

Polifenol Oksidaz Enzim İnce Filminin Bakır Sülfat (CuSO₄) Sensörü Olarak Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Investigation of the Polyphenol Oxidase Enzyme Thin Film as a Copper Sulfate (CuSO₄) Sensor

Murat EVYAPAN ^{1*} 

¹ Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, Balıkesir, Türkiye



Ö Z

Bu çalışmada spin kaplama tekniği kullanılarak çitosan-jelatin biyokompozit alt-tabakası üzerine polifenol oksidaz (PPO) enzimi ile ince filmler üretilmiştir. Biyo-kompozit malzeme, PPO enzim tabakasının altta üzerine kararlı ince film transferi amacıyla kullanılmıştır. Üretilen ince filmlerde PPO enzim tabakası aktif bölgeyi oluşturarak, ince filmin dış ortam ile direkt temas halinde olduğu kısımdır. Bu sayede ince filmin herhangi bir dış ortam değişimi, PPO enzim tabakası üzerine doğrudan etki etmektedir. PPO enzim tabakasının dış ortam değişimlerini duyarlılığını gözlemlemek amacıyla saf su çözucüsünde bakır sülfat (CuSO₄) çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözeltideki bakır sülfat kirlenici olup tespit edilmek istenilen zararlı kimyasal görevindedir. Dolayısıyla, PPO enziminin bakır sülfata karşı tepkisi ölçülerek sensör uygulamalarındaki kullanılabilirliği araştırılmıştır.

İnce filmlerin üretim aşamaları elektriksel ve Kuartz kristal mikrobals (QCM) yöntemleriyle takip edilmiştir. Ayrıca elektriksel ölçümler ve QCM sistemi, ince filmlerin sıvı ortam sensör ölçümleri için kullanılmıştır. PPO enzim ince filminin zamana bağlı kirlenici tepkisi kaydedilerek enzimlerin sensör uygulamalarında aktif tabaka olarak kullanılabilirlikleri araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Polifenol oksidaz enzimi, biyo-sensör, kuartz kristal mikrobals

Alınış / Received: 05.04.2023 Kabul / Accepted: 27.07.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



ABSTRACT

In this study, thin films were produced with the polyphenol oxidase (PPO) enzyme on chitosan-gelatine bio-composite via the spin coating technique. Bio-composite material was used for the PPO enzyme layer and for stable thin film transfer on the substrate. In the thin films produced, the PPO enzyme layer forms the active site and is the part where the thin film is in direct contact with the external environment. In this way, any external environmental change to the thin film directly affects the PPO enzyme layer. A copper sulfate (CuSO₄) solution in pure water solvent was used to observe the external changes in the environment of the PPO enzyme layer. The copper sulfate in this solution is a pollutant and is the harmful chemical to be detected. Therefore, its usability in sensor applications was investigated by measuring the response of the PPO enzyme to copper sulfate.

Production stages of thin films were followed by electrical and Quartz crystal microbalance (QCM) methods. In addition, electrical measurements and the QCM system have been used for liquid media sensor measurements of thin films. By recording the time-dependent contaminant response of the PPO enzyme thin film, the usability of enzymes as an active layer in sensor applications was studied.

Keywords: Polyphenol oxidase enzyme, bio-sensor, quartz crystal microbalance



1. Giriş

Hava ve çevre kirliliği son yıllarda gittikçe artmakta ve bazı bölgelerde tehlikeli boyutlar sınırına ulaşmaktadır. Atmosferde soluduğumuz hava kalitesinin azalmasının yanında, çevre kirliliğine sebep olan atıklar, gıda ve içme su kaynaklarını da olumsuz etkilemektedir. Bütün bu etkiler sonucunda hem kullanılabilir kaynak sayısı azalmakta hem de canlı sağlığı için tehlikeli durumlar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle özellikle hava, gıda ve sudaki canlı sağlığını tehdit eden zararlı maddelerin tespit edilmesi son derece önem kazanmıştır.

Çeşitli ortamlardaki zararlı maddelerin tespiti için kullanılan sensörler üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda yoğunluk kazanmıştır [1, 2]. Bu çalışmaların temel amacı, hedef maddeyi duyarlı, hızlı ve seçici olarak tespit edebilmektir. Ortamdaki kimyasalların yoğunluğu, türü ve sayısı ne kadar fazla olursa, istenilen maddenin tespiti de o derece zorlaşmaktadır. Dolayısıyla sensör çalışmaları hedef duyarlı (aktif) bölgenin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Duyarlı bölge, tespit edilmek istenilen zararlı kimyasal ile birebir etkileşime giren ve bu etkileşim sonucu fiziksel, kimyasal ve/veya elektriksel değişikliklere uğrayan bölüm olarak tanımlanabilir [3, 4]. Oluşan değişimlerin sürekli kontrolü sonucu sensör tepkisi anlık olarak verilebilmektedir.

Son yıllarda literatürdeki sensör çalışmalarında duyarlı bölge olarak organik malzemeler sıklıkla kullanılmaktadır. Organik malzemelerin düşük maliyetleri, kimyasal yapılarının kontrol edilebilir olması ve ince film üretimine uygunlukları sayesinde sensör araştırmalarında literatürde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan organik malzemeler arasında porfirinler [5], polimerler [6], calixarenler [7] ve ftalosiyaninler [3] gibi birçok farklı tür molekül sayılabilir. Sensörlerde duyarlı bölge olarak biyolojik malzemeler de son yıllarda kullanılmakta olup, özellikle biyosensör üretiminde büyük avantaj sağlamaktadır. Bu tip sensörlerde tespit edilmesi istenilen zararlı kimyasala bağlı olarak enzimler seçilmektedir. Birçok farklı enzim sensör sistemlerinde aktif tabaka olarak kullanılarak duyarlılık özelliklerinden faydalanılmaktadır [8]. Enzimler canlı metabolizmasındaki reaksiyonların çoğunu katalize eden organik maddelerdir. Reaksiyon durumunda değişikliğe uğrayabilirler fakat reaksiyonun sonunda eski hallerine geri dönmektedirler. Bu sayede sınırsız sayıda reaksiyona girebilirler. Son yıllarda sensör çalışmalarının büyük bir kısmı seçiciliği ve tekrar kullanılabilirliği arttırmak üzerine olmaktadır. Enzimlerin sahip olduğu bu iki özellik duyarlı tabakada aranan iki

özelliğidir. Dolayısıyla enzimler sensör çalışmalarında duyarlı tabaka olarak kullanımı ile bu avantajlarından faydalanarak sensör sistemleri içine entegre edilmeye çalışılmaktadır.

Metal iyonları (Cu, Pb, Zn, Ag, Cd, Co, Fe, Ni, Cr gibi), çevre kirliliğine neden olan tehlikeli faktörlerin önde gelenlerindedir. Bu tip iyonlarının toprak kirliliğine neden olması, çevreye verdiği en önemli ve en büyük zarardır [9]. Metal iyonlarının mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar ve insanlar gibi canlılar için toksik etkisi bilinmektedir [10, 11]. Önemli bir kirlenici grubu olan bu iyonlar; canlı organizmalarda birikerek toksik ve kanserojen etkiler ortaya çıkarabilmektedir [10]. Dolayısıyla son yıllarda artan metal iyonlarının ekosistemlerde tespit edilmesi büyük önem kazanmıştır.

Bu çalışmada kirlenici olarak bakır sülfat (CuSO_4) seçilmiştir. Bakır sülfat, tarım ve hayvancılık başta olmak üzere birçok alanda farklı amaçlarda kullanılmaktadır. Ancak kullanım miktarları kontrol edilmediği takdirde insan sağlığını tehdit edebilecek riskler ortaya çıkarabilmektedir. Bu sebeple, PPO enzimi katı yüzey üzerine ince film olarak üretilerek bakır sülfat tespitinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

İnce Film Malzemeleri

Bu çalışmada sensör sisteminde duyarlı tabaka olarak kullanılmak üzere Polifenol oksidaz (PPO) enzimi seçilmiştir. Enzimin zararlı kimyasal ile etkileşebilmesi ve bu etkileşimin fiziksel bir sinyal olarak ölçülebilmesi için katı bir yüzey üzerinde ince film haline getirilmesi gerekmektedir. PPO enziminin kararlı bir katı tabaka oluşturabilmesi amacıyla altında destek tabakası adını verebileceğimiz bir alt tabaka kullanılmıştır. Bu çalışma kapsamında üretilen ince filmlerin tamamında destek tabakası olarak çitosan ve jelatinden oluşan bir biyo-kompozit tabakası kullanılmıştır. Çitosan, kitin enzimlerle kolayca bağlanabilme özelliğine sahip doğal bir karbohidrat biyopolimeridir [12]. Jelatin ise yapışma özelliğine sahip, toksik olmayan doğal bir biyopolimerdir [13]. Bu çalışmada kullanılan PPO enzimi muzdan saflaştırılmıştır ve aşamaları daha önceki çalışmalarda detaylı olarak verilmiştir [14].

Spin (Döner) Kaplama Tekniği

İnce film üretim teknikleri arasında basitlik ve kullanılabilirlik açısından öne çıkan tekniklerden biri spin (döner) kaplama tekniğidir. Dakikada binlerce tur atabilen, titreşimsiz döner tablaya yerleştirilen alttaşa üzerine, ince film malzemesinin hazırlanan çözeltisinin serpilmesi sonucu dairesel hareketin etkisiyle çözeltinin alttaşa yayılması ve çözücünün de buharlaşması sağlanır. Elde edilen ürün, seçilen alttaş üzerinde düzgün olarak ince film halinde yayılmış örnek malzemedendir ibarettir.

PPO ince filmleri farklı dönme hızlarıyla (1000, 2000, 3000, 4000 ve 5000 rpm), IDE (interdigitated electrode) ve kuartz kristal üzerine kaplanmıştır. Döner kaplama cihazında hedef hıza ulaşan alttaş üzerine 50 μl çözelti damlatılması ve bir dakikalık dönüş süresi sonucunda ince film transferi gerçekleştirilmiştir.

Kuartz Kristal Mikrobals (QCM) Tekniği

Kuartz kristal mikrobals tekniği nanogram mertebesinde kütle hassasiyetine sahip bir ölçüm tekniğidir. Çok ince ve uygun formda kesilmiş kuartz bir tabaka, iki altın elektrot arasına yerleştirilir ve uygun bir elektronik devre ile sabit bir f_0 rezonans frekansında titreştirilir. Sistem, kuartzın üzerine eklenen en küçük kütle değişimlerinde bile rezonans frekansından sapma göstererek bu değişimi analitik sonuçlara bağlayabilmektedir. Sauerbrey tarafından kütle ve frekans değişimi arasındaki bağıntı şu şekilde verilmektedir [15]:

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2}{\rho_q^{1/2} \mu_q^{1/2} A} \Delta m \quad (1)$$

Burada f_0 rezonans frekansı (Hz), Δm kütle değişimi (g), A kuartzın alanı (cm^2), ρ_q kuartzın yoğunluğu (2.648 g cm^{-3}), μ_q kuartzın shear modülü ($2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$).

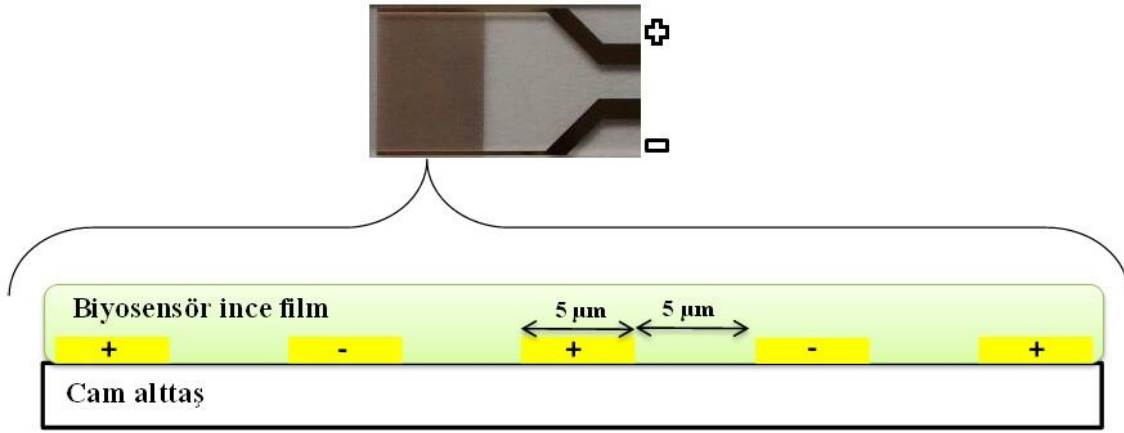
Bu yöntem yukarıdaki denklem yardımıyla kuartz kristal üzerine kaplanan ince filmin ağırlığını hesaplamakta kullanılabilir. Bunun yanı sıra ince film tabakalarının kalınlığı da aşağıdaki denklemde açıklanan kütle farkı yöntemi yardımıyla hesaplanabilir [16-18]:

$$d = \frac{\Delta m}{\rho \cdot A} \quad (2)$$

Burada Δm kaplanan ince film kütle değişimi, A kuartz kristal yüzey alanı ve ρ ince film maddesinin yoğunluğu.

Elektriksel Ölçümler

Elektriksel ölçümleri gerçekleştirmek için, alttaş olarak, cam üzerine kaplanmış birbiri içine geçmiş altın elektrot sisteminden oluşan interdigitated electrode (IDE) yapısı seçilmiştir. Bu elektrotlar ticari olarak Dropsens Company'den temin edilmiştir. Şekil 1'de şematik olarak gösterilen elektrot yapısında, her bir altın elektrotun ve aralarındaki boşluğun kalınlığı $5 \mu\text{m}$ ve elektrot sayısı 500'dür. Biyosensör filmin elektriksel iletkenlik özellikleri ± 4 volt arasında, akım-voltaj (I-V) değişimi kaydedilerek incelenmiştir. Ölçümler, oda sıcaklığında bilgisayar kontrollü Keithley 2400 Sourcemeter kullanarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1: Altın elektrot kaplı cam alttaşın şematik gösterimi

3. Bulgular

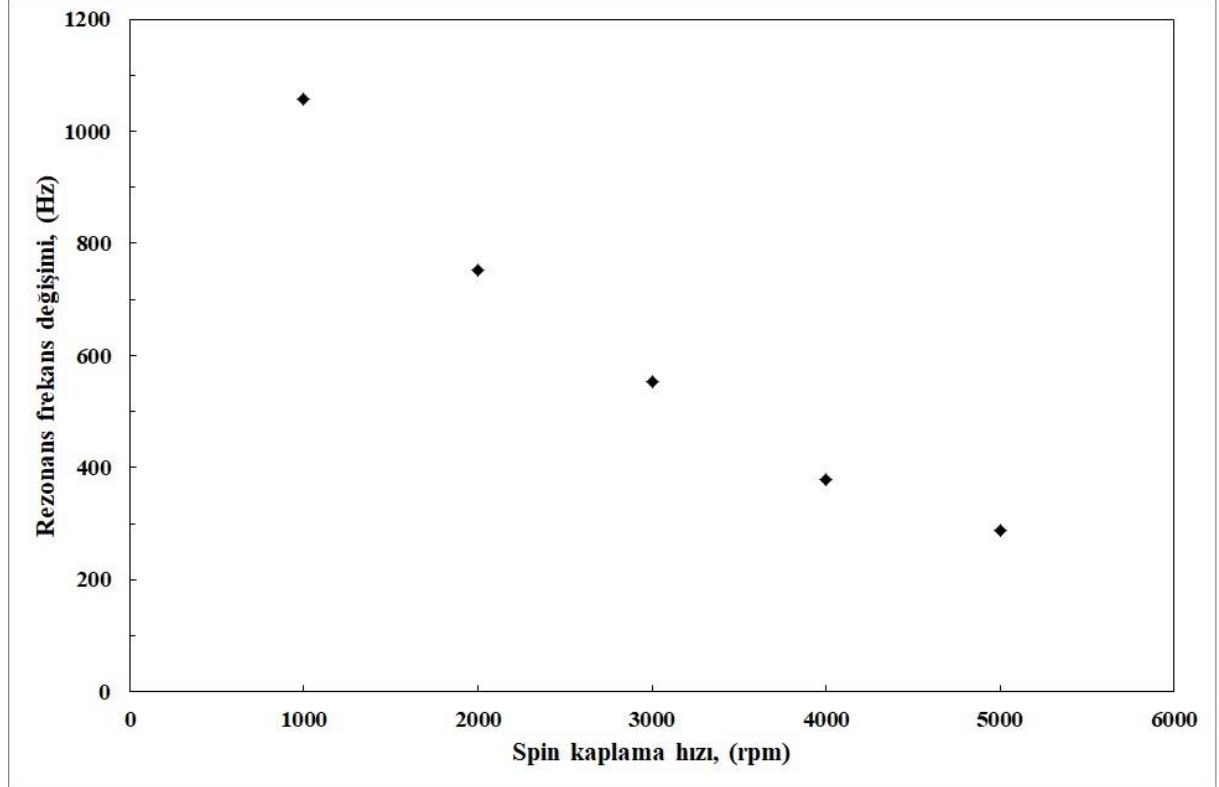
İnce Film Üretimi ve Karakterizasyonu

PPO enzim moleküllerinin katı yüzey üzerinde düzenli bir ince tabaka oluşturabilmesi amacıyla çitosan ve jelatinden oluşan biyo-kompozit malzeme alttaş üzerindeki ilk tabakayı oluşturmaktadır. Bu nedenle üretilen tüm PPO ince film katmanları bu biyo-kompozit tabaka üzerine transfer edilmiştir. 50 μl biyo-kompozit çözeltisi, hedeflenen hıza ulaşan alttaş üzerine mikro litrelik enjektör yardımıyla serpilerek çözeltinin katı yüzeye yayılması ve çözücünün buharlaşması sağlanmıştır. Transfer işlemi sonucunda biyo-kompozit kaplı alttaşın dış ortamdan izole bir şekilde kurumaması sağlanmıştır. Bu işlem, tüm alttaşlar üzerinde gerçekleştirilerek PPO enzim ince film transferi için hazır hale getirilmiştir.

Spin kaplama sisteminde dönme hızı üretilecek ince filmin homojenlik ve kalınlık gibi özellikleri başta olmak üzere film özellikleri üzerinde doğrudan etki etmektedir [19]. Bu nedenle PPO enzim filmi üretimi için beş farklı dönme hızı (1000, 2000, 3000, 4000 ve 5000 rpm) seçilerek film kalınlığı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Biyo-kompozit tabakasında olduğu gibi PPO ince filmde de hedeflenen hıza ulaşan alttaş üzerine 50 μl PPO çözeltisi serpilmiş ve yaklaşık 60 saniye devam eden dönme işlemi

sonucunda moleküllerin katı yüzey üzerine yayılması sağlanmıştır. Bu işlem tüm dönme hızları için ayrı ayrı tekrarlanmıştır.

İnce film üretim aşamalarının farklı metotlarla kontrolü amacıyla iki farklı alttaş seçilmiştir. 10 MHz kuartz kristal yüzey QCM sistemi kontrolü için, altın elektrot kaplı cam yüzey ise elektriksel ölçümlerde kullanılmıştır.



Şekil 2: PPO ince filmi spin kaplama hızına bağlı kuartz kristal mikrobalans rezonans frekans değişimi

Şekil 2'deki grafikte PPO moleküllerinin farklı dönme hızlarında kuartzın rezonans frekansında meydana getirdiği değişim verilmiştir. Grafikte artan dönme hızıyla frekans değişiminin azaldığı görülmektedir. Ayrıca Tablo 1'de, denklem 1 ve denklem 2 kullanılarak her bir dönüş hızına göre kaplanan PPO ince filmlerinin özellikleri listelenmektedir. Dönüş hızının artması sonucu rezonans frekansındaki kaymanın azaldığı ve dolayısıyla transfer olan kütle miktarının da azaldığı tablodan görülebilir. Bu beklenen bir sonuçtur ve literatürde dönüş hızının film özelliklerine etkileri gösterilmektedir [19]. Artan dönme hızı, PPO molekülleri üzerindeki kuvveti artırarak daha çok yayılmalarını ve daha ince bir katman oluşturmalarını sağlar. Yapılan hesaplar sonucu dönüş hızına bağlı kuartz üzerinde biriken kütle miktarı ve oluşan tabaka kalınlıkları da tabloda görülebilir. 1000 rpm dönüş hızıyla 38,80 nm PPO filmi oluşurken, 5000 rpm de bu kalınlık 10,52 nm ye kadar düşmüştür. Bu sonuçlar, PPO moleküllerinin katı yüzey üzerinde ince film olarak biriktirilebileceğini ve moleküler düzenlerinin de diğer organik ince film malzemeleri gibi kontrol edilebileceğini göstermiştir [20-22].

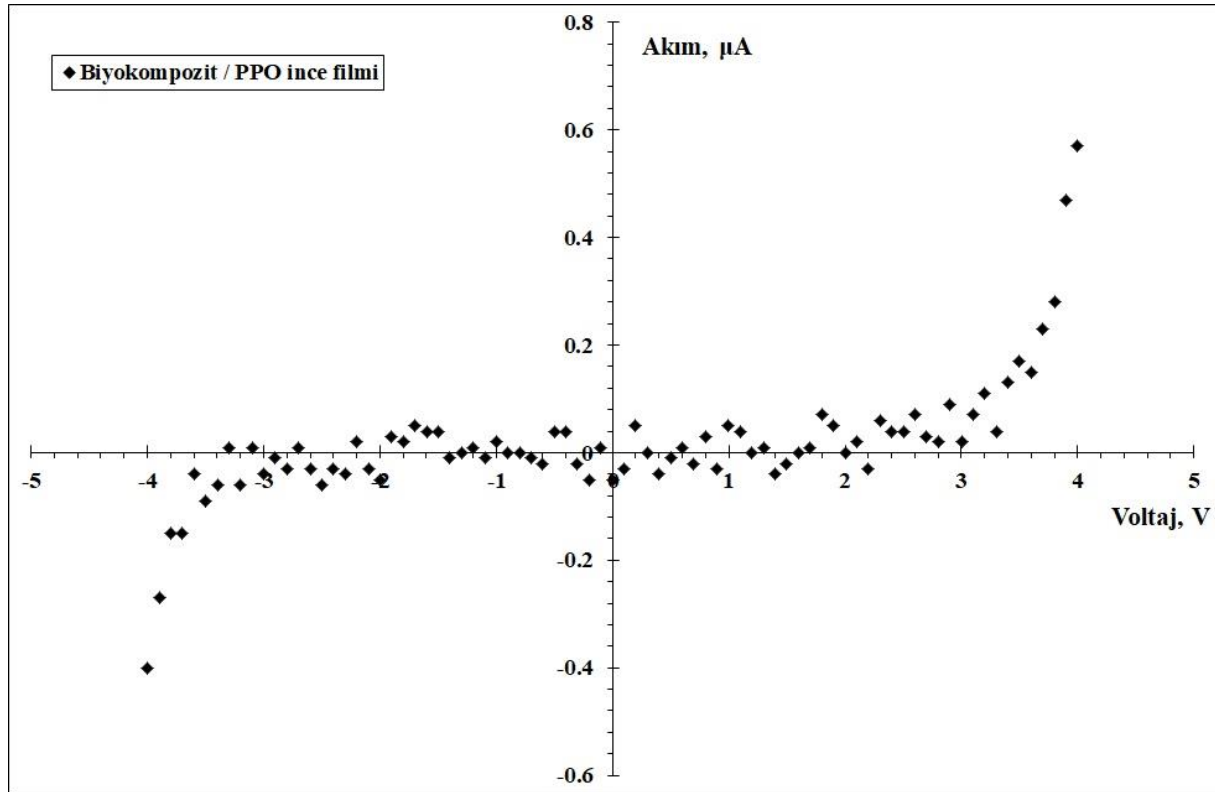
Tablo 1: Polifenol oksidaz enzimi spin kaplama hızına bağlı ince film özellikleri

PPO ince film	Spin kaplama dönüş hızı (rpm)				
	1000	2000	3000	4000	5000
Frekans değişimi (Δf, Hz)	1058,10	753,30	554,30	378,60	287,00
Transfer olan kütle (Δm, ng)	7078,00	5039,00	3708,00	2532,00	1920,00
Kalınlık (d, nm)	38,80	27,62	20,33	13,88	10,52

Sensör Ölçümleri

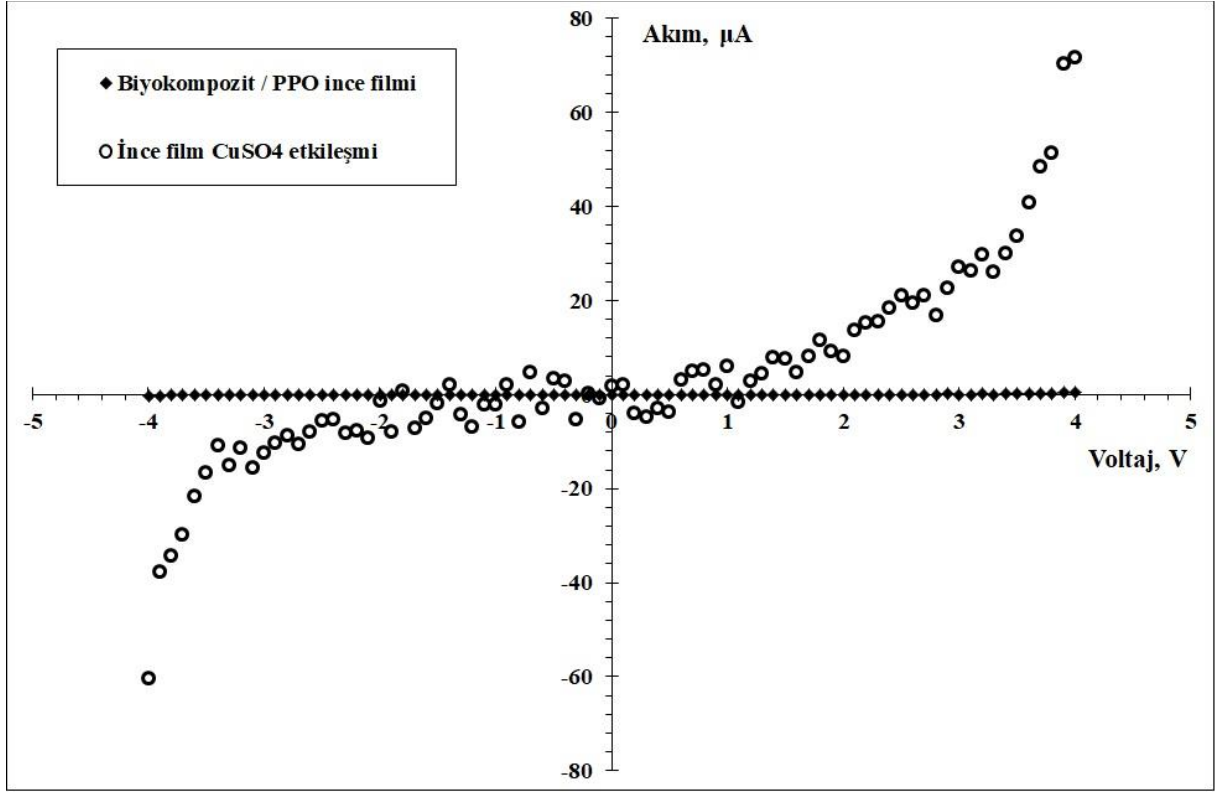
Polifenol oksidaz enzim ince filminin sensör olarak bakır sülfat tespitinde kullanılabilirliğini incelemek amacıyla hem elektriksel hem de QCM sisteminde sensör tepkileri kaydedilmiştir. Sensör olarak üretilecek filmler spin kaplama tekniğinde 3000 rpm hızında altın elektrotlu cam ve kuartz kristal üzerine üretilmiştir. Üretilen filmlerin şartları her iki altaş içinde aynı tutulmuştur.

Altın elektrotlu cam slaytlar üzerine kaplanan biyo-kompozit / PPO ince filmi, öncelikle referans olarak kaydedilmesi açısından $\pm 4V$ aralığında I-V ölçümü gerçekleştirilmiş ve eğri Şekil 3'de verilmiştir. Bu ölçüm enzim sensör ince filminin kontrol edilmesinin yanı sıra kirlenici ölçümleri için de referans niteliği taşımaktadır. Elde edilen eğri, karakteristik olarak daha önce yapılmış organik ince filmlerin I-V karakteristiği ile büyük benzerlik göstermektedir [23]. Ayrıca farklı enzimlerin ince film çalışmalarında elektriksel özellikleri incelenmiş ve akım-voltaj eğrilerinin Şekil 3'de verilen ile uyumlu olduğu görülmüştür [8].



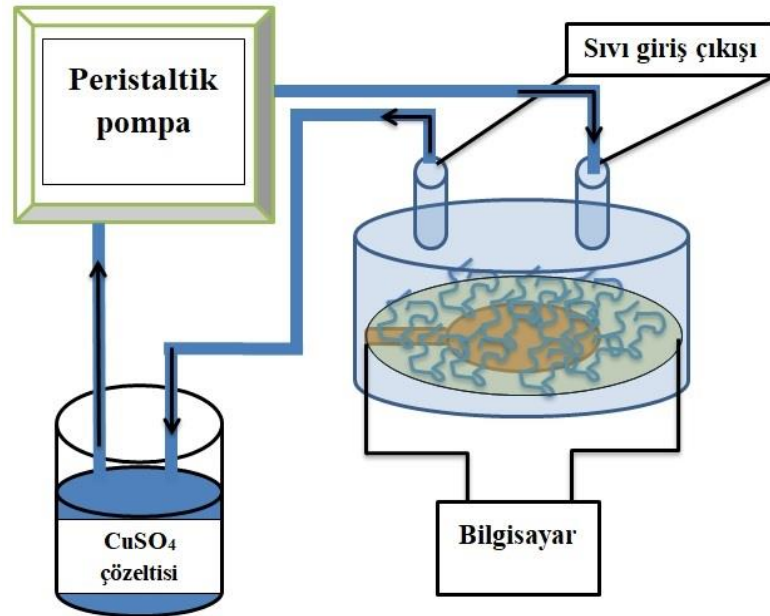
Şekil 3: Biyokompozit / PPO ince filmi akım-voltaj (I-V) grafiği

Enzim sensör ince filminin kirlenici olarak bakır sülfat tespitinde kullanılabilirliğini ölçmek amacıyla elektriksel ölçüm sisteminde $CuSO_4$ etkileşimi incelenmiştir. Saf su ile hazırlanmış 1×10^{-3} mol/L $CuSO_4$ çözeltisi elektriksel ölçüm sisteminde PPO enzim filmi üzerine damlatılmıştır. Bakır sülfat etkileşimi sonucu PPO ince filmin I-V eğrisindeki değişim Şekil 4'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde eğri karakteristiği olarak etkileşim öncesiyle benzerlik göstermektedir. Ancak akımdaki artış PPO ince filmi tarafından $CuSO_4$ 'ın tutulduğunu göstermektedir. Akımdaki bu artış, enzim molekülleri ile kirlenici arasındaki etkileşim sonucu ince filmde iyon artışına bağlanabilir. $CuSO_4$ 'ın PPO sensör filmin elektriksel özelliklerinde meydana getirdiği bu değişim enzim ince filmin bu kirleniciye gösterdiği sensör tepkisi olarak yorumlanabilir. Dolayısıyla PPO enzimi ile üretilen sensör sistemi elektriksel olarak bakır sülfata duyarlıdır denilebilmektedir.



Şekil 4: Enzim ince filmin CuSO₄ etkileşimi sonrası akım-voltaj (I-V) grafiği değişimi

QCM sistemi çok küçük kütle değişimlerine duyarlı bir sistem olmasından dolayı sensör ölçümlerinde sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Bu çalışmada da PPO sensör filminin CuSO₄ duyarlılığını ölçmek amacıyla kuartz kristal üzerine üretilen enzim filmi bu kirleticiye maruz bırakılarak değişimler kaydedilmiştir. Şekil 5'de sıvı çözelti ile QCM sisteminin çalışma mekanizması şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 5: Kuartz kristal mikrobals, sıvı çözelti ölçüm sistemi

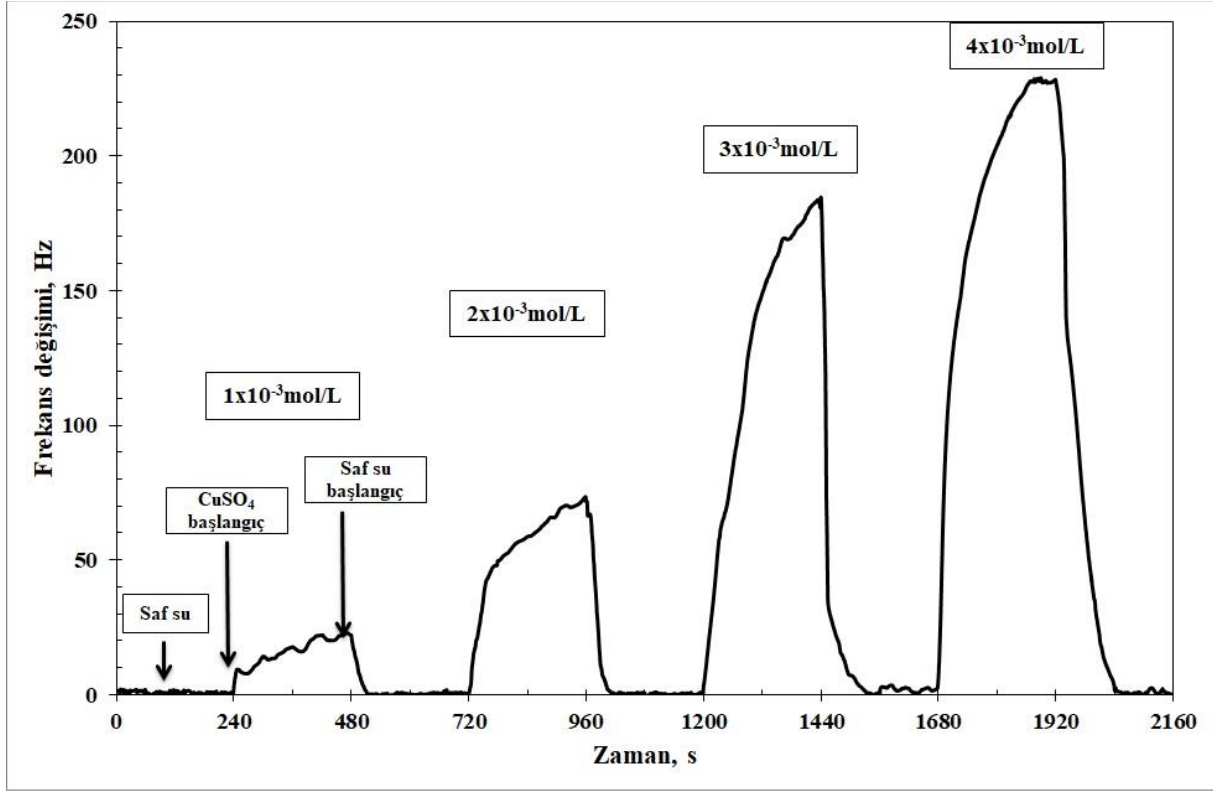
PPO ince film kaplı kuartz kristalin bulunduğu kapalı hücre içerisinde peristaltik pompa ile sırasıyla saf su ve CuSO_4 çözeltisi geçirilmektedir. Ölçüm süresince kuartzın rezonans frekansı zamana bağlı olarak kaydedilerek her türlü anlık değişim gözlem altında tutulur. Saf su ve CuSO_4 periyotları birbirini takip eden 4'er dakikalık çevrimler halinde uygulanmıştır.

Şekil 6'da PPO sensör filminin sıvı ortamda zamana bağlı CuSO_4 etkileşimi verilmiştir. İlk dört dakika saf su ortamında ölçüm başlatılmış ve dördüncü dakika sonunda 1×10^{-3} mol/L bakır sülfat çözeltisi kuartzın bulunduğu hücreye gönderilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi bakır sülfat çözeltisi PPO sensör filmi ile karşılaştığında frekansta dikkate değer bir değişim meydana getirmiştir. Frekanstaki bu değişim bakır sülfatın ortamda kaldığı dört dakika boyunca devam etmektedir. Bu durum PPO ince filmi tarafından, bu periyot süresince CuSO_4 'ün yakalanmaya devam ettiğini göstermektedir. PPO molekülleri tarafından oluşturulan ince film yapısı kuartzın yüzey alanına eşit bir yüzeye ve filmin kalınlığına bağlı belirli bir yüksekliğe sahiptir. İnce filmin üç boyutlu bu yapısı onu oluşturan PPO moleküllerinin arasında boşluklar kalmasına neden olur. Tespit edilmesi istenilen örnek kirletici ince film ile karşılaştığında öncelikle filmin yüzeyi ile etkileşime girer ve ince filmin aktif bölgeleri ile tutunur. Ortamdaki kirletici miktarı arttıkça bu moleküller ince filmin boşluklarından iç bölgelere nüfuz etmeye başlar. Böylece sensörün ürettiği tepki Şekil 6'da olduğu gibi artmaya devam etmektedir. Dört dakikalık kirletici periyodu sonucunda ortama tekrar saf su gönderilerek sensörün geri dönüşümlülüğü incelenmiştir. Ayrıca PPO enzim sensörün duyarlılığını incelemek amacıyla sonraki kirletici çevrimlerinde CuSO_4 konsantrasyonu artırılarak sensör tepkisindeki değişim gözlenmiştir. Şekil 6'daki grafikten de görüldüğü gibi, CuSO_4 konsantrasyonu arttıkça sensör tepkisi de artmaktadır. Konsantrasyona bağlı bu değişim, sensör sisteminin bakır sülfata karşı duyarlılığının yüksek olduğunu ifade eder ve maksimum tepki değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Konsantrasyon arttıkça sensör tepkisinin artması hala CuSO_4 ile etkileşime girebilecek aktif PPO bölgelerinin bulunduğunu göstermektedir. Bu bölgeler kirletici molekülleri tarafından dolduruldukça sensör doyum noktasına ulaşmaktadır. Grafikte görüldüğü gibi ilk üç konsantrasyon değeri için dört dakikalık periyot sonunda sensör doyum noktasına ulaşmamıştır. Ancak CuSO_4 konsantrasyonu 4×10^{-3} mol/L değerine ulaştığında sensör tepkisinin belirli bir seviyede sabitlendiği dikkat çekmektedir. Sabitlenme, yani doyuma ulaşma noktası ortama kirletici girdikten yaklaşık 200 s sonrasıdır. Bu noktada ulaşılabilir bütün aktif PPO noktaları kirletici molekülleri tarafından doldurulmuştur.

Sensör sistemlerinde dikkat edilmesi gereken önemli diğer bir nokta ise geri dönüşümdür. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlardaki her bir kirletici çevriminden sonra ortama geri dönüşüm kontrolü için dört dakikalık zaman dilimi için saf su gönderilmiştir. Grafikten de açıkça görülmektedir ki sensörü temizlemek için gerçekleştirilen her adımda sensör başlangıçtaki rezonans frekansına geri gelmiştir. Bu nedenle üretilen sensör tekrar kullanılabilirlik özelliğine sahiptir yeni bir ölçüm için hazırdır. Burada dikkat çeken, kirletici konsantrasyonu arttıkça geri dönüş süresinin de artmasıdır. Konsantrasyona bağlı geri dönüş süreleri Tablo 2'de verilmektedir. Bu beklenebilen bir sonuçtur, çünkü yüksek konsantrasyonlarda PPO ince filmi ile etkileşime giren kirletici molekül sayısı da artmaktadır. Dolayısıyla ince filmin iç bölgelerine kadar giren bu moleküllerin film yapısından uzaklaşma süresi molekül sayısı ile doğru orantılıdır.

Tablo 2: PPO filminin CuSO_4 konsantrasyonuna bağlı sensör tepki özellikleri

CuSO_4 konsantrasyonu	1×10^{-3} mol/L	2×10^{-3} mol/L	3×10^{-3} mol/L	4×10^{-3} mol/L
Maksimum tepki	22,9 Hz	73,5 Hz	184,6 Hz	228,4 Hz
Geri dönüşüm süresi	32 s	52 s	94 s	134 s



Şekil 6: PPO enzim ince filminin CuSO₄ sıvı çözelti etkileşimi sonrası kinetik kuartz kristal mikrobaleans sonuçları

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma kapsamında polifenol oksidaz enzimi ile ince film üretilmiş ve bu filmin kimyasal sensörlerde duyarlı tabaka olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Sensör ölçümlerinde kirletici olarak bakır sülfat (CuSO₄) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar öncelikle polifenol oksidaz enzimi ile başarılı bir şekilde ince film üretilbildiğini göstermiştir. Sensör ölçümleri için elektriksel ve kuartz kristal mikrobaleans olmak üzere iki farklı teknik kullanılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Yapılan elektriksel sensör ölçümleri sonucunda PPO ince filmin CuSO₄ etkileşimi sonrası iletkenlik değerinin arttığı görülmüştür. Bu, PPO ince filmi tarafından tutulan CuSO₄ ile ince film yapısı içindeki iyon sayısının artmasına bağlanmıştır. Diğer bir teknik olan QCM sistemiyle sıvı ortamında zamana bağlı olarak PPO ince filmi ile CuSO₄ arasındaki etkileşim takip edilmiştir. Farklı kirletici konsantrasyonlarında yapılan bu ölçüm sonucu, üretilen enzim ince filmin bakır sülfata karşı duyarlı olduğu ve sensör tepkisinde kirletici konsantrasyonu ile arttığı sonucuna varılmıştır. Bunun yanı sıra elde edilen tüm etkileşim sonuçlarının geri dönüşümlü olduğu ve sensörün tekrar kullanılabilirlik özelliğine sahip olduğu görülmüştür.

Teşekkür

Bu çalışmada kullanılan kimyasalların temin edilmesinde büyük katkıları bulunan Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Serap Beyaztaş Uzunoğlu ve altın kaplı elektrotların temin edilmesinde büyük katkıları sağlayan Fizik Bölümü'nden Tayfun Uzunoğlu'na teşekkür ederim.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Silva L. F., Mastelaro V. R., Catto A. C., Escanhoela C. A., Bernardini S., Zilio S. C., Longo E., Aguir K. 2015. Ozone and nitrogen dioxide gas sensor based on a nanostructured SrTi_{0.85}Fe_{0.15}O₃ thin film. *J. Alloys and Compounds*, 638, 374-379.
- [2] Zhai Z., Sun Y., Hao X., Li C. 2023. Capacitive Gas Sensors Based on a ZIF-67/PAN Nanofiber Membrane to Detect Volatile Organic Compounds. *Applied Surface Sci.*, 621, 156833
- [3] Kılınc N., Ozturk S., Atilla D., Gurek A., Ahsen V., Ozturk Z. Z., 2012. Electrical and NO₂ sensing properties of liquid crystalline phthalocyanine thin films. *Sensors and Actuators B*, 173, 203-210.
- [4] Banimuslem H., Hassan A., Basova T., Esenpınar A. A, Tuncel S., Durmus M., Gürek A. G., Ahsen V., 2015. Dye-modified carbon nanotubes for the optical detection of amines vapors. *Sensors Actuators B*, 207, 224-234.
- [5] Wang B., Zhang L., Li B., Li Y., Shi Y., Shi T., 2014. Synthesis, characterization, and oxygen sensing properties of functionalized mesoporous silica SBA-15 and MCM-41 with a Pt(II)-porphyrin complex. *Sensors Actuators B*, 190, 93-100.
- [6] Hyodo T., Ishibashi C., Matsuo K., Kaneyasu K., Yanagi H., Shimizu Y., 2012. CO and CO₂ sensing properties of electrochemical gas sensors using an anion-conducting polymer as an electrolyte. *Electrochimica Acta*, 82, 19-25.
- [7] Koshets I. A., Kazantseva Z. I., Shirshov Y. M., Cherenok S. A., Kalchenko V. I., 2005. Calixarene films as sensitive coatings for QCM-based gas sensors. *Sensors Actuators B*, 106, 177-181.
- [8] Uzunoglu T., Evyapan M., Beyaztas S., Yildirim G., Kuskü T., 2020. Immobilization xanthine oxidase on interdigitated electrode for biosensor investigation. *Fresenius Environmental Buletin*, 29(8), 7122-7129.
- [9] Rai U. N., Tripathi R. D., Vajpayee P. 2002. Bioacumulation of toxic metals (Cr, Cd, Pb and Cu) by seeds of euryale ferox salisb. (makhana). *Chemosphere*, 46, 267- 272.
- [10] Gu Y. G., Ning J. J., Ke C. L., Huang H. H., 2018. Bioaccessibility and human health implications of heavy metals in different trophic level marine organisms: A case study of the South China Sea. *Ecotoxicol Environ Saf*, 163, 551-557.
- [11] Pandey N., Sharma C. P., 2002 Effect of Heavy metals Co⁺², Ni⁺² and Cd⁺² on growth and metabolism of cabbage. *Plant Sci*, 163, 753-758.
- [12] Dinçer A., Becerik S., Aydemir T. 2012. Immobilization of tyrosinase on chitosan-clay composite beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 815-820.
- [13] Agarwal P., Dubey S., Singh M., Singh R. P. 2016. *Aspergillus niger* PA2 tyrosinase covalently immobilized on a novel eco-friendly bio-composite of chitosan-gelatin and its evaluation for L-Dopal. *Frontiers in Microbiology*, 7, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02088>.
- [14] Uzunoğlu S. B., Uzunoğlu T., Koçsuz S., Evyapan M., Arslan O. 2021. Metal ion effects Polyphenol Oxidase Covalently immobilized on a Bio-Composite. *Cellular and Molecular Biology*, 67, 50-55.
- [15] Sauerbrey G. 1959. The use of quartz oscillators for weighting thin layers and for microweighting, *Z. Phys.*, 155, 206.
- [16] Jundale D., Pawar S., Chougule M., Godse P., Patil S., Raut B., Sen S., Patil V. 2011. Nanocrystalline CuO thin films for H₂S monitoring: microstructural and optoelectronic characterization. *Journal of Sensor Technology*, 1, 36-46.
- [17] Mecea V. M. 2005. From quartz crystal microbalance to fundamental principles of mass measurements. *Analytical Letters*, 38, 753-767.
- [18] Koli P. B, Kapadnis K. H, Deshpande U. G, Tupe U. J, Shinde S. G, Ingale R. S. 2021. Fabrication of thin film sensors by spin coating using sol-gel LaCrO₃ Perovskite material modified with transition metals for sensing environmental pollutants, greenhouse gases and relative humidity. *Environmental Challenges*, 3, 100043.

- [19] Tyona M. D., 2013. A theoretical study on spin coating technique. *Advances in Materials Research*, 2(4), 195-208.
- [20] Pattananuwat P., Tagaya M., Kobayashi T. 2015. A novel highly sensitive humidity sensor based on poly(pyrrole-co-formyl pyrrole) copolymer film: AC and DC impedance analysis. *Sensors and Actuators B*, 209, 186-193.
- [21] Zhang F., Di C., Berdunov N., Hu Y., Hu Y., Gao X., Meng Q., Siringhaus H., Zhu D. 2013. Ultrathin Film Organic Transistors: Precise Control of Semiconductor Thickness via Spin-Coating. *Advanced Materials*, 25, 1401-1407.
- [22] Evyapan M., Hanoosh W. S., Hassan A. K. 2017. Determination of Volatile Organic Compounds by a Novel Polymer Spin-Coated Thin Film and Surface Plasmon Resonance. *Analytical Letters*, 50(16), 2579-2594.
- [23] Moiz S.A., Ahmed M. M., Karimov K. S., Mehmood M. 2007. Temperature-dependent current–voltage characteristics of poly-N-epoxypropylcarbazole complex. *Thin Solid Films*, 516, 72-77.