



Preparation of Glucose Sensor Based on Keggin Type Polyoxometalate/Conducting Polymer Composite for Use in Food Industry[#]

Yasemin Torlak^{1,a,*}, Rukiye Ayranci^{2,b}, Metin Ak^{2,c}

¹Çal Vocational High School, Pamukkale University, 20700 Denizli, Turkey

²Chemistry Department, Faculty of Art and Science, Pamukkale University, 20070 Denizli, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>[#]This study was presented as an oral presentation at the 4th International Anatolian Agriculture, Food, Environment and Biology Congress (Afyonkarahisar, TARGID 2019)</p> <p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 17/05/2019 Accepted : 11/07/2019</p> <p>Keywords: Food Glucose sensor Glucose Oxidase (GOD) Polyoxometalate (POM) Electropolymerization</p>	<p>In continuous monitoring and control systems as required by automation, biosensors are greatly advantageous with their precision, stability, ease of use and response rates. In this study, a new amperometric glucose sensor has been fabricated based on a composite film prepared by electrochemical polymerization of carbazole derivative with having free amino group in presence of the Keggin type polyoxometalate (POM) anion, $(n\text{Bu}_4\text{N})_3[\text{PW}_9\text{O}_{34}(\text{tBuSiOH})_3]$, in order to meet the needs of the sector. The enzymatic biosensor was prepared by immobilizing the Glucose Oxidase (GO_x) enzyme to the surface modified with the POM/PAAC composite. Biosensor preparation and working conditions were optimized and analytical characterizations was carried out. The amperometric response of the POM/PAAC-GO_x modified electrode versus varying concentrations of glucose was studied at a potential value of -0.7 V (Ag/AgCl). When the data obtained from these surfaces can be prepared in a short time, it was determined that they are sensitive to the presence of glucose in food samples such as cola and fruit juice. One of the innovations of this study is the shortening of the response time and the easy preparation of the biosensor. In addition to high linearity, short response time and long shelf life advantages in determining the glucose content in foods, it is thought that it will be an economical alternative with its easy preparation, ease of application and time and chemicals gain in measurements.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(sp1): 20-26, 2019

Gıda Endüstrisinde Kullanılmak Üzere Keggin Tipi Polioksometalat/İletken Polimer Kompozitine Dayalı Glukoz Sensörü Hazırlanması[#]

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 17/05/2019 Kabul : 11/07/2019</p> <p>Anahtar Kelimeler: Gıda Glukoz sensörü Glukoz Oksidaz (GOD) Polioksometalat (POM) Elektropolimerizasyon</p>	<p>Otomasyonun gerektirdiği sürekli izleme ve kontrol sistemlerinde biyosensörler hassasiyetleri, kararlılıkları, kullanım kolaylıkları ve cevap hızları ile büyük ölçüde avantaj sağlamaktadır. Bu çalışmada, sektörün ihtiyaçlarını karşılamak üzere Keggin tip Polioksometalat (POM), $(n\text{Bu}_4\text{N})_3[\text{PW}_9\text{O}_{34}(\text{tBuSiOH})_3]$, varlığında amino grubuna sahip karbazol türevinin (3-amino-9-etilkarbazol (AAC)) elektrokimyasal polimerizasyonu tarafından hazırlanan kompozit filme dayalı yeni amperometrik glukoz sensörü geliştirilmiştir. POM/PAAC kompozit ile modifiye edilen yüzeye Glukoz Oksidaz (GO_x) enzimi immobilize edilerek enzimatik biyosensör hazırlanmıştır. Biyosensörün hazırlama ve çalışma koşulları optimize edilerek analitik karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. POM/PAAC-GO_x modifiyeli yüzeylerin farklı derişimlerdeki glukoz miktarına karşı -0.7 V(Ag/AgCl) potansiyelde elektrokimyasal yanıtları incelenmiştir. Kısa zamanda hazırlanabilen bu yüzeylerden elde edilen veriler incelendiğinde kola ve meyve suyu gibi gıda örneklerindeki glukoz varlığına karşı hassas olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın literatüre ve endüstriye kattığı yenilik hem düşürülen cevap süresi hem de biyosensörün hazırlanması için geliştirilen yöntemdir. Gıdalardaki glukoz içeriğinin belirlenmesinde yüksek doğrusalılık, kısa cevap süresi ve uzun raf ömrü avantajlarının yanı sıra kolay hazırlanabilirliği, uygulamada kolaylık sunması, ölçümlerde zaman ve kimyasallardan kazanım sağlanmasıyla ekonomik bir alternatif olacağı düşünülmektedir.</p>

^a ytopal@pau.edu.tr
^c metinak@pau.edu.tr

^{id} <https://orcid.org/0000-0001-5964-2532>
^{id} <https://orcid.org/0000-0002-0000-4613>

^b rayranci@pau.edu.tr ^{id} <https://orcid.org/0000-0001-8444-2743>



Giriş

Gıda alanı biyosensör teknolojisinin önemli uygulama sahalarından biridir. Önceleri temin edilen gıdaların açlık giderme niteliği yeterli olurken bilim ve teknoloji alanındaki gelişmeler özellikle gelişmiş ülkelerde dengeli ve sağlıklı beslenmeyi ön plana çıkarmıştır. Bu nedenle gıdaların bileşimi, içerdikleri beslenme için öğelerin düzeyleri, tazelik durumları ya da çoğu çevresel etkenler veya kontaminasyondan kaynaklanan toksik niteliklerinin belirlenmesi daha bir önem kazanmıştır. Sözü edilen konularda bilgi sahibi olma ihtiyacı pratik, seri, ekonomik ve duyarlı analizleri gerekli kılmıştır (Adley, 2014; Bruen, 2017). Gıda analizlerinde bahsedilen tüm aşamalarda tayinlerde en büyük ortak problem gıda maddelerinin kimyasal olarak birbirinden oldukça farklı ve benzer çok sayıda bileşiği içeren kompleks karışımlar olmalarıdır. Bu durum, klasik kimyasal yöntemler için girişimlere açık olmaları nedeniyle önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır. Gıda alanında biyosensörler, gıda bileşenlerinin kalite kontrolleri ve gıda güvenliği için mikrobiyal ve kimyasal içeriklerin tespiti gibi birçok uygulama alanı bulmuştur. Buna bağlı olarak biyosensör teknolojisinde ve biyokimyasal bilimlerdeki gelişmeler paralelinde gıda analizlerinde de bilinen avantajlarından dolayı biyosensörlerden yararlanma yönündeki çalışmalara yönelinmiştir (Cappitelli ve Polo, 2014; Fan ve ark., 2008). Biyosensörlerin önemli uygulaması, öncelikle klinik teşhisler üzerine gerçekleşmiştir. Glukoz sensörleri, günümüzde bile en başarılı ve en geniş kapsamlı olanlarıdır (Mehrotra, 2016; Thakur ve Ragavan, 2013). Gıdalardaki temel beslenme bileşenlerinden önemli bir kısmını şekerler oluşturmaktadır. Şekerlerin meyve ve bazı sebzelerde, süt ve bal gibi ürünlerde, kola ve şarap, meyve suları ve çeşitli alkolsüz içeceklerde, bazı üretim ve fermantasyon proseslerinde tayinleri önem taşır (Faridbod ve ark., 2008). Bu işlemlerin duyarlı, spesifik, pratik ve ekonomik bir şekilde ve kısa sürede yapılması için çeşitli biyosensörler geliştirilmiştir. Gıdalardaki şekerlerin belirlenmesine yönelik biyosensörlerin büyük bir çoğunluğunu hidrojen peroksit veya oksijene duyarlı amperometrik sensörleri esas alan enzim elektrodları oluşturmaktadır. Tayin edilecek şekere ve ölçüm sistemine bağlı olarak biyoaktif tabakasında bir veya daha fazla enzimin immobilize edildiği biyosensörler kullanılabilir. Bunlara örnek olarak, amperometrik biyosensörlerde glukoz oksidaz immobilizasyonu glukoz tayinleri verilebilir (Faridbod ve ark., 2008; Keow ve ark., 2007). Son zamanlarda elektrokimyasal olarak sentezlenen iletken polimerler, hem biyosensörlerin hızını, duyarlılığını ve seçiciliğini geliştirdikleri hem de enzimlerin immobilizasyonu için uygun matriks ortamı oldukları için umut verici bir malzeme olarak dikkat çekmektedir (Chen ve Barteau, 2016; Jiang ve ark., 2008; Soganci, ve ark., 2018). Özellikle glukoz (Han ve ark., 2005; Sahraoui ve ark., 2013; Yang ve ark., 2016), kolesterol (Sahraoui 2015), etanol (Kecec, 2014; Soylemez ve ark., 2015) gibi bazı analitlerin belirlenmesi için amperometrik sensör uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Glukoz miktarının belirlenmesi için fonksiyonel amin grupları içeren elektroaktif monomerler (Ayranci ve ark., 2015a; Guler ve ark., 2014; Kecec, 2014) grafit elektrodu yüzeyi üzerinde polimerleştirilmektedir. Özellikle karbazol temelli iletken

polimerler, yüksek elektron mobilitesi, fotokimyasal ve termal kararlılık gibi özellikleri sayesinde sensör uygulamaları için birçok avantajlara sahiptir (Ayranci ve ark., 2015; Kanik, Rende ve ark., 2012). Bu polimerlere çoklu fonksiyonellik özelliği hibrit malzemeler ve kompozit kimyasındaki gelişmeler ile kazandırılabilir. Bu türlerden en çok tercih edilen, bir metal oksit ana merkez ve farklı anyonik ligantların düzenli olarak bağlanması ile oluşmuş polioksometalatlardır (POM) (Song, 2013). Üstün fiziksel ve kimyasal özellikleri sayesinde yeni malzeme üretimi gibi önemli alanlarda yüksek bir uygulama potansiyeline sahiptir. Kompozit oluşturmada en çok tercih edilen iletken polimerler redoks aktif Keggin tip POM gibi anyonik türlerle doplanabilen polikarbazol, polianilin ve polipirolerdir. Aynı zamanda politiyofen ve poli(3-metiltiyofen) fosfometalat ve silikometalatların dahil olduğu heteropolianyonlar için seçici grup olarak görev yapmaktadır. Elektrot modifikasyonu üzerine rapor edilen çalışmaların çoğu Keggin ve Dawson tipi POM bileşiklerini kapsamaktadır. Geçiş metal substitüveli POM'lar homojen çözelti ortamında kataliz olarak polimer modifiyeli elektrotlara aktif bölge olarak dahil edilmektedir. Böylece metal substitüveli silikotungstat bileşiği tarafından elektrot modifikasyonun potansiyelinin araştırılması elektrokimyasal ve malzeme kimyası alanında önemli rol oynamaktadır (Ates ve Sarac, 2009; Ayranci ve ark., 2017).

Bu çalışmada, metal/organik kompozit film, gıda endüstrisinde kullanılmak üzere sensör uygulamaları için Keggin tip POM'un varlığında fonksiyonel amin grubu içeren karbazol türevinin elektrokimyasal polimerizasyonu tarafından hazırlanmıştır. Kompozit elektrodu oluşturmak için iletken polimer yapısının içerisine POM tuzaklanmıştır. Metal/organik kompozit film yapısı, anyonik POM kümeleri ve elektropolimerizasyonu ile sentezlenen katyonik polikarbazol zincirleri arasındaki elektrostatik etkileşim tarafından grafit elektrot üzerinde oluşturulmuştur. GO_x enziminin amin grupları aracılığıyla immobilizasyonundan sonra metal/organik hibrit yapısı glukoz oksidasyonu için üstün elektrokatalitik aktivite göstermiştir. Sonuç olarak, POM/PAAC kompoziti gıda endüstrisinde kullanılmak üzere gelecek sensör uygulamaları için alternatif olabileceği düşünülmektedir.

Materyal ve Yöntem

Kimyasal Maddeler

Keggin tipi POM (nBu₄N)₃[PW₉O₃₄(tBuSiOH)₃] literatürde belirtildiği gibi sentezlenmiştir (Tountas ve ark., 2016). Elektrokimya için çözücü olarak asetonitril (ACN) (Merck), destek elektrolit olarak lityum perklorat (LiClO₄) Merck firmasından temin edilmiştir. AAC (3-Amino-9-etikkarbazol) monomeri ve Fe(CN)₆^{3-/4-} Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Fosfat tampon çözeltisi (50 mM, pH:6), 0,1 M sodium dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄) (Fluka Buchs) ile birlikte pH HCl(Carlo Erba) ile ayarlanarak hazırlanmıştır. Biyosensör kısmında enzimlerin kendi aralarında kovalent bağlanması için çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan glutaraldehit (GA), (%25), D-Glukoz, Glukoz oksidaz (GO_x) (Aspergillus niger, 200 U/mg) Sigma (St. Louis, MO, ABD) firmasından temin edilmiştir.

Kullanılan Alet ve Cihazlar

İletken polimerin sentezinde ve biyosensör özelliklerinin incelenmesinde elektropolimerizasyon düzeneği kullanılmıştır. Düzenek elektrokimyasal Potansiyostat-Galvanostat cihazına (Iviumstat, Hollanda) bağlı hücre ve üçlü elektrot sisteminden oluşur. Deneylede elektrolitik bir hücre içinde çalışma elektrodu grafit elektrot, referans elektrodu olarak gümüş tel (Ag) ve karşıt elektrot olarak da platin tel (Pt) kullanılmıştır. POM, monomer ve polimer karakterizasyonları FT-IR (Perkin Elmer-2000 Attenuated Total Reflection (ATR)) ile yapılmıştır. Yüzey karakterizasyonları Zeiss EVO Ls10 marka SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

POM/PAAC Modifiye Elektrotların Hazırlanması

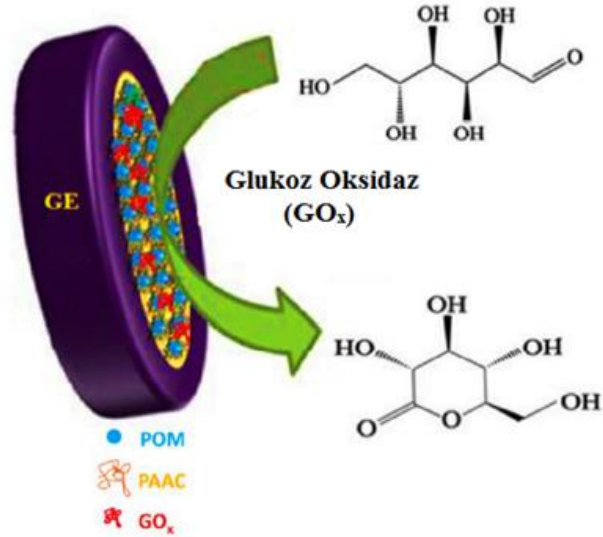
POM/PAAC modifiye elektrotların hazırlanmasında aşağıdaki prosedür izlenmiştir. Öncelikle grafit elektrot yüzeyi iki farklı yapıdaki zımpara kağıdı ile pürüzsüzleştirilmiş ve parlatılmıştır. 0,1 M LiClO₄ varlığında, çözücü olarak ACN içeren çalışma hücresi içerisine stok çözeltileri 5 mM elektroaktif monomer (AAC) ile 0.025 mM POM çözeltilerinden değişen oranlarda alınıp POM:AAC (v/v) 0:2, 0,1:1,9, 0,3:1,7, 0,5:1,5, 1:1, 1,5:0,5, 1:1 karıştırılarak grafit elektrot üzerinde elektropolimerizasyon yöntemi ile POM/PAAC kompozit malzemesi elde edilmiştir. Daha sonra 0.1 M LiClO₄, 5 mM AAC ve 0,025 mM POM ACN çözeltisi içinde hazırlandıktan sonra döngüsel voltametrik yöntemle -1,0 V ile +1,5 V arasında 150 mV/s tarama hızında 6 döngü ile elektropolimerizasyon işlemi uygulanarak elektrot yüzeyi POM/PAAC kompoziti ile modifiye edilmiştir (Ayrancı ve ark., 2015b; Han ve ark., 2005). Elektropolimerizasyondan sonra film, reaksiyona girmemiş monomer ve kullanılan destek elektrolitlerin fazlasından kurtulmak için ACN ile yıkanmıştır.

Glukoz Sensör Platformunun Hazırlanması

Glukoz Oksidaz (GOx) enzimiyle biyosensör hazırlanmasında aşağıdaki prosedür izlenmiştir. POM ve AAC monomer karışımından hazırlanan çözelti karşıt elektrot olarak Pt telin, referans elektrot olarak gümüş telin kullanıldığı hücre içine alınmış, polimerizasyon karanlık ortamda -1,0 V 1,5 V aralığında 100 mV/s tarama hızıyla grafit elektrot üzerinde 10 döngü döngüsel voltametri ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan modifiye elektrot reaksiyona girmemiş enzimleri uzaklaştırmak için su ile yıkanmıştır. 10 µl enzim çözeltisi 10 µl glüteraldehit çözeltisiyle karıştırılıp (20 µl) kompozit ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Immobilizasyon sırasında enzim glüteraldehit çözeltisini köpürtmemeye ve yüzeyin tamamını kaplamaya özen gösterilmiştir. Hazırlanan modifiye elektrotlar karanlık ortamda kurutulmuştur (Şekil 1).

Bu çalışma için; elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak polimerleşebilen karbazol monomeri, polimer yüzeyine enzimin glüteraldehit yardımıyla çapraz bağlanabilmesi için (-NH₂) gibi fonksiyonel grup içermesi, farklı pH'daki tampon çözeltiler içinde yürütülen deney koşullarına uyum sağlayabilecek yüksek film kalitesine sahip kompozit filminin oluşması gibi sensör platformu oluşturabilmek için gereken özelliklere sahiptir. Bu

kapsamda yapısında (-NH₂) grubu içeren AAC monomeri, grafit elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak polimerleştirilmiştir. (P(AAC)). Polimerin ve POM ile oluşturduğu kompozit film kalitesinin çalışmalar için yeterli olduğu gözlemlendikten sonra enzim immobilizasyonu fonksiyonel amin grubu üzerinden çapraz bağlanma ile gerçekleştirilmiştir. Şema 1'de oluşturulan platformun yapısı gösterilmektedir. Sensör çalışmalarına başlamadan önce hem polimer ve kompozitin hem de enzim immobilize edilmiş sensör platformunun karakterizasyonları yapılmıştır.



Şekil 1 POM/PAAC kompozit filminden oluşan glukoz sensörü için oluşturulan platformun şematik gösterimi
Figure 1 Schematic representation of the glucose sensor platform consisting of POM/PAAC composite film

Elektrokimyasal Ölçümler

POM/PAAC-GOx modifiyeli grafit elektrodun elektrokimyasal karakterizasyonu ve kronoamperometrik ölçümleri 10 mL fosfat tamponu (50 mM, pH:6) içerisinde elektrokimyasal hücrede döngüsel voltametrik yöntemle yapılmıştır. Glukoz oksidaz temelli biyosensörlerle yapılan çalışmalarda ölçüm yapılmadan önce POM/PAAC-GOx modifiyeli grafit elektrot reaksiyon hücresine alınarak ve oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bekletilmiştir. Glukoz tayini, enzimatik olarak oluşan hidrojen peroksitin (H₂O₂) -0,7 V'da Ag/AgCl'e karşı oksijene (O₂) yükseltgenmesine dayanılarak yapılmıştır. -0,7 V'da izlenen çalışmada substrat ilavesi öncesinde sistemin dengeye gelmesiyle belirlenen akım değeri kaydedilmiş ve ardından substrat ilavesi yapılmıştır. Oluşan enzimatik reaksiyon 120 saniyede tamamlanmış ve yeni bir denge durumuna ulaşılmıştır. Bu durumda da bir akım değeri okunarak kaydedilmiştir. Çalışmalarda, her iki denge durumunda okunan akım değerinin farkı alınmıştır. Söz konusu farklanma, substrat konsantrasyonuyla orantılıdır ve µA/cm² olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda öncelikle glukoz konsantrasyonu ile akım miktarındaki farklanmalar arasında grafikler çizilmiş ve çeşitli parametrelerin sensör cevabına etkileri belirlenmiştir.

Örnek Uygulama

Hazırlanan biyosensörün uygulanabilirliğini test etmek amacıyla ticari olarak satılan kola ve meyve suyundaki glukoz miktarları belirlenmiştir. Bu biyosensörler ile ticari örneklerde glukoz analizine yönelik uygulanabilirliğini izlemek amacıyla kola ve meyve suyu örnekleri kullanılmıştır. Reaksiyon ortamına glukoz yerine içecekler seyreltme yapılmadan eklenmiş ve ilgili standart grafiğinden örneklerdeki glukoz miktarı hesaplanmıştır. Referans yöntemi olarak kullanılan spektrofotometrik yöntem; ultraviyole ve görünür bölgeye dayanan absorpsiyon ölçümlerinin görünür bölgede okuma yapan UV spektrofotometreler ile gerçekleştirilmesi prensibine dayanmaktadır. Bu spektrofotometrik yöntem ile örneklerdeki glukoz miktarı belirlendikten sonra sonuçlar birbiri ile kıyaslanmıştır.

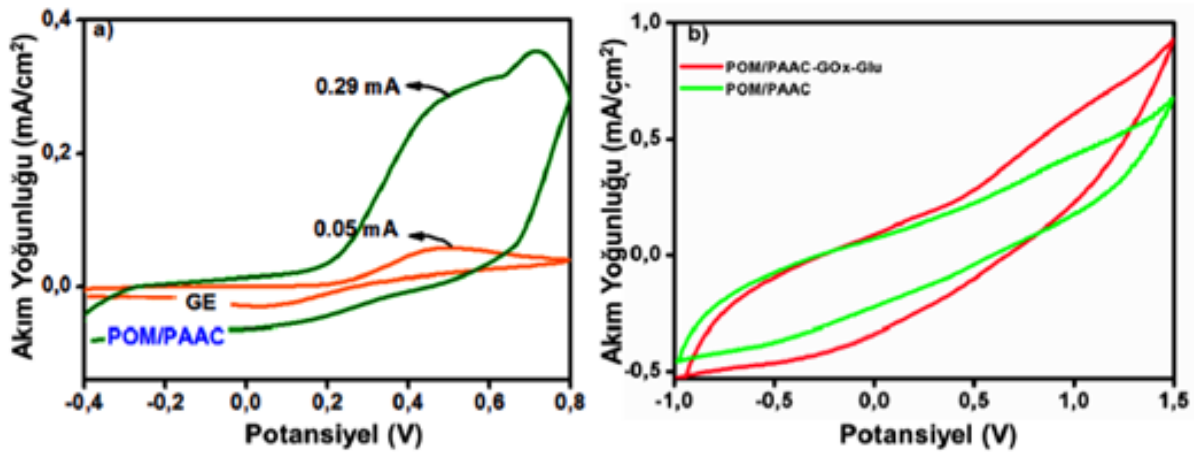
Bulgular ve Tartışma

POM/PAAC ve POM/PAAC-GOx Sensör Platformunun Karakterizasyonu

PAAC, POM ve POM/PAAC kompozitinin yapıları FT-IR analizi ile doğrulanmıştır. PAAC FT-IR spektrumunda 3500 cm^{-1} 'de ArN-H titreşim bandı ve 1623 cm^{-1} 'de C=C bandı gözlemlenmiştir. 1035 cm^{-1} 'deki bant elektropolimerizasyon sırasında dopant iyonların (LiClO_4)

dahil olduğunu gösterir. Keggin tipi POM anyonu ($n\text{Bu}_4\text{N}$) $_3$ [$\text{PW}_9\text{O}_{34}(\text{tBuSiOH})_3$], 2963 ve 1090 cm^{-1} 'deki bantlar sırayla C-C ve P-O titreşimine, $1003,969$ ve 940 cm^{-1} 'deki bantlar ise W=O titreşimine atfedilmektedir. Bunun yanısıra $864, 835, 727\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen bantlar W-O-W titreşiminden dolayıdır. Kompozit film, onun bileşenleriyle kıyaslandığı zaman başarılı bir şekilde sentezlendiğini doğrulamaktadır (Ayrancı ve ark., 2019; Ayrancı ve ark., 2018; Song, 2013).

Kompozitin elektrokimyasal karakterizasyonu için öncelikle ayrı ayrı döngüsel voltametri grafikleri (CV) incelenmiştir. Karşıt elektrot olarak Pt telin, referans elektrot olarak gümüş telin kullanıldığı hücrede $0,1\text{ M LiClO}_4/\text{ACN}$ çözeltisi içinde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ kullanılarak polimerleştirme yapılmıştır. $-1,0\text{ V}/1,5\text{ V}$ aralığında 100 mV/s tarama hızıyla CV grafiği alınmıştır (Şekil 2). Şekil 2a'da görüldüğü gibi, boş grafitin akım değeri $0,05\text{ mA}$ 'de gözlenirken, POM/PAAC kompozitinin akım değeri $0,29\text{ mA}$ 'de olduğu belirlenmiştir. Bu artış, POM'un elektroaktivitesinin yanısıra elektroaktif merkeze sahip iletken polimer ile elektrodun kaplanmasından dolayıdır. CV grafikleri incelendiğinde, redoks potansiyellerinin sayısal değerinin birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir. Bu sayede kompozitin oluştuğu CV tekniği ile kanıtlanmıştır (Ayrancı ve ark., 2019; Sahraoui ve ark., 2013).



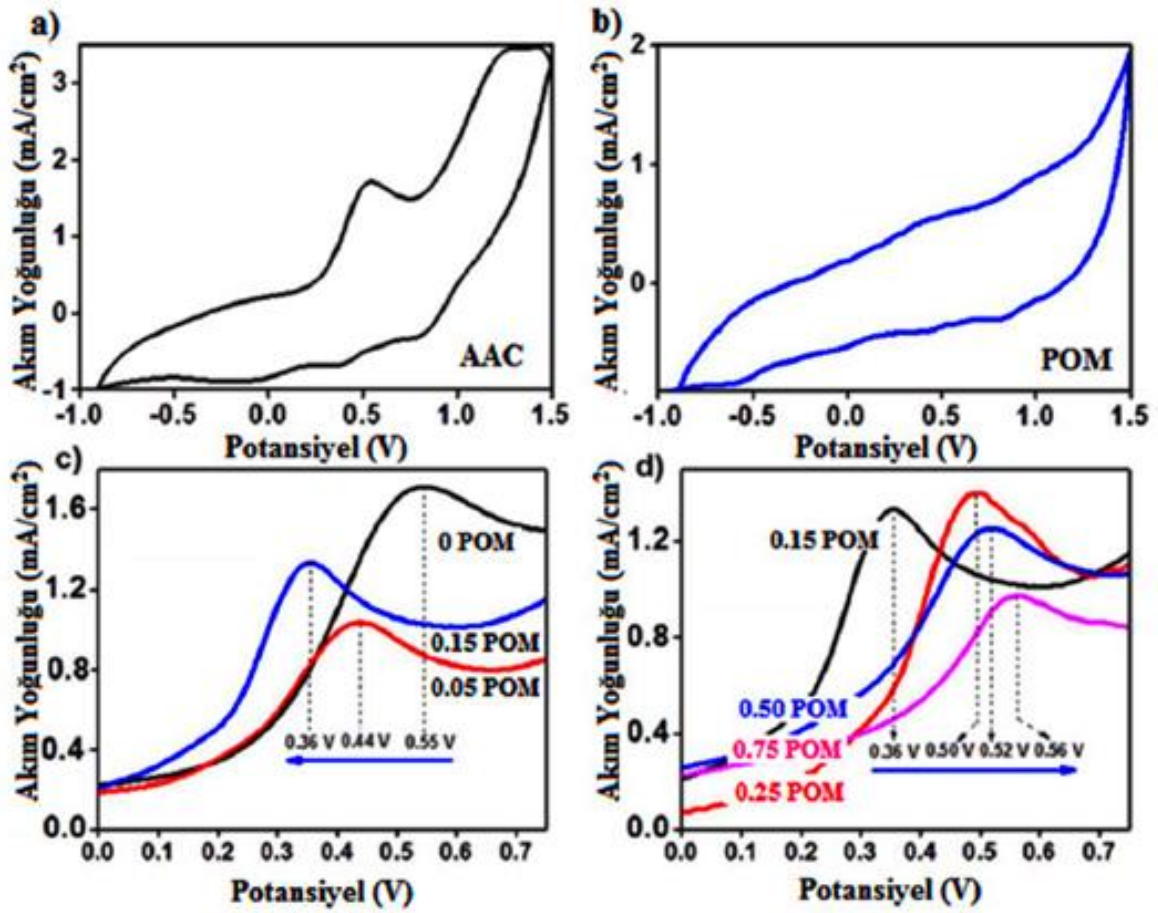
Şekil 2 a) Boş grafit elektrot ve POM/PAAC kaplı grafit elektrodun döngüsel voltamogramlarının karşılaştırılması b) POM/PAAC/GOx/Glukoz (glukoz varlığında) ve POM/PAAC döngüsel voltamogramlarının karşılaştırılması
Figure 2 a) CVs of bare electrode and POM/PAAC coated electrode b) amperometric response of POM/PAAC and POM/PAAC-GOx electrodes (in the presence of the glucose)

Döngüsel voltamogram eğrilerinden hesaplanan integrasyon alan değeri boş grafit elektrotta $0,025\text{ mA/cm}^2\cdot\text{V}$ iken POM/PAAC kompozitinin değeri $0,164\text{ mA/cm}^2\cdot\text{V}$ olarak hesaplanmıştır. 10 mM glukoz varlığında 50 mM , pH:6 fosfat tampon içerisindeki POM/PAAC ve POM/PAAC-GOx'un amperometrik ölçüm grafikleri Şekil 2b'de verilmiştir. Akım dengeye geldiğinde, 10 mM glukoz reaksiyon hücresine ilave edilmiştir. POM/PAAC-GOx $22,9\text{ }\mu\text{A/cm}^2$ 'lik bir akım değişikliği göstermiştir.

Şekil 3a-b'de AAC monomerinin ve POM bileşiğinin $-1,0+1,5\text{ V}$ aralığında alınan döngüsel voltamogramları görülmektedir. Şekil 3c-d'de farklı oranlarda hazırlanan POM/AAC kompozitlerinin oksidasyon potansiyellerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Bu karşılaştırma

değerlendirildiğinde Şekil 3c'de oksidasyon potansiyelleri giderek azalmaktadır. Polimerin optik ve elektriksel özelliklerinin, kompozitlerin oksidasyon potansiyelini belirleyen polimer zincirlerinde bulunan POM miktarına büyük ölçüde bağlı olduğu bulunmuştur (Tountas ve ark., 2016). Bu sebeple, kompozitin sensör özellikleri bu POM ve AAC oranları kullanılarak belirlenmiştir.

Kompozitin ayrı ayrı döngüsel voltametri grafikleri incelendiğinde polimer yapısına katılan POM'un oranı değiştiğçe oksidasyon piklerindeki değişim ve redoks potansiyellerinin sayısal değerinin birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir. Enzimli yüzeyin CV grafiği incelendiğinde ise polimer yüzeyindeki fonksiyonel amin grubunun aktif olduğu ve elektroaktif olmayan GOx enziminin polimer yüzeyine tamamen bağlandığı görülmektedir.



Şekil 3 a) AAC ve b) POM'un döngüsel voltamogramları c) 0-0,15 (v,v) oranında hazırlanan POM/AAC kompozitlerin oksidasyon piklerinin karşılaştırılması d) 0,15-0,75 (v, v) oranında hazırlanan POM/AAC kompozitlerin oksidasyon piklerinin karşılaştırılması

Figure 4 Cyclic voltammetry graphs a) AAC b)POM c) comparison of oxidation peaks of composites prepared at 0–0.15 (v, v) POM/AAC ratio d) comparison of oxidation peaks of composites prepared at 0.15–0.75 (v, v) POM/AAC ratio

Glukoz Biyosensörünün Karakterizasyonu

Glukoz oksidaz biyosensörünün farklı substrat konsantrasyonlarında biyosensör cevabını incelemek amacıyla glukozun farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen biyosensör cevapları Şekil 2 'de verilmiştir. 0,1-10 mM glukoz konsantrasyonu aralığında doğrusallık gözlenmiştir. Glukozun elektrokimyasal olarak belirlenmesi için POM/PAAC kompozitinin sensör karakteristiğinin belirlenmesi için, POM/PAAC-GO_x elektrot cevabı 0,1–500 mM arasında değişen glukoz konsantrasyonlarında cevabı değerlendirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi tarafından hesaplanan POM/PAAC sensör elektrodunun hassasiyeti, PAAC elektrodundan daha yüksektir. Glukoz konsantrasyonlarının artmasıyla, akımdaki değişiklik 0,1–10 mM arasındaki glukoz konsantrasyonları ile lineer olarak artmaktadır. Tayin sınırı 0,099 mM, hassasiyet 66,66 $\mu\text{AmM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ olarak hesaplanmıştır.

Enzim sensörlerinin farklı örneklerde kullanılabilirliğini kısıtlayan en önemli etmenlerden biri de ortamda girişim yapabilecek bileşiklerin bulunmasıdır. Örneğin alkollü içeceklerde glukoz tayini yaparken etanol ve meyve sularında glukoz tayini yaparken fenolikler potansiyel girişimci bileşiklerdir. POM/PAAC-GO_x enzim

sensörünün fenol ve etanol bileşiklerinin biyosensör cevabına etkisi test edilmiştir. POM/PAAC-GO_x sensörünün seçiciliğini doğrulamak için 0,5 mM etanol ve 0,5 mM fenol, glukoz yerine reaksiyon hücreesine ilave edilmiştir. Hazırlanan sensör için yapılan girişimci testinde fenol, etanol, [glukoz+etanol]'a karşı hiç cevap gözlemlenmezken [glukoz+fenol]'e karşı çok az cevap vermiştir. Hazırlanan glukoz oksidaz biyosensörünün belirli glukoz konsantrasyonlarında çalışma tamponu ve çalışma sıcaklığında tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Tekrarlanan ölçümler sonrasında ilgili substratın kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptanmıştır. Bu işlemler sonrasında glukoz oksidaz biyosensörü ile glukoz standardı için standart sapma (S.D) $\pm 0,103$ mM (n=5) ve varyasyon katsayısı (c.v) %5,0 olarak bulunmuştur.

Hazırlanan biyosensörün uygulanabilirliğini test etmek amacıyla ticari olarak satılan kola ve meyve suyundaki glukoz miktarları belirlenmiştir. Referans yöntem olarak spektrofotometrik bir yöntem ile örneklerdeki glukoz miktarı belirlendikten sonra sonuçlar birbiri ile kıyaslanmıştır. Alkolsüz içeceklerdeki glukoz analizinin spektrofotometrik ve glukoz biyosensörlerinin kullanımıyla elde edilen sonuçları Çizelge 1'de özetlenmiştir.

Çizelge 1 POM/PAAC kompozit elektrot için spektrofotometrik yöntem kullanılarak iki farklı gıda örneğinde glukoz analizi

Table 1 Glucose analysis in two different food samples using spectrophotometric method for POM / PAAC composite electrode

Örnek	Glukoz (g/L)*	
	Spektrofotometrik metod	Glukoz oksidaz biyosensörü
Kola	70,0±3,0	69,1±1,9
Meyve suyu	54,2±9,3	55,7±1,7

*Sonnular ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3)

Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak, Keggin tipi POM ($(n\text{Bu}_4\text{N})_3[\text{PW}_9\text{O}_{34}(\text{tBuSiOH})_3]$) anyonu varlığında amino grubuna sahip karbazol türevi monomerin elektrokimyasal polimerizasyonu tarafından hazırlanan kompozit filme dayalı gıda endüstrisinde kullanılmak üzere elektrokimyasal glukoz sensörü elde edilmiştir. POM/PAAC kompozit filmi başarılı bir şekilde sentezlenmiş ve elektrokimyasal tekniklerle karakterize edilmiştir. Fonksiyonel primer amin grubuna sahip olan AAC monomeri ile katalitik redoks özelliği gösteren POM kompozit bir yapı oluşturulmuş ayrıca kompozite glukoz oksidaz enzimi immobilize edilerek bu yapının biyosensör özellikleri incelenmiştir. POM/PAAC elektrokimyasal glukoz sensörü, glukozun pratik ve etkili bir şekilde belirlenmesi için umut vericidir. Metal ve organik hibrit kompozit filmin sinerjistik etkisi sayesinde elde edilen biyosensör ile gıda örnekleri üzerinde (ticari kola ve meyve suyu) glukoz tayini yapılmış ve referans metod ile tutarlı sonuçlar elde edilmiştir. Gıdalardaki glukoz içeriğinin belirlenmesinde yüksek doğruluk, kısa cevap süresi ve uzun raf ömrü avantajlarının yanı sıra kolay hazırlanabilirliği, uygulamada kolaylık sunması, ölçümlerde zaman ve kimyasallardan kazanım sağlanmasıyla ekonomik bir alternatif olacağı düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışma geliştirilerek antikolar, antijenler, enzimler, proteinler vb. biyomoleküllerin istenilen yüzeylere yüksek yoğunlukta ve tek basamakta immobilize edilmesi ve biyosensör, hedeflenmiş salınım, afinite kromatografisi vb. uygulamalarda kullanımı sağlanabilir.

Kaynaklar

Adley C. 2014. Past, Present and Future of Sensors in Food Production. *Foods*, 3: 491-510.

Ates M, Sarac A. 2009. Conducting polymer coated carbon surfaces and biosensor applications. *Progress in Organic Coatings*, 66(4): 337-358.

Ayranci R, Demirkol D, Ak M, Timur S. 2015. Ferrocene-functionalized 4-(2,5-Di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl) aniline: A novel design in conducting polymer-based electrochemical biosensors. *Sensors (Switzerland)*, 15(1): 1389-1403.

Ayranci R, Soganci T, Guzel M, Demirkol D, Ak M, Timur S. (2015a). Comparative investigation of spectroelectrochemical and biosensor application of two isomeric thienylpyrrole derivatives. *RSC Advances*, 5(65): 52543-52549.

Ayranci R, Soganci T, Guzel M, Demirkol D, Ak M, Timur S. 2015b. Comparative investigation of spectroelectrochemical and biosensor application of two isomeric thienylpyrrole derivatives. *RSC Advances*, 5: 52543.

Ayranci R, Torlak Y, Ak M. 2019. Non-Enzymatic Electrochemical Detection of Glucose by Mixed-Valence Cobalt Containing Keggin Polyoxometalate/Multi-Walled Carbon Nanotube Composite. *Journal of The Electrochemical Society*, 166(4): B205-B211.

Ayranci R, Torlak Y, Soganci T, Ak M. 2018. Trilacunary Keggin Type Polyoxometalate-Conducting Polymer Composites for Amperometric Glucose Detection. *Journal of The Electrochemical Society*, 165(13): B638-B643.

Ayranci R, Vargün E, Ak M. 2017. Conjugated and Fluorescent Polymer Based on Dansyl-Substituted Carbazole: Investigation of Electrochromic and Ion Sensitivity Performance. *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, 6(5): P211-P216.

Bruen D, Delaney C, Florea L, Diamond D. 2017. Glucose sensing for diabetes monitoring: Recent developments. *Sensors (Switzerland)*, 17(8): 1866.

Cappitelli F, Polo A, Villa F. 2014. Biofilm Formation in Food Processing Environments is Still Poorly Understood and Controlled. *Food Engineering Reviews*, 6(2): 29-42.

Chen J, Barteau MA. 2016. Electrochemical Properties of Keggin-Structure Polyoxometalates in Acetonitrile: Effects of Counterion, Heteroatom, and Framework Metal Exchange. *Industrial Engineering Chemistry Research*, 55(37): 9857-9864.

Fan X, White IM, Shopova SI, Zhu H, Suter D, Sun Y. 2008. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Analytica Chimica Acta*, 620(2): 8-26.

Faridbod F, Ganjali MR, Dinarvand R, Norouzi P. 2008. Developments in the field of conducting and non-conducting polymer based potentiometric membrane sensors for ions over the past decade. *Sensors*, 8: 2331-2412.

Guler E, Soyleyici HC, Demirkol D, Ak M, Timur S. 2014. A novel functional conducting polymer as an immobilization platform. *Materials Science and Engineering C*, 40, 148-156.

Han Z, Zhao Y, Peng J, Feng Y, Yin J, Liu Q. 2005. The Electrochemical Behavior of Keggin Polyoxometalate Modified by Tricyclic, Aromatic Entity. *Electroanalysis*, 17(12): 1097-1102.

Jiang K, Zhang H, Shannon C, Zhan W. 2008. Preparation and characterization of polyoxometalate/protein ultrathin films grown on electrode surfaces using layer-by-layer assembly. *Langmuir*, 24(7): 3584-3589.

Kanik FE, Rende E, Timur S, Toppare L. 2012. A novel functional conducting polymer: Synthesis and application to biomolecule immobilization. *Journal of Materials Chemistry*, 22: 22517-22525.

Kecec NC, Kanik FE, Udum YA, Hizliates CG, Ergun Y, Toppare L. 2014. A novel conducting polymer based platform for ethanol sensing. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 193: 306-314.

Keow CM, Bakar A, Salleh F, Heng LY, Wagiran R, Bean LS. 2007. An amperometric biosensor for the rapid assessment of histamine level in tiger prawn (*Penaeus monodon*) spoilage. *Food Chemistry*, 105(4): 1636-1641.

Mehrotra P. 2016. Biosensors and their applications - A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2): 153-159.

Sahraoui Y, Chaliaa S, Maaref A, Haddad A, Jaffrezic-Renault N. 2013. An Electrochemical Nitrite Sensor Based on a Multilayer Film of Polyoxometalate. *Journal of Sensor Technology*, 03(03): 84-93.

Sahraoui Y, Sbartaï A, Chaliaa S, Maaref A, Haddad A, Jaffrezic-Renault N. 2015. A Nitrite Electrochemical Sensor Based on Boron-Doped Diamond Planar Electrochemical Microcells Modified with a Monolacunary Silicotungstate Polyoxoanion. *Electroanalysis*, 27(6): 1359-1367.

- Soganci T, Torlak Y, Ak M, Ersoz M. 2018. Poly (dithienylpyrrole) / Keggin type (nBu₄N)₃[PW₉O₃₄(tBuSiOH)₃] hybrid material: Enhanced optical and electrical properties of conjugated polymers via polyoxometalates. *Synthetic Metals*, 244: 54–60.
- Song F, Ding Y, Ma B, Wang C, Wang, Q Du, Song J. 2013. K₇[Co^{III}Co^{II}(H₂O)W₁₁O₃₉]: a molecular mixed-valence Keggin polyoxometalate catalyst of high stability and efficiency for visible light-driven water oxidation. *Energy & Environmental Science*, 6(4): 1170.
- Soylemez S, Udum YA, Kesik M, Gündoğdu Hızlıateş C, Ergun Y, Toppare L. 2015. Electrochemical and optical properties of a conducting polymer and its use in a novel biosensor for the detection of cholesterol. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 212: 425–433.
- Thakur MS, Ragavan KV. 2013. Biosensors in food processing. *Journal of Food Science and Technology*, 50(4): 625–641.
- Tountas M, Topal Y, Kus M, Ersöz M, Fakis M, Argitis P, Vasilopoulou M. 2016. Water-Soluble Lacunary Polyoxometalates with Excellent Electron Mobilities and Hole Blocking Capabilities for High Efficiency Fluorescent and Phosphorescent Organic Light Emitting Diodes. *Advanced Functional Materials*, 26(16): 2655–2665.
- Yang MH, Kim DS, Yoon JH, Hong SB, Jeong SW, Yoo DE, Choi BG. 2016. Nanopillar films with polyoxometalate-doped polyaniline for electrochemical detection of hydrogen peroxide. *Analyst*, 141: 1319-1324.