlığında çevrimsel voltammetriden elde edilen maksimum akımın yükseldiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, laminer akış koşulları altında biyosensör etkinliğinin arttığı gözlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sürecinde her türlü desteği esirgemeyen, tecrübeleri ile yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Çetin CANPOLAT' a,

Tez dönemim boyunca tüm tecrübelerini ve desteğini esirgemeyen, yapıcı eleştirileri ve çok değerli önerileriyle, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Öğr. Gör. Mehmet Melih TATLISÖZ'e,

Tez sunumunda ve savunmasında yer alan saygıdeğer jüri üyelerine,

Varlıkları ile yaşama sevincim olan, maddi manevi her türlü desteği hiçbir zaman benden esirgemeyen sevgili aileme ve Mustafa AĞARTAN' a,

Bana maddi ve manevi olarak destek olan Ömer Muhsin DÜNDAR' a, Ahmet Faruk ÜRÜN'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER VI
ÇİZELGELER DİZİNİ VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ X
SİMGELER VE KISALTMALAR XII
1. GİRİŞ 1
1.1. Glukoz 1
1.2. Enzimler 2
1.2.1. Glukoz Oksidaz Enzimi 4
1.3. Biyosensörler 8
1.3.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması 12
1.3.1.1. Amperometrik Esaslı Biyosensörler 13
1.3.1.2. Potansiyometrik Esaslı Biyosensörler 13
1.3.1.3. Voltammetrik Esaslı Biyosensörler 13
1.3.1.3.(1). Çevrimsel Voltammetri (Cyclic Voltammetry) 14
1.3.1.3.(2). Çalışmanın Önemi ve Motivasyon 16
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 19
2.1. Elektrokimyasal Biyosensörlerin Sonlu Elemanlar Modellemesi 19
2.2. Farklı Elektrotlar ile Glukoz Oksidasyonu 22
2.3. Altın Elektrot ile Glukoz Tayini 22
2.4. Altın Nanoparçacıklar ve bor katkılı elmas ile Glukoz Ölçümü 23
2.5. Elektrokimyasal Nanobiyosensörün Modellenmesi 23
2.6. Mikroelektrot Dizilerinde Çevrimsel Voltammetri Simülasyonu 25
3. MATERYAL VE METOT 29

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 59
KAYNAKLAR 61
ÖZGEÇMİŞ 67

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 1.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması 12
Çizelge 3.1. Model Boyutları 30
Çizelge 3.2. Denklemlerde Kullanılan Parametreler 34
Çizelge 3.3. Reaksiyonların değişkenlerinin tanımlanması 34

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 1.1. Glukozun Yapısı 1
Şekil 1.2. Tepkime Hızı pH ilişkisi 4
Şekil 1.3. GOD yapısındaki FAD molekülü 5
Şekil 1.4. Glukoz Oksidaz Reaksiyon Mekanizması 6
Şekil 1.5. GOD yapısında FAD ve aktif bölgedeki aminoasit kalıntıları 6
Şekil 1.6. In-vitro biyosensörler için biyoalgılama ve transdüksiyon sınıfları. Biyoalgılama yöntemleri: (a) antikor/antijen; (b) enzim katalizli; (c) nükleik asit; (d) hücre bazlı; (e) biyomimetik. İletim yöntemleri; (f) optik; (g) elektrokimyasal; (h) kütleye duyarlı; (i) termal. 10
Şekil 1.7. Bir kimyasal sensörün yapısı ve çalışma mekanizması. 10
Şekil 1.8. Biyosensörlerin genel çalışma algoritması 11
Şekil 1.9. a) Potansiyel zaman grafiği b) Çevrimsel voltammetri 15
Şekil 1.10. Tarama hızının artmasının CV'ye etkisi 15
Şekil 2.1. Comsol'da analiz edilecek sensörün Solidworks 'de çizimi 19
Şekil 2.2. 2 mm çaplı ekran baskılı elektrot kullanılarak 7 mM toplu reaktan konsantrasyonundan (prob yüzeyinde) değişen ürün konsantrasyonları oluşturan 3D CV yüzey grafiği 20
Şekil 2.3. Kronoamperometri ekranlı Çevrimsel Voltammetri Parametreleri çeşitli toplu konsantrasyonlar 21
Şekil 2.4. Çevrimsel Voltammetri parametreleri ve çeşitli konsantrasyonlar 21
Şekil 2.5. (a) 0.1 M KNO3 (glukozsuz), (b) 0.1 M KNO3+ glukoz 0.001'in çevrimsel voltamogramı 22
Şekil 2.6. a) Simüle edilmiş nanoçip biyosensörün şematik tasarımı b) Nanoçip kesitinin iki boyutlu alanı ve yakınlaştırılmış görünümü için nanoçipin ayrıntılı bilgileri ve oluşturulan ağ. 24
Şekil 2.7. Farklı fenol konsantrasyonlarına karşılık gelen simüle edilmiş çevrimsel voltammogramlar 25

Şekil 2.8. Simülasyon Geometrileri a) kakmalı b) girintili 26
Şekil 2.9. Mikroelektrot dizisi üzerinde simüle edilen çevrimsel voltammetri 27
Şekil 3.1. Bu çalışmada kullanılan model geometrisinin görüntüsü. 30
Şekil 3.2. Reaksiyon şeması 32
Şekil 3.3. Bağımlı değişkenler 35
Şekil 3.4. Difüzyon katsayıları 36
Şekil 3.5. Başlangıç değerleri 37
Şekil 3.6. Elekrot yüzey parametreleri 37
Şekil 3.7. Elektrot kinetikleri 38
Şekil 3.8. Katsayılar 39
Şekil 3.9. Reaksiyon oranları 40
Şekil 3.10. Zamana bağlı çözüm parametreleri 41
Şekil 3.11. Elektroanaliz bölümü 42
Şekil 3.12. Sınır koşulu tam gelişmiş laminer akış olan girişin Comsol yazılımındaki ekran görüntüsü 42
Şekil 3.13. Auxiliary sweep parametreleri 43
Şekil 3.14. Farklı konsantrasyonlardaki çevrimsel voltametri grafiği 44
Şekil 3.15. Kalibrasyon eğrisi 44
Şekil 3.16. Comsol yazılımının ilgili ekran görüntüsü 45
Şekil 4.1. Akış koşulları olmadığı durumda CV grafiği 48
Şekil 4.2. Laminer akış koşulları altında CV grafiği 49
Şekil 4.3. Farklı glukoz değerlerindeki CV grafikleri 50
Şekil 4.4. Debi değeri 25 µl/dk olan 1 mMol glukoz değerindeki CV grafiği 51
Şekil 4.5. Debi değeri 50 µl/dk olan 1 mMol glukoz değerindeki CV grafiği 52
Şekil 4.6. Debi değeri 100 µl/dk olan 1 mMol glukoz değerindeki CV grafiği 53
Şekil 4.7. Debi değeri 200 µl/dk olan 1 mMol glukoz değerindeki CV grafiği 54
Şekil 4.8. Boyutu 100 µm olan elektrotun CV grafiği 55
Şekil 4.9. Boyutu 200 µm olan elektrotun CV grafiği 56
Şekil 4.10. Boyutu 300 µm olan elektrotun CV grafiği 57

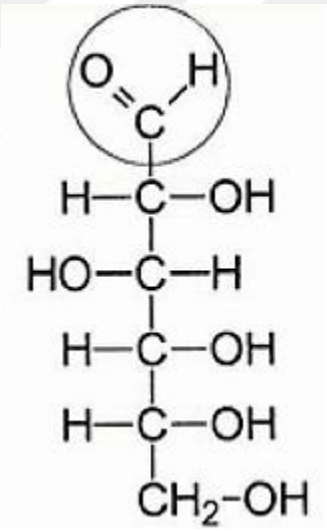
SİMGELER VE KISALTMALAR

µA : mikro-Amper
AMP : Adenozin Monofosfat
Au : Altın
AuNPs : Altın Nanoparçacıklar (Gold nanoparticles)
BDD : Bor Katkılı Elmas (Boron Doped Diamond)
BOD : Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı
CV : Çevrimsel Voltammetri (Cyclic Voltammetry)
FAD : Flavin Adenin Dinükleotid
FMN : FlavinMonoNükleotit
GOD : Glukoz Oksidaz
GOx : Glukoz oksidaz
K_m : Michaelis Menten sabit
mM : mili-Molar
mMol : mili-Molar
V_{max} : Maksimum Hız

1. GİRİŞ

1.1. Glukoz

Glukoz($C_6H_{12}O_6$), şekil 1.1'de görüldüğü gibi 6 karbondan oluşan basit bir hidrokarbondur. Canlı hücrelerin enerji kaynağı olan glukoz sağlıklı bir insanın kanında 4.4-6.6 mM olmalıdır (Li ve ark., 2009). Bir numunedeki glukoz konsantrasyonunu belirlemek için gıda ve klinik kimya araştırmalarında birçok yöntem geliştirilmektedir (Asif ve ark., 2010). Bunlardan birisi glukozun spesifik olmayan indirgeme özelliğini kullanarak reaksiyona girdiğinde indirgenerek rengini değiştiren bir madde kullanan kimyasal bir yöntemdir. Yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntem ise glukoza özgü olan glukoz oksidaz enzimi ve hekzokinaz gibi enzimlerin kullanılmasıdır(Cox ve ark., 2017).



Şekil 1.1. Glukozun Yapısı (Hühnerfuss, 2016)

Kanda glukoz düzeyi glisemi olarak adlandırılır. Gliseminin normal seviyesine normoglisemi, normal seviyenin altındaki değerlere hipoglisemi ve normal seviyenin üstündeki değerlere hiperglisemi adı verilir. Vücudun önemli enerji kaynağı olan karbonhidratlar glukoza dönüşebilmek için kan dolaşımında

parçalanırlar. Kandaki glukozun düzenlenmesinde karaciğerler ve hormonlar görev alır. İnsülin hormonu; parçalanmış olan glukozun hücrelerde kullanılması için kandan geçişinden sorumludur. Bireylerde diyabete sebep olan insülin yetersizliği veya etki göstermemesi durumu kandaki glukoz seviyesini arttırır. Diyabet ileri dönemlerde organlarda kalıcı hasarlara hatta ölüme sebep olduğu için glukoz seviyesi düzenli olarak takip edilmelidir (Wang ve ark., 2014).

Diyabet hastalarının klinik tanısı açısından önemli bir metabolit olan glukozun hassas tayini oldukça önemlidir. Hiperglisemi, hipoglisemi, diyabet gibi hastalıkların tanı ve takibini yapabilmek için kanda glukoz tayini yapılır ve bunun için çeşitli analitik yöntemler (enzimatik ve kolorimetrik yöntemler) kullanılmaktadır. Kolorimetrik yöntemler, oksidasyon-redüksiyon metodu ve ortotoluidin metodu olarak ikiye ayrılır. Oksidasyon redüksiyon yöntemi şekerlerin indirgenme niteliğinden faydalanılarak geliştirilmiştir, ortotoluidin metodunda renkli bir karışım elde edilir ve rengin şiddetine endeksli bir biçimde oluşturulmuş bir metottur. Enzimatik yöntemler ise Glukoz Oksidaz Metodu ve Hekzokinaz Metodu olarak iki çeşittir (Castillo ve ark., 2004). Glukoz tayini gıdalarda da yapılmaktadır. Bunun nedeni, karbonhidratı fazla tüketen bireylerde kilo artışıyla birlikte diyabete zemin hazırlanmaktadır. Paketli yiyeceklerdeki toplam şeker oranını belirlemek, toplam kalori hesabını yapmak, gıdaların uygun şekilde hazırlandığını analiz etmek gibi nedenlerden dolayı glukoz tayini uygulamaları gıdalar için de yapılmaktadır.

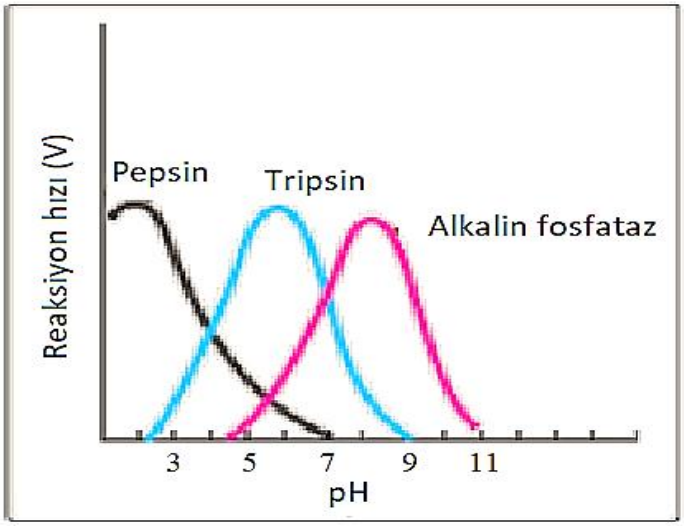
1.2. Enzimler

Enzimler protein yapısında olup tepkimeleri uygun koşullarda gerçekleştiren biyokatalizörlerdir. Canlılarda oluşan reaksiyonların çoğu enzimlerle gerçekleştirilir (Öztürk, 2015). Enzimler koenzim, kofaktör, aktif bölge, holoenzim kısımlarından oluşur. Enzim-substrat kompleksinin şekillendiği dar bölgeye aktif bölge denir. Enzim ve substrat anahtar-kilit uyumu ile birbirini tamamlayıcı niteliktedirler. Aminoasit ve substrat birbirine aktif bölgelerinden bağlanır ve enzim substrat

kompleksi oluşur, sonrasında substrat ürüne dönüştürülür. Daha sonra ürün enzim-ürün kompleksinden ayrılarak serbest hale geçer. Enzim değişime uğramadığından kalan enzim farklı bir substratı bağlayabilir (Öztürk, 2015).

Hücrenin canlılığının devamı için çok önemli bir role sahip olan enzimler, katalizledikleri ana reaksiyona göre uluslararası enzim komisyonu tarafından; oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar, ligazlar olarak 6 gruba ayrılmıştır. Oksidoredüktazlar, oksidasyon redüksiyon tepkimelerini kataliz ederler. Hidrolazlar, moleküle su molekülünün eklenmesini sağlayarak bağ kırılmasını sağlarlar. Liyazlar, çift bağ yaparlar ya da kırarlar. İzomerazlar, molekülleri izomerlerine çevirirler. Ligazlar, ise iki molekül arasında bağ oluşumunu katalize ederler(Geçkil, 2012).

Enzim, reaksiyonları sadece gerçekleştirilmek ile kalmaz aynı zamanda uygun hızlarda oluşmasını sağlar. Enzimlerin uygun koşullarda çalışması gerekmektedir. Örneğin, sıcaklık, pH, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, zaman gibi faktörlerden etkilenirler. Enzimler sıcaklık artışıyla birlikte moleküllerin kinetik enerjisini arttırarak tepkime hızını arttırır. Optimum sıcaklığa ulaştıktan sonra enzimin molekül yapısı etkilenir. Sıcaklığın artmasıyla maksimum hıza ulaştıktan sonra tepkime hızı birdenbire düşer. Ayrıca, şekil 1.2'de görüldüğü üzere her bir enzimin kendisine özel olan belirli optimum pH değeri vardır. Genellikle enzimler için optimum pH aralığı 6-8 arasındadır (Tüzün, 1991).

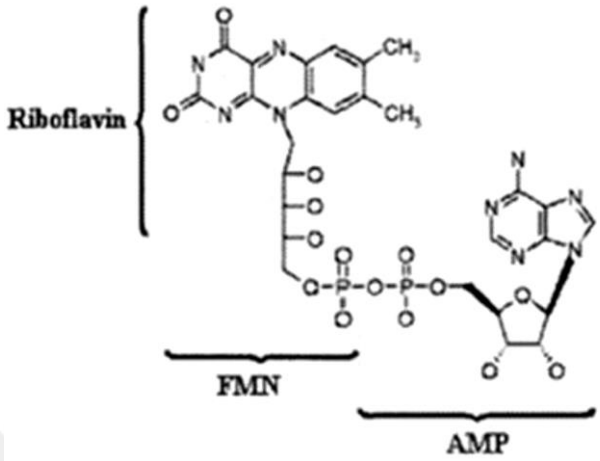


Şekil 1.2. Tepkime Hızı pH ilişkisi (Champe ve ark.,2005)

Substrat miktarı arttığı zaman tepkime hızı da artmış olur. Enzim substrata doyduktan sonra substrat konsantrasyonun artması reaksiyon hızında değişikliğe neden olmaz ve sabit kalır (Kutay ve ark., 2002). Ortamda yeterli miktarda substrat var ise enzim miktarının artması ile tepkimenin hızı da doğru orantılı artar. Enzimler tepkimenin hızını etkilemesine rağmen hız ve denge sabitlerini değiştirmez.

1.2.1. Glukoz Oksidaz Enzimi

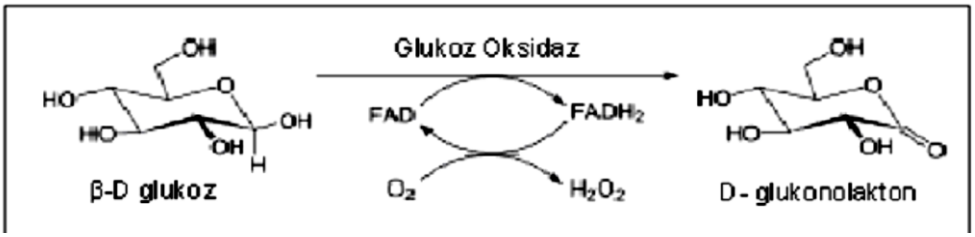
Glukoz 1-oksidaz (GOD)(*β*-D-glucose:oxygen-1-oxidoreductase, EC 1.1.3.4) 1928 yılında Muller tarafından keşfedilmiştir (Bentley, 1963). Muller enzimin oksidatif etkisi olduğunu ve saflaştırılan enzimin sarı renginin prostetik grup olan flavin adenin dinükleotidden (FAD) kaynaklandığını ifade etmiştir (Wilson ve Turner). Oksidasyonun FAD tarafından gerçekleştiği belirlenen enzimin ortaya çıkardığı H_2O_2 ile antimikrobiyal aktivite gösterip antibiyotik olarak davranış sergilediğini da ortaya koymuştur (Özyılmaz, 2005). GOD' un yapısındaki FAD molekülünün kimyasal yapısı şekil 1.3' de gösterilmektedir.



Şekil 1.3. GOD yapısındaki FAD molekülü (Özyılmaz, 2005)

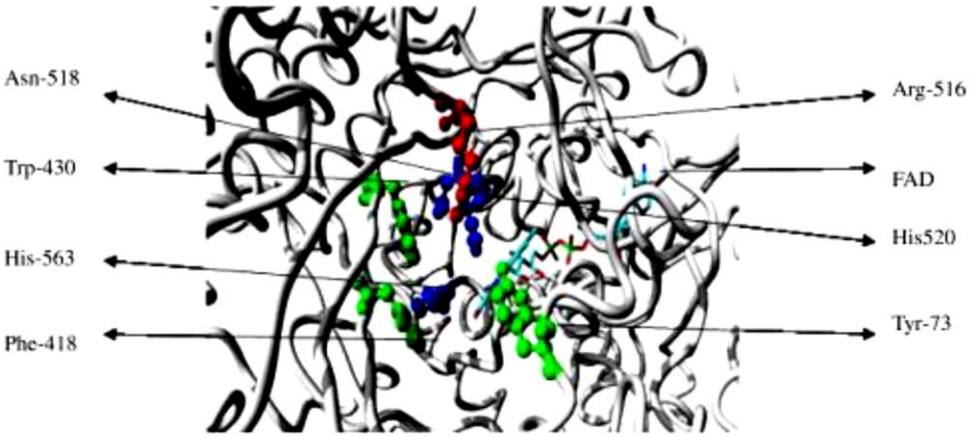
Oksiredüktaz sınıfına ait olan glukoz oksidaz aspergillus ve penicillium'dan salgılanır (İçli, 2008). Glukoz moleküler oksijen ile yükseltgenir, glukono-1,5 lakton ve hidrojen peroksidi oluşturur. Bu reaksiyonu glukoz oksidaz katalizler. Enzime ihtiyaç duymayan lakton sulu bir ortamda hidroliz olup glukonik aside dönüşmüş olur. Dimerik flavoprotein olan glukoz oksidaz kendi kendine gerçekleşen glukonik asit, hidrojen peroksit hidrolizi sırasında glukozun moleküler oksijeni glulaktona dönüştürülmesini katalizler (Xia ve ark., 2012).

Çözünmüş oksijen varlığında H_2O_2 şekil 1.4'te görülen reaksiyona göre üretilir (Berchmans ve ark., 2003). GOD'u katalize etmek için flavin adenin dinükleotit (FAD) koenzimini gerektirir. GOD katalizli indirgeme reaksiyonunda FAD bir elektron alıcısıdır ve $FADH_2$'ye indirgenir. Şekil 1.4'te görüldüğü gibi moleküller oksijen tarafından $FADH_2$ sonrasında FAD'a yükseltgenir ve oksijen hidrojen peroksite indirgenir. Biyolojik tepkimelerde H_2O_2 oksidasyon ürünü olarak kullanılır. Bu durum biyoproseslerin izlenmesi için oldukça önemlidir.



Şekil 1.4. Glukoz Oksidaz Reaksiyon Mekanizması (Leskovac ve ark., 2005)

Kovalent disülfit bağlarla bağlanmış iki özdeş polipeptitden oluşan ve dimerik glikoprotein olan GOD asklı mantarlardan oluşur (Ahmad ve ark., 2015). Monomerin her biri 583 aminoasit kalıntısından oluşur. Monomerler birbirine tuz köprüleri ve hidrojen bağlarıyla bağlanır (Leskovac ve ark., 2005). Asn-518, Tyr-73, Trp-430, Arg-516, PHe-418, His-520 ve His-563; GOD'un aktif merkez kalıntılardır. GOD ve β-D-glukozun etkili bir şekilde bağlanması için en önemli aminoasit Arg-516'dır. Tyr-73, PHe-418 ve Trp-430 substratın doğru yönelmesi için önemlidir. GOD yapısında FAD ve aktif bölgedeki aminoasit kalıntıları şekil 1.5'te görülmektedir.



Şekil 1.5. GOD yapısında FAD ve aktif bölgedeki aminoasit kalıntıları (Bankar ve ark., 2009)

Literatürde GOD enzimlerini belirlemek için birçok analitik yöntem bulunmaktadır. Tongbu (1996), GOD tayini belirlemek için bir titrasyon yöntemi kullanmıştır. Bu yöntemde enzim çözeltisi %2'dir. Asetat tamponuna eklenen ve β-D-glukoz içeren GOD sonrasında sodyum hidroksit çözeltisi eklenince reaksiyon durdurulur. GOD aktivitesi, karışımın standart hidroklorik asit çözeltisi ile titrasyonuyla ve eklenen standart hidroklorik asit çözeltisi hacminin hesaplanmasıyla bulunur. Araştırmacıların çoğu glukoz oksidazın β-D-glukozun β-D-glukano-δ-laktona ve H_2O_2 'ye oksidasyon reaksiyonunu içeren analitik yöntemi kullanır. İkincil bir reaksiyonda H_2O_2 HRP enzimiyle kromojenik substratın renk değişmesiyle sonuçlanan yükseltgenmesinde kullanılır.

Sıcaklık değişimine duyarlı olan enzimler her 10 derece artışta enzim tepkime oranı 2 katına çıkar. Sıcaklığı ne oranda arttırmamız gerektiği moleküller arası bağ kuvvetine bağlıdır. Bu bağlar ne kadar kuvvetliyse bu bağın bozulması o kadar zorlaşır. Sıcaklık arttırıldığında tepkimenin eşik değeri düşer. Sıcaklık artmasının devam etmesi substrat ve enzimleri oluşturan moleküllerin arasındaki bağları etkilediğinden zaman içerisinde kırılmaya başlar. Enzim optimum sıcaklıkta maksimum aktiviteyi gösterir. Glukoz oksidazın en düşük optimum sıcaklık aralığı 25-30 °C ve en yüksek optimum sıcaklık aralığı 40-60 °C'dir (Sim ve ark.,2016). Proteinlerin genellikle pH değer aralıklarının, ölçümler sonucunda 5-9 arasında değer aldıkları saptanmıştır. *A. Niger* ve *P. Chrysogenum g*lukoz oksidazın da değer aralıkları minimum pH=5 maksimum pH=7 değer aralıklarında aktiftir. *P. Funiculosum 433* ve *P. Canescens* glukoz oksidazın optimum pH'ı 6-8.6 arasındadır (Rayegan ve ark., 2017).

Enzim kinetiğinin matematiksel modeli için kullanılan Michaelis-Menten denklemlerindeki maksimum hız olan V_{max} ve Michaelis-Menten sabiti olarak bilinen K_m parametreleri farklı araştırmacılar tarafından hesaplanmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. GOD' un *T. favus* için K_m değeri 10.9 mM ve *A. Niger* için K_m=33 mM. *P. Amagasakiense* GOD K_m=5.7 mM ve *P. Funiculosum* GOD Km ise K_m=3.3 mM'dir. Glukozile ve deGlukozile *P. Amagasakiense* GOD K_m değerleri ise

sırasıyla 3.4 mM ve 2.7 mM 'dır. V_{max} değerleri 450-1000 U/mg arasındadır(Reynolds ve Pillay,2016).

Glukoz oksidaz enzimi birçok kimya, endüstriyel, sağlık, gıda gibi uygulamalarda kullanılmaktadır. Biyosensör tasarımı, gıda işleme, antioksidan, ağız hijyeni gibi uygulamalar bunlara örnek verilebilir:

Gıda işleme: GOD gıda endüstrisinde koruyucu, olgunlaştırıcı, antioksidan ve stabilize edici özelliklerinde güvenli olarak kullanılan katkı maddesidir (Vuong ve ark., 2016).

Ağız hijyeni: Glukoz oksidaz ağız bakım ürünlerinde mikrop öldürücü olarak kullanılmaktadır.

Biyosensör tasarımı: GOD biyosensörlerde kullanılan ilk enzimlerdendir. Enzim ve substrat arasındaki uyum sebebiyle enzim elektrotları kullanılır. Özellikle şeker hastalığında glukoz ölçümü için kullanılması oldukça önemlidir(Dönmez ve ark., 2016).

1.3. Biyosensörler

Kimyasal bileşiklere seçici ve tersinir olarak cevap veren ve konsantrasyona bağlı elektriksel sinyaller oluşturan küçük cihazlara biyosensör denir. Biyosensörlerin geliştirilmesindeki ilk çalışmalar 1962 yılında Lyons ve Clark tarafından oksijene duyarlı elektrotla glukoz oksidaz enzimini immobilize ederek hazırladığı glukoz biyosensörüyle başlamıştır (Asav ve Akyilmaz, 2009). Glukoz ölçümü için tasarlanan bu tip biyosensörlerde glukoz ve çözünmüş oksijen sıvı içerisinde elektrotun çevresindeki zarı geçerek elektrotun yüzeyine ulaşır ve glukozu O_2 ile oksitler. Ortamda bulunan glukoz bittiği zaman başlangıçtaki ve tepkime sonundaki çözünmüş oksijen, O_2 elektroduyla ölçülür. Bulunan fark glukozun yükseltgenmesi için harcanan oksijendir ve böylelikle ortamda bulunan sıvının glukoz derişimi hesaplanmış olur (Altug ve ark., 2011). Sisteme biyosensör eklenmesiyle klasik elektrokimya mantığındaki anyon ve katyon ölçümü dışında

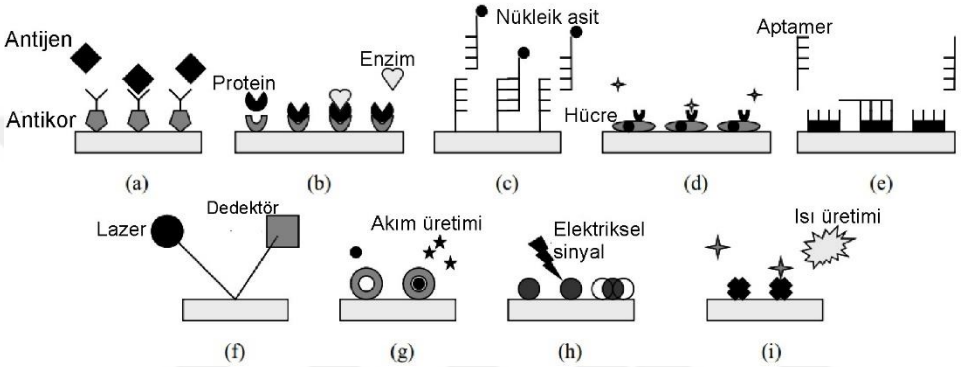
birçok madde tayini yapmak biyosensörlerin sistemlerdeki en önemli avantajlarındandır (DeSalvo ve ark., 2016).

Biyosensörler biyoaktif tabaka, sinyal iletici sistem, kaydedici olarak 3 bileşenden oluşur;

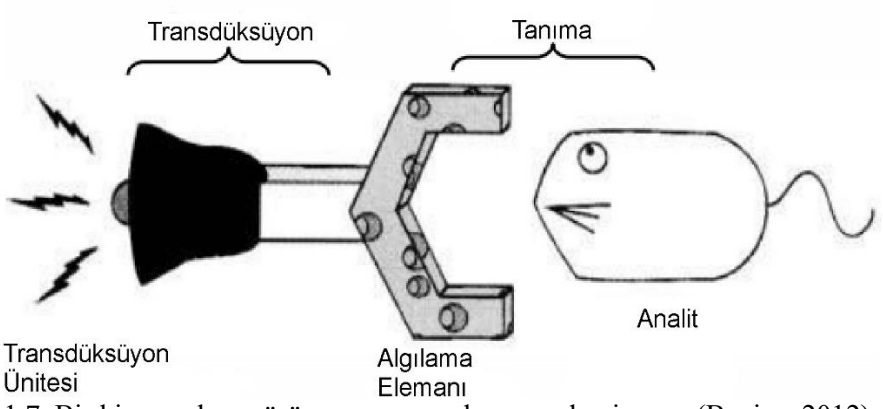
- **Biyoaktif tabaka**: Seçici bir mekanizması ile maddeyi tanır.
- **Sinyal iletici sistem**: Biyoaktif tabaka ile araştırılan maddenin etkileşmesiyle meydana gelen sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürür.
- **Kaydedici**: Oluşan sinyalleri kaydeden ölçüm cihazıdır (Meral ve ark., 2006).

Biyoaktif tabakalarda enzimler, antikorlar, reseptör proteinler ve bakteriler gibi değişik biyomoleküller kullanılır (Gooding, 2006). Biyosensörler, kullandıkları biyolojik sinyal mekanizması tipine veya kullandıkları sinyal transdüksiyon tipine göre sınıflandırılabilir. Biyosensörler tarafından kullanılan biyolojik sinyalleşme beş ana mekanizmaya ayrılabilir. Bunlar, antijen/antikor, enzim, nükleik asit, hücreler/virüsler ve biyomimetik malzemelerdir. Biyosensörlerin sinyal iletim tipleri de optik, elektrokimyasal, kütle ve termal olarak dört farklı şekildedir. In-vitro biyosensörler için biyoalgılama ve transdüksiyon sınıfları şekil 1.6'da görülmektedir. Örnek olarak bir kimyasal biyosensörlerin yapısı ve çalışma mekanizması şekil 1.7'de gösterilmiştir. Biyokimyasal sensör bir reseptör ve bir sinyal (iletim) biriminin birleşimidir. Bir kimyasal sensör çalıştırıldığında şekil 1.7'deki mekanizma ile örneklenen tanıma ve iletme olmak üzere iki işlevi yerine getirir. İlk olarak analit, analite yakınlık gösteren tanıma (veya algılama) unsuruyla az çok seçici bir şekilde etkileşime girer. Algılama elemanı, tanıma reseptörleri adı verilen farklı moleküler birimlerden oluşabilir. Alternatif olarak tanıma elemanı, bileşiminde belirli tanıma yerleri içeren bir malzeme olabilir. Bunun ötesinde,

tanıma elemanı, belirgin tanıma yerleri olmayan ancak analit ile etkileşime girebilen bir materyalden oluşturulabilir. Bir kimyasal sensörde, tanıma ve iletim işlevi aynı cihaza entegre edilmiştir. Tanıma işlevi olmayan bir analitik cihaz, bir kimyasal sensör değil, bir konsantrasyon dönüştürücüsüdür. Biyosensörlerin genel çalışma algoritması şekil 1.8'de görülmektedir.



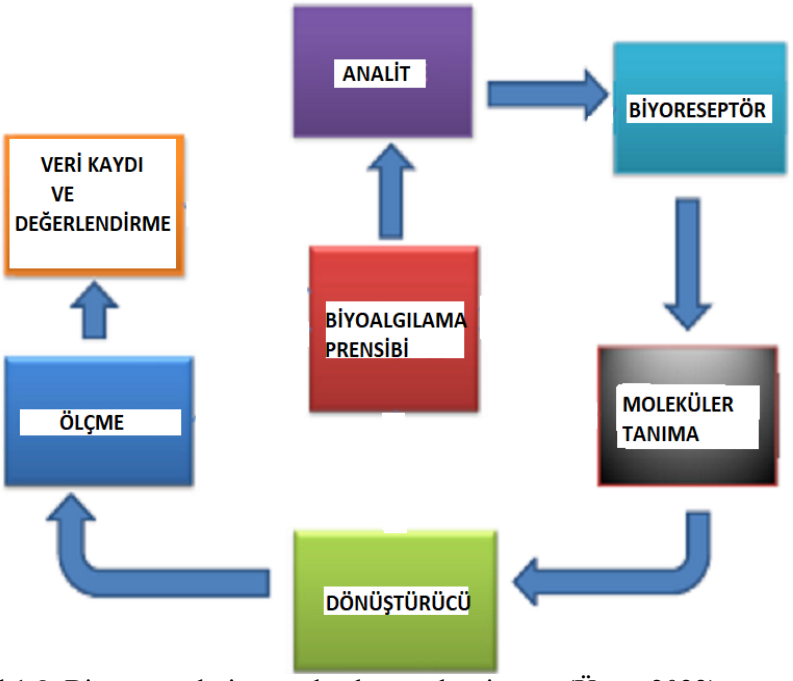
Şekil 1.6. In-vitro biyosensörler için biyoalgılama ve transdüksiyon sınıfları. Biyoalgılama yöntemleri: (a) antikor/antijen; (b) enzim katalizli; (c) nükleik asit; (d) hücre bazlı; (e) biyomimetik. İletim yöntemleri; (f) optik; (g) elektrokimyasal; (h) kütleye duyarlı; (i) termal (Morrison ve ark., 2007).



Şekil 1.7. Bir kimyasal sensörün yapısı ve çalışma mekanizması (Banica, 2012).

Biyosensörlerin özelliklerini aşağıdaki gibi sıralayabiliriz:

- Hassas, spesifik, kararlı, tekrarlanabilir olmalıdır.
- Ölçüm sırasında fiziksel parametreler (sıcaklık vb.) uygun hale getirilmelidir.
- Biyouyumlu olmalıdır.
- Taşınabilir, maliyeti düşük ve küçük olmalıdır(Morrison ve ark., 2007).



Şekil 1.8. Biyosensörlerin genel çalışma algoritması (Ürün, 2022)

Biyolojik moleküller veya canlı biyolojik sistemler biyoreseptör olarak kullanılır. Bu biyoreseptörlerin tespit edilmesi istenen hedef moleküle yüksek afinite ve seçici olması en önemli özelliklerindendir (Rasooly, 2005). Enzimin, hedef moleküle karşı özgül olması biyomolekül olarak en çok tercih sebeplerindendir (Chambers ve ark., 2008). Mikroorganizmalar birçok biyolojik molekülün temel

biyoreseptörüdür. Olumsuz şartlara uyum sağlayabilme, farklı değerlerdeki pH ve sıcaklıklarda çalışabilmeleri mikroorganizmaların önde gelen özelliklerindendir (D'Souza, 2001).

1.3.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler, ölçüm prensiplerine ve iletici türüne göre elektrokimyasal esaslı, optik esaslı, piezoelektrik esaslı ve kalorimetri esaslı biyosensörler olarak dörde ayrılır. Elektrokimyasal esaslı biyosensörler elektrokimyasal ileticilerle amperometri/ potansiyometri ilkeleriyle ölçümler alınabilir. Bu nedenle oksidoredüktaz enzimleri kullanılır(La Belle ve ark., 2016). Optik esaslı biyosensörler iki genel sınıftan oluşur. Işığın iletimindeki değişimin ölçülmesi esasına dayanan absorbsiyon esaslı biyosensörlerdir. Diğeri ise floresanın ölçümü esasına dayanır. Piezoelektrik esaslı biyosensörler piezoelektrik kristallerini kullanarak rezonans frekansındaki değişimle nano sevide kütlenin değişimini ölçen biyosensörlerdir. Kalorimetrik esaslı biyosensörler ise enzim reaksiyonlarında entalpi değişiminden yararlanıp substrat konsantrasyonunu belirlemeye yarar. Biyosensörlerin sınıfları çizelge 1.1'de görülmektedir. Bu çalışmada biyosensörler arasından çevrimsel voltammetri kullanılacağından Voltammetrik esaslı biyosensörlere ağırlık verilmiştir.

Çizelge 1.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Elektrokimyasal Esaslı	Optik Esaslı Biyosensörler	Piezoelektrik Esaslı Biyosensörler	Kalorimetrik Esaslı Biyosensörler
•Amperometrik Esaslı Biyosensörler •Potansiyometrik Esaslı Biyosensörler • Voltametrik Esaslı Biyosensörler	• Absorbsiyon Esaslı Biyosensörler • Biyoluminans Esaslı Biyosensörler		

1.3.1.1. Amperometrik Esaslı Biyosensörler

Potansiyeldeki akım şiddetini ölçen bir biyosensördür. Akım yoğunluğu çalışma elektrodundaki yükseltgenen veya indirgenen türlerin derişiminin bir fonksiyonudur. Amperometrik biyosensörlerin potansiyometrik biyosensörlerden farklı olarak ürünler arasında sinyal oluşturan tür elektrot yüzeyinde tüketilir (Dinçkaya ve Akyılmaz, 1998).

1.3.1.2. Potansiyometrik Esaslı Biyosensörler

Potansiyometri çalışma elektrodu ve referans elektrodu arasındaki potansiyel farkı ölçer. Referans elektrot sabit bir gerilim değerine sahip ve bulunduğu çevreden bağımsızdır. Ölçüm elektrodunda ise katı ve sıvının ara yüzeyindeki yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarında ortaya çıkan gerilimdir. Potansiyometrik biyosensörlerin diğerlerine göre hassasiyetinin düşük olması, alınan sinyalin aletsel olması gibi sorunları mevcuttur. Genellikle dış katman zara ya da istenilen bir biyoaktif maddeye (özellikle enzime) duyarlı bir yüzeyden oluşmaktadır. Bu biyosensörlerde moleküler olarak tanıma tepkimesi indirgenme potansiyeline, zarın potansiyeline sebep olmaktadır (Bard ve Faulkner, 2002).

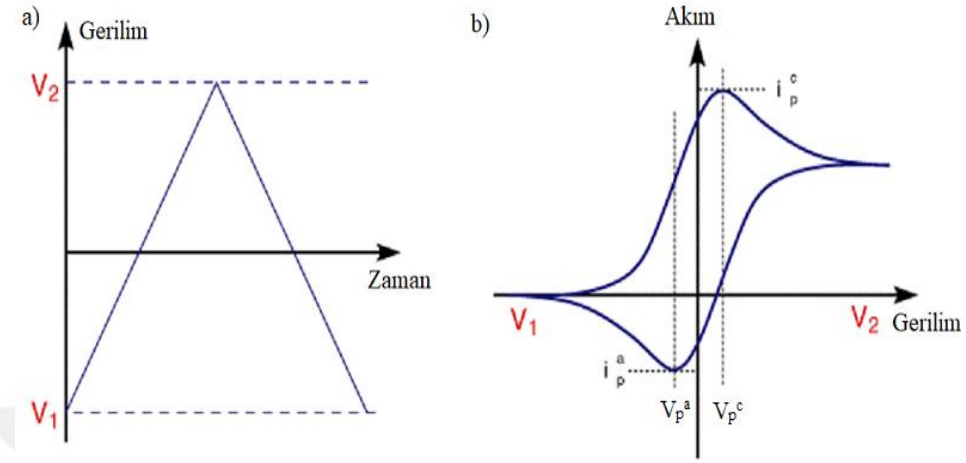
1.3.1.3. Voltammetrik Esaslı Biyosensörler

Voltammetrik esaslı biyosensörler, elektrokimyasal analizlerdeki diğer tekniklere göre çok yönlüdür. Bu teknikte akım ve potansiyel ölçülüp kaydedilir. Akımdaki tepe noktası belirli bir kimyasal ile ilişkilidir. Tepedeki akım yoğunluğu ise türün konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Bard ve Faulkner, 2002). İndirgenme yükseltgenme tepkimeleri sonucu ortaya çıkan akım ve potansiyostattaki gerilim değerlerinin oluşturduğu akım-gerilim grafiğine voltammogram denir. Voltammetrik biyosensörlerden en yaygın kullanılanı çevrimsel voltammetridir.

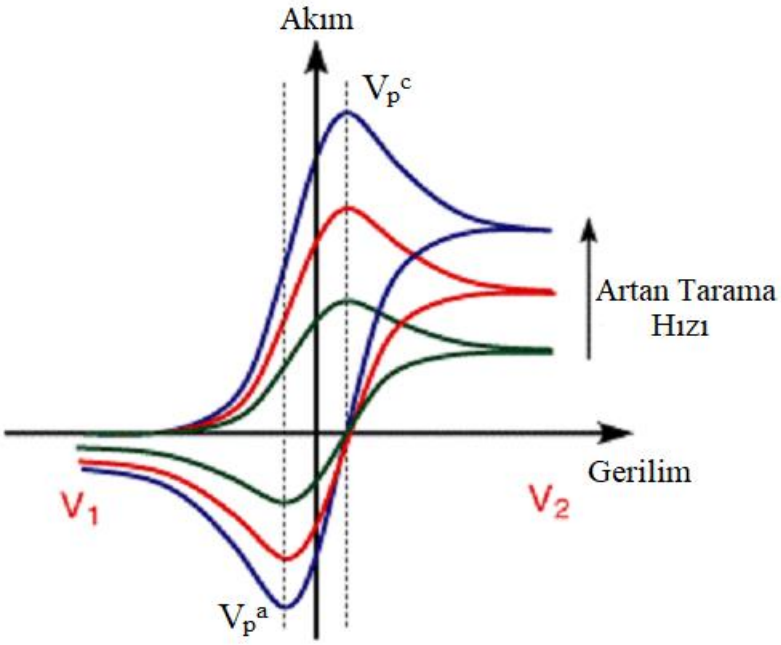
1.3.1.3.(1). Çevrimsel Voltammetri (Cyclic Voltammetry)

Çevrimsel voltammetride (CV) elektrot voltajı, bir potansiyelden birkaç milisaniyede oksitlenen bir potansiyele dönüşümlü olarak değiştirilir. Daha sonra uygulanan voltaja karşı ölçülen akımın miktarını çizerek çevrimsel bir voltammogram üretebilir. Voltammetri sınıflandırmasına giren amperometridir. Amperometri, elektrodu CV'nin aksine sabit bir voltajda tutar. Amperometri, elektrofizyolojide karbon fiberden oluşan bir elektrot kullanarak vezikül salma aktivitelerini analiz etmek için kullanılır. Normal olarak, kullanılan elektrot hücreye infüze edilmez, ancak hücrenin hemen yakınına yerleştirilir. Reaksiyon sırasında, o spesifik voltajda oksitlenebilen tüm moleküllerin saptanacağı tahmin edilmektedir. Bu nedenle, CV ile karşılaştırıldığında amperometrinin bir dezavantajı, spesifik olarak akımın dalga biçimine dayanarak elektrot tarafından gözlemlenen spesifik bileşiği tanımlamanın kolay olmamasıdır. Ancak, tespit edilen elektrik akımları zamana karşı entegre edilebildiğinden, kimyasalların bağıl konsantrasyonlarını daha doğru bir şekilde ölçebilir (Bagio, 2018).

Çevrimsel Voltammetride doğrusal bir tarama belirli bir potansiyel aralığında yapılır. Daha sonra ters yönlü bir taramada gerçekleştirilir. Şekil 1.9'da görüldüğü gibi gerilim V_1'den başlanarak V_2 değerine kadar arttırılır. Sonra V_2'den V_1'e doğru azaltılır. Yani, voltaj V_2'ye ulaştığı zaman tersine çevrilir ve V_1'e kadar taranır. Bu çevrim birden fazla tekrarlanır. Gerilimi önce yükseltip sonra azaltmasının sebebi yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleri sonucu oluşan akımların incelenmesidir. Bu tip voltammetri sıklıkla kullanılmakta olup taramalı çevrimsel voltammetri olarak da adlandırılır. Bu gerilimler sonucunda oluşan akım değerleri toplanır. Bu tez çalışmasında elektrokimyasal denklemler çevrimsel voltammetri ile analiz edilmiştir. Tarama hızı çevrimsel voltammetri için önemli bir parametredir. Şekil 1.10'de görüldüğü gibi elektron transferi nedeniyle tarama hızı artarken tepe noktalarındaki gerilim değeri sabit kalmış ve akım değerleri artmıştır.



Şekil 1.9. a) Potansiyel zaman grafiği b) Çevrimsel voltammetri (Andrienko,2008)
V1: Anodik yönde başlangıç, katodik yönde bitiş gerilimi,V2: Katodik yönde başlangıç, anodik yönde bitiş gerilimi,i_p^c: Katodik yöndeki tepe akımı,i_p^a: Anodik yönde tepe akımı,V_p^a: Anodik yöndeki tepe gerilimi,V_p^c: Katodik yöndeki tepe gerilimi



Şekil 1.10. Tarama hızının artmasının CV'ye etkisi (Wang, 2000)

Biyosensörler, biyoaktif tabakada kullanılan biyokomponent türüne göre aşağıdaki gibi sıralanabilir.

- Enzim Temelli Biyosensörler
- Doku Temelli Biyosensörler
- DNA temelli Biyosensörler
- Antikor/Antijen Temelli Biyosensörler

Enzim Temelli Biyosensörler: Enzim sensörleri diğer biyosensörlerdeki gibi üç sistemden oluşur. Biyoaktif tabakada enzimin molekül olarak yer alması diğer biyosensörlerden tek farkıdır (Dinçkaya ve Akyılmaz, 2000).

Doku Temelli Biyosensörler: Bu biyosensörler enzimlerin doğrudan doku olarak kullanılması olarak tanımlanabilir. Bu enzimler doğal ortamında olacağından özgüllük açısından oldukça avantajlıdır. Fakat difüzyon bariyerinin artması nedeniyle substratın enzime ulaşması zaman alır (Akyılmaz ve Dinçkaya, 1999).

DNA Temelli Biyosensörler: Tek zincirli DNA oligomeri biyokomponent olarak kullanılır. DNA sensörleri DNA probuyla hastalığı simgeleyen DNA parçasının hibridizasyonu prensibiyle çalışır (Ahn ve ark., 2016). Hibridizasyon sonucu elektrokimyasal sinyaller oluşur (Bose ve ark., 2016).

Antikor/Antijen Temelli Biyosensörler: Biyosensör olarak antikor kullanıldığından bu biyosensörlere immünosensörler denir. İmmünosensörler antikorlar ve antijenlerle duyarlı analizler gerçekleştirilebilir. İmmünosensörler antikorların uygun iletici ile eşleşmesiyle analiz edilmek istenen tüm moleküllerin tayin edilebilmesi için geliştirilir (Akyılmaz ve Dinçkaya, 1999).

1.3.1.3.(2). Çalışmanın Önemi ve Motivasyon

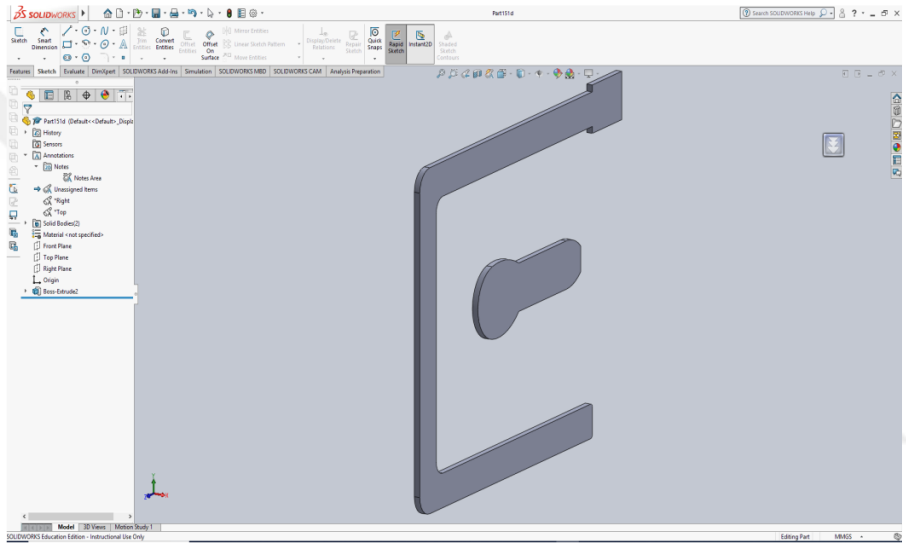
Biyosensörler biyokimyasal olayların incelenmesinde ve oluşan olayların algılanmasında yaygın olarak kullanılmasından dolayı çalışmanın temel hedefi

olmuştur. Elektrokimyasal biyosensörler birçok hastalığın teşhis tedavi ve takip süreçlerinde kullanılmaktadır. Özellikle, diyabet hastalığında glukoz miktarının değerlendirilebilmesi için biyosensör gerekmektedir. Bu analizlerde genel olarak biyosensör kullanılması gerektiğinden tez çalışmasında bir biyosensör tasarlanmıştır. Bu çalışmada, bir çevrimsel voltammetri biyosensörün tasarımı yapılmış ve deneysel koşullar mimik edilerek laminer akış varlığında ve yokluğunda performansı sayısal olarak incelenmiştir. Böylelikle, deneysel icrası aşamasında mikrokanal ve sensör tasarımda maliyetten ve zamandan kazanç sağlanması hedeflenmiştir. Tek kullanımlık sensörler yerine uzun ömürlü sensörler üretmek temel hedeflerden birisidir. Bu sebeple, sensör bir mikrokanal yüzeyine yerleştirilmiş ve laminar akış koşulları altındaki performansı incelenmiştir. Böylelikle, tasarlanan sensörün labrotuvar-üstü-çip (lab-on-chip) uygulamalarında da kullanılabilmesinin önü açılmıştır. Sonuç olarak, ucuz, tekrarlı kullanılabilen, hafif ve üretimi kolay bir cihazın tasarımı ve analizi yapılmıştır. Hastalıkların tedavi ve teşhis aşamalarına katkı sağlayabilmek, süreci doğru veya doğruya en yakın sonuçlar elde ederek yönetebilmek bu çalışmanın en büyük motivasyon kaynağıdır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Elektrokimyasal Biyosensörlerin Sonlu Elemanlar Modellemesi

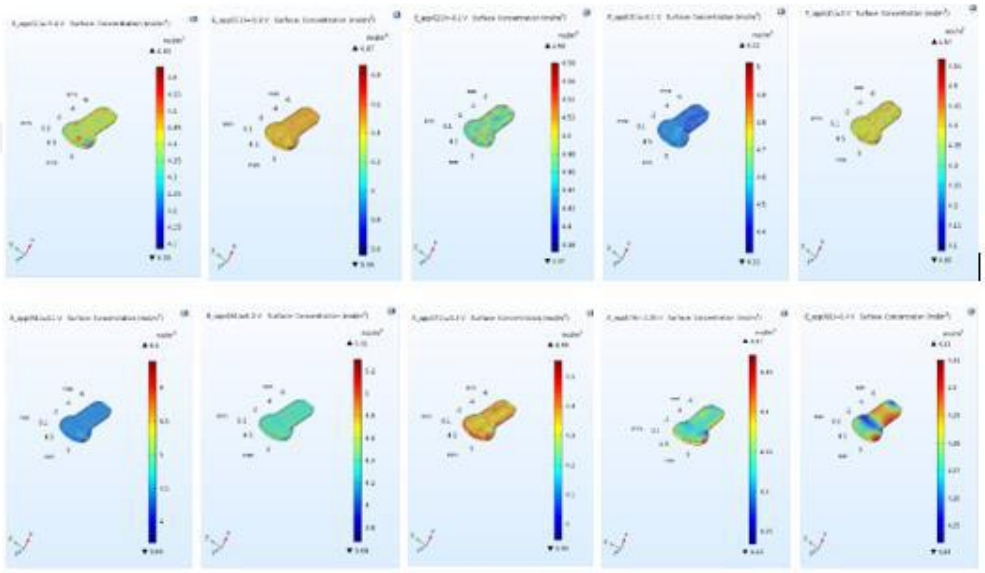
Bagio (2018) Solidworks programında tasarladığı şekil 2.1'de görülen elektrodu kullanarak glukoz oksidasyon reaksiyonu ile elektrokimyasal tepkimeyi sonlu elemanlar çözücüsü olan Comsol yazılımı yardımı ile simüle etmiştir.



Şekil 2.1. Comsol'da analiz edilecek sensörün Solidworks 'de çizimi (Bagio,2018)

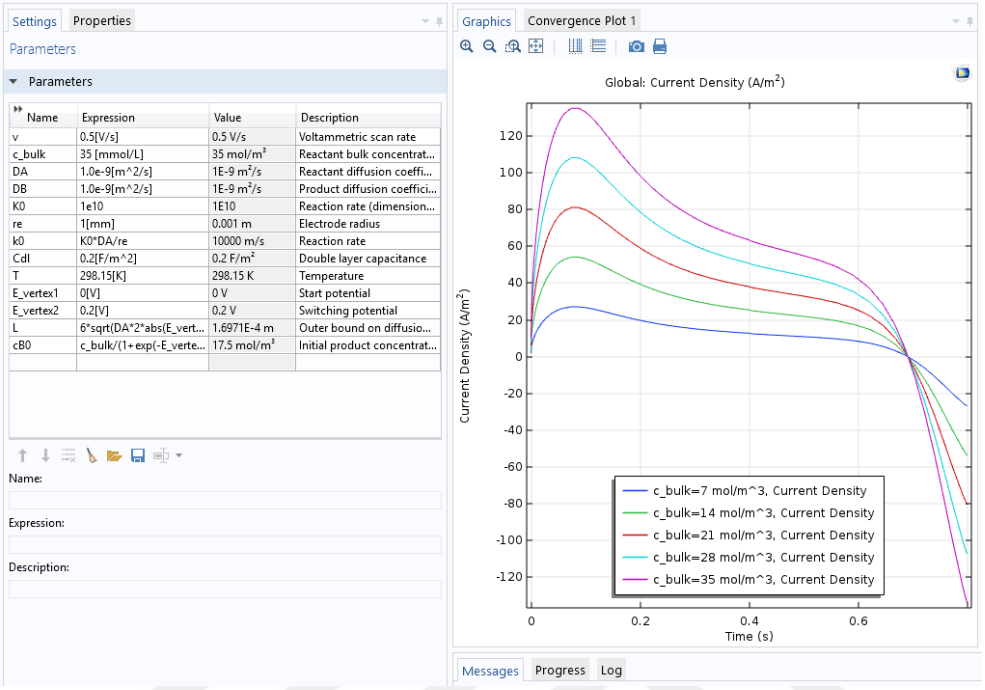
Bu çalışmasında, çeşitli hidrojen konsantrasyonlarının kronoamperometrisini ölçmesi gereken ek ayrıntılı analizlerin yanı sıra üç kimyasal türü içeren diğer ara simülasyonlar, Glukoz, hidrojen peroksit ve Glukoz bir katalizör enzimi aracılığıyla hidrojen peroksite ayrışırken oksijen olmalıdır. Ancak, bu reaksiyonlar için maksimum reaksiyon hızları ve Michaelis-Menten sabitleri ile ilgili deneysel verilerin olmaması, Bagio (2018)'nun çalışmasını yalnızca sonlu elemanlar simülasyonu ile sınırlandırmıştır. Gerçek deneylerde yalnızca değişen konsantrasyonlarda hidrojen peroksit tarafından üretilen akımı ölçülmektedir. Bununla birlikte, sonlu elemanlar ağındaki birçok malzemenin değiştirilmiş

simülasyonları olan ek Comsol simülasyonları da elektrotlarının yaklaşık boyutları ve fiziği kullanılarak yapılmıştır ve bazı sonuçlar şekil 2.2'de görülmektedir. Ayrıca, kronoamperometri ekranlı çevrimsel voltammetri parametreleri çeşitli toplu konsantrasyonlar şekil 2.3'te görülmektedir. Bagio (2018) çalışmasında çevrimsel voltammetri parametreleri ve çeşitli konsantrasyonlar da şekil 2.4'te verilmiştir.

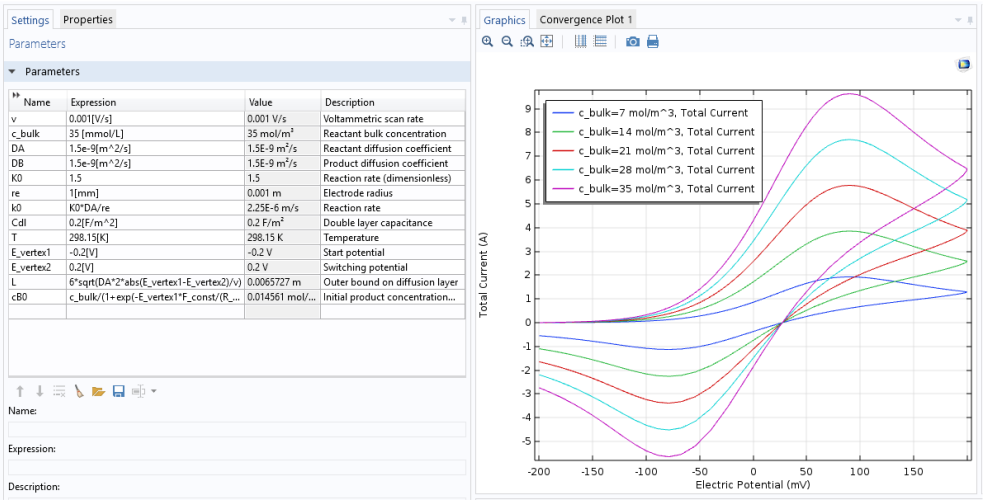


Şekil 2.2. 2 mm çaplı ekran baskılı elektrot kullanılarak 7 mM toplu reaktan konsantrasyonundan (prob yüzeyinde) değişen ürün konsantrasyonları oluşturan 3D CV yüzey grafiği (Bagio, 2018)

Comsol simülasyonları, glukoz izleme için olası bir biyosensör probu olarak elektrotun voltammetrisini veya amperometrisini öngörmüştür. Analizler sonrasında yapılan basit deneyler bu tahminleri doğrulamıştır. Bu sonuçlara göre; COMSOL'un kan şekeri izleme için elektrokimyasal sensörlerin tasarımında çok güçlü bir araç olduğunu ve deneylerde "Pine Research Instrumentation" ekran baskılı elektrotu ve "Cheapstat potansiyostat-kullanışlı" cihazları mimik edebildiği görülmüştür (Bagio, 2018).



Şekil 2.3. Kronoamperometri ekranlı Çevrimsel Voltammetri Parametreleri çeşitli toplu konsantrasyonlar (Bagio, 2018).



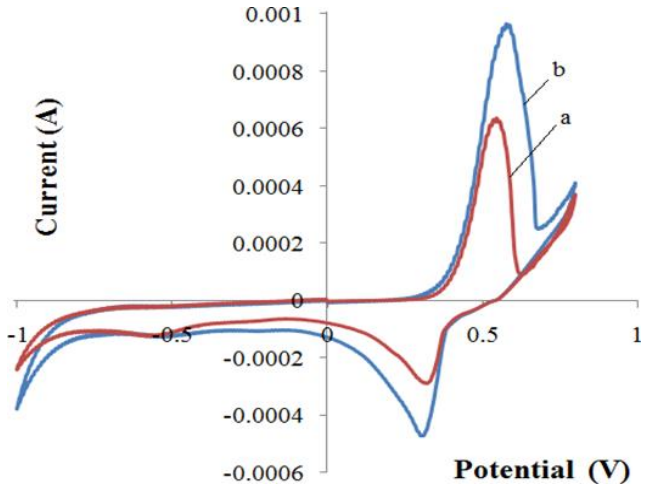
Şekil 2.4. Çevrimsel Voltammetri parametreleri ve çeşitli konsantrasyonlar (Bagio, 2018).

2.2. Farklı Elektrotlar ile Glukoz Oksidasyonu

Bubis (2011) glukozun oksidasyon reaksiyonunun elektrokimyasal olarak iletilen elektronların sayısı, oksidasyonun tersine çevrilebilirliği, glukoz konsantrasyonunun akım üzerindeki etkisini incelemiştir. Glukozun oksidasyon reaksiyonunu inceleyebilmek için farklı elektrotlar ile farklı tarama hızları da değerlendirilmiştir.

2.3. Altın Elektrot ile Glukoz Tayini

Altın elektrot kullanılarak çevrimsel voltammetri ile insan idrarında glukoz tayini yapılmıştır. Altın elektrot, gümüş iletken boya kullanılarak gümüş tel ile bağlanmış, sırasıyla %99,99 saflıkta, 1,0 mm uzunluğunda ve genişliğinde altın tel kullanılarak hazırlanmıştır. Potansiyeli 0,5 V olan anodik akım tepe noktasının glukoz oksidasyonu olmasını sağlama yöntemi, daha sonra farklı konsantrasyonlarda çevrimsel voltammetrideki glukoz ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.5'te görüldüğü gibi glukoz konsantrasyonu, oksidasyon zirve potansiyeli ve glukoz indirgeme zirve potansiyeli ne kadar büyükse, o kadar büyük olduğunu gösterir (Hakim, 2018).



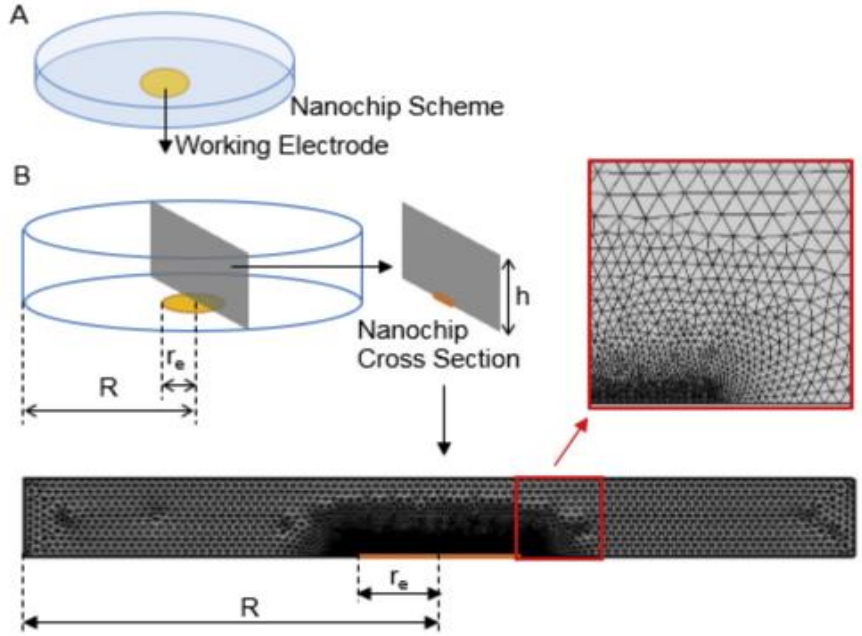
Şekil 2.5. (a) 0.1 M KNO3 (glukozsuz), (b) 0.1 M KNO3+ glukoz 0.001'in çevrimsel voltamogramı (Hakim, 2018)

2.4. Altın Nanoparçacıklar ve bor katkılı elmas ile Glukoz Ölçümü

Glukoz oksidaz (GOx), bir glukoz sensöründe uygulama için biyoalgılayıcı /biyokatalizör olarak kullanılabilmektedir. Bu enzimin redoks aktif bölgeleri, yani flavin adenin dinükleotitleri (FAD'ler), çekirdek merkez proteininde yer alır, bu nedenle elektrot yüzeyine doğrudan elektron transferini sınırlar. Altının enzim ile elektron transferinde iyi tepkiler verdiği bilindiğinden sistemdeki Au yüzey alanını arttırmanın önemli olduğu belirtilmektedir (Holland ve ark., 2011). Buna göre, Ivandini ve Wibovo (2017) çalışmasında bor katkılı elmas'ın (BDD) yüzeyi, enzim ve BDD arasında daha verimli bir elektron transferi sağlamak için altın nanoparçacıklar (AuNP'ler) tarafından modifiye edilmiştir. Çalışmalarında AuNPs-BDD, GOx tarafından değiştirilmiştir. Hazırlanan bu elektrot (GOx-AuNPs-BDD) daha sonra glukoz sensörlerinin ön çalışması için araştırılmıştır. Sonuçlar, glukoz konsantrasyonlarına doğrusal tepe akımları ile iyi tepkiler göstermiştir.

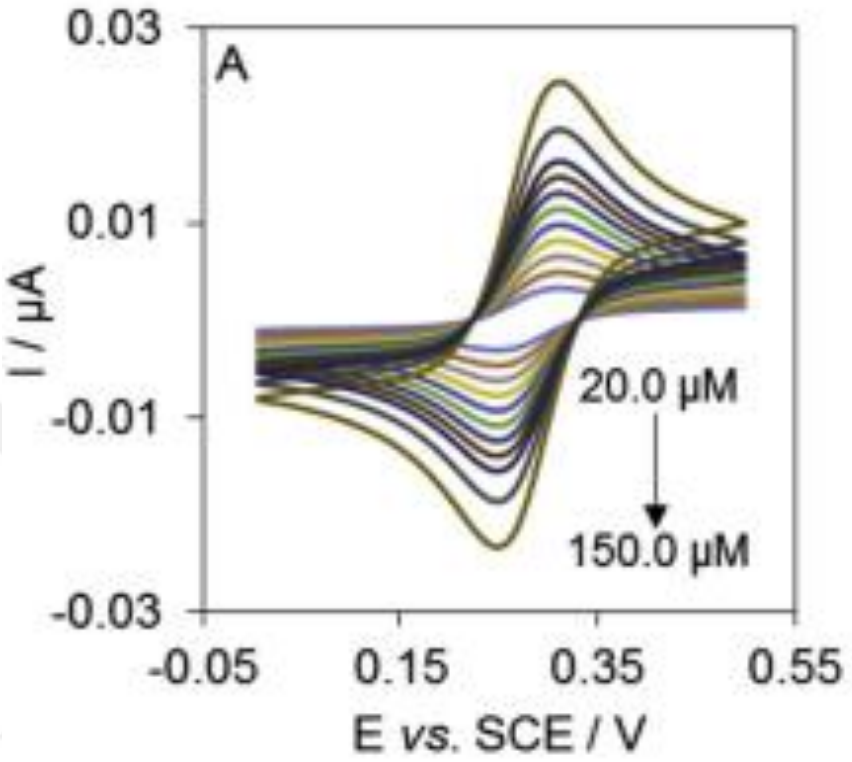
2.5. Elektrokimyasal Nanobiyosensörün Modellenmesi

Kaffash ve ark. (2019) tarafından o-quinone enzimatik üretimini ve elektrokimyasal davranışını araştırmak için iki boyutlu bir model geliştirilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen model için cihaz yapısı, simülasyon bölgesi ve sonlu elemanlar yazılımında oluşturulan ağ yapısı şekil 2.6'da görülmektedir. Silindirik şekle sahip olan çözüm bölgesinin çapı boyunca oluşturulan iki boyutlu ağ yapısının üçgen elemanları şekildeki gibi oluşturulmuştur. Cihazın tabanına yerleştirilen elektrodun etrafındaki bölge çözümleme hassasiyetinin arttırmak için sık bir ağ yapısı ile oluşturulmuştur.



Şekil 2.6. a) Simüle edilmiş nanoçip biyosensörün şematik tasarımı b) Nanoçip kesitinin iki boyutlu alanı ve yakınlaştırılmış görünümü için nanoçipin ayrıntılı bilgileri ve oluşturulan ağ (Kaffash ve ark., 2019).

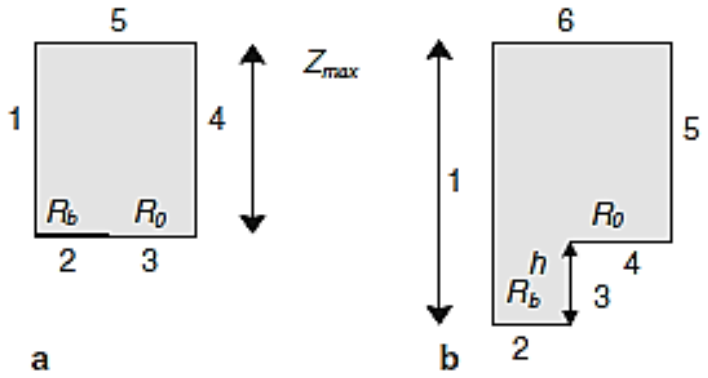
Kaffash ve ark. (2019) yapmış oldukları çalışmada fenolün o-quinone oksidasyon hızı, Michaelis-Menten denklemine dayalı olarak geliştirilen model tarafından simüle edilmiştir. Modelin geçerliliğini doğrulamak için simülasyondan elde edilen sonuçlar deneysel sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Simülasyon ve deneysel sonuçlardan elde edilen çevrimsel voltammogramları karşılaştırarak, heterojen hız sabiti, k° ve transfer katsayısı α, sırasıyla 0,02 cm s^{-1} ve 0,5 olarak hesaplanmıştır. Daha sonra simülasyon sonuçları kullanılarak farklı yüksekliklere sahip nanoçip biyosensörler için kronoamperogramlar çizilmiştir. Ayrıca, elektrot yüzeyinde o-quinone konsantrasyon gradyanları belirlenmiştir, bu da elektrodun kalınlığını tahmin etmek için kullanılabilecek bir bilgi üretmiştir. Bu çalışmada elde edilen farklı fenol konsantrasyonlarına karşılık gelen simüle edilmiş çevrimsel voltammogramlar şekil 2.7'de görülmektedir.



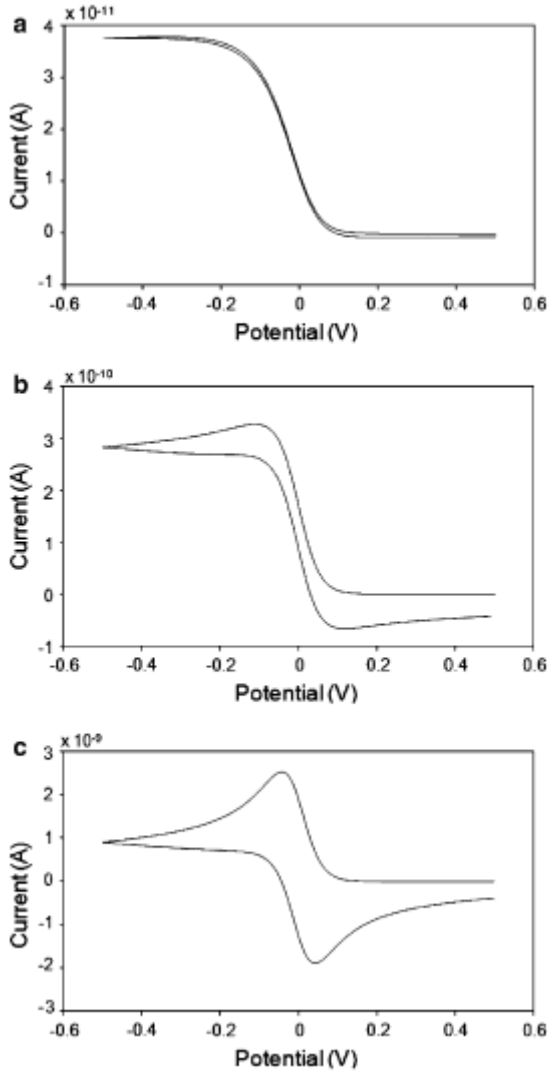
Şekil 2.7. Farklı fenol konsantrasyonlarına karşılık gelen simüle edilmiş çevrimsel voltammogramlar (Kaffash ve ark., 2019)

2.6. Mikroelektrot Dizilerinde Çevrimsel Voltammetri Simülasyonu

Lavacchi ve ark. (2009) COMSOL yazılımının CV'lerin simülasyonu için kullanımını değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Mikroelektrot yarıçapı ve elektrotlar arası mesafelerin bir fonksiyonu olarak sistemlerin difüzyon davranışının önceden analiz edilebilmesiyle mikroelektrot dizilerin tasarımına yardımcı olmak temel hedefleri olmuştur. Şekil 2.8'de çalışmalarında kullandıkları simülasyon geometrilerinin taslağı gösterilmiştir. Z_{max} simüle edilmiş hücrenin yüksekliği ve h girinti derinliğidir.



Şekil 2.8.Simülasyon Geometrileri a) kakmalı b) girintili (Lavacchi ve ark.,2009)



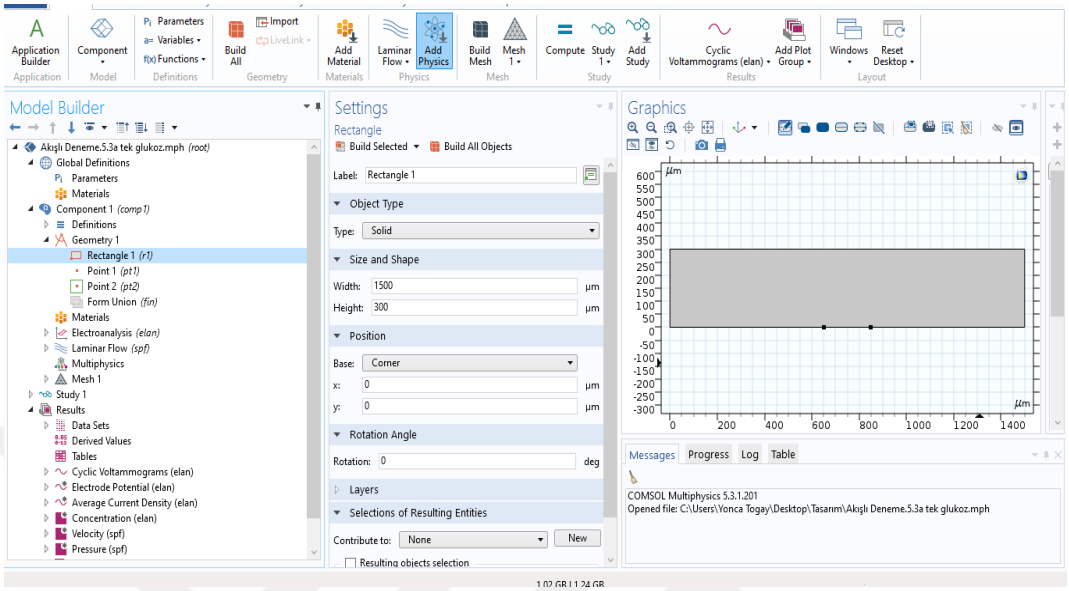
Şekil 2.9. Mikroelektrot dizisi üzerinde simüle edilen çevrimsel voltammetri (Lavacchi ve ark.,2009)

Şekil 2.9'da görülen grafikler yukarıdan aşağıya sırasıyla 0.1, 1 ve 10 μm 'lik elektrot çapı ile üç mikroelektrot dizilerindeki CV eğrilerinin simülasyonunun sonuçlarını göstermektedir. Şekil 2.9a, 0,1 μm mikro elektrotlu mikroelektrot dizilerinin kararlı bir dalga biçimi olan bir CV şekli sağladığını göstermişlerdir.

Elektrot boyutu arttıkça, eğrilerin şekli kademeli olarak tepe şeklindeki CV'ye doğru hareket eder, bu da lineer difüzyonun meydana geldiğini göstermiştir. (Şekil 2.9b, c). Bu durum, elektrot çapı ve elektrotlar arası mesafe büyüdüğünde difüzyon bulutlarının üst üste geldiği düşünülerek açıklanmıştır. Bu tür bir üst üste bindirme, sonsuz büyük bir düzlemin sınır koşuluna yaklaşan elektrot yüzeyine neredeyse dikey olarak yayılmak için difüzyon sağlamıştır. Lavacchi ve ark. (2009) elde ettikleri çevrimsel voltammetri grafiklerini değerlendirmişlerdir ve doğru sonuçlar elde etmek için, simüle edilen eğrinin şeklinde daha fazla değişiklik gözlemlenmeyene kadar sonlu elemanlar ağ yapısında bir iyileştirme yapılması gerektiğini düşünmüşlerdir. Ayrıca, modelin uygulamasının simülasyona kadar genişletilebileceğini de göstermişlerdir. Dickinson ve ark. (2014) elektrokimyasal analizler için sonlu elemanlar yazılımı COMSOL Multiphysics 'in kullanımını tartışmışlardır. Sonlu eleman modellemesi ile ilgili pratik hususları vurgulamışlardır. Bu yazılımın çağdaş uygulamalarının bir incelemesi sağlanmış; ilgili konular, genel amacın özel uygunluğunu ortaya koymuşlardır.

3. MATERYAL VE METOT

Mikro kanala elektrot yerleştirip akış simülasyonlarının yapılmasının temel amacı deney yapılmasına ihtiyaç kalmadan maliyet ve zamandan kazanç sağlayıp yeni hesaplamalar yapılabilecek sanal bir deney ortamı oluşturmaktır. Ayrıca, deneylerin gerçekleştirilmesi esnasında elde edilecek sonuçların öngörülüp optimum çalışma parametrelerini belirlemektir. Bu tez çalışmasında matematiksel modelleme bir sonlu elemanlar çözücüsü olan Comsol Multiphysics v5.3a programında tasarlanmıştır. Bu yazılımın tercih edilmesinin nedeni ise kısmi diferansiyel denklemlere dayalı bilimsel ve mühendislik problemlerini modellemek ve çözmek için güçlü bir yazılım olmasından dolayıdır. Bu yazılımla temel denklemler malzeme özellikleri, elektriksel yükler, kısıtlamalar, kaynaklar gibi fiziksel nicelikleri tanımlayarak çözmek mümkündür. İki boyutlu düzlemde çözüm alanı sonlu elemanlar yönteminin uygulanabilmesi için uygun bir ağ yapısı ile doldurulur (Comsol Multiphysics kullanıcı dökümanları, 2008). Bu çalışmada glukozun oksidasyon ve redüksiyon tepkimeleri incelenmiş ve tepkimeler kullanılarak bir mikro kanalda akış analizleri yapılmıştır. Öncelikle Comsol arayüzünde hesaplama geometrisi oluşturulmuştur. İlk önce dikdörtgen bir mikro kanal çizilmiş ve sonrasında iki nokta belirlenerek mikro kanalın alt duvarına elektrokimyasal elektrot gömülmesi sağlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan geometrik modelin bir görüntüsü şekil 3.1'de görülmektedir.



Şekil 3.1. Bu çalışmada kullanılan model geometrisinin görüntüsü.

Mikrokanal geometrisi dikdörtgen şekle sahip olup uzunluğu 1500 µm ve yüksekliği 300 µm dir. Mikro kanalın tabanına bir elektrot yerleştirilebilmesi için alt taraftaki çizgi iki noktadan bölünmüştür. Böylelikle çözümlemede duvardan farklı sınır koşullarının verilebilmesi sağlanmıştır. Oluşturulan tasarımın geometrik büyüklükleri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Model Boyutları

Boyutlar	**Değerler**
Kanal Yüksekliği	300 µm
Kanal Genişliği	1500 µm
Elektrot Nokta 1	650 µm
Elektrot Nokta 2	850 µm

Bu çalışmanın birinci bölümünde mikrokanalda herhangi bir akışın olmadığı, yani durgun sıvıda simülasyonlar yapılmıştır. İkinci kısmında ise mikro

kanalın solundan sağına doğru laminer akış tanımlanmıştır. Laminer akış süreklilik ve Navier-Stokes denklemleri ile modellenmiştir.

$$\rho\left(\frac{\partial \boldsymbol{u}}{\partial t} + (\boldsymbol{u}.\nabla)\boldsymbol{u}\right) = -\nabla \mathrm{p} + \nabla.(\eta\nabla^2\boldsymbol{u}) + \boldsymbol{f}$$

$$\nabla.(\boldsymbol{u}) = 0$$

Burada **u** ve **ρ** sırasıyla akışkanın hızı ve yoğunluğudur, p basınç, **f** harici kuvvettir. Viskoz kuvvetler ve atalet kuvvetleri, sırasıyla denklemin sağ ve sol tarafının ikinci terimi ile temsil edilir. Kalın karakterler vektörel nicelikleri göstermek için kullanılmıştır. Bu denklemler, sıvının sıkıştırılamazlığı nedeniyle modifiye edilir, yani sıvının yoğunluğu her koşul için mikro kanal üzerindeki her noktada sabit kalır.

Kimyasal türlerin taşınımını tanımlamak için Nernst-Planck denklemi kullanılmaktadır.

$$\frac{\partial \mathrm{ci}}{\partial \mathrm{t}} + \nabla.(D_i\nabla c_i) + \mathrm{u}\nabla c_i = 0$$

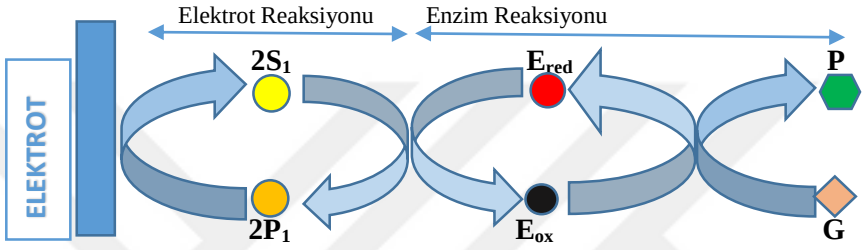
Burada D_i ve c_i sırasıyla kimyasal türlerin difüzyon katsayısı ve ortamdaki konsantrasyonudur.

Elektroanaliz için Butler-Volmer denkleminden faydalanılmıştır. Butler-Volmer denklemi ile elektrot üzerindeki anodik ve katodik reaksiyonlar meydana geldiğinde elektrik akımının elektrot potansiyeline bağlılığını açıklanmaktadır. Butler-Volmer denklemi elektrot reaksiyonu olarak elektrot yüzeyine uygulanmaktadır.

$$\mathrm{i} = \mathrm{A}i_0[c_{red}\exp\left(\frac{(n-\alpha_C)\mathrm{F}\eta}{\mathrm{RT}}\right) - \mathrm{c}_{ox}\exp\left(\frac{-\alpha_C\ \mathrm{F}\eta}{\mathrm{RT}}\right)]$$

Burada i_0 değişim akım yoğunluğu, A elektrot alanı c_{red} redüksiyon konsantrasyonu c_{ox} : oksidayon konsantrasyonu η:potansiyel sabiti, R: gaz sabiti, T: sıcaklık, n: değiştirilen elektron sayısı, α_C: katodik yük transfer katsayısı'dır.

$$i = Ai_0[\exp\left(\frac{(n-\alpha_C)F\eta}{RT}\right)P_1 - \exp\left(\frac{-\alpha_C\ F\eta}{RT}\right)S_1]$$



Şekil 3.2. Reaksiyon şeması

Enzim kinetiği enzimler tarafından katalizlenen kimyasal reaksiyon hızlarını inceler. Substratı enzime dönüştürürken öncelikle ara ürün olarak enzim substrat kompleksi oluşur sonrasında oluşan kompleks ürün ve enzime dönüşür.

$$E + S \underset{K2}{\overset{K1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{K3} E + P$$

Burada E, S, ES, P sırasıyla enzim, substrat, enzim-substrat kompleksi ve ürün konsantrasyonudur. Oluşan ES kompleksi E ve S'den K_1 hızıyla oluşmaktadır. ES'in ayrışması K_2 hızıyla geri reaksiyon ile ve K_3 hızıyla ürün ve enzime ayrışmasıyla olur. Michaelis-Menten denklemi ise aşağıdaki gibi tanımlanmaktadır.

$$V = \frac{Vmax[S]}{Km + [S]}$$

Burada K_m, Michaelis-Menten sabitidir ve enzim reaksiyonunun hızının maksimum reaksiyon hızının yarısına eşit olduğu substrat konsantrasyonudur. Michaelis-Menten sabiti enzimin substratına özgü bir sabit değerdir ve enzimin substratına olan afinitesini belirler. K_m değeri ne kadar düşükse enzimin substrata afinitesi o kadar yüksektir.

Enzimatik tepkimeler aşağıda verilen denklemler ile ifade edilmiştir:

$$\mathrm{Eox} + \mathrm{G} \xrightarrow{\mathrm{k1}} \mathrm{Ered} + \mathrm{P}$$

$$\mathrm{Ered} + 2\mathrm{S}_1 \xrightarrow{k2} \mathrm{Eox} + 2\mathrm{P}_1$$

Eox oksidasyon enzimi,G glukoz(substrat konsantrasyonu), Ered redüksiyon enzimi, P:ürün (Glukonolakton), S_1: medyatör (Ferrisyanid), P_1:medyatör (Ferrosiyanid), E: glukoz dehidrogenaz. Burada medyatör kullanılarak ikinci nesil elektrokimyasal biyosensör modellemesi gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle tek bir glukoz konsantrasyonunda mikrokanal içerisinde akışkan akışı olmadan analiz yapılmıştır. Ardından basınç tahrikli laminer akış ile çalışmaya devam edilmiştir. Basınç tahrikli akışın olmadığı simülasyonlarda Nernst-Planck denklemindeki konveksiyon terimi çıkarılmıştır.

Çalışmada kullanılan parametreler çizelge 3.2'de ve reaksiyonların değişkenleri çizelge 3.3'te görülmektedir.

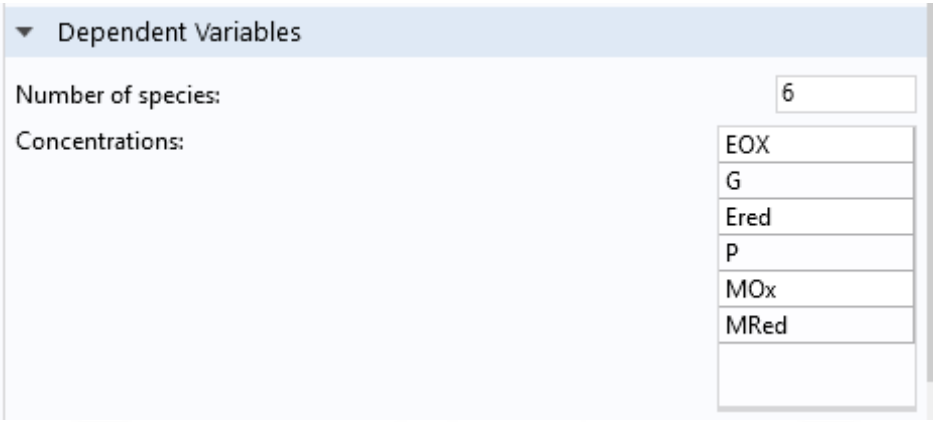
Çizelge 3.2. Denklemlerde Kullanılan Parametreler

Değişken ismi	**Değer**	**Açıklama**
E0	0.03 mol/m^3	Başlangıç Enzim Konsantrasyonu
M0	12 mol/m^3	Başlangıç Mediator Konsantrasyonu
G0	1 mol/m^3	Başlangıç Glukoz Konsantrasyonu
k1	7.9 m^3/(s.mol)	Hız Sabiti
k2	1.4 m^3/(s.mol)	Hız Sabiti
k0	5.0119*10^{-10} m/s	Hız sabiti
DG	6.51*10^{-10} m^2/s	Glukozun Difüzyon Katsayısı
DMOx	7.2*10^{-10} m^2/s	Oksidasyonun difüzyon katsayısı
DMRed	6.4*10^{-10} m^2/s	Redüksiyonun difüzyon katsayısı
DE	3.9*10^{-11} m^2/s	Redüksiyon Enzimin Difüzyon Katsayısı
Nu	0.001 V/s	Sabit sayı
Beta	0.51	Sabit sayı

Çizelge 3.3. Reaksiyonların değişkenlerinin tanımlanması

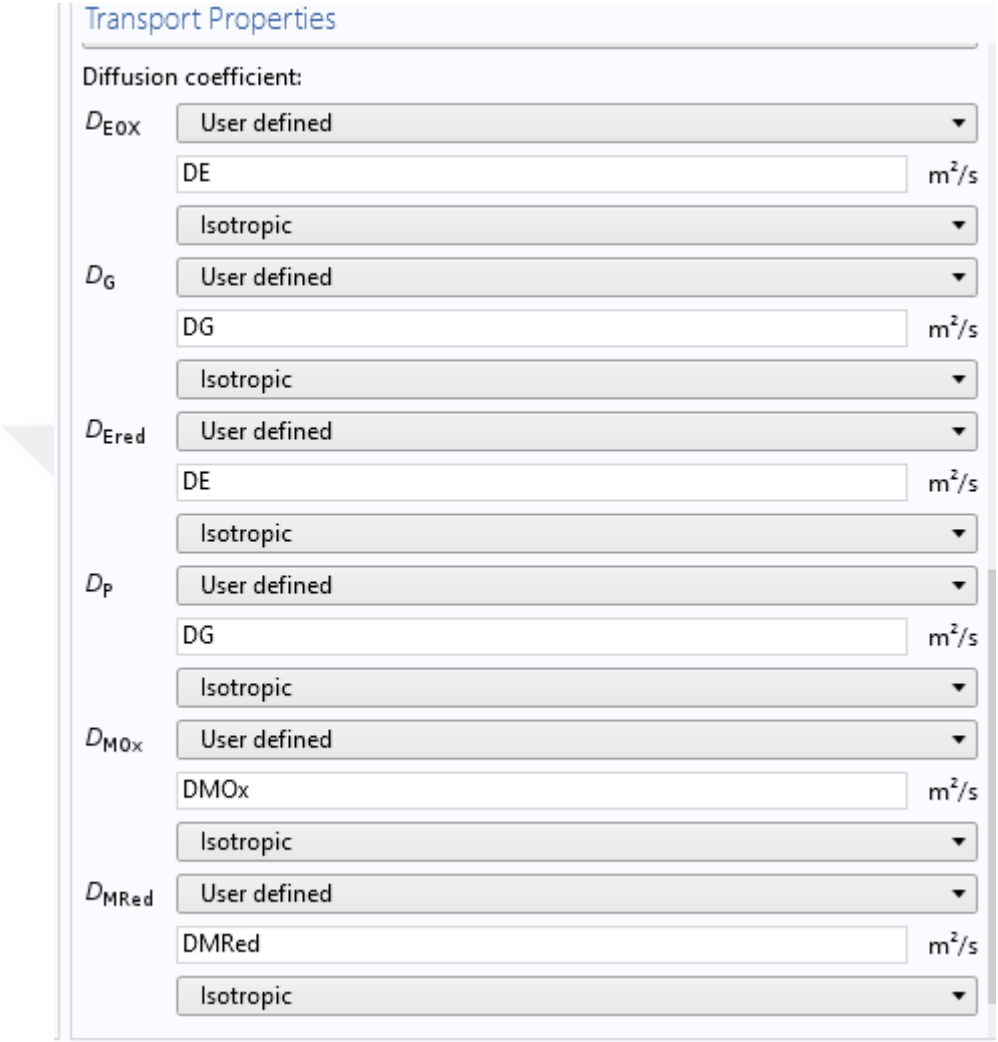
Adı	**Açıklama**	**Birimi**
rEOX	-k1*EOX*G+k2*Ered*MOx	mol/(m^3.s)
rG	-k1*EOX*G	mol/(m^3.s)
rERED	k1*EOX*G-k2*Ered*MOx	mol/(m^3.s)
rP	k1*EOX*G	mol/(m^3.s)
rMOX	-2*k2*Ered*MOx	mol/(m^3.s)
rMRED	2*k2*Ered*MOx	mol/(m^3.s)

Simülasyonlar sırasında elektroanaliz kısmında denklemlerdeki bağımlı değişkenlerin tümü Comsol yazılımında bulunan concentration kısmına tanımlanmıştır. Comsol yazılımının ilgili bölümünün ekran görüntüsü şekil 3.3'te görülmektedir.



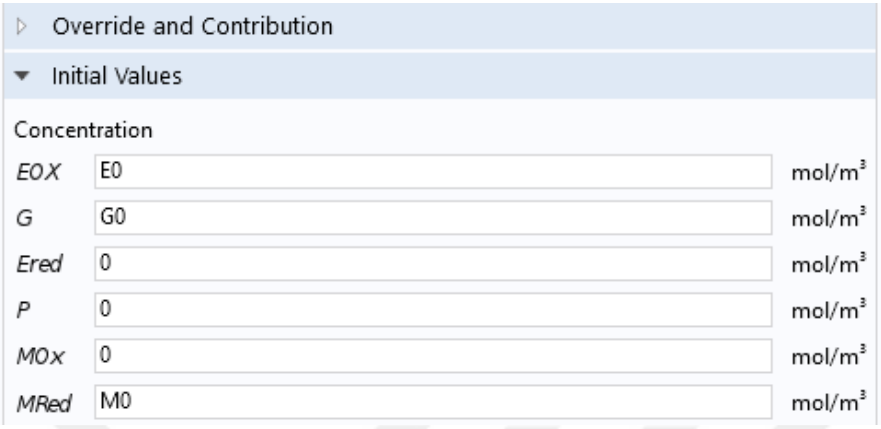
Şekil 3.3. Bağımlı değişkenler

Comsol yazılımında transport properties kısmına denklemlerin difüzyon katsayıları girilmiştir ve ekran görüntüsü şekil 3.4'te görülmektedir.

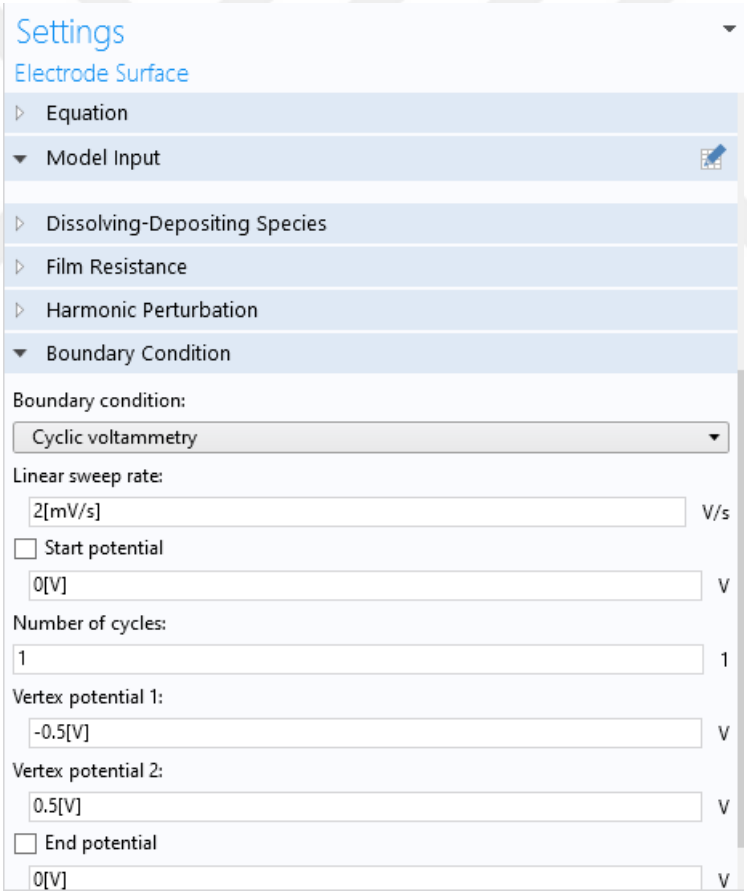


Şekil 3.4. Difüzyon katsayıları

Analiz edilen denklemlere göre başlangıç değerleri şekil 3.5'de gösterildiği gibi eklendi. Çalışmada çevrimsel voltammetri kullanılacağından elektrot yüzeyi için sınır koşulları seçilmiştir ve ekran görüntüsü şekil 3.6'da görülmektedir.

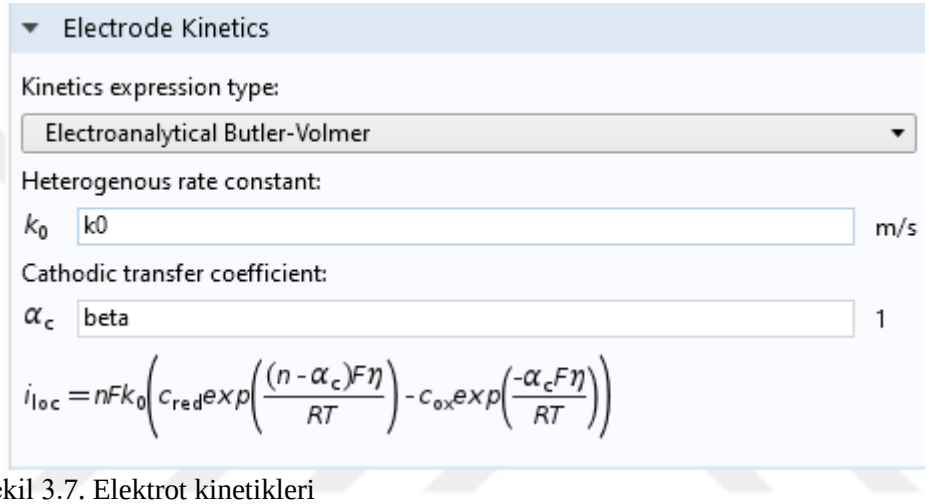


Şekil 3.5. Başlangıç değerleri

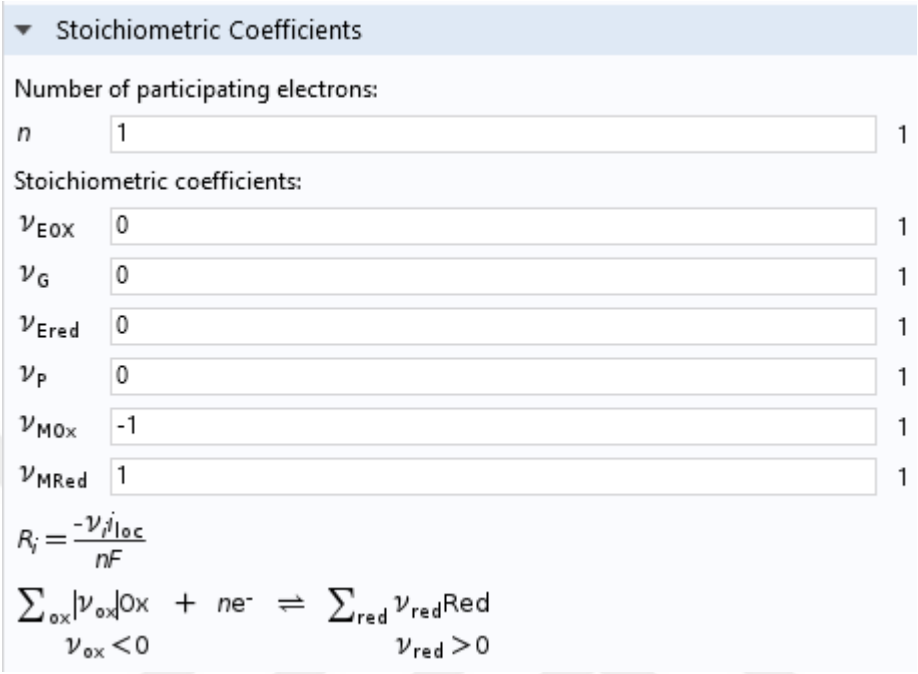


Şekil 3.6. Elekrot yüzey parametreleri

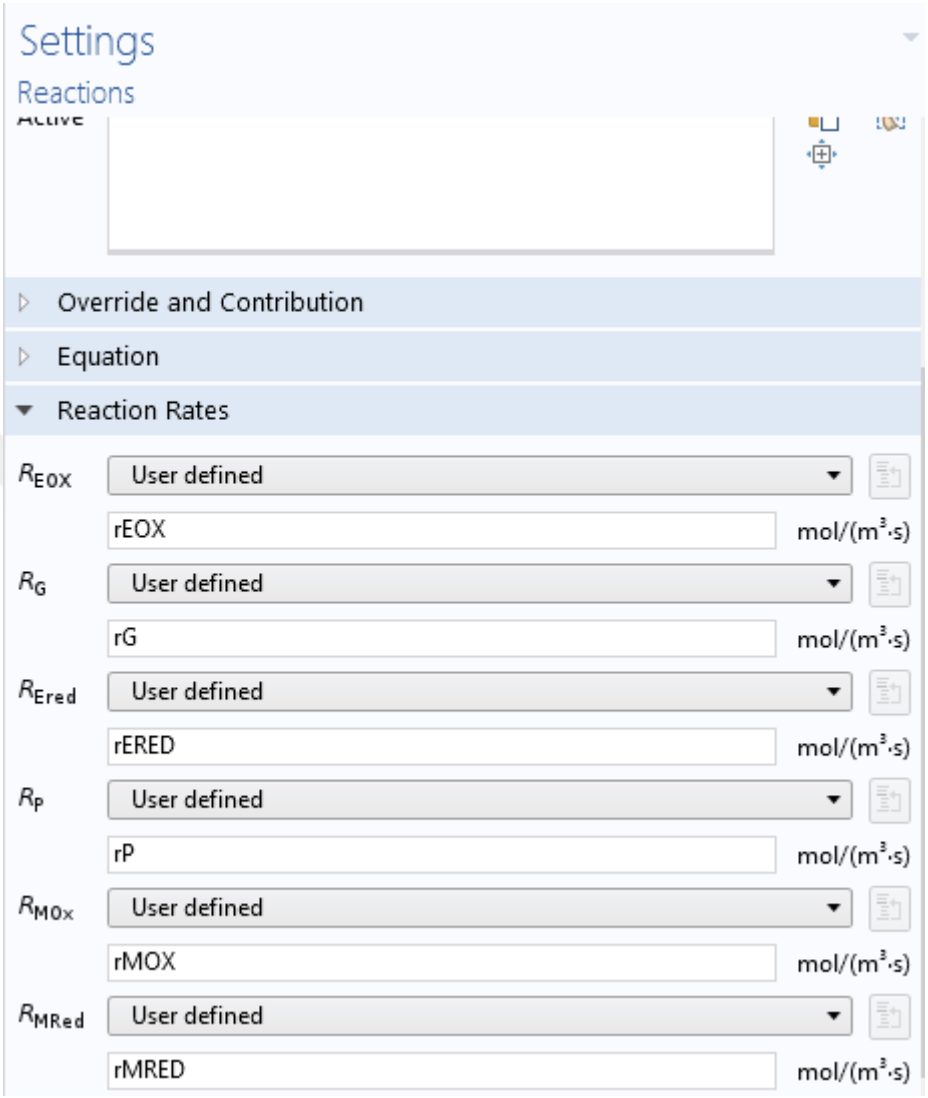
Elektrot yüzeyinde Butler-Volmer denklemleri uygulanmıştır ve Comsol yazılımında uygulanan bölümün ekran görüntüsü şekil 3.7'de görülmektedir. Katsayılar şekil 3.8'de görüldüğü gibi indirgenme ve yükseltgenme denklemlerine göre belirlenmiştir. Reaksiyon oranları da şekil 3.9'da görüldüğü gibi düzenlenmiştir.



Şekil 3.7. Elektrot kinetikleri

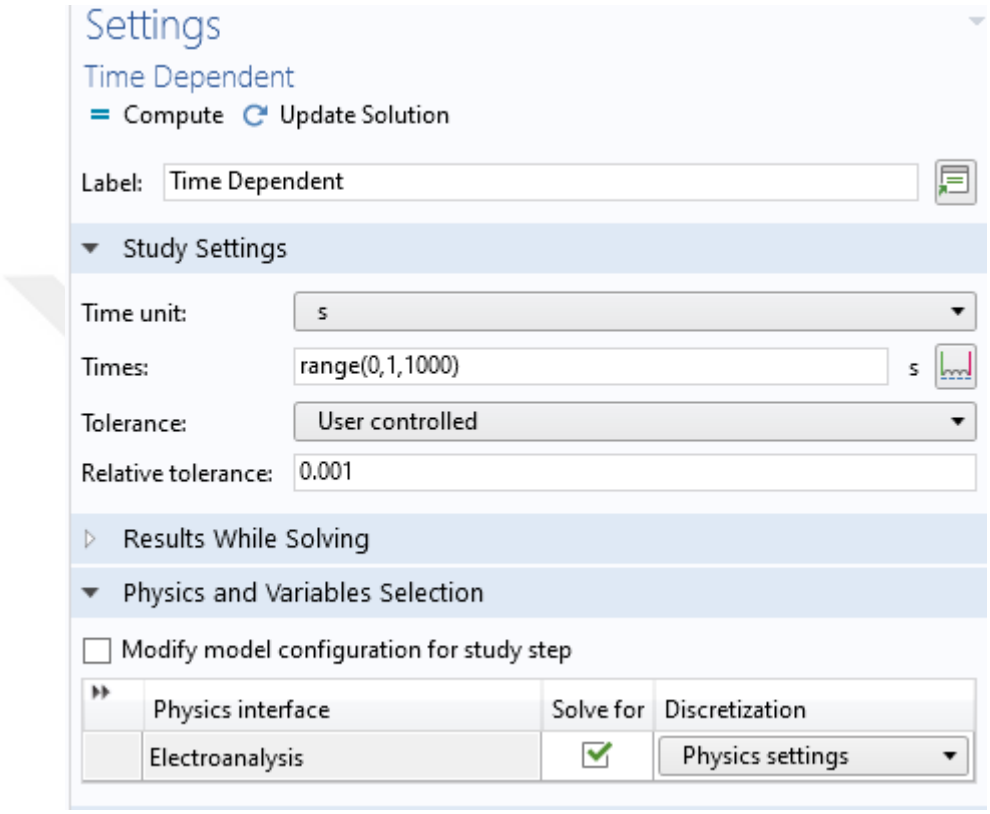


Şekil 3.8. Katsayılar



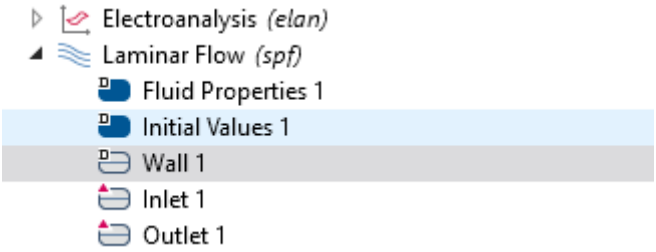
Şekil 3.9. Reaksiyon oranları

Elektroanalizin çözümlenmesi için zamana bağlı çözüm kullanılmıştır ve Comsol yazılımının ekran görüntüsü şekil 3.10'de görüldüğü gibi düzenlenmiştir.



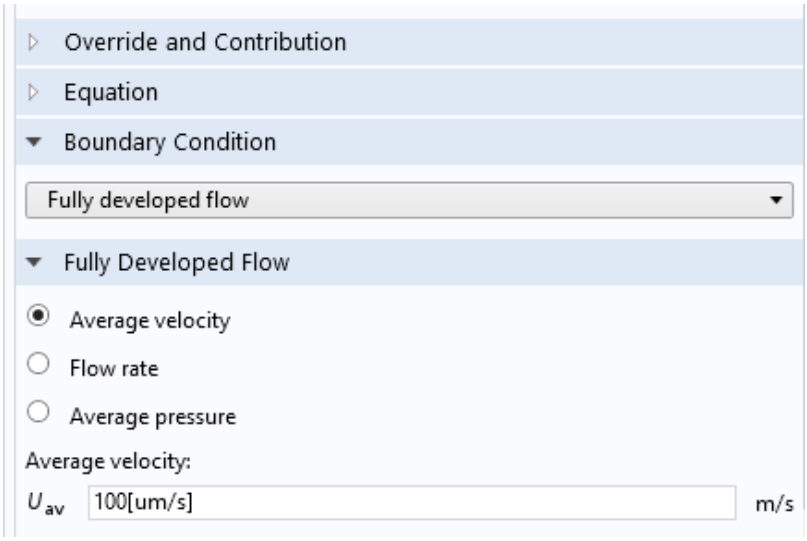
Şekil 3.10. Zamana bağlı çözüm parametreleri

Öncelikli olarak sıvı akışı olmadan bir model tasarlanmıştır. Modeli akışlı olarak incelediğimizde ise Comsol programında elektroanaliz kısmı şekil 3.11'de görüldüğü gibi oluşturulmuştur.



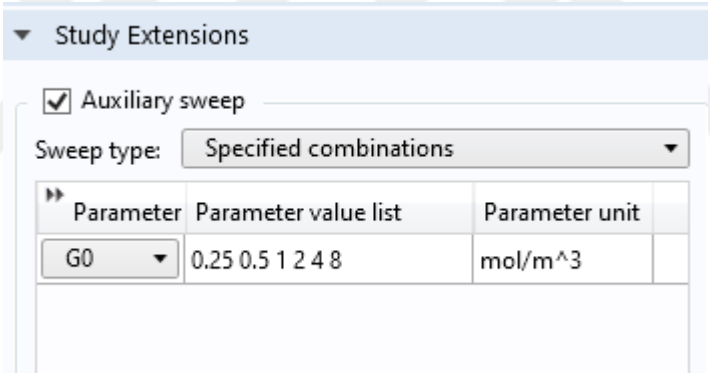
Şekil 3.11. Elektroanaliz bölümü

Basınç tahrikli akış analizinde mikrokanalın girişine Laminer akış uygulanmıştır. Oluşturulan mikro kanalın başlangıç değerleri belirlenmiştir. Sınır koşulları mikrokanalın alt ve üst yüzeyleri için duvar olarak belirlenmiştir. Alt duvarın bir kısmı bölünmüş ve elektrot için gerekli sınır koşulu uygulanmıştır. Mikrokanalın soluna laminer akış için hız profili uygulanmıştır. Sağına ise basınç sınır koşulu uygulanarak akışın takip edeceği yol belirlenmiştir. Sınır koşulu tam gelişmiş laminer akış olan girişin Comsol yazılımındaki ekran görüntüsü şekil 3.12'de gösterilmektedir.

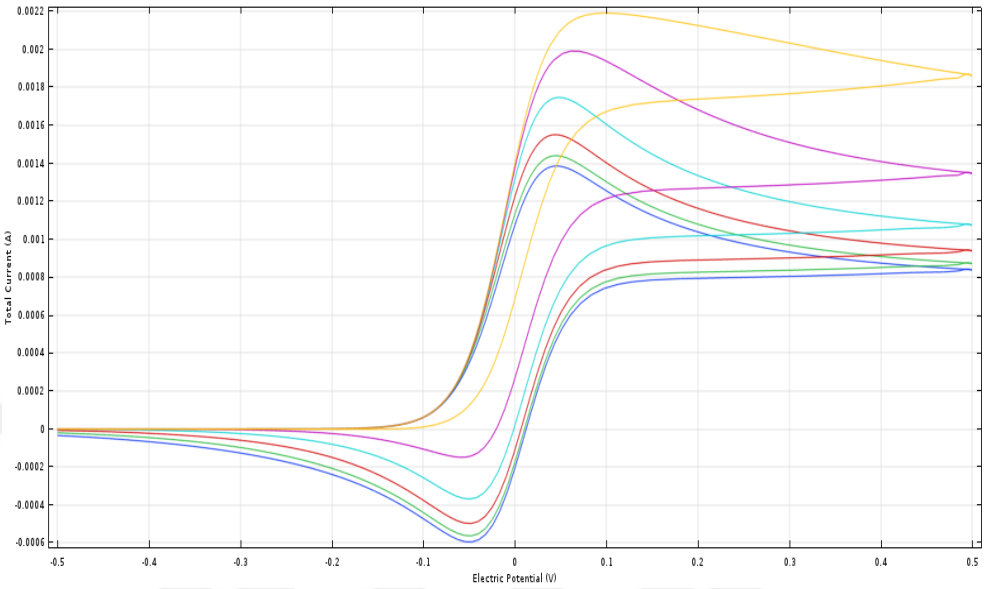


Şekil 3.12. Sınır koşulu tam gelişmiş laminer akış olan girişin Comsol yazılımındaki ekran görüntüsü

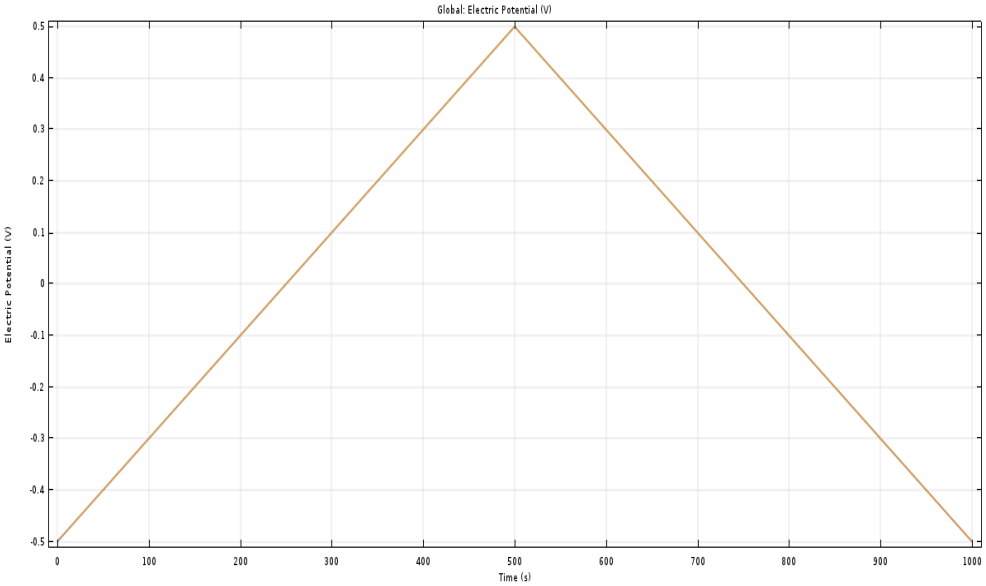
Başlangıç kısmında giriş sınır koşulu için kısmında tam gelişmiş akış (fully develop flow) işaretlenmiştir ve sıvı akış hızı 100 µm/s olarak eklendi. Kanalın sağ tarafında bulunan çıkış kısmına da basınç sıfır olarak girilmiştir. Farklı glukoz konsantrasyonlarındaki çevrimsel voltammetri hesabı yapılabilmesi için Comsol yazılımındaki "Study" kısmında zamana bağlı (time dependent) çözümde "auxiliary sweep" seçeneği seçilmiştir ve bu kısmın ekran görüntüsü şekil 3.13'te görülmektedir. Böylelikle glukoz konsantrasyonları geniş aralıkta aynı anda incelenebilme olanağına sahip olunmuştur. Ağ yapısı seçilip çözüm zamanı belirtildikten sonra "compute" simgesine tıklanarak modelin çözümü başlatılmıştır. Oluşan çevrimsel voltammetri sonuçları toplu halde şekil 3.14'te verilmiştir. Çevrimsel voltametrinin kalibrasyon eğrisi de şekil 3.15'te verilmiştir.



Şekil 3.13. Auxiliary sweep parametreleri

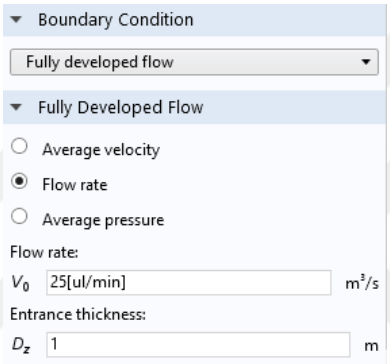


Şekil 3.14. Farklı konsantrasyonlardaki çevrimsel voltametri grafiği



Şekil 3.15. Kalibrasyon eğrisi

Daha sonra denklemler farklı debi değerlerinde laminer akış şartlarında analiz edilmiştir. Basınç tahrikli akış "laminer flow" kısmında mikrokanal girişine "fully developed flow" tanımlanmıştır. Böylelikle mikrokanalın giriş kısmında laminer akış hız profilinin laminer akış için tanımlanabilmesi sağlanmıştır. Debi (flow rate) kısmına ise 25 µl/dk,50 µl/dk,100 µl/dk ve 200 µl/dk değerleri tek tek girilerek çözümlemeler yapılmıştır. Comsol yazılımının ilgili alanı şekil 3.16'da görülmektedir.



Şekil 3.16. Comsol yazılımının ilgili ekran görüntüsü

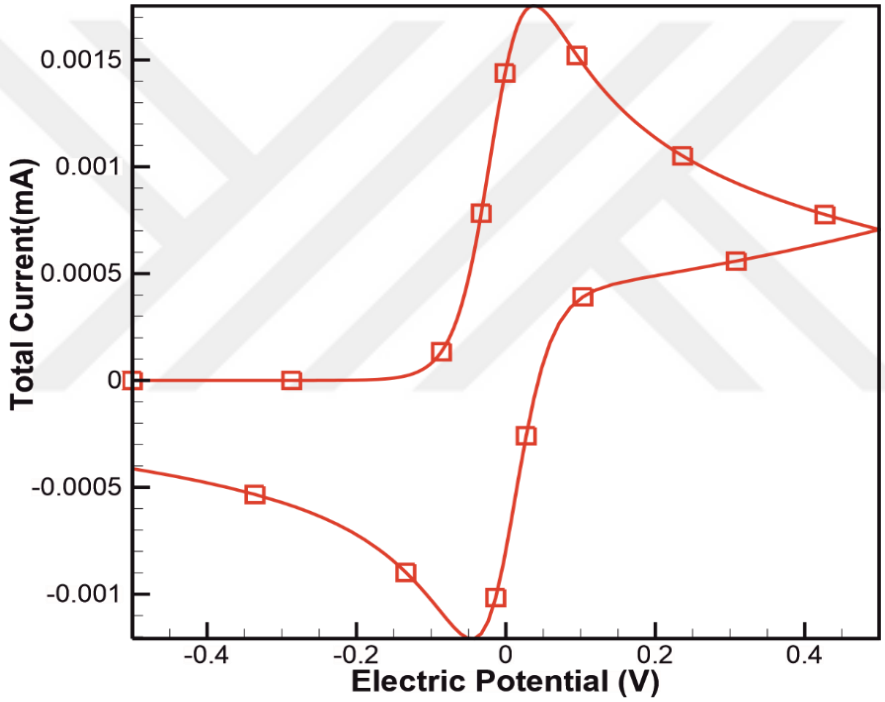
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Elektrokimyasal biyosensörler birçok hastalığın teşhis tedavi ve takip süreçlerinde kullanıldığından çalışmamızda sensör tasarımı gerçekleştirilmiş olup sonuçları bu bölümde yorumlanmıştır. Yapılan analizlere göre zamandan kazanç sağlayarak deneysel ortama ihtiyaç duymadan sonuçların değerlendirilebileceği öngörülmüştür. Farklı parametrelerin değerlendirilebilmesi biyosensörlerin kullanım ömrünün uzatılabilmesi için ileri değerlendirmelerde katkısının olacağı anlaşılmaktadır. Bu çalışmanın ilk aşamasında çevrimsel voltametriden elde edilen elektrik akımı ve potansiyeli bir grafik üzerinde çizdirilerek tipik CV dalga formunun oluşup oluşmadığı araştırılmıştır. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi laminer akış olmadığı durumda biyosensör tipik çevrimsel voltametri dalga biçimini oluşturmaktadır.

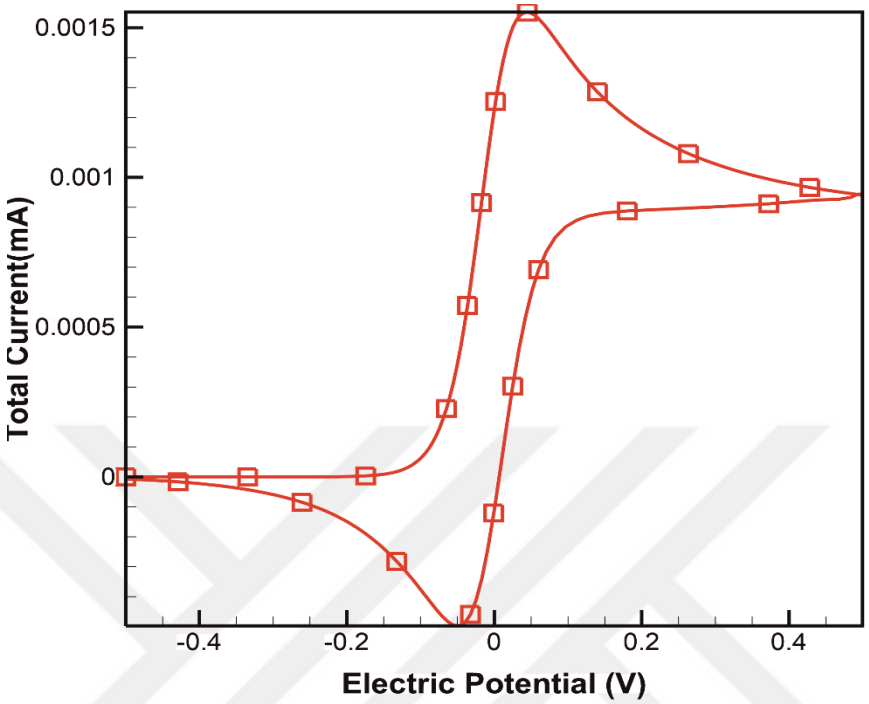
Tipik bir çevrimsel voltammetri grafiğinde başlangıçta, indirgeme potansiyellerinde oksidasyon reaksiyonu yürütülmez ve ihmal edilebilir bir akım çekilir. Potansiyel, redoks çiftinin indirgeme potansiyeline doğru hareket ettikçe oksidasyon reaksiyonu hızlanır ve böylece akım artar. Oksidasyon reaksiyonu, elektrot yüzeyindeki reaktanı tükettiğinde, akım, çalışma elektroduna doğru taşınma hızı ile sınırlanır. Bu nedenle, bir tepe akımı gözlemlenir ve daha yüksek potansiyellerde voltammetrik akım, potansiyelden bağımsız bir oranda düşer; bu bölge difüzyon kontrollü veya taşıma kontrollü olarak adlandırılmaktadır. Daha fazla indirgeme potansiyeline doğru geriye doğru süpürüldüğünde, ürünün orijinal reaktana yeniden dönüştürülmesi negatif (katodik, indirgeyici) bir akım verir. Reaksiyona giren türün tükenmesi, negatif bir tepe akımına neden olur ve ardından yeniden dönüşüm, difüzyon kontrollü bir hızda ilerler. İleri tepe noktasındaki akımın büyüklüğü, voltammetride yaygın bir teşhis değişkenidir.

Laminer akışın varlığı sırasında biyosensörün okuma yaptığı ve yine tipik bir CV dalga biçimi oluşturduğu görülmektedir. Akış olmayan ortama göre laminer akış koşulları altında maksimum akıma daha hızlı ulaştığı görülmektedir. Ayrıca,

akım sinyalinin azalma eğilimi gösterdiği bölgelerde ise daha hızlı azalma oluştuğu şekil 4.2'de görülebilmektedir. Laminer akış varlığında bu şekilde bir CV grafiğinin elde edilmesinin sebebi olarak ortamda bulunan akışkanın konvektif etkilere de maruz kalmasıdır. Akış olmadığı durumda ortamda bulunan kimyasal türler difüzyon yardımı ile uzun sürelerde sensör yüzeyi ile etkileşime girerken akış bulunan ortamda ise bu etkileşim daha hızlı olmaktadır. Böylelikle sensörden elde edilen bilginin daha hızlı eldesi sağlanmaktadır.

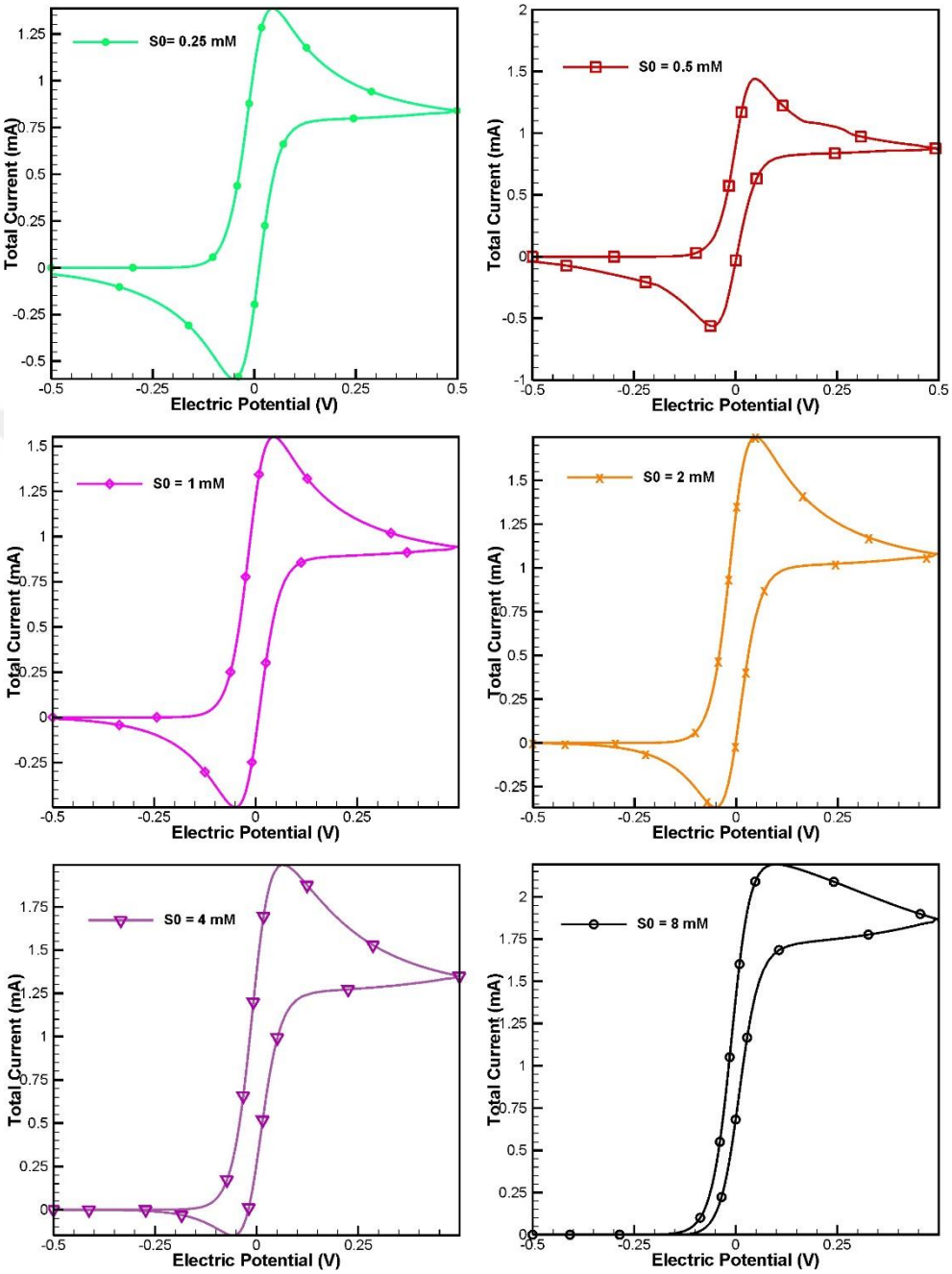


Şekil 4.1.Akış koşulları olmadığı durumda CV grafiği



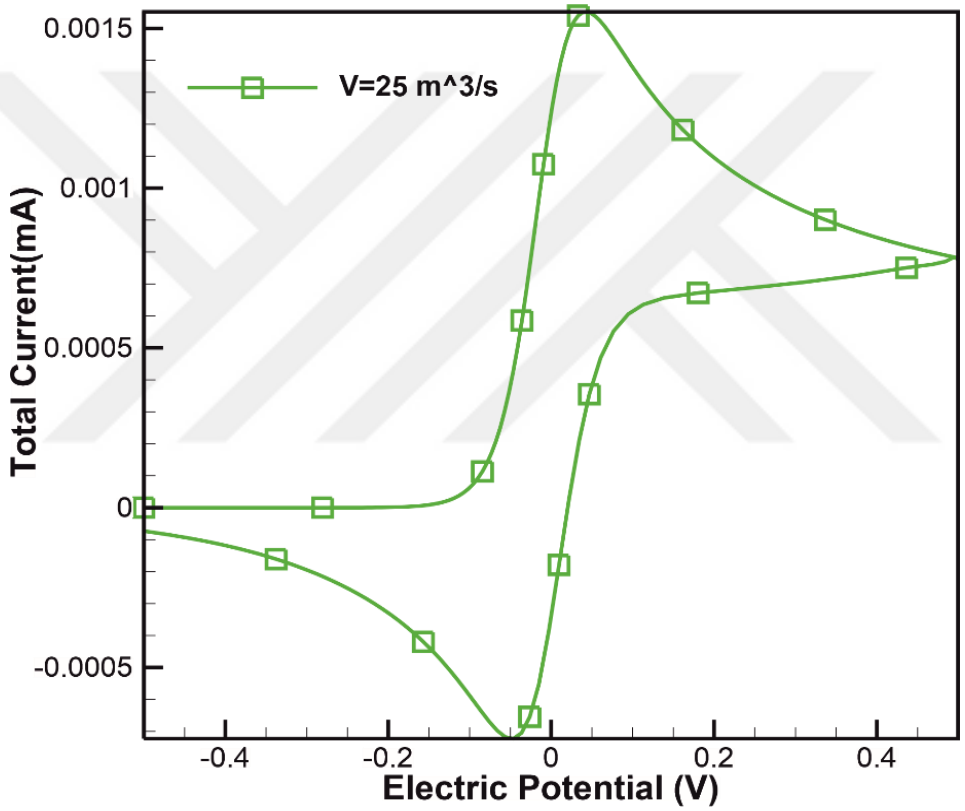
Şekil 4.2. Laminer akış koşulları altında CV grafiği

Şekil 4.3'de mikrokanal içerisinde bulunan çözeltideki glukoz konsantrasyonları arttırarak biyosensörün etkinliği değerlendirilmiştir. Başlangıç glukoz konsantrasyonları sırasıyla 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM ve 8mM olarak belirlenmiş olup glukoz konsantrasyonun arttırılmasıyla elde edilen akımın arttığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeni ise glukoz konsantrasyonlarının artmasıyla elektrokimyasal tepkimelerin artması ve buna bağlı olarak elde edilen akımın artmasını sağlamıştır. Laminer akışın varlığında glukoz konsantrasyonunun artmasının da pik akım değerine ulaşmayı hızlandırdığı görülmüştür. Hem akışkan üzerinde bulunan konvektif etkiler hem de glukoz konsantrasyonunun artmasının sensörden elde edilen bilgiyi daha da hızlandırdığı görülmektedir. Fakat glukoz konsantrasyonunun 8mM üzerine çıkarılması sensörden elde edilen tipik çevrimsel voltammetri grafiğinin bozulmaya başlamasına sebep olmaktadır.

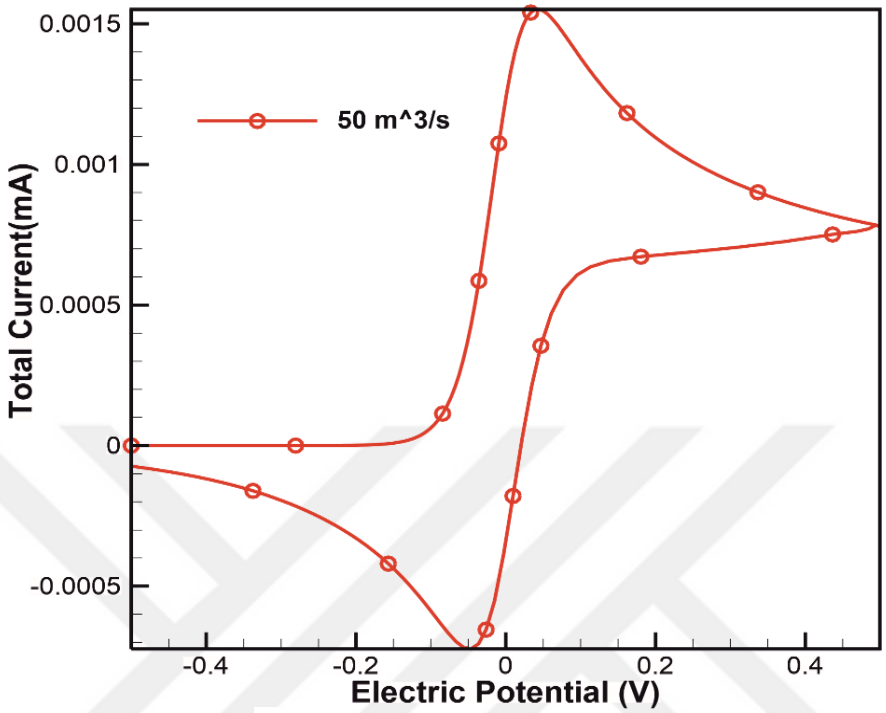


Şekil 4.3. Farklı glukoz değerlerindeki CV grafikleri

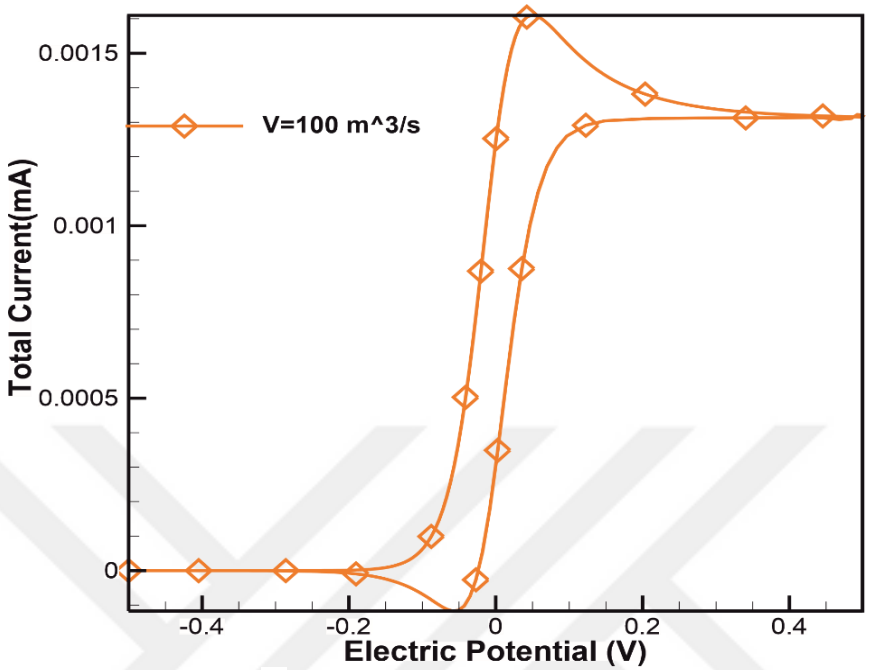
Şekil 4.4, şekil 4.5, şekil 4.6 ve şekil 4.7'da görüldüğü gibi laminer akış varlığında debinin sırasıyla 25 µl/dk, 50 µl/dk, 100 µl/dk, 200 µl/dk olarak arttırılmasıyla akım artışı gözlemlenmiştir. Akışkanın aktığı geometrideki birim zamanda geçen hacmin arttırılması Nerst-Planck denklemindeki konveksiyon terimindeki debi değerinin artmasıyla elektrot ve akışkan arasındaki etkileşim artmakta olup akımın arttığı gözlemlenmiştir.



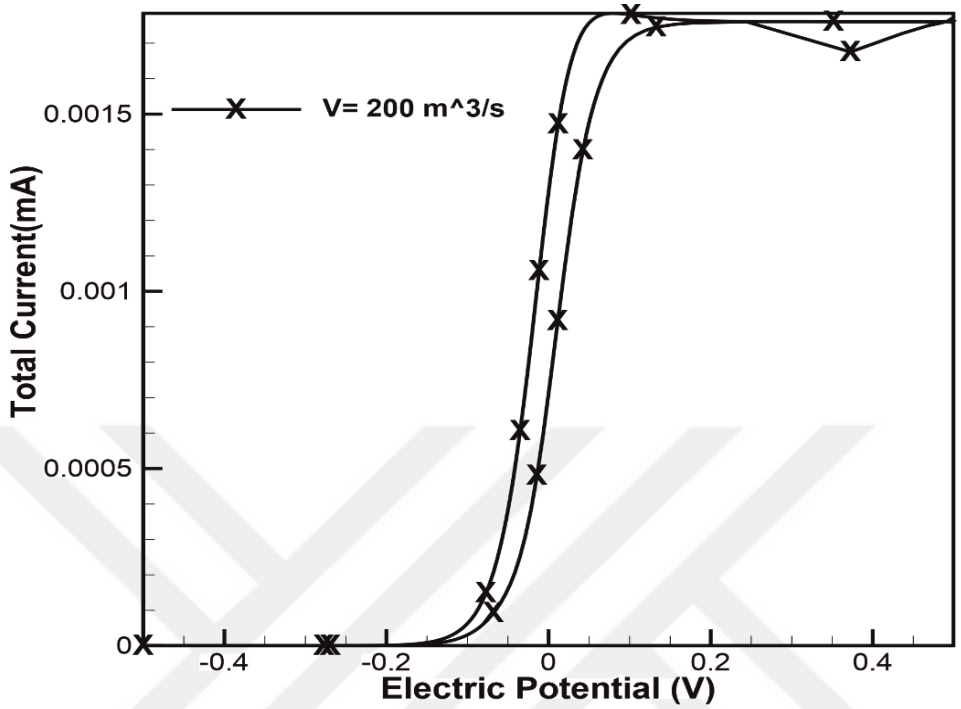
Şekil 4.4. Debi değeri 25 µl/dk olan 1 mMol glukoz değerindeki CV grafiği



Şekil 4.5. Debi değeri 50 µl/dk olan 1 mMol glukoz değerindeki CV grafiği



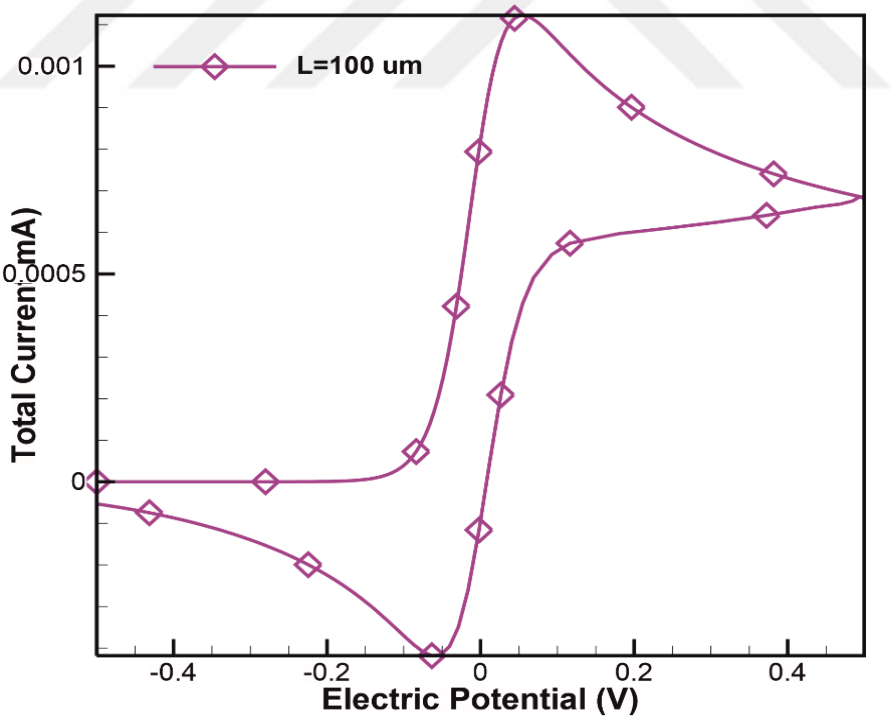
Şekil 4.6. Debi değeri 100 µl/dk olan 1 mMol glukoz değerindeki CV grafiği



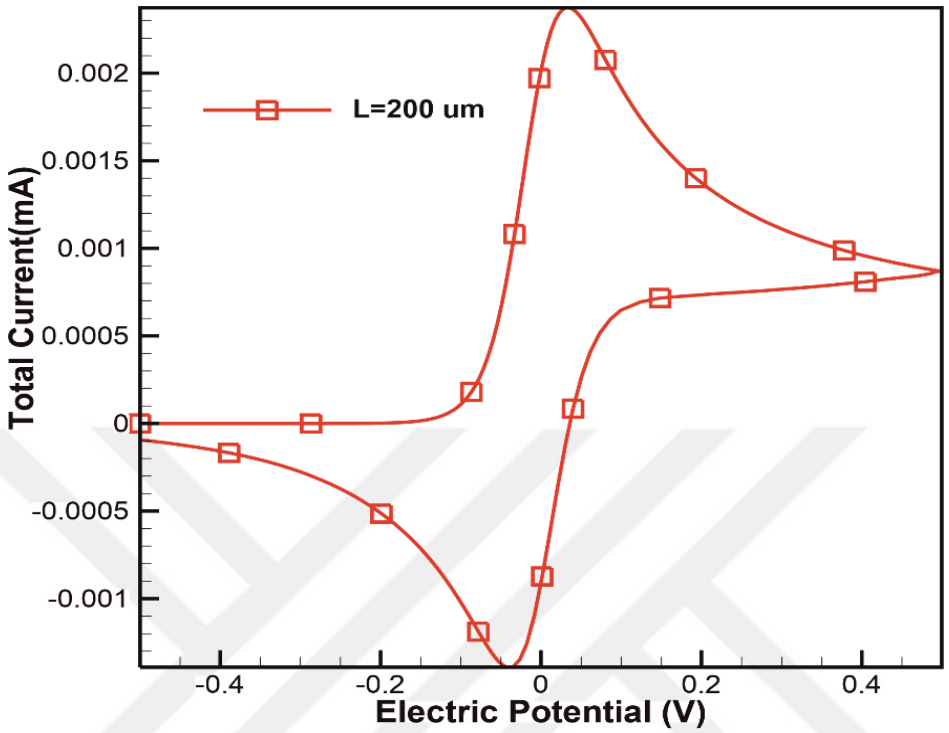
Şekil 4.7. Debi değeri 200 µl/dk olan 1 mMol glukoz değerindeki CV grafiği

Çevrimsel voltammetri simülasyonunda çalışan elektrot yüzeyine uygulanan potansiyel, zamanın bir fonksiyonu olarak doğrusal olarak değişmektedir. Farklı elektrot boyutlarında kaydedilen voltammetriler şekil 4.8, şekil 4.9 ve şekil 4.10'da verilmiştir. Elektrot boyutu arttıkça, eğrilerin şekli, lineer difüzyonun meydana geldiğini gösteren tepe şeklindeki CV'ye aşamalı olarak hareket eder. Elektrot boyutu büyüdüğünde kimyasal türün etkileşebileceği yüzeyin arttığı ve konveksiyon ile difüzyondan kaynaklı tür bulutlarının üst üste gelerek daha yoğun madde taşınımının oluştuğu düşünülerek açıklanabilir. Bu tür bir üst üste bindirme, sonsuz büyük bir düzlemsel elektrodun sınır koşuluna yaklaşan elektrot yüzeyine neredeyse dikey olarak madde taşınımının oluşmasına olanak verir. Madde taşınımının artması doğal olarak sensörden elde edilen akımın artmasına da sebep olmuştur. Ayrıca, pozitif ve negatif tepe noktalarındaki akım değerlerine daha hızlı bir şekilde ulaşılmasına sebep olmuştur.

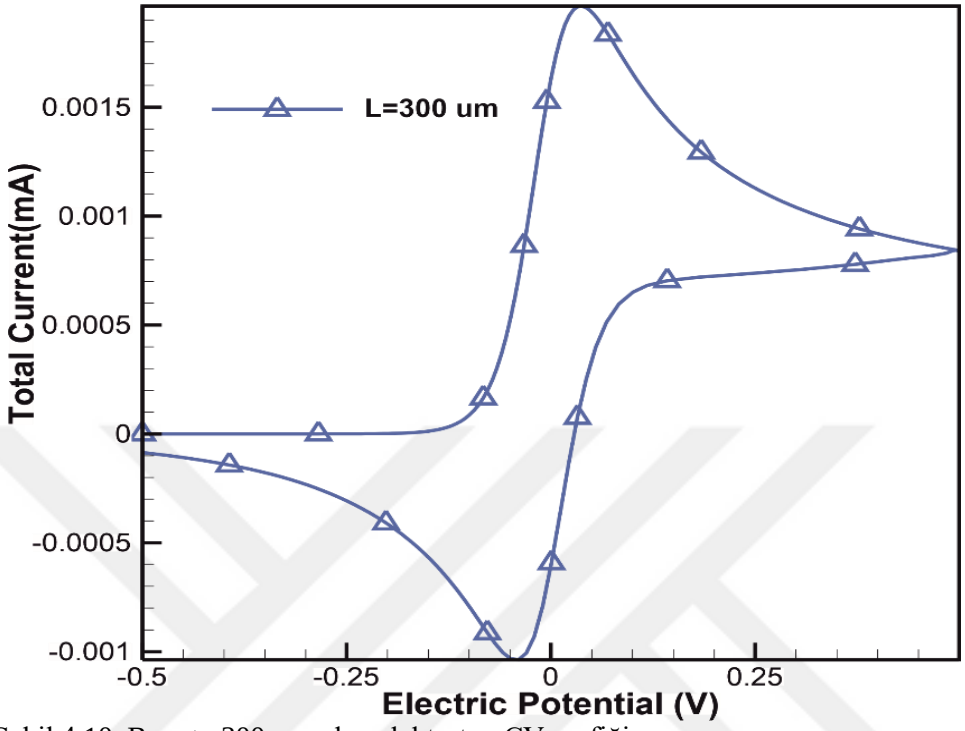
Bu çalışmada kullanılan matematiksel model, elektrot geometrisini değiştirerek ve uygun parametre değerlerini seçerek farklı deney koşullarını taklit edecek şekilde kolayca modifiye edilebilir. Model, aracının elektrot reaksiyonları, çeşitli enzim kinetikleri ve durağan olmayan koşullar için geçerlidir. Ayrıca simülasyon parametreleri, enzimler ve aracılar ile elektrotların davranışını doğru bir şekilde tahmin etmek için uyarlanmıştır. Bu nedenle, önerilen model, özellikle kinetik parametrelerdeki değişikliklerden dolayı yanıttaki değişikliklerin tahmin edilmesi için yararlıdır. Bireysel reaksiyonlar için kinetik parametreler bilindiğinde veya tahmin edilebildiğinde en iyi enzim, aracı madde ve elektrot malzemesi kombinasyonunun seçilmesine yardımcı olabilir. Tüm reaktanların konsantrasyon gradyanları farklı koşullar altında görselleştirilebildiğinden, simülasyonlar uzaysal mekanizmaları aydınlatmak için de kullanılabilir. Bu nedenle geliştirilen model, enzim elektrotlarının gerçekçi simülasyonlarını sağlar.



Şekil 4.8. Boyutu 100 µm olan elektrotun CV grafiği



Şekil 4.9. Boyutu 200 µm olan elektrotun CV grafiği



Şekil 4.10. Boyutu 300 µm olan elektrotun CV grafiği

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Elektrokimyasal biyosensörler birçok hastalığın teşhis, tedavi ve takibinde kullanılmaktadır. Özellikle diyabet hastalığında biyosensörlerden faydalanılmaktadır. Bu çalışmada deneysel bir ortama ihtiyaç duymadan sonuçları hızlı, doğru ve az maliyetli olarak elde edebilmek hedeflenmiştir. Öncelikle tasarlanan mikro kanal içerisinde akışkan akışı olmadan analiz yapılmış ardından basınç tahrikli akış ile çalışmaya devam edilmiştir. Glukoz konsantrasyonu, elektrot boyutu, debi gibi parametreler değiştirilerek çevrimsel voltametride kullanılan potansiyel-akım değişimleri simülasyonlar aracılığı ile gözlemlenmiştir. Elde edilen simülasyonlar, sıvı akış hız şiddetinin biyosensörün etkinliğinin arttırdığını göstermektedir. Ayrıca, glukoz konsantrasyonunun artmasıyla sensörün etkinliğinin arttığı ve fakat belirli bir konsantrasyon değerinden itibaren tipik çevrimsel voltammetri grafiğinin bozulduğu görülmektedir. Elektrot uzunluğunun artmasının da laminer akış koşulları altında çalışan biyosensörün algılama etkinliğini arttırmıştır. Tek kullanımlık sensörlerin maliyetleri göz önünde bulundurulduğunda birden fazla analizde kullanılabilecek ucuz ve kolay üretilebilen bir cihazın glukoz algılama için kullanılabileceği ispatlanmıştır. Gelecek çalışmalar için öneri olarak cihazın üretiminin sonucunda deneysel ortamda test edilmesi verilebilir.

KAYNAKLAR

Ahmad, R.,Tripathy,N.,Park, J. H.,Hahn, Y. B., 2015. A comprehensive biosensor integrated with a ZnO nanorod FET array for selective detection of glucose, cholesterol and urea. *Chemical Communication*, 60; 11968-11971

Ahn, J.,Choi,Y.,Lee, A. R.,Lee, J.H. and Jung, J. H.,2016.A duplex DNA-gold nanoparticle probe composed as a colorimetric biosensor for sequence-specific DNA-binding proteins. *Analyst*., 141, 2040-5.

Akyilmaz, E.,Dinckaya, E.,A.,1999. new enzyme electrode based on ascorbate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of l-ascorbic acid. *Talanta*,50; 87-93.

Altug, C.,Mengulluoglu,U.,Kurt, E.,Kaya,S.,Dinckaya, E., 2011.A novel biosensor based on glucose oxidase for activity determination of alpha - amylase. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 39; 298-303

Andrienko, D. (2008). Cyclic voltammetry. *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.10764-4

Asav, E.,Akyilmaz, E.,2009.Preparation and optimization of a bienzymic biosensor based on self-assembled monolayer modified gold electrode for alcohol and glucose detection. *Biosensors& Bioelectron*ics, 25; 1014-1018

Asif,M., Ali,S.U.,Nour, O., Willander,M.,Brännmark,C., Strålfors,P., Englund,U.,Elinder,F.,Danielsson, B., 2010. Functionalised ZnO-nanorod-based selective electrochemical sensor for intracellular glucose. *Biosensors & Bioelectronics*, *25*(10); 2205-2211

Bagio, L., 2018. *Finite element modeling of electrochemical biosensors* (Doctoral dissertation, California State University, Northridge).

Banica,F.G., Chemical Sensors and Biosensors, Fundamentals and Applications, John Wiley & Sons Ltd, 2012, ISBN: 9780470710678

Bankar,S.B., Bule, M.V.,Singhal,R.S., Ananthanarayan,L., 2009. Glucose oxidase--an overview. *Biotechnology Advances*, 27(4); 489-501

Bard, a, & Faulkner, L.,2002. Allen J. Bard and Larry R. Faulkner, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, New York: Wiley, 2001. *Russian Journal of Electrochemistry*, *38*(12), 1505–1506.

Bentley, R (1963). Glucose oxidase. In The Enzymes, Vol. 7, eds P. D. Boyer, H. Lardy & K. Myrback. Academic Press, London, pp. 567-86.

Berchmans,S.,Sathyajith, R., Yegnaraman, V., 2001. Layer-by-layer assembly of 1, 4-diaminoanthraquinone and glucose oxidase.*Materials Chemistry and Physics*,77; 390-396

Bose, D.,Su, Y.,Marcus, A.,Raulet, D. H., Hammond, M.C.,2016.An RNA-Based Fluorescent Biosensor for High-Throughput Analysis of the cGAS-cGAMP-STING Pathway. *Cell Chem Biol*, *23*, 1539-1549.

Bubis, E., Faiger, H., Tayyh, E.,Schechner, P.,2011. The Influence of Glucose Concentration on the Performance of an Ag Plated Fiber Anode by Cyclic Voltammetry. *ECS Transactions*, *33*(39);201.

Castillo, J., Gáspár, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Soukharev,V.,Dorneanu,S.A.,Ryabov,A.D.,Csöregi, E.,2004. Biosensors for life quality: Design, development and applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *102*(2);179-194

Champe, P.C., Harvey, R.A. ve Ferrier, D.R., (2005). Biochemistry, 3rd Ed,Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Comsol Multiphysics, 2008, COMSOL Multiphysics User's Guide, Version 3.5.

Cox M.M., Lehninger A.L., Nelson D.L., (2017). Lehninger Principles of Biochemistry. 248-49.

D'Souza, S.F.,2001. Microbial Biosensors. *Biosensors&Biotecnology*,16;337–353.

Demirel,S., 2017, Biyokimya,TUSEM,432

DeSalvo,D.J.,Ly, T.T.,Wadwa, R. P.,Messer, L.,Westfall, E.,Gopisetty, D.,Hanes, S.,von Eyben,R.,Maahs, D. M., Buckingham, B. A.,2016.Continuous

Glucose Sensor Survival and Accuracy Over 14 Consecutive Days. *Diabetes Care*, 39(8);112-113

Dickinson, E. J., Ekström, H., & Fontes, E. (2014). COMSOL Multiphysics®: Finite element software for electrochemical analysis. A mini-review. *Electrochemistry communications*, *40*, 71-74.

Dinckaya, E.,Akyilmaz, E.,Akgol, S.,2000.Urate oxidase electrode based on dissolved oxygen probe for urine uric acid determination. *Indian Journal Biochemistry& Biophysics*, 37, 67-70.

Donmez, S.,Arslan, F.,Sari, N.,Hasanoglu Ozkan, E., Arslan, H.,Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase on a carbon paste electrode modified with microspheres attached L-glycine.2016. *Biotechnol Appl Bioch.em*.

Geçkil,H.,2012.Biyokimya 2. Flaş Kitapevi,Malatya,287

Gooding, J.,2006. Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends. *Analytica Chimica Acta*, 559(2), 137-151.

Hakim, M. S.,2018. Determination of glucose in human urine by cyclic voltammetry method using gold electrode. In *IOP Conference Series. Materials Science and Engineering*,Vol. 299, No. 1, p. 012001. IOP Publishing.

Holland J.T., Lau C., Brozik S., Atanassov P., Banta S.,2011. Engineering of Glucose oxidase for direct electron transfer via site-specific gold nanoparticle conjugation. *Journal of the American chemical society*, 133(48); 19262-5

Hühnerfuss H., Basics in Carbonhydrate Chemistry, Handbook of Carbonhydrate-Modifying Biocatalsis, Jenny Stanford Publishing; 1st edition, 2016, Editor: Grunwald, Peter, ISBN:9784669788.

Ivandini, T. A., Wibowo, W.,2017.Preparation of glucose sensors using gold nanoparticles modified diamond electrode. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*,Vol. 188, No. 1, p. 012046. IOP Publishing.

İçli, N., 2008. İmmobilize Glukoz Oksidaz Enziminin Özellikleri ve Enzim Aktifliğinin Artırılması.Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Kaffash,A., Rostami,K., Zare, H. R.,2019. Modeling of an electrochemical nanobiosensor in COMSOL Multiphysics to determine phenol in the presence of horseradish peroxidase enzyme. *Enzyme and microbial technology*, *121*, 23-28.

Kozan, A.,Ö., 2015. Glikoz Ölçümü İçin Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Platformun Geliştirilmesi.Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Kutay, F., Onat,T., Emerk K.,Sözmen, E.,2002. *İnsan Biyokimyası*. Palme Yayıncılık, Ankara,197–202.

La Belle, J. T.,Adams, A.,Lin, C. E.,Engelschall, E.,Pratt,B.,Cook, C. B.,2016.Self-monitoring of tear glucose: the development of a tear based glucose sensor as an alternative to self-monitoring of blood glucose. *Chemical Communication, 52;* 9197-204.

Lavacchi, A., Bardi, U., Borri, C., Caporali, S., Fossati, A., & Perissi, I. (2009). Cyclic voltammetry simulation at microelectrode arrays with COMSOL Multiphysics®. *Journal of Applied Electrochemistry*, *39*(11), 2159-2163.

Leskovac,V., Trivić, S., Wohlfahrt, G., Kandrac, J.,Pericin, D., 2005. Glucose oxidase from Aspergillus niger: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 37 (4);731-50

Li, X., Zhu, Q., Tong, S., Wang, W., Song, W.,2009. Self-assembled Microstructure of Carbon Nanotubes for Enzymeless Glucose Sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *136*(2), 444-450

Meral B., Öcal C., Özbek F., Öney R.G., 2006. *Kimya Mühendisliğine Giriş*, (Üçüncü Baskı). Ankara: Ankara Üniversitesi, 30-35.

Morrison, D. W. G., Dokmeci, M. R., Demirci, U., & Khademhosseini, A. (2007).

Clinical Applications of Micro- and Nanoscale Biosensors. *Biomedical Nanostructures*, *1*, 439–460. https://doi.org/10.1002/9780470185834.ch17

Öztürk,K.,A.,2015.Glikoz Ölçümü İçin Güçlendirilmiş Raman Platformun Geliştirilmesi. *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 7-8

Özyılmaz, G., 2005. Glukoz oksidaz ve Katalazın Ayrı Ayrı ve Birlikte İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Adana, 11-14

Rayegan, S.,Dehpour, A.R.,Sharifi, A.M.,2017.Studying neuroprotective effect of atorvastatin as a small molecule drug on high glucose-induced neurotoxicity in undifferentiated PC12 cells: role of NADPH oxidase. *Metabolik Brain Disease*, 32; 41-49

Reynolds,T.M., Pillay, T.S.,2016.Donald Rumsfeld and point-of-care testing (POCT): the problem of unknown unknowns-venous blood and glucose oxidase-based test strips. *Journel of Clinical Patho*logy, 69(10); 839-840

Sim, H. J.,Kim, J. H.,Kook, S. H.,Lee, S. Y., Lee, J. C.,2016.Glucose oxidase facilitates osteogenic differentiation and mineralization of embryonic stem cells through the activation of Nrf2 and ERK signal transduction pathways.*Molecular and Cellular Biochemistry*, 419(1-2); 157-63

Tüzün, C.,1992. Enzim Reaksiyonlarına Sıcaklığın ve pH'nın Etkisi. *Biyokimya*. Ankara Palme Yayınları, 129-130

Ürün,A.F., 2022. Taşınabilir Potansiyostat Tasarımı Ve Gerçekleştirilmesi. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,* Adana.

Vuong, T. V.,Foumani, M.,MacCormick, B.,Kwan, R.,Master,E.R.,2016. Direct comparison of gluco-oligosaccharide oxidase variants and glucose oxidase: substrate range and H_2O_2 stability. *Scientific Reports*, 6, 37356

Wang, X., Shi, Y.,2014. Fabrication techniques of graphene nanostructures. *Nanofabrication and its Application in Renewable Energy*,1-30

Wang,J. 2000.Analytical Electrochemistry,Canada

Wilson R., Turner A.P.F. Glucose oxidase: an ideal enzyme, Biosensors & Bioelectronics, Vol.7, pp.165-185, 1992

Xia Y., Li J.,Jiang L.,2012. A new strategy for the controlled deposition of gold nanoparticle aggregates on two-dimensional polystyrene arrays and its application in glucose oxidase immobilization. *Journal Of Collaid And İnterface Science*, 377(1);34-39

Zhang D., Zhang,K., Yao Y.L., Xia H. X.,Chen H.Y., 2004. Multilayer Assembly of Prussian Blue Nanoclusters and Enzyme-Immobilized Poly(toluidine blue) Films and Its Application in Glucose Biosensor Construction . *Langmuir* ,20(17); 7303-7307

Zhang, J.,Barajas, J. F.,Burdu, M.,Ruegg, T. L.,Dias, B., Keasling, J.D.,2016. Development of a Transcription Factor Based Lactam Biosensor. *ACS Synthetic Biology*, 6(3);439-445

Zhang,Y.,Tsitkov, S., Hess, H.,2016.Proximity does not Contribute to Activity Enhancement in the Glucose Oxidase-horseradish Peroxidase Cascade. *Nature Communications*. *7*, 13982 https://www.biyologlar.com/glikoz-nedir

ÖZGEÇMİŞ

2013 yılında Dr. M. Feyyaz Etiz Anadolu Lisesi'ni tamamladıktan sonra, 2014 yılında Çukurova Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği lisans eğitimini almaya hak kazandı. 4 yıl lisans eğitimi aldıktan sonra 2018 yılında 2.33 ortalama ile mezun oldu. 2019 yılında Çukurova Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Anabilim dalı alanında Yüksek Lisans eğitimine başladı. Biyomekanik, elektronik, sinyal ve sistemler alanlarına ilgilidir.