

Zeolit İnce Filmlerinin Biyosensör Uygulamalara Yönelik Olarak Hazırlanması ve Araştırılması

Proje No: 108M576

Doç.Dr. Burcu Akata Kurç
Prof.Dr. Hayrettin Yücel
Esin Soy
Kaan Kirdeciler
Sezin Galioğlu

NİSAN 2012
ANKARA

ÖNSÖZ

“Zeolit İnce Filmlerinin Biyosensör Uygulamalara Yönelik Olarak Hazırlanması ve Araştırılması” başlıklı proje çalışmaları Orta Doğu Teknik Üniversitesi'nin (ODTÜ) Mikro ve Nanoteknoloji Anabilimdalı'nda TÜBİTAK desteğiyle gerçekleştirilmiştir. TÜBİTAK'tan sağlanan maddi destek bütünü itibarı ile deneysel ve uygulamalı araştırma için gerekli olan kimyasal ve diğer sarf malzemelerin ve proje kapsamında kullanılan temel laboratuvar teçhizatının temin edilmesinde kullanılmıştır. Ayrıca, bu projede yer alan tüm öğrenciler, yürütücüsü olduğum IRSES-FP7 projemiz çerçevesinde (PIRSES-GA-2008-230802) beş farklı ülkede konularıyla ilgili olarak 2-5 aylık eğitim görmüşlerdir. Benzer şekilde ODTÜ'ye de yabancı uyruklu öğrenciler gelmiş ve buradaki öğrencilerimizle ortak çalışmalar yapılmıştır.

Son yıllarda, protein ve nano malzemeler arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla, proteinlerin inorganik malzemeler üzerine immobilizasyonu oldukça önem kazanmıştır. Protein-nanomalzeme ilişkisinin daha ayrıntılı anlaşılmasıyla, ileri biyoteknolojik araştırmalarda kullanılmak üzere, istenilen uygulamaya göre fiziksel ve kimyasal değişikliklerin yapılabildiği ideal yüzeylerin üretilmesi mümkündür. Kendisine özgü pek çok özellikleri sebebiyle zeolit ve zeo-tip malzemeler, literatürde bu amaçla sıkça kullanılan inorganik malzemeler arasındadır. Bu proje kapsamında, değişik özelliklere ve yapıya sahip zeolit ve silikalit örnekleri sentezlenmiş, karakterize edilmiş, kondüktometrik biyosensörlere ve iyon seçici alan etkili transistörlere (ISFET) entegre edilerek alınan sonuçlar değerlendirilmiştir.

Projenin sonunda ise zeolit ve zeo-tip malzemeler kullanılarak modifiye edilmiş elektrotların kullanıldığı kondüktometrik ve ISFET tipli biyosensörler, direk üre, glukoz ve bütirikolin tespiti için kullanılmış ve biyosensör performansını artırıcı etkileri tespit edilmiştir. Ayrıca, SiO₂ ve cam yüzeyler üzerinde istenilen büyüklükte oluşturulan zeolit desenleriyle, aynı elektrot yüzeyine hidrofilik/hidrofobik özelliklerin kontrollü oluşumu sağlanmıştır. Bu şekilde oluşturulan zeolit ince filmlerinde yine ilk defa hücre büyümesi testleri yapılmış ve zeolitli ortamların hücre büyütmek için bir avantaj olduğu gösterilmiştir. İnce film çalışmalarının bir parçası olarak, yine ilk defa Engelhard Titanyum Silikat (ETS-10) malzemesi iletken bir yüzey üzerinde büyütülmüştür. Elde edilen sonuçların, yeni nesil biyosensör tasarımı için gelecekteki çalışmalara ışık tutacak nitelikte olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, projemiz bünyesinde zeolit ve zeo-tip malzeme sentezi; bunlardan farklı yüzeylerde ince film yapımı ve mikrofabrikasyonu; bu oluşan yüzeylerin biyosensör cihazlarına entegrasyonu ve yeni sensörlerin laboratuvarımızdaki kurulumu; ve son olarak fabrikasyonu yapılan filmler üzerindeki protein, enzim ve hücre immobilizasyonu çalışmalarının başarısı ile proje teklifindeki her konuda tamamen başarılı çalışmalar gerçekleştirilmiş, gerek özgün değer, gerekse yaygın etki açısından proje teklifinde önerdiğimiz proje sonuçlarına ulaşılmıştır.

Saygılarımla,
Doç. Dr. Burcu Akata
Nisan 2012, Ankara

İçindekiler

| | |
|--|----|
| Önsöz..... | 2 |
| İçindekiler..... | 3 |
| Şekillerin Listesi..... | 5 |
| Tabloların Listesi..... | 8 |
| Özet..... | 9 |
| Abstract..... | 11 |
| 1. GİRİŞ..... | 11 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 12 |
| 2.1 Zeolit ve Zeo-tip Malzemeler..... | 12 |
| 2.1.1 Zeolitlerin Yapısı..... | 12 |
| 2.1.2 Zeolitlerin Asidik Özellikleri..... | 13 |
| 2.1.3 Zeolitin Protein Çalışmalarındaki Rölü..... | 14 |
| 2.2 Elektrokimyasal Biyosensörler..... | 15 |
| 2.2.1 Amperometrik Biyosensörler..... | 15 |
| 2.2.2 Kondüktometrik Biyosensörler..... | 16 |
| 2.2.3 ISFET Tip Biyosensörler..... | 17 |
| 2.2.4 Zeolitlerin Biyosensörler Uygulamalarındaki Kullanımı..... | 17 |
| 2.3 Zeolitlerden İnce Film Yapım Teknikleri..... | 18 |
| 2.4 Proje Başlangıcındaki Öngörüler..... | 18 |
| 2.5 Projenin Özgün Değeri..... | 20 |
| 2.6 Proje Raporunun Yapısı..... | 21 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 22 |
| 3.1 Zeolit ve Zeo-tip Malzemelerin Sentezi ve Karakterizasyonu..... | 22 |
| 3.2 Yüzey Modifikasyonu ve Karakterizasyonu..... | 23 |
| 3.2.1 Zeolit Beta ve SBA'nın Modifikasyonu..... | 24 |
| 3.2.2 İyon Değişimi Çalışmaları..... | 24 |
| 3.2.3 Isıl İşlem Çalışmaları..... | 25 |
| 3.3 İnce Film Çalışmaları..... | 25 |
| 3.3.1 Zeolitlerin Farklı Yüzeyle Tutturulması..... | 26 |
| 3.3.1.1 Döndürerek Kaplama Yöntemi (Spin Coating)..... | 26 |
| 3.3.1.2 Ultrasonik Karıştırma Yöntemi (Ultrasonic Agitation)..... | 26 |
| 3.3.1.3 Direkt Tutturma Yöntemi..... | 27 |
| 3.3.2 Mikrofabrikasyon ve Zeolit Desenlerinin Oluşturulması..... | 27 |
| 3.3.2.1 Elektron Demet Litografisi ile Üretim..... | 27 |
| 3.3.2.2 Fotolitografi ile Üretim..... | 28 |
| 3.3.2.3 Çift Katlı Zeolit Desenlerinin Oluşturulması..... | 28 |
| 3.4 İmmobilizasyon Çalışmaları..... | 29 |
| 3.4.1 Adsorpsiyon Çalışmaları..... | 29 |
| 3.4.1.1 Si/Al Oranının Etkisi..... | 30 |
| 3.4.1.2 Parçacık Boyutunun Etkisi..... | 30 |
| 3.4.1.3 Ortamdaki pH'ın Etkisi..... | 30 |
| 3.4.1.4 Yüzey Yükünün Etkisi..... | 30 |
| 3.4.1.5 Gözenek Boyutunun Etkisi..... | 30 |
| 3.4.1.6 Zeolit İçerisindeki İyonların Etkisi..... | 30 |
| 3.5 Biyosensör Çalışmaları..... | 31 |
| 3.5.1 Amperometrik Biyosensör Verileri..... | 31 |
| 3.5.2 Kondüktometrik Biyosensör Verileri..... | 32 |
| 3.5.3 ISFET Tip Biyosensör Verileri..... | 32 |
| 3.6 Gerçek Uygulamalara Yönelik Çalışmalar: Hücre Tutunması ve Çoğaltma İşlemleri..... | 32 |
| 4. BULGULAR..... | 33 |

| | |
|--|----|
| 4.1 Zeolit ve Zeo-tip Malzemelerin Sentezi | 33 |
| 4.1.1 Mikron Zeolit A..... | 33 |
| 4.1.2 Zeolit Beta | 35 |
| 4.1.3 Silikalit ve SBA-15 | 38 |
| 4.2 Yüzey Modifikasyonu..... | 41 |
| 4.2.1 İyon Değişimi Çalışmaları | 42 |
| 4.3 İnce Film Çalışmaları | 43 |
| 4.3.1 Zeolitlerin Farklı Yüzeyle Tutturulması | 43 |
| 4.3.1.1 Döndürerek Kaplama Yöntemi (Spin Coating)..... | 43 |
| 4.3.1.2 Ultrasonik Karıştırma Yöntemi (Ultrasonic Agitation | 43 |
| 4.3.1.3 Direkt Tutturma Yöntemi | 44 |
| 4.3.2 Mikrofabrikasyon ve Zeolit Desenlerinin Oluşturulması | 46 |
| 4.3.2.1 Elektron Demet Litografisi ile Üretim | 46 |
| 4.3.2.2 Fotolitografi ile Üretim | 49 |
| 4.4 İmmobilizasyon Çalışmaları | 52 |
| 4.4.1 Parçacık Boyutunun Etkisi | 53 |
| 4.4.2 Si/Al Oranının Etkisi..... | 55 |
| 4.4.3 Yüzey Yükünün Etkisi | 55 |
| 4.4.4 pH'ın Etkisi..... | 56 |
| 4.4.5 İyon Değişiminin Etkisi..... | 56 |
| 4.4.6 Gözenek Boyutunun Etkisi..... | 58 |
| 4.5 Biyosensör Çalışmaları ve Veri Ölçümleri | 58 |
| 4.5.1 Amperometrik Biyosensör Verileri | 58 |
| 4.5.1.1 Glukoz Oksidaz Enzimi Kullanılarak Oluşturulan Amperometrik Tip Biyosensör Çalışmaları | 58 |
| 4.5.1.2 Alkol Oksidaz Enzimi Kullanılarak Oluşturulan Amperometrik Tip Biyosensör Çalışmaları | 61 |
| 4.5.1.3 Laktat Oksidaz Enzimi Kullanılarak Oluşturulan Amperometrik Tip Biyosensör Çalışmaları | 64 |
| 4.5.2 Kondüktometrik Biyosensör Verileri | 65 |
| 4.5.2.1 Gluteraldehit Tutulma Süresinin Etkisi..... | 65 |
| 4.5.2.2 Tampon Çözeltisinin Konsantrasyon ve pH'ının Etkisi..... | 65 |
| 4.5.2.3 Zeolitlerin Kondüktometrik Biyosensör Sonuçlarına Etkisi | 68 |
| 4.5.2.4 Si/Al Oranının Enzimatik Yanıtlara Etkisi..... | 73 |
| 4.5.2.5 Farklı Modifikasyon Şekillerinin Enzimatik Yanıtlara Etkisi..... | 74 |
| 4.5.2.6 Zeolit Modifikasyonunun Enzimatik Yanıt Verme Süresine Etkisi..... | 77 |
| 4.5.3 ISFET Tip Biyosensör Verileri | 77 |
| 4.6 Gerçek Uygulamalara Yönelik Çalışmalar: Hücre Tutunması ve Çoğaltma Çalışmaları | 85 |
| 4.6.1 MG63 ve NIH 3T3 Hücre Tipleri ile MTT Testleri..... | 86 |
| 4.6.2 Hücre Tutturma Çalışmaları Sonuçları | 87 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR..... | 96 |
| 6. ÖNERİLER..... | 97 |
| 7. PROJE HEDEFLERİ VE HEDEFLERE GÖRE DEĞERLENDİRME | 98 |
| 8. KAYNAKÇA..... | 99 |

Şekillerin Listesi

| | |
|---|----|
| Şekil 1: Zeolit A (A), zeolit Beta (B) kristallerinin 3 boyutlu kafes yapıları ve zeolitlerde bulunan katyonların yerini gösteren bir örnek; zeolit X içindeki Na ⁺ katyonları siyah toplarla gösterilmiştir (C) (www.iza-online.org)..... | 13 |
| Şekil 2: Zeolit yüzeyinde bulunan Brønsted asit bölgeleri (A) ve silanol grupları (B)..... | 14 |
| Şekil 3: Amperometrik Deney Sistemi..... | 16 |
| Şekil 4: Kondüktometrik Deney Sistemi..... | 16 |
| Şekil 5: ODTÜ Laboratuvarımızda Kurulan Kondüktometrik Sistem..... | 17 |
| Şekil 6: ISFET tip biyosensörlerde kullanılan elektrotun şematik görünüşü. Oklarla işaretlenmiş bölgeler, membranların immobilize edildiği alanları göstermektedir. Tüm bu elektrotlar IRSES projemiz kapsamındaki Ukrayna'lı ortaklarımız tarafından tasarlanıp yapılmıştır..... | 24 |
| Şekil 7: Yüzey Modifikasyonu için Kullanılan Geri Akım Sistemi. | 26 |
| Şekil 8: Zeolit kullanılarak hazırlanan elektrotların şematik resimleri..... | 27 |
| Şekil 9: Zeolit kristallerinin SiO ₂ yüzeylerindeki fabrikasyonunun şematik gösterimi..... | 27 |
| Şekil 10: Zeolit kristallerinin SiO ₂ yüzeylerinde fotolitografik yöntemle fabrikasyonunun şematik gösterimi..... | 28 |
| Şekil 11: Çift katlı zeolit desenlerinin oluşturulmasının şematik gösterimi..... | 29 |
| Şekil 12: Farklı boyutlarda sentezlenmiş Mikron-Zeolit A, LTA-2 (A), LTA-4 (B) ve LTA-5 (C) SEM Mikrografikleri. | 33 |
| Şekil 13: Sentezlenmiş Mikron- Zeolit A XRD Deseni. | 34 |
| Şekil 14: Sentezlenmiş Mikron- Zeolit A Örneklerinin Tanecik Boyutu Analizi, 2 µm (A), 4 µm (B) ve 5 µm(C)..... | 34 |
| Şekil 15: Sentezlenmiş Farklı Si/Al Özellikli Zeolit-Beta Örneklerinin SEM Mikrografikleri, Si/Al=30 (A), Si/Al=50 (B), Si/Al=60 (C), Si/Al=120 (D). | 36 |
| Şekil 16: Sentezlenmiş Farklı Si/Al Özellikli Zeolit-Beta Örneklerinin XRD Desenleri..... | 36 |
| Şekil 17: Sentezlenmiş Zeolit Beta Örneklerinin Tanecik Boyutu Analizi..... | 37 |
| Şekil 18: Sentezlenmiş Farklı Si/Al Özellikli Zeolit-Beta Örneklerinin Zeta Potansiyel Grafikleri..... | 37 |
| Şekil 19: Şekilde gözlenen tüm pikler literatürdekilerle uyum içerisindedir. Bütün bu sonuçlar elde edilen malzemelerin yüksek kelitedeki Silikalit ve SBA-15 örnekleri olduğunu göstermektedir. Elde edilen bu malzemelerin SEM mikrografikleri de Şekil 20'de gösterilmiştir. | 39 |
| Şekil 20: Sentezlenmiş Silikalit (A) ve SBA-15 (B) Örneklerinin SEM Mikrografiji..... | 39 |
| Şekil 21: Sentezlenmiş 20 nm gözenek boyutuna sahip SBA-15 taneciklerinin gözeneklerinin SEM mikrografiji. | 40 |
| Şekil 22: Yüzey Grubu Değiştirilmemiş (A), X. Zhang et al. prosedürüne göre (B) ve T. W. Pechar prosedürüne göre (C) yüzey grupları değiştirilmiş Beta-120 Örneğinin Zeta Potansiyel Karakterizasyon Grafiği..... | 41 |
| Şekil 23: Döndürerek kaplama yöntemi ile hazırlanan yüzeylere ait bir örneğin mikrografiji..... | 43 |
| Şekil 24: Ultrasonik karıştırma yöntemiyle oluşturulmuş filmlerin düşük büyütmedeki (A) ve yüksek büyütmedeki (B) SEM mikrografikleri..... | 44 |
| Şekil 25: Direk tutturma yöntemi ile üretilen zeolit filmlerinin yüksek büyütme (A) ve düşük büyütmedeki (B) taramalı elektron mikroskobu görüntüleri..... | 45 |
| Şekil 26: Toz halindeki zeolit A'nın (a), boş silikon levhanın (b) ve direk tutturma yöntemi ile hazırlanmış silikon levha üzerindeki zeolit filminin (c) XRD sonuçları (ÖZTÜRK, 2009)..... | 46 |

| | |
|---|----|
| Şekil 27: Elektron demet litografisi ve direk tutturma yöntemi ile hazırlanmış zeolit mikrodesenlerinin SEM Mikrografisi (ÖZTÜRK, 2009)..... | 47 |
| Şekil 28: Elektron demet litografisi ve direk tutturma yöntemi ile hazırlanmış dört, iki ve tek sıra halinde üretilmiş zeolit mikrodesenlerinin SEM mikrografisi (ÖZTÜRK, 2009)..... | 48 |
| Şekil 29: Zeolit A tek katman tabakası üzerinde elektron demet litografisi ile oluşturulmuş silikalit mikrodesenlerinin SEM mikrografisi..... | 48 |
| Şekil 30: Silikalit tek katman tabakası üzerinde elektron demet litografisi ile oluşturulmuş zeolit A mikrodesenlerinin SEM mikrografisi..... | 49 |
| Şekil 31: Fotolitografi ve direk tutturma yöntemi ile hazırlanmış zeolit mikrodesenlerinin SEM mikrografileri..... | 49 |
| Şekil 32: Fotolitografi ve direk tutturma yöntemi ile hazırlanmış tabanı silikalit üzeri zeolit A ve tabanı zeolit A üzeri silikalit mikrodesenlerinin SEM mikrografileri..... | 50 |
| Şekil 33: Farklı kalınlıktaki ETS-10 filmlerinin yukarıdan SEM görüntüleri (a, c, e) ve kesit görüntüleri (b, d, f). *SL = alt tabaka, CG = üzerinde büyütülen tabaka (GALİOĞLU, 2010)..... | 51 |
| Şekil 34: Proteinlerin, zeolit A parçacıkları üzerindeki olası davranışları. Büyük parçacıkların sahip olduğu geniş dış yüzey, proteinlerin yüzey üzerinde denatüre olmalarını ve daha çok etkileşime girerek daha sağlam tutunduklarını göstermektedir..... | 54 |
| Şekil 35: Glukoz oksidaz (■), hemoglobin (■), and lizozim (■) proteinlerinin farklı pH'larda zeolit Beta parçacıklar üzerine adsorplanma miktarları..... | 55 |
| Şekil 36: Proteinlerin (Σ _W) farklı gözenek boyutuna sahip malzemeler üzerine adsorpsiyonu..... | 57 |
| Şekil 37: Proteinlerin silicalite (■), SBA-15 (■) ve modifiye edilmiş SBA-15 (■) malzemeleri üzerine adsorpsiyonu..... | 57 |
| Şekil 38: Hiç zeolit içermeyen amperometrik alkol oksidaz biyosensörlerindeki enzimatik aktivitenin farklı tipte zeolit içeren amperometrik biyosensörlerdeki enzimatik aktivite ile karşılaştırılması..... | 62 |
| Şekil 39: Gluteraldehitte Bırakılma Süresi (Çapraz-Bağ Olması İçin Gereken Zaman)..... | 65 |
| Şekil 40: Fosfat Tampon Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisi..... | 66 |
| Şekil 41: Fosfat Tampon pH'nın Enzim Aktivitesine Etkisi..... | 67 |
| Şekil 42: Farklı Zeolitlerin Üreaz Aktivitesi Üzerine Etkisi..... | 67 |
| Şekil 43: Tablo 2'de gösterilen modifiye edilmiş zeolitlerin kullanıldığı kondüktometrik tipli üreaz biyosensörlerinin aktivitesinin hiç zeolit içermeyen biyosensörlerin aktiviteleri ile karşılaştırılması..... | 68 |
| Şekil 44: Zeolit konsantrasyonunun biyosensör aktivitesine etkisi (a) NH ₄ iyonu içeren zeolit Beta-30, (b) H iyonu içeren zeolit Beta-30 ve (c) iyon değişimi yapılmamış zeolit Beta-50..... | 70 |
| Şekil 45: NH ₄ -Beta-30, H-Beta-30 ve H-Beta-50 partikülleri içeren ve hiç zeolit içermeyen üreaz biyosensörlerindeki enzimatik aktivitenin tekrarlanabilirliğinin karşılaştırılması..... | 71 |
| Şekil 46: Farklı tip zeolit içeren biyosensörlerdeki enzimatik aktivitenin tekrarlanabilirliği (1 gün boyunca), (A) Hiç zeolit içermeyen, (B) NH ₄ -Beta-30, (C) H-Beta-30 içeren biyosensörler..... | 72 |
| Şekil 47: Farklı yöntemlerle hazırlanan elektrot yüzeylerindeki üreazların enzimatik aktivitelerinin karşılaştırılması (KİRDECİLER, 2011)..... | 73 |
| Şekil 48: Farklı Si/Al oranlarında sentezlenmiş zeolitlerle hazırlanmış Zeolit Membran Elektrotların (ZME'lerin) Standard Membran Elektrot ile karşılaştırılması (KİRDECİLER, 2011)..... | 74 |
| Şekil 49: Standard Membran Elektrot-SME (A), Zeolit Membran Elektrot-ZME (B) ve Zeolit Kaplı Elektrot'ların-ZKE (C) şematik gösterimi..... | 75 |
| Şekil 50: Silikalit ve zeolit Beta-60 ile hazırlanmış Zeolit Kaplı Elektrot'ların taramalı elektron mikroskobu görüntüleri..... | 75 |

| | |
|--|----|
| Şekil 51: Farklı zeolit modifikasyonlarının Standard Membran Elektrodları (SME) ile karşılaştırılması. | 76 |
| Şekil 52: Zeolit Kaplı Elektrotların (ZKE) Enzimatik Yanıt Süresinin Standard Membran Elektrotlarla (SME) karşılaştırması (KİRDECİLER, 2011). | 77 |
| Şekil 53: Farklı yöntemlerle kalsine edilmiş Na-Beta-50 örneklerinin FTIR grafiği. | 78 |
| Şekil 54: Hiç zeolit içermeyen, standart membran hazırlama yöntemi ile hazırlanmış üreaz ve bütirilkolinesteraz enzimlerine ait standart ISFET verileri. | 79 |
| Şekil 55: Kalsine edilmiş zeolit Beta parçacıkları içeren standart membran yöntemi ile hazırlanmış üreaz (A) ve bütirilkolinesteraz (B) enzimlerine ait ISFET verileri. | 79 |
| Şekil 56: Bütirilkolinesteraze (A) ve üreaz (B) içeren ISFET tip biyosensörlerin çalışma stabiliteleri. | 81 |
| Şekil 57: Bütirilkolinesteraze (A) ve üreaz (B) içeren ISFET tip biyosensörlerin artan inhibitör konsantrasyonuna karşı ölçülen rezidual aktiviteleri. | 82 |
| Şekil 58: Zeolit konsantrasyonunun biyosensör aktivitesine etkisi 0.015 % (A), 0.15% (B), 1.5% (C) and 8.2 % (D). | 83 |
| Şekil 59: Biyosensörlerin stabilitesi bir gün boyunca alınan veriler (A), biyosensör +4°C de kuru olarak tutulduktan sonra alınan veriler (B) | 84 |
| Şekil 60: Ortamdaki Civa ve Bakır iyonlarının tespiti için farklı tip zeolit içeren biyosensörlerdeki enzimatik aktivitenin zeolit içermeyen biyosensörlerdeki enzimatik aktivite ile karşılaştırılması. | 85 |
| Şekil 61: Silikalit (A) ve Zeolit A (B) mikroparçacıklarının SEM mikrografı. | 86 |
| Şekil 62: Kullanılan örneklerin şematik gösterimi, Mikrodeseen bulunan alanın açılı şematik gösterimi, zeolitlerle üretilmiş çizgilerin kalınlığını-a, iki zeolit çizgisi arasındaki boşluk-b(A); Tüm örneğin yukarıdan şematik gösterimi (B). | 86 |
| Şekil 63: MG63 hücre tipi ile 0,125 cm ² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 24, 48 ve 72 saatlik MTT testlerinin sonuçları. | 87 |
| Şekil 64: MG63 hücre tipi ile 0,08825 cm ² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 24, 48 ve 72 saatlik MTT testlerinin sonuçları. | 88 |
| Şekil 65: MG63 hücre tipi ile 0,04167 cm ² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 24, 48 ve 72 saatlik MTT testlerinin sonuçları. | 88 |
| Şekil 66: MG63 hücre tipi ile 0,125cm ² , 0,008825 cm ² ve 0,004167 cm ² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 24 saatlik MTT testlerinin sonuçları. | 89 |
| Şekil 67: MG63 hücre tipi ile 0,125cm ² , 0,008825 cm ² ve 0,004167 cm ² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 48 saatlik MTT testlerinin sonuçları. | 89 |
| Şekil 68: MG63 hücre tipi ile 0,125cm ² , 0,008825 cm ² ve 0,004167 cm ² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 72 saatlik MTT testlerinin sonuçları | 90 |
| Şekil 69: 0.125 cm ² zeolit kaplı örnekler üzerinde NIH 3T3 hücreleri ile yapılan 24, 48 ve 72 saatlik MTT testi sonuçları. | 91 |
| Şekil 70: 0.08825 cm ² zeolit kaplı örnekler üzerinde NIH 3T3 hücreleri ile yapılan 24, 48 ve 72 saatlik MTT testi sonuçları. | 91 |
| Şekil 71: 0.04167 cm ² zeolit kaplı örnekler üzerinde NIH 3T3 hücreleri ile yapılan 24, 48 ve 72 saatlik MTT testi sonuçları. | 92 |
| Şekil 72: NIH 3T3 hücre tipi ile 0,125cm ² , 0,008825 cm ² ve 0,004167 cm ² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 24 saatlik MTT testlerinin sonuçları. | 93 |
| Şekil 73: NIH 3T3 hücre tipi ile 0,125cm ² , 0,008825 cm ² ve 0,004167 cm ² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 48 saatlik MTT testlerinin sonuçları. | 93 |
| Şekil 74: NIH 3T3 hücre tipi ile 0,125cm ² , 0,008825 cm ² ve 0,004167 cm ² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 72 saatlik MTT testlerinin sonuçları. | 94 |

Tabloların Listesi

| | |
|--|----|
| Tablo 1: Çalışılan zeolitlerin sentez koşulları. | 22 |
| Tablo 2: Çalışılan tüm zeolitlerin için kullanılan kodlar ve amaçları. | 31 |
| Tablo 3: Zeolit A mikrokristallerinin yüzey özellikleri. | 35 |
| Tablo 4: Zeolit A mikrokristallerinin yüzey özellikleri. | 38 |
| Tablo 5: Silikalit ve SBA-15kristallerinin yüzey özellikleri. | 40 |
| Tablo 6: Silikalit ve SBA-15kristallerinin yüzey özellikleri. | 42 |
| Tablo 7: Farklı iyonlarla iyon-değiştirme işlemine tabi tutulmuş zeolit Beta örneklerinin özellikleri. | 42 |
| Tablo 8: Fiziksel adsorpsiyon çalışmalarında kullanılan proteinlerin moleküler ağırlıkları ve izoelektrik noktaları. | 52 |
| Tablo 9: Fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile farklı özelliklere sahip zeolit A ve zeolit Beta parçacıkları üzerine immobilize edilmiş protein miktarları. | 53 |
| Tablo 10: Hiç zeolit içermeyen amperometrik glukoz oksidaz biyosensör verileri. | 59 |
| Tablo 11: Silikalit-500 (500 nm) içeren amperometrik biyosensörler verileri. | 59 |
| Tablo 12 - Silikalit-70 (70 nm) içeren amperometrik biyosensörler verileri. | 60 |
| Tablo 13: Hiç zeolit içermeyen amperometrik glokoz oksidaz biyosensörlerinin kalsine edilmiş ve edilmemiş Silikalit 500 ve silikalit 70 partikülleri içeren amperometrik biyosensörler ile karşılaştırılması. | 61 |
| Tablo 14: Hiç zeolit içermeyen amperometrik alkol oksidaz biyosensörlerinin kalsine edilmiş ve edilmemiş silikalit 500 ve silikalit 70 partikülleri ile Na-Beta-30, Na-Beta-40 ve Na-Beta-50 partikülleri içeren amperometrik biyosensörler ile karşılaştırılması. | 63 |
| Tablo 15: Hiç zeolit içermeyen amperometrik laktat oksidaz biyosensörlerinin Silikalit-500 ve kalsine edilmiş silikalit-70 partikülleri ile Na-Beta-30 partikülleri içeren amperometrik biyosensörler ile karşılaştırılması. | 64 |

Özet

Zeolitler, yüzey elektrostatik ve elektrokimyasal özellikleri, Si/Al oranına bağlı olarak değiştirilebilen hidrofilik/hidrofobik özellikleri ile biyomoleküllerin bağlanabilmesi için oldukça uygun bir alana sahiptirler. Bu özellikler zeolitleri, proteinlerin bağlanması ve biyosensör cihazlarında kullanılmaları amacıyla alternatif birer malzeme haline getirmektedirler. Bu projenin asıl amacı, nanomalzemelerin, biyolojik bileşiklerin ve biyosensörlerdeki çevirici birimlerin birbirlerine ve dolayısıyla da nanomalzemelerin uygulamaya yönelik olarak cihazlara entegrasyonunu yaparak, sonuçta elde edilmiş entegre cihazda nanomalzemenin rolünün tartışılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda, farklı özellikteki zeolit ve zeo-tip malzemeler sentezlenmiş; bunlardan farklı nitelikte ince filmler elde edilmiş; zeolit nanoparçacıkları mikrofabrikasyon yöntemleriyle desenlendirilmiş; elde edilen ince filmlere biyolojik malzemelerin immobilizasyonu çalışılmış ve son olarak da farklı tipteki elektrokimyasal biyosensör verileri elde edilerek bu nanomalzemelerin biyosensörler için rolü ve önemi tartışılmıştır. Projenin birinci aşaması, homojen boyutlara ve farklı Si/Al oranlarına sahip mikron- ve nanoboyuttaki zeolit parçacıklarının sentezi ve sentezlenen malzemelerin farklı tekniklerle modifiye edilmesidir. Projenin sonuna kadar olan süre içerisinde bahsi geçen bütün zeolit malzemeleri başarıyla sentezlenmiş olup, gerek yapısındaki iyonların gerekse yüzey gruplarının değişimi ile yapılması planlanan modifikasyonlarda da istenilen sonuçlara ulaşılmıştır. Proje teklifinin ikinci kısmında ise, sentezlenmiş zeolitlerden SiO₂ üzerinde ince film yapımı çalışmaları yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, zeolitlerin şekil farklılıkları, boyut farklılıkları ve Si/Al oranlarındaki farklılardan dolayı değişiklik gösterecek hidrofilik-hidrofobik yüzey özellikleri gibi faktörlerin hem ince film yapım kalitesi üzerindeki etkileri, hem biyosensör olarak kullanım potansiyelleri hem de hücre bağlanması üzerine etkilerinin araştırılması gerçekleştirilmiştir. Proje teklifinin üçüncü aşaması, sentez çalışmaları sonucunda başarıya ulaşılmış tüm zeolit tozlarına ve onlardan oluşturulmuş ince filmler üzerine farklı biyolojik malzemelerin immobilizasyonu ve elde edilen entegre malzemelerden gerçek anlamda bir biyosensör verisi eldesidir. Projenin bir sonraki döneminde ise bir önceki dönem aktivitesi ölçülen biyosensörlerin çalışma stabilitesi, biyosensör ömürleri ve inhibisyon davranışları araştırılmış, geleneksel yöntemlerle alınan verilerle karşılaştırılmış ve alınan sonuçlar ilk defa çalışma grubumuz tarafından literatüre katılmıştır. Projenin son döneminde de elde edilen tüm verilerin ışığında mikrofabrikasyonu yapılmış farklı zeolit ince filmleri üzerinde osteoblast ve fibroblast tipi hücreler üretilmiş ve MTT testi yardımıyla hücre sayıları ölçülmüştür. SiO₂ üzerinde üretilen mikrodosenler sayesinde, örnek üzerindeki zeolit miktarı doğrudan kontrol edilerek, zeolit miktarının hücrelerin tutunması ve çoğalması üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Abstract

Zeolites play an important role in the immobilization of biomolecules with their tunable surface properties, adjustable surface charge and hydrophilicity, which is a function of crystal Si/Al ratio. These properties make zeolites promising alternative candidates for the immobilization of enzymes and incorporation into biosensing devices. The objective of the project is to successfully assemble individual pieces of elements, such as different nanomaterials, biological compounds, and transducers into each other in order to study the role of nanomaterials in the assembled piece of work. For this purpose, zeolites and zeo-type materials with varying characteristics were synthesized; zeolite thin films were made and microfabricated to obtain different zeolite patterns from the synthesized materials; immobilization of biological compounds were investigated onto these thin films; and finally different types of electrochemical biosensors were fabricated using these individual pieces to obtain actual data out of the integrated devices in order to discuss the role and significance of the nanomaterials for biosensors. During the first phase of the project, micron and nano sized zeolite materials with homogenous particle size and varied Si/Al ratio were synthesized and modified by using different techniques. Throughout the project, all zeolites that were aimed to be produced were successfully synthesized and modified by either applying ion-exchange protocols or changing surface groups. During the second phase, zeolite particles were attached onto SiO₂ surfaces to obtain zeolite thin films. For this purpose, the quality of the obtained thin films, their potentiality to be used in biosensors and their use in cell attachment applications were investigated by studying the changing zeolite parameters such as the morphology, varying particle size, changing Si/Al ratio and thus the changing hydrophilic/hydrophobic surface properties of zeolites. The third phase of the project involves immobilization of different biological compounds onto the obtained zeolites and their thin films and then to actually gather biosensor data from the assembled piece of device. Next phase of the project involves obtaining performance characteristics of biosensors such as stability, life time, and inhibition using these assembled pieces. During the last stage of our project, all zeolite thin films that were microfabricated were subjected to cell attachment tests using osteoblasts and fibroblasts and the number of cells were counted using MTT tests. In this way, it was possible to control the number of zeolites in the micropatterns and it was found that this number directly correlated with the number of cells that were attached and their proliferation was investigated as a function of attached zeolites.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Bu sonuç raporunda, Tübitak tarafından 01/03/2009 ile 01/03/2012 tarihleri arasında, 1001 programı bünyesinde 108M576 numarası ile desteklenmiş olan, “Zeolit İnce Filmlerinin Biyosensör Uygulamalarına Yönelik Olarak Hazırlanması ve Araştırılması” başlığına sahip projemiz ile ilgili tüm teknik ve bilimsel çalışmaları özetlemekteyiz. Bu bağlamda yapılan çalışmalar beş ana başlık altında açıklanmaktadır.

Öncelikle, 1. bölümde, farklı özelliklerdeki zeolit ve zeo-tip malzemelerin sentezi, karakterizasyonu ve biyosensörlerdeki kullanımlarına yönelik olarak modifikasyonları anlatılmıştır. Bunu takiben 2. bölümde, proje bünyesinde tamamen ülkemiz olanakları ile fabrikasyonları tamamlanmış olan ve bundan önceki bölümde sentezi başarılı olan zeolitlerden tasarlanmış zeolit ince filmlerinin üretim detayları ve karakterizasyonları verilmiştir. 3. bölümde ise, sentezlenmiş zeolitlere ve bunlardan oluşan ince filmler üzerine yapılan protein immobilizasyonu çalışmaları detaylandırılmıştır. Bunu takiben 4. bölümde, bundan önceki bölümde öğrenilen ve yine başarılı bulunan biyomalzeme immobilize edilmiş zeolit ve ince filmleri, farklı elektrokimyasal biyosensörlere entegre edilmiş ve gerçek uygulamalara yönelik olarak veri toplanmıştır. Toplanan bu veriler, bugüne kadar FP-7 proje ortaklarımız tarafından yapılan geleneksel biyosensör verileriyle kıyaslanmış ve kullanılan zeolit nanomalzemelerinin biyosensörler için rolü ve önemi, tüm detaylarıyla, zeolit parametreleri de değiştirilerek kıyaslanmıştır. Son olarak da, yeni bir uygulama alanının potansiyeli, hidrofilik/hidrofobik özellik kazandırılmış zeolit ince filmleri üzerindeki hücre çalışmalarıyla son bulmuştur. Bu çalışmalar ve proje boyunca öğrenilmiş tüm ince film hazırlama teknikleri genel olarak çok daha farklı ve yeni uygulama alanlarının kapısını açmıştır. Yukarıda bahsi geçen hemen her başlıkla ilgili toplam olarak 6 adet yayıнымız vardır ve proje boyunca 3 yüksek lisans tezi tamamlanmış olup, bir diğeri de bu sene içerisinde tamamlanacaktır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Zeolit ve Zeo-Tip Malzemeler

Son yıllarda, protein ve nano malzemeler arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla, proteinlerin inorganik malzemeler üzerine immobilizasyonu oldukça önem kazanmıştır (MORTIER, 1978; CAMBLOR 1998; ZHU 1998; CHEN 1993; RAVISHANKAR, 1999). Protein-nanomalzeme ilişkisinin daha ayrıntılı anlaşılmasıyla, ileri uygulama alanlarında kullanılmak üzere, istenilen amaca yönelik olarak fiziksel ve kimyasal modifikasyonların yapılabildiği ideal yüzeylerin üretilmesi mümkündür. Bu amaç doğrultusunda, nanomalzemeler ve özellikle de nanogözenekli malzemeler çok önemli rol oynarlar. Yüksek yüzey alanları, moleküler boyuttaki gözenekli yapıları, değiştirilebilir yüzey özellikleri, yüksek ve kullanıma amacına yönelik iyon değiştirme kapasiteleri gibi kendilerine özgü pek çok özellikleri sebebiyle zeolit ve zeo-tip malzemeler, literatürde sıkça araştırılan inorganik malzemeler arasındadırlar. Ayrıca zeolitler, yüzey elektrostatik özellikleri ve Si/Al oranına bağlı olarak değiştirilebilen hidrofilik-hidrofobik özellikleri ile biyomoleküllerin bağlanabilmesi için oldukça uygun bir ortam yaratmaktadırlar. Bu özelliklerinden dolayı zeolitler, proteinlerin bağlanması ve biyosensör cihazlarında kullanılmaları amacıyla alternatif birer malzeme haline gelmişlerdir. Zeolitlerin aşağıda sıralanan özelliklerinin biyosensör verileri ve proteinlerin immobilizasyonu üzerindeki etkilerinin test edilmesi tam kapsamlı bir çalışma yapılmasına olanak sağlamaktadır. Önemli olan, bu etkilerin araştırılması sırasında, diğer etkilerin mümkün olduğunca sabit tutulmasıdır.

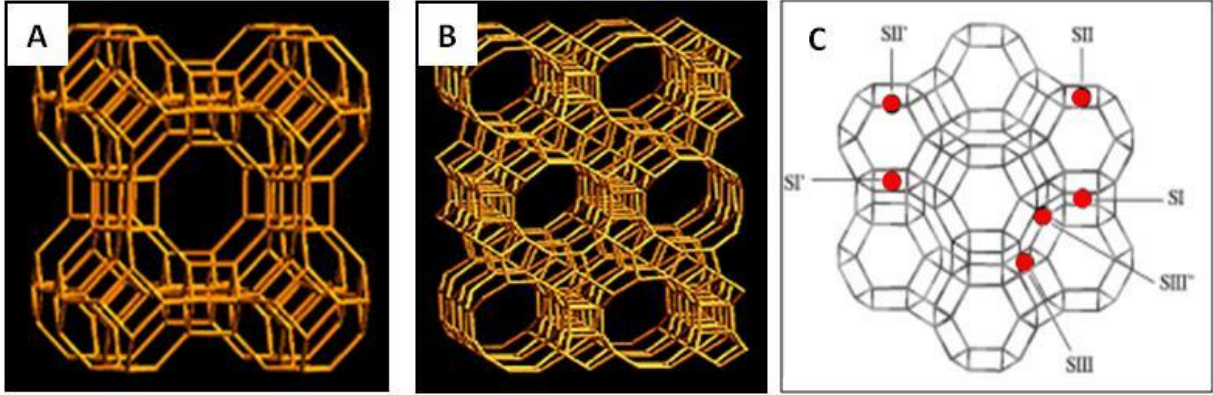
1. Si/Al oranı: Hidrofilik/hidrofobik özelliklerin yanısıra yüzeyin asidik özelliğini de değiştireceğinden biyosensör verileri üzerindeki en etkin kontrol faktörü olacaktır.
2. Parçacık boyutu: Toplam yüzey alanı değişeceğinden, enzim ve protein moleküllerinin elektrot yüzeyi ile etkileşimi üzerinde etkili olacaktır.
3. Yüzey yükü: Protein ve enzim moleküllerinin zeolit, yani zeolitlerden fabrike edilen elektrot yüzeyindeki aktif alanla etkileşimi üzerinde etkili olacaktır.
4. Gözenek boyutu: Mikrogözenekli bir zeolit yerine mezo gözenekli bir nanomalzeme (SBA-15) kullanımının yukarıdakilere benzer olarak proteinlerin aktif alanla etkileşimi üzerinde etkili olacaktır.
5. Zeolit içerisindeki iyonlar: Zeolitlerin gözeneklerindeki iyonların farklılaştırılması, dışındaki biyomoleküllerle aktif alan arasındaki dengeleri değiştirebilir.

Bahsi geçen tüm bu etkenlerin hiçbirinin literatürde kontrollü olarak değiştirilerek gerçek bir biyosensör uygulamasına etkisinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu kontrol mekanizmalarının, biyosensör ve hatta daha farklı uygulama alanlarındaki rolleri tam olarak tespit edilememiş ve bir avantaja dönüştürüldüğü minyatür cihazlar oluşturulamamıştır. Özet olarak, bu projenin zeolit ve zeo-tip nanogözenekli nanomalzemelerinin gerçek bir uygulamaya dönüştürüldüğü bir örnek olduğuna inanılmaktadır.

2.1.1 Zeolitlerin Yapısı

Zeolitler, temelde silisyum ile alüminyum oksitlerin silikat ve alüminat yapısında birleşmesi ile oluşan nano boyutlarda çok düzgün ve homojen gözenek yapısına sahip düzgün kristal yapılardır (CORMA, 2003). Üstelik yapılarında bulunan bu nanoboyutlu kanal ve dizilimler, hazırlanış kompozisyonuna bağlı olarak veya sonradan yapıya farklı elementler eklemek suretiyle çeşitlilik gösterirler (Şekil 1-A-B). İç yapılarındaki değiştirilebilir katyonlar, bu malzemelerin uygulama alanlarına yönelik olarak özellik kazanmalarını sağlar (Şekil 1-C). Bu

yapısal avantajların yanında zeolitlerin çok yüksek sıcaklıklara dayanabilmeleri ve mekanik anlamda dayanıklı olmaları da sonuçta elde edilecek komponentin termal ve mekanik dayanıklılığını azaltmayacak ve belki de arttıracaktır.



Şekil 1: Zeolit A (A), zeolit Beta (B) kristallerinin 3 boyutlu kafes yapıları ve zeolitlerde bulunan katyonların yerini gösteren bir örnek; zeolit X içindeki Na⁺ katyonları siyah toplarla gösterilmiştir (C) (www.iza-online.org).

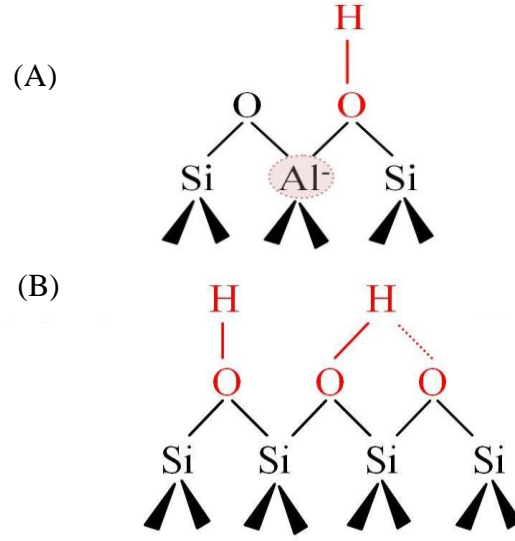
Zeolit kristallerinin geniş iç ve dış yüzey alanları, düzgün kanal yapıları ve bunların nanometrik seviyede kontrol altında tutulabilecek olmaları, farklı molekülleri bağlamak ve bu moleküllerin yüzeye veya kanallara kontrollü tutunmalarını sağlamak açısından onlara çok değişik ve ileri malzeme yapımına yönelik olanaklar yaratmaktadır (GONÇALVES, 1996; CLIMENT 2005; WANG, 2005; CHESTER, 2000; GHOSE, 1993; CHANG, 2007).

2.1.2 Zeolitlerin Asidik Özellikleri

Zeolit malzemelerinin kimyasal formüllerinde yapılan değişiklikler veya sentez sonrasında zeolitlere yapılan bazı uygulamalar (ısıtma işlemi, asitle yapılan karıştırma işlemleri) yüzeydeki asidik grupların niteliğini ve niceliğini etkilemektedir (BORADE, 1992; YOO, 2002). Genel olarak yüzey grupları iki başlık altında toplanmaktadır;

1. Al-(OH)-Si grupları (Brønsted asit grupları veya tetrahedral gruplar) (Şekil 2-A)
2. Yüzey Silanol grupları (Şekil 2-B)

Bahsi geçen bu gruplar, güçlü OH esneme bantları sebebiyle infrared spektroskopisi (FTIR) yöntemi kullanılarak 3610 (Al-(OH)-Si grupları) ve 3745 cm⁻¹ (Silanol grupları) bölgelerinden karakterize edilebilmektedirler. Bu özelliklerine ek olarak, bahsi geçen grupların katalitik reaksiyonlarda ve adsorpsiyon uygulamalarında malzemenin aktivitesini artırıcı ve azaltıcı özellikleri bulunmaktadır. Zeolitlerin asidik özelliklerinin biyosensör verilerinde de etkin olabileceğinden dolayı, bu asidik özelliklerin kontrollü modifikasyonunun biyosensör uygulamalarına etkisi, bu proje çerçevesinde çok detaylı olarak incelenmiş ve tüm veriler bundan sonraki bölümlerde açıklanmıştır.



Şekil 2: Zeolit yüzeyinde bulunan Brønsted asit bölgeleri (A) ve silanol grupları (B).

2.1.3 Zeolitlerin Protein Çalışmalarındaki Rolü

Zeolitler, nano-gözenekleri ve düzgün kristal yapıları, çok geniş yüzey alanları ve üstün performansları ile değişik uygulamalarda, örneğin iyon değiştirici ve katalizör olarak kullanılmaktadırlar. Zeolitlerin sahip oldukları bu düzgün kristal yapıları, kendilerini tekrar eden, çok düzgün iki veya üç boyutlu atomik boyuttaki kanalları ve özellikle de geniş yüzey alanları, biyolojik moleküllerin hedefe yönelik olarak bağlanabilirliğinin araştırılması için çok elverişli bir ortam oluşturmaktadır. Zeolitlerin, hedeflenen amaca yönelik sentezlenebilecek ve modifiye edilebilecek olmaları; yani gözenek büyüklüklerinin, Si/Al oranlarının (yüzeylerindeki kimyasal grupların ve hidrofilik/hidrofobik özelliklerinin kontrolü açısından) kontrollü olarak değiştirilebilir olması, farklı biyolojik moleküllerin immobilizasyon potansiyellerinin araştırılması ve daha da önemlisi, bunun sonucu olarak ortaya çıkacak olan cihaza yönelik ileri düzey malzeme araştırmaları için çok büyük avantaj sağlamaktadır.

Son yıllarda, protein ve nano malzemeler arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla, proteinlerin inorganik malzemeler üzerine immobilizasyonu oldukça önem kazanmıştır (TAVOLARO, 2007; TAVOLARO 2009). Protein-nanomalzeme ilişkisinin daha ayrıntılı anlaşılmasıyla, ileri biyoteknolojik araştırmalarda kullanılmak üzere, istenilen uygulamaya göre fiziksel ve kimyasal değişikliklerin yapılabildiği ideal yüzeylerin üretilmesi mümkündür. Kendisine özgü pek çok özellikleri sebebiyle zeolit ve zeo-tip malzemeler, literatürde bu amaçla sıkça kullanılan inorganik malzemeler arasındadırlar. Bütün bu potansiyel çalışma alanlarına rağmen, yukarıda da bahsi geçen zeolite ait farklı parametrelerin kontrollü olarak değiştirilmesinin biyomolekül bağlanmasına ve biyosensör verilerine etkisi çalışılmamıştır. Bu konuyla ilgili sadece hipotezler bulunmaktadır. Bu proje çerçevesinde zeolit ve zeo-tip malzemelerin değiştirilebilir tüm özellikleri büyük bir dikkatle kontrollü bir şekilde değiştirilmiş ve pekçok farklı proteinin immobilizasyonu ve yine 3 farklı çeşit elektrokimyasal biyosensör verilerine etkileri tüm detaylarıyla ilk defa bu proje çerçevesinde incelenmiştir.

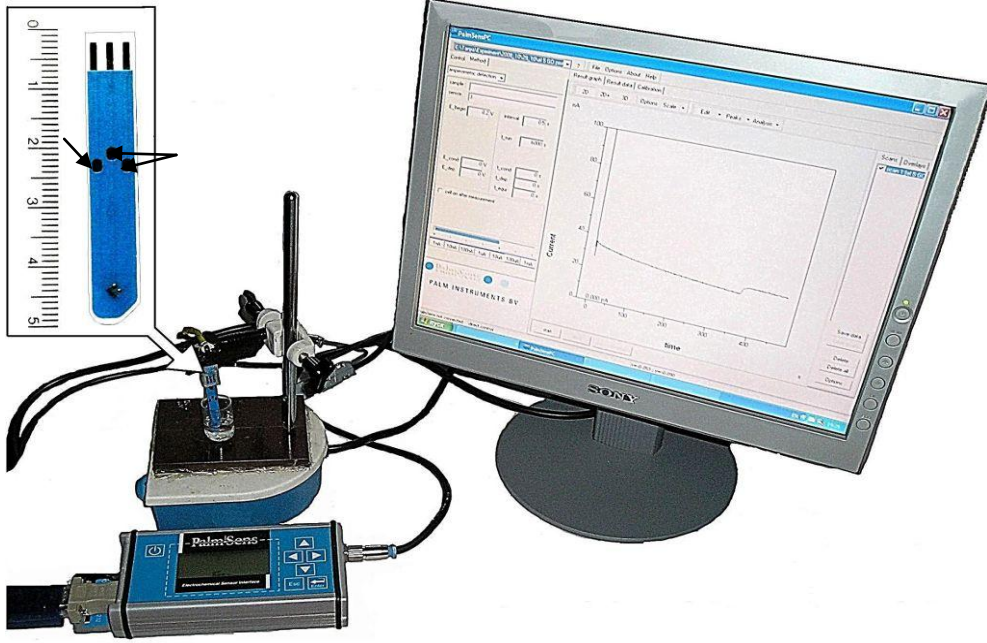
2.2 Elektrokimyasal Biyosensörler

Günümüzde, çevremizde bulunan toksik maddeleri ve biyolojik sıvılarda veya dokulardaki araştırılmak istenen biyolojik molekülleri ölçebilecek komplike analitik sistemler (gaz ve sıvı kromatografi cihazları gibi) bulunmaktadır. Bu sistemlerin ölçüm yapılması hedeflenen alanlara taşınmaları zor ve hatta imkansızdır. Ayrıca bu sistemlerin sensör amaçlı kullanılması hem zor hem de hiç pratik değildir, çünkü bütün bu işlemler için gerekli olan diğer gereçlerin de (gaz tüpleri gibi) ölçüm yapılması istenen yere taşınması güç, tüm bunların gerçekleşmesi için yapılması gereken masraf çok, analiz zamanları da uzun sürebilmektedir. Günümüzde kullanılmakta olan sensörler yüksek seçicilik, güvenilirlik ve sadece hedeflenen organik/biyolojik komponentlerin ölçülmesi konularında zayıf kalmaktadırlar (DZYADEVYCH, 2008). Her anlamda etkin bir biyosensörün geliştirilmesi için, yeterli miktarda enzimin ya da biyolojik malzemenin yüzeye immobilizasyonu gerekmektedir. Dolayısıyla, yüksek performanslı bir biyosensörün geliştirilmesi için gerekli parametrelerden biri de, immobilizasyon için kullanılan yüzey alanının artırılmasıdır. Bunu yapmak için de nanomalzemelerin biyosensörlere entegrasyonu çok önemli ve gereklidir. Bu proje kapsamında geliştirilmiş olan nanomalzeme-cihaz entegrasyonu çalışmaları sayesinde, mevcut olan teknolojiler minyatürize edilerek biyosensörlerin kullanım alanları biraz daha kolaylaştırılmış ve hedefe yönelik analiz teknikleri nanomalzemelerin kontrollü modifikasyonu ile daha da mümkün kılınmıştır.

Elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik bir bileşen ve bu kısımda gerçekleşen biyolojik reaksiyondan gelen sinyali, elektriksel sinyale çevirebilen ikinci bir bileşenden oluşur. Bir biyosensörün amacı, bir veya bir grup analitin (analiz edilecek madde) miktarı ile orantılı olarak sürekli ve sayısal bir grup elektrik sinyali üretmektir. Proje boyunca zeolitlerin biyosensör uygulamalarında kullanılmasına yönelik değişik malzemeler ve biyosensör çeşitleri denenmiştir. Bu alanda en çok kullanılan biyosensörler, elektrokimyasal biyosensörler grubundaki en temel sensör çeşitleri olan "Amperometrik", "İyon Seçici Alan Etkili Transistör-ISFET" ve "Kondüktometrik" biyosensörleridir (JAFFREZIC-RENAULT, 2008; LI, 1994; WANG, 1988). Proje teklifinde de bahsedildiği gibi, tüm bu biyosensör çeşitleri ODTÜ laboratuvarımızda FP-7 proje ortaklarımızla ortak çalışmalarımız sayesinde sıfırdan kurulmuş, test edilmiş ve ilk defa zeolit ve zeo-tip nanomalzemelerinin bu kurulan cihazların "çevirici birimlerine" (transducer) entegre edilerek çok ilginç ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Dolayısıyla yine ilk defa olarak bir nanomalzemenin ve özellikle de gözenekli nanomalzemelerin hangi özelliklerinin biyosensör çalışmalarında nasıl bir rolü olabileceği üzerine bir seri veri alınmıştır.

2.2.1 Amperometrik Biyosensörler

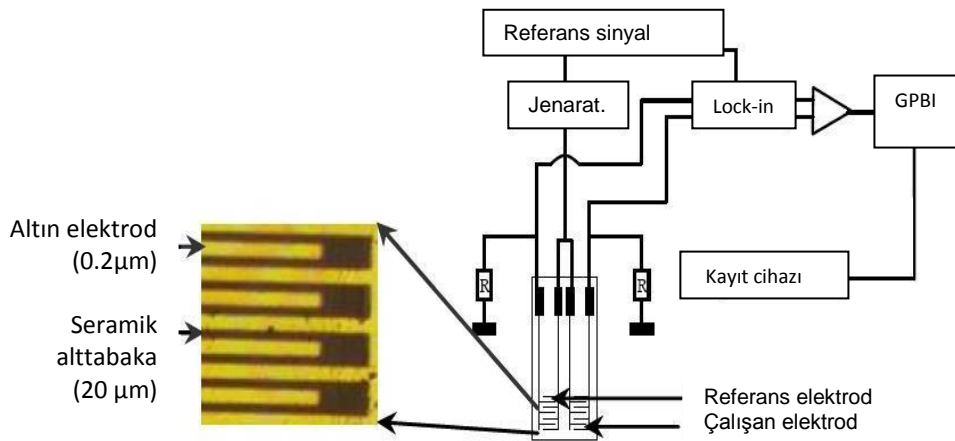
Proje boyunca çalışılan elektrokimyasal biyosensör tiplerinden biri ise amperometrik tip biyosensörlerdir. Çalışmanın bu kısmında kullanılan amperometrik tip biyosensörlerin çalışma prensibi belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Sözkonusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen veya indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonudur. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde yararlanır. İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılmasının ISFET tip sensörlerden en büyük farkı, ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir. Sistemin kurulum şekli ve ölçüm esnasında kullanılan elektrot Şekil 3'de gösterilmektedir.



Şekil 3: Amperometrik Deney Sistemi

2.2.2 Kondüktometrik Biyosensörler

Çalışmanın bu kısmında kullanılan kondüktometrik tip biyosensörlerin çalışma prensibi, iyon oluşumunu engelleyici sıvı bir ortam içerisinde, biri çalışan diğeri referans olan iki elektroda potansiyel uygulanması sonucu gerçekleşen iyon değişiminin ölçülmesine dayanmaktadır. Asıl ölçülen iki elektrot arasındaki potansiyel farktır. Kondüktometrik düzenek Şekil 4'de gösterilmektedir.



Şekil 4: Kondüktometrik Deney Sistemi

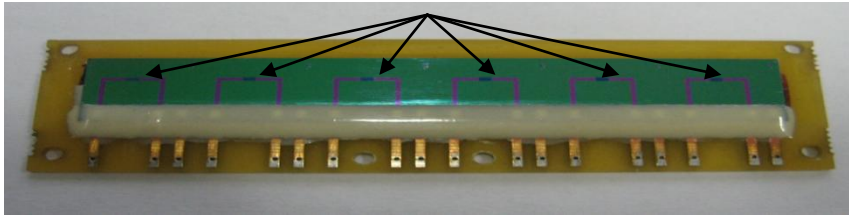
Şekil 5'de ise, kondüktometrik tip biyosensörler ile yapılan çalışmaların ODTÜ laboratuvarımızda da aynı şekilde devam edebilmesi amacıyla Ukraynalı ortaklarımızın da yardımıyla, ODTÜ laboratuvarımızda da kurulmuş kondüktometrik sistem gösterilmektedir. Proje boyunca yapılan kondüktometrik çalışmalarda, şimdiye kadar ilk defa farklı yöntemler kullanılarak farklı zeolitlerden farklı sonuçlar alınmış ve elde edilen bilgiler literatürde yayınlanmıştır.



Şekil 5: ODTÜ Laboratuvarımızda Kurulan Kondüktometrik Sistem.

2.2.3 ISFET Tip Biyosensörler

Projenin bu döneminde kullanılan ISFET tip biyosensörlerin çalışma prensibi, çalışma ve referans elektrotları arasındaki potansiyel farkının ölçülmesine dayanır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlar. Bu tip biyosensörlerde kullanılan temel sensörler pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyon ya da katyonlara duyarlı iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz duyarlı elektrotlardır. Bu çalışmada kullanılan sensörler pH'a duyarlı ISFET sensörleridir. ISFET tip biyosensörlerde kullanılan çok kapılı elektrotlar Şekil 6'da gösterildiği gibidir. Çok kapılı bu sistemler sayesinde birçok veri aynı anda alınabilmekte ve sistemin bağlı olduğu program tarafından bilgisayar ekranından okunabilmektedir.



Şekil 6: ISFET tip biyosensörlerde kullanılan elektrotun şematik görünüşü. Oklarla işaretlenmiş bölgeler, membranların immobilize edildiği alanları göstermektedir. Tüm bu elektrotlar IRSES projemiz kapsamındaki Ukrayna'lı ortaklarımız tarafından tasarlanıp yapılmıştır.

2.2.4 Zeolitlerin Biyosensör Uygulamalarındaki Kullanımı

Enzimlerim immobilize edilerek hazırlandığı biyosensörler, daha az enzim kaybı, daha fazla aktivite ve stabilite artışı ile geleneksel biyosensörlere göre çok daha verimlidir. Günümüzde, enzimlerim immobilizasyonu ile hazırlanmış elektrotların dizaynı ve bu elektrotlara tutturulan nanomalzemelerin biyosensör performansı üzerindeki etkisi sıklıkla araştırılmaktadır (AKATA, 2004; SOY, 2010). Bahsi geçen biyosensör çalışmalarındaki esas amaç, enzim immobilize edilmiş elektrotların stabilitesini ve performansını mümkün olduğu kadar arttırmaktır. Bu artış ise elektrot yüzeylerinin zeolitik malzemeler ile modifiye edilmesiyle

sağlanabilmektedir. Böylelikle, zeolitlerin biyosensör performansı üzerine etkisi, proteinlerin elektrot yüzeyine tutturulmuş zeolit malzemeler üzerine immobilizasyonu aracılığıyla araştırılabilmektedir. Bahsi geçen elektrotların, biyosensör mikrocihazlarına entegrasyonu aracılığıyla da biyosensör performansında istenilen değişiklik sağlanabilmektedir.

2.3 Zeolitlerden İnce Film Yapım Teknikleri

Zeolitlerden ince film üretim teknikleri temel olarak üç sınıfta toplanmaktadır. Bunlar döndürerek kaplama, ultrasonik yöntemle karıştırma ve doğrudan tutturma yöntemi olarak adlandırılabilir. Bu yöntemlerle, farklı kaplama oranlarında, farklı düzenlilikte ve farklı kalınlıklarda ince filmler oluşturulabilmektedir. Zeolitlerden ince film yapım tekniklerinin araştırılması konusu, projemiz çerçevesinde söz verildiği (Bölüm 2.5) gibi, tüm bu yöntemlerin kullanımıyla SiO₂ ve cam yüzeyler üzerinde ilk defa olarak bu kadar kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve bulgularımızdan bir adet yayın da yapılmıştır (ÖZTÜRK, 2009). Bu yöntemlerin sonucunda oluşmuş zeolit ince filmlerindeki zeolitlerin bağlanma sıklıkları, organizasyonları ve zeolit filminin kalınlık kontrolü karşılaştırılmıştır.

Zeolitlerle yapılan bu çalışmaların çeşitli mikrofabrikasyon cihazlarıyla entegrasyonu ile yüzeyler üzerinde nano-mikrodesenler oluşturmak mümkündür. Bu amaçla çeşitli litografi sistemleriyle zeolit ince film üretim teknikleri birleştirilerek bu proje kapsamında ilk defa olarak istenilen ebatlarda ve şekillerde zeolit mikrodesenleri oluşturulmuş ve yayınlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda sıklıkla kullanılan litografi sistemlerinin başında elektron demet litografisi ve fotolitografi gelmektedir. Bu sistemlerden elektron demet litografisi daha küçük alanlarda mikrodesenler oluşturmak ve tek sıra zeolitler kadar küçük yapıların oluşturabilmesini sağlamakla beraber, fotolitografi sistemi, elektron demet litografisine göre çok daha geniş alanlarda mikrodesenler üretimini sağlamakta ve çok daha kısa sürede, çoklu üretim yapma imkanı sağlamaktadır. Projemiz kapsamında bütün bu farklı yöntemler ve zeolit nano-mikrodesen oluşum çalışmaları ilk defa olarak yapılmıştır. Buna ek olarak, yine ilerideki bölümlerde de detayları anlatılan hücre tutunum çalışmaları yine ilk defa olarak bu desenli zeolit ince filmler üzerinde McGill Üniversitesi ortaklığı ile denenmiş ve çok ilginç sonuçlar elde edilmiştir (Bölüm 4.6).

2.4 Proje Başlangıcındaki Öngörüler ve Amaçlar

Zeolit kristallerinin geniş iç ve dış yüzey alanları, düzgün kanal yapıları ve bunların nanometrik seviyede kontrol altında tutulabilecek olmaları, farklı molekülleri bağlamak ve bu moleküllerin yüzeye veya kanallara kontrollü tutunmalarını sağlamak açısından onlara çok değişik ve ileri malzeme yapımına yönelik olanaklar yaratmaktadır. Zeolitlerin toz halinde sentezlenmeleri, biyosensör gibi cihaz yapımına yönelik araştırmalar için dezavantajlı olmaktadır. Teklif edilen bu projenin amacı, önceden çok farklı morfoloji ve özelliklerde sentezlenmiş yine farklı tipteki zeolit mikron- ve nanokristallerinin özellikle SiO₂ üzerinde organize bir şekilde tutturulmalarını sağlamaktır. Bu tutunumun sağlam olması, yani herhangi bir sonikasyon işleminden sonra yüzeyden kopmamaalarının sağlanması, hedeflenen amaçların başında gelmiştir. Bu dizilimin başarılı olmasındaki anahtar faktörlerden biri, sentezlenen zeolitlerin parçacık boyutlarının çok homojen olması gerekliliğidir. Diğer bir faktör ise, yüzeye dizilimlerinin ve tutunumlarının gerçek anlamda kontrollü olmasının altında yatan faktörlerin optimize edilmesidir. Bu aşamada, mikrofabrikasyon tekniklerinin de uygulanmasıyla zeolitlerin SiO₂ yüzeyindeki tutunumlarının tam anlamıyla kontrol edilebilmesi ile ilgili çalışmalar öncelik kazanmıştır. Bu amaç için elektron demet litografi sistemiyle zeolitlerin SiO₂ yüzeyi üzerindeki organizasyon sınırları test edilmiş ve hedeflenen amaca göre tutunum parametreleri ve zeolit özellikleri optimize edilmiştir.

Bu projenin sunulmasının bir diğer hedefi de, zeolitlerin ve zeo-tip malzemelerin getirdiği tüm avantajların (seçicilik, nano gözenekli yapılar, yüksek yüzey alanı, kontrol edilebilir topolojiler) nanoteknoloji ve nanobiyoteknoloji alanlarında ileri düzey bir cihaz yapımı aşamasına entegrasyonlarının sağlanmasıyla, zeolitlerin bu alanlara yönelik kullanımlarına geçiş sağlayacak araştırmaların başlatılmasıdır. Sadece zeolit tozları üzerinde sensörlere yönelik çok olumlu sonuçlar alınmasına rağmen, onların cihaz yapımında kullanımlarını sağlayacak çalışmalarda rol oynayabilecekleri (SiO_2 gibi) yüzeylerde 'kontrollü' tutunumlarına yönelik araştırmaların çok yeni olması ve özellikle de zeolitlerden oluşturulmuş ince filmlerin kullanımıyla yapılmış olan ve gerçek anlamda hizmet veren bir cihazın hiç bulunmamasından dolayı, bu proje çerçevesinde yapılmış çalışmaların bu alana önemli bir yenilik getirmiş olduğu düşünülmektedir.

Cihaz yapımı aşamasındaki eksiklik genel olarak bu seviyedeki bir çalışmanın tam anlamıyla birden çok disiplin içeren ortak bir çalışma olmasındaki gereksinimden dolayı olabilir. Bu projede, FP7 projemiz çerçevesinde de bizimle ortak olarak çalışmış olan ve herbirinin biyomedikal, fizik, kimya ve biyoloji gibi farklı alanlarda uzmanlık sahibi oldukları 5 farklı ülkeden farklı araştırmacılarla çalışma fırsatımız olmuştur. Böylece genel anlamda zeolite tipi nanomalzemelerin biyosensörlere entegrasyonuna katacağı düşünülen avantajların araştırılması mümkün olmuştur. Bu proje, FP7 projesi kapsamındaki çalışmalarımızda bizi her anlamda desteklemiş ve çok daha büyük başarılar kazanmamıza yardımcı olmuştur. Çalışmalarımız sonucunda, nanomalzemelerin entegrasyonundan oluşturulmuş biyosensörlerin, mevcut teknolojide bulunan malzemelere oranla daha yüksek bir seçicilik ve duyarlılık gösterdikleri ilk defa tarafımızca bulunmuştur.

Yukarıda bahsedilen amaçlar ve bu amaçlara ulaşmak için proje başvurusunda söz verilen aşamalar 4 farklı alandan oluşmaktadır. Bunlar:

1. Farklı çeşitlerdeki mikron- ve nanoboyuttaki zeolit parçacıkları sentezlenmesi:
 - 1.1. Zeolitlerin parçacık boyutlarının homojen olması.
 - 1.2. Hedefe yönelik olarak farklı yapılarda, mikron veya nano boyutlarda ve farklı Si/Al oranlı zeolitler sentezlenmesi.
 - 1.3. Sentezlenen tüm zeolitlere biyolojik malzemelerin bağlanmasına yönelik olarak farklı yüzey modifikasyon teknikleri (kimyasal bağlayıcıların kullanılmasıyla) uygulanması.
 - 1.4. Sentezlenen ve modifikasyona uğrayan tüm malzemelerin karakterizasyonu SEM, EDS, NMR, XRD, XRF yöntemleriyle yapılması.
2. Sentezlenmiş zeolitlerden SiO_2 üzerinde ince film yapımının araştırılması:
 - 2.1. Zeolitlerin biyosensörlere yönelik olarak hedeflenen kanallarının/yüzeylerinin substrat yüzeylerine dik olacakları şekilde tutturulmaları için gerekli yöntemlerin araştırılması.
 - 2.2. Zeolitlerin tutunum sıklıkları ve tutunma güçlerinin araştırılması ve amaca yönelik olarak optimize edilmesi.
 - 2.3. Sentezlenmiş farklı zeolitlerden ince film yapımı aşamasında, zeolitlerin şekil farklılıkları, boyut farklılıkları ve Si/Al oranlarındaki farklılardan dolayı değişiklik gösterecek hidrofilik-hidrofobik yüzey özellikleri gibi faktörlerin hem ince film yapım kalitesi üzerindeki etkilerinin, hem de biyosensör olarak kullanım potansiyellerine etkilerinin araştırılması.
 - 2.4. İnce filmlerin XRD, SEM, ve basit analitik yöntemlerle incelenmesi.
 - 2.5. Mikrofabrikasyon yöntemiyle yüzeylere kontrollü bir şekilde zeolit ve dolayısıyla biyomolekül tutunumu sağlanması ve bu işlemin sınırlarının temel olarak SEM ile test edilmesi.
3. Sentez çalışmaları sonucunda başarıya ulaşılmış tüm zeolit tozlarına ve onlardan oluşturulmuş ince filmler üzerine farklı biyolojik malzemelerin immobilizasyonuna çalışılması. Zeolitlerin immobilizasyonları sonucunda elde edilmiş verilerin geleneksel

- yöntemlerle yapılmış immobilizasyon çalışmalarıyla kıyaslanması.
4. Farklı aşamalarda oluşturulmuş ve başarıya ulaşılmış tüm verilerin biraraya getirilip birbirlerine entegrasyonunun sağlanmasıyla ilk biyosensör prototiplerinin oluşturulmaya başlanması. Bundan önce bahsedilen tüm aşamalar da proje sonlanana kadar devam etmiştir. Bu aşamadaki temel çalışmalar oluşturulan mikrodesezneli veya desensiz en başarılı zeolit ince filmleri üzerine biyomolekül bağlanması çalışmaları olmuştur. Bunların da bir başka örneği literatürde bulunmamaktadır.

2.5 Projenin Özgün Değeri

Teklif edilen bu projede, zeolitlerin ve zeo-tip malzemelerin sentez yöntemlerinin spektrumunun genişletilmesi ve farklı yüzeylerle entegrasyonlarının amaca yönelik olarak araştırılmasıyla, biyosensör teknolojilerindeki kullanımları ilk defa olarak bu kadar kapsamlı bir şekilde ve interdisipliner bir grup tarafından araştırılmıştır. Sonuç olarak, proje teklifinde de söz verildiği gibi, bu çalışma boyunca mevcut sistemlerden daha selektif, daha güvenilir, daha çabuk sonuç veren ve daha avantajlı olacağına inanılan yepyeni, entegre ve cihaz yapımına yönelik bir çalışma projesi gerçekleşmiştir. Organize olmuş zeolit kristallerinden oluşmuş bir ince film üzerinde bugüne kadar yapılmış hiçbir immobilizasyon ya da biyosensör çalışması bulunmamaktadır. Bu konu ile ilgili tüm çalışmalar ilk defa grubumuz tarafından yapılmıştır. Proje çerçevesinde toplam 6 adet yayın yapılmıştır. Hazırlık aşamasında olan da 1 adet yayınıımız bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar şu şekilde özetlenebilir:

1. Literatürdeki biyosensörlere yönelik çalışmalar, zeolitlerin mikron veya nano boyutta olmalarının, Si/Al oranı farklılıklarının, farklı tip zeolitlerin ve dolayısıyla farklı kanal büyüklüklerinin etkileri tam kapsamlı olarak araştırılmaksızın sadece toz zeolitler üzerinde olmuştur. Bahsedilen etkiler teklif edilen proje çerçevesinde incelenmiş ve bu zeolitlerden SiO₂ ve cam üzerinde organize bir şekilde oluşturulmuş ince filmlerin hem yapım aşamaları, hem de biyosensör teknolojileri için kullanım potansiyelleri ilk defa olarak araştırılmıştır (**ÖZTÜRK, 2009; GALİOĞLU 2010; KİRDECİLER 2011**).
2. Farklı yüzeylerdeki zeolit tutunumlarının sıklıkları ve güçlerine etki eden faktörler ve özellikle de mikrondan nano boyuta geçişin tüm bunlar üzerindeki etkileri ilk defa olarak bu kadar kontrollü yüzeylerde ve farklı tip zeolitler üzerinde çalışılmıştır.
3. Elektron demet litografisi yöntemiyle şekil verilecek zeolit ince film yüzeyleri ilk defa gerçekleştirilmiştir. (**ÖZTÜRK, 2009**)
4. Toz zeolitler ve bu zeolitlerden oluşturulmuş ince filmler üzerinde biyolojik moleküllerin immobilizasyonu; immobilizasyon potansiyellerinde karşılaşılan farklılıkların ne oldukları ve hangi faktörlerden dolayı farklılık gösterdikleri ilk defa olarak karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır (**SOY, 2010; GORUISHKINA 2010**).
5. Belki de en önemli ve benzeri olmayan çalışmalar, elde edilen tüm bulgulardan gerçek anlamda ve yine gerçek uygulamalara yönelik olarak ilk denemelerin yapılması çalışmalarıdır. Bunların gerçekleşmesinde FP7 çerçevesinde kabul edilmiş ortaklığımız ve bu projenin desteklediği araştırmacı değişimlerinden elde edilen bilgi ve deneyimlerin katkıları şüphesiz çok önemli olmuştur. (**SOY, 2012**)

2.6 Proje Raporunun Yapısı

Bu projede yapılan çalışmalar takip eden ve farklı iş paketlerinden oluşan üç ana bölümde (Bölüm 3, 4, 5) sunulmuştur. Bölüm 2.4'de özetlenen ve proje teklifinde söz verilen öngörüler ve amaçların herbiri; yani zeolit sentezi (Bölüm 4.1), yüzey modifikasyonu (Bölüm 4.2), ince film yapımı (Bölüm 4.3), zeolitlerdeki biyomolekül tutunumu ve bağlanması çalışmaları (Bölüm 4.4), biyosensör verilerinin eldesi çalışmaları (Bölüm 4.5) ve son olarak nano/mikro-fabrikasyonu yapılmış ince filmlerden gerçek uygulamalara yönelik çalışmalar (Bölüm 4.6), ayrı birer bölüm olarak tek tek açıklanmıştır. Bütün bu açıklamaların sonunda da konuyla ilgili öneriler getirilmiştir.

BÖLÜM 3

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Zeolit ve Zeo-Tip Malzemelerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Proje boyunca, biyosensör, ince film ve hücre tutunum çalışmalarında kullanılmak üzere, farklı özelliklere sahip zeolit ve silikalit örnekleri hidrotermal sentezleme yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Sentezi başarıyla gerçekleştirilen örneklerin karakterizasyonları Taramalı Elektron mikroskobu (SEM), X-Işını Difraktometresi (XRD), Parçacık Boyut Analiz Cihazı (PSD), Zeta Potansiyel ve Yüzey Alanı ve Gözenek Boyutu Cihazı (BET) yöntemleri kullanılarak ODTÜ-Merkez Laboratuvarında yapılmıştır. Cihazlar ile ilgili detaylar <http://www.merlab.metu.edu.tr/laboratuvarlar> adresinden bulunabilir. Proje boyunca sentezlenmiş partiküllerin listesi ve sentez koşulları Tablo 1'de verilmekte ve bahsi geçen örneklerle ait ayrıntılar bir sonraki başlıkta ayrıntılı olarak anlatılmaktadır.

Tablo 1: Çalışılan zeolitlerin sentez koşulları.

| Zeolit tipi | Sentez Formülü | Sentez Sıcaklığı | Fırınlama süresi |
|------------------------------|--|------------------|------------------|
| Zeolit A 2 µm | 1.94 Na ₂ O : Al ₂ O ₃ : 0.84 SiO ₂ : 194 H ₂ O: 2 TEA | 100°C | 2-4 gün |
| Zeolit A 4 µm | 1.94 Na ₂ O : Al ₂ O ₃ : 0.84 SiO ₂ : 194 H ₂ O: 4 TEA | 100°C | 2-4 gün |
| Zeolit A 5 µm | 1.94 Na ₂ O : Al ₂ O ₃ : 0.84 SiO ₂ : 194 H ₂ O: 6 TEA | 100°C | 2-4 gün |
| Zeolit Beta (Si/Al=x) | 2.2 Na ₂ O : Al ₂ O ₃ :x SiO ₂ :4.6 (TEA) ₂ O :444 H ₂ O | 140 °C | 5-7 gün |
| Silikalit-70 | 9TPAOH:25SiO ₂ :408H ₂ O:100EtOH | 90 °C | 20 saat |
| Silikalit-500 | 5 TEOS :1 TPAOH :500 H ₂ O | 140 °C | 24 saat |
| SBA-15 | 1TEOS:0,017P123:0.6Mesitylene:KCl: 5,85HCl:165 H ₂ O | 100 °C | 24 saat |

Zeolit A, literatürde her türlü çalışma için çok fazla kullanılan bir malzemedir. Düşük Si/Al orana sahip olmasından dolayı (Si/Al~1) diğer zeolit tiplerinden farklılıklar gösterebilir. Si/Al oranı geniş tutulamadığından, bu tip bir zeolit üzerinde çalışılabilecek en anlamlı parametre parçacık boyutu olacaktır. Bu sebeple, laboratuvarımızda 4 µm, 8 µm ve 11 µm boyutlarındaki zeolit A'lar, yukarıdaki sentez koşullarında ve kimyasal formüllerinde değişiklikler yapılarak üretilmiştir. Tipik bir sentezde, Al kaynağı olarak sodyum hidroksit, sodyum alüminat deionize su ile karıştırılarak, 100 °C'lik fırında 50 dakika tutularak elde edilmiştir. Daha sonra farklı boyutlarda zeolit A elde etmek için, yapının temel yapı taşı görevini gören trietanolamin Tablo 1'den hesaplanan oranlara göre Al kaynağına eklenmiştir. Si kaynağı ise, sodyum metasilikat pentahidratın su ile karıştırılmasıyla oluşturulmuş ve Al kaynağına katılıp, karıştırılmıştır. Reaksiyon 1-4 gün arası 100°C'lik fırında gerçekleşmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen kristaller bazik bir solüsyon içerisinde bulunduğundan, örnekler 3-4 kere saf suyla sentrifüj edilip, en son döngüden sonra 70 °C'lik fırında

kurutularak toz halinde elde edilmiştir. Üretilen örnekler SEM, XRD ve PSD yöntemleriyle karakterize edilmiştir.

Zeolit Beta, literatürde diğer zeolit tiplerine oranla daha az çalışılmaktadır. Bunun sebebinin sentezinin ve/veya hazır olarak bulunmasının çok daha zor olmasıdır. Ancak bu zeolit, yüksek Si/Al oranlı zeolit tipleri içinde yer almakla beraber çok geniş bir Si/Al aralığında sentezlenebilmektedir. Bu oran hem yüzeydeki –OH gruplarının sayısal ve niteliksel dağılımını etkilemekte, hem de hidofilik/hidrofobik özellikleri değiştirmektedir. Bu iki özellik de biyosensör uygulamaları için önemli olabileceğinden, ODTÜ laboratuvarımızda Si/Al oranları 30, 50, 60 ve 120 olan zeolit Beta örnekleri, kimyasal formülleri değiştirilerek yukarıda belirtilen koşullarda sentezlenmiştir. Tipik bir mikron Beta sentezinde, Al kaynağı için sodyumhidroksit ve sodyumalüminat deiyonize su içerisinde çözülerek 100°C'lik fırında 50 dakika tutularak hazırlanmıştır. Bu Al kaynağına temel yapı taşı ajanı olan tetraetilamonyumhidroksit eklenmiştir. Farklı Si/Al oranlarına sahip zeolit Beta elde etmek için Tablo 1'deki molar formüllerden hesaplanan oranlarda Ludox, Al kaynağına eklenmiş ve karıştırılmıştır. Hazırlanan jel otoklavlara alınarak 120 °C'lik fırında 7 gün tutulmuştur. Nano Beta sentezinde ise, alüminyumisopropoksit ve tetraetilamonyumhidroksit deiyonize su içerisinde çözülmüştür. Farklı Si/Al oranlarına sahip zeolit Beta sentezlemek için, Tablo 1'den hesaplanan değerlere göre, Si kaynağı olarak TEOS bu solüsyona eklenmiş ve 100 °C'lik fırında 14 gün reaksiyon için bırakılmıştır. Reaksiyon sonucunda elde edilen kristaller bazik bir solüsyon içerisinde bulunduğundan, örnekler 3-4 kere saf suyla santrifüj edilip, en son döngüden sonra kurutularak 70 °C'lik fırında toz halinde elde edilmiştir. Üretilen örnekler SEM, BET, Zeta Potansiyel ve XRD yöntemleriyle karakterize edilmiştir.

Silikalit örnekler biyosensörler için en çok araştırılan örneklerdir. Tamamen hidrofobik olmalarından dolayı farklı çalışmalarda kullanılmaktadırlar. Bu çalışma boyunca projemizde de bu örnekler farklı boyutlarda sentezlenerek yüzey alanlarındaki farklılıkların pratik uygulamalar için bir öneminin olup olmayacağı araştırılacaktır. Bu amaç için, 500 nm ve 70 nm boyutlarındaki iki silikalit örneği farklı kimyasallar kullanılarak, farklı sentez sıcaklıkları ve fırınlama sürelerinde sentezlenmişlerdir (Tablo 1). Silikalit kristalleri molar kompozisyonu 1 TPAOH : 4 TEOS : 350 H₂O olan karışımdan hidrotermal olarak sentezlenmiştir. Bu sentezde, tetraetilortosilikat (TEOS), şekil verici ajan (SDA) olan tetrapropil amonyum hidroksit (TPAOH) ile saf suda 5 dakika el ile karıştırılmıştır. Oluşan beyaz ve yoğun jel, 10 mL hacimli içi Teflon kaplı, paslanmaz çelik otoklavlara yerleştirilmiştir. Statik sentez 1 gün 403 K sıcaklıkta gerçekleştirilmiş olup, sentez ürünlerinin oda sıcaklığına soğuması beklenmiştir. Ardından filtreden geçirilen ürün, saf su ile yıkanmış ve 70 °C'de bir gece kurutulmuştur.

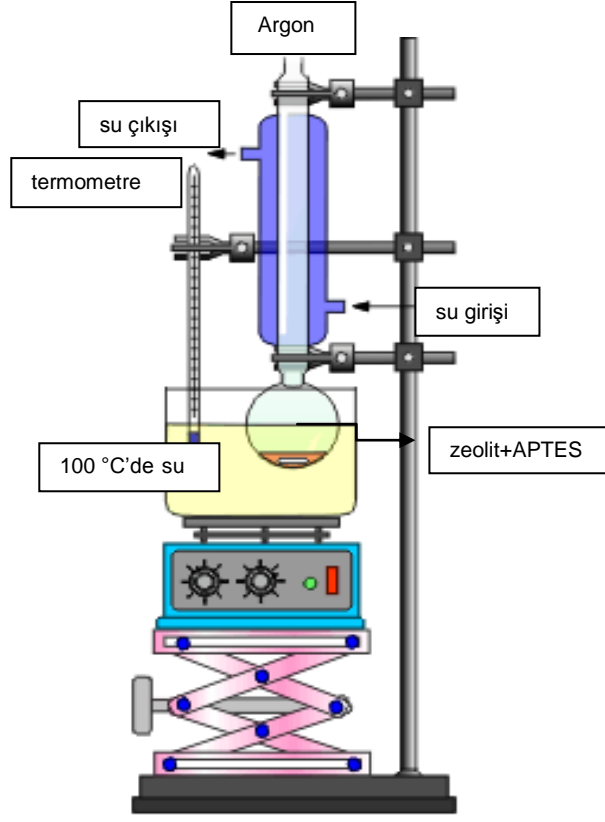
SBA-15 parçacıkları molar formülü 1 TEOS : 0.017 P123 : 0.6 Mesitylene : 1 KCl : 5.85 HCl : 165 H₂O olan karışımdan hidrotermal yöntem ile sentezlenmiştir. Hazırlanışı sırasında potasyum klorit, hidroksil klorit, mesitilen ve tetraetilortosilikat (TEOS), saf su içerisinde çözülmüş ve 5 dakika elde çalkalanmıştır. Oluşan beyaz yoğun jel 10 mL hacimli içi Teflon kaplı, paslanmaz çelik otoklavlara yerleştirilmiş, 35 °C'de 24 saat bekletilmiştir. 24 saatin ardından, otoklavlar 100 °C'de 24 saat bekletilerek sentez tamamlanmıştır. Sentez ürünlerinin oda sıcaklığına soğuması beklenmiştir. Ardından filtreden geçirilen ürün, saf su ile yıkanmış ve 70 °C'de bir gece kurutulmuştur. Sentezlenen örneklerin karakterizasyonu SEM ve BET kullanılarak yapılmıştır.

3.2 Yüzey Modifikasyonu ve Karakterizasyonu

Yukarıda sentez koşulları verilmiş zeolit örneklerinin yüzey grupları 3-Aminopropiltriethoxisilan (APTES) kullanılarak aşağıda şematik olarak anlatılan geri akım yöntemiyle değiştirilmiş ve

karakterizasyonları ODTÜ-Merkez Laboratuvarındaki Zeta Potansiyel ve Mobilite Ölçüm Cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Geri akım yönteminde zeolit örnekleri ve APTES kimyasalı sisteme konularak, Argon gazı altında sıcaklık 100 °C ye getirilmiş ve 2 saatin sonunda zeolit örnekleri filtrasyon ile toplanmıştır (Şekil 7). Literatürde birbirinden farklı birçok prosedürün bulunması sebebiyle iki farklı makale referans olarak seçilmiş ve hangi yöntemin daha uygun olduğu Zeta Potansiyel yöntemi ile belirlenmiştir. Bu ilk adımdan sonraki bütün yüzey modifikasyon çalışmaları, belirlenen yöntem kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 7: Yüzey Modifikasyonu için Kullanılan Geri Akım Sistemi.

3.2.1 Zeolit Beta ve SBA-15'in Modifikasyonu

Projenin ilk dönemlerinde sentezlenen zeolit Beta ve mezo gözenekli SBA-15 örnekleri yukarıda bahsi geçen geri akım yöntemi kullanılarak modifiye edilmiş ve (-OH) olan yüzey grupları (-NH₂) grupları ile değiştirilmiştir. Böylelikle protein immobilizasyon çalışmalarında yüzey gruplarının ve yüzey yükünün etkisi araştırılmıştır. Bahsi geçen etkilere ek olarak, kullanılan yöntemin mezo gözeneklere sahip SBA-15 örneklerinde gözenek boyutuna etkisi de yapılan çalışmalardan bir diğeridir. Böylelikle aynı malzemeyle aynı anda hem gözenek boyutunun hem de yüzey yükünün protein immobilizasyonu üzerine etkisinin araştırılması mümkün olmuştur.

3.2.2 İyon Değişimi Çalışmaları

Zeolitlerin içerisindeki iyonların değiştirilmesi amacıyla, projenin ilk dönemlerinde sentezleri başarıyla gerçekleştirilmiş Na-Beta parçacıklarının içerisinde bulunan Na katyonları da literatürde sıkça kullanılan iyon değiştirme yöntemleri kullanılarak Ca, Co, Cu, Mn, ve Mg katyonları ile değiştirilmiştir. Böylece elde edilen modifiye malzemelerle, iyon değişiminin protein immobilizasyonu üzerine etkisi ayrıntılı olarak araştırılabilmiştir. İyon değişimi prosedüründe ise, zeolit örnekleri, değişimi yapılmak istenen iyonların nitrat tuzları ile 3 saat boyunca, 80 °C de karıştırılmış ve örnekler filtrasyon sistemiyle toplanmıştır. Elde edilen örnekler Ca-Beta, Co-Beta, Cu-Beta, Mn-Beta ve Mg-Beta olarak isimlendirilmiştir.

3.2.3 Isıl İşlem Çalışmaları

Zeolitlerin yüzey gruplarının sayısı ve çeşidinin değiştirilmesi amacıyla, projenin ilk dönemlerinde sentezleri başarıyla gerçekleştirilmiş Na-Beta-50 partikülleri literatürdeki buna benzer çalışmalara dayanarak (AKATA, 2004) 3 farklı yöntem kullanılarak kalsine edilmiş ve kalsine edilen örnekler FTIR tekniği ile karakterize edilmiştir. Adı geçen zeolitlere uygulanan sıcaklık prosedürleri aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- İlk kalsinasyon prosedüründe zeolit örneklerinin sıcaklığı 500 °C'ye dakikada 1 °C artırılarak çıkarılmış ve bu sıcaklıkta 6 saat tutulmuşlardır. Elde edilen örnekler BEA-1 olarak isimlendirilmiştir.
- İkinci prosedürde ise zeolit örneklerinin sıcaklığı 700 °C' ye dakikada 10 °C artırılarak çıkarılmış ve bu sıcaklıkta 6 saat tutulmuşlardır. Elde edilen örnekler BEA-2 olarak isimlendirilmiştir.
- Üçüncü ve son prosedürde ise ilk iki yöntem benzer şekilde, zeolit örneklerinin sıcaklığı 700 °C' ye dakikada 1 °C artırılarak çıkarılmış ve bu sıcaklıkta 6 saat tutulmuşlardır. Elde edilen örnekler ise BEA-3 olarak isimlendirilmiştir.

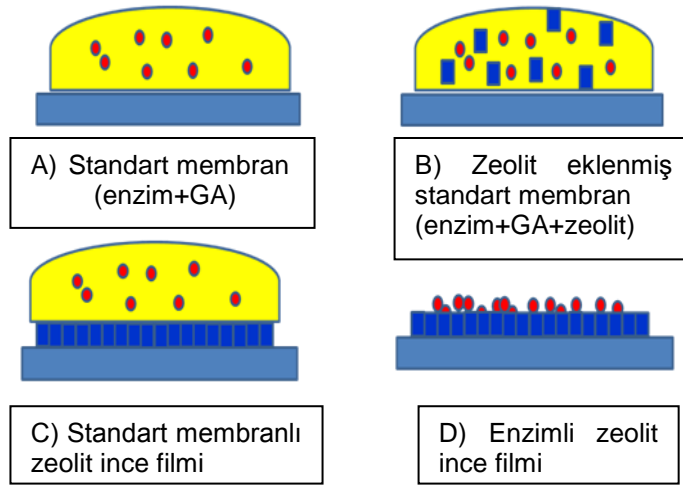
3.3 İnce Film Çalışmaları

Zeolit ve zeo-tip malzemelerin bahsedilen avantajlarının gerçek bir uygulama alanında denenmesi ve sahip oldukları bu avantajların anlamlı bir veriye dönüştürülmesi, ancak sentezlendiklerinde toz olan bu malzemelerden kaliteli ince filmlerin elde edilmesiyle mümkün olabilir. Kaliteli demek, organize, kalınlığı ve tipi kontrol edilebilir, daha sonradan kullanılacakları amaç doğrultusunda film üzerinde başka bir kimyasal ortam olmayan filmler olarak özetlenebilir. Bu amaç doğrultusunda, projemiz çerçevesinde, literatürde var olan ve zeolitlere uygulanabilir tüm ince film yapım teknikleri araştırılmış ve çok güzel sonuçlar elde edilmiştir. İnce filmler temel olarak SiO₂, Si₃N₄ altın kaplı yüzeyler ve cam üzerinde oluşturulmuşlardır. Oluşturulan farklı zeolit filmlerinden biyosensörlere yönelik veriler de yine farklı sistemler kullanılarak (üreaz, bütirilkolinesteraz, vs.) alınmıştır. Bu çalışmaların genel olarak çıkış noktası, elektrot yüzeylerinde yapılan değişikliklerin ve standart enzim membranlarına zeolit eklenmesiyle elde edilen yeni membranların yüzeye uygulanış biçimlerinin biyosensörler tarafından alınan verileri büyük oranda etkilemesinden ileri gelmektedir. Bu nedenden dolayı, projenin amacına yönelik olarak yapılan ince film ve immobilizasyon çalışmaları bu yönde hız kazanmıştır. Ukraynalı ortaklarımızın standart yöntemlerle hazırladıkları metodlara alternatif metodlar üretilmiş ve geliştirilmiştir. Genel olarak oluşturulan ince filmlerin biyosensör uygulamalarında test edilmeleri sırasında oluşan farklı ince filmler Şekil 8'de şematik olarak gösterilmişlerdir.

- Standart membran hazırlama yönteminde kullanılan karışıma (Şekil 8-A) zeolitlerin karıştırılmasıyla hazırlanan "zeolit eklenmiş standart membran" ların (Şekil 8-B) hazırlanması.

- Zeolitlerin biyosensör elektrot yüzeylerine daldırarak kaplama (dip-coating) yöntemiyle tutturularak, enzim ve glutraldehit (GA) içeren (çapraz bağ oluşumu için) standart membranın bu yüzeye uygulanması ile hazırlanan yüzeyler (standart membranlı zeolit ince filmi - Şekil 8-C).
- Zeolitlerin biyosensör elektrot yüzeylerine daldırarak kaplama yöntemiyle tutturularak, bu yüzey üzerine enzimin başka hiçbir kimyasal karışım olmadan eklenmesi ile hazırlanan yüzeyler (enzimli zeolit ince filmi – Şekil 8-D).

Bu membranlarla alınan kondüktometrik sonuçlar ise raporun devamında (Bölüm 4.5.2) anlatılmaktadır.



Şekil 8: Zeolit kullanılarak hazırlanan elektrotların şematik resimleri.

3.3.1 Zeolitlerin Yüzeyle Farklı Yöntemlerle Tutturulması

Özellikle silikon çip teknolojilerinde sıklıkla kullanılan bir yöntem olan “döndürerek kaplama” yönteminin (spin coating) yanısıra, “ultrasonik karıştırma” yöntemi ve “doğrudan tutturma” yöntemleri, zeolitlerin yüzeye tutturulması için uygulanan yöntemlerdendir. Bu prosedürler aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

3.3.1.1 Döndürerek Kaplama Yöntemi

Döndürerek kaplama yönteminde, kütlece %3 lük IPA (izopropil alkol) içerisinde zeolit süspansiyonu kullanılmıştır. Zeolit süspansiyonu örnekler üzerine damlatılmış, ardından döndürerek kaplama cihazında 1500 tur/dakika hızıyla ve 40 saniye süreyle çevrilmiştir. Ardından örnekler fırında 100 °C’de 5 dakika süre ile bekletilerek kurutulmuştur. Bu işlemler her deneyde üçer kez tekrarlanmıştır.

3.3.1.2 Ultrasonik Karıştırma Yöntemi

Ultrasonik karıştırma yönteminde tolien içerisinde kütlece % 3’lük zeolit süspansiyonu hazırlanıp bir beher içerisine yerleştirilmiştir. Beher içine yerleştirilen bu süspansiyon ultrasonik banyo içerisinde mümkün olduğunca homojen bir karışım oluşturuluncaya kadar

bekletilmiştir. Ardından örnekler bu beherin içine atılmış ve 10 dakika boyunca ultrasonik banyo içerisinde tutulmuştur. Son olarak örnekler aseton yardımıyla temizlenmiş ve kuru N₂ gazı yardımı ile kurutulmuşlardır (LEE, 2005).

3.3.1.3 Direk Tutturma Yöntemi

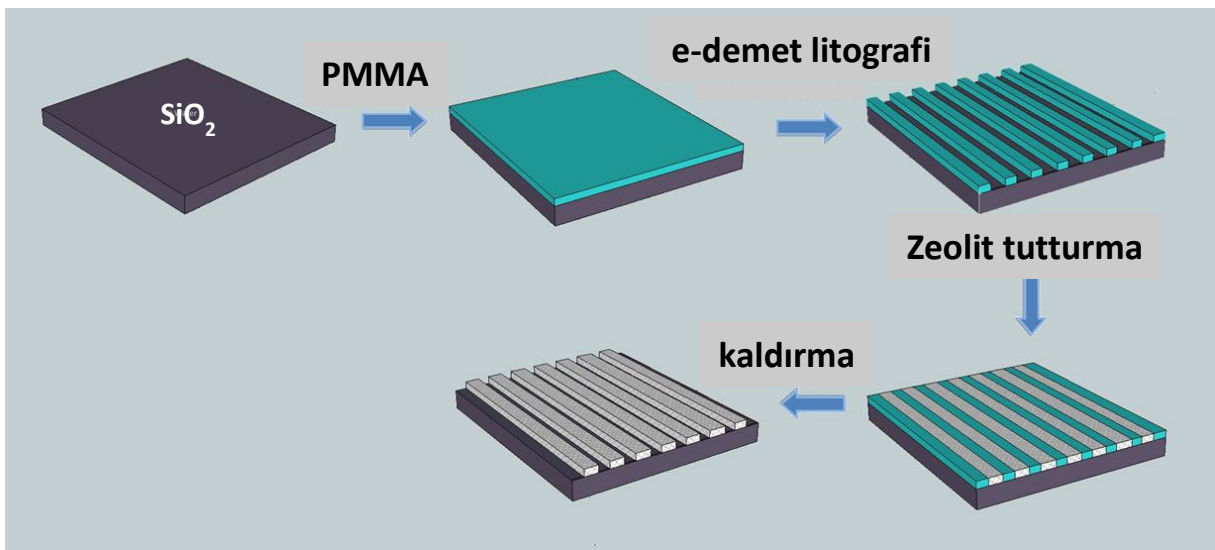
Silikon plakalar 2 cm x 2 cm ebatlarında kesilip temiz bir kağıt üzerine yerleştirilir. Yaklaşık 2 mg kadar toz halindeki zeolit örnekler üzerine dökülür. Ardından zeolitler işaret parmağı yardımıyla örnek üzerine hafifçe bastırılarak kibarca yayılır (LEE, 2007). Kaplamanın düzgün olup olmadığı optik mikroskop yardımıyla kontrol edilir. Düzgün kaplama sağlandığında zeolitlerin tam tutulmasının sağlanması için örnekler 100 °C'deki fırında 30 dakika bekletilerek hazırlanmış olurlar.

3.3.2 Mikrofabrikasyon ve Zeolit Desenlerinin Oluşturulması

Bölüm 3.3.1'de bahsi geçen 3 yöntemin herbiri, mikrofabrikasyon ve zeolit desenlerinin SiO₂ yüzeyleri üzerinde oluşturulması için araştırılmış ve test edilmişlerdir. Bunlar kısaca şu şekildedir:

3.3.2.1 Elektron Demet Litografisi ile Üretim

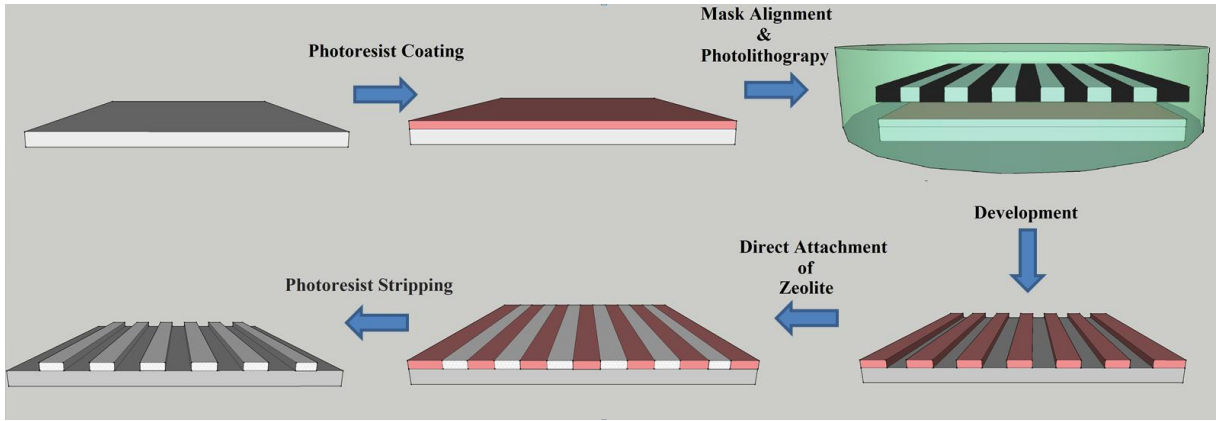
3" Silikon levha öncelikle istenilen ebatlarda parçalara ayrılır. Ardından örnekler, %3 konsantrasyonunda seyreltilmiş polimetilmetakralat (PMMA) ile 40 saniye ve 5000 tur/dakika ile döndürerek çevirici cihazda kaplanmıştır. Ardından fırında 160 °C'de yarım saat bekletilen bu örnekler elektron demet litografisi cihazında istenilen şekilde işlendikten sonra çözücü olan metilzobütiletan (MIBK) / izopropilalkol (IPA) çözeltisi içerisinde bekletilerek, elektrona maruz kalan bölgelerdeki polimerlerin çözülmesi beklenmiştir. Zeolitlerin, daha önceki çalışmalarda en başarılı sonuçları veren yöntem olan direk tutturma yöntemi ile yüzeylere tutunumu sağlanmıştır. Direk tutturma yöntemi uygulandıktan sonra zeolitlerin yüzeye tam tutunumunun sağlanması için, örnekler 30 dakika süre ile 100 °C'de fırınlanmıştır. Fırından alınan örnekler, kalan PMMA'in çözülmesi için aseton içerisinde ultrasonik banyoda kısa süre tutulmuştur. Örnekler saf su ile temizlenmiş ve N₂ gazı ile kurutularak, son ürün ortaya çıkmıştır. Bütün bu prosesin şematik akışı Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 9: Zeolit kristallerinin SiO₂ yüzeylerindeki fabrikasyonunun şematik gösterimi.

3.3.2.2 Fotolitografi ile Üretim

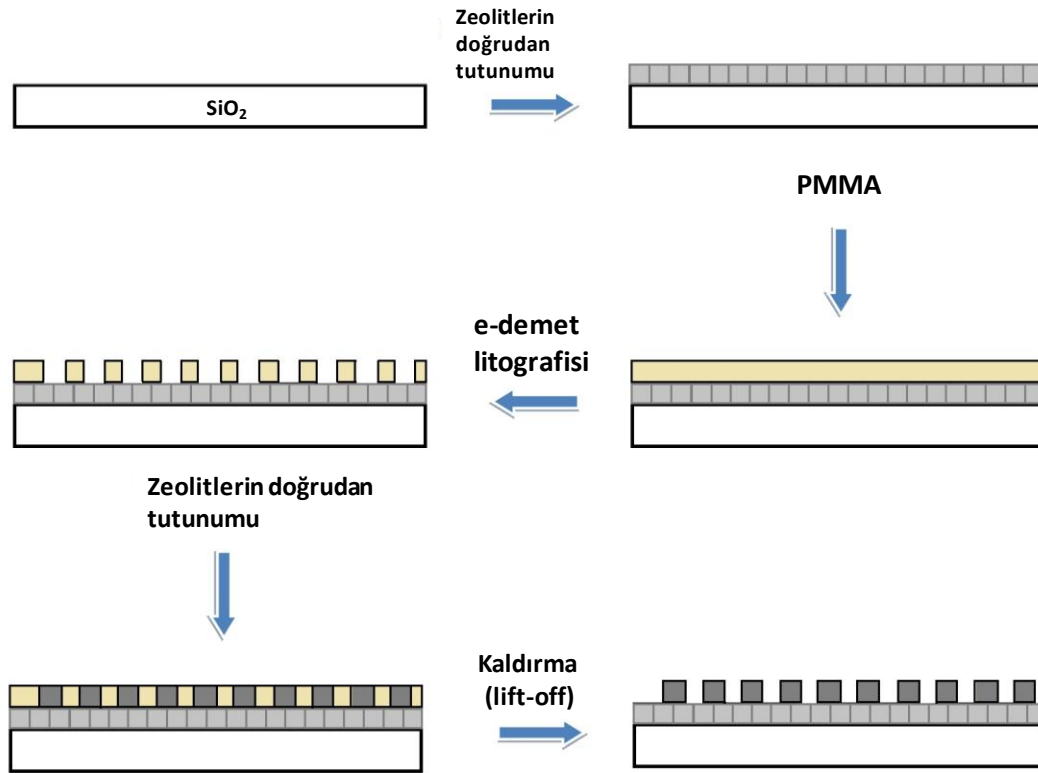
3" Silikon levha öncelikle AZ 5214 adlı fotorezist ile 7000 rpm'de 90 saniye süre ile döndürülerek kaplanmıştır. Bu proses sonucunda oluşan fotorezist kalınlığı yaklaşık 2 µm olmaktadır. Kaplanan plakalar OAI model 200 Mask Aligner cihazı yardımıyla daha önceden hazırlanmış maskeler kullanılarak 5 saniye UV ışığa maruz bırakılmıştır. Ardından plakalar AZ 726 isimli solüsyonda ile 10 saniye kadar banyo edilerek, UV ışığa maruz kalmış alanlardaki fotorezistin çözülmesi sağlanmıştır. Örnekler direk tutturma yöntemi kullanılarak zeolit ile kaplanmış, ardından zeolitlerin tam tutunumunun sağlanabilmesi için örnekler 30 dakika süre ile 100 °C'de fırınlanmıştır. Bu işlemin ardından zeolit kaplı levhalar aseton içerisinde bekletirerek kalan fotorezistlerin çözülmesi ve zeolit mikrodeseenlerinin yüzeyde kalması sağlanmıştır. Yapılan işlemler şematik olarak Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10: Zeolit kristallerinin SiO₂ yüzeylerinde fotolitografik yöntemle fabrikasyonunun şematik gösterimi.

3.3.2.3. Çift Katlı Zeolit Desenlerinin Oluşturulması

Hidrofilik ve hidrofobik özelliklerin SiO₂ yüzeyler üzerinde kontrollü oluşturulmasının çalışılması amacıyla Si/Al oranı yaklaşık 1 olan zeolit A ve Si/Al oranı sonsuz olan, yani hiç Al içermeyen silikalit nanoparçacıkları da bu yüzeyler üzerindeki desen çalışmaları yapılmıştır. Genel hatlarıyla bu işlem 3.3.2.1 bölümüne benzemekle beraber, yapılan işlemin prosesi şematik olarak Şekil 11'da gösterilmiştir.



Şekil 11: Çift katlı zeolit desenlerinin oluşturulmasının şematik gösterimi.

3.4 İmmobilizasyon Çalışmaları

3.4.1 Adsorpsiyon Çalışmaları

Proje boyunca gerçekleştirilen immobilizasyon çalışmalarının ilk kısmı, farklı özelliklere sahip proteinlerin yine farklı özelliklere sahip zeolitler üzerine fiziksel adsorpsiyonunu kapsamaktadır. Bu çalışmanın literatürdeki diğer çalışmalardan en büyük farkı, değişik morfolojilere sahip zeolitleri karşılaştırmak yerine zeolit tipinin sabit tutulduğu ve araştırılmak istenen özelliklerinin basamak basamak değiştirildiği bir yol izlenmiş olmasıdır (WALCARIUS, 1998; WALCARIUS, 1999; LIU, 1999; MARKO-VARGA, 1996).. Böylece farklı morfolojilere sahip zeolitlerin karşılaştırılmalarından doğacak karışıklıkların önüne geçilmeye çalışılmıştır. Belirli oranlarda hazırlanan protein ve zeolit solusyonları 2'şer saat boyunca oda sıcaklığında ve farklı pH'larda karıştırılarak sentrifüj edilmiş ve üstte kalan süpernatant kısmı ODTÜ-Merkezi Laboratuvar'da bulunan UV-VIS Spektrofotometresiyle ölçülerek ne kadar proteinin zeolitlere bağlandığı hesaplanmıştır.

3.4.1.1 Si/Al Oranının Etkisi

Zeolitlerin Si/Al oranlarının protein-zeolit ilişkisini nasıl ve hangi derecede etkilediğinin araştırılması amacıyla, projenin ilk dönemlerinde sentez ve karakterizasyonları

gerçekleştirilen farklı Si/Al oranlarına (30, 50, 60 ve 120) sahip zeolit Beta örnekleri kullanılmıştır. Kullanılan örnekler Na-Beta-30, Na-Beta-50, Na-Beta-60 ve Na-Beta-120 olarak adlandırılmıştır (Tablo 1).

3.4.1.2 Parçacık Boyutunun Etkisi

Zeolitlerin parçacık boyutlarının ve yüzey alanlarının protein-zeolit ilişkisini ne derecede etkilediğinin araştırılması amacıyla ise farklı parçacık boyutuna sahip zeolit A (2, 4 ve 5 mikrometre) örnekleri immobilizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere LTA-2, LTA-4 ve LTA-5 olarak adlandırılmışlardır.

3.4.1.3 Ortamdaki pH'ın Etkisi

Ortamdaki pH'ın protein-zeolit davranışlarını ve ilişkisinin nasıl etkilediğinin araştırılabilmesi amacıyla asidik (pH: 4), nötral (pH: 7) ve bazik pH'lara (pH: 11) sahip tampon çözeltiler kullanılmış ve alınan sonuçlar ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

3.4.1.4 Yüzey Yükünün Etkisi

Zeolitlerin yüzey gruplarının ve yüklerinin, protein immobilizasyonu üzerindeki etkisinin araştırılabilmesi amacıyla yüzey grupları NH₂ ile değiştirilmiş zeolit Beta örnekleri kullanılmış ve elde edilen sonuçlar bulgular kısmında ayrıntılı olarak tartışılmıştır. Hazırlanan örnekler Na-Beta-NH₂ olarak adlandırılmıştır.

3.4.1.5 Gözenek Boyutunun Etkisi

Parçacıkların gözenek boyutlarındaki değişikliğin protein-zeolit ilişkisini ne derece etkilediğinin araştırılabilmesi amacıyla, projenin 3. döneminde sentezi gerçekleştirilen farklı gözenek boyutuna sahip silikalit ve SBA-15 örnekleri kullanılmıştır.

3.4.1.6 Zeolit İçerisindeki İyonların Etkisi

Zeolit Beta parçacıklarının doğal yapısında bulunan Na iyonları, Ca, Co, Cu, Mg ve Mn iyonları ile değiştirilerek, bu değişimin protein-zeolit ilişkisini nasıl etkilediği araştırılmış ve hazırlanan örnekler Ca-Beta, Co-Beta, Cu-Beta, Mg-Beta ve Mn-Beta olarak adlandırılmıştır.

Tablo 2: Çalışılan tüm zeolitlerin için kullanılan kodlar ve amaçları.

| Zeolit Kodu | Yapılan İşlem / çalışılan parametre |
|---|---|
| Na-Beta-30 / 40 / 50 / 60 / 120 | Si/Al oranının değiştirilmesi / yüzey asidik gruplarının biyosensör verilerine etkisi |
| LTA 2 / 4 / 5 | Parçacık boyutunun değiştirilmesi / parçacık boyutunun biyosensör verilerine etkisi |
| BEA-120-NH ₂ SBA-15-NH ₂ | Silanlama / yüzey gruplarının değişiminin biyosensör verilerine etkisi |
| NH ₄ -Beta-30/50 H-Beta-30/50 | Na-Beta örneklerine önce amonyaklı ortamda iyon değişimi uygulanır (NH ₄ -Beta) ve istenildiği takdirde kalsinasyona tabii tutulur (H-Beta). Böylece yüzey gruplarının asidik özellikleri değiştirilmiş ve kondüktometrik biyosensör verilerinde bir farklılık yaratıp yaratmadıkları incelenmiştir. |
| Silikalit / SBA-15 | Tamamen silika içeren ve hiç Al içermeyen biri mikrogözenekli diğeri de mezogözenekli malzeme üretimi / Gözenek boyutunun biyosensör verilerine etkisi |
| Silikalit 70 / Silikalit-500 | Amperometrik biosensör çalışmaları için parçacık boyutu ve yüzey alanının etkisi açısından araştırılmıştır |
| Ca / Co / Cu / Mg / Mn-Beta | İyon değişimi / farklı iyonların biyosensör verilerine etkisi |
| BEA-1 / BEA-2 / BEA-3 | Na-Beta-50'nin farklı protokollerle kalsinasyonu sonucu oluşturulan farklı miktarlardaki asidik -OH gruplarının ISFET biyosensör verilerine etkisi |

3.5 Biyosensör Çalışmaları

Projenin ilk dönemlerinde sentezlenmiş, modifikasyonları ve karakterizasyonları yapılmış zeolit örnekleri kullanılarak kondüktometrik, amperometrik ve ISFET tipli biyosensörlerde, biyosensör performansı (çalışma stabilitesi, biyosensör ömrü ve inhibisyon çalışmaları) verileri alınmış ve yapılan modifikasyonlara ek olarak biyosensör performansının daha fazla artırılabilmesi amacıyla elektrot yüzeylerine çeşitli protein tutturma teknikleri denenmiştir.

3.5.1 Amperometrik Biyosensör Verileri

Amperometrik ölçüm almak amacıyla, elektrokimyasal polimerizasyon için kullanılan polimer solüsyonunun içerisine, ağırlıkça %5 zeolit eklenerek elektrotun yüzeyine bir miktar damlatılır ve kullanılmaya hazır hale getirilir. Referans elektrotta ise proteinlerin kullanılmadığı ama diğer herşeyin aynı kaldığı solüsyon kullanılır. Ölçümler, proje çerçevesinde kurulan ve Şekil 3'de gösterilen sistem kullanılarak alınmıştır.

3.5.2 Kondüktometrik Biyosensör Verileri

Kondüktometrik ölçüm almak amacıyla hazırlanan tampon çözelti içerisinde, ağırlıkça %5 protein ve %5 zeolit eklenerek elektrotun yüzeyine bir miktar damlatılır ve kullanılmaya hazır hale getirilir. Referans elektrot kısmına ise, aynı solusyonun protein içermeyeni hazırlanarak damlatılır. Ölçümler, proje çerçevesinde kurulan ve Şekil 5'de gösterilen sistem kullanılarak alınmıştır.

3.5.3 ISFET Tip Biyosensör Verileri

Kondüktometrik ölçüm almak amacıyla hazırlanan çözeltisinin aynısı ISFET çalışmalarında kullanılmıştır. Tampon çözeltinin içerisinde, ağırlıkça %5 protein ve %5 zeolit eklenerek elektrotun yüzeyine bir miktar damlatılmış ve kullanılmaya hazır hale getirilmiştir. Referans elektrot kısmına ise, aynı solusyonun protein içermeyeni hazırlanarak damlatılmıştır. Böylelikle iki elektrot arasındaki potansiyel fark ölçülebilmektedir. Ölçümler, proje çerçevesinde FP-7 proje ortaklarımızın bizim için ürettikleri ISFET elektrotları kullanılarak (Şekil 6) alınmıştır.

3.6 Gerçek Uygulamalara Yönelik Çalışmalar: Hücre Tutunması ve Çoğaltma Çalışmaları

Bu çalışmada amaçlanan, bundan önce anlatılan ve elde edilen tüm veriler ışığında, ilk kez sistematik bir şekilde örnekler üzerindeki zeolit miktarının değişiminin ve kalsinasyon işleminin hücre çoğaltması üzerine etkilerinin iki değişik zeolit tipi ve iki hücre tipiyle araştırılmasıdır. 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)'nin indirgenmesi hücre içerisinde bulunan mitokondriyal dihidrojenaz enzimleri tarafından gerçekleştiği için, dolaylı yoldan hücre canlılığı hakkında bilgi vermektedir. Bu çalışmada hücre canlılığının gözlenebilmesi için MTT testi 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda uygulanmıştır. Hücreler 24 kuyulu hücre kültür plakları içerisinde yerleştirilmiş ve üzerlerine 2×10^4 hücre/kuyu, 800 µl besi ortamı içerisinde eklenmiştir. MTT eklenene kadar hücreler 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiş, her 48 saat sonunda besi ortamı değiştirilmiştir. Fosfat tampon çözeltisi (PBS) içerisinde 5mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmış 10 µl MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) tüm kuyulara 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda eklenmiştir. Ardından MTT moleküllerinin hücre içine alınabilmesi için hücreler inkübatörde 4 saat bekletilmiştir. 1 cm x 1 cm şekilde kesilmiş örnekler kültür plağındaki kuyuların tamamını kaplamadığı için bazı hücreler kuyu tabanına veya yan duvarlarına yerleşip oralarda çoğalabilmektedir. Bu yüzden, sadece örnekler üzerindeki hücrelerin sayısını öğrenebilmek için örnekler 4 saatlik inkübasyonun ardından yeni bir 24 kuyulu kültür plağına alınmıştır. Örneklerin üzerine 100 µl dimetil fültoksit (DMSO) eklenmiş ve DMSO'nun hücreler içerisinde oluşan formazanı tam olarak çözmesi beklenmiştir. Çözünme işleminin ardından, spektroskopiyel yardımıyla 570 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Bu çalışmalar sonucunda bulunan sonuçlar tüm detaylarıyla Bölüm 4.6'de açıklanmıştır.

BÖLÜM 4

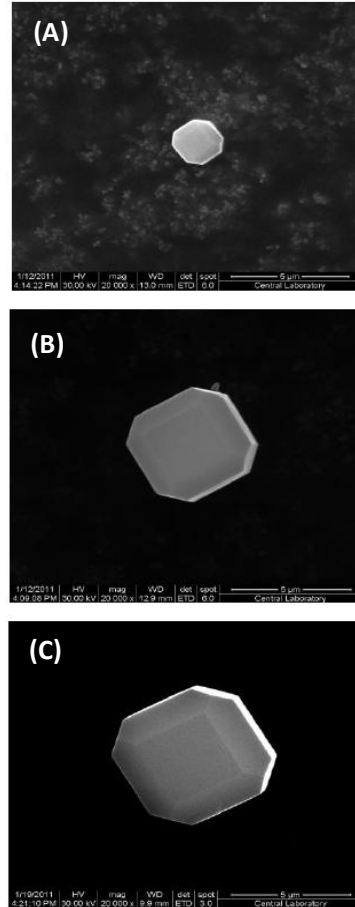
BULGULAR

4.1 Zeolit ve Zeo-Tip Malzemelerin Sentezi

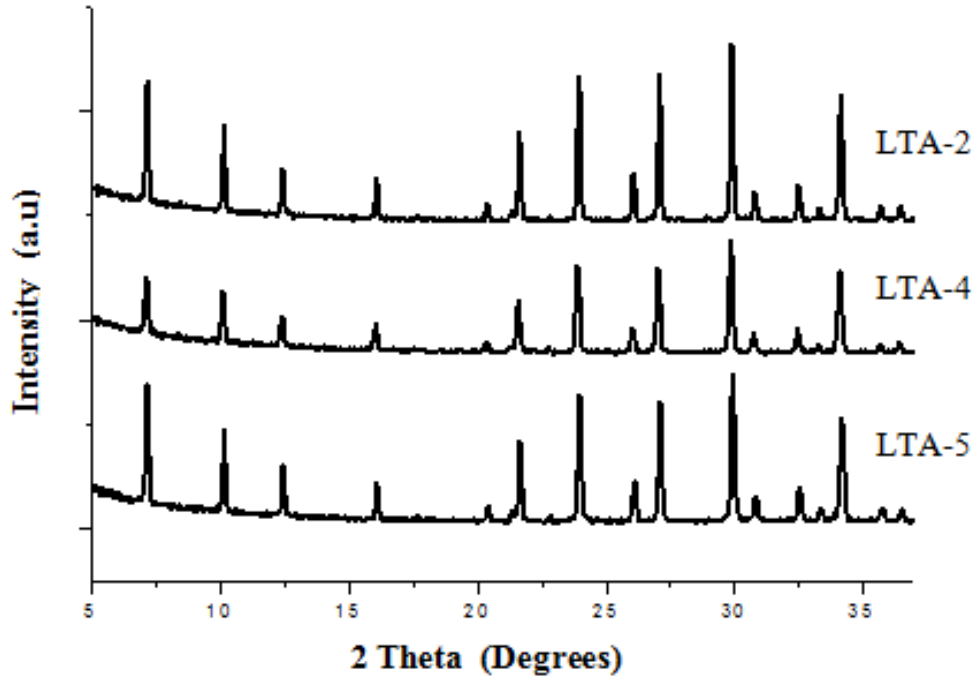
Farklı tipteki biyosensör verilerinin zeolitlerin kullanımıyla değerlendirilmesi, sistemlerin optimizasyonu, farklı biyosensörlerin çalışma prensiplerinin öğrenilmesi ve ileri hücre çalışmalarında kullanılması amacıyla farklı tipte zeolitler proje kapsamında başarıyla sentezlenmişlerdir (Tablo 1). Sentezlenen farklı büyüklüklerdeki zeolit A, farklı hidrofobik özelliklerdeki zeolit Beta (diğer bir deyişle farklı Si/Al oranlarında) ve iki farklı boyuttaki silikalit örneklerinin sonuçları aşağıda tartışılmıştır.

4.1.1. Mikron Zeolit A

Sentezlenmiş zeolit-A parçacıklarının SEM resimleri Şekil 12'de verilmiştir. Bu resimler zeolit A kristallerinin tipik olarak kübik olan morfolojilerini de göstermektedir. Böylece projede de hedeflendiği gibi farklı parçacık boyutuna sahip zeolit A kristalleri, Şekil 14' de gösterilen parçacık boyutu analizi sonuçları ile uyumlu bir şekilde elde edilmiştir.

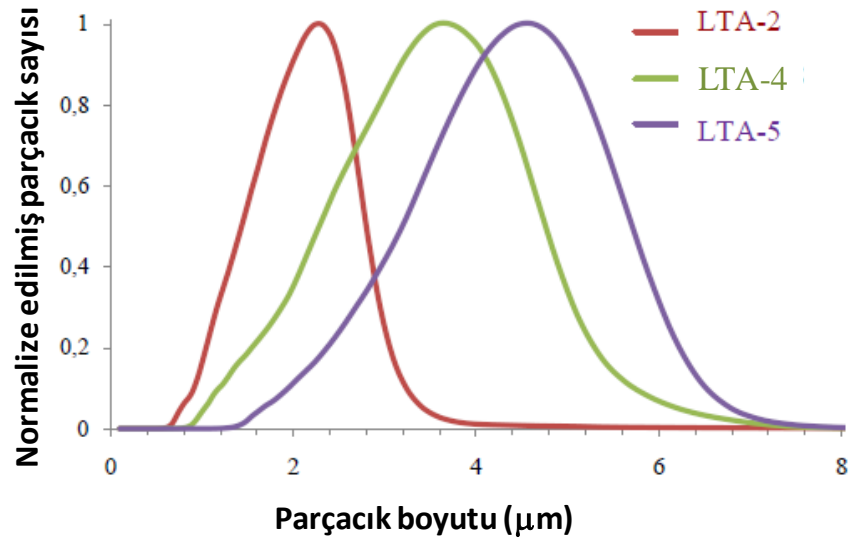


Şekil 12: Farklı boyutlarda sentezlenmiş Mikron-Zeolit A, LTA-2 (A), LTA-4 (B) ve LTA-5 (C) SEM Mikrografikleri.



Şekil 13: Sentezlenmiş Mikron- Zeolit A XRD Deseni.

Şekil 12 ve 13'de görüldüğü üzere mikron boyutlardaki zeolit A örnekleri Tablo 1'de anlatılan yöntem kullanılarak sentezlenmiştir ve elde edilen XRD deseni literatürdeki zeolit A örnekleri ile uyum sağlamaktadır (ZHU, 1998). Böylelikle, zeolit büyüklüğünün protein bağlanmasına etkisinin çalışılması için gereken 3 farklı boyuta sahip zeolit A (2 μm , 4 μm ve 5 μm) örnekleri başarıyla elde edilmiştir.



Şekil 14: Sentezlenmiş Mikron- Zeolit A Örneklerinin Tanecik Boyutu Analizi, 2 μm (A), 4 μm (B) ve 5 μm (C) .

Şekil 14'de görüldüğü üzere farklı tanecik boyutuna sahip (2 µm (A), 4 µm (B) ve 5 µm(C)) zeolit A örnekleri, sıcaklık ve fırınlama süreleri aynı tutulup kimyasal formüllerinde farklılıklar yapılarak başarıyla sentezlenmiştir. Sentezlenen örneklerin parçacık boyut dağılımları PSD yöntemi kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen bu örneklerin yüzey özellikleri ise Tablo 3'de özetlenmiştir.

Tablo 3: Zeolit A mikrokristallerinin yüzey özellikleri.

| Örnek ismi | Si/Al ^a | Par. Boyu (µm) ^b | S _{total} (m ² /g) ^c | S _{EXT} (m ² /g) ^d | Gözenek Hacmi (cc/g) ^e | Yüzey yük durumu (mV) ^f |
|------------|--------------------|-----------------------------|---|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| LTA-2 | ~1 | 2 | 557 | 192 | 0.23 | -10.5 |
| LTA-4 | ~1 | 3.8 | 550 | 188 | 0.23 | -16 |
| LTA-5 | ~1 | 5 | 513 | 193 | 0.22 | -22.2 |

^a EDX ile ölçülmüştür.

^b API Aerosizer LD ile ölçülmüştür.

^c Çoknoktalı BET ile ölçülmüştür.

^d t-plot yöntemi ile ölçülmüştür.

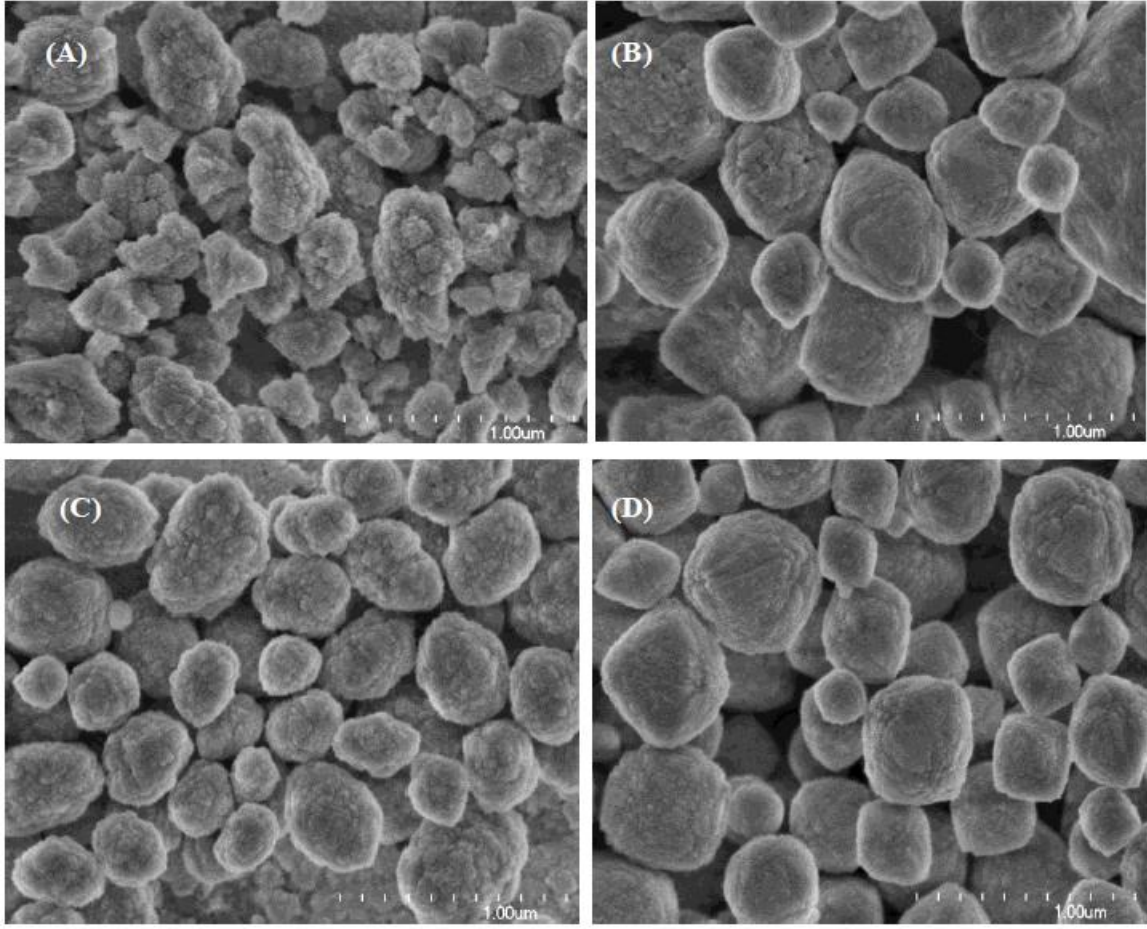
^e Saito-Foley (SF) yöntemi ile ölçülmüştür.

^f Zeta potansiyel ile pH 7'de ölçülmüştür.

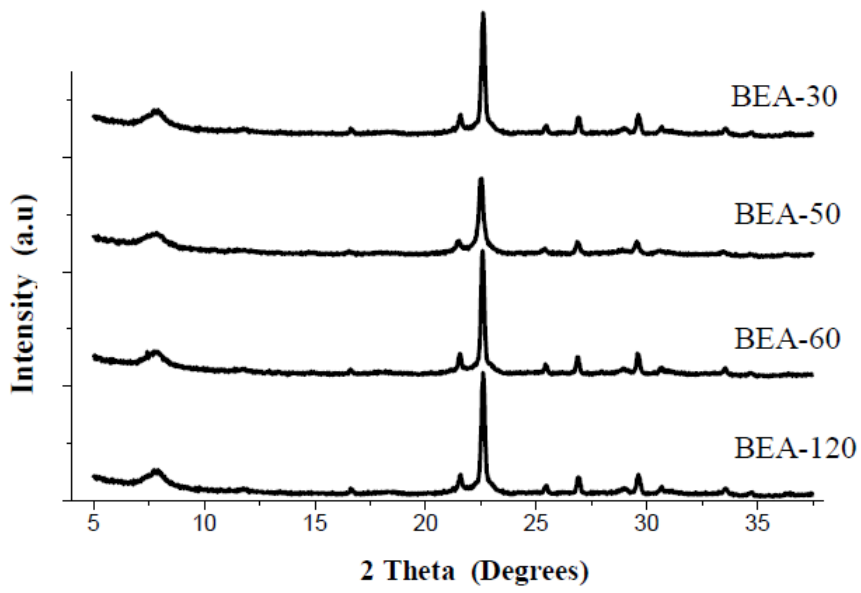
Tablo 3'de gösterilen sonuçlara göre, zeolit A örneklerinin hiçbiri Si/Al oranı, dış yüzey alanı (S_{EXT}) ve gözenek hacminde çok belirgin bir farklılık göstermemiştir. Ancak, parçacık boyutu arttıkça, toplam yüzey alanı (S_{total}) 557 m²/g'dan 513 m²/g'a düştüğü gözlenmiştir.

4.1.2. Zeolit Beta

Proje boyunca devam eden biyosensör çalışmalarında hidrofobik ve hidrofilik özelliğin proteinler üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi amacıyla farklı Si/Al oranına sahip zeolit Beta örnekleri sentezlenmiş ve karakterizasyonları, XRD, SEM, Zeta Potansiyel ve BET teknikleri kullanılarak yapılmıştır. Farklı Si/Al oranlarının kullanılmasının sebebi, zeolit hidrofobik ve hidrofilik özelliklerini kontrollü bir şekilde değiştirebilmektir. Şekil 15 ve 16'da görüldüğü üzere 4 farklı Si/Al oranlarına (30, 50, 60 ve 120) sahip zeolit Beta örnekleri, sıcaklık ve fırınlama süreleri aynı tutulup kimyasal formülleri değiştirilerek proje boyunca başarıyla sentezlenmiştir. XRD deseni literatürdeki zeolit Beta örnekleriyle uyum sağlamaktadır (NARASIMHARAO, 2006).

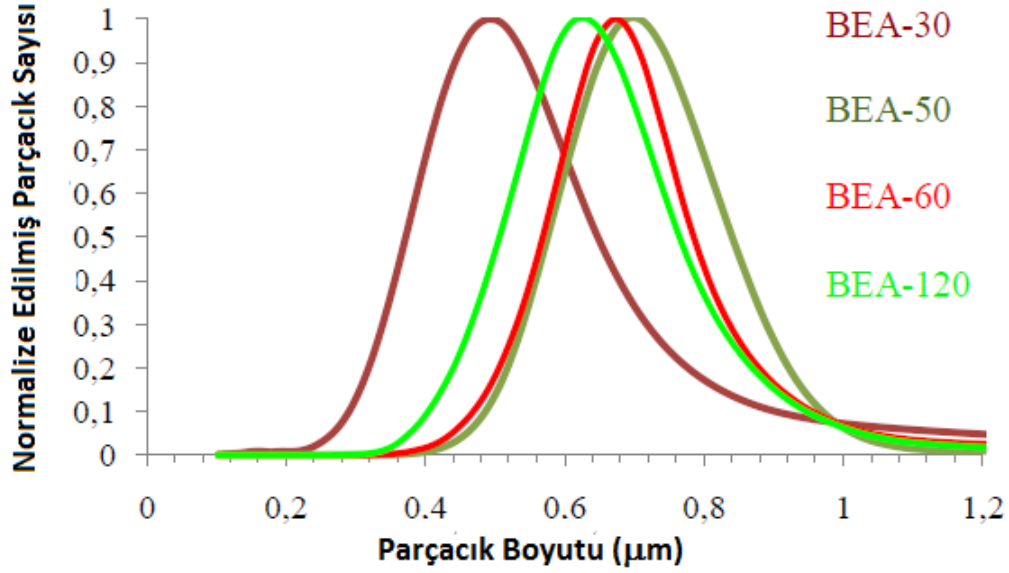


Şekil 15: Sentezlenmiş Farklı Si/Al Özellikli Zeolit-Beta Örneklerinin SEM Mikrografikleri, Si/Al=30 (A), Si/Al=50 (B), Si/Al=60 (C), Si/Al=120 (D).

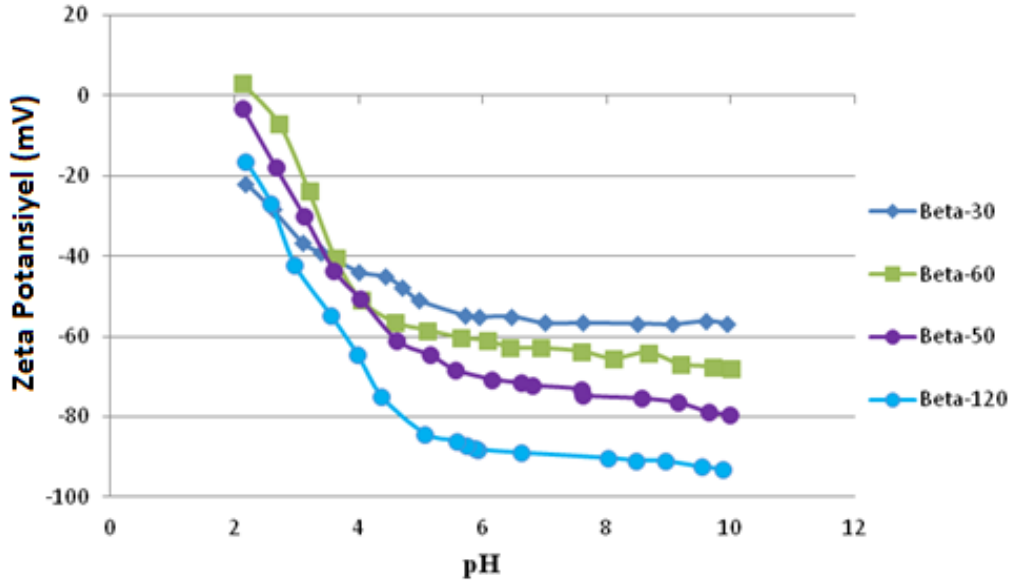


Şekil 16: Sentezlenmiş Farklı Si/Al Özellikli Zeolit-Beta Örneklerinin XRD Desenleri.

Şekil 15'de gösterilen SEM mikrografiklerine göre, zeolit Beta örnekleri tipik olarak kesilmiş bi-piramidal yapılı morfoloji göstermişlerdir. Parçacıklar yaklaşık olarak 0.7-1.2 μm parçacık boyutu aralığındadırlar. Bu durum, Şekil 17'de gösterilen parçacık boyut analizleriyle de uyum içerisindedir.



Şekil 17: Sentezlenmiş Zeolit Beta Örneklerinin Tanecik Boyutu Analizi .



Şekil 18: Sentezlenmiş Farklı Si/Al Özellikli Zeolit-Beta Örneklerinin Zeta Potansiyel Grafikleri.

Şekil 17 ve 18'de görüldüğü üzere Si/Al oranının değişmesi parçacığın yüzey alanını ve yüzeyindeki grupların dağılımını büyük ölçüde etkilemektedir. 30, 50, 60 ve 120 Si/Al

oranlarına sahip zeolit Beta örneklerinin herbirinden, farklı ama birbiriyle orantılı sonuçlar elde edilmiştir. Şekil 17 ve 18'deki sonuçlara göre, proteinlerin bağlanacağı yüzeydeki negatif grupların yüzey alanlarıyla doğru orantılı olarak değişmekte olduğunu göstermektedir. Proteinlerin bu negatif gruplarla nasıl bir etkileşim içine gireceğinin ve bu etkileşimin nasıl geliştirilebileceğinin açıklanabilmesi için bir sonraki basamağa geçilmiş, negatif yüzey grupları APTES aracılığı ile $-OH$ 'dan $-NH_2$ 'ye değiştirilmiş ve karakterizasyonları bitirilmiştir (Bölüm 4.2, Şekil 22).

Tablo 4: Zeolit A mikrokristallerinin yüzey özellikleri.

| Örnek ismi | Si/Al ^a | Par. Boyu (μm) ^b | S _{total} (m ² /g) ^c | S _{EXT} (m ² /g) ^d | Gözenek Hacmi (cc/g) ^e | Yüzey yük durumu (mV) ^f |
|------------|--------------------|---------------------------------------|--|--|---|--|
| BEA-30 | 9.7 ± 1.0 | 450 | 260 | 144 | 0.11 | -62 |
| BEA-50 | 17.7 ± 1.8 | 700 | 460 | 579 | 0.19 | -89 |
| BEA-60 | 14.8 ± 1.5 | 600 | 360 | 703 | 0.15 | -65 |
| BEA-120 | 20.3 ± 2 | 650 | 495 | 726 | 0.2 | -70 |

^a EDX ile ölçülmüştür.

^b API Aerosizer LD ile ölçülmüştür.

^c Çoknoktalı BET ile ölçülmüştür.

^d t-plot yöntemi ile ölçülmüştür.

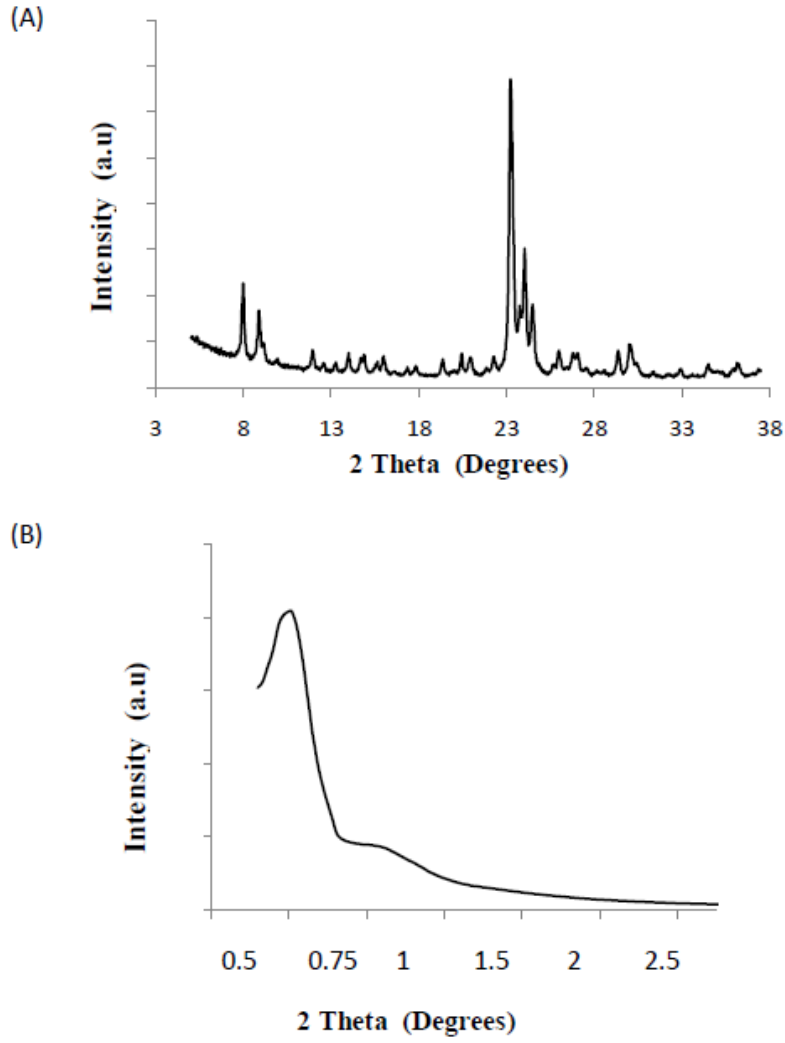
^e Saito-Foley (SF) yöntemi ile ölçülmüştür.

^f Zeta potansiyel ile pH 7'de ölçülmüştür.

Bunlara ek olarak Tablo 4'de gösterilen sonuçlara göre, farklı Si/Al oranları elde etmek için jel kompozisyonunun çok değiştirilmesine rağmen, en düşük Si/Al oranı olarak 9.7 ve en yüksek olarak da 20.3 elde edilebilmiştir. Ancak, dış yüzey alanı 144 m²/g'dan 720 m²/g'a yükselmiştir. Parçacık boyutlarında da benzer bir artış söz konusudur. Buna rağmen, gözenek boyutu ve yüzey yüklerinde çok belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

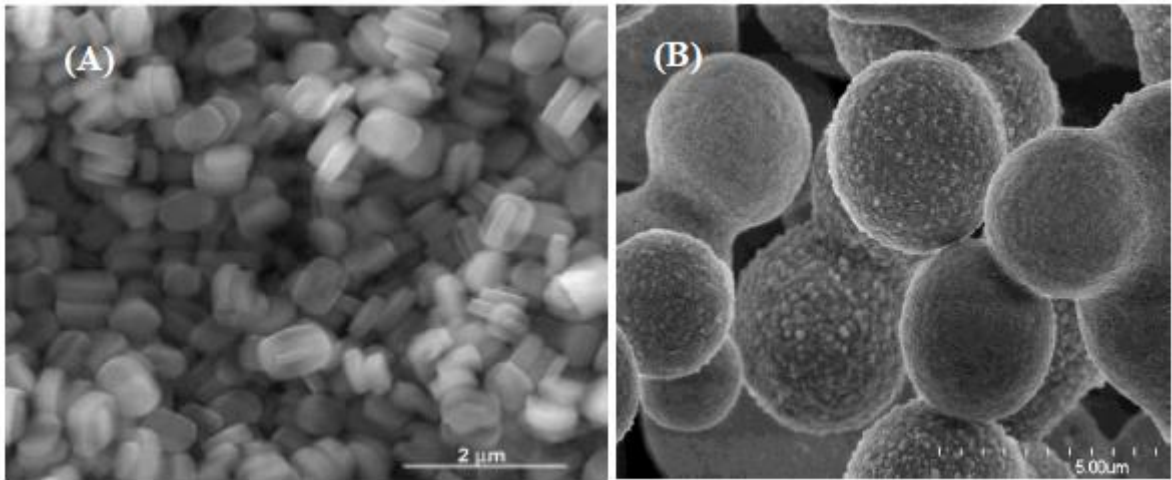
4.1.3. Silikalit ve SBA-15

Farklı gözenek boyutlarının protein immobilizasyonu üzerindeki etkisinin araştırılması için bu özellikleri gösteren Silikalit ve SBA-15 örnekleri sentezlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda sentezlenen Silikalit ve SBA-15'in gözenek boyutları sırasıyla 1 ve 20 nm'dir. Bu malzemelerin sentez koşulları Tablo 1'de açıklanmıştır. Elde edilen bu iki malzemenin XRD desenleri Şekil 19'da verilmiştir.



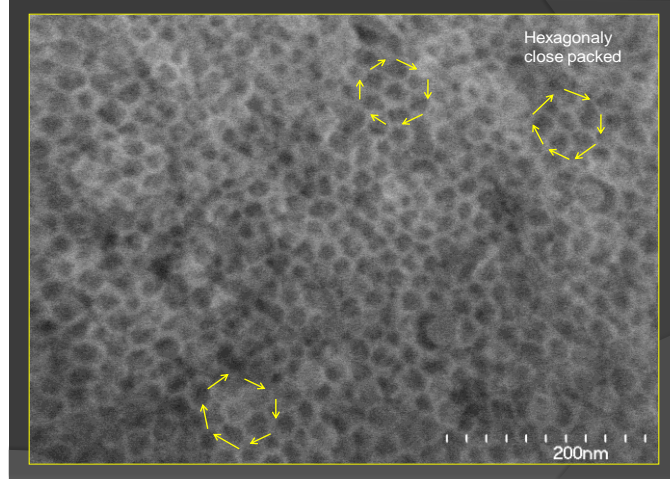
Şekil 19: Sentezlenmiş Silikalit (A) ve SBA-15 (B) Örneklerinin XRD Desenleri.

Şekil 19'da gözlenen tüm pikler literatürdekilerle uyum içerisindedir [WANG, 2006; MARK, 1996). Bütün bu sonuçlar elde edilen malzemelerin yüksek kalitedeki Silikalit ve SBA-15 örnekleri olduğunu göstermektedir. Elde edilen bu malzemelerin SEM mikrografikleri de Şekil 20'de gösterilmiştir.



Şekil 20: Sentezlenmiş Silikalit (A) ve SBA-15 (B) Örneklerinin SEM Mikrografığı.

Şekil 20-A'da görüldüğü gibi elde edilen Silikalit örnekleri tipik olarak tabut şeklindeki morfolojilerine sahiptirler. Şekil 20-B'de SBA-15'lerin 2-2,5 mikron partikül boyutuna sahip olduğu gözlenmiştir. Buna ek olarak SBA-15'lerin 20 nm gözenek boyutuna sahip oldukları da yine Şekil 21'de gösterilmiştir. SBA-15, yapısında alüminyum içermeyen, sadece silikadan oluşan ve raporun önceki kısımlarında bahsi geçmiş silikalit benzeri yapılardır. Silikalitlerden farkları kontrol edilebilir dış yapıları ve gözenek boyutlarıdır. Bu sebeple, SBA-15 örneklerinin sentezleri ve modifikasyonları farklı gözenek boyutları gözetilerek yapılmıştır.



Şekil 21: Sentezlenmiş 20 nm gözenek boyutuna sahip SBA-15 taneciklerinin gözeneklerinin SEM mikrografiji.

Bütün bunlara ek olarak elde edilen bu malzemelerin yüzey özellikleri de Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5: Silikalit ve SBA-15 kristallerinin yüzey özellikleri.

| Örnek İsmi | Si/Al ^a | Par. Boyu (µm) ^b | S _{total} (m ² /g) ^c | S _{EXT} (m ² /g) ^d | Göz. Hacmi (cc/g) ^e | Yüzey Yükü (mV) ^f |
|------------|--------------------|-----------------------------|---|---|--------------------------------|------------------------------|
| Silicalite | No Al. | ~1 | 288 | 202 | 0.12 | -43 |
| SBA-15 | No Al. | ~2,5 | 800 | 693 | 2.4 | -33 |

^a EDX ile ölçülmüştür.

^b API Aerosizer LD ile ölçülmüştür.

^c Çoknoktalı BET ile ölçülmüştür.

^d t-plot yöntemi ile ölçülmüştür.

^e Saito-Foley (SF) yöntemi ile ölçülmüştür.

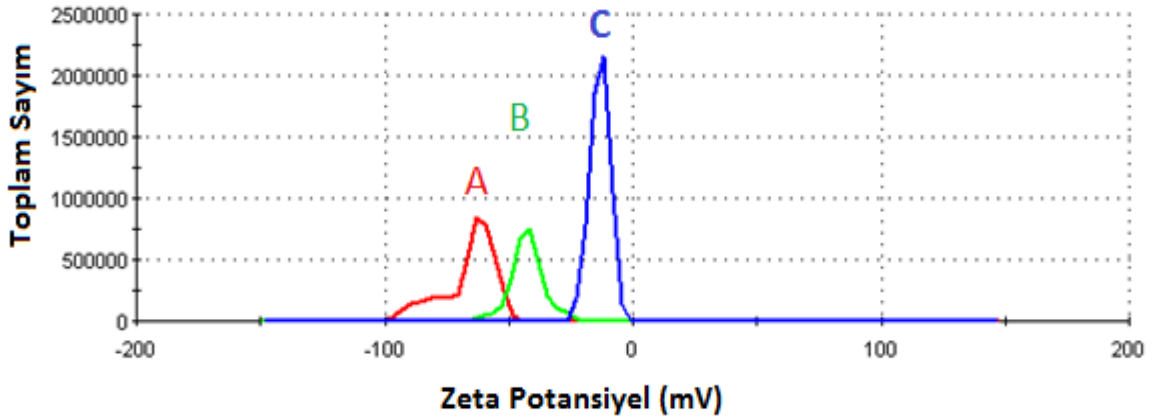
^f Zeta potansiyel ile pH 7'de ölçülmüştür.

Tablo 5'de de gösterildiği gibi, SBA-15 örneğinin gözenek ve parçacık boyutu, toplam ve dışsal yüzey alanları ve toplam gözenek boyutu Silikalit örneğinden fazladır. Ancak iki malzeme de sadece silikadan oluşmaktadır ve yüzey yüklerinde çok belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

4.2 Yüzey Modifikasyonu

Pekçok biyolojik reaksiyon da diğer katalitik reaksiyonlar gibi malzemelerin yüzeyinde gerçekleştiğinden dolayı yüzeylerin modifiye edilmesi veya fonksiyonelleştirilmeleri çok önemli olabilir. Bu sebeple protein immobilizasyonu basit bir şekilde sadece yüzey özelliklerinin değiştirilmesi ile de kontrol edilebilir.

Bu projede, yüzey grupları fonksiyonelleştirme prosedürleri uygulanarak istenilen gruplarla değiştirilmiş ve bunun protein immobilizasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, Silikalit örneklerinin yüzey grupları geri akım yöntemi ile Argon gazı altında APTES kullanılarak değiştirilmiştir. Bu yöntemde zeolit örnekleri ve APTES kimyasalı sisteme konularak sıcaklık 100 °C ye getirilmiş ve 2 saatin sonunda zeolit örnekleri filtrasyon ile toplanmıştır. Literatürde birçok farklı yöntemin bulunması nedeniyle en çok kullanılan 2 tanesi seçilmiş ve yüzeyi hiç değiştirilmemiş olan örnekler ile karşılaştırılmak üzere Zeta Potansiyel ölçüm cihazı ile karakterizasyonları yapılmıştır (Şekil 22) (ZHANG, 2004; PECHAR, 2002).



Şekil 22: Yüzey Grubu Değiştirilmemiş (A), ZHANG, 2004 prosedürüne göre (B) ve PECHAR, 2002 prosedürüne göre (C) yüzey grupları değiştirilmiş Beta-120 Örneğinin Zeta Potansiyel Karakterizasyon Grafiği.

Literatüre göre yüzey gruplarının APTES ile değiştirilmesi zeta potansiyel grafiğinde 0 noktasına doğru bir değişime neden olmaktadır. Grafikte, A ile gösterilen eğri APTES'e hiç maruz kalmamış zeolit örneği, B ve C ise literatürde en çok kullanılan iki farklı yöntem ile yüzey grupları APTES'e maruz bırakılmış zeolit örnekleridir. Şekilden de anlaşılacağı üzere, zeolit A'nın yüzeyi geri akım yöntemiyle APTES kullanılarak başarıyla değiştirilmiş ve en çok değişimi gösteren C yöntemi ile de diğer zeolit tiplerinde aynı yöntem tekrarlanmıştır. Yüzey grupları değiştirilmemiş örneklere kıyasla diğerlerinden daha pozitif yüklü bir yüzey sonucu alınması beklenmektedir ki elde edilen sonuçlar da bu doğrultuda olmuştur. İleride anlatılan biyosensör çalışmaları için, protein ve zeolitler arasındaki bağlantının tam olarak anlaşılabilmesi ve geliştirilebilmesi açısından, bu çalışma çok önemli bir yer teşkil etmektedir. Elde edilen bu örneklerin yüzey karakterizasyon sonuçları Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6: Silikalit ve SBA-15 kristallerinin yüzey özellikleri.

| Örnek İsmi | Yüzey Grupları | Si/Al^a | Par. Boyutu (µm)^b | S_{total} (m²/g)^c | Göz. Boy^d | Göz. Hacmi (cc/g)^d | Yüzey yükü (mV)^e |
|-------------------------|--|--------------------------|-------------------------------------|--|-----------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| BEA-120-NH ₂ | OH ⁻ , NH ₂ ⁺ | 20.3 | 0.7 | 450 | 0.3 | 0.25 | 10 |
| BEA-120 | OH ⁻ | 20.3 | 0.7 | 400 | 1.03 | 0.2 | -70 |
| SBA-15-NH ₂ | OH ⁻ , NH ₂ ⁺ | No Al. | 2 | 790 | 6.8 | 1.5 | -7 |
| SBA-15 | OH ⁻ | No Al. | 2 | 800 | 7.9 | 2.4 | -33 |

^a EDX kullanılarak ölçülmüştür.

^b Parçacık Boyut Analizi kullanılarak ölçülmüştür.

^c BET kullanılarak ölçülmüştür.

^d BJH ve Saito-Foley yöntemi ile ölçülmüştür.

^e Zeta Potansiyel kullanılarak ölçülmüştür.

Tablo 6'da görüldüğü üzere yüzey grubu değiştirilen zeolit parçacıklarında başka herhangi bir değişim yapılmadan sadece yüzey yükü -70' den 10'a değiştirilmiş ve immobilizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere hazır hale getirilmişlerdir.

4.2.1 İyon Değişimi Çalışmaları

Zeolitlerin sentezlendikleri durumunda sahip oldukları Na⁺ katyonlarının farklı iyonlarla değiştirilmesinin etkisinin araştırılması için Zeolit Beta seçilmiştir, çünkü zeolit Beta sahip olabileceği geniş Si/Al oranıyla bu çalışmaya çok uygun bir malzemedir. Bu amaç doğrultusunda elde edilen farklı zeolitler, SEM ve EDX kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 7: Farklı iyonlarla iyon-değişirme işlemine tabi tutulmuş zeolit Beta örneklerinin özellikleri.

| Örnek İsmi | Değişim için kullanılan kimyasal | Si/Al Oranı | Değişim yüzdesi (%)^a |
|-------------------|---|--------------------|--|
| Na-BEA-120 | As-synthesized | ~14 | - |
| Ca-BEA-120 | Ca(NO ₃) ₂ | ~14 | 94 |
| Co-BEA-120 | Co(NO ₃) ₂ | ~14 | 76 |
| Cu-BEA-120 | Cu(NO ₃) ₂ | ~14 | 92 |
| Mn-BEA-120 | Mn(NO ₃) ₂ | ~14 | 75 |
| Mg-BEA-120 | Mg(NO ₃) ₂ | ~14 | 75 |

^a EDX ile ölçülmüştür.

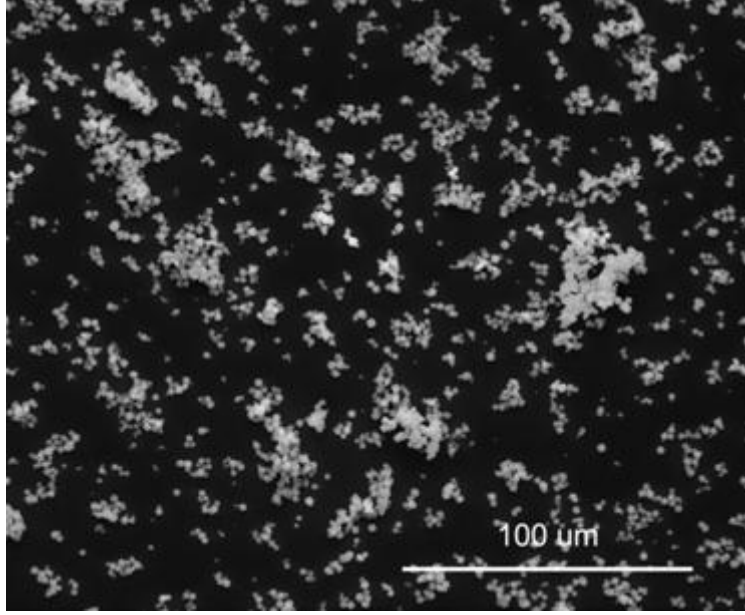
Tablo 7'de sunulan sonuçlara göre, yüksek denilebilecek seviyede bir iyon-değişimi kapasitesi elde edilmiştir. Genel olarak 75% üzerinde bir iyon-değişimi sonucu alınmıştır. Ayrıca bu işlem zeolitlere herhangi bir şekilde (morfolojik veya Si/Al oranı olarak) bir zarar vermemiştir.

4.3 İnce Film Çalışmaları

4.3.1 Zeolitlerin Yüzeyle Farklı Yöntemlerle Tutturulması

4.3.1.1 Döndürerek Kaplama Yöntemi

Su içerisinde kütlece % 1 oranında hazırlanmış zeolit süspansiyonu silikon levhalar üzerinde döndürülerek çevirici cihaz yardımıyla kaplanmıştır. Kaplama sıklığı SEM yardımıyla gözlenmiş ve elde edilen yüzeyle ait tipik bir görüntü Şekil 23'de gösterilmiştir.

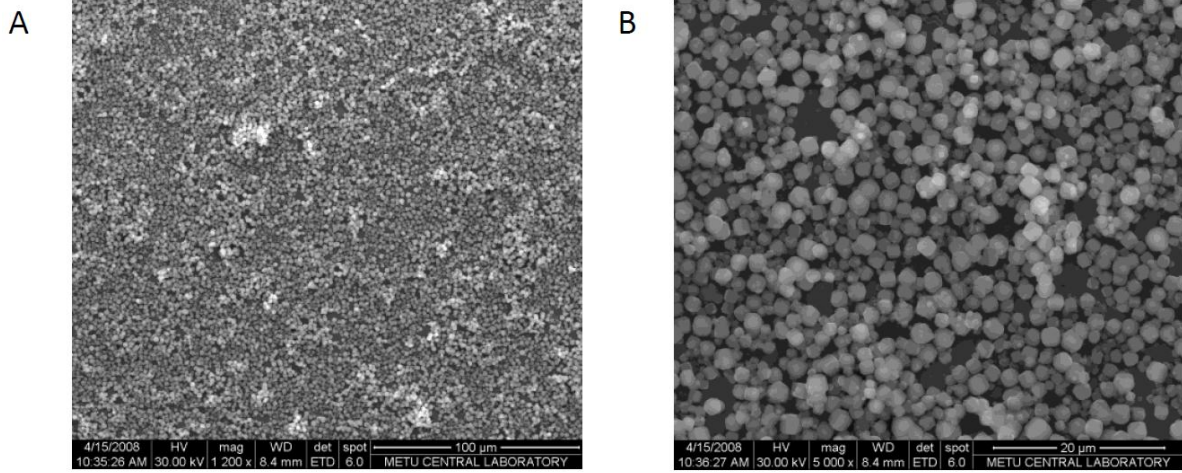


Şekil 23: Döndürerek kaplama yöntemi ile hazırlanan yüzeyle ait bir örneğin mikrografığı.

Zeolit süspansiyonunun konsantrasyonu % 5'e kadar artırılarak silikon levha üzerinde tam kaplama sağlanmış ancak oluşturulan filmlerin tam organize ve düzenli bir yapı sağlamadığı gözlenmiştir. Ayrıca örnekler üzerindeki zeolitlerin bağlanma gücü, oluşturulan ve fırınlanan filmlerin tekrar ultrasonik banyo içerisinde tutulması yöntemiyle gözlenmeye çalışılmış, ancak kısa bir süre ultrasonik karıştırma ardından, zeolitlerin bir kısmının yüzeyden ayrıldığı gözlenmiştir.

4.3.1.2 Ultrasonik Karıştırma Yöntemi

Ultrasonik karıştırma yöntemiyle oluşturulan zeolit filmleri SEM ile gözlenmiş, sonuçlar Şekil 24'de gösterilmiştir.

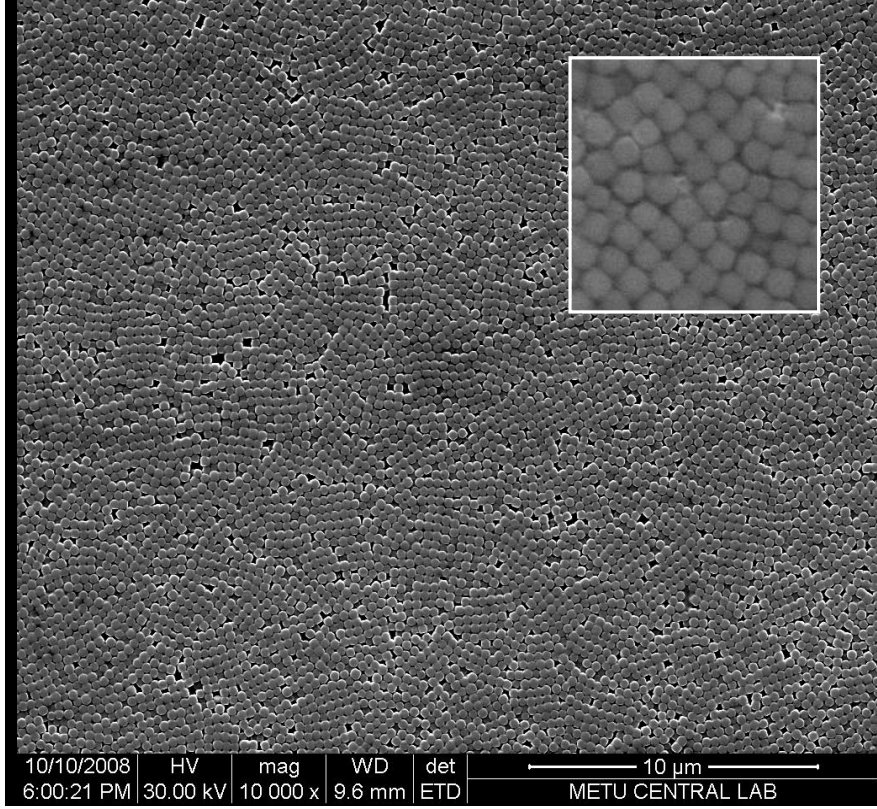


Şekil 24: Ultrasonik karıştırma yöntemiyle oluşturulmuş filmlerin düşük büyütmedeki (A) ve yüksek büyütmedeki (B) SEM mikrografikleri.

Şekil 24'de görüldüğü üzere, ultrasonik karıştırma yöntemiyle hazırlanmış filmlerin, döndürerek karıştırma yönteminden daha başarılı ve daha düzenli bir kaplama sağladığı gözlenmiştir. Ancak örneklerin fırınlama işleminden sonra kısa bir süre ultrasonik karıştırıcıda tutulmasıyla, yüzeydeki zeolitlerin yaklaşık % 60'ının döküldüğü görülmüştür. Bu yeterince stabil bir kaplama yapılamadığını göstermektedir.

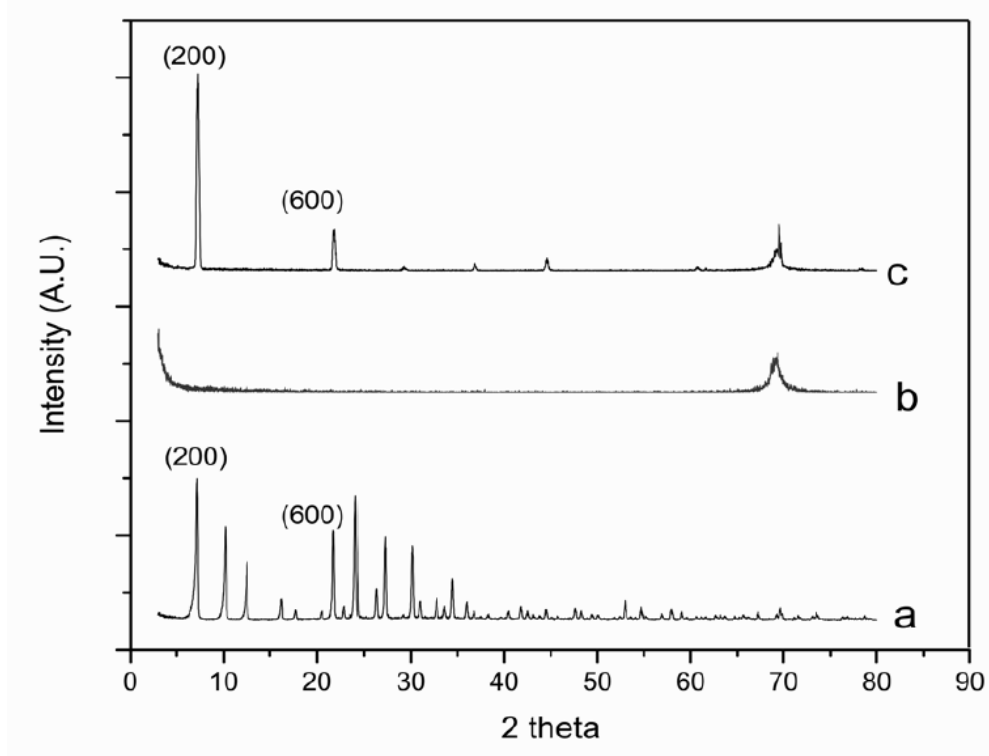
4.3.1.3 Direk Tutturma Yöntemi

Zeolit A mikrokristallerinin, Yoon et. al. tarafından (LEE, 2007) geliştirilen yöntemle yüzeye yerleştirilmesi ve tek bir tabaka halinde organize bir film oluşturma çalışmaları ilk defa olarak gerçekleştirilmiş, herhangi bir kimyasal işlem uygulanmadan oluşturulan filmlerin SEM görüntüleri Şekil 25'de gösterilmiştir.



Şekil 25: Direk tutturma yöntemi ile üretilen zeolit filmlerinin SEM mikrografikleri.

Çalışmanın başında amaçlanan tam kaplama ve maksimum düzenlilik kriterleri direk tutturma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 200-250 nm büyüklüğündeki zeolit mikrokristalleri silikon levha üzerinde bu yöntemle, tek katman halinde, ve tüm yüzeyin eksiksiz kaplanması sağlanmış olup, literatürde bu kadar küçük mikrokristallerden tek katman oluşturulması ilk kez gerçekleştirilmiştir (ÖZTÜRK, 2009)]. Oluşturulan tek katman zeolit A filmlerinin elektron mikroskobu görüntüleri Şekil 25’de verilmiş olup, XRD sonuçları ise Şekil 26’de verilmiştir.



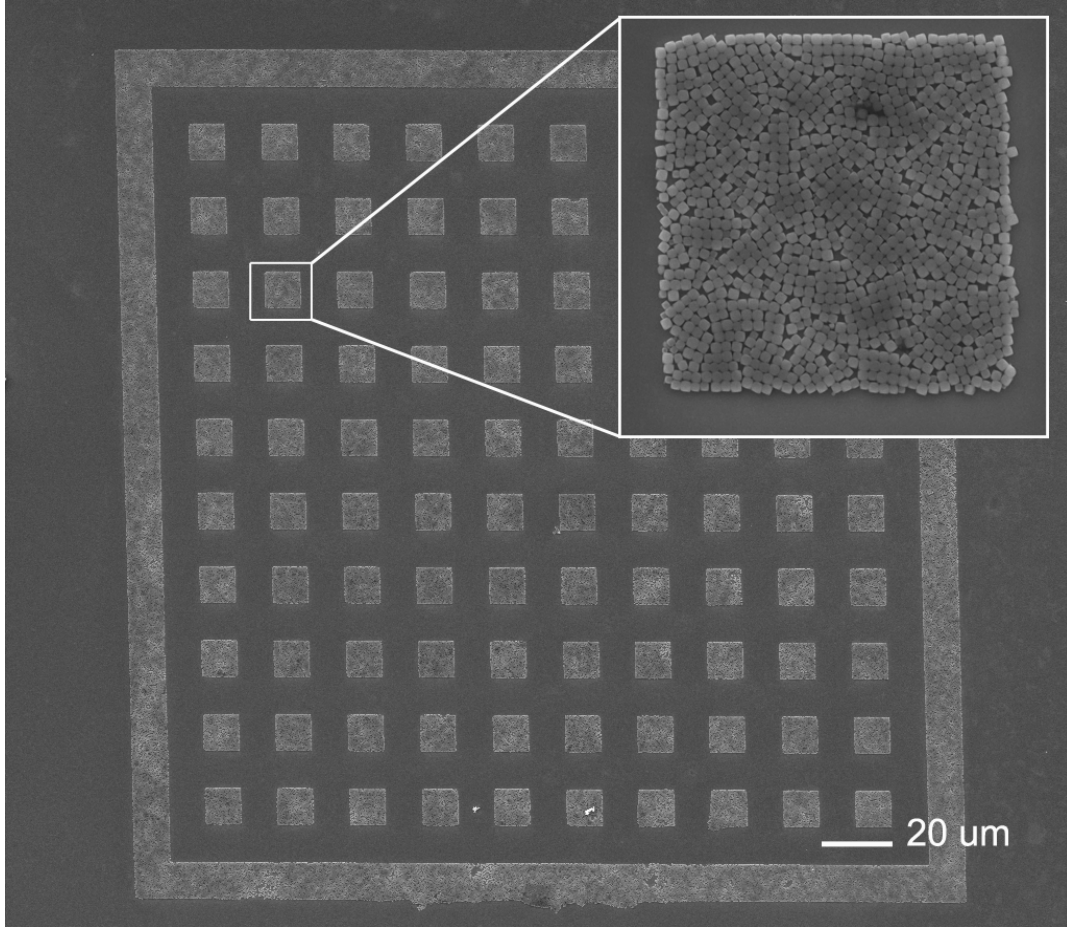
Şekil 26: Toz halindeki zeolit A'nın (a), boş silikon levhanın (b) ve direk tutturma yöntemi ile hazırlanmış silikon levha üzerindeki zeolit filminin (c) XRD sonuçları (ÖZTÜRK, 2009).

4.3.2 Mikrofabrikasyon ve Zeolit Desenlerinin Oluşturulması

Zeolit mikrodeseenlerini oluşturmak amacıyla iki farklı sistem bir araya getirilerek litografi ile zeolit film oluşturma sistemleri birleştirilmiştir. Bu konu iki ana başlık üzerinde incelenmiş ve sonuçlar aşağıda verilmiştir.

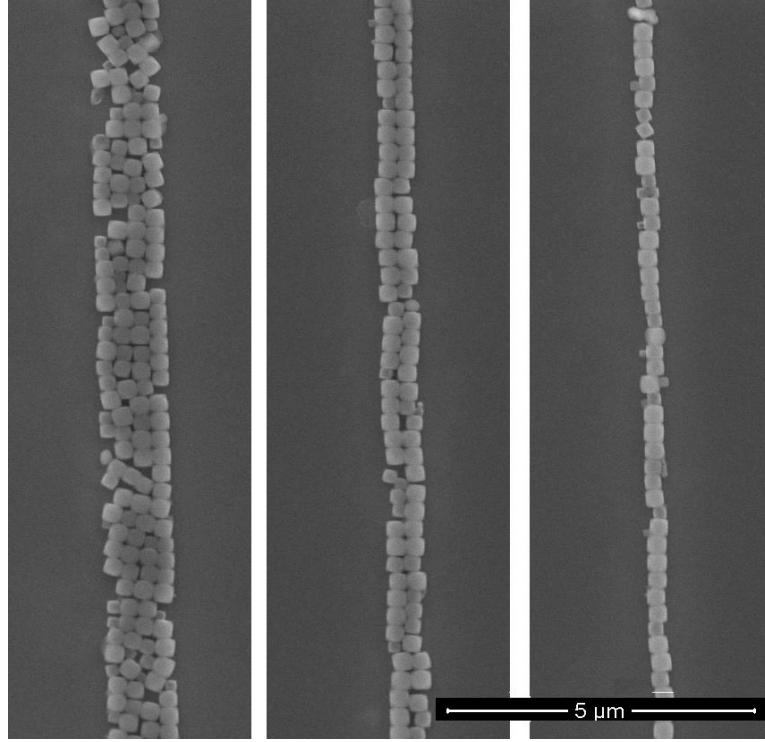
4.3.2.1 Elektron Demet Litografisi ile Üretim

Zeolitlerle ince film üretimi konusundaki 4.3.1'de yapılan çalışmalarda, en organize ve başarılı sistemin direk tutturma yöntemi olduğu tespit edildikten sonra, bu sistem elektron demet litografisi sistemi ile birleştirilerek, silikon üzerinde zeolit mikrodeseenleri oluşturulmuştur. Oluşturulan zeolit mikrodeseenlerinden bir örnek Şekil 27'de gösterilmiştir (ÖZTÜRK, 2009).



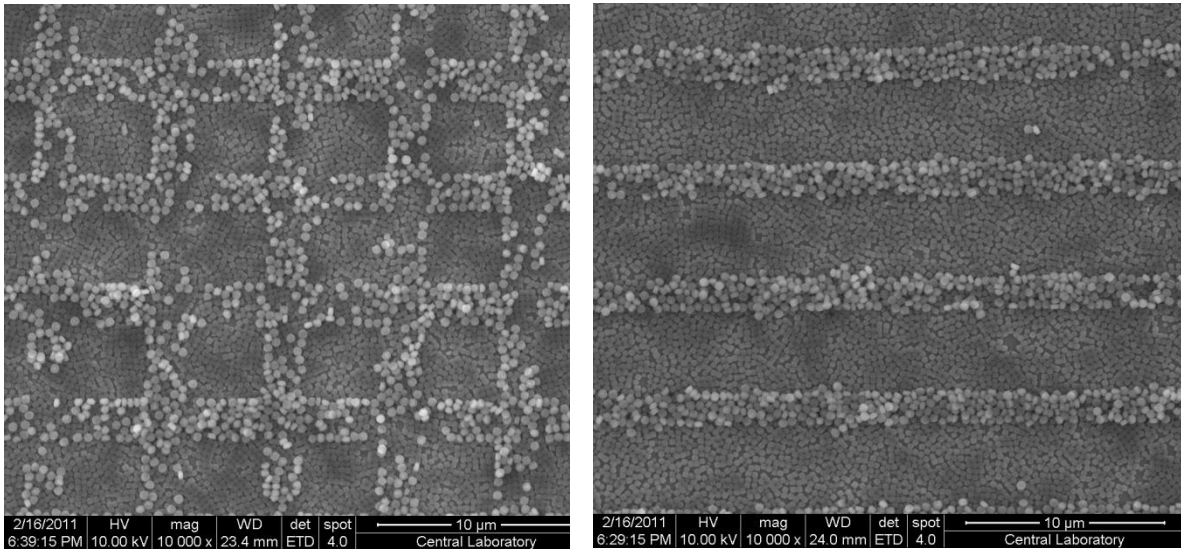
Şekil 27: Elektron demet litografisi ve direk tutturma yöntemi ile hazırlanmış zeolit mikrodesenlerinin SEM Mikrografisi (ÖZTÜRK, 2009).

Elektron demet litografisinin hassasiyetinden faydalanılarak, bir zeolit kristalinin ebadı kadar kalınlıkta desenler oluşturulmuş ve bu desenler direk tutturma yöntemi yardımıyla zeolitlerle doldurulmuştur. Literatürde ilk defa yapılan bu çalışmanın SEM mikrografisi Şekil 28'de verilmiştir. Bu sonuçlar ışığında, direk tutturma yönteminin istenilen amaç doğrultusunda ne kadar başarılı bir yöntem olduğu ilk defa bu proje kapsamında gösterilmiştir.



Şekil 28: Elektron demet litografisi ve direk tutturma yöntemi ile hazırlanmış dört, iki ve tek sıra halinde üretilmiş zeolit mikrodeseenlerinin SEM mikrografigi (ÖZTÜRK, 2009).

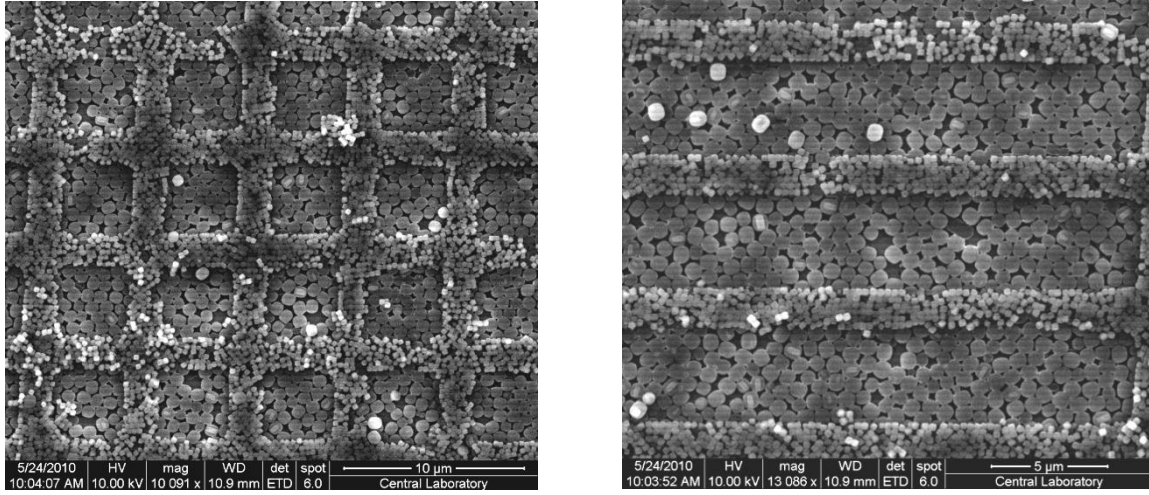
Ayrıca çok farklı özelliklere sahip iki farklı zeolit, silikalit ve zeolit A, bu iki sistemin tam olarak entegrasyonu ile, SiO_2 yüzeyinde farklı katmanların oluşturulup oluşturulamayacağı araştırılmış ve bu amaçla tabanı zeolit A kaplanmış örneklerin üzerine silikalit ile mikrodeseenleri yine ilk defa olarak bu proje kapsamında oluşturulmuştur. Bu çalışmanın SEM görüntüleri Şekil 29'da gösterilmiştir. Bu çalışmaya ait bir yayının ise hazırlık aşamasındadır.



Şekil 29: Zeolit A tek katman tabakası üzerinde elektron demet litografisi ile oluşturulmuş silikalit mikrodeseenlerinin SEM mikrografigi.

Ayrıca aynı sistemle, silikalit tek katman tabakası üzerine zeolit A ile mikrodeseenlerde üretilebilmektedir. Bu şekilde yüzeyin özelliklerini istenilen şekilde modifiye edebilmek ve tam olarak birbirinden farklı yüzey özelliğine sahip malzemeler oluşturulabilmektedir. Böylece,

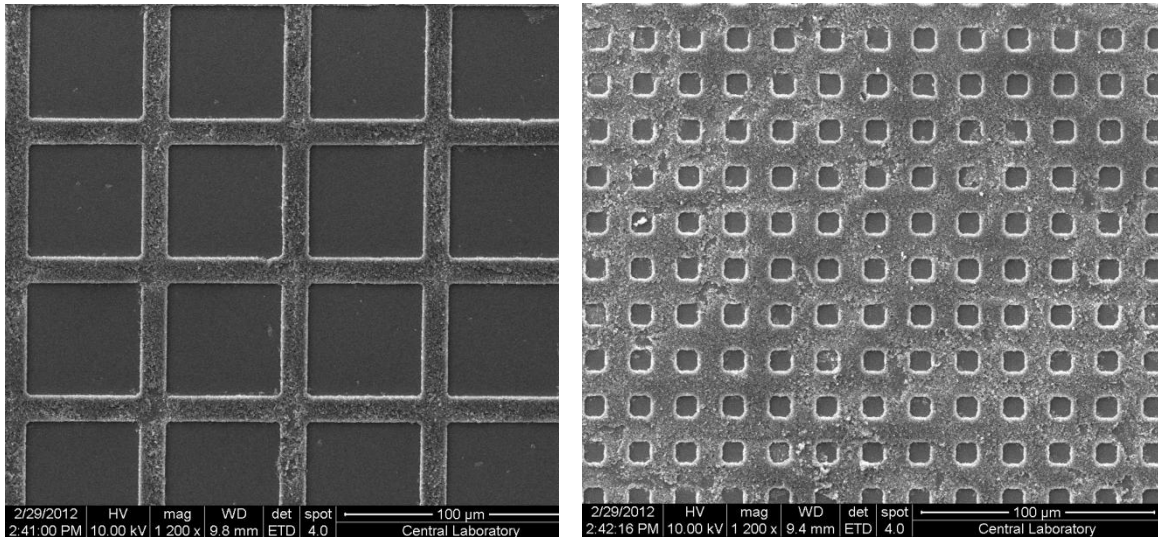
hem hidrofilik hem de hidrofobik özellikli malzemeler aynı yüzey üzerinde ilk defa bu yöntemle elde edilmiştir. Bu konuyla ilgili SEM mikrografikleri ise Şekil 30'da gösterilmiştir.



Şekil 30: Silikalit tek katman tabakası üzerinde elektron demet litografisi ile oluşturulmuş zeolit A mikrodesenlerinin SEM mikrografiji.

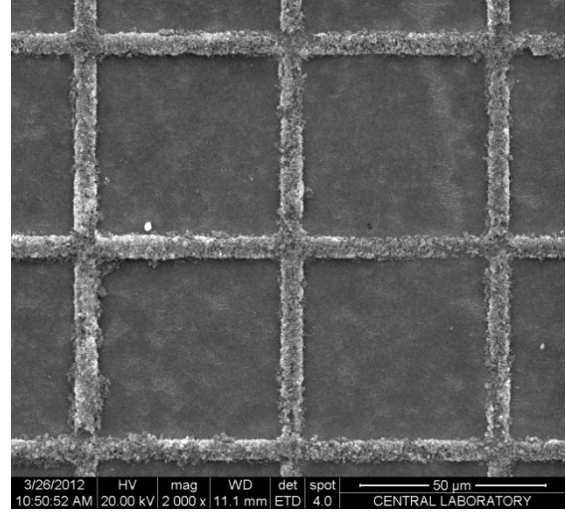
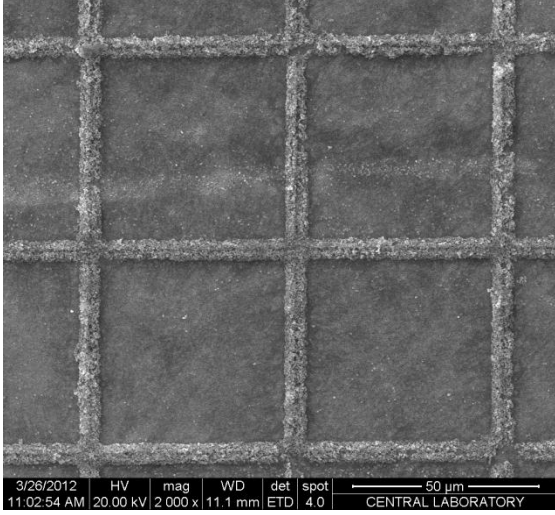
4.3.2.2. Fotolitografi ile Üretim

Fotolitografi ve direk tutturma yönteminin beraber kullanılması ile elektron demet litografisine göre çok daha geniş alanlar (birkaç cm büyüklüğe kadar) çok kısa sürede mikrodesenler yine ilk defa olarak bu proje kapsamında oluşturulmuştur ve bu konuyla ilgili yayıncımız hazırlık aşamasındadır. Bu sistem ile üretilen mikrodesenler Şekil 31'de gösterilmiştir.



Şekil 31: Fotolitografi ve direk tutturma yöntemi ile hazırlanmış zeolit mikrodesenlerinin SEM mikrografikleri.

Ayrıca bu sistemle elektron demet litografisinde yapıldığı gibi tabanda tek katman silikalit veya zeolit A tabakası hazırlandıktan sonra, fotolitografi ile diğer zeolit mikrodeseni oluşturulmuştur. Bu çalışmaların SEM mikrografikleri ise Şekil 32'de verilmiştir.

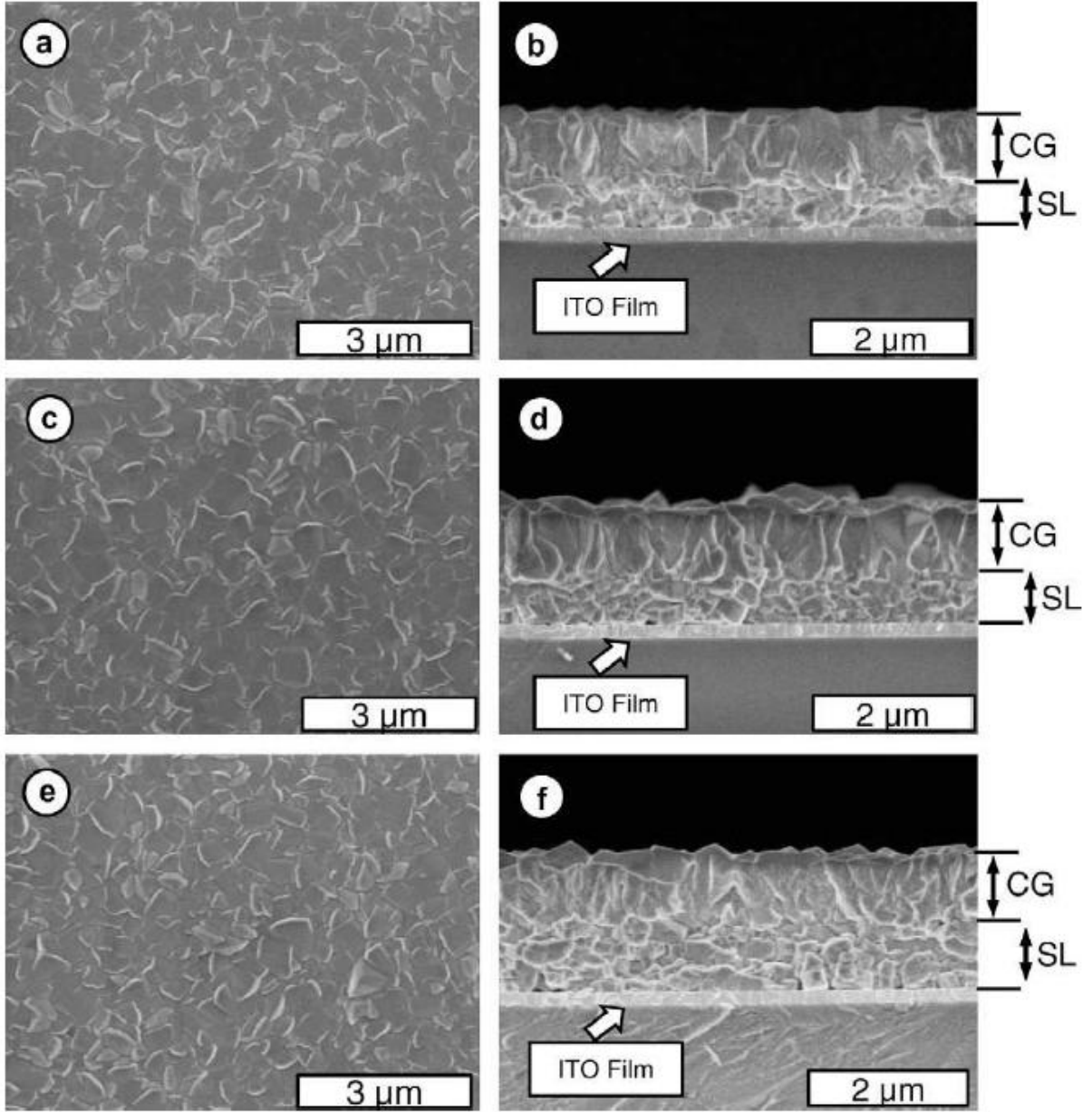


Şekil 32: Fotolitografi ve direk tutturma yöntemi ile hazırlanmış tabanı silikalit üzeri zeolit A ve tabanı zeolit A üzeri silikalit mikrodeseenlerinin SEM mikrografikleri.

Fotolitografi çalışmaları, bu proje sonrasındaki hücre çalışmaları gibi biyolojik sistemlerin bu şekilde oluşturulmuş yüzeyler üzerindeki çalışmalar konusu açısından çok önemlidir, çünkü protein ve hücre gibi biyomalzemeler elektron demet litografisiyle oluşturulan desen aralıklarına girmek için çok büyüktürler. Dolayısıyla farklı hücreler, ileride fotolitografi ile yapılan ve farklı hidrofilik/hidrofobik özelliklere sahip olan bu desenler üzerine tutturılmaya çalışılacaktır. Bu proje kapsamında yapılan çalışmalar söz verilenlerin üstünde bir başarı sağlamış ve ilerdeki çalışmalarımıza ışık tutmuştur.

4.3.2.3. Yüzeyde Büyütme Çalışmaları

Bu çalışmalara ek olarak, yine ilk defa İndium Tin Oksit (ITO) yüzey üzerinde, titanyum silikat ailesinden olan ETS-10 mikrokristalleri, içerisinde bulunan Ti-O-Ti quantum tellerinin yönü kontrol edilerek büyütülmüştür (GALİOĞLU, 2010) ve konuyla ilgili her türlü detay yayınlamamızda bulunabilir. Bu çalışmaya ait SEM mikrografikleri Şekil 33'de verilmiştir. Bu malzemenin ITO üzerinde büyütülmüş olması, ETS-10 ince filmlerinin ileride güneş pilleri alanındaki uygulamalarda test edilmesini mümkün kılacaktır.



Şekil 33: Farklı kalınlıktaki ETS-10 filmlerinin yukarıdan SEM görüntüleri (a, c, e) ve kesit görüntüleri (b, d, f). *SL = alt tabaka, CG = üzerinde büyütülen tabaka (GALİOĞLU, 2010).

4.4 Immobilizasyon Çalışmaları

Proje boyunca yapılan immobilizasyon çalışmaları, genel olarak fiziksel adsorpsiyon, biyosensör ve hücre tutunumu çalışmalarını kapsamaktadır. İlk olarak, proje teklifinde de bahsi geçtiği üzere, tek bir SiO₂ yüzey üzerine zeolit A ve silikalit parçacıkları ile tam kontrollü ince filmler üretilmiş (Bölüm 4.2.1.3), mikrosesen çalışmaları yapılmış (Bölüm 4.2.2.2) ve hücre tutunumu çalışmaları için kullanıma hazır hale getirilmişlerdir. Hücre tutunumu çalışmaları, FP-7 projesi kapsamında Kanada ortağımız olan McGill Üniversitesine gönderilen öğrencilerimiz tarafından gerçekleştirilmiş olup yapılan çalışmalara ait ilk sonuçlar tarafımızdan ayrıntılı olarak tartışılmıştır. Bu çalışmalara ek olarak, protein-zeolit ilişkisini daha yakından inceleyebilmek adına sentezlenmiş malzemeler ve farklı çeşit proteinler kullanılarak fiziksel adsorpsiyon yöntemi çalışılmış ve hangi parametrenin protein-zeolit ilişkisini ne şekilde etkilediği ayrıntılarıyla anlatılmıştır. Raporun bir diğer kısmında ise, farklı tip zeolitler üzerine farklı tip enzimler immobilize edilerek bu kompleksin amperometrik, kondüktometrik ve ISFET biyosensörlerinin performansı üzerine etkisi araştırılmıştır. En son olarak, farklı Si/Al oranına sahip zeolit Beta örneklerinden bir tanesi seçilerek, yüzey gruplarının sayısı ve çeşidinin ISFET tip biyosensörlerde üreaz ve bütirilkolinesteraz enzimlerinin aktivitesini, stabilitesini, ömrünü ve inhibisyonunu ne yönde etkilediği ayrıntılı olarak çalışılmıştır.

Proje boyunca yapılan immobilizasyon çalışmaları fiziksel adsorpsiyon alanında yoğunlaşmıştır. Bovin Serum Albumin, Konkanavalin.A, Hemoglobin, Glukoz Oksidaz, Lizozim, Üreaz ve Bütirilkolinesteraz proteinleri farklı Si/Al oranına, parçacık boyutuna, yüzey yüküne, iyon tipine ve gözenek boyutuna sahip zeolit malzemelere immobilize edilmiş ve hangi özelliğin bu etkileşimi ne derece etkilediği ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Kullanılan proteinler moleküler ağırlıklarına ve asidik/bazik özelliklerine göre seçilmiş olup ayrıntıları Tablo 8'te gösterilmiştir.

Tablo 8: Fiziksel adsorpsiyon çalışmalarında kullanılan proteinlerin moleküler ağırlıkları ve izoelektrik noktaları.

| <i>Protein</i> | <i>Moleküler Ağırlık (kD)</i> | <i>Izoelektrik noktası</i> |
|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Bovin Serum Albumin | 66 | 4,9 |
| Konkanavalin A | 104 | ~5 |
| Hemoglobin | 64,5 | 6,8 |
| Lizozim | 14,5 | 11,4 |
| Glukoz Oksidaz | 160 | 4,2 |
| Üreaz | 480 | 5,2 |
| Bütirilkolinesteraz (BuChE) | 440 | 5 |

Tablo 8'te görüldüğü üzere, bovin serum albumin ve konkanavalin A asidik, hemoglobin nötral, glukoz oksidaz, lizozim, üreaz ve bütirilkolinesteraz proteinleri ise bazik özellikteki proteinlerdir. Ayrıca en küçük protein 66 kD ağırlığı ile bovin serum albumin iken en büyük protein 480 kD ağırlığıyla üreaz proteindir. Diğer proteinlerin moleküler ağırlıkları ise 66 kD ile 480 kD arasında değişmektedir. Tablo 8'deki proteinlerin, sentezlenmiş ve modifiye edilmiş zeolit parçacıklarına immobilizasyonunu ait sonuçlar ise Tablo 9'da gösterilmektedir.

Tablo 9: Fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile farklı özelliklere sahip zeolit A ve zeolit Beta parçacıkları üzerine immobilize edilmiş protein miktarları.

| Zeolitler | BSA | Kon.A | Hem. | Liz. | G.O. | Üreaz | BuChE |
|--------------------------|------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| LTA-2 | - | - | - | + | - | + | - |
| LTA-4 | - | + | + | + | + | + | + |
| LTA-5 | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Na-Beta-30 | - | - | - | + | -- | - | - |
| Na-Beta-50 | - | + | + | + | - | ++ | + |
| Na-Beta-60 | ++ | + | + | + | - | + | + |
| Na-Beta-120 | + | + | + | + | - | + | + |
| Beta-120-NH ₂ | - | - | ++ | + | + | ++ | ++ |
| Ca-Beta | - | +++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ |
| Co-Beta | - | ++ | ++ | +++ | + | + | + |
| Cu-Beta | -- | ++ | +++ | + | + | + | + |
| Mn- Beta | - | +++ | ++ | + | + | ++ | ++ |
| Mg- Beta | + | na ² | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ |

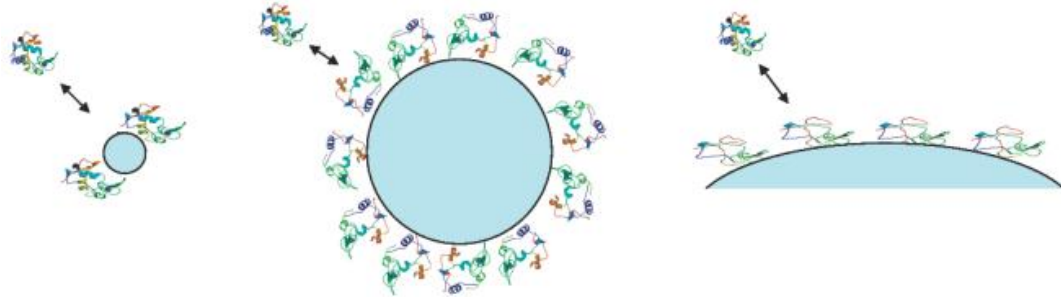
¹(- -) % 0-20, (-)% 20-40, (+)% 40-60, (++) % 60-80, (+++) % 80-100.

²na; ölçüm alınamamıştır.

Tablo 9'daki sonuçlar doğrultusunda, parçacık boyutunun, yüzey fonksiyonelleştirilmesinin ve iyon-değişiminin protein adsorplama amacı için kullanılabileceği kanıtlanmıştır. Bu sonuçlar detaylı bir şekilde aşağıda anlatılmaktadır.

4.4.1 Parçacık Boyutunun Etkisi

Tablo 9'un ilk bölümünde, proteinlerin 2, 4 ve 5 mikrometre boyutlarına sahip zeolit A parçacıkları üzerine adsorplanma miktarları görülmektedir. Elde edilen verileri göre proteinlerin zeolit A parçacıkları üzerine bağlanma oranları şu şekilde elde edilmiştir; LTA-2 < LTA-4 < LTA-5. Bu sonuca göre zeolit A üzerine protein immobilizasyonu parçacık boyutuyla doğru orantılı olarak artmaktadır. Ayrıca, bu çalışmada kullanılan proteinlerin boyutları 3-15 nm arasında değişmekte olduğu için, protein moleküllerinin zeolit A parçacıklarının mikrogözeneklerine girmeleri beklenmemekte ve adsorpsiyonun zeolit parçacıklarının sadece dış yüzeyinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu sebeple en yüksek protein adsorpsiyonunun daha geniş dış yüzeye sahip olan LTA-5 parçacıkları ile elde edilmiş olması sonuçların birbirleriyle ve literatürdeki çalışmalar ile uyum içerisinde olduğunu göstermektedir. Elde edilen veriler ışığında parçacık boyutunun proteinlerin fiziksel adsorpsiyonu üzerinde güçlü bir etkisi olduğu bulunmuştur. Büyük dış yüzey alanına ve parçacık boyutuna sahip zeolite A örneklerinin, küçük boyutlu zeolit A örneklerine göre daha çok protein bağladığı gözlenmiştir. Proteinlerin, büyük parçacıkların geniş dış yüzeyleri üzerinde yayıldıkları ve 3 boyutlu yapılarını kaybederek kısmen bozdukları, dolayısıyla da yüzey üzerine farklı bölgelerinden tutunarak daha sağlam bağlandıkları düşünülmektedir. Proteinlerin, zeolit A parçacıkları üzerindeki olası davranışları Şekil 34'de gösterilmektedir.



Şekil 34: Proteinlerin, zeolit A parçacıkları üzerindeki olası davranışları. Büyük parçacıkların sahip olduğu geniş dış yüzey, proteinlerin yüzey üzerinde denatüre olmalarını ve daha çok etkileşime girerek daha sağlam tutunduklarını göstermektedir (VERTEGEL, 2004).

4.4.2 Si/Al Oranının Etkisi

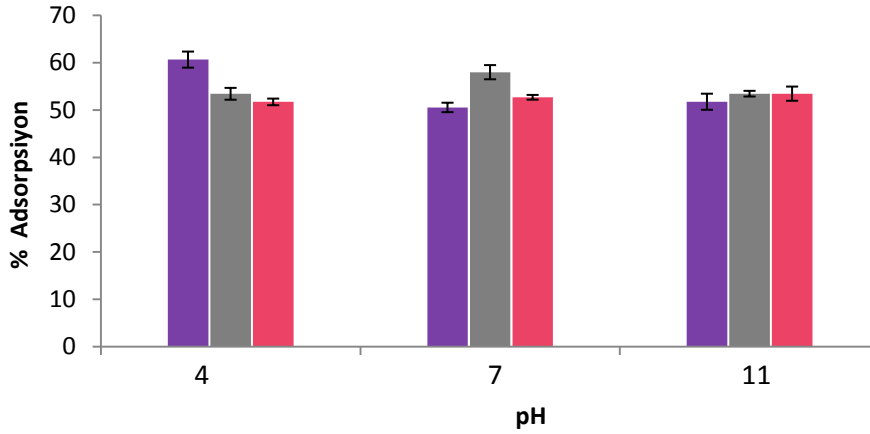
Tablo 9'un ikinci kısmında proteinlerin 30, 50, 60 ve 120 Si/Al oranlarına sahip zeolit Beta parçacıkları üzerine adsorplanma miktarları görülmektedir. Farklı Si/Al oranının, parçacık üzerinde farklı hidrofobik ve asidik bölgelerin oluşmasını sağlayarak protein-zeolit arasındaki etkileşimleri büyük oranda etkilediği düşünülmektedir. Zeolit yüzeyindeki hidrofobik bölgelere ek olarak, farklı Al oranlarından kaynaklanan farklı negatif bölgeler de bulunmaktadır. Yüzeydeki bu farklı negativiteye sahip bölgeler, proteinlerin elektrostatik güçler aracılığıyla zeolit yüzeyine bağlanmasını etkileyebilmektedir. Zeolit parçacıklarındaki değişikliklere ek olarak kullanılan proteinlerin doğal yapılarının da aradaki etkileşime farklı oranlarda etki ettiği düşünülmektedir. Bu sebeple her bir protein-zeolit etkileşimi kendi içerisinde değerlendirilmelidir. Alınan sonuçlara göre, neredeyse bütün asidik ve nötral proteinlerin yüksek Si/Al oranına, yüksek hidrofobikliğe ve daha az negatif yüke sahip zeolit Beta malzemelerine yüksek oranda bağlandıkları saptanmıştır (Na-Beta-120). En düşük bağlanma miktarları ise Na-Beta-30 parçacıkları ile alınmıştır. Bu durumun sebeplerinden birisinin protein ve zeolit parçacıkları arasındaki itme kuvvetinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Na-Beta-30 parçacıkları yüksek Al oranı sebebiyle yüksek oranda negatif oldukları ve kullanılan asidik proteinlerin yükleri de çalışılan ortam pH'ında (pH:7) negatif olduğu için en az bağlanmanın en düşük Si/Al oranına sahip parçacıklarda gözlenmesi beklenen bir durumdur. Ayrıca en düşük bağlanmanın en düşük Si/Al oranına yani en yüksek hidrofiliteye sahip zeolit parçacıklarında gözlenmesi, hidrofobik etkileşimlerin de proteinlerin fiziksel adsorpsiyonunu etkileyen bir diğer parametre olduğunu göstermiştir. Alınan veriler ışığında proteinlerin, asidik ve bazik özelliklerinin protein bağlanmasını etkilediği ve hidrofobik etkiler kadar elektrostatik etkilerin de protein-zeolit ilişkisine katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır. Tablo 9'da göze çarpan diğer bir nokta ise, bazik bir protein olan lizozimin bütün zeolit Beta parçacıklarına aynı oranda bağlanmış olmasıdır. Bu durumun sebebinin çok küçük moleküler ağırlığa sahip protein moleküllerinin yüzeyler üzerinde daha rahat ve hızlı bir şekilde hareket edebiliyor olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonuç olarak alınan veriler ışığında, proteinlerin zeolit malzemeler üzerine adsorpsiyonunun proteinlerin moleküler ağırlıkları ve asit/baz özellikleri ile olduğu kadar zeolit parçacıklarının parçacık boyutu ve Si/Al oranları ile de istenilen uygulamaya göre artırılabilir veya azaltılabilir gözlenmiştir. Ayrıca, proteinlerin zeolit ve zeolit benzeri yüzeyler üzerine adsorpsiyonunun elektrostatik, hidrofobik ve proteinlerin zeolit yüzeyindeki davranışları gibi birçok kuvvetin kombinasyonu ile sağlandığı da elde edilen diğer veriler arasındadır.

4.4.3 Yüzey Yükünün Etkisi

Tablo 9'da açıkça gözlenen bir diğer durum ise, proteinlerinin fiziksel adsorpsiyonunun zeolitin yüzey grubu ve yükünden etkilendiğidir. Proteinler ve zeolit parçacıkları arasındaki bütün etkileşimler hesaba katıldığı takdirde her bir proteinin yüzey yükü değişmiş veya değişmemiş zeolit Beta parçacıklarına farklı oranlarda bağlanması kaçınılmazdır. Tablo 6'da görüldüğü üzere bovin serum albumin ve konkanavalin A haricindeki bütün asidik ve nötral proteinler, yüzeyi pozitif yüklü NH_2 grupları içeren zeolit Beta parçacıklarına yüksek oranda bağlanmışlardır. Asidik proteinler pH 7'de negatif yüklü oldukları için, pozitif yüklü zeolit yüzeylerine daha iyi bağlanmışlardır. Bu sebeple, proteinlerin zeolit yüzeyler üzerine immobilizasyonunun, yüzey grupları APTES ile değiştirilmiş zeolitler kullanılarak artırılabilirdiği kanıtlanmıştır. Bu değişim, zeolitin yüzeyindeki elektrostatik alanları etkileyerek protein bağlanmasını etkilemektedir. Daha önceki bölümde de bahsedildiği üzere, lizozim enzimi hem pozitif hem negatif yüklü zeolit yüzeylerine eşit oranda bağlanmış olup, bu durumun sebebinin proteinin küçük moleküler yapısı ve mobilitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sebeple proteinlerin moleküler büyüklükleri, protein-zeolit ilişkisini etkileyen bir diğer parametre olarak düşünülebilmektedir.

4.4.4 pH'ın Etkisi

Literatürde bulunan pek çok çalışmaya göre, proteinlerin zeolit ve zeo-tip malzemeler üzerine fiziksel adsorpsiyonunu etkileyen bir diğer faktör, ortamın pH derecesidir. Bu durumun doğruluğunu, aynı tip malzemelerin kullanıldığı bir deney sisteminde araştırmak üzere, üç farklı asiditeye sahip proteinler; glukoz oksidaz (asidik), hemoglobin (nötral) ve lizozim (bazik), seçilerek aynı tip zeolit Beta parçacıkları üzerine 3 farklı pH derecesinde (pH: 4, 7 ve 11) immobilize edilmişlerdir. Bu çalışmaya ait veriler Şekil 35'de gösterilmektedir.



Şekil 35: Glukoz oksidaz (■), hemoglobin (■), and lizozim (■) proteinlerinin farklı pH'larda zeolit Beta parçacıklar üzerine adsorplanma miktarları.

Şekil 35'de görüldüğü üzere pH, proteinlerin izoelektrik noktalarına yaklaştıkça proteinleri adsorpsiyonu göreceli olarak artmaktadır. Örneğin, pl noktası 4 civarında olan asidik protein glukoz oksidazın en yüksek adsorplandığı aralık pH 4 civarındadır. Aynı durum nötral protein hemoglobin için de geçerlidir. Bu artışın sebebinin, proteinlerin yüzey yüklerinin, izoelektrik noktalarına yaklaşıldıkça lokalize olması ve sonuç olarak protein moleküllerinde meydana gelen çökme davranışlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonuç olarak proteinlerin zeolit malzemeler üzerine immobilizasyonunun kontrolünün mümkün olduğu ve istenilen değişikliğin ortamın pH derecesinde yapılan oynamalarla elde edilebileceği gözlenmiştir. Ancak daha önceki çalışmalarda olduğu gibi bu çalışma sonucunda da lizozim proteini, zeolit

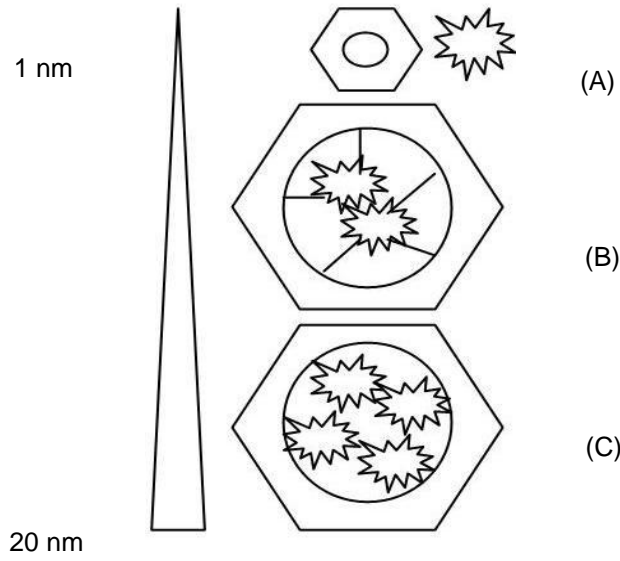
parçacıkları üzerine bütün pH derecelerinde yaklaşık olarak aynı oranda adsorplanmıştır. Bu sebeple proteinlerin zeolit malzemeler üzerine immobilizasyonunun farklı bir takım etkileşimler (hidrofobik ve elektrostatik) ve proteinlerin yüzey üzerindeki hareketlerini kapsayan oldukça karışık parametreler içerdiği sonucuna ulaşmak kaçınılmazdır. Bu sebeple her protein-zeolit ilişkisi kendi içerisinde değerlendirilmeli ve her bir etkileşimin proteine ve zeolit tipine özgü olduğu unutulmamalıdır.

4.4.5 İyon Değişiminin Etkisi

Protein-zeolit ilişkisini etkileyen, zeolitlerin parçacık boyutu, Si/Al oranı ve yüzey yükü gibi özelliklerinin dışında zeolitlerde meydana gelen iyon değişiminin de protein-zeolit ilişkisini açıklamada etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple, çalışmanın bu kısmında proteinler farklı iyonlar içeren zeolit Beta parçacıkları üzerine immobilize edilmiş ve alınan sonuçlar Tablo 9'un en son kısmında gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre BSA dışındaki bütün asidik, nötral ve bazik proteinler, iyon değişimi yapılmış parçacıklara daha yüksek oranda bağlanmışlardır. Daha ayrıntılı olarak incelendiğinde ise asidik bir protein olan konkanavalin A haricindeki bütün proteinlerin Mg içeren zeolit Beta parçacıklarını daha yüksek miktarda tercih ettikleri ve en yüksek adsorplanma oranını bu parçacıklarda gösterdikleri görülmektedir. Ayrıca asidik ve nötral proteinler Ca ve Cu içeren zeolit Beta parçacıklarına da yüksek oranda bağlanırken bazik bir protein olan lizozim ise en çok Co ve Mg iyonları içeren zeolit Beta parçacıklarına bağlanmıştır. Bahsi geçen çalışmalar neticesinde, proteinlerin zeolit ve zeolit benzeri yüzeyler üzerine adsorpsiyonunun elektrostatik, hidrofobik ve proteinlerin zeolit yüzeyindeki davranışları gibi birçok kuvvetin kombinasyonu ile sağlandığı ve bu tip çalışmalar sayesinde her bir proteine özgü ideal bir yüzey sağlanabileceği düşünülmektedir.

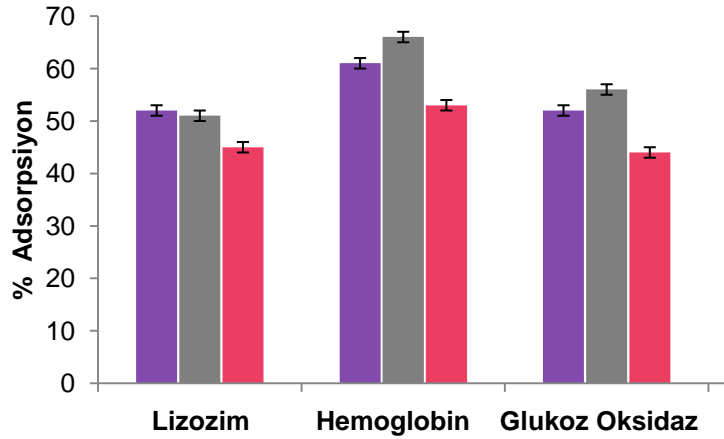
4.4.6 Gözenek Boyutunun Etkisi

Zeolit ve zeo-tip malzemelerin yüzey yapıları ve özellikleri proteinlerin immobilizasyonunu çok büyük ölçüde etkilemektedir. Bahsi geçen yüzey özelliklerinden birisi de gözenek boyutudur. Literatürde sıkça bahsedildiği üzere, özellikle mezo gözenek içeren malzemelerin, protein taşıyıcılığı için gereken ihtiyacı doldurabilecekleri düşünülmektedir (MIYAHARA, 2007; HU, 2009; YIU, 2001; GORADIA, 2005). Ayrıca mikro gözenekli malzemeler, proteinlerin zayıf kuvvetlerle sadece dış yüzeye bağlanmalarına izin verirken, mezo gözenekli yapılar proteinlerin daha sağlam tutunabilecekleri, aktivitelerini, stabilitelerini ve tekrar kullanılabilirliklerini arttıracabilecekleri daha uygun bir alan sağlamaktadırlar. Bu durumu Şekil 36'de gösterilen şema ile de anlatmak mümkündür.



Şekil 36: Proteinlerin (yıldız şekilli) farklı gözenek boyutuna sahip malzemeler üzerine adsorpsiyonu.

Yukarıda bahsi geçen sebeplerden dolayı, gözenek boyutunun protein adsorpsiyonu üzerindeki etkisini görebilmek amacıyla farklı gözenek boyutuna sahip mikro gözenekli silikalit ve mezo gözenekli SBA-15 parçacıkları sentezlenmiştir. Mikro ve mezogözenek arasında bir gözenek genişliği elde edebilmek amacıyla da SBA-15 parçacıkları APTES ile modifiye edilmiş ve malzemelere ait karakterizasyon sonuçları Bölüm 4.2'deki Tablo 6'da gösterilmiştir. Daha sonra, farklı moleküler boyutlara sahip lizozim (3.2 nm), hemoglobin (5.5 nm) ve glukoz oksidaz (10 nm) proteinleri sentezlenen SBA-15 ve silikalit parçacıklarına adsorplanmış ve alınan sonuçlar Şekil 37'de gösterilmiştir.



Şekil 37: Proteinlerin silikalite (■), SBA-15 (■) ve modifiye edilmiş SBA-15 (■) malzemeleri üzerine adsorpsiyonu.

Şekil 37'de görüldüğü üzere kullanılan bütün proteinler mezo gözenekli SBA parçacıklarına mikro gözenekli silikalitten daha çok bağlanmışlardır. Bu artışa SBA parçacıklarının büyük gözenek boyutlarının olduğu kadar yüksek yüzey alanlarının da sebep olduğu düşünülmektedir. Ayrıca modifiye edilmiş ve edilmemiş SBA-15 parçacıklarını kendi aralarında karşılaştırdığımızda, APTES ile gözenek boyutu ve yüzey yükü değiştirilmiş parçacıkların daha çok protein adsorpladığını görülmüştür. Bu sebeple parçacıkların yüzey

yükünün, gözenek boyutu ve yüzey alanı söz konusu olduğunda proteinlerin adsorpsiyonu üzerinde daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

4.3 Biyosensör Çalışmaları ve Veri Ölçümleri

Projenin bu döneminde kullanılan ISFET, kondüktometrik ve amperometrik tip biyosensörler (Şekil 3, 5 ve 6) ilk defa olarak laboratuvarımızda kurulmuşlardır. Bu biyosensörlerle zeolitlerin kullanıldığı veriler ilk kez tarafımızdan alınmış, modifiye edilmiş zeolitlerin kullanımıyla değerlendirilmiş, sistemin optimizasyonu, deney süreci ve sonuçları özellikle kondüktometrik, amperometrik ve ISFET tip biyosensörler için proje boyunca ayrıntılı olarak tartışılmıştır. Bu doğrultuda çıkan yayınlarımız da her bölümde kısaca anlatılmıştır.

ODTÜ'deki laboratuvarımızda sentezlediğimiz zeolitlerin farklı özelliklerinin enzim immobilizasyonu üzerinde nasıl bir etkisi olduğu projemiz boyunca detaylı olarak çalışılmıştır. Bu nedenle proje teklifinde de bahsettiğimiz üzere farklı tipte zeolitler sentezlenmiş, sentezlenen zeolitlerin yüzey grupları ve yapılarında bulunan iyonlar başarıyla değiştirilmiştir. Elde edilen bu zeolitlerden film ve mikro kanallar yapılarak enzim ve hücre bağlanabilmesi ve en yüksek etkinlikte çalışabilmesi için uygun şartlar sağlanmaya çalışılmıştır. Sentezlediğimiz bu örnekler, ilk denemelerin yapılabilmesi için Fransa'daki ortağımıza gönderilmiş ve dayanıklılık testleri yapılmıştır. Farklı yöntemlerle hazırlanan enzim ve zeolit içeren membranlar elektrotlara immobilize edilmiş ve literatürdeki ilk veriler alınmıştır. Bu ilk verilerin sonuçları proje dönemi boyunca ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Daha sonra yapılan tüm bu çalışmalar ODTÜ laboratuvarlarımızda devam etmiş halen de etkili bir şekilde devam etmektedir.

4.5.1 Amperometrik Biyosensör Verileri

Yukarıda da bahsi geçtiği üzere çalışmanın bu kısmında kullanılan amperometrik tip biyosensörlerin çalışma prensibi belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen veya indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonudur. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde yararlanır. İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılmasının ISFET tip sensörlerden en büyük farkı, ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir.

Zeolitlerin bu tip bir biyosensör üzerindeki etkisini görebilmek amacıyla Glukoz oksidaz, Alkol oksidaz ve Laktak oksidaz enzimleri seçilerek değişik tipte zeolitlere immobilize edilmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıda gösterilmiştir.

4.5.1.1 Glukoz Oksidaz Enzimi Kullanılarak Oluşturulan Amperometrik Tip Biyosensör Çalışmaları

Zeolitlerin amperometrik biyosensörlerin çalışmasına etkisini görebilmek amacıyla öncelikle farklı büyüklüklerdeki silikalit örneklerine glukoz oksidaz enzimi iki farklı teknikle immobilize edilmiş ve zeolitsiz biyosensörler ile karşılaştırılmıştır. Birinci yöntem; PEDT kullanılarak yapılan elektrokimyasal polimerizasyon yöntemi, ikincisi ise glutraldehit kullanılarak yapılan çapraz-bağ oluşturma yöntemidir. Bu iki tekniğe ait deney sonuçları Tablo 10'da gösterilmiştir. Çalışmalar, 5 mM fosfat tampon solüsyonunda ve pH 7.2 de gerçekleştirilmiştir.

Tablo 10: Hiç zeolit içermeyen amperometrik glukoz oksidaz biyosensör verileri

| İmmobilizasyon Yöntemi | Ölçülebilen en düşük substrat miktarı, mM | Enzimin substratına doyduğu konsantrasyon, mM | Doyma noktasında amperometrik olarak ölçülen enzimatik yanıt, nA | Biosensör ömrü,% |
|------------------------|---|---|--|---|
| Gluteraldehit | 0.32 | 0.32 – 20.48 | 16.3 | 5. gün sonunda 553, 10. gün sonunda 192 |
| PEDT | 0.08 | 0.08 – 20.48 | 33.5 | 5. gün sonunda 217, 10. gün sonunda 62, |

Tablo 11: Silikalit-500 (500 nm) içeren amperometrik biyosensörler verileri

| İmmobilizasyon Yöntemi | Ölçülebilen en düşük substrat miktarı, mM | Enzimin substratına doyduğu konsantrasyon, mM | Doyma noktasında amperometrik olarak ölçülen enzimatik yanıt, nA | Biosensör ömrü,% |
|------------------------|---|---|--|---|
| Gluteraldehit | 0.08 | 0.08– 20.48 | 29.5 | 5. gün sonunda 213, 10. gün sonunda 249 |
| PEDT | 0.16 | 0.16– 20.48 | 5.6 | 5. gün sonunda 162, 10. gün sonunda 168 |

Tablo 12 - Silikalit-70 (70 nm) içeren amperometrik biyosensörler verileri

| İmmobilizasyon Yöntemi | Ölçülebilen en düşük substrat miktarı, mM | Enzimin substratına doyduğu konsantrasyon, mM | Doyma noktasında amperometrik olarak ölçülen enzimatik yanıt, nA | Biosensör ömrü,% |
|------------------------|---|---|--|--|
| Gluteraldehit | 0.16 | 0.16– 20.48 | 11.8 | 5. gün sonunda 168, 10. gün sonunda 214 |
| PEDT | 0.08 | 0.08– 20.48 | 2.8 | 5. gün sonunda 468, 10. gün sonunda 532 |

Tablo 10-12'de görüldüğü üzere, immobilizasyon için kullanılan tekniklerin biyosensör performansı yani enzimin hassasiyeti (ölçülebilen en düşük substrat miktarı), hızı (enzimin substratına doyduğu nokta) ve biyosensör ömrü (enzimin stabilitesi) üzerine etkileri arasında belirgin bir fark görülmemektedir. Bu sebeple, elektropolimerizasyon yöntemi daha güvenilir ve uygulanması kolay bir yöntem olduğu için çalışmanın bundan sonraki kısımlarına bu yöntem kullanılarak devam edilmiştir.

PEDT kullanılarak Silikalit-500 ve Silikalit-70 ile yapılan çalışma genişletilerek her iki örneğin kalsine edilmiş tipleri de çalışmaya eklenmiş ve sonuçlar Tablo 13'de gösterilmiştir.

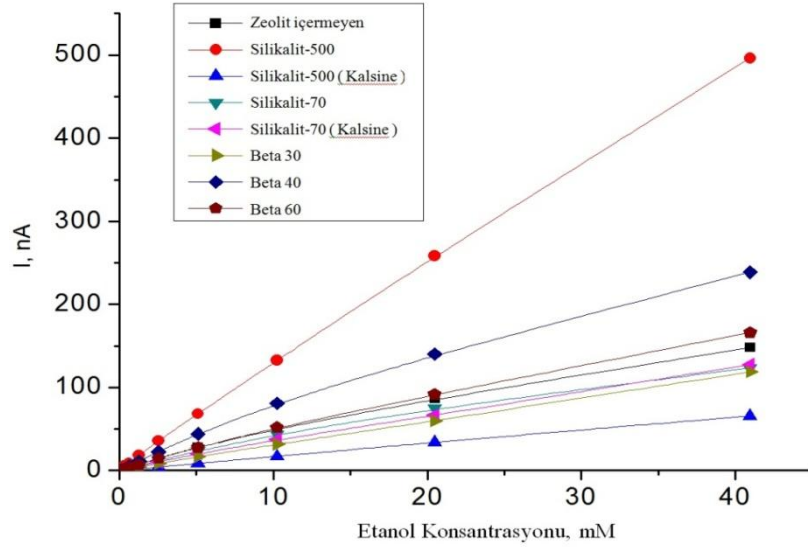
Tablo 13: Hiç zeolit içermeyen amperometrik glukoz oksidaz biyosensörlerinin kalsine edilmiş ve edilmemiş Silikalit 500 ve silikalit 70 partikülleri içeren amperometrik biyosensörler ile karşılaştırılması.

| Biyosensör tipi | Ölçülebilir en düşük substrat miktarı, mM | Enzimin substratına doyduğu konsantrasyon, mM | Doyma noktasında amperometrik olarak ölçülen enzimatik yanıt, nA | Biyosensör ömrü, % |
|-------------------------------|---|---|--|---|
| Zeolitsiz | 0.08 | 0.08 – 20.48 | 69 | 5. gün sonunda 217, 10. gün sonunda 62 |
| Silikalit-500 | 0.16 | 0.16– 20.48 | 29 | 5. gün sonunda 162, 10. gün sonunda 168 |
| Silikalit-70 | 0.08 | 0.08 – 20.48 | 46 | 5. gün sonunda 468, 10. gün sonunda 532 |
| Kalsine edilmiş Silikalit-500 | 0.64 | 0.64 – 20.48 | 125 | 5. gün sonunda 230, 10. gün sonunda 239 |
| Kalsine edilmiş Silikalit-70 | 0.64 | 0.64 – 20.48 | 15,6 | 5. gün sonunda 231, 10. gün sonunda 159 |

Tablo 13’de görüldüğü üzere, farklı tip zeolitler arasında çok belirgin bir fark gözlenmemesine rağmen, Silikalit-70 örneği içeren glukoz oksidaz biyosensörlerinde, diğer tip zeolitleri içeren biyosensörlere göre enzimin hassasiyeti (ölçülebilir en düşük substrat miktarı), hızı (enzimin substratına doyduğu nokta), ve biyosensör ömrü (enzimin stabilitesi) açısından daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Silikalit-70 örneği içeren biyosensörler hiç zeolit içermeyenlerle karşılaştırıldığında, enzimin hassasiyeti ve hızında bir değişim gözlenmemesine rağmen enzimin doyduğu noktada ölçülen yanıt %40 oranında azalmıştır. Enzimin stabilitesinde ise oldukça yüksek oranda bir artış gözlenmiştir. Tabloda göze çarpan bir diğer durum ise kalsine edilmiş Silikalit-500 içeren biyosensörlerde enzimatik yanıtın % 80 oranında artmış olmasıdır. Enzimatik aktivitenin yanısıra biyosensör ömründe de belirgin bir artış gözlenmiş ancak enzimin hassasiyeti ve hızında olumlu yönde bir değişime rastlanmamıştır.

4.5.1.2 Alkol Oksidaz Enzimi Kullanılarak Oluşturulan Amperometrik Tip Biyosensör Çalışmaları

Çalışmanın bu kısmında, kalsine edilmiş ve edilmemiş Silikalit-500 ve Silikalit-70 örnekleri ile farklı Si/Al oranına sahip Na-Beta-30, Na-Beta-40 ve Na-Beta-60 partikülleri, kullanılmış ve bu partiküllerin amperometrik alkol oksidaz biyosensör performansı üzerine etkisi çalışılmıştır. Bu örneklerin seçilmesindeki amaç, zeolitlerin partikül büyüklüğü, kalsinasyon süreci ve Si/Al oranının biyosensör performansına etkisinin anlaşılabilmesidir. Bu araştırmaya ait sonuçlar aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 38: Hiç zeolit içermeyen amperometrik alkol oksidaz biyosensörlerindeki enzimatik aktivitenin farklı tipte zeolit içeren amperometrik biyosensörlerdeki enzimatik aktivite ile karşılaştırılması.

Şekil 38’de görüldüğü üzere Silikalit-500 içeren alkol oksidaz biyosensörleri en yüksek performans göstermiştir. Silikalit-70 içeren biyosensörlerdeki enzimatik yanıtın düşük çıkmasının ise, partiküllerin küçük parçacık boyutlarından dolayı kümelenme olması ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca kalsine edilmiş silikalitleri içeren biyosensörlerde de görülen düşük enzimatik aktivitenin nedeni reaksiyona girmemiş maddelerin tam olarak uzaklaştırılamaması veya yüksek sıcaklığın silikalitin yapısını bozmuş olması ile açıklanabileceği düşünülmektedir. Zeolit Beta içeren biyosensörler de ise Si/Al oranına bağlı olarak herhangi bir etkiye rastlanmamış, en yüksek enzimatik aktivite Na-Beta-40 partiküllerini içeren biyosensörlerde okunmuştur. Bu çalışmada elde edilen en önemli sonuç ise Silikalit-500 partiküllerinin kullanıldığı biyosensörlerde alkol oksidaz enziminin aktivitesinin yaklaşık % 200 oranında, zeolit Beta-40 partiküllerinin kullanıldığı biyosensörlerde ise enziminin aktivitesinin % 60 oranında arttırılmış olduğudur.

Deney sonuçlarının, biyosensör performansı ile ilgili diğer parametreleri ise Tablo 2’de gösterilen zeolitler de kullanılarak çalışılmış ve sonuçları Tablo 14’te gösterilmiştir.

Tablo 14: Hiç zeolit içermeyen amperometrik alkol oxidaz biyosensörlerinin kalsine edilmiş ve edilmemiş silikalit 500 ve silikalit 70 partikülleri ile Na-Beta-30, Na-Beta-40 ve Na-Beta-50 partikülleri içeren amperometrik biyosensörler ile karşılaştırılması.

| Biyosensör tipi | Ölçülebilen en düşük substrat miktarı, mM | Enzimin substratına doyduğu konsantrasyon, mM | Doyma noktasında amperometrik olarak ölçülen enzimatik yanıt, nA | Biyosensör ömrü, % |
|-------------------------------|---|---|--|--|
| Zeolitsiz | 0.16 | 0.08 – 20.48 | 110 | 5. gün sonunda 100, 10. gün sonunda 39,5 |
| Silikalit-500 | 0.08 | 0.08 – 20.48 | 431 | 5. gün sonunda 59,6, 10. gün sonunda 35,7 |
| Silikalit-70 | 0.16 | 0.16 – 20.48 | 103.5 | 5. gün sonunda 42, 10. gün sonunda 27 |
| Kalsine edilmiş Silikalit-500 | 0.32 | 0.32 – 20.48 | 117.5 | 5. gün sonunda 76,7, 10. gün sonunda 46,6 |
| Kalsine edilmiş Silikalit-70 | 0.08 | 0.08 – 20.48 | 174.5 | 5. gün sonunda 65,9, 10. gün sonunda 37,9 |
| Na-Beta-30 | 0.16 | 0.16 – 20.48 | 136.5 | 7. gün sonunda 71, 15. gün sonunda 37 |
| Na-Beta-40 | 0.08 | 0.08 – 20.48 | 113.5 | 5. gün sonunda 77,3, 10. gün sonunda 41 |
| Na-Beta-60 | 0.16 | 0.16 – 20.48 | 144.5 | 5. gün sonunda 55, 10. gün sonunda 44 |

Tablo 14’de görüldüğü üzere, biyosensör performansı farklı tip zeolitler kullanıldığında farklı sonuçlar vermektedir. Kalsine edilmiş Silikalit-70 ve Na-Beta-40 partiküllerinin kullanıldığı biyosensörlerde enzimin hassasiyeti göz önüne alındığında (ölçülebilen en düşük substrat

miktarında), hiç zeolit içermeyen biyosensörlerdeki enzim hassasiyetine oranla gözle görülür bir gelişme sağlanmıştır. Ancak enzimin hızı (substratına doyduğu konsantrasyon) ve stabilitesi (biyosensör ömrü) söz konusu olduğunda herhangi bir değişime rastlanamamıştır. Bu iki durumun enzimin kendine ait yapısıyla ilgili olduğu ve zeolit bu yapıya negatif veya pozitif bir anlamda etki sağlayamadığı düşünülmektedir. Tablo 14’te dikkat edilmesi gereken bir diğer parametre ise enzimatik aktivitedir. Silikalit-500 partiküllerinin kullanıldığı biyosensörlerde alkol oksidaz enziminin aktivitesinde yaklaşık % 300 oranında bir artış sağlanmıştır. Silikalit-500 partikülleri enzime sağladıkları geniş yüzey alanı, uygun yüzey grupları ve etkileşime katkıda buldukları elektriksel ve kimyasal değişimler ile enzimin çalışabilmesi için uygun bir ortam sağlamış ve enzimin aktivitesinde gözle görülür oranda bir artış sağlamıştır.

4.5.1.3 Laktat Oksidaz Enzimi Kullanılarak Oluşturulan Amperometrik Tip Biyosensör Çalışmaları

Amperometrik çalışmaların bu son kısmında, Laktat oksidaz enzimi, Silikalit-500, kalsine edilmiş Silikalit-70 ve Na-Beta-30 partikülleri üzerine immobilize edilerek aktivitesi ölçülmüş ve sonuçları aşağıda gösterilmiştir.

Tablo 15: Hiç zeolit içermeyen amperometrik laktat oksidaz biyosensörlerinin Silikalit-500 ve kalsine edilmiş silikalit-70 partikülleri ile Na-Beta-30 partikülleri içeren amperometrik biyosensörler ile karşılaştırılması.

| Biyosensör tipi | Ölçülebilir en düşük substrat miktarı, mM | Enzimin substratına doyduğu konsantrasyon, mM | Doyma noktasında amperometrik olarak ölçülen enzimatik yanıt, nA | Biyosensör ömrü, % |
|------------------------------|---|---|--|--------------------------------------|
| Zeolitsiz | 0.016 | 0.016 | 16.4 | 2. gün sonunda 40; 4. gün sonunda 24 |
| Silikalit-500 | 0.004 | 0.004 | 92 | 2. gün sonunda 3 |
| Kalsine edilmiş Silikalit-70 | 0.016 | 0.016 | 19.4 | 2. gün sonunda 2 |
| Na-Beta 30 | 0.016 | 0.016 | 56.2 | 2. gün sonunda 2 |

Tablo 15’de görüldüğü üzere, farklı tip zeolitler kullanıldığında biyosensör performansı da farklılıklar göstermektedir. Daha önce bahsedilen glukoz oksidaz ve alkol oksidaz biyosensörlerinde de olduğu gibi, laktat oksidaz biyosensörlerinde en yüksek biyosensör performansı yani düşük enzim hassasiyeti (ölçülebilir en düşük substrat miktarı), yüksek aktivite hızı (enzimin substratına doyduğu nokta), ve yüksek aktivite (enzimin doyduğu noktada ölçülen yanıt) Silikalit-500 partiküllerinin kullanıldığı biyosensörlerde görülmektedir. Bu biyosensörlerde enzimin aktivitesi % 600 oranında artmış ancak biyosensör ömründe herhangi bir gelişme kaydedilememiştir. Aynı tip zeolit fakat enzimlerin kullanıldığı biyosensörlerdeki ‘biyosensör ömrü’ parametresinde görülen farklılıkların nedeninin ise her enzimin kendine ait doğal yapısıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Glukoz Oksidaz ile ilgili bir makalemiz ara rapor döneminde yayınlanmıştır (GORUISHKINA, 2010).

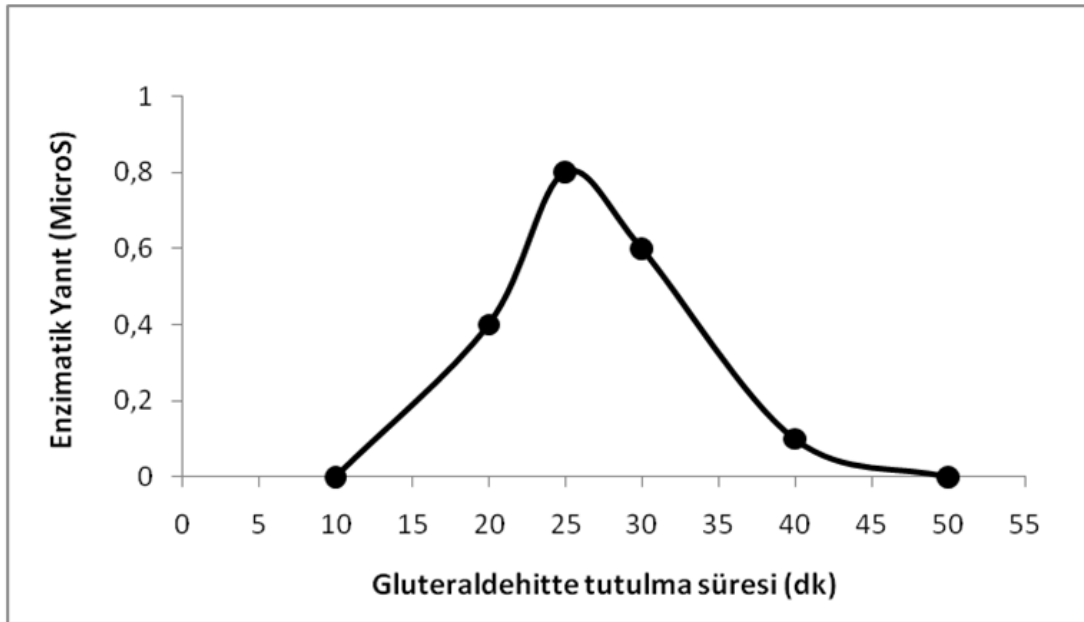
4.5.2 Kondüktometrik Biyosensör Verileri

Daha önce de bahsi geçtiği üzere, çalışmanın bu kısmında kullanılan kondüktometrik tip biyosensörlerin çalışma prensibi, iyon oluşumunu engelleyici sıvı bir ortam içerisinde, biri çalışan diğeri referans olan iki elektroda potansiyel uygulanması sonucu gerçekleşen iyon değişiminin ölçülmesidir. Asıl ölçülen iki elektrot arasındaki potansiyel farktır. Model enzim olarak seçilen üreaz enzimi, literatürde ilk defa, modifiye edilmiş farklı tipteki zeolitlere immobilize edilerek ortamda meydana getirdiği iyon değişimi ölçülmüş ve sonuçlar zeolitsiz biyosensörlerdeki değişim ile karşılaştırılmıştır. Biyosensör çalışmalarında kullanılmak üzere değişik özellikte ve büyüklükte zeolitler ve bu alanda sıkça kullanılan silikalit örnekleri sentezlenmiştir.

Enzimatik aktivite için en uygun koşulların belirlenmesi amacıyla, zeolit A model olarak seçilerek üreaz'la karıştırılmış, farklı molarite ve pH 'larda fosfat tamponları hazırlanmış, gluteraldehit içinde tutulma süreleri karşılaştırılmıştır.

4.5.2.1 Gluteraldehit İçinde Tutulma Süresinin Etkisi

Şekil 39'da da görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesi, elektrodun 25 dakika gluteraldehit buharında tutulmasıyla gerçekleşmiştir. 25 dakika, enzimin, enzim özelliği taşımayan bir protein olan Bovine Serum Albumin (BSA)'e çapraz-bağ ile bağlanması ve BSA'nın da elektroda tutunması için en etkili süredir. Bu sürenin altındaki zamanlarda yetersiz hidrojen bağları nedeniyle elektrot yüzeyinden enzim kaybı olabilirken, daha uzun zamanlarda çok fazla hidrojen bağı oluşması enzimin aktif merkezini bloke edebilir. Diğer yapılan tüm deneyler de elektrotların 25 dakikalık gluteraldehit buharında tutulmasıyla gerçekleşmişlerdir.

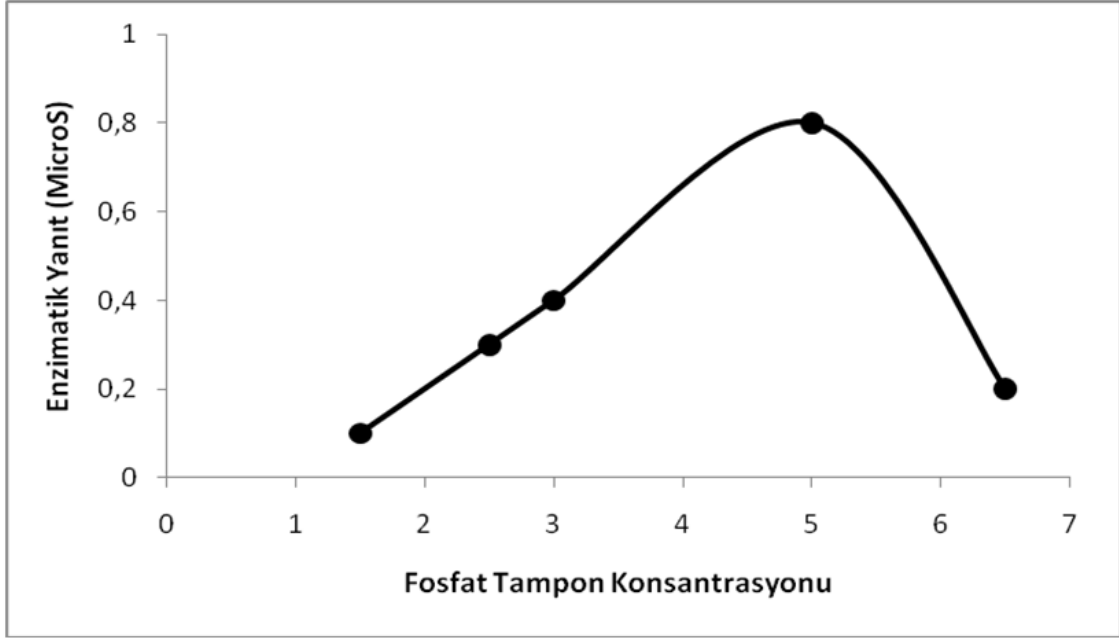


Şekil 39: Gluteraldehitte Bırakılma Süresi (Çapraz-Bağ Olması İçin Gereken Zaman)

4.5.2.2 Tampon Çözeltisinin Konsantrasyonunun ve pH Değerinin Aktiviteye Etkisi

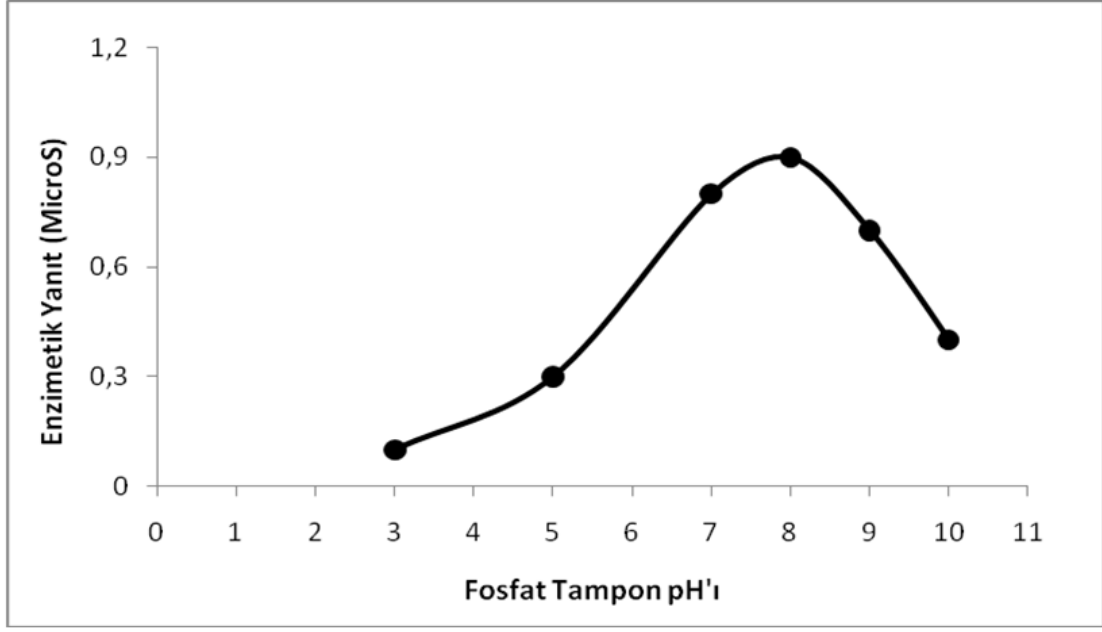
Fosfat tamponu, bir zayıf asit ve onun konjuge bazından veya zayıf baz ve onun konjuge asidinden oluşur. Şekil 40'da görüldüğü üzere 5 mM konsantrasyondaki bir fosfat tamponu,

ortamdaki hidrojen ve hidroksil iyonlarını dengelemede ve dolayısıyla da pH'ı sabit tutmada yeterlidir. Dengesiz pH değışiklikleri enzimlerin yapısını bozarak çalışmalarına engel olur. Diğer yapılan tüm deneyler de 5 mM fosfat tamponu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



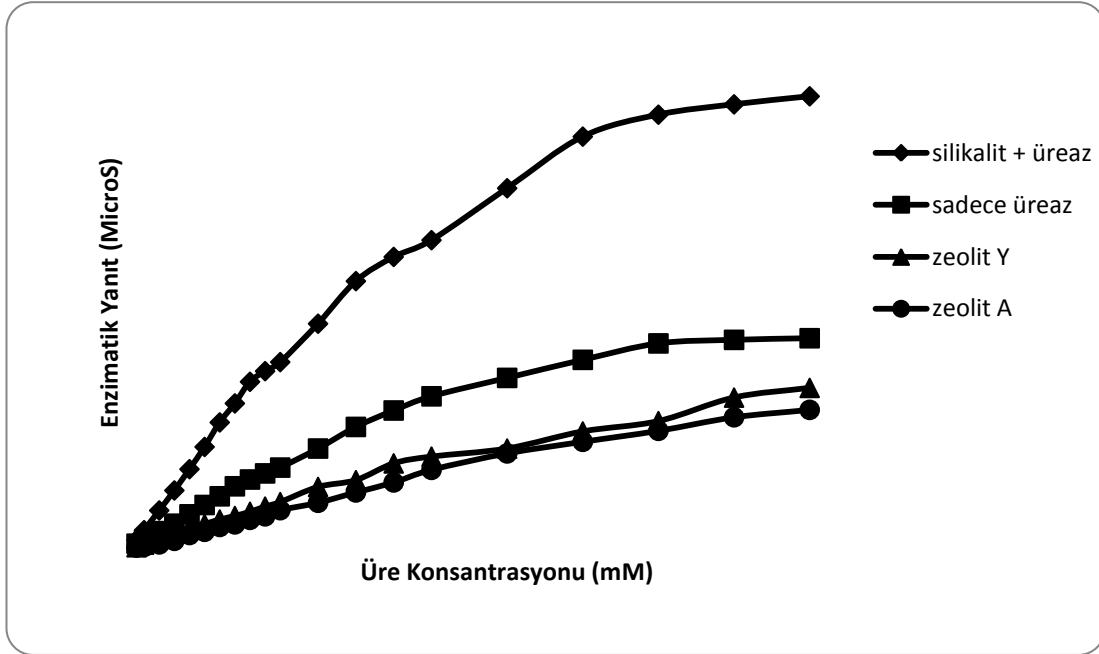
Şekil 40: Fosfat Tampon Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesine Etkisi

Bir fosfat tamponu, ortamdaki hidrojen ve hidroksil iyonlarını etkin bir şekilde yok ederek pH'ı hazırlandıkları değerde sabit tutabilmelidir, çünkü bütün biyolojik reaksiyonlarda olduğu gibi enzimler de ancak belirli pH aralıklarında çalışabilirler. Bu aralıkların dışındaki değışimler konformasyon değışimine neden olarak enzimlerin çalışmasını engeller. Şekil 41'de görüldüğü üzere üreaz enziminin 7-9 pH aralığında aktif bir şekilde çalışmakta olduğu gözlenmiştir.



Şekil 41: Fosfat Tampon pH'ının Enzim Aktivitesine Etkisi

Üreazın etkin bir şekilde çalışabilmesi için gerekli olan koşullar belirlendikten sonra, immobilizasyon işlemi her bir zeolit için tekrar denenmiş, artan miktarlarda üre eklenerek ölçülen enzimatik aktiviteler ise Şekil 42'de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.



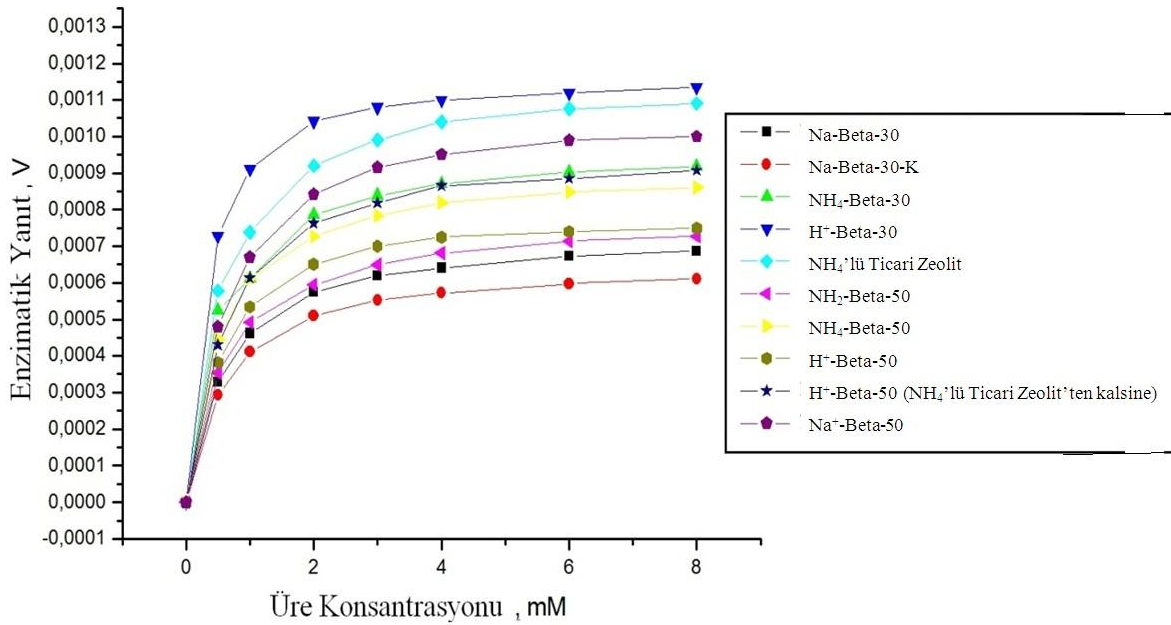
Şekil 42: Farklı Zeolitlerin Üreaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bu çalışmaların sonucunda, literatürde ve endüstride çok kullanılan zeolit A, zeolit Y, silikalit gibi zeolitler ilk defa olarak üreaz enzimi ile oluşturulmuş kondüktometrik biyosensörlere entegre edilerek, enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Zeolitlerin zeolit kullanılmadan yapılan aktivitelere oranla daha farklı sonuçlar verdiği kesindir. Ancak bu farklılıkların zeolitlerin hangi özelliklerinden dolayı olduklarını anlamak amacıyla bundan sonraki çalışmalarda bu amaca

spesifik farklı ve kontrollü Si/Al oranlı, farklı yüzey alanlı, gözenek boyutlu zeolitler kullanılmıştır. Bu çalışmalarımızın sonucu ile ilgili bir makalemiz ara rapor döneminde yayınlanmıştır (SOY, 2010).

4.5.2.3 Zeolitlerin Kondüktometrik Biyosensör Sonuçlarına Etkisi

Çalışmalarımızın bir sonraki kısmı ise yine kondüktometrik biyosensörlerin daha pratik, spesifik ve hatta seçici kullanımlarını da sağlamak için, kontrollü bir şekilde sentezlenen zeolitlerin biyosensöre entegrasyonu yapılmıştır. Bütün bu deneyler daha önceden de bahsedildiği gibi zeolitlerin standart olarak kullanılan enzim içerikli biyosensör membranlarına eklenmesiyle (Şekil 8-A) yapılmıştır. Bu amaca yönelik enzimin aktivitesine (Şekil 43) ek olarak zeolit konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi ve tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucu elde edilen sonuçlar da Şekil 44'de gösterilmiştir. Yapılan bütün çalışmalar 5 mM fosfat tampon solüsyonunda ve pH 7.2 de gerçekleştirilmiştir.

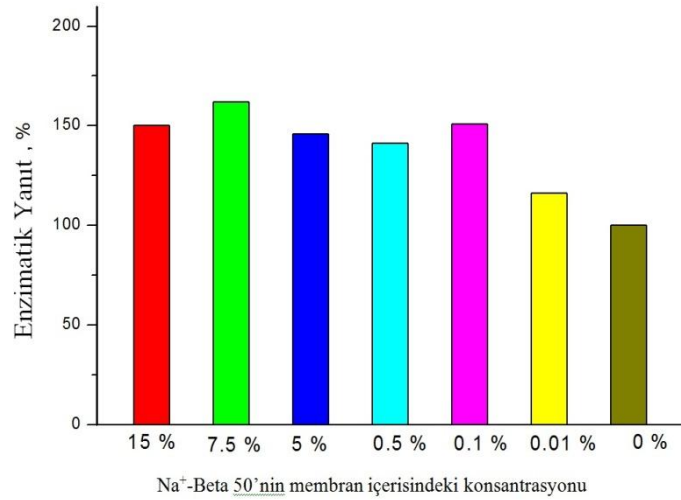
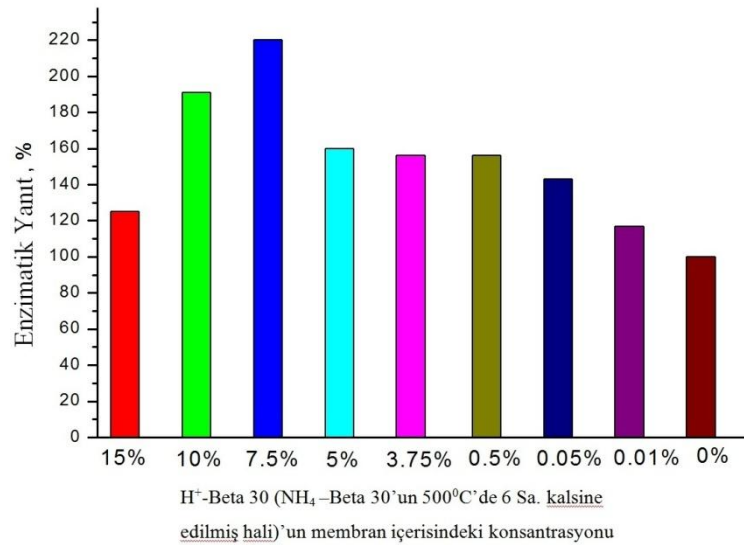
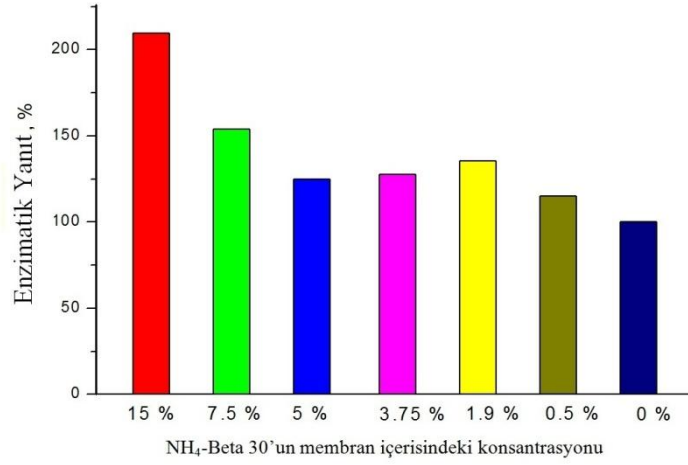


Şekil 43: Modifiye edilmiş zeolitlerin kullanıldığı kondüktometrik tipli üreaz biyosensörlerinin aktivitesinin hiç zeolit içermeyen biyosensörlerin aktiviteleri ile karşılaştırılması.

Şekil 43'de görüldüğü üzere farklı tip zeolitler enzimatik aktiviteyi farklı oranlarda etkilemektedirler. NH₄-Beta-30 ve H-Beta-30 zeolitleri içeren biyosensörlerdeki enzimatik aktivitenin en yüksek olduğu, iyon değişimi yapılmamış Na-Beta-30 içeren ve hiç zeolit içermeyen biyosensörlerdeki üreaz aktivitesinin ise en düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu noktada varılan sonuç, ortamda bulunan NH₄ ve H iyonlarının enzimin stabilitesini artırarak daha etkin çalışmasını sağlamış olabileceği yönündedir. Kalsinasyon uygulanmasının etkisine bakılacak olursa, Beta-30-K örneklerine immobilize edilmiş üreaz enziminin aktivitesi kalsine edilmemiş Na-Beta-30 örneklerine immobilize edilmiş üreazın aktivitesinden daha yüksektir. Uygulanan sıcaklık zeolit boşluklarında bulunan reaksiyona girmemiş maddelerin uzaklaştırılmasını sağlamıştır. Alınan sonuçlara göre, reaksiyona girmemiş bu maddeler enzimin aktivitesini olumsuz yönde etkilemektedirler. Karşılaşılan bir diğer sonuç ise yüzey gruplarının negatif OH'lardan pozitif NH₄'lere dönüştürülmesinin enzimin aktivitesi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olmamasıdır. Bu durumun, üreaz enziminin dış yüzeyindeki grupların zeolitteki OH grupları ile daha iyi bir etkileşime girmesi ile alakalı olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca kullanılan zeolitlerdeki Si/Al oranı, immobilize edilmiş enzimin aktivitesi üzerinde çok belirgin bir rol oynamamaktadır. Bu çalışma ile elde edilen en önemli sonuç ise, zeolitlerin kondüktometrik biyosensörlerde, üreaz enziminin aktivitesini %15 ila 80 oranında ve zeolitlere uygulanan modifikasyon metoduna bağlı olarak arttırmış olmalarıdır. İyon değişimi ve sıcaklık uygulaması ile modifiye edilen zeolitler, üreaz enziminin aktivitesini gözle görülür oranda arttırmakta ve klinik alandaki biyosensör uygulamaları için gelecek vaad etmektedirler.

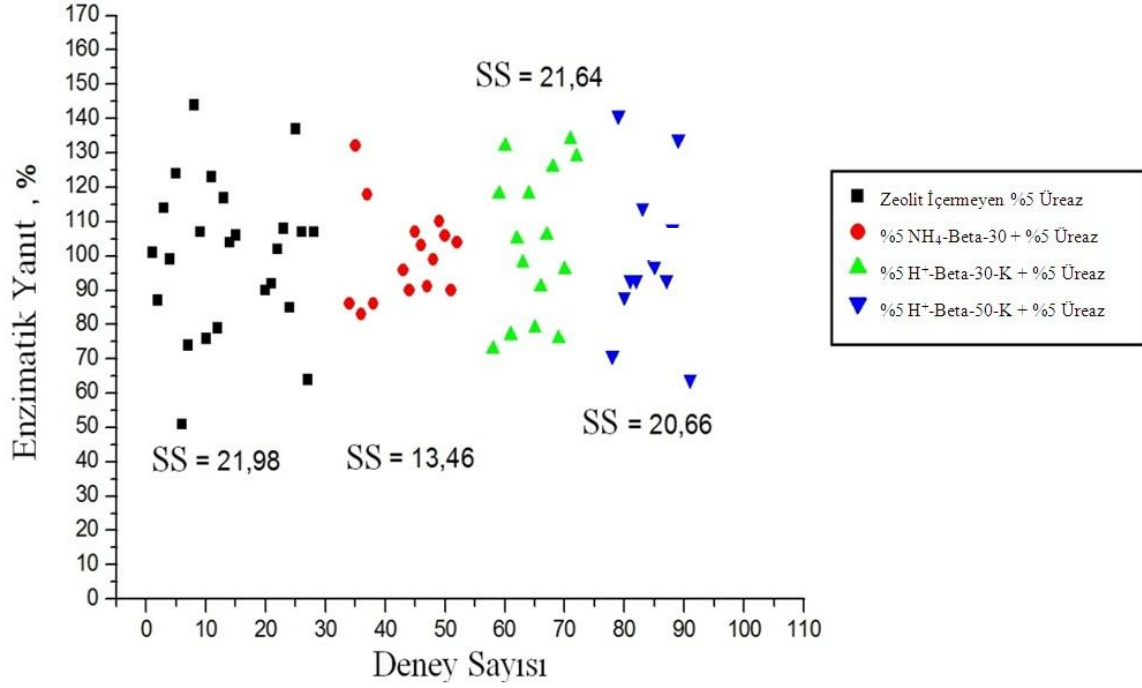
Bir sonraki çalışmada, en yüksek enzimatik aktivitenin görüldüğü ilk üç biyosensördeki zeolitler alınarak, zeolit konsantrasyonunun enzimatik aktiviteye etkisi çalışılmış ve sonuçlar Şekil 44'de gösterilmiştir.



Şekil 44: Zeolit konsantrasyonunun biyosensör aktivitesine etkisi (a) NH₄ iyonu içeren zeolit Beta-30, (b) H⁺ iyonu içeren zeolit Beta-30 ve (c) iyon değişimi yapılmamış zeolit Beta-50.

Şekil 44'de görüldüğü üzere en yüksek enzimatik aktivite, NH₄-Beta-30 partiküllerinin % 15 oranında kullanılmasıyla gözlenmiştir. Diğer iki zeolit örneğini içeren biyosensörlerde ise en yüksek enzimatik aktivite % 7,5 oranında kullanıldıkları takdirde gözlenmiştir.

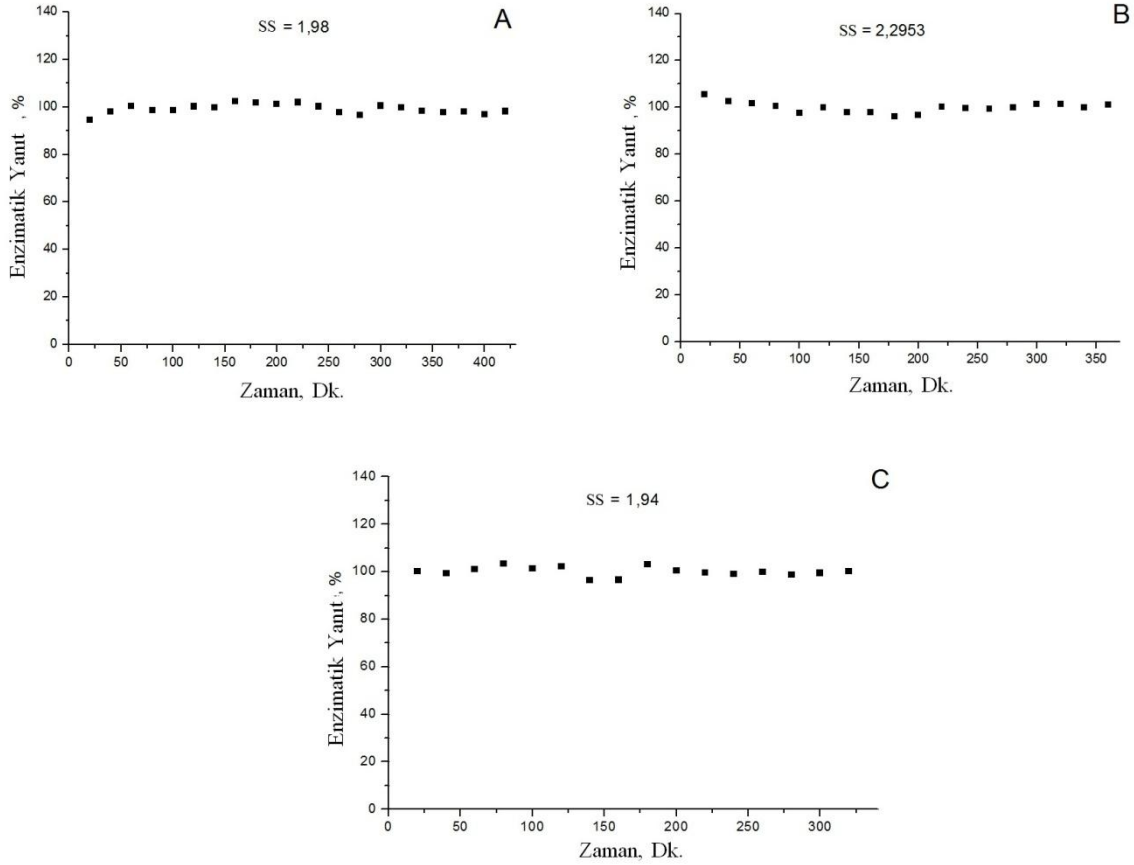
Tekrarlanabilirlik, biyosensörler için en sık karşılaşılan problemlerden birisidir. Bu nedenle NH_4 -Beta-30, H-Beta-30 ve H-Beta-50 örnekleri seçilerek tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmış ve sonuçları aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 45: NH_4 -Beta-30, H-Beta-30 ve H-Beta-50 partikülleri içeren ve hiç zeolit içermeyen üreaz biyosensörlerindeki enzimatik aktivitenin tekrarlanabilirliğinin karşılaştırılması.

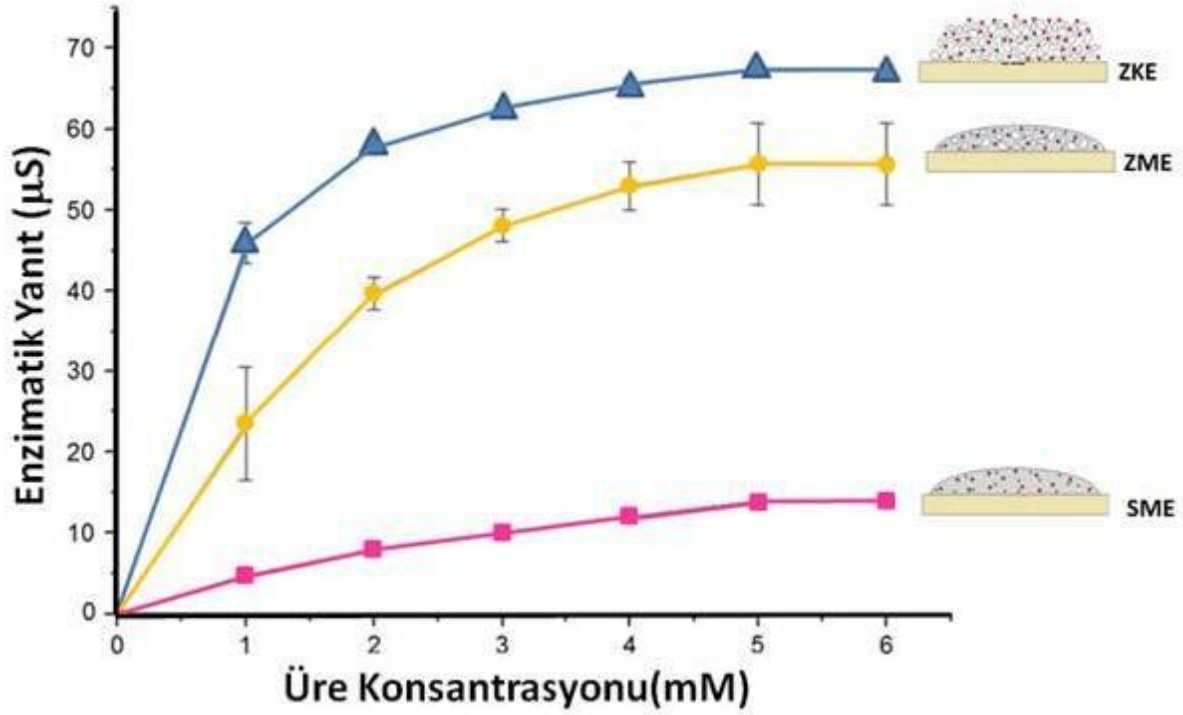
Şekil 45'de görüldüğü üzere NH_4 -Beta-30 biyosensörlerinde üreaz enziminin aktivitesindeki tekrarlanabilirliğin diğer biyosensörlerdekine oranla oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Hiç zeolit kullanılmayan biyosensörlerdeki tekrarlanabilirliğe oranla ise %30 oranında gelişme sağlanmıştır.

Kondüktometrik tip biyosensör çalışmalarının tekrarlanabilirlik deneylerinin ikinci kısmında ise NH_4 -Beta-30, H-Beta-30 örneklerinin kullanıldığı biyosensörlerdeki enzimatik aktivitenin bir gün boyunca tekrarlanabilirliği çalışılmıştır. Şekil 46'da da görüldüğü üzere, zeolitlerin enzimatik aktivitelerinin, tekrarlanabilirlik konusunda kondüktometrik olarak ölçülebilen herhangi bir negatif değişime sebep olmadığı kanıtlanmıştır.



Şekil 46: Farklı tip zeolit içeren biyosensörlerdeki enzimatik aktivitenin tekrarlanabilirliği (1 gün boyunca), (A) Hiç zeolit içermeyen, (B) NH₄-Beta-30, (C) H-Beta-30 içeren biyosensörler.

Proje dönemindeki kondüktometrik çalışmaların son kısmında ise Bölüm 3.3'de bahsi geçen üç farklı membran yöntemi kullanılarak (Şekil 8), silikalit partikülleri üzerine üreaz enzimi immobilize edilmiş ve çıkan sonuçlar Şekil 47'de gösterilmiştir. Bu çalışmalarımız da ayrı olarak yayınlanmıştır (KİRDECİLER, 2011). Bu çalışmaların önemi, projemiz kapsamında ilk defa olarak Gluteraldehit (GA) içermeyecek bir şekilde direk olarak zeolit filmlerinin biyosensörlerin elektrotlarının üzerinde oluşturulduğu, entegre bir yüzey fabrike edilmiş ve bu yüzeylerden kondüktometrik veri alınmış olmasıdır. Böylece kondüktometrik verilerde görülen farklılıklar, direk olarak zeolitlerin farklı parametreleriyle ilişkilendirilebilmiştir.

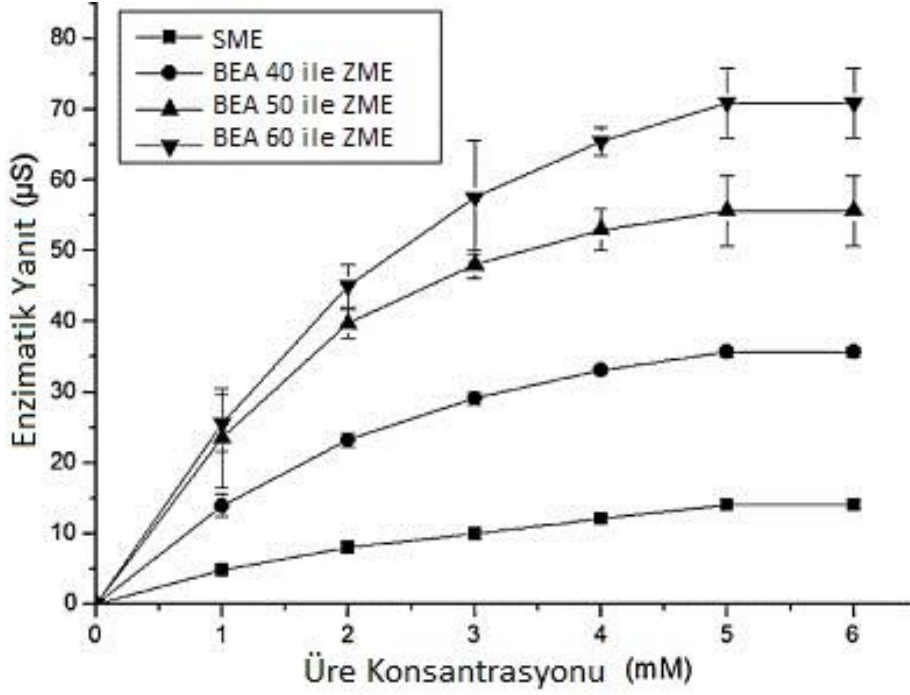


Şekil 47: Farklı yöntemlerle hazırlanan elektrot yüzeylerindeki üreazların enzimatik aktivitelerinin karşılaştırılması (KİRDECİLER, 2011).

Şekil 47’de görüldüğü üzere elektrot yüzeyi üzerine ince film yapılmış zeolitlerin (Beta-50) kullanıldığı biyosensörlerde (ZKE), üreaz aktivitesi en yüksek iken, standart membranla hazırlanmış ve hiç zeolit içermeyen elektrotların kullanıldığı biyosensörlerdeki aktivite en düşüktür (SME). Zeolit ince filmlerinin üzerine hiç bir kimyasal kullanılmadan immobilize edilmiş üreazların aktiviteleri ise (ZME) standart membranla hazırlanmış biyosensörlerdekinden daha fazla ancak GA kimyasalı kullanılmış ve zeolit ince filmle hazırlanmış biyosensörlerdekinden daha azdır. Sonuç olarak, zeolitlerin elektrot yüzeyi üzerinde kontrollü bir şekilde film haline getirilmesi enzimatik aktiviteyi yaklaşık %70 ile 160 arasında arttırmaktadır.

4.5.2.4 Si/Al Oranının Enzimatik Yanıtlara Etkisi

Zeolit Beta içerisinde bulunan Si/Al oranları sentez esnasında değiştirilerek, sadece bu etkinin biyosensör verilerine etkisinin gözlenmesi, zeolitinin diğer özellikleri değiştirilmeden mümkündür. Bu amaçla, farklı Si/Al oranlarında sentezlenmiş (Si/Al oranı 40, 50 ve 60 olan) zeolitler kondüktometrik biyosensör düzeneğinde üreaz adsorpsiyonu ile denenmiş ve alınan sonuçlar Şekil 48’de gösterilmiştir.

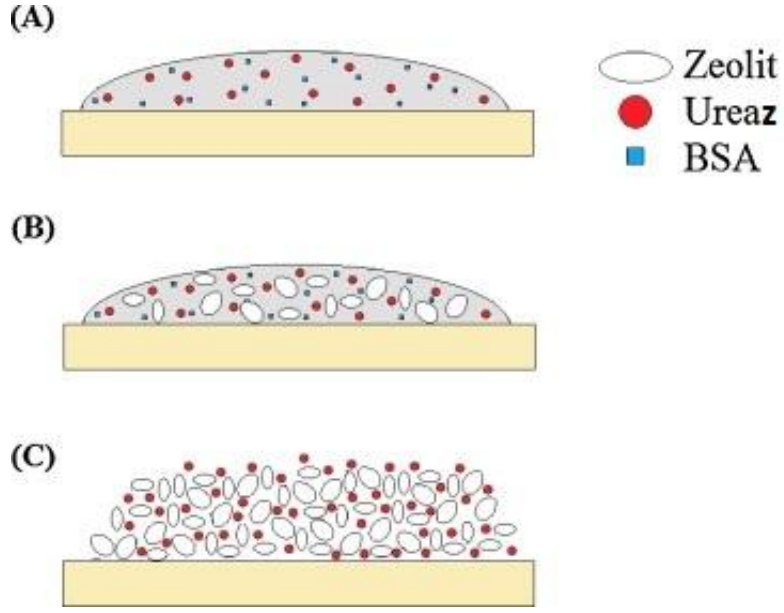


Şekil 48: Farklı Si/Al oranlarında sentezlenmiş zeolitlerle hazırlanmış Zeolit Membran Elektrodların (ZME'lerin) Standard Membran Elektrod ile karşılaştırması (KİRDECİLER, 2011).

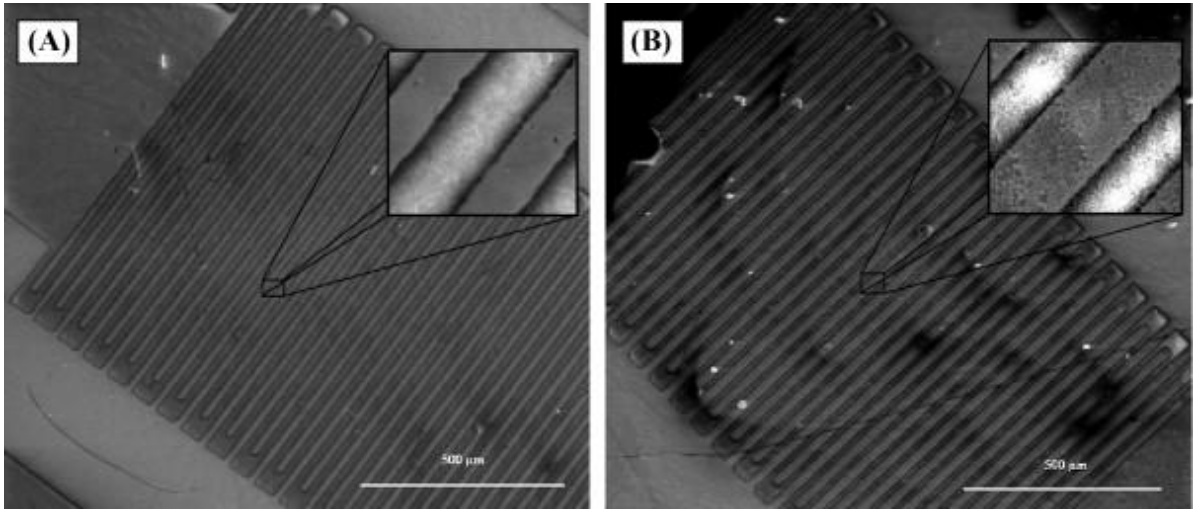
Şekil 48'de görüldüğü üzere zeolit Beta içerisindeki Si/Al oranı arttıkça elektrotdan alınan enzimatik yanıtın seviyesi artmaktadır. Daha önce literatürde yapılan çalışmalarda Si/Al oranının etkisi gözlenmeye çalışılırken, farklı tipte zeolitler kullanılmıştır. Bu durum sonucunda, biyosensör verilerine etki eden faktörlere sadece Si/Al oranı değil, parçacık boyutu, yüzey alanı ve morfolojisi gibi faktörlerde devreye girmektedir. Projemiz kapsamında ilk defa olarak sadece Si/Al oranının bu verilere etkisi çalışılmıştır. Bunun sonucunda da Si/Al oranı daha yüksek olan ve dolayısıyla da daha hidrofobik olan zeolit Beta-60'ın daha hidrofilik olan Beta-50 ve Beta-40'tan daha yüksek aktiviteye sebep olduğu anlaşılmıştır (KİRDECİLER, 2011).

4.5.2.5 Farklı Modifikasyon Şekillerinin Enzimatik Yanıtlara Etkisi

Biyosensör elektrodları zeolitlerle modifiye edilirken çeşitli sistemler kullanılmaktadır. Standart membran elektrodalarda (SME) elektrodlar üzerinde oluşturulan ince filmler Gluteraldehit (GA) buharına maruz bırakılarak stabilitesi artırılmaktadır. Ancak GA enzimler için zehirli bir kimyasal olması sebebiyle, enzimatik aktiviteyi bir miktar düşürmektedir. Yapılan çalışmada zeolitler standart membran elektrodlar içerisine % 5 oranında karıştırılarak zeolit membran elektrodlar (ZME) hazırlanmıştır. Ayrıca zeolitlerin direk olarak yüzeye damlatılması şeklinde hazırlanan zeolit filmlerinin üzerine gerekli enzimlerin yerleştirilmesi ile Zeolit Kaplı Elektrodlar (ZKE) hazırlanmıştır. Hazırlanan elektrot tipleri Şekil 49'da şematik olarak tekrar gösterilmiştir. Zeolit kaplı elektrodların (ZKE) SEM görüntüleri Şekil 50'de gösterilmiştir.

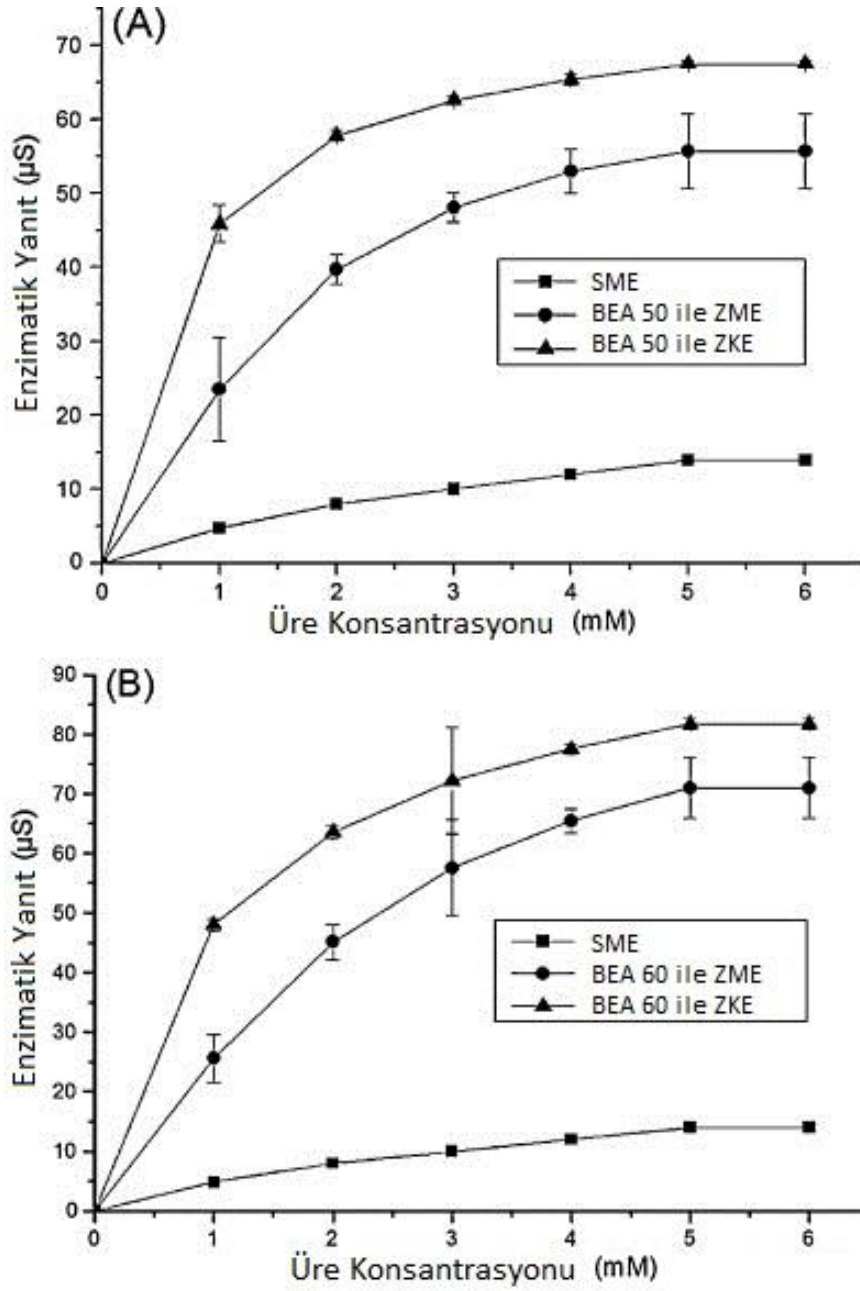


Şekil 49: Standard Membran Elektrot-SME (A), Zeolit Membran Elektrot-ZME (B) ve Zeolit Kaplı Elektrot'ların-ZKE (C) şematik gösterimi.



Şekil 50: Silikalit ve zeolit Beta-60 ile hazırlanmış Zeolit Kaplı Elektrod'ların taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.

ZKE'lerin diğer membranlı elektrotlardan en büyük farkı üzerinde GA tabakasının bulunmamasıdır. Bahsedilen şekilde hazırlanan üç elektrot tipi kondüktometrik biyosensör ile test edilmiş ve alınan sonuçlar Şekil 51'de verilmiştir.

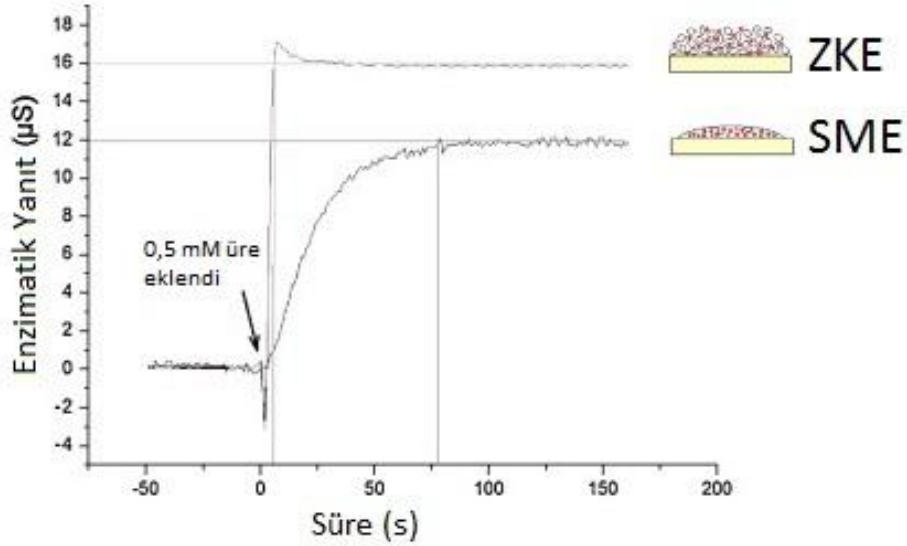


Şekil 51: Farklı zeolit modifikasyonlarının Standard Membran Elektrodları (SME) ile karşılaştırılması.

Zeolit Kaplı Elektrodlar (ZKE) her iki zeolit tipinde de SME ve ZME'lerden daha yüksek enzimatik yanıt vermiştir. Alınan enzimatik yanıtların karşılıklı standard sapmalarına bakıldığında, SME için % 5, ZME için % 6.7 ve ZKE için % 3.6 olduğu görülmüştür. SME ve ZME için tekrarlanabilirlik, aynı ince filmi her seferde oluşturmanın zor olmasından dolayı daha düşük tekrarlanabilirlikle sonuçlanmıştır. Bunun tersine ZKE'lerde oluşturulan zeolit filmi her denemede aynı miktarda süspansiyon kullanılarak hazırlandığı için tekrarlanabilirliği çok daha fazladır. Ayrıca ZKE'lerde enzim için zehirli sayılabilecek bir kimyasal olan GA kullanılmadığı için daha yüksek enzimatik yanıt alınmış olabilir.

4.5.2.6 Zeolit Modifikasyonunun Enzimatik Yanıt Verme Süresine Etkisi

Biyosensörler için en az enzimatik yanıtın miktarı kadar önemli olan diğer bir parametre de enzimatik yanıtın süresidir. Standard Membran Elektrotlarda (SME), difüzyon bariyeri olarak görev yapan Gluteraldehid (GA) tabakası, ürenin üreaz'a ulaşmasını ve tepkimeyi geciktirdiğinden tepki süresinin uzamasına sebep olmaktadır. Yapılan çalışmada, Zeolit Kaplı Elektrotlar (ZKE) , Standart Membran Elektrotlar (SME) ile karşılaştırılmış ve alınan sonuçlar Şekil 52'de gösterilmiştir.



Şekil 52: Zeolit Kaplı Elektrotların (ZKE) Enzimatik Yanıt Süresinin Standard Membran Elektrotlarla (SME) karşılaştırılması (KİRDECİLER, 2011).

Biyosensör elektrodunun zeolit ile kaplanması ile oluşturulan ZKE'lerin kullanılmasıyla yapılan ve ortama 0.5 mM üre eklenmesiyle oluşan enzimatik yanıt gözlenmiş ve SME verileri ile karşılaştırılmıştır. Şekil 52'de görüldüğü üzere ZKE ile alınan yanıt 27.5 µS iken SME'den alınan yanıt 16.8 µS olmuştur. Daha da önemlisi SME'ler yaklaşık 80 saniyede stabil bir yanıtla ulaşırken, ZKE'de bu değer 8 saniyeye kadar düşmüştür (KİRDECİLER, 2011).

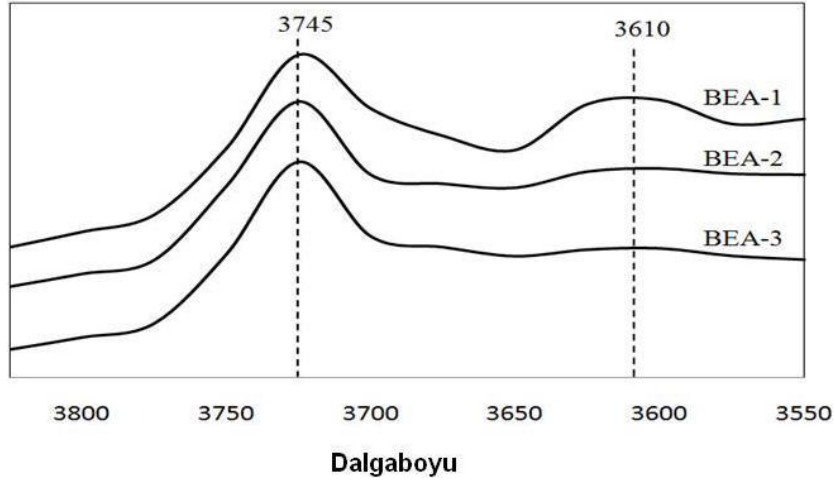
Bütün bu sonuçlar, zeolitlerin gerçek bir biyosensör uygulamasındaki kullanımlarının çok daha verimli sonuçlara sebep olacağını göstermektedir. Bu tip bir uygulama ilk defa olarak bu proje çerçevesinde yapılmış ve yüzey gruplarının kontrol edildiği farklı zeolit ince filmlerinin potansiyel kullanım alanlarını artırarak gerçek anlamdaki bir uygulamadaki önemi bu kadar net olarak ilk defa vurgulanmıştır.

4.5.3 ISFET Tip Biyosensör Verileri

Daha önceki bölümlerde de anlatıldığı üzere, projenin bu döneminde kullanılan ISFET tip biyosensörlerin çalışma prensibi, çalışma ve referans elektrotları arasındaki potansiyel farkının ölçülmesine dayanır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlar. Bu tip biyosensörlerde kullanılan temel sensörler pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyon yada katyonlara duyarlı iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz duyarlı elektrotlardır. Bu çalışmada kullanılan sensörler pH'a duyarlı ISFET sensörleridir. Projemiz boyunca model enzim olarak seçilen üreaz ve bütirikolinesteraz enzimleri, farklı yöntemler kullanılarak kalsine edilmiş zeolit Beta parçacıklarına immobilize edilerek, ortamda meydana gelen pH değişimi ölçülmüş

ve elde edilen sonuçlar zeolitsiz biyosensör verileriyle karşılaştırılmıştır. Kalsine edilen zeolit Beta parçacıklarının yüzey gruplarının sayısı ve şeklinde yapılan değişikliklerin, protein-zeolit ilişkisini büyük oranda etkilediği ilk defa olarak bulunmuştur. Bu çalışmalarımız da ayrı olarak yayınlanmıştır (SOY, 2012).

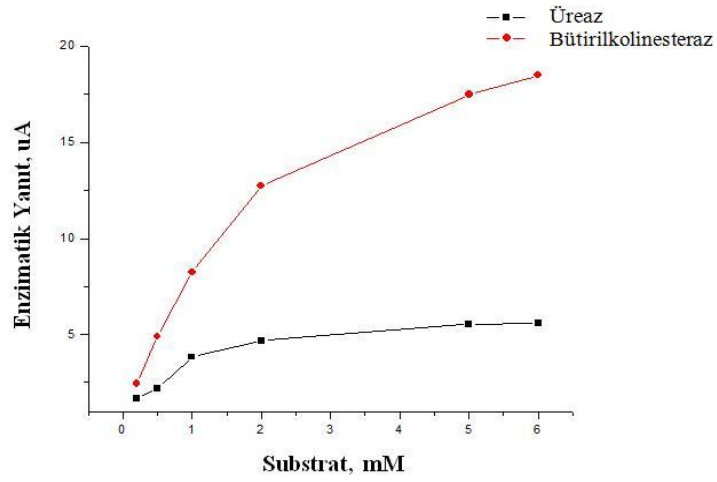
Bahsi geçen grupların karakterizasyonu FTIR yöntemi kullanılarak yapılmış ve kontrollü olarak asidik –OH grupları oluşturulmak amacıyla (Şekil 2) farklı sıcaklıklarda kalsine edilmiş (Bölüm 3.2.3) zeolit Beta'ların artan Brønsted asit bölgelerine göre sıralaması şu şekilde bulunmuştur: BEA-1>BEA-2>BEA-3 (Şekil 53).



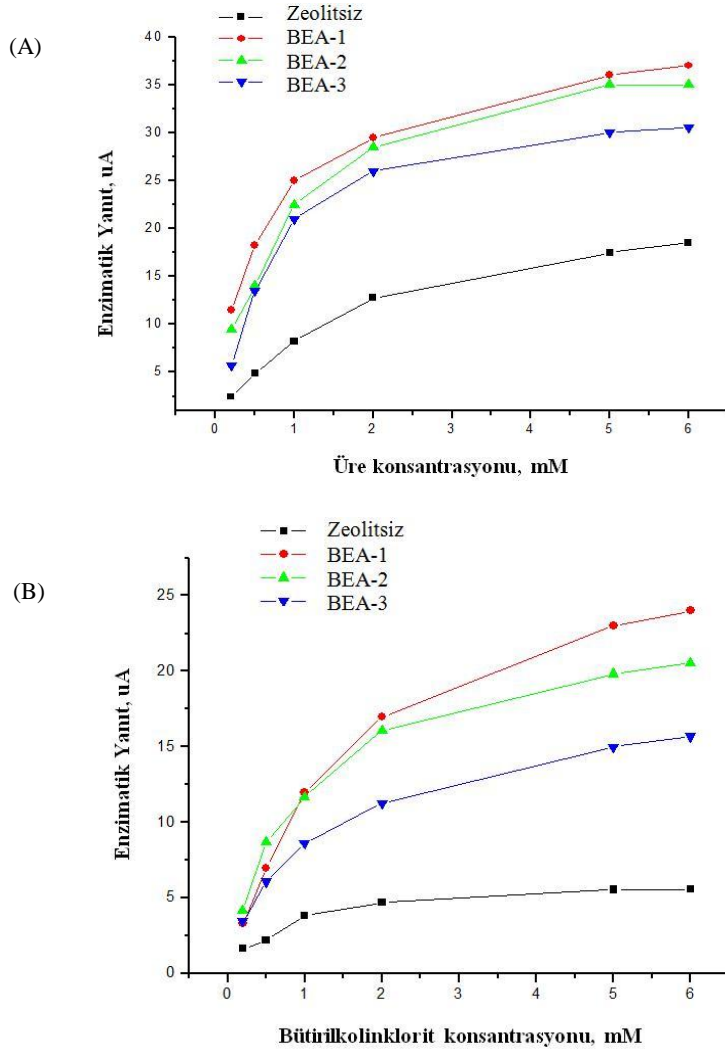
Şekil 53: Farklı yöntemlerle kalsine edilmiş Na-Beta-50 örneklerinin FTIR grafiği.

Proje boyunca alınan sonuçlara göre, hem üreaz hem de bütirikolinesterazın aktivitesi, zeolit Beta yüzeyindeki silanol grupları ve daha belirgin olarak Brønsted asit bölgeleri ile doğru orantılı olarak artmıştır. BEA-1 örneği, FTIR sonuçlarına göre en yüksek oranda Brønsted asit bölgesi içermekte ve ISFET sonuçlarına göre de en yüksek enzimatik aktivite yine BEA-1 örnekleri ile elde edilmektedir. Sayıca artmış yüzey grupları, enzimlerin bağlanması için daha geniş bağlantı bölgeleri oluşturmakta ve enzimatik aktivitenin artmasına çok büyük bir oranda katkı sağlamaktadırlar. Hem üreaz, hem de bütirikolinesteraz aktivitesi için kalsine edilmiş örneklerle hazırlanan elektrotlardan alınan sonuçların sıralanışı da şu şekildedir: BEA-1 > BEA-2 > BEA-3. Bu sonuçlara göre, Al-OH-Si yüzey gruplarıyla (Brønsted) ISFET verileri arasındaki korrelasyon ilk defa olarak bu kadar net bir şekilde gösterilmiştir (SOY, 2012).

Şekil 54'de hiç zeolit içermeyen standart membranlar ile hazırlanmış elektrotlardan alınan üreaz ve bütirikolinesteraz enzimlerine ait standart veriler gösterilmektedir. Ayrıca bu verilerin, bahsi geçen kalsine edilmiş zeolit Beta parçacıklarını içeren standart membran ile hazırlanmış elektrot verileriyle karşılaştırılması Şekil 55'de gösterilmektedir.



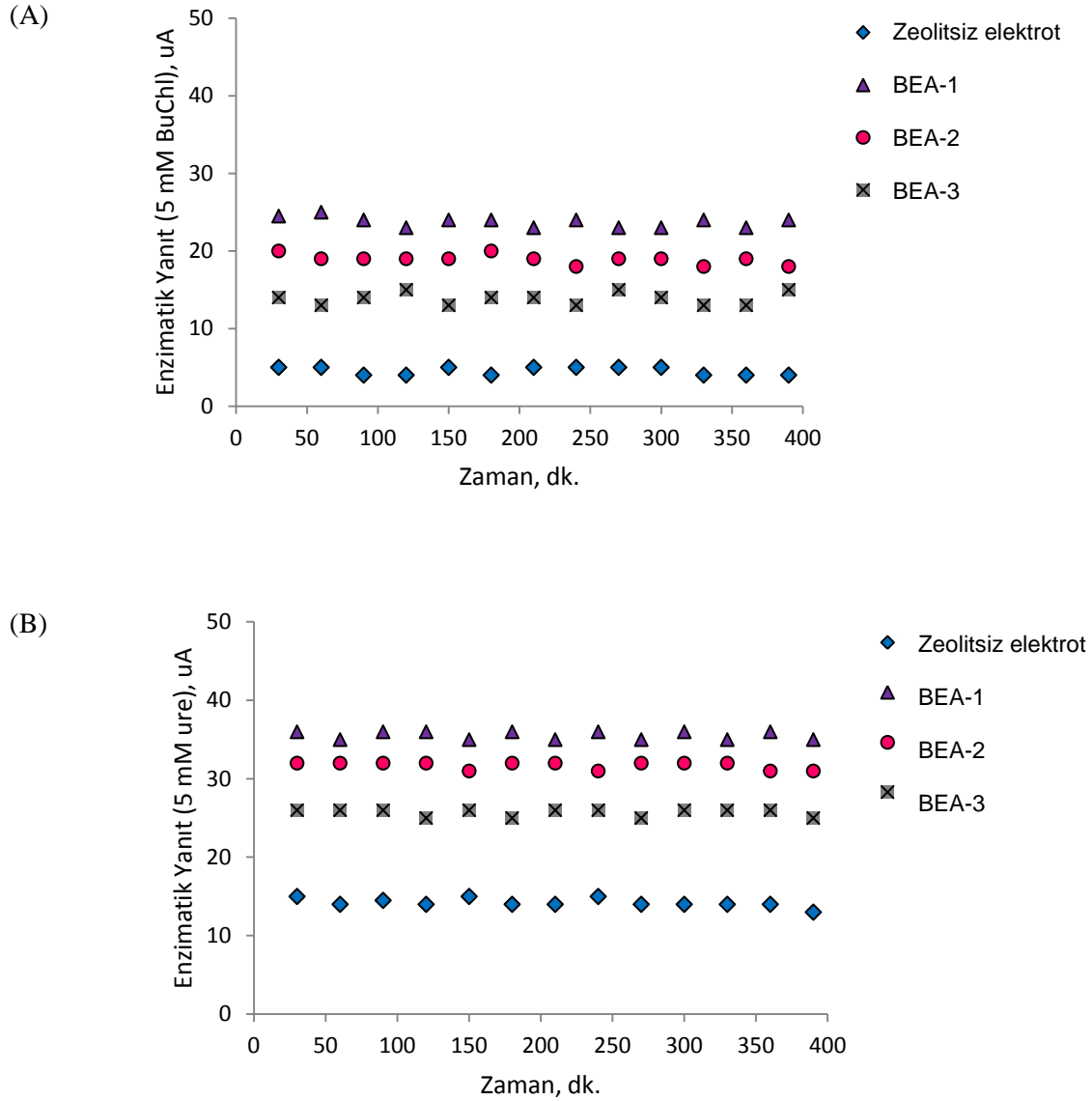
Şekil 54: Hiç zeolit içermeyen, standart membran hazırlama yöntemi ile hazırlanmış üreaz ve bütirikolinesteraz enzimlerine ait standart ISFET verileri.



Şekil 55: Kalsine edilmiş zeolit Beta parçacıkları içeren standart membran yöntemi ile hazırlanmış üreaz (A) ve bütirikolinesteraz (B) enzimlerine ait ISFET verileri.

Şekil 55'te görüldüğü üzere ISFET tip elektrot yüzeyleri üzerine, sıcaklıkla modifiye edilmiş zeolit Beta parçacıkları içeren standart membranların hazırlandığı biyosensörlerde, hem üreaz hem de bütirilkolinesteraz aktivitesi en yüksek iken, standart membranla hazırlanmış hiç zeolit içermeyen elektrotların kullanıldığı biyosensörlerde ölçülen aktivite oldukça düşüktür. Bu verilere ek olarak, farklı sıcaklık derecelerinde modifiye edilmiş zeolitlerin kullanıldığı biyosensörlerden farklı sonuçlar alınmıştır. Alınan bu sonuçlara göre, hem üreaz hem de bütirilkolinesterazın aktivitesi, zeolit Beta yüzeyindeki silanol grupları ve daha belirgin olarak Brønsted asit bölgeleri ile doğru orantılı olarak artmaktadır. BEA-1 örneği, FTIR sonuçlarına göre en yüksek oranda Brønsted asit bölgesi içermekte ve ISFET sonuçlarına göre de en yüksek enzim aktivite yine BEA-1 örnekleri ile elde edilmektedir. Sayıca artmış yüzey grupları, enzimlerin bağlanması için daha geniş bağlantı bölgeleri oluşturmakta ve enzim aktivitesinin artmasına çok büyük bir oranda katkı sağlamaktadır (LEE, 2005; TAVOLARO, 2007). Hem üreaz hem bütirilkolinesteraz aktivitesi için kalsine edilmiş örneklerle hazırlanan elektrotlardan alınan sonuçların sıralanışı şu şekildedir: BEA-1 > BEA-2 > BEA-3. Bu sonuçlara göre, Al-OH-Si yüzey gruplarıyla (Brønsted) korelasyon içerisindedir. Sıcaklık uygulanarak yüzey grupları modifiye edilmiş zeolit Beta BEA-1 örneklerinin kullanıldığı biyosensörlerde, literatürde ilk defa, üreaz enziminin aktivitesi 2 katı, bütirilkolinesteraz enziminin aktivitesi ise 3 katı oranında arttırılmış ve zeolitlerin, biyosensör performansını belirgin bir oranda etkilediği kanıtlanmıştır. En önemli bulgu ise, hem farklı zeolitlerin kullanımıyla hem de tek bir tip zeolite uygulanan farklı modifikasyon teknikleriyle elde edilebilen ve hatta zeolit yüzey gruplarıyla korelasyon gösteren biyosensör verilerinin elde edilmiş olmasıdır. Bu bulgular da teklif edilmiş olan projenin en önemli sonuçlarından.

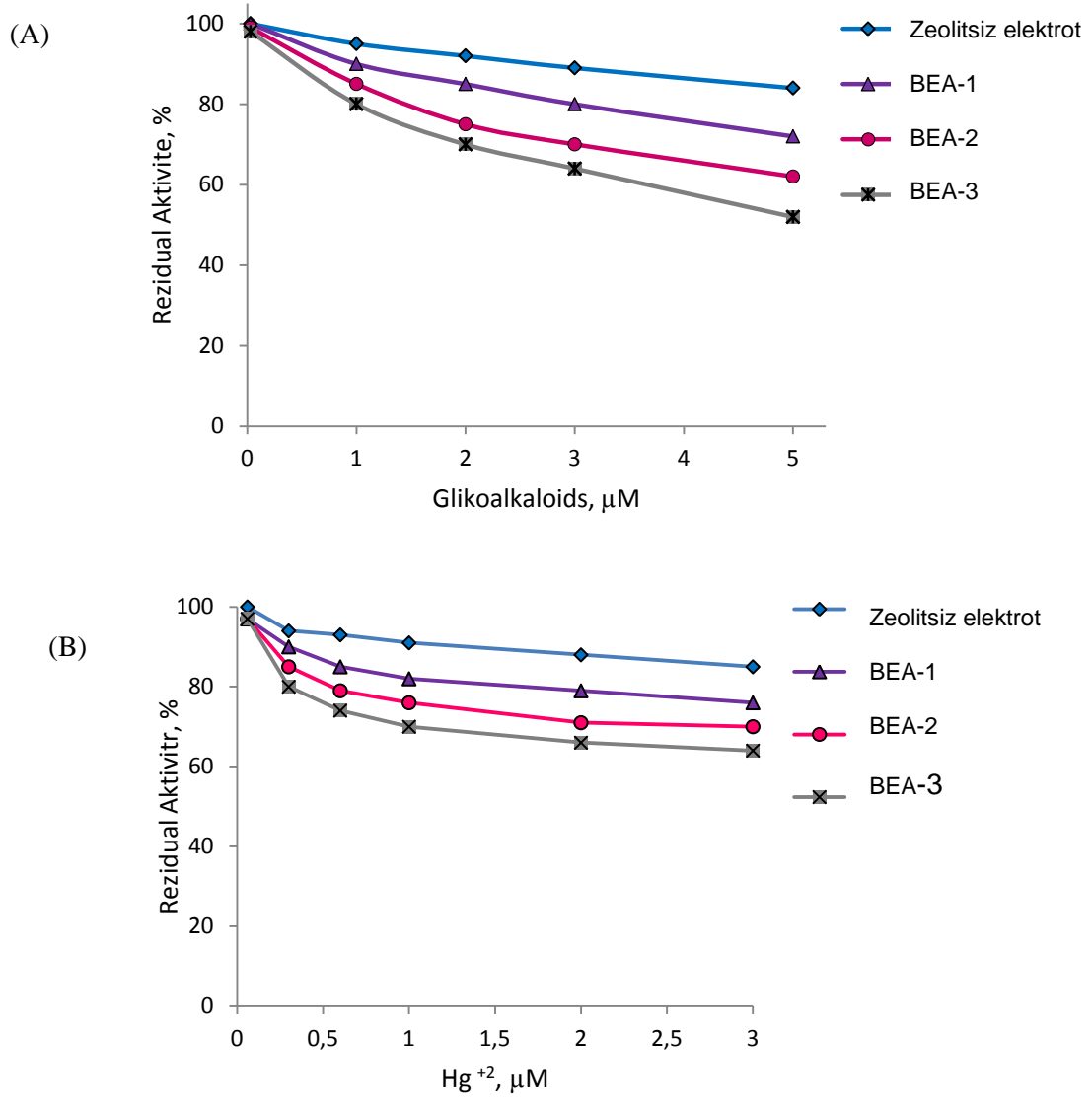
Yukarıda bahsi geçen zeolit Beta parçacıklarının kullanıldığı, üreaz ve bütirilkolinesteraz içeren ISFET tip biyosensörlerin stabilite ve biyosensör ömrü gibi analitik özellikleri ise bu çalışmaların devamı niteliğini taşımaktadır. Böylelikle Brønsted asit gruplarının enzim aktivitesine ek olarak biyosensör performansı üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi amaçlanmaktadır. Biyosensörlerin ömrü, çalışma stabiliteleri ve ortamdaki inhibitör maddelere verdikleri yanıt biyosensör performansını belirleyen en önemli etkenler arasındadır. Bu sebeple sıcaklıkla modifiye edilmiş zeolit Beta örnekleriyle hazırlanmış elektrotlar, hiç zeolit içermeyen standart elektrotlardan alınan sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Alınan sonuçlar Şekil 56 ve Şekil 57'de gösterilmektedir.



Şekil 56: Bütirikolinesteraze (A) ve üreaz (B) içeren ISFET tip biyosensörlerin çalışma stabiliteleeri.

Şekil 56'da gösterildiği üzere, her iki proteine ait biyosensörler oldukça yüksek çalışma stabilitesi göstermiş, 400. dakikanın sonunda bile aynı performansla çalışmaya devam etmişlerdir. Ayrıca ölçümü alınan sensörler, tampon çözelti içerisinde saklanarak biyosensör ömrü çalışmaları için gün aşırı ölçümleri alınmış ve bütün biyosensörlerin 1 haftadan daha fazla süre boyunca aynı performansla çalıştıkları bulunmuştur.

Çalışma stabiliteleeri ve biyosensör ömrü çalışmalarına ek olarak, biyosensörlerin ortamdaki inhibitör moleküllere verdikleri yanıt da araştırılmıştır. Bu sebeple bütirikolinesterazın inhibitörü glikoalkoloid ve üreazın inhibitörü olarak da metal iyonları (Hg) kullanılmıştır. Biyosensörlerin artan inhibitör madde konsantrasyonlarına verdikleri yanıt Şekil 57'de gösterilmektedir.



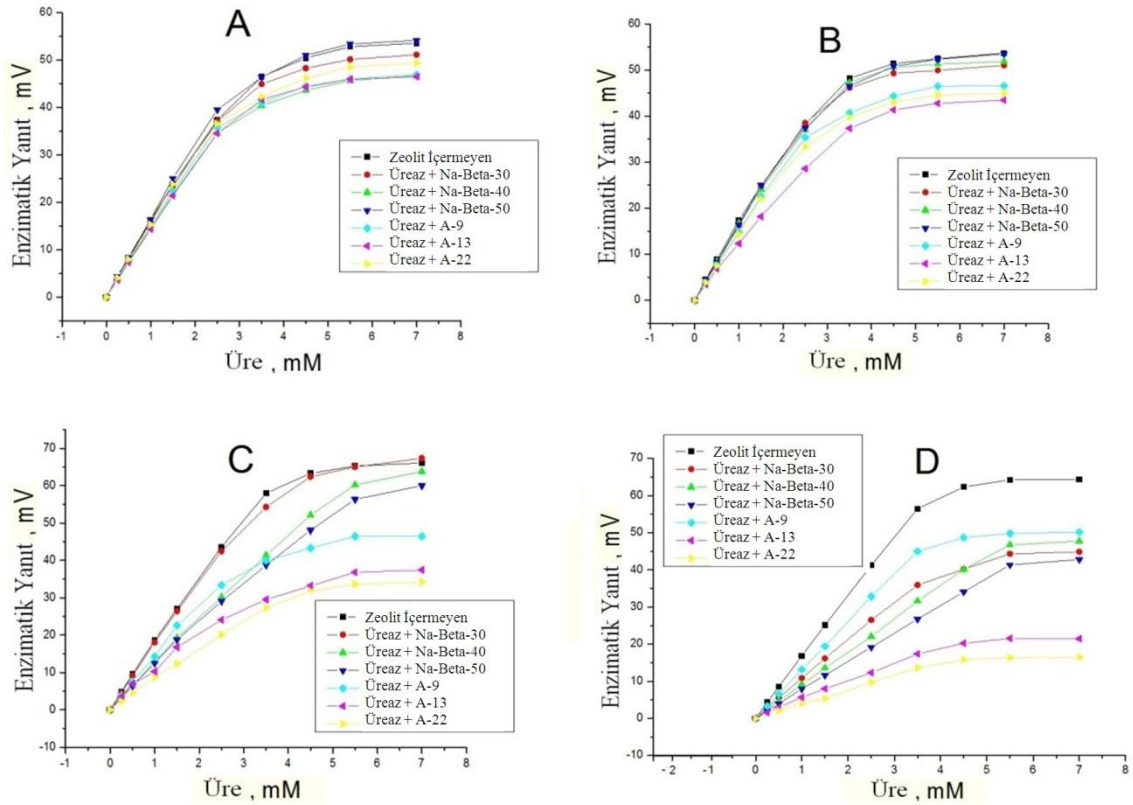
Şekil 57: Bütirikolinesteraze (A) ve üreaz (B) içeren ISFET tip biyosensörlerin artan inhibitör konsantrasyonuna karşı ölçülen rezidual aktiviteleri.

Şekil 57’de görüldüğü üzere, zeolit Beta parçacıklarıyla modifiye edilmiş bütirikolin biyosensörlerinin ortamdaki inhibitör maddelere, standart biyosensörlerden daha duyarlı oldukları gözlenmiştir. Ortamdaki inhibitör maddelere karşı artan hassasiyet sıralaması şu şekildedir: BEA-3 > BEA-2 > BEA-1 > Zeolitsiz biyosensör. Üreaz biyosensörlerinde de sıralama aynı şekilde bulunmuştur. Elde edilen bu veriler, zeolit Beta ile modifiye edilmiş biyosensörlerin inhibisyon analizlerinde de rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca biyosensörlerin ortamdaki inhibitör maddelere karşı hassasiyetinin de zeolit üzerindeki Brønsted asit bölgeleriyle doğru orantılı olarak değiştiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak, enzimler ve zeolitlerin Brønsted asit bölgeleri arasındaki ilişkinin biyosensör performansını çok büyük ölçüde etkilediği ve bu etkileşimin kontrollü olarak değiştirilebildiği tarafımızca kanıtlanmıştır. Proje boyunca alınan verilere göre, zeolitlerin Brønsted asit bölgelerinin biyosensör hassasiyeti, ömrü ve stabilitesi gibi analitik özelliklerini ve performansını belirgin bir şekilde etkilediği ortaya çıkmıştır. Bu durum, zeolit parçacıklarının ileri biyosensör uygulamalarında kullanılabilecek güçlü malzemeler olduklarını gözler önüne

sermiştir. Zeolit malzemeler üzerinde yapılan basit modifikasyon teknikleriyle istenilen uygulamaya göre kontrollü değişiklikler yaratmak mümkündür. İleri düzeydeki biyosensör çalışmalarına ışık tutacak nitelikte olan bu veriler ilk defa bizim çalışma grubumuz tarafından literatüre katılmıştır.

ISFET çalışmalarının en son aşamasında, farklı Si/Al oranına sahip zeolit Beta ve farklı parçacık boyutuna sahip zeolit A örnekleri kullanılarak, bu özelliklerin biyosensör performansını hangi yönde etkilediği araştırılmıştır. Bu sebeple sistemin optimizasyonunun yapılabilmesi amacıyla zeolit konsantrasyonunun enzimatik aktiviteye etkisi araştırılmış ve Na-Beta-30 örnekleri %0.015, 0.15, 1.5, ve 8.2 oranlarında standart membranlara karıştırılarak enzimatik aktiviteleri ölçülmüş ve sonuçları Şekil 58'de gösterilmiştir.

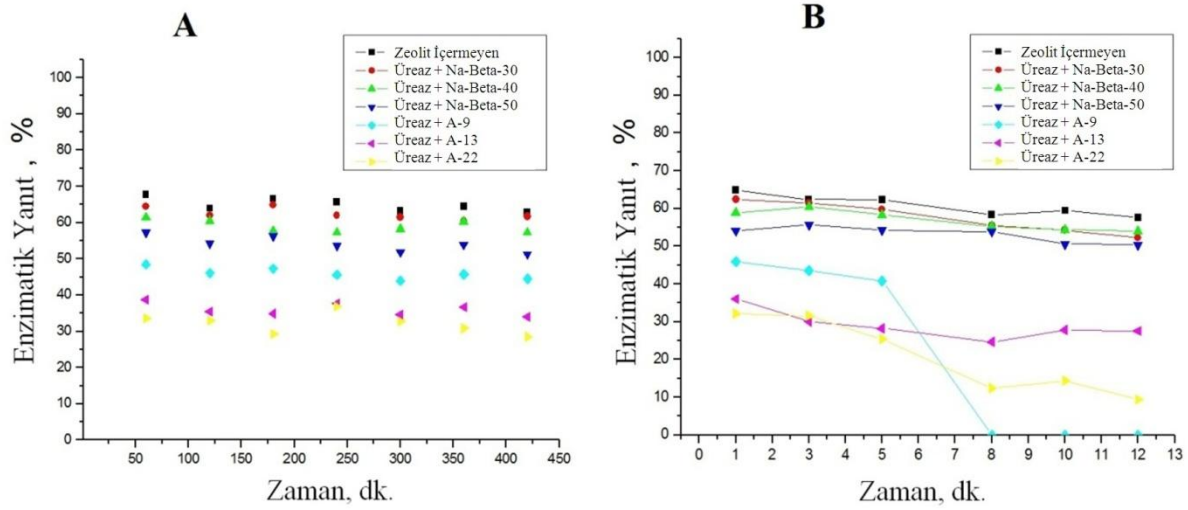


Şekil 58: Zeolit konsantrasyonunun biyosensör aktivitesine etkisi 0.015 % (A), 0.15% (B), 1.5% (C) and 8.2 % (D).

Şekil 58'de görüldüğü üzere düşük zeolit konsantrasyonlarında (%0.015 ve 0.15) enzimatik aktivitede büyük bir değişime rastlanmazken, ortamdaki zeolit konsantrasyonu arttırıldığında enzimin aktivitesinde belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Bu durum özellikle zeolit A örneklerinin kullanıldığı biyosensörlerde oldukça belirgindir. Zeolit A örnekleri kullanıldığı zaman gözlenen üreaz aktivitesinin, zeolit Beta örnekleri kullanıldığında gözlenen üreaz aktivitesinden düşük olmasının sebebinin zeolit A partiküllerinin daha hidrofilik olmasıyla (Si/Al oranı zeolit A için yaklaşık 1 iken zeolit Beta için 30-50 arasındadır) ve çok büyük parçacık boyutuna sahip olmalarıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Zeolit A örneklerinin kullanıldığı biyosensörlerde parçacık boyutu 9'dan 22'ye arttıkça, üreaz aktivitesinin de düzenli bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Çok büyük parçacık boyutuna sahip zeolit örneklerinin membran içerisinde, substratın içeri girmesini engelleyici bir bariyer gibi davranarak enzimatik aktiviteyi negatif yönde etkilemiş olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca parçacık boyutunun artması yüzey

alanını da aynı oranda azaltacağından enzimlerin bağlanabileceği bölgeler nispeten azalmakta ve enzimatik aktiviteyi de aynı oranda etkilemektedir. Ayrıca alınan sonuçlar, kullanılan standart membran yönteminde, Na-Beta örneklerinde Si/Al oranının üreaz aktivitesi üzerinde büyük bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

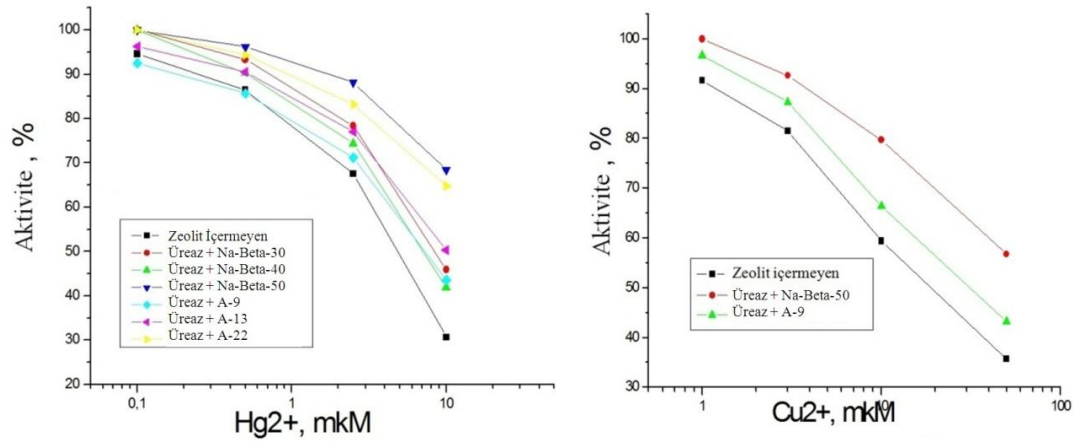
Enzimatik aktiviteye ek olarak stabilize çalışmaları da biyosensör performansını etkileyen en önemli parametrelerden birisidir. Bu nedenle, zeolit A ve zeolit Beta partikülleri içeren biyosensörlerde stabilize çalışmaları yapılmış ve sonuçları aşağıda gösterilmiştir.



Sekil 59: Biyosensörlerin stabilitesi bir gün boyunca alınan veriler (A), biyosensör +4°C de kuru olarak tutulduktan sonra alınan veriler (B).

Şekil 59-A'da görüldüğü üzere, bütün biyosensörlerin 1 gün boyunca stabilitesi hiç değişmemiş, 1. günün başında okunan aktivite ile günün sonunda okunan aktivite arasında bir fark gözlenmemiştir. Daha sonra +4°C de kuru olarak saklanan ve farklı tip zeolit içeren biyosensörlerden 12 gün boyunca gün aşırı veriler alınmış ve çıkan sonuçlar hiç zeolit içermeyen biyosensörler ile karşılaştırılmıştır. Na-Beta içeren biyosensörler 12. günün sonunda aktivitelerinin %90'ını hala korurken, 9 µm'lik zeolit A içeren biyosensörlerde aktivite % 20, 4 µm ve 22 µm'lik zeolit A içerenlerde ise yaklaşık %100 oranında azalmıştır. Sonuç olarak zeolit Beta içeren üreaz biyosensörlerinde stabilize zeolite A içerenlerden gözle görülür oranda fazladır.

ISFET çalışmalarının son kısmında ise, üreaz biyosensörlerinin ortamdaki ağır metal iyonlarına karşı hassasiyeti, inhibe edici maddeler kullanılarak çalışılmıştır. Zeolit içeren ve içermeyen biyosensörlerin bakır ve civa iyonlarına karşı hassasiyetini gösteren sonuçlar Şekil 60'da gösterilmiştir.

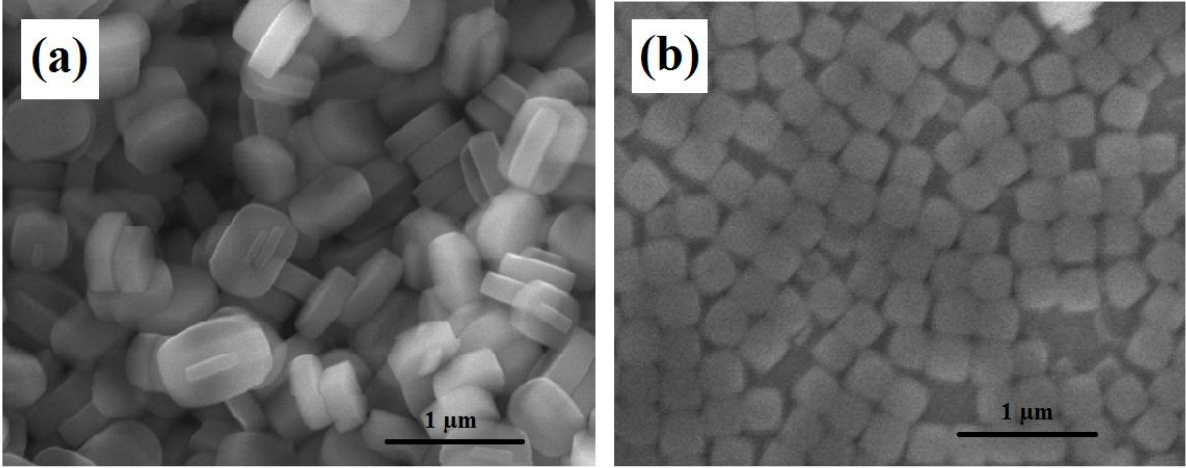


Şekil 60: Ortamdaki Civa ve Bakır iyonlarının tespiti için farklı tip zeolit içeren biyosensörlerdeki enzimatik aktivitenin zeolit içermeyen biyosensörlerdeki enzimatik aktivite ile karşılaştırılması.

Şekil 60'da görüldüğü üzere, biyosensörlerde zeolit kullanılması, ortamdaki inhibe edici maddelerin etkisini yaklaşık % 20 ile % 50 oranında azaltmakta ve farklı tip zeolitler farklı oranda etki göstermektedirler. Na-Beta-40 ve Na-Beta-50 ile hazırlanan biyosensörlerde civa iyonunun inhibe edici etkisinin en az olması sebebiyle, aynı sensörlerin bakır iyonuna etkisine de bakılmıştır. Alınan sonuçlara göre Na-Beta-40 kullanılan biyosensörlerde bakır ve civa iyonlarına karşı hassasiyet gözle görülür oranda azalmıştır.

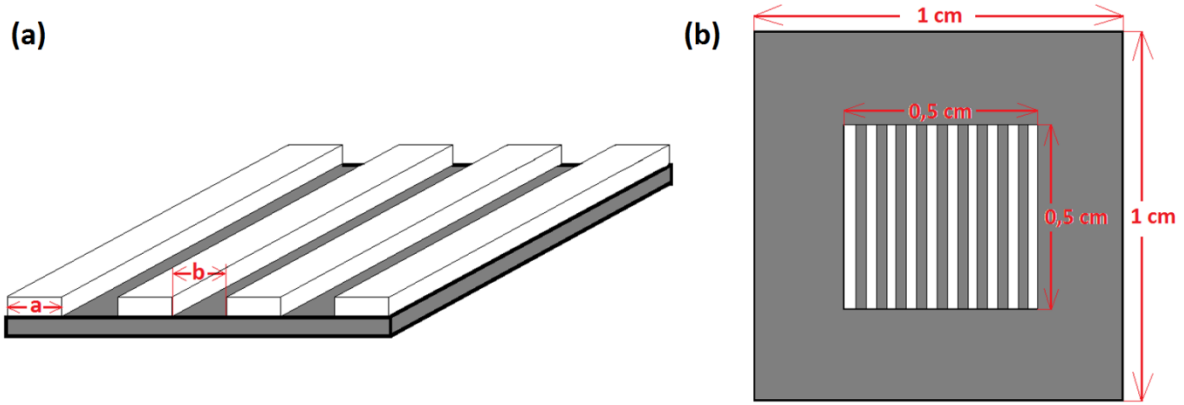
4.6 Gerçek Uygulamalara Yönelik Çalışmalar: Hücre Tutunması ve Çoğaltma Çalışmaları

Literatürde zeolit mikrokristallerinin besi ortamına katılmasının hücreler üzerinde tutunma, çoğalma ve değişimleri üzerine birçok çalışma bulunmaktadır (CEYLAN, 2007; FENOGLIO, 2000; KEETING, 1991; PETRUSHKOV, 2009; THIAN, 2010). Bu çalışmada amaçlanan, bundan önce anlatılan ve elde edilen tüm veriler ışığında, ilk kez sistematik bir şekilde örnekler üzerindeki zeolit miktarının değişiminin ve kalsinasyon işleminin hücre çoğaltması üzerine etkilerinin iki değişik zeolit tipi ve iki hücre tipiyle araştırılmasıdır. Kullanılan zeolitlerin taramalı elektron mikroskopu görüntüleri Şekil 61'de verilmiştir.



Şekil 61: Silikalit (A) ve Zeolit A (B) mikroparçacıklarının SEM mikrofrafı.

Bu çalışmada, zeolit A ve silikalit mikroparçacıklarının MTT testi yardımıyla sitotoksitelerinin 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde ölçümü yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan silikon üzerinde fotolitografi ile üretilmiş üç farklı mikrodese Şekil 62’de gösterilmiştir.



Şekil 62: Kullanılan örneklerin ve mikrodese bulunan alanın açılı şematik gösterimi, zeolitlerle üretilmiş çizgilerin kalınlığını-a, iki zeolit çizgisi arasındaki boşluk-b (A); Tüm örneğin yukarıdan şematik gösterimi (B).

Bu çalışmaya özel olarak üretilen örneklerde a değerleri 20, 50 ve 100 µm olarak değiştirilirken, b değeri 100 µm olarak sabit tutulmuştur. Bunun sonucunda toplam alanı 1 cm² olan örneklerin üzerinde sırasıyla 0,04167 cm², 0,08825 cm² ve 0,125 cm² lik alanlar Şekil 61’de gösterilen zeolitler ile kaplanmıştır.

4.6.1 MG63 ve NIH 3T3 Hücre Tipleri ile MTT Testleri

Bölüm 3.3.2.2’de anlatılan metotla üretilen ve şematik olarak Şekil 62’de gösterilen mikrodese zeolit ince filmlerinde, MTT testinde hücrelerin çoğalması ve MTT’lerin formazana dönüşümünü çalışmaları yapılmıştır. Şekil 62’de şematik olarak gösterilen iki farklı zeolit ince filminden (Zeolit A ve silikalit) elde edilen yüzey özellikleri sonuçları Tablo 15’de açıklanmıştır.

Tablo 15: Zeta potansiyel ve kontak açısı deney sonuçları

| Örnek İsmi | Osteoblast Besi Ortamı+FBS+PS* (mV) | Fibroblast Besi ortamı+FBS+PS* (mV) | Saf Su* (mV) | Kontakt Açısı ° |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------|-----------------|
| Zeolit A | 2,45 | -11,26 | -29,72 | 71.35 ± 3.07 |
| Silikalit | 11,68 | 15,15 | -11,29 | 89.35 ± 4.03 |

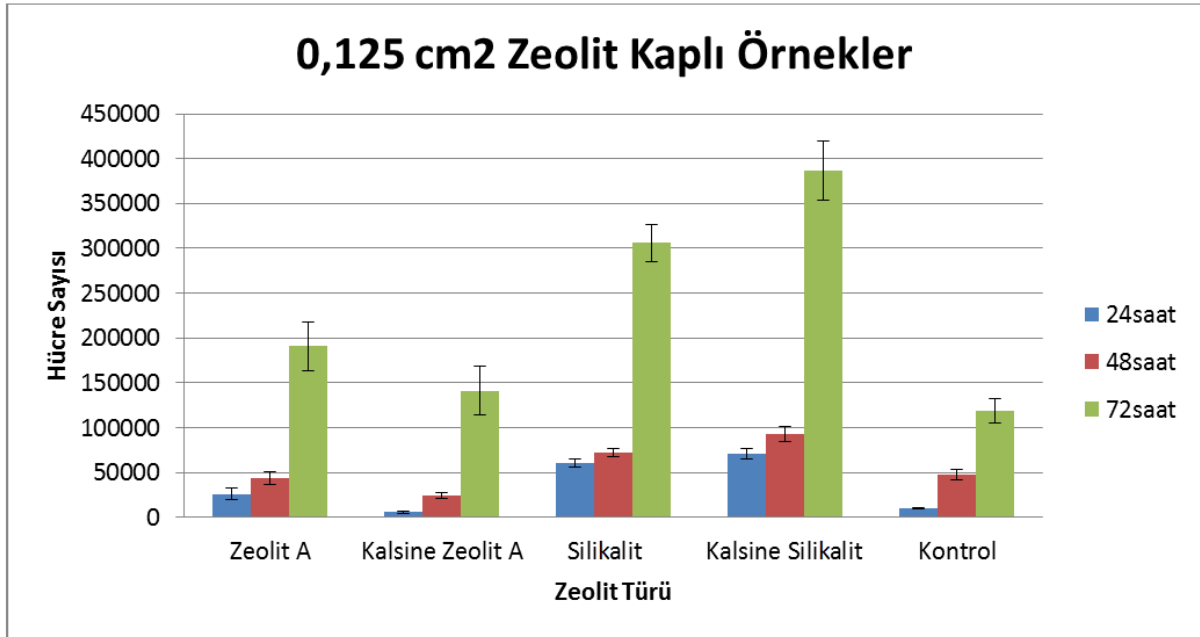
*pH 7'de alınmış zeta potansiyel değerleri.

Bu sonuçlara göre, iki farklı zeolitten elde edilen ince filmlerin hidrofilik özelliklerinin gerçekten de ne kadar birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir. Bu durum hücre çalışmalarını etkileyebilir ve kontrollü bir şekilde üretilen farklı zeolit ince film ve mikrodesenleri, kontrollü hücre tutunumu için kullanılarak ileriye dönük lab-on-a-chip çalışmalarına başlangıç sayılabilir.

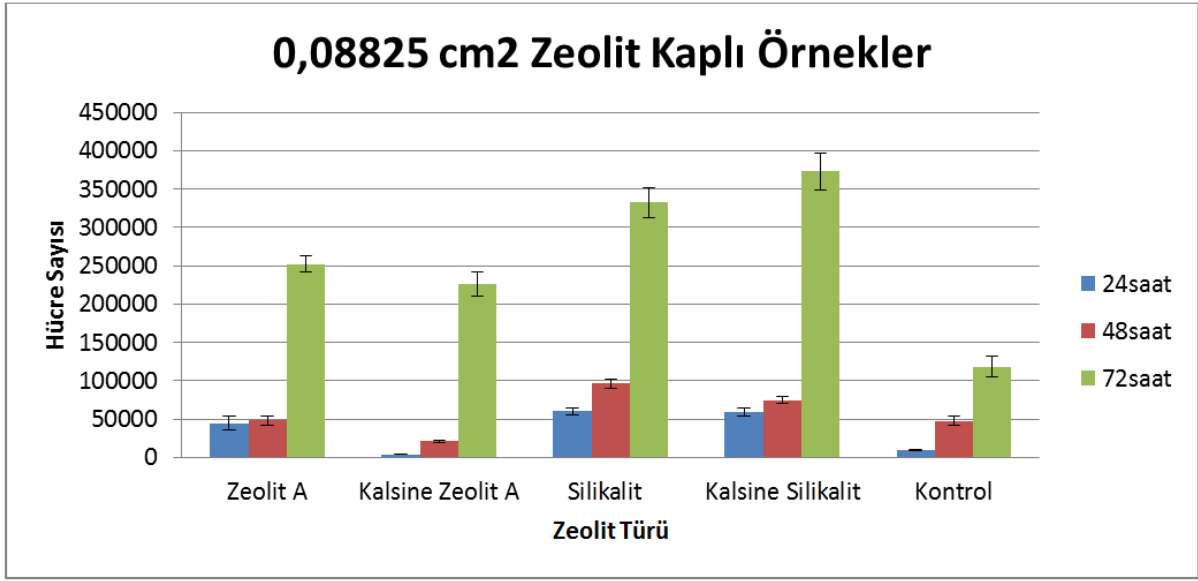
4.6.2 Hücre Tutturma Çalışmaları Sonuçları

Bu çalışmada, mikrodesenler içerisindeki zeolitlerin bulunduğu alan direk olarak örneklerdeki zeolit miktarını belirlemektedir. Bu şekilde oluşturulan desen çalışması, örnekler üzerindeki zeolit miktarını güvenilir ve tam olarak kontrol edebilmenin tek yoludur. Bu sebeple, zeolit miktarının hücre sayısı üzerindeki etkisi, 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarla ölçülmüştür.

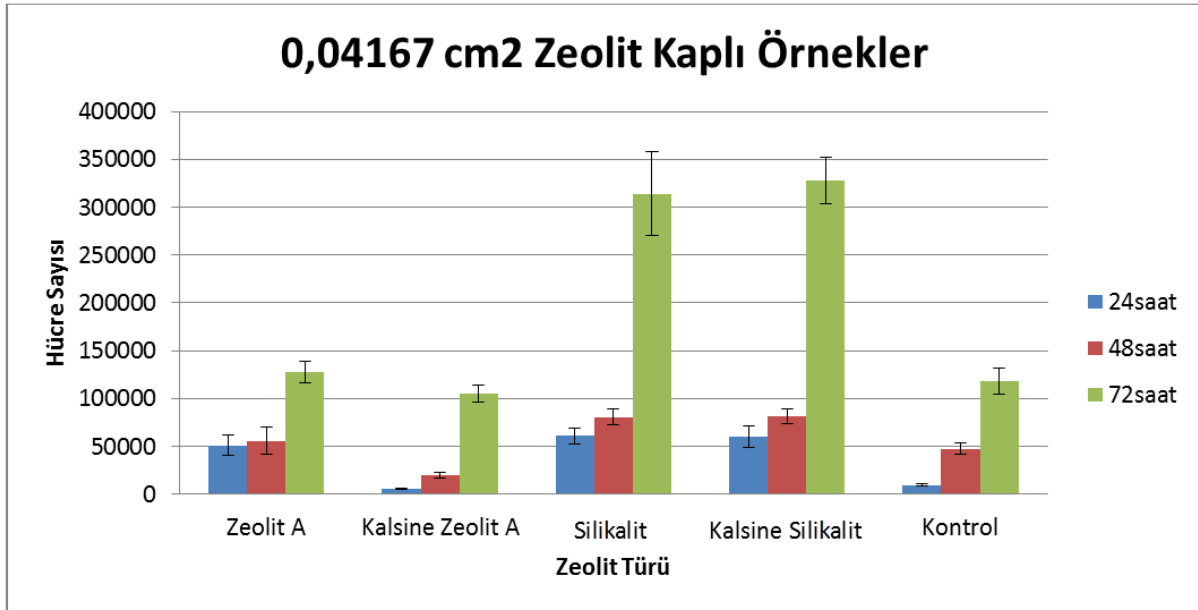
Farklı miktarlarda zeolit içeren örneklerle yapılan 24, 48 ve 72 saatlik MTT testlerinin sonuçları Şekil 63-65'de verilmiştir.



Şekil 63: MG63 hücre tipi ile 0,125 cm² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 24, 48 ve 72 saatlik MTT testlerinin sonuçları.



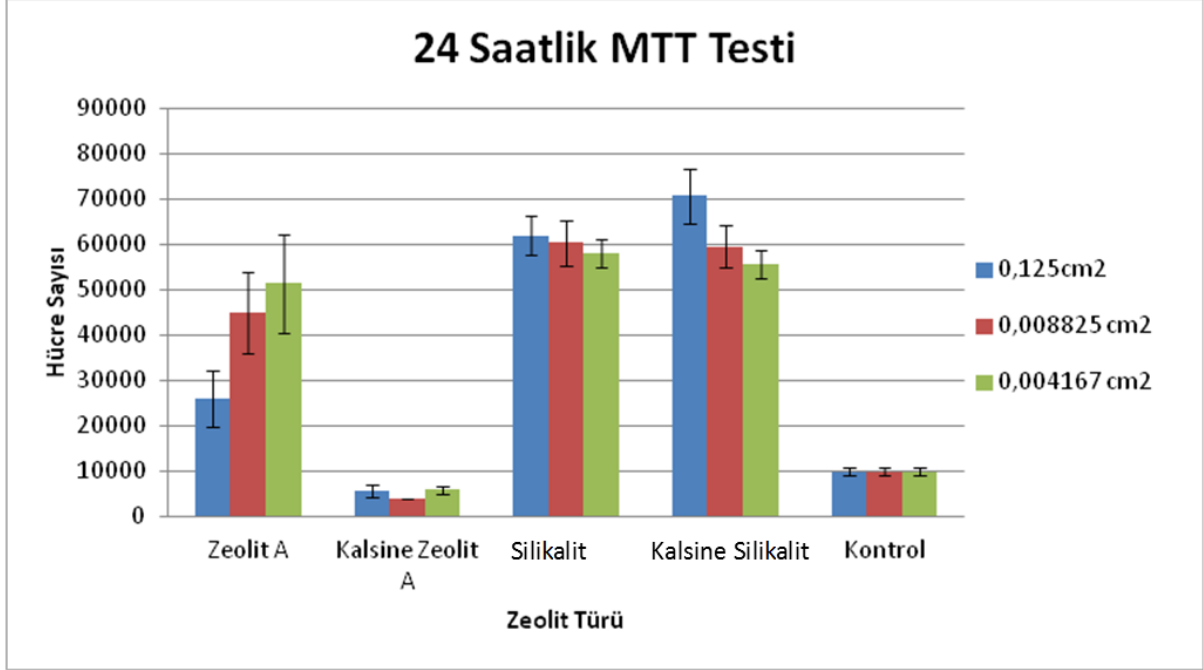
Şekil 64: MG63 hücre tipi ile 0,08825 cm² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 24, 48 ve 72 saatlik MTT testlerinin sonuçları.



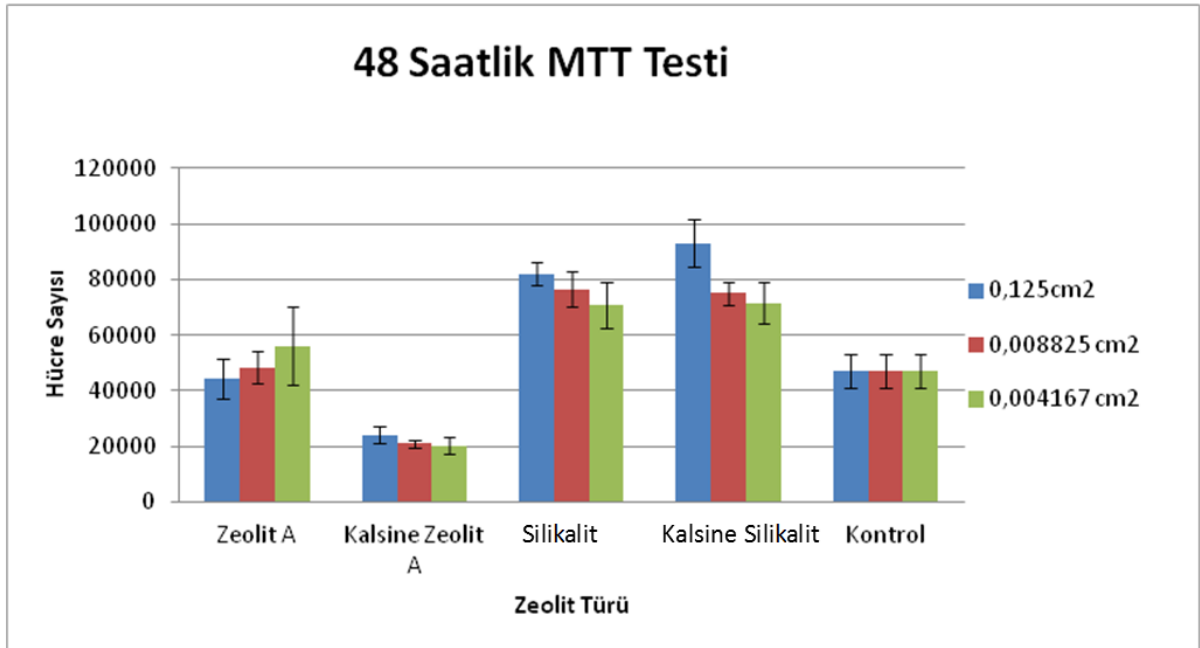
Şekil 65: MG63 hücre tipi ile 0,04167 cm² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 24, 48 ve 72 saatlik MTT testlerinin sonuçları.

Şekil 63-65'de görüldüğü gibi, silikalit tipi zeolitlerle kaplanmış örnekler 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda zeolit A ile kaplanmış örneklerden daha yüksek hücre sayısına ulaşmıştır. Bu fark, Tablo 15'de verilen özelliklere göre, zeolitlerin hidrofilik/hidrofobik özelliklerindeki değişikliğe, yüzey yüklerindeki farklılığa ve/veya partikül morfolojisi ve büyüklüğündeki farklılıklara dayandırılabilir. Tian ve ark. yaptığı çalışmada daha hidrofobik ve negatif yüklü yüzeylerin hücre bağlanmasını, çoğalmasını ve değişimini artırdığını rapor etmiştir (THIAN, 2010).

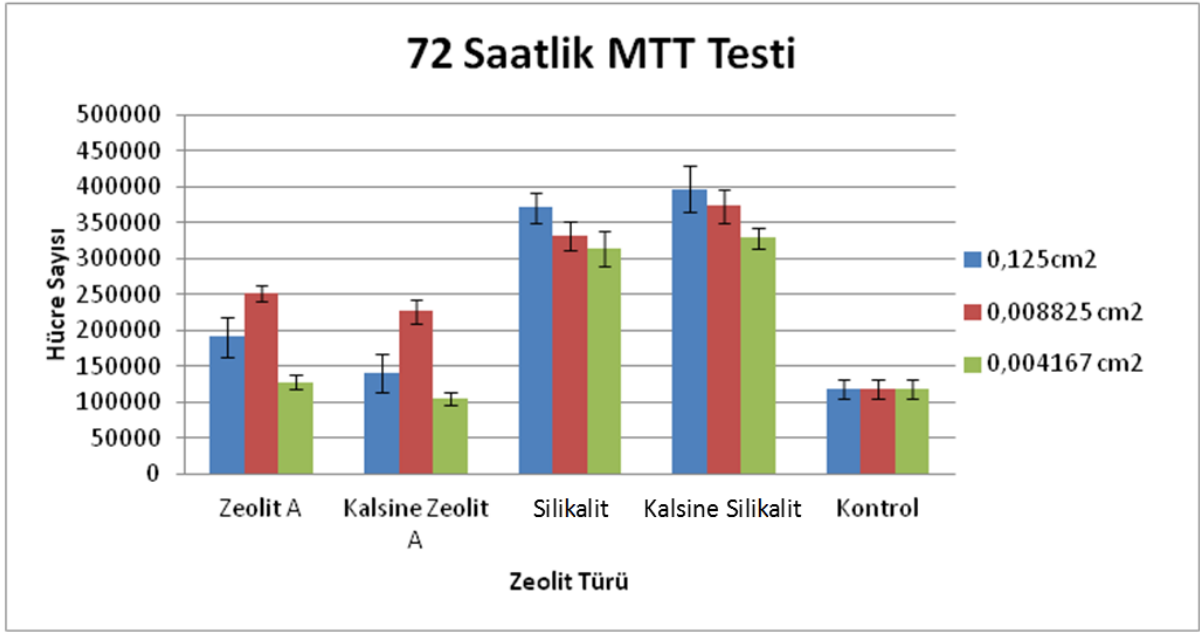
Mikrodesen içerisinde zeolit kaplı alan doğrudan zeolit miktarını simgelediği için, zeolit miktarı daha fazla olan örnekler üzerinde başlangıçtaki hücre sayısı aynı olmakla beraber, 24, 48 ve 72 saatlik periyotlar sonucunda daha fazla hücre bulunması, bu örnekler üzerinde hücre çoğalmasının daha çok gerçekleştiğini göstermiştir. MG63 osteoblast tipi hücrelerle örnekler üzerinde yapılan MTT testlerinin sonuçları 24, 48 ve 72 saatlik periyotlar halinde Şekil 66-68'de verilmiştir.



Şekil 66: MG63 hücre tipi ile 0,125cm², 0,008825 cm² ve 0,004167 cm² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 24 saatlik MTT testlerinin sonuçları.



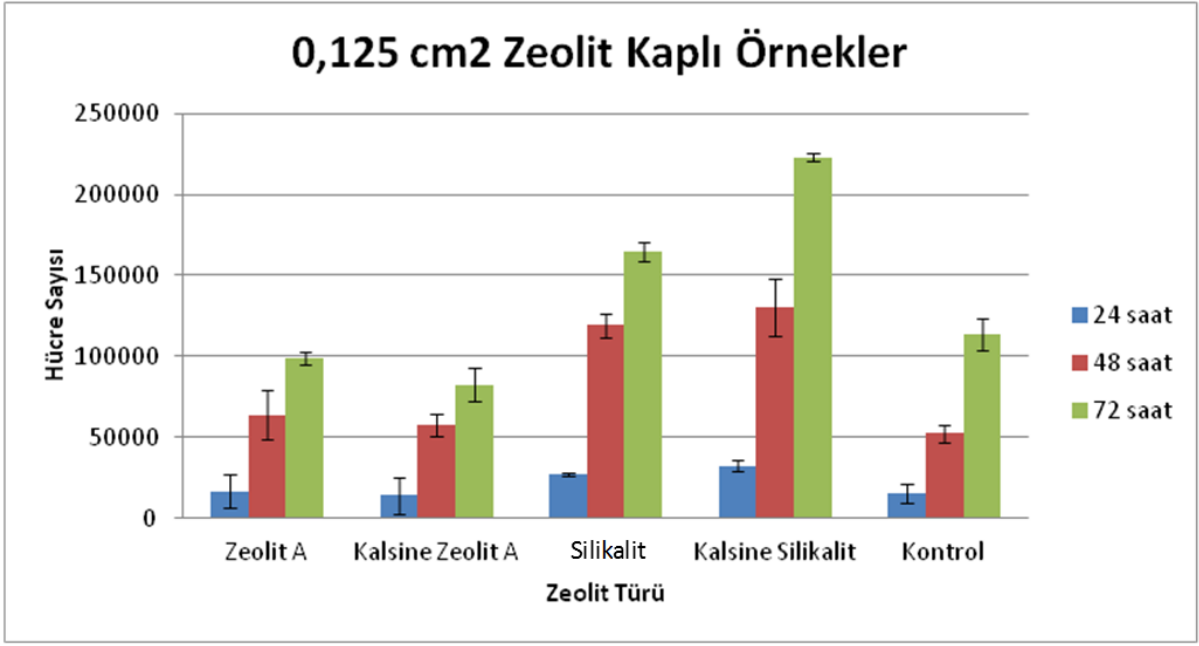
Şekil 67: MG63 hücre tipi ile 0,125cm², 0,008825 cm² ve 0,004167 cm² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 48 saatlik MTT testlerinin sonuçları.



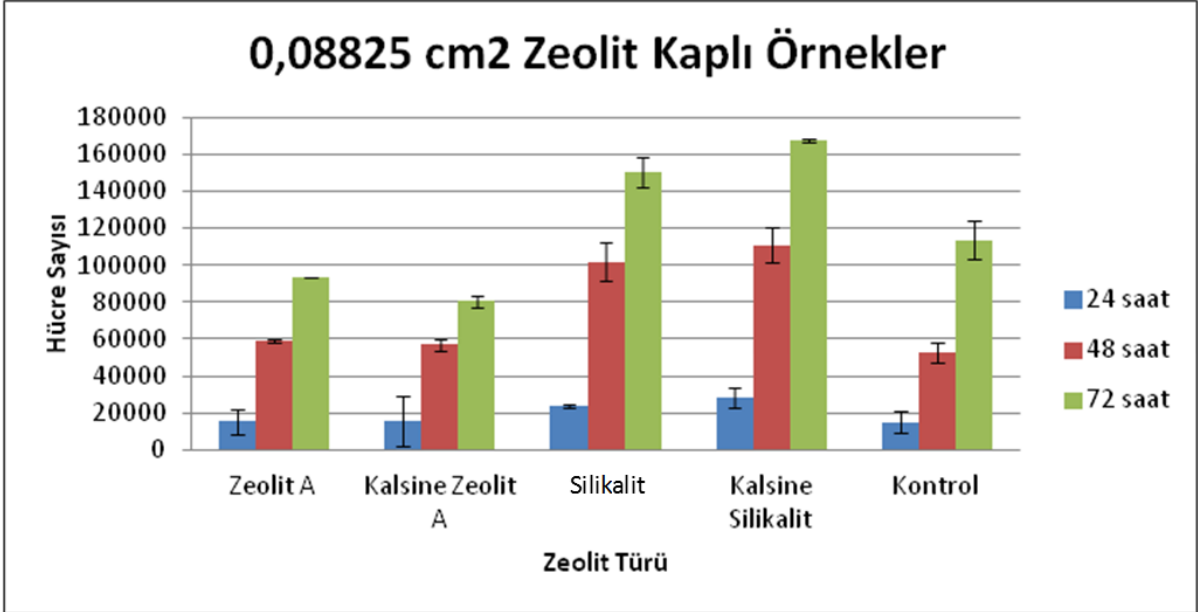
Şekil 68: MG63 hücre tipi ile 0,125cm², 0,008825 cm² ve 0,004167 cm² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 72 saatlik MTT testlerinin sonuçları.

Şekillerden anlaşıldığı üzere, 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda zeolit miktarının artışı ile üzerinde bulunan hücre miktarının arttığı gözlenmiştir. Bu artışın örneklerdeki yüzey alanının artışıyla alakalı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca tüm örneklerin kontrol örneklerinden daha fazla zeolit bulundurduğu düşünülürse, hücrelerin zeolitler üzerinde de tutunduğu ve çoğaldığı tahmin edilmektedir. Bu sonuçların aksine, Fenoglio ark. saf silika zeolit (porosil) ile yapılan deneylerde, zeolit miktarı arttıkça, makrofaj hücrelerinde toplam hücre sayısının düştüğünü gözlemiştir (FENOGLIO, 2000).

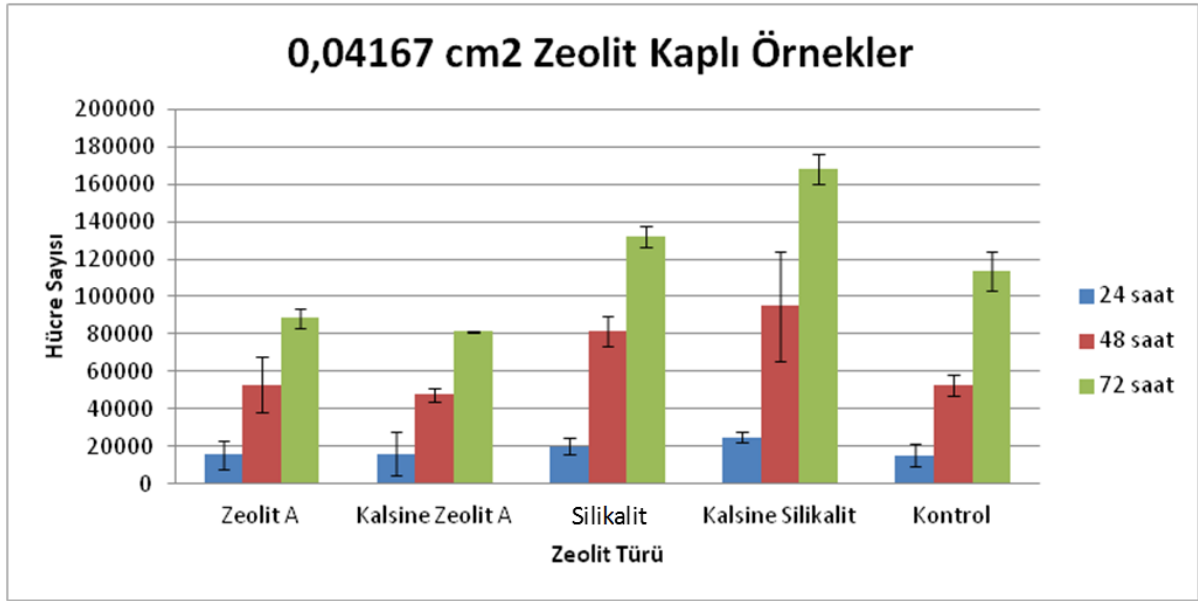
Ayrıca aynı deneyler NIH 3T3 Fibroblast hücreleriyle yapılmış olup, inkübasyon süresinin etkisi Şekil 69-71'de verilmiştir.



Şekil 69: 0.125 cm² zeolit kaplı örnekler üzerinde NIH 3T3 hücreleri ile yapılan 24, 48 ve 72 saatlik MTT testi sonuçları.



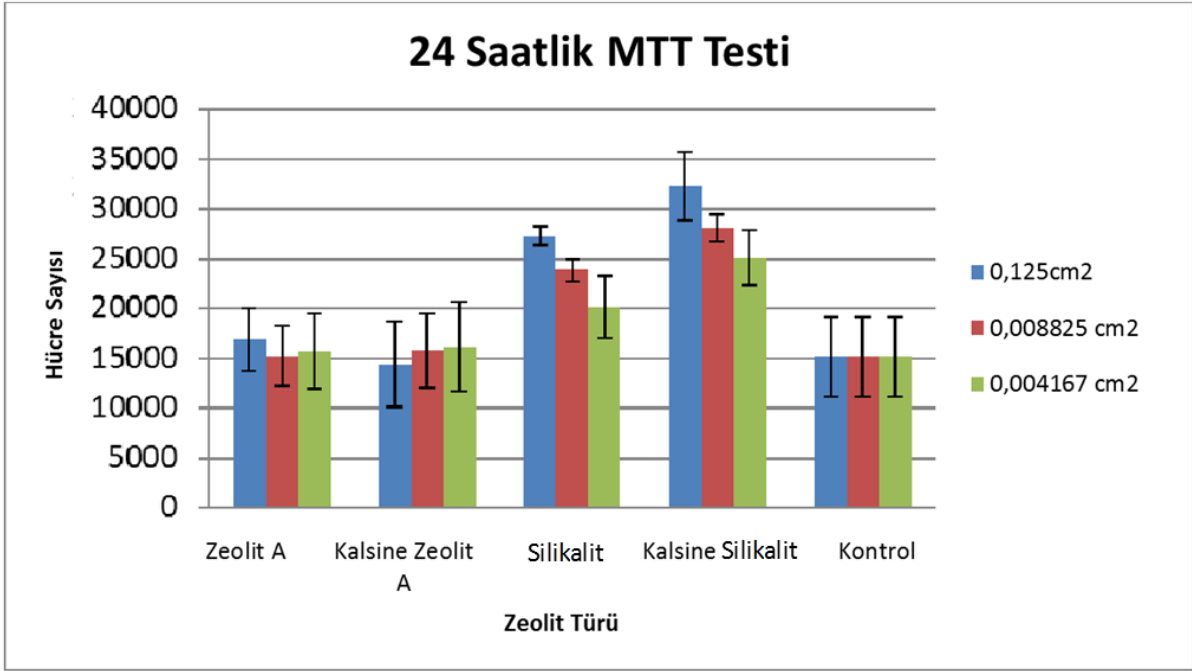
Şekil 70: 0.08825 cm² zeolit kaplı örnekler üzerinde NIH 3T3 hücreleri ile yapılan 24, 48 ve 72 saatlik MTT testi sonuçları.



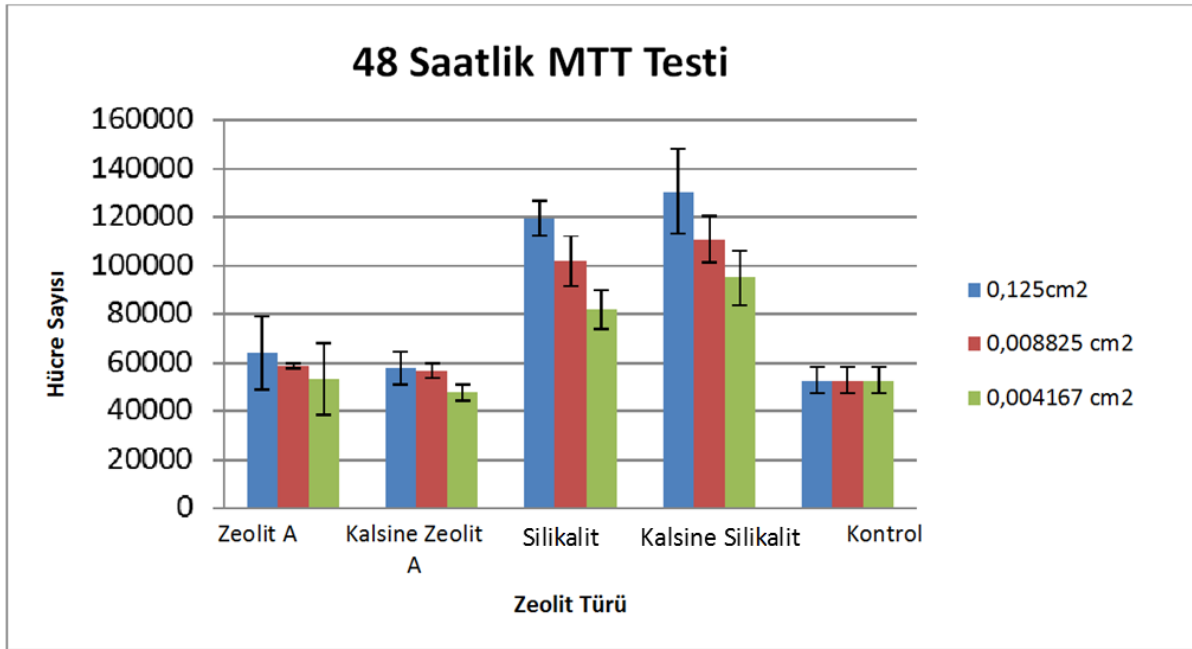
Şekil 71: 0.04167 cm² zeolit kaplı örnekler üzerinde NIH 3T3 hücreleri ile yapılan 24, 48 ve 72 saatlik MTT testi sonuçları.

Şekil 69, 70 ve 71'de görüldüğü üzere, zamanla tüm örnek tipleri üzerinde hücre sayıları artmaktadır. Bu sonuçlar, MG63 tipi hücrelerle yapılan çalışmalarla aynı korelasyondadır. Aynı şekilde, silikalit tipi hücreler üzerinde gelişen hücre sayısı, zeolit A'lardan daha yüksektir. Zeolit A lar ile silikalitler arasında birçok fark bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri, silikalitlerin parçacık boyutlarının daha fazla olması ve yüzeyinde daha çok pozitif yük bulunmasıdır. Literatürde bazı çalışmalarda, hücre tutunması ve gelişiminin yüzey yüküne bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir. Bu çalışmada da 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda daha hidrofobik ve pozitif yüklü yüzeylerde daha fazla hücre bulunduğu gözlenmiştir.

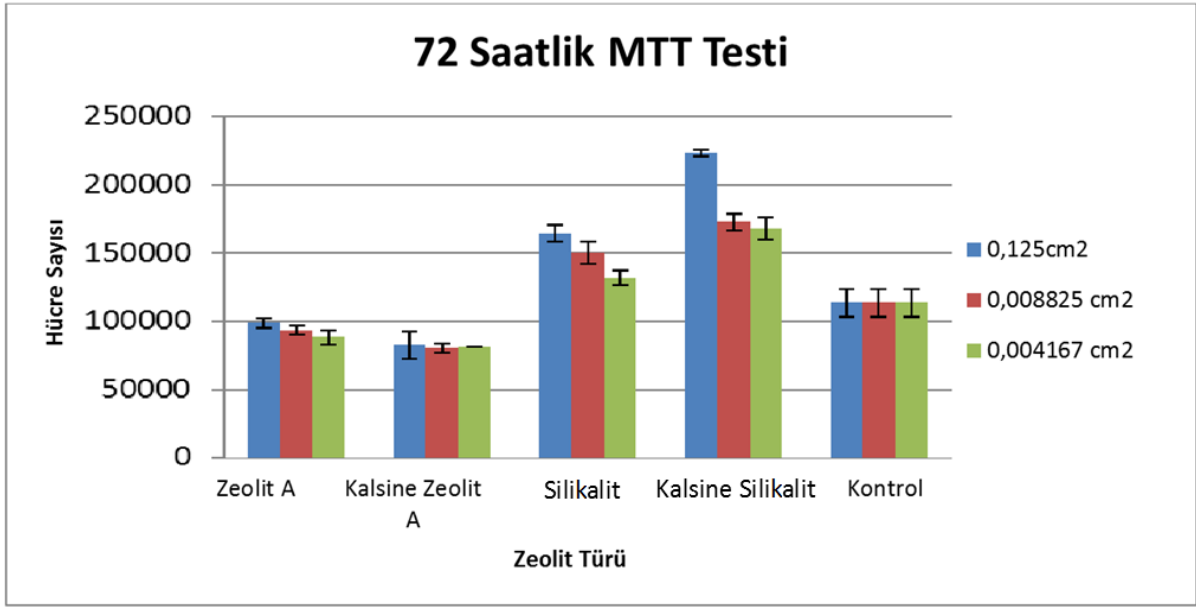
Şekil 72, 73 ve 74'de zeolit miktarının sırasıyla 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda hücre sayısına etkileri gösterilmiştir.



Şekil 72: NIH 3T3 hücre tipi ile 0,125cm², 0,008825 cm² ve 0,004167 cm² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 24 saatlik MTT testlerinin sonuçları.



Şekil 73: NIH 3T3 hücre tipi ile 0,125cm², 0,008825 cm² ve 0,004167 cm² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 48 saatlik MTT testlerinin sonuçları.



Şekil 74: NIH 3T3 hücre tipi ile 0,125cm², 0,008825 cm² ve 0,004167 cm² zeolit kaplı örnekler üzerinde yapılan 72 saatlik MTT testlerinin sonuçları.

MG63 hücreleri ile yapılan çalışmalarına benzer olarak, kalsinasyon iki farklı zeolit tipinde farklı sonuçlar vermiştir. Kalsinasyon işlemi, silikalit kullanılan örneklerde toplam hücre sayısını artırırken, zeolit A'lı örneklerde düşürmüştür. Fenoglio ve ark. (FENOGLIO, 2000) zeolit gözeneklerinin çok küçük olmaları sebebiyle, zeolitlerin iç yüzey alanın hücre çalışmalarında bir etkisinin bulunmadığını belirtmiş. Petushkova ve ark. (PETRUSHKOV, 2009) ise silikalit örneklerinde iç yüzey alanının etkisiz olduğunu ancak daha büyük yüzey alanına sahip parçacıkların daha sitotoksik olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada, kalsine örneklerle kalsine olmayan örnekler arasında açık bir fark olduğu gözlenmiş ve bu farkın hücrelerin direk o bölgelere bağlanmasından çok, besi ortamındaki proteinlerin, en azından bu gözenek açıklıklarına yerleşerek, hücrelerin bağlanma ve bölünme mekanizmalarını etkileyebileceği düşünülmüştür.

MTT testleri sonuçlarına göre, iki zeolit tipi arasında kayda değer bir fark görünmemektedir. Daha hidrofobik ve daha pozitif yüklü olan silikalit ile hazırlanmış örneklerin, zeolit A'lı örnekler göre tüm farklı zeolit miktarlarında daha çok hücre bulundurduğu gözlenmiştir. Literatürdeki çalışmalarda, sitotoksikite ve hücre bağlanmasının, hücre tipi, parçacık büyüklüğü (THOMASSEN, 2010; RABOLLI, 2011), yüzeydeki yükler (THIAN, 2010) ve hidrofilik/hidrofobik özellikler (YANG, 2010) ile direk bağlantılı olduğu açıklanmıştır. Bu çalışmada alınan sonuçlar, Thian ve ark.'ın çalışmasında anlattığı daha hidrofilik ve negatif yüklü nanoapatit parçacıkların hücre bağlanmasını, çoğalmasını ve değişimini artırdığı yönündeki çalışmasının aksini göstermektedir (THIAN, 2010). Ayrıca birçok çalışma yüzey alanının toksisite ve hücre tutunumu açısından en önemli faktör olduğunu (PETRUSHKOV, 2009; THOMASSEN, 2010; RABOLLI, 2011) açıklamakta ve daha büyük parçacıkların, daha toksik olduğunu söylemektedir (THOMASSEN, 2010). Bu bağlamda, daha büyük parçacık boyutuna sahip zeolit A'ların silikalitlerden daha toksik olduğu, dolayısıyla üzerinde daha az hücrenin yaşamaya devam ettiği yorumuna varılabilir. Bir başka çalışmada ise Thomassen ve ark. (THOMASSEN, 2010) daha büyük parçacıkların endotel hücreleri ve makrofajlar için daha az sitotoksik olduğunu raporlamıştır.

Literatürde iç yüzey alanının, hücre çalışmalarında kayda değer bir etkisinin olmadığı söylenmekle beraber, yapılan çalışmada kalsine olan örneklerle kalsine olmayan örnekler arasında ciddi farkların olduğu gözlenmiştir. Bu besi ortamında bulunan proteinlerin

yüzeydeki gözenek açıklıklarına kalsine örneklerde daha fazla tutunması sonucu, kalsine örneklerde daha fazla hücre tutunumu ve çoğalmasını sağladığı şeklinde açıklanabilir. Literatürde simüle edilmiş vücut sıvısı zeolitlerle temas ettirildiğinde zamanla silikon oranının arttığı gözlenmiştir (CEYLAN, 2007) ayrıca yüzeydeki hidrofilik –OH gruplarının osteoblastların gelişimini ve mineralizasyonunu artırdığını rapor etmiştir (KESELOWSKY,2004).

Sonuç olarak, silikalit içeren örneklerin MG63 ve NIH 3T3 hücreleriyle yapılan çalışmalarda hücre tutunumu ve gelişimini 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda arttırdığı gözlenmiştir. Literatürde açıklandığı üzere zeolit miktarındaki artış sitotoksisiteyi arttırmamış, silikalit ile hazırlanmış örneklerde tüm zaman dilimlerinde hücre sayılarında artışa neden olmuştur. Ayrıca kalsinasyon işlemi, silikalit ile oluşturulan örneklerde pozitif etki göstermiştir.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Zeolit kristallerinin bundan önceki bölümlerde özetlenen pekçok özelliğinin, onlara çok değişik ve ileri malzeme yapımına yönelik avantajlar yaratmakta olduğu hem ileri uygulama ile ilgili çalışmalarda, hem de nanogözenekli malzemelerle ilgili çalışmalarda sıkça tartışılan ancak tam olarak ispatlanamamış bir olguydu. Bunun sebebi böyle kapsamlı bir çalışmanın oldukça interdisipliner bir oluşum gerektirmesidir. Tübitak projemize paralel olarak yürüttüğümüz FP-7 projemiz, bu tip bir çalışmanın yapılabilmesi için bir olanak sağlamıştır. Bu olanaklarla, proje teklifinde bahsi geçen bütün çalışmalar yapılmış ve 6 adet SCI'de olan yayınla beraber bulunan sonuçlar ulusal ve uluslararası pekçok bildiriyle sunulmuştur.

Genel olarak bu projede farklı tipteki zeolit ve zeo-tip malzeme başarıyla sentezlenmiş ve karakterizasyonları yapılmıştır. Literatürde başka örneği bulunmayan tüm sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

- 1- Zeolit nanomalzemelerinin kullanımıyla ilk defa olarak biyosensör verilerinin kontrol edilebileceği, yani okuması yapılmak istenen veya hizmet etmesi düşünülen amaca yönelik bir elektrot yüzeyi oluşturulabileceği gösterilmiştir.
- 2- Pekçok farklı zeolit çeşidi (silikalit, Zeolit A, farklı parçacık boyutlu zeolitler, vs.), yine pekçok farklı yüzey üzerinde (SiO_2 , cam, altın kaplı yüzeyler) organize edilmiş ve hedeflenen amaca göre tutunum parametreleri ve zeolit özellikleri optimize edilmiştir.
- 3- Hidrofilik/hidrofobik yüzeylerin aynı elektrot üzerinde oluşturulmasıyla zeolit tutunumu başarıyla sağlanmıştır. Bu şekilde oluşturulan yüzeyler farklı desenlerde ve istenilen büyüklüklerde oluşturulmuşlardır. Tek bir zeolitten oluşmuş 200 nm'lik bir sıradan 50-100 μm 'a kadar her türlü zeolit deseni, istenilen zeolit tipi kullanılarak çok kontrollü fabrike edilmiştir.
- 4- Oluşturulan tekli ve çoklu-zeolit yüzeylerinde yapılan çalışmalarla, zeolit tipinin ve kalınlığının hücre tutunumuna etkisi olduğu bulunmuştur. Bu çalışma iki farklı hücre ile denenmiştir, ancak sinir hücreleriyle devam eden ileri düzey çalışmaların kapısını açmıştır.
- 5- Zeolitle modifiye edilmiş tüm biyosensörler yüksek enzimatik yanıt verme süresini düşürmüştür; çok daha yüksek aktiviteye, dayanıklılığa, tekrarlanabilirliğe ve seçiciliğe neden olduğu gösterilmiştir. Bu anlamda, standart olarak hep kullanılagelen biyosensör yüzeylerine ilk defa olarak alternatif ve daha gelişmiş bir "çevirici birim" geliştirilmiştir.
- 6- Sentez başarılı olan tüm zeolit tozlarına ve onlardan oluşturulmuş ince filmler üzerine farklı biyolojik malzemelerin immobilizasyonu çalışılmıştır. Zeolitlerin immobilizasyonları sonucunda elde edilmiş veriler ışığında önceki bölümlerde bahsi geçen özelliklerin; yani zeolitlerin asidik özelliğinin, parçacık boyutunun ve yüzey alanının biyosensör verilerinde farklılıklar yarattığı ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlara varmak amacıyla yapılanlar sırasında tüm bu parametreler çok kontrollü, yani diğerleri sabit tutularak sadece istenilen parametre değişecek şekilde yapılan sistematik bir çalışmanın ürünüdür.
- 7- Özet olarak, bu proje kapsamında geliştirilmiş olan nanomalzeme-cihaz entegrasyonu çalışmaları sayesinde, mevcut olan teknolojiler minyatürize edilerek biyosensörlerin kullanım alanları biraz daha kolaylaştırılmış ve hedefe yönelik analiz teknikleri nanomalzemelerin kontrollü modifikasyonu ile daha da mümkün kılınmıştır.

BÖLÜM 6

ÖNERİLER

Bu proje kapsamında yapılan çalışmaların en önemli amacı, elde edilen bilimsel bulgular dışında, laboratuvar ortamında sentezi başarılı olan toz formundaki nanomalzemelerden gerçek bir uygulamaya yönelik, cihaza entegre ve belli bir amaç doğrultusunda veri alınmasının hedeflenmesiydi. Bu kapsamda, proje teklifinde de bahsedildiği gibi, interdisipliner bir grubun biraraya gelerek kurdukları bir platformda başarılı olunabilirdi. Dolayısıyla, bilimsel bulguların ötesinde bu tip çok ortaklı projelere entegre olan Tübitak projelerinin daha da artırılmasının ve bu entegrasyonu artırıcı belki farklı platformlar kurulmasının çok daha büyük başarılar için yol açacağı düşüncesindeyiz.

Bilimsel açıdan, projemiz kapsamında, proje grubumuz ilk defa olarak her bir zeolit kristalini neredeyse tek tek (100-200 nm) silikon yüzeyler üzerine litografik yöntemlerle yerleştirmeyi başarmıştır. Zaten projenin yukarıda bahsi geçen nanomalzeme-cihaz entegrasyonunun başarılması açısından gerekli olan ilk adım da bu kontrollü ve organize dizilimin başarılmasıydı. Proje boyunca en zorlanılan ve interdisipliner çalışmaların öne çıktığı bölüm, bu elde edilen zeolit ince filmlerinin zaten çalışan bir biyosensör sistemi gibi bir cihaza entegrasyonu olmuştur. Bu aşamada, bu cihazların veya nanomalzemenin yer alacağı cihaz parçasının (bu projedeki çevirici birim gibi) da araştırmacılar tarafından üretilmesi gereği ortaya çıkmıştır. Projemiz boyunca Ukrayna'lı ortaklarımızın ürettikleri elektrotlar kullanılmıştır, ancak bu elektrotların elektron demet litografi sistemine yerleştirilmesi ve üzerinde herhangi bir nanomalzemenin tutturulması mümkün olmamıştır. Böyle bir şey ancak elektrotların da ilk aşamadan itibaren tarafımızca üretilmeleriyle mümkün olabilirdi, ancak zaten projede yapmayı hedeflediklerimiz arasında da böyle bir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu kadar organize bir zeolit ince filmi üzerinde (Bölüm 4.3.2 ve 4.6) sadece hücre tutunumu çalışmaları yapılabilmektedir. Bunun yanısıra, çok organize olmayan zeolit ince filmlerinde bile (Şekil 47; KİRDECİLER, 2011), biyosensörler açısından bakılırsa, oldukça avantajlı sonuçlar alındığı görülmüştür.

Bu tip çalışmaların daha da ileri bir seviyeye taşınması için nanomalzeme sentezinden film fabrikasyonuna ve bu sentezlenen nanomalzemelerin, belki de temiz oda ortamındaki cihaz entegrasyonuna kadar tüm aşamaların araştırma ekibi tarafından, diğer bir deyişle, hiçbir parçasının dışarıdan hazır olarak alınmadığı bir çalışma yapılması öngörülmektedir. Sadece bu projede yapılan çalışmalar açısından bakıldığında ise, bu nanomalzemelerin sentez sonrasında farklı yüzeylere tutturmak yerine, farklı yüzeyler üzerinde büyütüldükleri ve amaçlanan şekilde cihazlara entegre edildikleri bir çalışmanın, daha zor olmakla birlikte, çok daha verimli sonuçlar vereceği beklenmektedir. Bunun da sebebi, kimyasal olarak zaten tam olarak kimyasının anlaşılması zor olan bir nanomalzeme sentezlemek bile çok vakit alırken, bu sentez ortamına bir de bir cihaz parçası eklenecek olmasıdır. Bütün bunlara ek olarak, bahsi geçen zeolit ince filmlerinin güneş pili uygulamaları açısından test edilmesi de önerilecekler arasında yer almaktadır. Bu konuyla ilgili çalışmalar da ekibimiz tarafından hedeflenmektedir.

BÖLÜM 7

PROJE HEDEFLERİ VE HEDEFLERE GÖRE DEĞERLENDİRME

Projemizde planlanan iş paketleri ve bu iş paketlerine göre projemizin kendi kendini değerlendirmesi aşağıdaki tabloda verilmiştir.

| İş paketi | Açıklama | Tamamlanan |
|--|--|------------|
| 1 | Zeolit Sentezi | 100% |
| <p>Mikron ve nano boyutta, farklı tipteki, farklı Si/Al oranlı zeolitler başarıyla sentezlenmiştir. Sentezlenen bu zeolitlerin kimyasal kullanılarak ve kullanılmadan SiO₂ ve cam gibi farklı yüzeyler üzerindeki tutunumları çalışılmıştır. Toz ve film her türlü örnek SEM, XRD, PSD, BET kullanılarak karakterize edilmişlerdir. Merkez Laboratuvar imkansızlıklarından dolayı eksik olan NMR karakterizasyonları yerine zeta potansiyel cihazı kullanılmıştır ve aslında bu karakterizasyon, projemiz için daha da anlamlı olmuştur, çünkü yüzeylerin yük durumu hakkında da bilgi sahibi olunmuştur. Zeta potansiyel ile okunan farklılıklar, zeolitlerimizin yüzey gruplarının değiştiğine dair bize ipucu vermiştir.</p> | | |
| 2 | Yüzey Modifikasyonu ve İnce Film Çalışmaları | 100% |
| <p>Hem elektron demet litografisi ile, hem de fotolitografi ile zeolit nanoparçacıklarının SiO₂ üzerindeki kontrollü dizilimi çok detaylı çalışılmıştır. Bu şekilde ilk defa özetlenen özellikteki ince filmler oluşturulmuş ve son iş paketindeki çalışmalara sebep olmuştur. Farklı yüzeylerdeki zeolit tutunumlarının sıklıkları ve güçlerine etki eden faktörler ve özellikle de mikrondan nano boyuta geçişin tüm bunlar üzerindeki etkileri ilk defa olarak bu kadar kontrollü yüzeylerde ve farklı tip zeolitler üzerinde çalışılmıştır. Bu amaç doğrultusunda fotolitografi yöntemiyle de zeolit desenleri oluşturulması için yeni prosedürler oluşturulmuştur. Zeolit kanallarının yüzeye dik olacak şekilde tutturulması da başarıyla sonuçlanmıştır. Farklı özellikteki hidrofilik/hidrofobik zeolitler aynı yüzey üzerinde tam kontrollü bir şekilde oluşturulmuştur.</p> | | |
| 3 | İmmobilizasyon Çalışmaları | 100% |
| <p>Sentez çalışmaları sonucunda başarıya ulaşılmış tüm zeolit tozlarına ve onlardan oluşturulmuş ince filmler üzerine farklı biyolojik malzemelerin immobilizasyonu çalışılmıştır. Zeolitlerin immobilizasyonları sonucunda elde edilmiş veriler geleneksel yöntemlerle yapılmış immobilizasyon çalışmalarıyla kıyaslanmıştır.</p> | | |
| 4 | Biyosensör Yapımına Yönelik Çalışmalar | 100% |
| <p>Farklı aşamalarda oluşturulmuş ve başarıya ulaşılmış tüm veriler, yani sentezi başarılı zeolitler, ince filmler ve biyosensörler biraraya getirilip birbirlerine entegrasyonu sağlanmıştır. Elde edilen tüm entegre sistemlerden (kondüktometrik, amperometrik, ISFET) veriler alınmış ve zeolitsiz ortamlarla kıyaslanmıştır. Bu şekilde oluşturulan biyosensör prototipleri oluşturulmaya ODTÜ laboratuvarımızda kurulmuştur.</p> | | |
| 5 | Testlerin Yapılması | 95% |
| <p>En ilginç ve başarılı zeolit ince filmlerinden gerçek uygulamaya yönelik bir çalışma olarak, hücre tutunumu çalışmaları Mc Gill Üniversitesi ortaklığıyla başarıyla yapılmıştır. İlk bulgular çok heyecan verici olmakla birlikte bu konuda yapılacak çalışmalarımız devam etmektedir. Hedefimiz, oluşturulan hidrofilik/hidrofobik zeolit desenli yüzeyler üzerinde sinir hücresi tutunumu çalışmaları yapmaktır. Bu konuyla ilgili olarak proje teklifinde bir söz verilmemiştir, ancak yine de bu uygulamanın bir test olarak kullanılması proje devam ederken gelişmiştir. Söz verilenler kapsamında zeolitlerden ince film oluşturulmuş farklı biyosensör prototiplerinden üre, glukoz ve bütirikolin tespiti için kullanılmıştır.</p> | | |

BÖLÜM 8

KAYNAKÇA

- AKATA B., Warzywoda J., Sacco Jr. A., Gas-phase Meerwein–Ponndorf–Verley Reaction: Correlation of the 3665 cm^{-1} IR Band with the *Cis*-alcohol Selectivity, *Journal of Catalysis*, 222, 397-403, (2004).
- BORADE R.B.**, Clearfield A., Characterization of Acid Sites in Beta and ZSM-20 Zeolites, *Journal of Physical Chemistry*, 96, 6729-6737, (1992).
- CAMBLOR M.A.**, Corma A., Valencia S., Characterization of Nanocrystalline Zeolite Beta, *Microporous and Mesoporous Materials*, 25, 59-74, (1998).
- CEYLAN, T., Tatlier, M., Akçakaya, H., In vitro Evaluation of The Use of Zeolite as Biomaterials: Effects on Simulated Body Fluid and Two Types of Cells, *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 18, 1557-1562 (2007).
- CHANG Y. K., Chu L., A Simple Method for Cell Disruption by Immobilization of Lysozyme on the Extrudate-shaped NaY Zeolite, *Biochemical Engineering Journal*, 35, 37-47, (2007).
- CHEN C.Y.**, Li H.X., Davis M.E., Studies on mesoporous materials. I. Synthesis and characterization of MCM-41, *Microporous and Mesoporous Materials*, 2, 17-26, (1993).
- CHESTER A.W., Clement P., Han S., Faujasite Zeolitic Materials, *US patent*, 6,136,291A, (2000).
- CLIMENT M.J.**, Corma A., Iborra S., Synthesis of Nonsteroidal Drugs with Anti-inflammatory and Analgesic Activities with Zeolites and Mesoporous Molecular Sieve Catalysts, *Journal of Catalysis*, 233, 308-316, (2005).
- CORMA A.**, Rey F., Valencia S., Jorda J.L., Rius J., A Zeolite with Interconnected 8-, 10- and 12-Ring Pores and Its Unique Catalytic Selectivity, *Nature Materials*, 2, 493-497, (2003).
- DZYADEVYCH S.V.**, Soldatkin A.P., *Solid-State Electrochemical Enzyme Biosensors*, Kyiv, IMBG, 222, (2008).
- FENOGLIO, I., Croce, A., Di Renzo, F., Tiozzo, R., Fubini, B., Pure Silica Zeolites (Porosils) as Model of the Physicochemical Features Determining Silica Toxicity of Macrophages, *Chemical Research in Toxicology*, 13, 489-500 (2000).
- GALİOĞLU S., Ismail M.N, Warzywoda J., Sacco Jr. A., Akata B., Preparation and Microstructural Characterization of Oriented Titanosilicate ETS-10 Thin Films on Indium Tin Oxide Surfaces, *Microporous and Mesoporous Materials*, 131, 401-406, (2010).
- GHOSE S., Mattiasson B., Protein Adsorption to Hydrophobic Zeolite Y: Salt Effects and Application to Protein Fractionation., *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 18, 311-20, (1993).
- GONÇALVES A.P.V.**, Lopes J.M., Lemos F., Ramôa R. F., Prazeres D.M.F., Cabral J.M.S., Aires-Barros M.R., Zeolites as Supports for Enzymatic Hydrolysis Reactions. Comparative Study of Several Zeolites, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1, 53-60, (1996).
- GORADIA D., Cooney J., Hodnett B.K., Magner E., The Adsorption Characteristics, Activity and Stability of Trypsin onto Mesoporous Silicates, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32, 231-239, (2005).
- GORIUSHKINA T.B., Akata Kurç B., Sacco Jr. A., Dzyadevych S.V., Application of Zeolites for Immobilization of Glucose Oxidase in Amperometric Biosensors, *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*, 1, 36-42, (2010).
- HU Y.Y., Zhang Y.H., Ren N., Tang Y., Crystal Plane- and Size-Dependent Protein Adsorption on Nanozeolite, *Journal of Physical Chemistry C*, 113, 18040- 18046, (2009).
- ÖZTÜRK S., Akata B., Oriented Assembly and Nanofabrication of Zeolite A Monolayers, *Microporous and Mesoporous Materials*, 126, 228-233, (2009).

- JAFFREZIC-RENAULT N., Dzyadevych S.V., Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring, *Sensors*, 8, 2569-2588, (2008).
- KEETING, P. E., Oursler, M. J., Wiegand, K. E., Bonde, S. K., Spelsberg, T. C., Riggs B. L., Zeolite A Increases Proliferation, Differentiation and TGF-beta Production in Normal Adult Human Osteoblast-like Cells in Vitro, *Journal of Bone and Mineral Research*, 7, 1281-1289 (1991).
- KİRDECİLER S.K., Soy E., Öztürk S., Kucherenko I., Soldatkin O., Dzyadevych S., Akata B., A Novel Urea Conductometric Biosensor Based on Zeolite Immobilized Urease, *Talanta*, 85, 1435-1441, (2011).
- LEE C.H., Lang J., Yen C.W., Shih P., Lin T.S., Mou C.Y., Enhancing Stability and Oxidation Activity of Cytochrome c by Immobilization in the Nanochannels of Mesoporous Aluminosilicates, *Journal of Physical Chemistry B*, 109, 12277- 12286, (2005).
- LEE J.S., Kim J.H., Lee Y.J., Jeong N.C., Yoon K.B., Manual Assembly of Microcrystal Monolayers on Substrates, *Angewandte Chemie*, 46, 3087-3090, (2007).
- LI J., Calzaferri G., Copper-zeolite-modified Electrodes: An Intrazeolite Ion Transport Mechanism, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 377, 163-175, (1994).
- LIU B., Yan F., Kong J., Deng J., Reagentless Amperometric Biosensor Based on the Coimmobilization of Horseradish Peroxidase and Methylene Green in a Modified Zeolite Matrix, *Analytica Chimica Acta*, 386, 31-39, (1999).
- MARK C.L., Tsapatsis M., Preferentially Oriented Submicron Silicalite Membranes, *AIChE Journal*, 42, 3020-3029, (1996).
- MARKO-VARGA G., Burestedt E., Svensson C.J., Emnéus J., Gorton L., Ruzgas T., Lutz M., Unger K.K., Effect of HY-Zeolites on the Performance of Tyrosinase-Modified Carbon Paste Electrodes, *Electroanalysis*, 8, 1121-1126, (1996).
- MIYAHARA M., Vinu A., Ariga K., Adsorption Myoglobin Over Mesoporous Silica Molecular Sieves: Pore Size Effect and Pore-filling Model, *Materials Science and Engineering C*, 27, 232-236, (2007).
- MORTIER V.J., Zeolite Electronegativity Related to Physicochemical Properties, *Journal of Catalysis*, 55, 138-145, (1978).
- NARASIMHARAO K., Hartmann M., Thiel H.H., Ernst S., Novel Solid Basic Catalysts by Nitridation of Zeolite Beta at Low Temperature, *Microporous and Mesoporous Materials*, 90, 377-383, (2006).
- PECKAR T.W., Tsapatsis M., Marand E., Davis R., Preparation and characterization of a glassy fluorinated polyimide zeolite-mixed matrix membrane, *Desalination*, 146, 3-9, (2002).
- PETRUSHKOV, A., Intra, J., Graham, J. B., Larsen, S.C., Salem, A. K., Effect of Crystal Size and Surface Functionalization on the Cytotoxicity of Silicalite-1 Nanoparticles, *Chemical Research in Toxicology*, 22, 1359-1368 (2009).
- RABOLLI, V., Thomassen, L. C. J., Uwambayinema, F., Martens, J. A., The Cytotoxic Activity of Amorphous Silica Nanoparticles is Mainly Influenced by Surface Area and not by Aggregation, *Toxicology Letters*, 206, 197-203 (2011).
- RAVISHANKAR R., Kirschhock C.E.A., Gerrits P.P.K., Feijen E.J.P., Grobet P.J., Vanoppen P., Schryver F.C., Mieke G., Fuess H., Schoeman B.J., Jacobs P.A., Martens J.A., Characterization of Nanosized Material Extracted from Clear Suspensions for MFI Zeolite Synthesis, *Journal of Physical Chemistry B*, 103, 4960-4964, (1999).
- SOY E., Pyeshkova V., Arkhypova V., Khadro B., Jaffrezic-Renault N., Sacco Jr. A., Dzyadevych S. V., Akata B., Potentialities Of Zeolites For Immobilization Of Enzymes In Conductometric Biosensors, *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*, 1, 28-35, (2010).
- SOY E., Arkhypova V., Soldatkin O., Shelyakina M., Dzyadevych S., Warzywoda J., Sacco Jr. A., Akata B., Investigation of characteristics of urea and *butyrylcholine chloride* biosensors based on ion-selective field-effect transistors modified by the incorporation of heat-treated zeolite Beta crystals, *Materials Science and Engineering C*, kabul edildi (2012).

- TAVOLARO A., Tavolaro P., Drioli E., Zeolite Inorganic Supports for BSA Immobilization: Comparative Study of Several Zeolite Crystals and Composite Membranes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 55, 67-76, (2007).
- TAVOLARO P., Tavolaro A., Martino G., Influence of Zeolite PZC and pH on the Immobilization of Cytochrome c: A Preliminary Study Regarding the Preparation of New Biomaterials, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 70, 98-107, (2009).
- THIAN, E. S., Ahmad, Z., Huang, J., Edirisinghe, Jayasinghe, S. N., Ireland, D. C., Brooks, R. A., Rushton, N., Bonfiels, W., Best, S. M., The Role of Surface Wettability and Surface Charge of Electrosprayed Nanoapatites on Behaviour of Osteoblasts, *Acta Biomaterialia*, 6, 750-755 (2010).
- THOMASSEN L.C.J., Aerts A., Rabolli V., Lison D., Gonzalez L., Kirch-Volders M., Napierska, D., Hoet, P. H., Kirschhock, C. E. A., Martens, J. A., Synthesis and Characterization of Stable Monodisperse Silica Nanoparticle Sols for in Vitro Cytotoxicity Testing, *Langmuir*, 26, 1, 328-335 (2010).
- VERTEGEL A.A., Siegel R.W., Dordick J.S., Silica Nanoparticle Size Influences the Structure and Enzymatic Activity of Adsorbed Lysozyme, *Langmuir*, 20, 6800-6807, (2004).
- WANG J., Martinez T., Accumulation and Voltammetric Measurement of Silver at Zeolite-containing Carbon-paste Electrodes, *Analytica Chimica Acta*, 207, 95-102, (1988).
- WANG L., Qi T., Zhang Y., Chu J., Morphosynthesis Route to Large pore SBA-15 Microspheres, *Microporous and Mesoporous Materials*, 91, 156-160, (2006).
- WANG** Y., Caruso F., Mesoporous Silica Spheres as Supports for Enzyme Immobilization and Encapsulation, *Chemistry of Materials*, 17, 953-961, (2005).
- WALCARIUS A., Analytical Applications of Silica-Modified Electrodes-A Comprehensive Review., *Electroanalysis*, 10, 1217-1235, (1998).
- WALCARIUS A., Zeolite-modified Electrodes in Electroanalytical Chemistry, *Analytica Chimica Acta*, 384, 1-16, (1999).
- YANG, C., Huang, L., Shen, T., Yeh, J. A., Cell Adhesion, Morphology and Biochemistry on Non-topographic Oxidized Silicon Surfaces, *European Cells and Materials*, 20, 415-430 (2010).
- YIU H.H.P., Wright P.A., Botting N.P., Enzyme Immobilisation Using Siliceous Mesoporous Molecular Sieves, *Microporous and Mesoporous Materials*, 44-45, 763-768, (2001).
- YOO** K., Smirniotis P. G., The Influence of Si/Al Ratios of Synthesized Beta Zeolites for the Alkylation of Isobutane with 2-butene, *Applied Catalysis A: General*, 227, 171-179, (2002).
- ZHANG X., Lai E.S.M., Martin-Aranda R., Yeung K.L., An investigation of Knoevenagel condensation reaction in microreactors using a new zeolite catalyst, *Applied Catalysis A: General*, 261, 109-118, (2004).
- ZHU G., Qiu S., Yu J., Sakamoto Y., Xiao F., Xu R., Terasaki O., Synthesis and Characterization of High-Quality Zeolite LTA and FAU Single Nanocrystals, *Chemistry of Materials*, 10, 1483-1486, (1998).

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

| |
|---|
| Proje No: 108M576 |
| Proje Başlığı: Zeolit İnce Filmlerinin Biyosensör Uygulamalara Yönelik Olarak Hazırlanması ve Araştırılması |
| Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Yürütücü: Doç. Dr. Burcu Akata Kurç Araştırmacı: Prof. Dr. Hayrettin Yücel |
| Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Mikro ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı Merkez Laboratuvar Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 06531, Ankara |
| Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: |
| Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/03/2009 – 01/03/2012 |
| Öz (en çok 70 kelime) Protein-nanomalzeme ilişkisinin daha ayrıntılı anlaşılmasıyla, ileri biyoteknolojik araştırmalarda kullanılmak üzere, istenilen uygulamaya göre fiziksel ve kimyasal değişikliklerin yapılabildiği ideal yüzeylerin üretilmesi mümkündür. Kendisine özgü pek çok özellikleri sebebiyle zeolit ve zeo-tip malzemeler, literatürde bu amaçla sıkça kullanılan inorganik malzemeler arasındadır. Bu proje kapsamında, değişik özelliklere ve yapılaraya sahip zeolit ve silikalit örnekleri sentezlenmiş, karakterize edilmiş, kondüktometrik biyosensörlere ve iyon seçici alan etkili transistörlere entegre edilerek alınan sonuçlar değerlendirilmiştir. |
| Anahtar Kelimeler: Zeolit, biyosensör, ince film, immobilizasyon, yüzey modifikasyonu, mikrofabrikasyon. |
| Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır. |
| Projeden Yapılan Yayınlar: |

- S. Öztürk, B. Akata. "Oriented Assembly and Nanofabrication of Zeolite A Monolayers", *Microporous and Mesoporous Materials*, 126 (2009) 228-233.
- S. Galioğlu, M. N. Ismail, J. Warzywoda, A. Sacco Jr., B. Akata, "Preparation and Characterization of Oriented Titanosilicate ETS-10 Thin Films on Indium Tin Oxide Surfaces", *Microporous and Mesoporous Materials*, 131 (2010) 401-406.
- S. K. Kirdeciler, E. Soy, S. Ozturk, I. Kucherenko, O. Soldatkin, S. Dzyadevych, B. Akata, "A novel urea conductometric biosensor based on zeolite immobilized urease", *Talanta* 85 (2011) 1435-1441.
- Esin Soy, Viktoriya Pyeshkova, Valentyna Arkhypova, Basma Khadro, Nicole Jaffrezic-Renault, Albert Sacco Jr., Sergei V. Dzyadevych, Burcu Akata Kurç, "Potentialities of Zeolites for Immobilization of Enzymes in Conductometric Biosensors", *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*, 1 (2010) 28-35.
- T. Goriushkina, Burcu Akata Kurç, Albert Sacco Jr., Sergei V. Dzyadevych, "Application of Zeolites for Immobilization of Glucose Oxidase in Amperometric Biosensors", *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*, 1 (2010) 36-42.
- Esin Soy, Valentyna Arkhypova, Oleksandr Soldatkin, Margarita Shelyakina, Sergei Dzyadevych, Juliusz Warzywoda, Albert Sacco Jr., Burcu Akata, "Investigation of characteristics of urea and *butyrylcholine chloride* biosensors based on ion-selective field-effect transistors modified by the incorporation of heat-treated zeolite Beta crystals", *Materials Science and Engineering C*, kabul edildi.

Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliđi Taşıdığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.

Ekler

Proje kapsamında yapılan bilimsel yayınlar ve aktiviteler

Ek1. Yayın (SCI Science Citation core indeksli dergi)

- S. Öztürk, B. Akata. "Oriented Assembly and Nanofabrication of Zeolite A Monolayers", *Microporous and Mesoporous Materials*, 126 (2009) 228-233.
- S. Galioğlu, M. N. Ismail, J. Warzywoda, A. Sacco Jr., B. Akata, "Preparation and Characterization of Oriented Titanosilicate ETS-10 Thin Films on Indium Tin Oxide Surfaces", *Microporous and Mesoporous Materials*, 131 (2010) 401-406.
- S. K. Kirdeciler, E. Soy, S. Ozturk, I. Kucherenko, O. Soldatkin, S. Dzyadevych, B. Akata, "A novel urea conductometric biosensor based on zeolite immobilized urease", *Talanta* 85 (2011) 1435-1441.

Ek2. Diğer yayınlar

- Esin Soy, Viktoriya Pyeshkova, Valentyna Arkhypova, Basma Khadro, Nicole Jaffrezic-Renault, Albert Sacco Jr., Sergei V. Dzyadevych, Burcu Akata Kurç, "Potentialities of Zeolites for Immobilization of Enzymes in Conductometric Biosensors", *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*, 1 (2010) 28-35.
- T. Goriushkina, Burcu Akata Kurç, Albert Sacco Jr., Sergei V. Dzyadevych, "Application of Zeolites for Immobilization of Glucose Oxidase in Amperometric Biosensors", *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*, 1 (2010) 36-42.

Ek3. Uluslararası kongreler

- S. Öztürk, B. Akata, "Nanofabrication of Zeolite Monolayers for Potential Biosensor Applications", *EUROSENSORS 09* (2009), Sözlü Sunum.
- S. Galioğlu, B. Akata, "Structural Characterization of Titanosilicate ETS-10", Uluslararası Multifunctional, *Hybrid and Nanomaterials Konferansı*, Strasburg, Fransa, (Mart 2011), Sözlü Sunum.
- S. Galioğlu, B. Akata, "Structural Characterization of Silver NPs Modified Titanosilicate ETS-10", *Uluslararası MRS Konferansı*, Boston, USA, (Kasım 2011), Poster Sunumu.
- S. K. Kirdeciler, E. Soy, S. Ozturk, I. Kucherenko, O. Soldatkin, S. Dzyadevych, B. Akata, "A Novel Urea Conductometric Biosensor Based on Zeolite Immobilized Urease", *Uluslararası MRS Konferansı*, Boston, USA, (Kasım 2011), Sözlü sunum.

Ek4. Kabul Edilmiş Yayınlar

- Esin Soy, Valentyna Arkhypova, Oleksandr Soldatkin, Margarita Shelyakina, Sergei Dzyadevych, Juliusz Warzywoda, Albert Sacco Jr., Burcu Akata, "Investigation of characteristics of urea and *butyrylcholine chloride* biosensors based on ion-selective field-effect transistors modified by the incorporation of heat-treated zeolite Beta crystals", *Materials Science and Engineering C*.

Ek5. Tez Abstract'ları

- **Seçkin Öztürk:** BİYOSENSÖR UYGULAMALARI İÇİN SİLİKON YÜZEY MODİFİKASYONLARI, (2010)
- **Sezin Galioğlu:** TİTANYUMSİLİKAT ETS-10'LERİN OLASI FOTOVOLTAİK UYGULAMALAR İÇİN SENTEZLENMESİ VE KARAKTERİZE EDİLMESİ (2010)

- **Salih Kaan Kırdeciler:** BİOSENSÖR UYGULAMALARI İÇİN İŞLEVSELLEŞTİRİLMİŞ YÜZEYLERİN HAZIRLANMASI (ODTÜ; Devam etmekte, Haziran 2012)
- **Esin Soy:** KONDÜKTOMETRİK VE İYON SEÇİCİ ALAN ETKİLİ TRANSİSTÖR TIPLI BİYOSENSÖR UYGULAMALARINDA KULLANILMAK ÜZERE PROTEİNLERİN ZEOLİT VE ZEOLİT BENZERİ MALZEMELER ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU, (2011)

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

| | |
|---|---|
| Proje Yürütücüsü: | Doç. Dr. BURCU AKATA KURÇ |
| Proje No: | 108M576 |
| Proje Başlığı: | Zeolit İnce Filmlerinin Biyosensör Uygulamalarına Yönelik Olarak Hazırlanması Ve Araştırılması |
| Proje Türü: | Araştırma |
| Proje Süresi: | 36 |
| Araştırmacılar: | HAYRİTTİN YÜCEL |
| Danışmanlar: | |
| Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: | ORTA DOĞU TEKNİK Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MİKRO VE NANOTEKNOLOJİ B. |
| Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: | 01/03/2009 - 01/03/2012 |
| Onaylanan Bütçe: | 189870.0 |
| Harcanan Bütçe: | 167370.0 |
| Öz: | <p>Zeolitler, yüzey elektrostatik ve elektrokimyasal özellikleri, Si/Al oranına bağlı olarak değiştirilebilen hidrofilik/hidrofobik özellikleri ile biyomoleküllerin bağlanabilmesi için oldukça uygun bir alana sahiptirler. Bu özellikler zeolitleri, proteinlerin bağlanması ve biyosensör cihazlarında kullanılmaları amacıyla alternatif birer malzeme haline getirmektedirler. Bu projenin asıl amacı, nanomalzemelerin, biyolojik bileşiklerin ve biyosensörlerdeki çevirici birimlerin birbirlerine ve dolayısıyla da nanomalzemelerin uygulamaya yönelik olarak cihazlara entegrasyonunu yaparak, sonuçta elde edilmiş entegre cihazda nanomalzemenin rolünün tartışılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda, farklı özellikteki zeolit ve zeo-tip malzemeler sentezlenmiş; bunlardan farklı nitelikte ince filmler elde edilmiş; zeolit nanoparçacıkları mikrofabrikasyon yöntemleriyle desenlendirilmiş; elde edilen ince filmlere biyolojik malzemelerin immobilizasyonu çalışılmış ve son olarak da farklı tipteki elektrokimyasal biyosensör verileri elde edilerek bu nanomalzemelerin biyosensörler için rolü ve önemi tartışılmıştır. Projenin birinci aşaması, homojen boyutlara ve farklı Si/Al oranlarına sahip mikron- ve nanoboyuttaki zeolit parçacıklarının sentezi ve sentezlenen malzemelerin farklı tekniklerle modifiye edilmesidir. Projenin sonuna kadar olan süre içerisinde bahsi geçen bütün zeolit malzemeleri başarıyla sentezlenmiş olup, gerek yapısındaki iyonların gerekse yüzey gruplarının değişimi ile yapılması planlanan modifikasyonlarda da istenilen sonuçlara ulaşılmıştır. Proje teklifinin ikinci kısmında ise, sentezlenmiş zeolitlerden SiO₂ üzerinde ince film yapımı çalışmaları yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, zeolitlerin şekil farklılıkları, boyut farklılıkları ve Si/Al oranlarındaki farklılardan dolayı değişiklik gösterecek hidrofilik-hidrofobik yüzey özellikleri gibi faktörlerin hem ince film yapım kalitesi üzerindeki etkileri, hem biyosensör olarak kullanım potansiyelleri hem de hücre bağlanması üzerine etkilerinin araştırılması gerçekleştirilmiştir. Proje teklifinin üçüncü aşaması, sentez çalışmaları sonucunda başarıya ulaşılmış tüm zeolit tozlarına ve onlardan oluşturulmuş ince filmler üzerine farklı biyolojik malzemelerin immobilizasyonu ve elde edilen entegre malzemelerden gerçek anlamda bir biyosensör verisi eldesidir. Projenin bir sonraki döneminde ise bir önceki dönem aktivitesi ölçülen biyosensörlerin çalışma stabilitesi, biyosensör ömürleri ve inhibisyon davranışları araştırılmış, geleneksel yöntemlerle alınan verilerle karşılaştırılmış ve alınan sonuçlar ilk defa çalışma grubumuz tarafından literatüre katılmıştır. Projenin son döneminde de elde edilen tüm verilerin ışığında mikrofabrikasyonu yapılmış farklı zeolit ince filmleri üzerinde osteoblast ve fibroblast tipi hücreler üretilmiş ve MTT testi yardımıyla hücre sayıları ölçülmüştür. SiO₂ üzerinde üretilen mikrodeseenler sayesinde, örnek üzerindeki zeolit miktarı doğrudan kontrol edilerek, zeolit miktarının hücrelerin tutunması ve çoğalması üzerindeki etkileri araştırılmıştır.</p> |
| Anahtar Kelimeler: | Zeolit, biyosensör, ince film, immobilizasyon, yüzey modifikasyonu, mikrofabrikasyon |
| Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?: | Hayır |