

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEDYATÖR BAĞLI MATRİKSLERİN
TYROSİNASE TABANLI
FENOL BİYOSENSÖRÜNE UYGULANMASI

Fuat DURSUN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

GEBZE
2009

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEDYATÖR BAĞLI MATRİKSLERİN
TYROSİNASE TABANLI
FENOL BİYOSENSÖRÜNE UYGULANMASI

Fuat DURSUN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Elif ERHAN

GEBZE
2009



**MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
JÜRİ ONAY FORMU**

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15.04.2009 tarih ve 2009/13... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 26.06.2009... tarihinde tez savunma sınavı yapılan Fuat DURSUN... 'un tez çalışması Geyve Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç.Dr.Elif ERHAN

ÜYE

: Prof.Dr.Bülent KESKİNLER

ÜYE

: Prof.Dr.Dilek KAZAN

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15.../06.../2009 tarih ve 2009.../13... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: Medyatör Bağlı Matrikslerin Tyrosinase Tabanlı Fenol Biyosensörüne Uygulanması

YAZAR ADI: Fuat DURSUN

Biyosensör teknolojileri Çevre Mühendisliğinde kullanılan izleme parametreleri arasında da hızla yerini almaktadır. Son yıllarda özellikle fenol ve türevlerinin daha güvenli, seçici, hassas ve hızlı ölçülmesi amacıyla fenol biyosensörlerinin geliştirilmesine yönelik literatürde çok sayıda çalışmaya rastlanmaktadır. Bu biyosensörler çalışma elektrotlarının ölçüm performansını artıracak şekilde çeşitli parametrelerin düzenlenmesiyle yeniden tasarlanmakta ve sonuçlar birbiriyle kıyaslanmaktadır. Amperometrik fenol biyosensörleri için geline nokta özellikle enzimin elektrot yüzeyine tutuklanmasını ve stabil bir çalışma elektrodu elde edilmesini sağlayan polimerik kompozit filmin tasarlanması başlıca çalışma alanıdır. Bu tez çalışmasında medyatör bağlı (vinilferrosen) 2 farklı polimer kullanılarak çalışma elektrotları tasarlanarak fenol ve türevlerinin ölçümünde denenmiştir. Kullanılan polimerler Poly(GMA-co-VFc) ve Poly(MTM-co-VFc)dir. 1. tip çalışma elektrodunda tyrosinase enzimi polimer üzerine kimyasal olarak bağlanmıştır. 2. tip elektrotta ise tyrosinase enzimi tiyofen ve polipirrol arasında oluşturulan kopolimer aracılığı ile tuzağa düşürülerek tutuklanmıştır. Hazırlanmış olan çalışma elektrotları kullanılarak geliştirilen biyosensörler kesikli sistemle işletilmiştir. Çalışma şartları optimize edilerek (pH, Potansiyel), çalışma elektrotları fenol ve türevleri için denenmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan fenol ve türevleri için gerekli kalibrasyon eğrileri çizilmiş, bu kalibrasyon eğrileri kullanılarak ölçüm analitik parametreleri olan hassasiyet, lineer aralık ve alt belirleme limitleri hesaplanmıştır. Analitik parametrelere göre biyosensörlerin performansı, ölçüm güvenilirliği, tartışılmıştır.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: Application of Mediator Bounded Matrix on Tyrosinase Based Phenol Biosensor

AUTHOR: Fuat DURSUN

Biosensor technologies rapidly take place at following parameters which is used in Environmental Engineering applications. Recently a lot of study are found on literature to detect phenol and phenol derivatives more confident, selective, sensitive and fast. These biosensors are re-designed with restoring various parameters to get more detection performance of working electrodes and the results are compared. At this point the goal is for amperometric phenol biosensors designing polymeric composite film which is supportive to get stable working electrode and entrap the enzyme (tyrosinase) on the surface of the electrode. At this study, phenol and phenol derivatives were detected with using two different mediator (vinylferrocene) bounded polymers. The polymers are Poly(GMA-co-VFc) and Poly(MTM-co-VFc). At the first working electrode tyrosinase was chemically bounded on Poly(GMA-co-VFc). On the other hand, at the second working electrode, tyrosinase was entrapped with a thiophene and polypyrrol copolymer. Working electrodes were operated at batch system. Working conditions (pH, potential) were optimized and the electrodes were tried for phenol and phenol derivatives' detection. For phenol and phenol derivatives, calibration curves were constructed and the sensitivity, linear range and detection limit which are the analytical parameters of biosensor were calculated from these calibration curves. The performance of biosensors and the reliability of the measurement were discussed.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda, bana her türlü imkanı sağlayan,engin bilgilerinden yararlandığım çok kıymetli hocam Doç Dr. Elif ERHAN’a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince, bana sonuna kadar destek olan ve hiçbir yardımı esirgemeyen, Arş. Gör. Şeyda ÖZÖNER’e bu teze katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her evresinde sevgi ve destekleriyle yanımda olan, kariyer yapmam konusunda beni yüreklerinden canım aileme teşekkürlerimi ve minnet duygularımı ifade etmek isterim.

Fuat DURSUN

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	İV
SUMMARY	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIII
1. GİRİŞ	1
2. ENZİMLERE GENEL BAKIŞ	6
2.1. Enzimlerin Yapısı ve İşleyişi	6
2.2. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması	8
3. BİYOSENSÖRLER	9
3.1. Biyosensörlerin Çalışma Prensibi	12
3.2. Elektrokimyasal Sensörler	13
3.2.1. Potansiyometrik Sensörler	13
3.2.2. Amperometrik Sensörler	15
3.3. Enzim İmmobilizasyon Metotları	20
3.3.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri	21
3.3.1.1. Kovalent Bağlama	22
3.3.1.2. Adsorpsiyon	23
3.3.1.3. İyonik Bağlama	25
3.3.1.4. Şelat Bağlama	25
3.3.1.5. Biyospesifik Bağlama	26
3.3.2. Çapraz Bağlama Yöntemleri	26
3.3.3. Kopolimerizasyon Yötenleri	27
3.3.4. Tutuklama Yöntemleri	28
3.3.4.1. Polimer Matrikste Tutuklama	28
3.3.4.2. Mikrokapsülleme	30

3.4. Biyosensörde Ölçüm Metodu İçin Gerekli Analitik Hesaplamalar	31
3.4.1. Kalibrasyon Eğrisinin Lineerliği	31
3.4.2. Cevap Süresi	32
3.4.3. Belirleme Limiti	33
3.4.4. Ölçüm Metodunun Güvenilirliği (Stabilite)	33
3.4.5. Hasasiyet	34
3.5. Enzim Tabanlı Fenol Biyosensörleri	35
4. KOMPOZİT ÇALIŞMA ELEKTRODU TASARIMINDA KULANILAN BAZI MATRİKSLER	42
4.1. Polimerlerin Biyosensör Uygulamalarında Kullanımı Ve İletkenliklerin Metallerle Karşılaştırılması	42
4.1.1. Medyatör Bağlı Polimerler	48
4.2. Poligluteraldehit ve Biyosensör Uygulamalarında Kullanımı	50
5. MATERYAL – METOD	54
5.1. Materyal	54
5.1.1. Kullanılan Kimyasallar	54
5.1.2. Çalışma Sistemi	55
5.2. Metot	56
5.2.1. Bradford Protein Analizi	56
5.2.2. İmmobilize Enzim Miktarının Belirlenmesi	57
5.2.3. Enzim Kinetiği- Akıma Göre Modifiye Edilmiş Michealis-Menten Eşitliği ve I_M - K_M Parametrelerinin Belirlenmesi	58
5.2.4. Çözeltilerin Hazırlanması	61
5.2.5. Poly(GMA-co-VFC)/Tyr/PGA/PPy/GC Çalışma Elektrodunun Hazırlanması	62
5.2.6. Poly(MTM-co-VFC)/Tyr/PPy/GC Çalışma Elektrodunun Hazırlanması	63
5.3. Biyosensör Çalışmaları	64
5.3.1. Potansiyel	65
5.3.2. pH	65
6. BULGULAR VE TARTIŞMA	66
6.1. İmmobilize Enzim Miktarı	66
6.2. I_M - K_M Parametrelerinin Belirlenmesi	67

6.3. Poly(GMA-co-VFC)/Tyr/PGA/PPy/GC Çalışma Elektrodu Bulguları	69
6.4. Poly(MTM-co-VFC)/Tyr/PPy/GC Çalışma Elektrodu Bulguları	80
7. SONUÇLAR	89
KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ	98

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Tyr	Tyrosinase Enzimi
PPy	Polipirol
GC	Cam Karbon Elektrot
LOD	Belirleme Limiti
PGA	Poligluteralehit
MTM-co-VFc	Metiltiyonilmetakrilat-ko-vinilferrosen
GMA-co-VFC	Glisin Metakrilat-ko-vinilferrosen
CV	Dönüşümlü Voltametri
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
DMF	Dimetil formamid
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
S	Substrat Konsantrasyonu
DCM	Diklorometan
V	Spesifik Aktivite
V _m	Maksimum Hız
K _m	Yarı Doygunluk Sabiti (Michealis-Menten)
S ₀	Başlangıç Substrat Konsantrasyonu
EPA	Environmental Protection Agency
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografi
CE	Elektrokimyasal Kapiler Elektroforez
GC	Gaz Kromatografisi
MS	Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometri
MIP-ES	Mikrodalga İndüklenmiş Plazma Emsiyon Spektroskopisi
E	Enzim Konsantrasyonu
P	Ürün Konsantrasyonu
ES	Enzim-Substrat Kompleksi
I _M	Maksimum Akım

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Fenolün Moleküler Yapısı	1
1.2. Tyrosinase Enzimi ile Fenol Arasındaki Etkileşim	4
2.1. Anahtar-Kilit Modeli	7
3.1. Bir Biyosensörün Şematik Gösterimi	10
3.2. Potansiyometrik Gaz Probu	14
3.3. Amperometrik Esaslı Biyosensör Sistemi	15
3.4. Kovalent Bağlama	23
3.5. Adsorpsiyon	24
3.6. İyonik Bağlama	25
3.7. Çapraz Bağlama	27
3.8. Polimer Matrikste Tutuklama	30
3.9. Mikrokapsülleme	30
3.10. Kalibrasyon Eğrisinin Lineerliği	31
3.11. Cevap Süresi	32
3.12. Stabilite	33
3.13. Hassasiyet	34
4.1. Konjuge Çift Bağ	43
4.2. İletken Polimerler	45
4.3. Bir Polipirol Filminin Elektrokimyasal Olarak İndirgenmesine ve Yükseltgenmesine Ait Şematik Gösterim	46
4.4. Poly(GMA-co-VFc)'nin Sentezi	48
4.5. Poly(MTM-co-VFc)'nin Sentezi	49
4.6. Gluteraldehitin Polimerizasyon Reaksiyonu	51
4.7. Poligluteraldehit Kullanarak Enzim İmmobilizasyon Mekanizması	52
5.1. Çalışma Sistemi	55
5.2. Protein Kalibrasyon Eğrisi	57
5.3. Pirolün Polimerizasyonu İçin Hazırlanan Reaksiyon Ortamı	62
5.4. Pirol ve Tyrosinase Polimerizasyonu İçin Hazırlanan Reaksiyon Ortamı	63
5.5. Çalışma Hücreleri	64

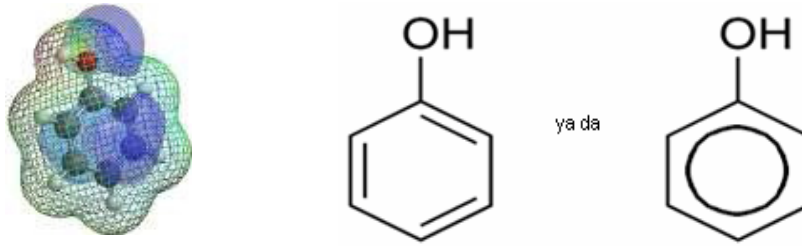
6.1.	4-metoksifenol için Lineweaver-Burk Eğrisi	67
6.2.	Fenol için Lineweaver-Burk Eğrisi	68
6.3.	Poly(GMA-co-VFC)/Tyr/GC CV	69
6.4.	Poly(GMA-co-VFC)/Tyr/PGA/PPy/GC CV ve Poly(GMA-co-VFC)/Tyr/Py/GC CV	69
6.5.	Potansiyel-Akım İlişkisi	70
6.6.	pH Etkisi	71
6.7.	4-metoksifenol Akım-Zaman Grafiği	73
6.8.	4-metoksifenol Kalibrasyon Eğrisi	73
6.9.	m-kresol Akım-Zaman Grafiği	74
6.10.	m-kresol Kalibrasyon Eğrisi	74
6.11.	Katekol Akım-Zaman Grafiği	75
6.12.	Katekol Kalibrasyon Eğrisi	75
6.13.	Fenol Akım-Zaman Grafiği	76
6.14.	Fenol Kalibrasyon Eğrisi	76
6.15.	Pirokatekol Akım-Zaman Grafiği	77
6.16.	Pirokatekol Kalibrasyon Eğrisi	77
6.17.	Poly(GMA-co-VFC)/Tyr/PGA/PPy/GC Çalışma Elektrodunun Farklı	79
6.18.	Fenol Bileşikleri İçin Kalibrasyonlarının Karşılaştırılması Poly(MTM-co-VFC)/Tyr/PPy/GC ve Poly(MTM-co-VFC)/ GC CV	81
6.19.	Potansiyel-Akım İlişkisi-2	81
6.20.	pH Etkisi-2	82
6.21.	Katekol Akım-Zaman Grafiği-2	84
6.22.	Katekol Kalibrasyon Eğrisi-2	84
6.23.	Pirokatekol Akım-Zaman Grafiği-2	85
6.24.	Pirokatekol Kalibrasyon Eğrisi-2	85
6.25.	2-6 dimetoksifenol Akım-Zaman Grafiği-2	86
6.26.	2-6 dimetoksifenol Kalibrasyon Eğrisi-2	86
6.27.	Poly(MTM-co-VFC)/Tyr/PPy/GC Çalışma Elektrodunun Farklı Fenol Bileşikleri İçin Kalibrasyonlarının Karşılaştırılması	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Enzim Sınıfları	8
3.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemlerinin Sınıflandırılması	21
3.2. Enzimin Bağlanmasını Sağlayan Fonksiyonel Gruplar	22
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	54
6.1 I_M ve K_M Değerleri	68
6.2. Poly(GMA-co-VFC)/Tyr/PGA/PPy/GC Çalışma Elektrodu İçin Analitik Parametreler	79
6.3. Poly(MTM-co-VFC)/Tyr/PPy/GC Çalışma Elektrodu İçin Analitik Parametreler	88

1.GİRİŞ

Benzen hidrojenlerinden biri veya birkaçı yerine hidroksil (OH) gruplarının girmesiyle türeyen bileşiklere fenoller denir. Fenol, karbolik asit veya hidroksil benzen de denilen, çok yönlü organik bir bileşiktir. Benzen molekülünden bir hidrojen çıkarılmasıyla geriye kalan köke (C_6H_5) alkil ismine izafeten "Fenil" ismi verilir. Basit fenoller maden kömürü katranından elde edilirse de bugün ucuz olarak benzenden sentez edilmektedir. Fenollerin değeriği moleküllerindeki (OH) sayısına bağıdır. Fenollerin en basiti Fenik asit (C_6H_5OH) dir. İsmine sadece "fenol" de denir. Saf halde renksizdir. Dezenfektan olarak kullanılır.



Şekil 1.1.Fenolün Moleküler Yapısı.

Fenol, en önemli endüstriyel atıksu içeriklerinden biridir. Fenolik atıklar kok ve petrol rafinelerindeki üretim sırasında ortaya çıkmaktadır. Ayrıca plastik ve sentetik reçine, tekstil, kimya ve boya endüstri atıksuları da istenmeyen derişimlerde fenol içermektedir. Fenol içeren atık suların diğeri kaynakları arasında orlon üretim tesisleri, yağ rafinerileri, patlayıcı üretim tesisleri, kağıt üretim tesisleri, kostik havalı temizleyiciler, azot işleri, fiberglas üretimi, dökümhaneler ve kullanılmış kauçukların geri kazanıldığı tesisler gösterilebilir. Aynı zamanda nadir de olsa evsel atık sularda da görülür.

Fenol ve bağı fenoller çevre kirlenmesi açısından önemli yer tutmaktadır. Pek çok fenol bileşiği biyolojik sistemler üzerinde zehirli ve tehlikeli etkiye sahip olup sular vasıtasıyla besin zincirine girmektedir. Fenollerin 1 ppb'den düşük seviyeleri bile suyun tat ve koku özelliklerini değiştirebilmektedir. Fenol, yüksek toksisiteye, yüksek oksijen ihtiyacına (2,4 mg O₂/ mg fenol) sahip, biyolojik olarak ayrışabilir bir kirleticidir. 2 mg/L'nin üstündeki konsantrasyonlarda balıklara toksik etki yapar, 10-100 mg/L konsantrasyonları arasında da sucul yaşamın ölümüne neden olur. İçme sularında ve besin endüstrisi sularında fenolün varlığı suyun tadını bozar. Fenol içeren su klorlandığında zehirli poliklorlu fenoller oluşur. EPA (Enviromental Protection Agency) yüzey sularının 1 ppb'den az fenol içerebileceğini belirtmektedir. Fenolün sularda bulunmasına müsaade edilen maksimum konsantrasyonu Su Kirliliği Kontrol Yönetmeliği'ne göre kanalizasyon sistemleri tam arıtma ile sonuçlanan atık su alt yapı tesislerinde 20 mg/L, deniz deşarjı ile sonuçlanan sistemlerde 10 mg/L'dir.

Fenoller doğal membran yapısına kolaylıkla nüfuz ederek genotoksik, mutajenik ve hepatoksik etkiler göstermekte, respirasyon ve fotosentezin kataliz mekanizmasını olumsuz yönde etkilemektedir. Tüm bu nedenlerle fenollerin çevre açısından bulundukları ortamda miktarlarının ve yerine göre türünün belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Fenollerin kantitatif analizi için kullanılan başlıca standart metotlar yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC), elektrokimyasal kapiler elektroforez (CE), spektrometrik kağıt elektroforezi, ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi (GC), gaz kromatografisi kütle spektrometri metodu (MS), UV ölçümlü ince tabaka kromatografisi ve mikrodalga indüklenmiş plazma emisyon spektroskopisi (MIP-ES) teknikleridir. Ayrıca söz konusu tekniklerin çevre numunelerinde doğrudan kullanılmaları da mümkün olmamaktadır.

Çevre konularını ilgilendiren ölçümlerde fenol bileşikler numuneler içerisinde genellikle iz seviyede ve oldukça karışık halde bulunduklarından numuneler cihazlara alınmadan önce çeşitli ekstraksiyon, temizleme ve seyreltme aşamalarından geçirilmektedir. Bu işlemler zaman alıcı ve zahmetlidir ancak duyarlı değildir.

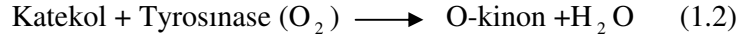
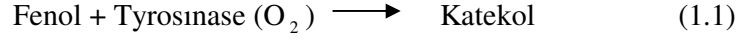
Bu nedenle fenollerin kantitatif ölçümleri için daha güvenilir, daha duyarlı, seçici ve hızlı ölçüm yapabilen biyosensörler geliştirilmektedir.

Enzimler hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden proteinlerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler artık çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata girmişlerdir. Pekçok endüstriyel, analitik ve klinik proseslerde enzimler substrat çözeltisi ile karşılaştırılırlar ve ürüne dönüştürüldükten sonra ekonomik olarak geri kazanılamazlar. Enzimlerin sadece bir kere kullanılmaları, pahalı olmaları nedeni ile büyük masraflara neden olmaktadır. Bu nedenle immobilize olarak defalarca kullanılmaları ekonomik olarak daha makul olmakla birlikte enzimatik prosesler sürekli olarak da yapılabilmektedir. Günümüzde çok sayıda immobilize enzim endüstride ve arıtımda kullanılmaktadır.

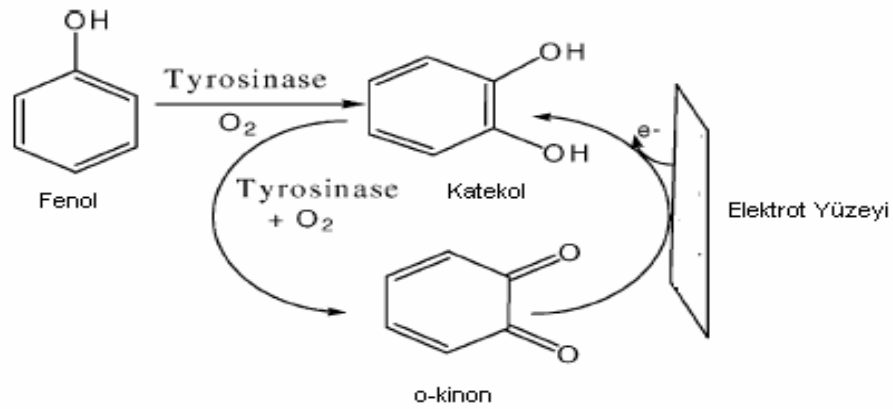
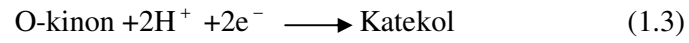
Biyomühendislik ve biyoteknolojideki dinamik gelişmeler, atıksu ortamlarındaki substrat konsantrasyonlarının hızlı ve güvenilir olarak belirlenebilmesi ve izlenebilmesi açısından imkan sağlamaktadır. Enzim tabanlı ölçüm sistemlerinin yüksek seçiciliği, kesikli yüklemeli sistemlerin avantajlarıyla birleşerek atıksu ortamlarında ölçümü istenen substratlar için hızlı ve güvenilir bir proses izlemesi sağlar. Bu amaçla, *tyrosinase*, *laccase* ve *peroxidase* enzimleri amperometrik ve potansiyometrik sensör sistemlerinde yaygın olarak kullanılır. Sensör sistemleri, içerdikleri biyokomponentler sayesinde hızlı ve güvenilir ölçümler sağlar, taşınabilir ve pratik sistemlerdir. Kirleticinin yerinde izlenebilmesi için rahatlıkla kullanılabilirler ve ölçümleri basittir.

Tyrosinase, elmada, mantarda ve patatesta bulunur, meyvelere koyu renk verir (Bevilaqua et al. 2002). Bakır içeren bir enzim olup, aktif bölgesinde prostetik gruba sahiptir (Mai et al. 2002). Enzim, reaksiyonlar tamamlandıktan sonra moleküler oksijen tarafından oksitlenerek doğal haline geri döner (Nistor et al. 1999).

Tyrosinase, fenolik bileşikleri katalizleyen oksidoredüktaz (yükseltgenme-indirgenme tepkimelerini katalizleyen enzim sınıfı) sınıfı bir enzimdir. Kataliz mekanizması, ardışık iki reaksiyonla olur:



o-kinonlar, herhangi bir elektron transfer aracısı olmaksızın aşağıda verilen eşitliğe göre düşük potansiyellerde o-difenollere indirgenebilirler.



Şekil 1.2. Tyrosinase Enzimi ile Fenol Arasındaki Etkileşim.

Bu çalışmada Çevre Mühendisliği açısından önemli bir parametre olan fenol ve türevlerinin ölçümünde, Tyrosinase tabanlı fenol biyosensörüne medyatör bağlı matriksler yerleştirilerek ölçüm parametreleri hesaplanmıştır. Çalışma elektrotları, ferrosin medyatörünün polimerik matrikslere kimyasal olarak bağlandığı polimerler kullanılarak hazırlanmıştır. Tyrosinase enzimi medyatör matriks üzerindeki aktif epoksi grupları üzerine kimyasal olarak bağlanmış ayrıca tiyofen grupları üzerine elektropolimerizasyonla tutuklanmıştır.

Elde edilen çalışma elektrotlarında aynı zamanda çeşitli iletken polimerler kullanarak biyosensörün ölçüm stabilitesinin yükseltilmesi hedeflenmiştir. Çalışma sonunda elde edilen elektrotlar için kalibrasyon eğrileri üretilmiş, bu eğrilerden fenol ve bazı fenol türevleri için başlıca biyosensör parametreleri hassasiyet, lineer aralık ve alt belirleme limitleri hesaplanmıştır. Ayrıca elektrot yüzeyinde immobilize olan enzim miktarı belirlenmiş, enzim kinetiği parametreleri olan I_M , K_M değerleri hesaplanmıştır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerde amperometrik ölçüm metodu kullanılmıştır. Kesikli deney düzeneğinde çalışılmıştır. Deneysel çalışmalarda; akımı etkilediği düşünülen çeşitli iletken polimerler ve maddeler kullanılmıştır.

2. ENZİMLERE GENEL BAKIŞ

2.1. Enzimlerin Yapısı ve İşleyişi

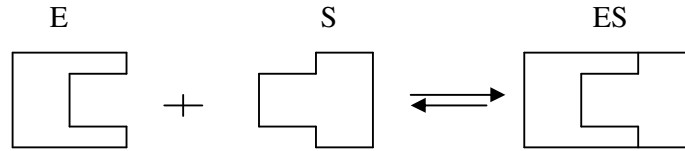
Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörler olarak tanımlanırlar. Bir başka deyişle, enzimler katalitik aktivite gösteren proteinlerdir. Her biyolojik dönüşüm bir enzim tarafından katalizlenir. Özgül, geniş kullanım alanlı ve oldukça etkin biyokatalistler olup, kimyasal katalistlere kıyasla çok daha hızlı tepkime verirler. Yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle enzimlere ilişkin tüm nitelik ve özellikleri bir bütün olarak inceleyen enzimoloji bilim dalı, başta biyokimya ve moleküler biyoloji olmak üzere fizikokimya, bakteriyoloji, mikrobiyoloji, genetik, botanik, tarım, farmakoloji, toksikoloji, patoloji, fizyoloji, tıp, mühendislik, biyoteknoloji gibi bilim dalları ile çeşitli endüstriyel alanlar için büyük önem taşımaktadır.

Tüm enzim proteinleri genler tarafından şifrelenir. Dolayısıyla amino asit dizilimi kendine özgüdür. Bazı enzimler (pepsin ve üreaz gibi) yalnız proteinden oluşmuştur. Fakat diğer çoğunluğu iki farklı kısımdan meydana gelmiştir. Bunlar;

- Protein kısmı (enzimin apoenzim kısmı), enzimin hangi maddeye etki edeceğini saptar.
- Koenzim kısmı, organik ya da inorganik, çok defa fosfattan meydana gelmiş, protein kısmına göre çok daha küçük molekülli bir kısımdır. Enzimde işlev gören ve esas iş yapan kısım bu kısımdır.

Koenzim kısmı metal iyonu ise (Ca^{++} , K^{++} , Mg^{+} , Zn^{++}) buna "kofaktör" denir. Enzimin etkinlik göstermesi için gereksinim duyduğu organik moleküllere "koenzim" denir. Bazı durumlarda koenzim kısmı apoenzim kısmına kuvvetlice (kovalent) bağlanmıştır.

Enzimin apoenzim kısmıyla substrat arasında bir ilişki vardır. Enzimler substrata bağlanarak katalizledikleri tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürür ve hızını arttırır. ES (enzim-substrat) kompleksi oluşur. ES kompleksindeki bağlar zayıf Vander Walls ya da hidrojen bağları olup, kompleks kararlı değildir. Substrat, enzimin "aktif kısım" denilen özgül bir kesimine bağlanır. Bu ilişkiye anahtar-kilit modeli adı verilir (Telefoncu, 1997).



Şekil 2.1. Anahtar-Kilit Modeli.

2.2. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Uluslararası Enzim Komisyonu'nun çalışmaları doğrultusunda adlandırmada 3 temel ilke göz önüne alınmıştır;

1. Enzimlerin isimleri –az son eki alırlar. Bu ilke sadece tek bir reaksiyonu katalizleyen enzimler için geçerlidir.
2. Enzimler katalizledikleri reaksiyona göre adlandırılır ve sınıflandırılır. Burada dikkate alınan enzimin katalizlediği reaksiyondur. Ara ürünler, kofaktör ya da prostetik gruplar isme dahil edilmez. Bu nedenle bir enzim katalizlediği reaksiyon tam anlamıyla tamamlanana kadar sistematik olarak isimlendirilemez.
3. Yapılan bir adlandırma, reaksiyonun geri dönüşlü olduğu deneysel olarak gösterilmiş olsa bile bütün enzim sınıflarında reaksiyonun sadece dikkate alınan yönünü ifade eder. Buna karşılık enzimlerin önerilen isimleri genelde ilgili reaksiyonların canlı ortamdaki yönlerini göz önüne almaktadır.

Enzimlerin katalizlediği 6 temel reaksiyon sınıfı vardır (Çizelge 2.1) (Telefoncu, 1997).

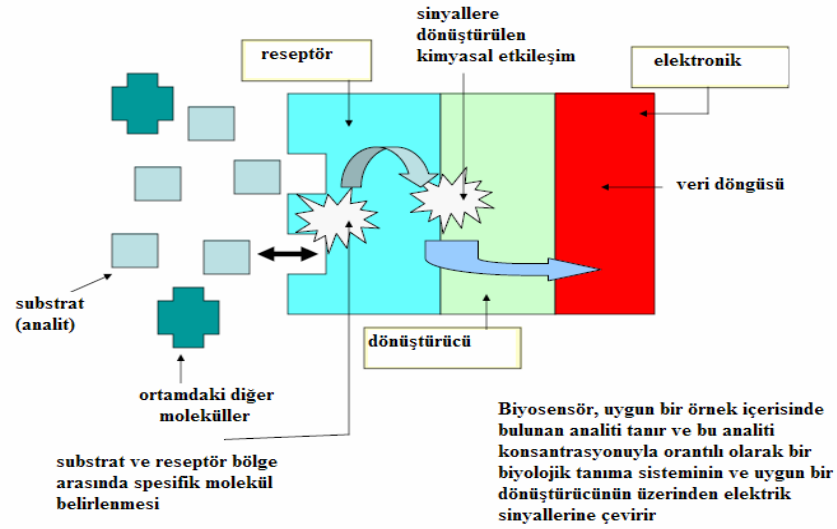
Çizelge 2.1. Enzim Sınıfları.

REAKSİYON TİPİ	ENZİM ADI
Yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları	Oksidoredüktazlar
Fonksiyonel grupların transferi	Transferazlar
Hidroliz reaksiyonları	Hidrolazlar
Çift bağlara ekleme	Liyazlar
İzomerizasyon reaksiyonları	İzomerazlar
ATP bölünmesiyle bağ oluşumu	Ligazlar

3. BİYOSENSÖRLER

Biyosensörler, ölçümü istenen bileşen (analit) ile uygun bir biyoajan (biyomolekül) arasındaki etkileşimin dönüştürücüler (transduser) yardımı ile elektrik sinyallerine dönüştürüldüğü ve bu sinyallerin elektronik yöntemlerle analit konsantrasyonu cinsinden ifade edildiği analitik cihazlardır. Biyosensör sistemleri genel olarak üç temel bileşenden oluşur. Bunlar, seçici tanıma mekanizmasına sahip biyoajan (biyomolekül), bu biyoajanın analit ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştüren çevirici (transduser) ve elektronik bölümler olarak sıralanabilir. Genel olarak bir biyosensörün ana elemanları Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Bu ana elemanların en önemlisi analite karşı son derece seçimli ve tersinir etkileşmeye sahip biyoajandır. Biyoajantar, biyoafinite ve biyokatalitik olmak üzere iki grupta toplanabilir. Biyoafinite ajanları (örneğin antikorlar) analitlerle kompleks oluşturarak analitin moleküler tanımlanmasında kullanılırlar. Bu kompleks oluşumu, tabaka kalınlığı, kırılma indisi ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal parametrelerin değişimine neden olur. Biyokatalitik ajanlar ise analitin molekül yapısında değişime neden olur ve bu dönüşüm sonucunda ortamda artan veya azalan madde miktarı takip edilerek değerlendirilir. Biyokatalitik ajan olarak enzimler, mikroorganizmalar, organlar, tüm hücreler, bitki veya hayvansal doku parçaları kullanılmaktadır.

Biyosensörün ikinci önemli elemanı çevirici kısımdır. Çeviriciler biyoajan-analit etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyallerin elektrik sinyallerine dönüştürüldüğü biyosensör elemanlarıdır.



Şekil 3.1. Bir Biyosensörün Şematik Gösterimi.

İlk biyosensör uygulamaları 1960 yıllarında tıp alanında başlamış ve günümüzde biyoteknoloji devriminin verdiği ivme ile birçok alanda kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Günümüzde biyosensörler klinik, teşhis, tıbbi uygulamalar, proses kontrol, biyoreaktörler, ilaç sanayi, madencilik, savunma sanayi, arıtım ve kontrol teknolojileri gibi birçok alanda çok yaygın kullanılmakta ve bu konularda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Hatta son yıllarda biyosensör kavram ve tanımlarında önemli değişme ve genişlemelere paralel olarak, algılama mekanizmaları (görme, işitme, koku alma, tat alma) ideal biyosensör olarak görülmekte ve bu mekanizmaların yapay olarak üretilmesi çalışmaları hızla devam etmektedir. Biyosensör sektörünün toplam satışları incelendiğinde 1990 yılında 35 milyon dolar olan toplam satış miktarı, 1995 yılında 895 milyon dolara ve 2002 yılında 2,5 milyar dolara yükselmıştır.

Biyosensör satışlarında meydana gelen baş döndürücü artışlar, özellikle bu alandaki üretici firma sayılarını arttırdığı gibi, firmaların biyosensörlerle ilgili araştırma ve geliştirme faaliyetlerini de etkilemiş ve son yıllarda firmalar tarafından patentlenmiş çalışmaların sayısında büyük artışlar meydana gelmiştir. Halen gerek akademik gerekse firma bazında biyosensör çalışmaları artan bir hızda devam etmektedir.

Elektroanalitik kimyasal teknikler, çevre koruma ve kirlenmenin sürekli izlenmesi açısından giderek önem kazanmaktadır. Özellikle elektrokimyasal sensör ve dedektörler, öncelikli kirleticilerin yerinde izlenmesi çalışmalarında önemli rol oynayan elektroaktif türlere karşı seçici, duyarlı, hızlı, hassas, kompakt, taşınabilir ve ucuz sistemlerdir.

Uzun zamandır, pH ve oksijen elektrotları gibi elektrokimyasal cihazların çevre analizlerinde kullanıldığı bilinmektedir. Elektrokimyasal sensör teknolojilerindeki son gelişmeler organik ve anorganik kirleticilerin uygun sensörler yardımı ile yerinde, hızlı ve hassas bir şekilde ölçümüne izin vermektedir. Bu sensörlerden birisi bir biyoajan kullanan biyosensörlerdir. EPA, çevresel izleme teknolojilerinin geliştirilmesini sağlamak amacıyla bu tür sensörlerin üretimi ve geliştirilmesini destekleyici teşvikler vermekte ve bu sensörlerin hava, su, toprak, atıksu ve yeraltı sularının sürekli izlenmesi çalışmalarında kullanılmasını desteklemektedir.

Biyosensörlerin çeşitli ortamlarda (toprak, hava, arıtma tesisi) kirleticilerin konsantrasyonlarını ölçme ve izleme potansiyeli yanında bu tekniklerin konvansiyonel analiz metotlarına göre daha ucuz olması ve ortamda kirleticinin davranışının sürekli izlenebilmesi gibi çok önemli avantajları vardır. Kirleticilerin anında analiz edilebilmesi, özellikle arıtma reaktörlerinin otomatik kontrolünde rahatlıkla kullanılabilir veya ortamdaki kirleticinin sürekli izlenmesi ile gerekli önlemlerin alınabilmesine izin verir.

Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliğinde de giderek artan çevresel sınırlamalar hava, toprak ve özellikle sulardaki kirleticilerin güvenilir ve hızlı analizlenmesini zorunlu hale getirmiştir. Konvansiyonel analiz metotları oldukça pahalı, uzun zaman alan ve uzmanlık gerektiren tekniklerdir. Buna karşın biyosensörler düşük maliyetli ve taşınabilir olduklarından yerinde analiz imkanı sağlayan, hassas ve güvenilir biyoanalitik sistemlerdir.

3.1. Biyosensörlerin Çalışma Prensibi

İnce bir tabaka enzimin, elektrokimyasal sensör yüzeyine immobilize edilmesiyle enzim elektrotu elde edilir. Oluşturulan elektrot, uygulanacak örneğin renk ve bulanıklığından etkilenmeden yani örneği bir ön arıtmadan geçirilmeden çalıştırılmalı ve kesin sonuçlar vermelidir. Enzim tabakasına difüze edip tüketilen substrat ya da bu tabakada oluşan ürün elektrokimyasal olarak izlenebilir. İzleme potansiyometrik ve amperometrik olmak üzere iki yolla olabilir. Elektrokimyasal sinyal ile substrat konsantrasyonları arasında bir korelasyon kurulur.

Bir enzim elektrotunun cevabı, hem kararlı hal metodu ile milivolt ya da mikroamper olarak, hem de elektrokimyasal sinyalin zamana karşı değişim hızını veren kinetik ölçümle belirlenebilir.

Enzimlerin kullanılmasıyla ilgili problemler (stabil olmamaları, tekrar kullanılamamaları gibi) sözkonusu olduğundan, kullanılmalarıyla ilgili kısıtlamalar meydana gelmiştir. Bu sorunları minimize etmek amacıyla enzimler katı desteklere fiziksel ve kimyasal olarak immobilize edilmektedir (Taylor, 1991).

3.2. Elektrokimyasal Sensörler

Uygun elektrokimyasal sensör seçiminde dikkat edilmesi gereken en önemli hususlar şöyle sıralanabilir.

1. Belirlenmesi istenen substratın yapısı (redoks ya da iyon tipleri)
2. Yapılan sensörün şekli (mikroelektrotlar)
3. Sensör seçiciliği, hassasiyeti ve ölçüm hızı
4. Sensörün doğruluğu ve stabilitesi

En sık kullanılan sensörler, potansiyometrik ve amperometrik modlarda çalışan sensörlerdir. Amperometrik enzim elektrotları genişletilmiş bir lineer sinyal aralığına ve potansiyometrik elektrotta göre daha büyük Michaelis-Menten sabitine (K_m) sahiptir (Telefoncu, 1997).

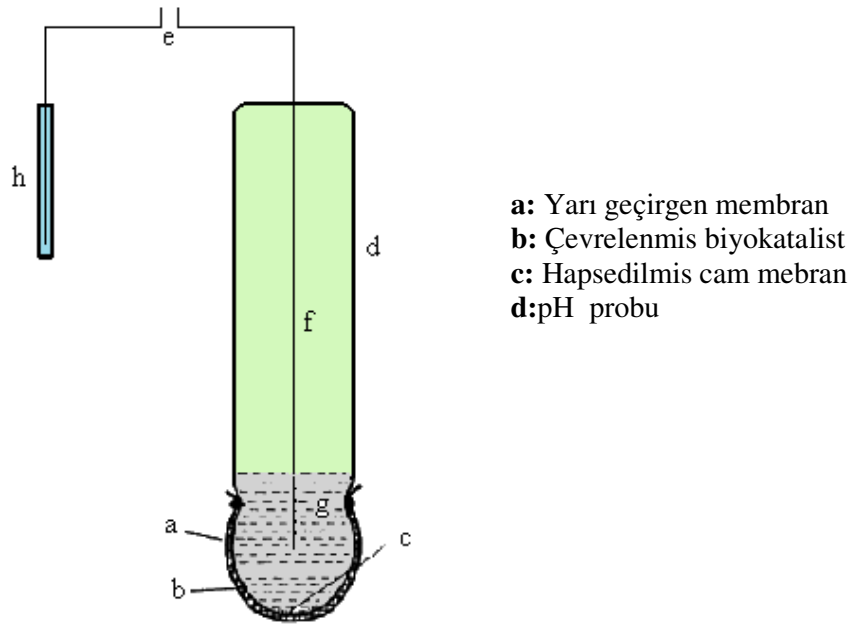
3.2.1. Potansiyometrik Sensörler

Potansiyometrik tip sensörde, membran (cam, katı, sıvı), seçici olarak yüklü tanecikçi membran fazın içine alır. İç kısımdaki dolgu çözeltisi ve örnek çözelti arasında potansiyel fark oluşturur. Oluşan bu potansiyel analit konsantrasyonunun logaritması ile orantılıdır. Potansiyometrik iyon seçici elektrotlar arasında, özellikle gaz propları kullanışsızdır. Bu tip sensörlerde bu problem, gaz seçici membranın iyon seçici elektrot üzerine çıkarılmasıyla giderilebilir.

Örnek içindeki diğer çözünmüş maddeler membrandan difüze ederek, iç dolgu çözeltisinin pH'sını değiştirebilir ve sensöre olumsuz etki yapabilir.

Potansiyometrik iyon seçici elektrotlar arasında daha ziyade gaz propları kullanışlıdır. Gaz propları, iyon seçici elektrotun gaz seçici membranla yer değiştirmesiyle yapılır. En sık kullanılan gaz seçici sensörler, amonyak ve karbondioksit sensörleridir.

Şekil 3.2’de tipik bir biyokatalitik potansiyometrik gaz probu gösterilmektedir. Elektrot, pH camından, referans elektrotlarından ve gaz seçici membrandan oluşur. Cam elektrot ve membran arasında karbondioksit sensörü için sodyum bikarbonat çözeltisi, amonyak sensörü için amonyum klorit çözeltisi ince bir tabaka halinde bulunur. Elektrot, analizi istenen çözeltiye daldırıldığında, enzimatik reaksiyon sonucu karbondioksit veya amonyak gazı üretilir. Oluşan gaz, analizi yapılan çözeltiden pH elektrotuna doğru difüze ederken, öncelikle gaz seçici membrandan geçer ve iç dolgu çözeltisine ulaşarak burada çözünür. Çözünmeye bağlı olarak ortam pH’sı değişir ve buna bağlı olarak sistemin potansiyometrik yanıtı artar. Potansiyometrik yanıtındaki lineerlik, 10 μ M - 0,1 M substrat konsantrasyon aralığında gözlenir (Telefoncu, 1997).



Şekil 3.2. Potansiyometrik Gaz Probu.

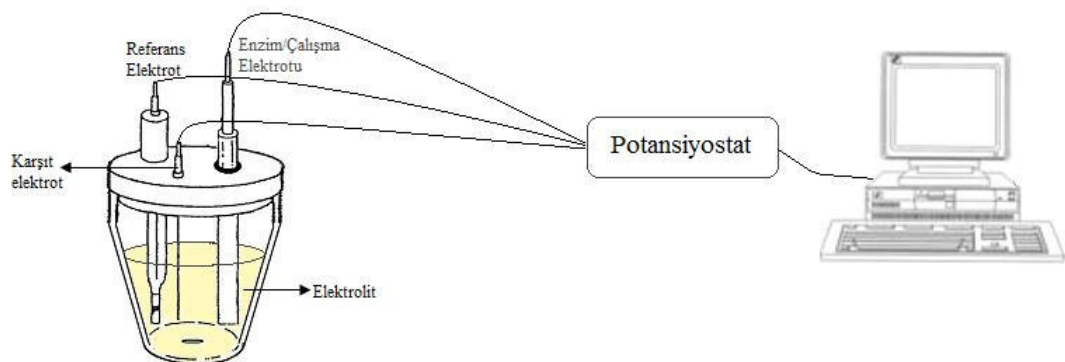
3.2.2. Amperometrik Sensörler

Ampermetre, sabit potansiyel uygulanan sürekli akım durumlarını izlemek üzere kurulmuştur. Sistem, çalışan, referans ve yardımcı elektrot olmak üzere üç elektrottan oluşmaktadır. Çalışan elektrotun potansiyel kararlılığı potansiyostat ile kontrol edilmektedir. Çalışan elektrot immobilize biyoaktif tabaka içermektedir. Bu üç elektrotun tasarımı hareketsiz veya karıştırılmalı şartlarda ve akış sistemlerinde olmak üzere iki çeşit hidrodinamik şartta uygulanabilir.

Amperometrik biyosensörün yanıtı;

- i. Analit veya kofaktörün biyokatmana difüzyonu,
- ii. Enzimatik reaksiyon,
- iii. Ürünlerin biyo katman içine veya dışına difüzyonu,
- iv. Ürünün veya kofaktörün elektrokimyasal olarak ortaya çıkması,
- v. Elektrokimyasal reaksiyon sonucu oluşan ürünün biyo katman dışına difüzyonuna

bağlıdır.



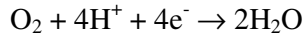
Sekil 3.3. Amperometrik Esaslı Biyosensör Sistemi.

Amperometrik biyosensörlerde istenen işletme şartlarında akımın enzim kinetikleri veya elektrot kinetikleri yerine analitin kütle transferi ile sınırlandırılması istenmektedir. Amperometrik biyosensörlerde üç farklı elektron transferi gözlenmektedir.

I. Üretim

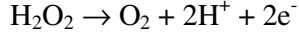
Oksidoredüktaz enzimler genelde amperometrik güç çeviricilerde birleştirilmektedirler. Elektrokimyasal amperometrik biyosensörlerin ilk kategorisi enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan ürünlerin (hidrojen peroksit, NADH, veya kofaktör yapısının izlenmesi, oksijen) ölçümüne dayanmaktadır.

Oksijen Ölçme: Clark elektrotu örnek çözeltiyi gaz sızdıran membrandan ayıran iki elektrot sisteminden oluşmaktadır. Oksijenin bu membrandan difüzyonu 700 mV'ta platin katotta azalmaktadır.



Sürekli akımın sürekli hale gelmesi ile sonuçlanan bu olay oksijen basıncı ile doğru orantılı ve besin konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Engelleyen türlerin etkisi enzimin seçiciliği ve gaz geçiren membranın seçiciliği ile azalmaktadır. Oksijenin besinlere göre daha fazla olduğu bir durumda besinler için sistemin birinci derece kinetiklerine uyduğu zaman sinyalin analit konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğunu söylemek henüz pahalı bir sistemdir. Clark tip oksijen glukoz elektrotu, iki altın elektrotu, polielektrotu ve biyo katman ile kaplanmış gaz geçiren tabaka ile birlikte ince silikon besin üzerine imal edilebilir. Bu sensörün glukoz için dinamik aralığı 56µm – 1.1 mM'dır.

Hidrojen Peroksit Ölçme: H_2O_2 üreten oksidaz enzimi içeren biyokatmanın çalışan elektrot yüzeyine immobilizasyonu olarak tanımlanır ve genellikle 700 mV’ da anot gibi çalışan Pt elektrotudur.



Seçicilik, selüloz asetat ince tabakasının elektrotu sarmasıyla oluşur. Bu tabaka ca. 100D gibi moleküler kesiciden oluşmakta ve böylece H_2O_2 gibi küçük moleküllerin geçişine imkan tanımakla beraber engelleyen türleri geri çevirmektedir. Hidrojen peroksitin platin elektrotta yüksek potansiyelde oksidasyonu ve askorbat, urat, parasetamol gibi okside olabilir türlerin elektrokimyasal olarak engelleyici olmalarından dolayı büyüklük seçici katmanın olması zorunludur.

Hidrojen peroksitin bulunması, hidrojen peroksitin engelleyici türlerin aktif olmadığı düşük potansiyellerde Pt elektrotunda indirgenmesi olarak tanımlanabilir. Horseradish peroxidase gibi katalistlerin veya diğer elektrot materyallerinin (Pt + Au) H_2O_2 ’ yi katalizlemesi araştırılmıştır.

NADH Ölçme: Dehidrojenaz için kullanılmaktadır. NADH oksidasyonu yüksek potansiyel istemekte ve oksidasyon ürünü polimerizasyonu yüzeyi kirletmektedir. NADH esaslı biyosensörlerin ana problemi ikincil ürün olan NAD^{+} ’ yı biyokatmana immobilize etmektir. Yoksa NAD^{+} biyosensörün stabilitesi bozulduğu anda biyokatmandan kurtulmaktadır.

II. Üretim (İkinci Üretim)

İkinci üretimde amperometrik biyosensörler enzim redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında transfer aracı kullanılmaktadır. Aracılar, metallerin inorganik veya organik kompleksleri, organik maddeler ve polimerler olabilirler. Aracının organik molekülü ne kadar büyükse, lipofilik karakteri de o kadar büyüktür ve stabilitesi daha iyidir. Aracılar, enzim redoks merkezi veya enzimatik reaksiyon ürünü ile reaksiyona giren küçük moleküllerdir ve okside olan veya azalan aracılar düşük potansiyellerde elektrokimyasal redoks reaksiyonlara hızla girebilirler.

Birinci tip araçlar, ferriciyanit, 1,4-benzokinon (1,4-BQ), 1,4-fenilendiamin, ferrosen (Fc), tetrahiyafulvalen (TTF), tetrasiyanokinodimetan (TNCQ), N-metilfenazinyum, Meldola mavisi, metilen yeşili, metilen mavisi gibi inorganik veya organik bileşiklerden oluşan) suda çözünebilirlerdir. Çözülebilir araçların enzim biyokatmanından sızması gibi problemleri mevcuttur.

Ferrosen ve tetrahiyafulvalen türevleri gibi suda çözünmeyen bileşiklerin oluşturduğu geliştirilmiş araçlar da mevcuttur. Bu araçlar enzim ile birlikte biyo katmanda immobilize olurlar. Meldola mavisi gibi besinlerin kovalent bağlarla silika jel üzerine bağlanması ile çözünebilir araçların çözünürlüğü giderilebilir.

Son yıllarda ferrosen veya tetrahiyafulvalen ile tutturulmuş polimerler veya osmiyum, rutenyum veya paladyum içeren polimerler gibi redoks polimerler esas alınarak yeni araçlar araştırılmıştır.

Polimerleri taşımak enzim ve polimer arasında yüksek derece ilişki sağlamasından avantajlıdır. Bu durum elektron transfer kinetiklerini hızlandırmakta ve enzimin işlemini arttırmakta ve böylece besin dönüşüm hızını arttırmaktadır.

III. Üretim (Üçüncü Üretim)

Burada enzimin aktif merkezi ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferi direkt olarak meydana gelmektedir. Enzimler elektron transferini güçleştiren daha doğrusu engelleyen protein kabuktan oluştuğundan bu tip davranışı gösteren birkaç enzim mevcuttur. Bunlar arasında horseradish peroxidase elektronları direkt transfer edebilir çünkü bunun redoks merkezi protein kabuğun dışında kalmaktadır. Akım eğimleri enzimlerin elektrot ve redoks merkezi arasındaki yakınlıktan oluşan molekül biçimiyle bağlantılıdır.

Bu üretim şeklinde ;

$$I = n \times F \times D \times V_A \quad (3.1)$$

eşitliği ile elektrot yüzeyinde meydana gelen reaksiyonun hızı hesaplanabilmektedir. Çünkü ortamdaki akım değişikliği, elektrot yüzeyinde transfer olan elektron sayısı, Faraday sabiti ve elektrot yüzey alanı deneysel çalışmalar sonucunda belirlenebilen parametrelerdir.

$I = \text{Akım (amper)}$

$n = \text{Elektrot yüzeyinde transfer olan elektron sayısı}$

$D = \text{Elektrot yüzey alanı (mm}^2\text{)}$

$V_A = \text{Reaksiyon hızı}$

$F = \text{Faraday sabiti (C / mol)}$

Faraday sabiti fizik ve kimyada, bir mol elektronun sahip olduğu elektrik yükü olarak tanımlanır. Bu ad, İngiliz bilim insanı Michael Faraday'ın adına ithafen verilmiştir. Elektrolitik sistemlerde, elektrot yüzeyinde toplanan kimyasal madde miktarını hesaplamada kullanılır.

$$F = N_A \cdot q = 96485 \text{ C/mol} \quad (3.2)$$

şeklindeki eşitlikle ifade edilebilir. Bu eşitlikte N_A Avogadro sayısı (yaklaşık $6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) ve q da, bir elektronun yükünün büyüklüğüdür (elektron başına yaklaşık $1.602 \times 10^{-19} \text{ Coulomb}$).

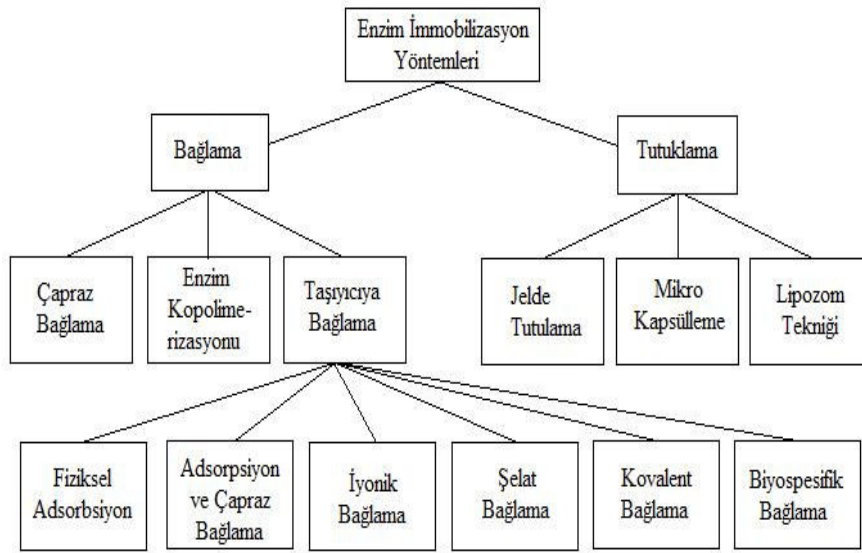
F nin değeri ilk olarak, belirli bir süre boyunca belirli bir akımın geçtiği bir elektrokimyasal reaksiyonda toplanan gümüşün ağırlığından bulunmuştur. Bu değer Avogadro sayısını hesaplamada kullanılmıştır. F ve dolayısıyla N_A yı daha hassas olarak belirlemeye ilişkin araştırmalar sürmektedir.

3.3. Enzim İmmobilizasyon Metotları

Enzimin elektrot yüzeyine yüksek aktivite ile ince tabaka içerisinde fiziksel olarak yerleştirilmesi kovalent ve kovalent olmayan metotlarla gerçekleştirilir. Basitçe immobilizasyon, serbest haldeki enzimi elektrot yüzeyinde yarı geçirgen bir membran kullanarak tutmak suretiyle gerçekleştirilir. Elde edilen prop, çoğunlukla kötü stabilite gösterir ve fazla miktarda enzime gereksinim duyar.

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere üstünlükleri şöyle sıralanabilir;

1. Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
2. Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.s.) karşı daha dayanıklıdır.
3. Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
4. Sürekli işlemlere uygulanabilir.
5. Serbest enzime kıyasla daha kararlıdır.
6. Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
7. Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
8. Bazı durumlarda, serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
9. Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.
10. Mekanistik çalışmalar için uygundur.

Çizelge 3.1 Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

Fiziksel ya da kimyasal olarak immobilize edilen enzimler, daha iyi bir stabilite gösterir ve diğer maddelerle etkileşimi daha azdır. Tercih edilen immobilizasyon metotları aşağıdaki gibidir:

3.3.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

Taşıyıcıya bağlamada bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlamada rol alırlar.

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekir. İmmobilizasyon, çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde, enzim-taşıyıcı bağının aktivite için

zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında, taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözümlere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilir.

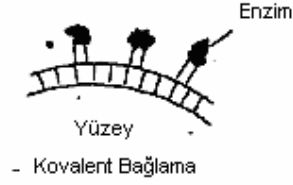
3.3.1.1 Kovalent Bağlanma

Enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması genelde sulu ortamda gerçekleştirilir. Reaktif taşıyıcıda ve enzimde bulunup enzimin bağlanmasını sağlayan fonksiyonel gruplar aşağıdaki gibidir;

Çizelge 3.2.Enzimin Bağlanmasını Sağlayan Fonksiyonel Gruplar.

Reaktif Gruplar	
Taşıyıcı	Enzim
OH	NH ₂
COOH	NH ₂
NH ₂	COOH, NH ₂
COOH	NH ₂
COOH	NH ₂
CH ₂ COOH	CH ₂ CON ₃
CHO	NH ₂

Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Taşıyıcıya kovalent bağlanma enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir.



Şekil 3.4.Kovalent Bağlama.

3.3.1.2 Adsorpsiyon

Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Proteinler ve özellikle enzimlerin katı yüzeylerde adsorpsiyonu detaylıca araştırılmıştır. Adsorpsiyonun asıl amacı enzim immobilizasyonu olmayıp, enzim saflaştırmaktır. Fakat suda çözünmeyen taşıyıcılarda adsorpsiyon yönteminin enzim immobilizasyonunda oldukça sık kullanıldığını görmekteyiz.

Yöntem, yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Taşıyıcıya bağlanmada etkin olan Van der Waals kuvvetleridir. Adsorbanlar çok değişik türde olmakla birlikte iyi bir adsorpsiyon sağlayabilmek için genellikle adsorbanın bir ön işleminden geçirilmesi gerekir.

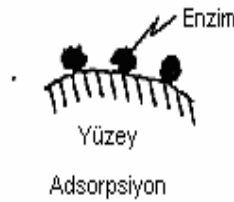
Enzim immobilizasyonunda en sık kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, CaCO_3 , kül, , silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır.

Bir enzimin suda çözünemeyen taşıyıcıda adsorpsiyonu pH, çözgen, iyon şiddeti, enzim-adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlere bağlıdır. Bu faktörlerin araştırılması, adsorpsiyon ve aktivitenin önemli ölçüde geri kazanılması için optimal koşulların saptanması çok önemlidir. Adsorpsiyon mekanizması genellikle çok karışık olup, birçok olasılıktan hangisinin gerçekleşeceğini önceden saptanması güçtür.

Prensip olarak, bir proteinin aktif yüzeylerde adsorpsiyonu tersinir bir işlem olmalıdır. Ancak bazı durumlarda (örneğin; kaolenitte adsorplanmış üreaz) tersinir olmayan adsorpsiyon söz konusu olabilmektedir. Eğer aktivite sabit kalıyor ve immobilize enzim sürekli işlemlerde kullanılabiliriyorsa, bu tür adsorpsiyon enzim immobilizasyonu için idealdir. Desorpsiyon, reaksiyon ürünlerinin kirlenmesine ve aktivitede sürekli bir değişmeye neden olur. Tersinir adsorpsiyonlar enzim immobilizasyonu için pek uygun değildir.

Bazı adsorbanlar bir enzimin farklı biçimlerini, aktif veya inaktif biçimlerinden birini adsorbe ederken, diğerini desorbe etmektedir. Eğer enzimin aktif şekli desorbe edilirse bazı durumlarda immobilize enzimin bağıl aktivitesi %100 den büyük değerler alır, tersi durumda bağıl aktivite sıfır olur, yani immobilizasyon ürünü hiç aktivite göstermemektedir.

Yöntemin yararları; enzim immobilizasyon işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve bir yandan immobilizasyonu gerçekleştirirken diğer yandan enzim saflaştırılmasına olanak sağlamasıdır. Yöntemin sakıncaları; her ne kadar immobilizasyon işlemi kolaysa da optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer, enzimle taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa, bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçer ve ürünlerin kirlenmesine neden olur.

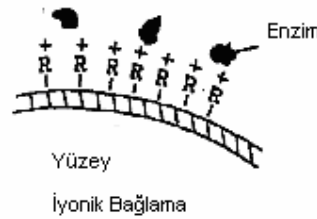


Şekil 3.5.Adsorpsiyon.

3.3.1.3 İyonik Bağlama

Bu yöntem, iyon değıştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlama yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır.

İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden, enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değışikliğe neden olmaz. Ancak; enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışı söz konusudur.



Şekil 3.6. İyonik Bağlama.

3.3.1.4. Şelat Bağlama

Bazı transizyon metallerinin şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması mümkündür. Yöntem ilk kez 1971 yılında uygulanmış olup, daha sonra da kullanılmaya devam edilmiştir.

3.3.1.5 Biyospesifik Bağlama

Enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak enzim immobilize edilebilir. Lektinler, spesifik karbonhidrat atıklarını içeren enzimlere kuvvetlice bağlanırlar. Örneğin bu yöntemle immobilize edilen invertaz, sakarozun kesiksiz inversiyonunda kullanılmıştır. Spesifik monoklonal antikorları suda çözünmeyen materyale bağlayarak hazırlanan taşıyıcılar enzim immobilizasyonunda başarılı biçimde kullanılmaktadır.

3.3.2.Çapraz Bağlama Yöntemleri

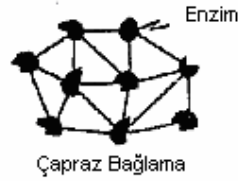
Küçük moleküllü bi- veya multi- fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında kovalent bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH yada immobilize edilecek enzime çok bağlıdır. İntermoleküler bağlanmalar yanında, intramoleküler bağlanmalar da sözkonusudur.

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu 4 farklı şekilde gerçekleşir:

- Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu.

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; gluteraldehid, klorformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, transizyon metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir.

Çapraz bağlama reaksiyonu çok yumuşak koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur. Enzimler bu şekilde birbirlerine bağlandıklarında jelatinimsi bir yapı oluştururlar, bu nedenle mekanik bakımdan çok kararsızdırlar. Çok sayıda enzimin diğer enzimler için matriks olarak davranmasında dolayı bu metot iyi bir immobilizasyon metodu değildir. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifi; gluteraldehitdir.



Şekil 3.7.Çapraz Bağlama.

3.3.3. Kopolimerizasyon Yöntemleri

Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranır ve böylelikle polimer matrikse bağlanmış olur. Yöntem, polimer matrikse tutuklamaya benzemekle birlikte enzim kaçışının önlenmiş olması gibi üstünlüğü vardır.

3.3.4. Tutuklama Yöntemleri

Prensip olarak tutuklama enzim molekülünü belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem, polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

3.3.4.1. Polimer Matrikste Tutuklama

Polimerizasyon ve çapraz bağlanmanın olduğu ortamda enzim de bulunduğu takdirde enzim, çapraz bağlanma sonucu oluşan odacıklarda (kafes) tutuklanmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer, N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir.

Yöntem, yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir

Çapraz bağ yüzdesi öyle ayarlanmalıdır ki, enzim molekülleri tutuklanabilsin ama substratın enzimlere ulaşmasına engel olunmasın. Çapraz bağ yüzdesinin aşırı olması substratın enzim aktif merkezlerine ulaşmasını engellemekle kalmayıp, enzimin zincir yapısını da zorlayıp aktivite kaybına veya tamamen inaktif olmasına neden olabilir. Bu nedenle optimal bir çapraz bağ yüzdesi saptanması önemlidir. Bu oran, enzime ve taşıyıcıya bağlı olarak değişir.

Uygun çaplı substrat molekülleri polimer kafes içinde tutuklanmış enzim moleküllerine ulaşır ve reaksiyon ürünleri de dışarı çıkar. Bu yöntemde kullanılacak substratın küçük moleküllü olması gerekir. Bu tip immobilizasyon, ilk kez 1963 yılında tripsin kimotripsin ve diğer bazı enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmıştır.

Molekül ağırlığı 15000'den fazla olan enzimlerin bu yöntemle immobilizasyonları oldukça kolaydır. Bu tür immobilizasyon işleminde en çok kullanılan taşıyıcılar, hidrofilik temele dayalı poliakrilamid jeli ve jel oluşturan polisakkaritlerdir. Ayrıca silikon lastiği ve silikajel de kullanılmaktadır. Tutuklama yanında özellikle yüklü polimerlerde fiziksel adsorpsiyonun da etkin olduğu saptanmıştır.

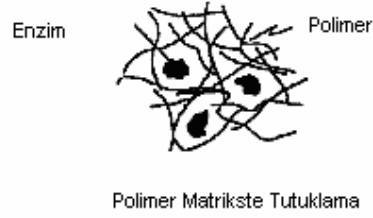
Polimer zincirleri arasındaki çapraz bağlama değişik bifonksiyonel veya multi-fonksiyonel reaktiflerle sağlanmaktadır. Örneğin, bu yöntemle enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan taşıyıcı olan poliakrilamidin çapraşık bağlanması N,N'-metilenbisakrilamid ile gerçekleştirilir.

Çapraz bağlı taşıyıcıların hazırlanmasında, monomer ve çapraz bağlayıcı reaktiflerin mol oranları çok önemlidir. Bu durum bir yandan enzim moleküllerinin tutuklanacağı hücrelerin çapına etki ederken, diğer yandan taşıyıcının fiziksel özelliklerinde önemli değişmelere de neden olacaktır.

Bu yöntemle immobilize edilen enzimin asıl özelliklerinde bir değişme beklenmez. Ancak taşıyıcının tipi ve enzimatik reaksiyonlar bölgesel mikro çevre etkilerinin oluşmasına neden olurlar. Örneğin, taşıyıcının yüklü olması önemli bir etkidir. Taşıyıcının yüklü olması immobilize enzimin özelliklerinde doğal enzime kıyasla çok önemli değişmelere neden olmaktadır.

Bu yöntemin yararları; çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem olması ve çok az miktarlarda enzim kullanılarak gerçekleştirilmesidir. Nötral, suda çözünmeyen taşıyıcılarla da immobilizasyon gerçekleştirilmekte ve kimyasal bir bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcıya gerek duyulmamaktadır.

Yöntemin sakıncaları ise; immobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun deney koşullarına çok sıkı bağımlı oluşu ve immobilize enzimin ancak küçük moleküllü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir.



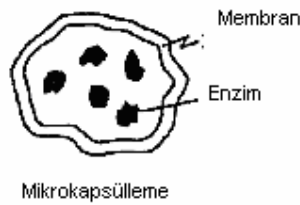
Şekil 3.8.Polimer Matrikste Tutuklama.

3.3.4.2 Mikrokapsülleme

Bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasından ibarettir. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 μ arasında değişir.

Enzimler daha çok kimyasal mikrokapsülleme ile immobilize edilir. Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu; sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen membran mikrokapsüllerde tutuklama olmak üzere iki grupta incelenebilir.

Sürekli mikrokapsüllerde çerçeve membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde lipozomlar ise bir sıvı tabakadır. İmmobilizasyonda kullanılan çerçeve maddesinin (membran) yarı geçirgen olması zorunludur. Ayrıca bu yarı geçirgen membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek bir büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntemle immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır.

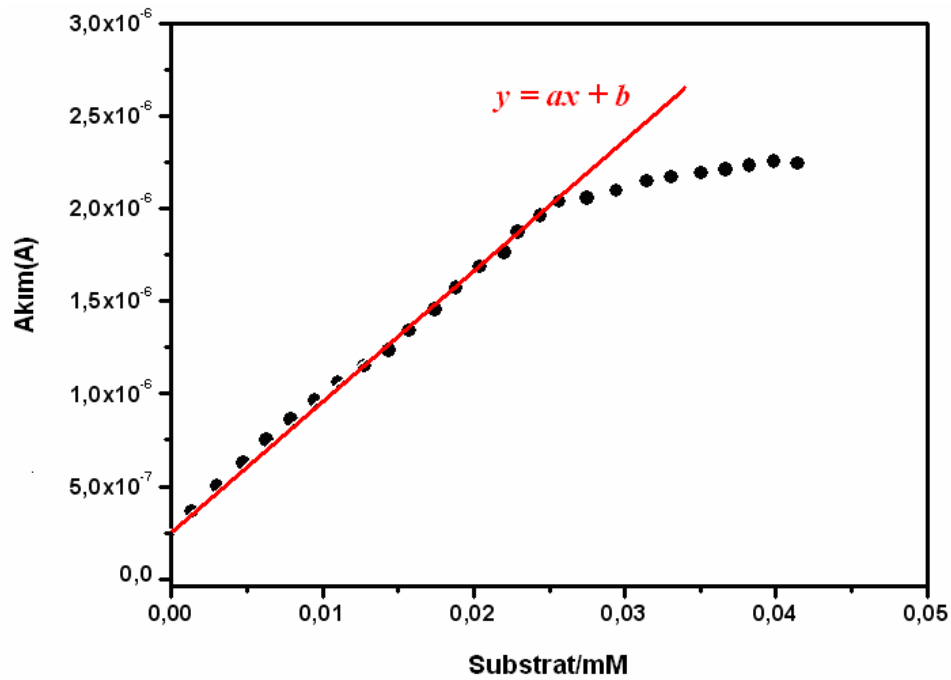


Şekil 3.9. Mikrokapsülleme

3.4.Biyosensörde Ölçüm Metodu İçin Gerekli Analitik Hesaplamalar

3.4.1. Kalibrasyon Eğrisinin Lineerliği

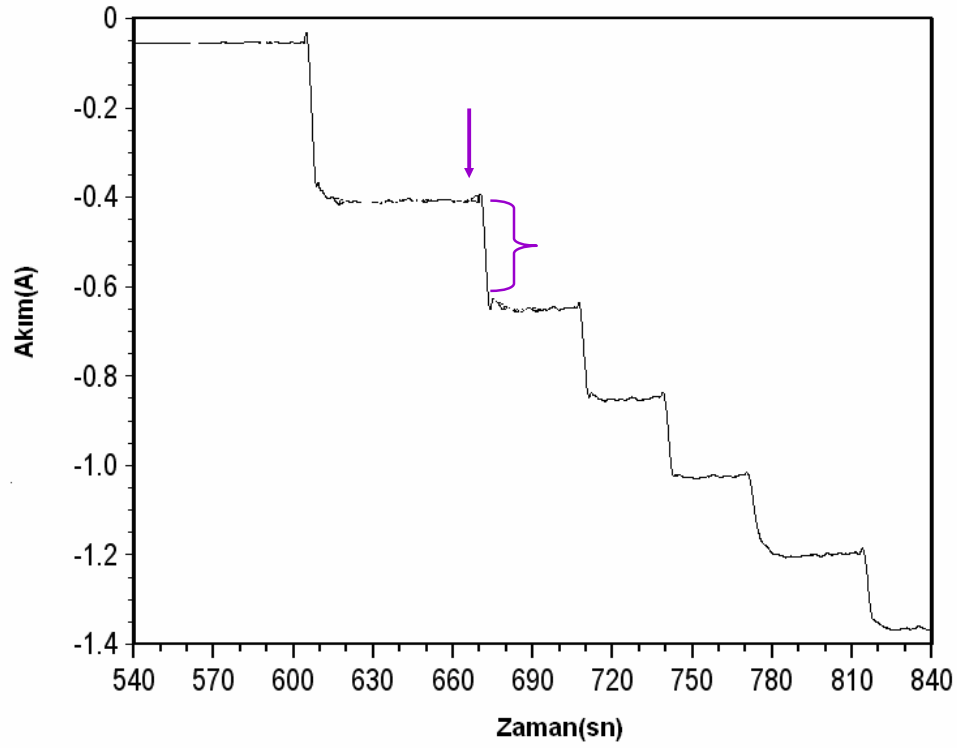
Reaksiyon ortamına artan analit eklemeleri yapılarak elde edilen akım değişimleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilir. Belli bir konsantrasyonda analit ilavesinden sonra ortam kararlılığının bozulması, enzim aktivitesinin azalması, elektrot yüzeyinin oluşan bazı radikaliklere bağlı olarak dolması gibi nedenlerle akım değişimleri azalır ve ileriki konsantrasyonda eklemelerden sonra akım değişimi gözlenmez. Doğru ölçümün yapılabilmesi için akım değişimlerinin doğrusal eğilim gösterdiği lineer bölgeyi tanımlamak gereklidir. Biyosensör için ölçüm aralığı tanımlanan bu lineer aralıktır. Gerekli analitik hesaplamalar bu lineer aralıkta yapılır. Lineer aralığın geniş olması biyosensör için avantajdır.



Şekil 3.10. Kalibrasyon Eğrisinin Lineerliği.

3.4.2. Cevap Süresi

Cevap süresi biyosensör için önemli diğer bir parametredir. Reaksiyon ortamına analit eklemesi yapıldığı andan akım değişiminin olduğu ve tekrar kararlı hal akımına ulaşıldığı ana kadar geçen süre olarak tanımlanır. Hızlı cevap alma biyosensör için avantajdır. Cevap süresi, elektrot materyaline, iletken polimerin cinsine, enzimin yapısına ve hızına, analitin enzime olan ilgisine ve analitin elektrot yüzeyindeki redoks potansiyeline bağlı olarak değişim göstermektedir.



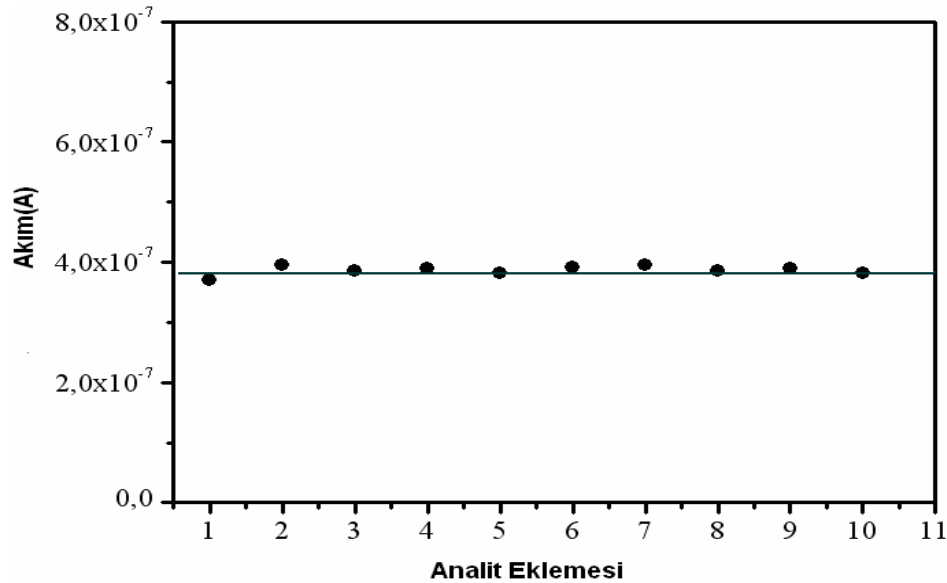
Şekil 3.11. Cevap Süresi.

3.4.3. Belirleme Limiti

Biyosensörün cevap verebildiği en küçük konsantrasyon değeri belirleme limiti olarak adlandırılır. Belirleme limiti $3 s_b / m$ formülü ile adlandırılır. Burada m analit için hazırlanmış kalibrasyon eğrisinin lineer bölgedeki eğimini, s_b aynı konsantrasyondaki analitin reaksiyon ortamına ardarda eklenmesiyle oluşan akım değişimleri arasındaki standart sapma değerini verir. Düşük belirleme limiti biyosensör için bir avantajdır.

3.4.4. Ölçüm Metodunun Güvenilirliği (Stabilite)

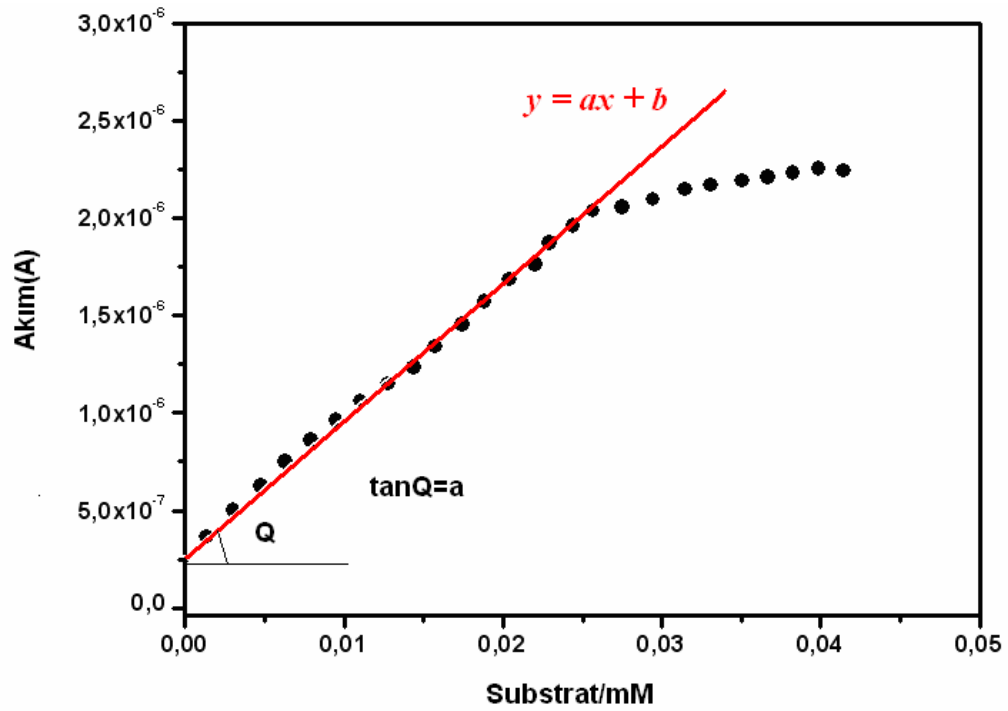
Ölçüm metodunun güvenilirliği, tekrarlanabilirlik (stabilite) ile tanımlanır. Aynı konsantrasyondaki analitin reaksiyon ortamına ardarda eklenmesiyle oluşan akım değişimleri arasındaki standart sapma değeri stabiliteyi verir. Biyosensörde ölçümün standart sapma değerinin indirgenmesi ölçümü doğruluğa yaklaştırmaktadır. Ayrıca eklenen analitin gerçek konsantrasyon değeri ile kalibrasyona göre okunan ölçüm sonucu arasındaki fark ölçümün doğruluğunu vermektedir.



Şekil 3.12. Stabilite.

3.4.5. Hassasiyet

Biyosensörün hassasiyeti, oluşturulan analit kalibrasyon eğrisinin eğimidir. Bir başka tanımla biyosensörün ne kadar küçük bir değişimi ölçebildiğinin ölçüsüdür. Bu sebeple , hassasiyet değerinin büyük olması konsantrasyondaki küçük bir değişimin ölçülebildiğinin göstergesidir.



Şekil 3.13. Hassasiyet.

3.5. Enzim Tabanlı Fenol Biyosensörleri

Bu bölümde, literatürde yapılmış fenol sensörleri özetlenmiştir.

Christophe ve arkadaşları (2003), fenolik bileşikleri ve herbisitleri belirlemek için, tyrosinase tabanlı amperometrik enzim sensörü geliştirdiler. İletken polimer poly (3,4-ethylenedioxythiophene) içerisine enzim tutuklanarak cam karbon elektrot yüzeyine elektropolimerize edilmiştir. Biyosensor performansını optimize etmek için çalışma şartları ve elektropolimerizasyon prosesi parametreleri deneysel olarak çalışılmıştır. Kesikli sistemde -200 mv da monofenol ve difenoller amperometrik olarak ölçülmüştür. Bu moleküllerin belirleme limitleri 5-500 nm arasında tespit edilmiştir. Herbisitlerin belirlenmesi tyrosinase elektrodu yanıtlarına karşı oluşan inhibisyon mekanizmasından elde edilmiştir. Atrazin ve diuron için belirleme limitleri sırasıyla 1 ve 0.5 mgL⁻¹ olarak bulunmuştur. Bu veri PEDT filmin gelişmekte olan bir tyrosinase immobilizasyon metodu olduğunu göstermektedir.

Cristea ve arkadaşları (2005), tyrosinase tabanlı hidrofilik polipirol film biyosensörde gerçekleştirdikleri amperometrik ölçümler sonucu kloroformda katekol için 15,6 mAM⁻¹cm⁻² değerini elde ettiler. Çalışmalarında biyosensörün elektroanalitik parametrelerinin önemli ölçüde enzim matriksinin hidrasyon basamağına ve çalışma elektrodunun hazırlandığı konfigürasyona bağlı olduğunu söylediler. Hazırlamış oldukları çalışma elektrodu daha hidrofilik bir karakter taşıyan iletken polimer içermekte ve enzime çapraz olarak bağlanmaktadır. Kullanılan polipirol yeni bir bispirolik türevidir.

Liu ve arkadaşları (2004), karbon pelet ile desteklenmiş modifiye manyetik nanopartiküller (MgFe₂O₄- SiO₂) kullanarak tyrosinase tabanlı bir biyosensör geliştirdiler. İlk 20 sn içerisinde %95 kararlı hale geldiği belirtilen sistem ile 54,2 µA(mM)⁻¹ gibi yüksek duyarlılıkta ölçümler gerçekleştirdiler. Fenol için belirledikleri ölçüm aralığı 1×10⁻⁶- 2,5× 10⁻⁴ M arasında olup alt sınır 6×10⁻⁷ M seviyesinde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda çalışma elektrodunun yüksek miktarda tyrosinase içermesi çalışmanın avantajlarından biri olarak görülmüştür.

Tyrosinase manyetik nanopartiküller üzerindeki amino grupların modifiye edilmesi ile sisteme kovalent olarak bağlanmıştır. Çalışmanın sonunda üretilen elektrodun silika sol jel graft kopolimer elektrodlarına göre daha iyi özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir.

Liu ve arkadaşları (2003); koloidal altın ile modifiye edilmiş karbon elektroda tyrosinase immobilize ederek, fenol tayininde kullanılmak üzere yenilenebilir bir biyosensör geliştirmişlerdir. Amperometrik sonuçlar üzerine pH'nın, işletme potansiyelinin ve koloidal altın çözeltisinin hacminin etkisi araştırılmıştır. Optimum şartlarda biyosensörün fenol ölçümü için, tepki verme süresi (5 saniyeden az), duyarlılığı ($12,3 \mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$) ve saklama stabilitesi verilmiştir. Substrat olarak fenolün kullanıldığı deneylerde K_{mapp} değeri ise $58,3 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır.

Kim ve arkadaşları (2002); fenolik bileşiklerin tayini için, silikat/nafyon kompozit filmine tyrosinase immobilizesi ile hazırlanmış amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Kompozitteki nafyon polimeri sadece sol-jel silikat film eldesinin kırılgenliğini gidermek için değil aynı zamanda biyosensörün uzun süreli stabilitesini arttırmak için de kullanılmıştır. Enzim elektrodun optimum analitik performansı belirlemek için, enzim elektrodun üretimindeki işletme parametreleri ve çeşitli deneysel değerler (pH ve işletme potansiyeli) araştırıldı. Biyosensörün ölçülebilecek akımın %95'ne ilk 15 saniyede ulaştığı belirtilmiştir. Katekol ve fenol için biyosensörün duyarlılığı, sırasıyla, 200 ve 46 mA/M olarak verilmiştir. Enzim elektrodunun başlangıç aktivitesinin %74'nü 2 hafta boyunca koruduğu belirtilmiştir.

Sulu çözeltilerde fenolün belirlenmesi için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirilmiş ve *tyrosinase* enzimi, yeni bir kopolimer olan poli(N-3-aminpropil pirol-ko-pirol) film üzerine, filmin amino gruplarından kovalent olarak bağlanmıştır. Enzim bağlı film tabakası, indiyum-kalay-oksit (ITO) kaplı cam levha üzerine elektrokimyasal olarak uygulanmış ve polimer filmin poroz morfolojisi ve enzimin kovalent bağlanması, yüksek dozda enzimin tutuklanmasına ve enzim kullanım ömrünün uzamasına neden olmuştur. pH 7,2 fosfat tamponunda ve -0,2 V'luk sabit

voltajda sensörden alınan amperometrik yanıt, fenol konsantrasyonlarına bağlı olarak değişim göstermiş ve fenol için 1,35-222,3 μM konsantrasyonları arasında, katekol için 1,6-118,8 μM konsantrasyonları arasında, *p*-kresol için ise 1,9-257,8 μM konsantrasyonları arasında sensörde lineerlik elde edilmiştir. Sensörde yanıt, 10 saniyeden kısa bir sürede alınmış ve bu süre içinde sistem kararlı hale geçmiş ve enzim 4 ay sonunda ilk aktivitesinin %80'ini korumuştur. Kopolimer elektrot, öncelikle 1,5 saat boyunca 0,1 M pH 7,2 fosfat tamponuna daldırılıp bekletilmiş, daha sonra 3,6 mg/mL *tyrosinase* içeren çözeltiye daldırılmış ve yine 1,5 saat bekletilmiştir. Reaksiyonlar, oksijene doyurulmuş ortamda, oda sıcaklığında ve sabit karıştırma hızlarında gerçekleştirilmiş ve -0.2 V'tan yüksek voltajlar uygulandığında oluşan kinon tipi ürünlerin polimerleşip, elektrotu kapladığı görülmüştür. Elektrotun, kullanılmadığı süre içinde +4°C de buzdolabında korunabileceği belirtilmiştir (Rajesh et al. 2004).

Katekol ve *p*-kresolün belirlenmesi için *tyrosinase* ve *tyrosinase/peroxidase* enzimlerini içeren 2 elektrot hazırlanmış ve bu iki elektrotun substrat seçiciliği araştırılmıştır. Katekol ve *p*-kresolün beraberce bulunduğu bir reaksiyon ortamında çift enzimli elektrottan *tyrosinase* elektrotuna göre daha iyi yanıt alındığı gözlenmiştir. Çalışmada, indiyum-kalay-oksit elektrot kullanılmış, elektrot yüzeyi aseton ve 0,1 M NaOH ile yıkanarak hidrofilik hale getirilmiştir. Daha sonra elektrot, %5 oranında 3-aminopropilttriethoksilane içeren toluene batırılarak yüzeyde amino grupları oluşturulmuştur. Modifiye edilen elektrot, içerisinde 20 g/L *peroxidase*, 5 g/L *tyrosinase* ve %2,5 oranında gluteraldehit olacak şekilde korunduğu bulunmuştur. Ayrıca, 4-48 μM fenol konsantrasyon aralığında sensörde lineerliğe ulaşıldığı ve sensör için gerekli minimum fenol konsantrasyonunun 6,1 nM olduğu belirlenmiştir (Liu et al. 2003).

Sulu çözeltilerde 4-klorofenolün belirlenmesi pH duyarlı, yarı geçirgen dönüştürücüye sahip potansiyometrik bir sensör yardımıyla gerçekleştirilmiştir. *Tyrosinase*, ilk defa doygun gluteraldehit buharı içinde immobilize edilmiş ve sistemde farklı pH'lara ve gluteraldehit buharında farklı sürelerde immobilizasyona göre çalışılmıştır. Bu şartlarda biyosensörün hassasiyeti, belirlenebilir minimum substrat konsantrasyonu ve stabilitesi araştırılmıştır. Belirlenebilir minimum substrat konsantrasyonunun 20 ppm, belirlenebilir konsantrasyon aralığının ise 20-1000 ppm

arasında olduğu bulunmuştur. Sensörün kararlılığa 3-4 saatte ulaştığı ve bu kararlılığın 15 saat devam ettiği görülmüştür. En iyi sensör yanıtının pH 6'da olduğu tespit edilmiştir (Mai et al. 2002).

Stanca ve Popescu (2004), *tyrosinase* tabanlı Pt çalışma elektrodu yardımıyla elektropolimerize poli- amfipilik pirol matriks ya da gluteraldehit ile çapraz bağlanmış biyosensör sisteminde çeşitli fenol bileşiklerini (fenol, çeşitli dihidroksi benzenler, çeşitli hidroksi tolüenler ve klorofenoller) amperometrik yöntemle ölçtüler. Ölçüm ortamı sulu fosfat tamponu (pH=7) olup, elektrolit olarak 0,1 M lık LiClO_4 ve 0,1 M $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$ içeren kloroform çözeltisi gibi sulu ve susuz ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Kullanılan polipirol matriksin gerek sulu tamponda ($690 \mu\text{A M}^{-1}$) ve kloroformda ($149 \mu\text{A M}^{-1}$) yüksek biyoelektrot duyarlılığı gösterdiğini rapor ettiler. (Liu et al. 2005; Rajesh et al. 2005; Jimenez-Juarez et al., 2005; Xue et al., 2002).

Laccase enzimi, polietersülfon membrana immobilize edilip Platinyum elektrota bağlanmış ve referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrotu kullanılmıştır. Bu elektrot, genellikle kırmızı şarap içinde bulunan olifenollerin (kafeik asit, galik asit, katekin, rutin, malvidin) belirlenmesinde kullanılmaktadır. Asetat tamponunda pH 4,5 ve pH 3,5'da çalışılmış ve katekin, +100mV potansiyelde, pH 3,5'da pH 4,5'dakine göre daha iyi sonuç verirken, aynı potansiyelde kafeik asit ile çalışıldığında pH 4,5 da sonuç alınamadığı görülmüştür. pH 3,5 de katekin ve kafeik asit arasında etkileşim olmadığı ve +100 mV'da ikisinin de sensörde yanıt verdiği görülmüştür. Katekin ve kafeik asitin sensörde belirlenebilir minimum konsantrasyonu 1×10^{-6} M olarak bulunmuştur. 2×10^{-6} - 14×10^{-6} M konsantrasyonları arasında sensörde lineerlik belirlenmiştir. Üç defa üst üste yapılan substrat yüklemelerinde sensör yanıtının hemen hemen aynı olduğu belirlenmiştir (Gomes et al., 2004).

Kağıt fabrikası atıksuyunda bulunan fenolik bileşiklerin belirlenmesinde amperometrik bir sensör sistemi geliştirilmiştir. Kullanılan bu sistem, sürekli bir akış sistemi, dializ membran prosesi ve *laccase* tabanlı bir elektrotan oluşmuştur. Sistemin performansı, pH'ya, iyonik şiddete, uygulanan potansiyele ve debiye göre araştırılmıştır ve biyosensör, üç ay gibi uzun bir süre kararlı olarak çalışmıştır. Biyosensörün hassasiyeti fenol, *p*-fenol, guaiacol ve chloroguaiacol için test edilmiş.

Dializ membran ünitesinin, biyosensör yüzeyini kirlenmekten koruduğu ve dolayısıyla da biyosensör performansı üzerine önemli etkide bulunduğu görülmüştür. Bu özellik sayesinde, karışık bir ortamda ön arıtım yapılmadan atıksu örneğine direkt ölçüm yapılabilmektedir. Enzim immobilizasyonu için, karbon elektrot öncelikle pH'sı 7,2 olan fosfat tamponuyla yıkanmış ve daha sonra 30 dakika boyunca, gluteraldehit, bovin serum albumin ve *laccase* karışımında bekletilmiştir. 0,5-1,6 mL/dak debi aralığında, debi arttıkça sinyal artmış bu değerden sonra artan debilerde alınan sinyallerde düşüşler kaydedilmiştir. Sistemden sürekli bir şekilde pH'sı 5 olan tampon çözelti geçtiğinden dolayı sensör uygulanacak örneğin pH'sından etkilenmemiştir. 1×10^{-3} - 5×10^{-1} M aralığındaki tampon konsantrasyonlarında çalışılmış ve bu aralıkta sensör performansında değişiklik gözlenmemiştir. Sensör kalibrasyonunda lineerliğe, 1-10 μ M arasındaki konsantrasyonlarda guaiacol ve chloroguaiacol çözeltilerinden 1,6 mL/dak debide ve pH 5'de 220 μ L enjekte edilerek ulaşılmıştır (Freire et al., 2002).

Laccase enzimi, fiziksel adsorpsiyon, gluteraldehit, karbodiimid, karbodiimid/gluteraldehit teknikleriyle farklı şekillerde karbon-fiber elektrota immobilize edilmiş ve en iyi sensör yanıtı karbodiimid/gluteraldehit tekniği kullanılarak bulunmuştur. Bu teknikle *laccase*, karbon-fiber elektrota karboksil gruplarından kovalent olarak bağlanmış, karbodiimid sayesinde enzim ve elektrot arasında güçlü bağlanma oluşurken gluteraldehit sayesinde de enzimler arasında ağlaşma gerçekleşmiştir. En kötü sensör yanıtı ise fiziksel adsorpsiyon metodu kullanıldığında gözlenmiştir. Substrat olarak 100 μ M'lık katekol çözeltisi kullanılmış ve bu metotta farklı gluteraldehit miktarlarının sensör üzerine etkisi araştırılmıştır. En iyi gluteraldehit oranı %10 (m/v) olarak tespit edilmiş, sensör farklı pH ve potansiyellerde çalıştırılmış ve optimum sonuca pH 5'de ve -100 mV potansiyelde ulaşılmıştır. İmmobilize *laccase* enziminin, 2 aydan fazla bir süre aktivitesinin tamamını koruduğu tespit edilmiştir (Freire et al., 2001).

Peroxidase amperometrik elektrot kullanarak, ucuz ve basit bir nitrik oksit biyosensörü tasarlanmıştır. Nitrik oksit varlığında *horseradish peroxidase* aktivitesinde inhibisyon görüldüğünden aktivitedeki düşme ile nitrik oksit konsantrasyonu arasında bir ilişki kurulabileceği belirtilmiştir. Naylon, 6 mm çapında diskler halinde kesilerek, kimyasal çapraz bağlanma tekniği ile kesilen

diskler üzerine, içinde *horseradish peroxidase*, BSA ve gluteraldehit bulunan çözelti püskürtülerek, yüzey homojenleştirilmiştir. Diskler, 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Aynı şekilde bir de elektrokimyasal çapraz bağlama tekniği kullanılarak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için, biyosensör, *p*-benzokinon içeren fosfat tamponuna daldırılarak 10 saniye boyunca +0,2 V'luk potansiyel uygulanmıştır. Sistem kararlı hale getirildikten sonra sisteme hidrojenperoksit eklenerek reaksiyon başlatılmış ve 1 dakika sonra nitrik oksit ilavesi yapılmıştır. Akım düşüşü izlenerek nitrik oksit konsantrasyonları bulunmuştur. Kimyasal çapraz bağlanma tekniği ile immobilize edilen biyosensörün belirleyebildiği maksimum nitrik oksit konsantrasyonu $7,9 \times 10^{-6}$ M iken, elektrokimyasal çapraz bağlama tekniği ile immobilize edilen biyosensörün belirleyebildiği maksimum nitrik oksit konsantrasyonu 2×10^{-6} M olarak bulunmuştur. Tasarlanan biyosensörler, nitrik oksitten dolayı sürekli inhibisyona maruz kaldığından tek kullanımlık biyosensörler olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Casera et al., 2000).

Sulu ortamda fenolik bileşiklerin belirlenmesi için *peroxidase* elektrotu hazırlanmış ve enzim çözeltisi grafit üzerine damlatılarak, enzimin grafit üzerine +4°C'de 30 dakika boyunca adsorplanması beklenmiştir. Adsorplama işleminden sonra, elektrot yıkanmış ve teflon tutucu içine yerleştirilerek, amperometrik hücreye daldırılmıştır. Referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrotu kullanılarak elektrotlar bir potansiyostata bağlanmış ve elektrokimyasal hücre, kesikli substrat yükleme sistemine göre çalıştırılmıştır. Bu sisteme ek olarak glikoz oksidaz reaktörü kullanılarak hidrojenperoksit üretimi sağlanmıştır. Fenolün enzimatik oksidasyonu ile oluşan radikaller, elektrot üzerinde indirgenmiş ve indirgenme akımı ile fenol konsantrasyonları arasında ilişki kurulmuştur. Elektrotun çalışma stabilitesi, sisteme ard arda verilen difenol yüklemeleri ile araştırılmıştır. Tekrarlanan yüklemeler sonucu, 1 saat boyunca elektrottan alınan akım değerlerinin % 2-3 oranında azaldığı görülmüş, elektrotun 2 hafta boyunca kararlı kaldığı ve 2. haftadan sonra aktivitede hızlı düşüşlerin meydana geldiği, ayrıca 3 haftadan sonra elektrotun bu aktivitede sabit kaldığı tespit edilmiştir (%60) (Rogers et al., 1995).

Kan testlerinde kullanılan *horseradish peroxidase* sensörlerinin stabilizasyonu için, tetrametilbenzidin (TMB), luminol, argonla doyurulmuş tampon, BSA, ve Tween 20 gibi çeşitli kimyasalların etkisi araştırılmıştır. Ayrıca reaksiyonlarda kullanılacak çözeltilerin gün ışığında ve karanlıkta korunmasının aktiviteye etkisi araştırılmıştır. TMB ve luminolün enzimi etkili bir biçimde stabilize ettiği görülmüş. Stabilize edici madde konsantrasyonlarının 0,1 mM'ın altında olmasına rağmen karanlıkta korunan çözeltiler kullanıldığında, 12 hafta boyunca aktivitede kayıp görülmemiş, aynı stabilize edici madde konsantrasyonlarında, gün ışığına maruz bırakılan çözeltiler kullanıldığında, 6 haftada aktivitede %80'e varan kayıplar görülmüştür. Bu çözeltiler argonla doyurulmuş tampon içinde kullanıldıklarında aktivitede kayıp olmadığı literatürde belirtilenin tam aksine, BSA ve Tween 20'nin stabilize edici etkisinin olmadığı görülmüştür. Stabilize edilen enzimler bu amaçla 3 ay aktivitesinde değişim sözkonusu olmadan kullanılmış ve TMB'in etkili olduğu en iyi konsantrasyon 6 μ M, luminolün etkili olduğu en iyi konsantrasyon ise 0,1 μ M olarak belirlenmiştir. TMB ve luminolün, enzimin aktif bölgesine bağlanarak, oksidatif yıkımını ve üç boyutlu yapısını koruduğu ve ayrıca, çözeltide bulunan serbest radikalleri uzaklaştırdığı belirtilmiştir (Schütz et al., 1997).

4. KOMPOZİT ÇALIŞMA ELEKTRODU TASARIMINDA KULLANILAN BAZI MATRİKSİLER

4.1. Polimerlerin Biyosensör Uygulamalarında Kullanımı ve İletkenliklerinin Metallerle Karşılaştırılması

Tekrarlanan birimlerden (monomerlerden) oluşan büyük moleküllerin bir araya gelmesiyle polimerik maddeler oluşur. Monomerlerden polimerik maddelerin elde edilmesini sağlayan reaksiyonlara da polimerleşme reaksiyonları denir. Geçen yüzyılın başından beri hayatımıza girmeye başlayan yapay polimerler, çeşitli amaçlar için yaygın biçimde kullanılmaktadır. “Polimerler yalıtkan malzemelerdir” fikri 70’li yıllarda son bulmaya başlamıştır; zira daha önce sentezlenmiş olan fakat iletkenlik özelliğinden bahsedilmeyen bazı polimerlerin, şartlara bağlı olarak, elektrik akımını ilettebildiği gözlenmiştir. Sonrasında, iletken polimerlere artan ilgiyle beraber, hakkında yapılan çalışma sayısı artmış, sağlanan gelişmeler neticesinde “organik metaller” adı altında bir çalışma sahası doğmuştur.

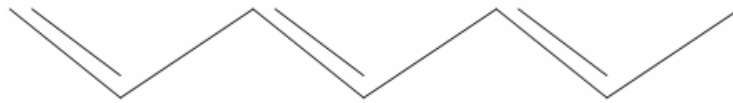
Metaller ; elektriksel iletkenliği yüksek, üstün mekaniksel özelliklere sahip bir başka madde grubunu oluşturur. Ancak, metaller polimerlerden ağırdır, pahalıdır ve polimerler gibi kolayca şekillendirilemezler. Korozyon, metaller için önemli bir başka sorundur.

Bir iletkenin geçen elektrik akımına karşı iletkenin gösterdiği direncin birimi Ohm dur (simge Ω). Bir iletkenin iki ucu arasına 1 voltluk bir gerilim uygulandığında, bu iletkenin 1 amperlik akım geçerse bu iletkenin direnci 1 ohmdur. 1983'teki Milletlerarası Elektrik Kongresi'nde tarif edilen milletlerarası ohm ise, 106,3 cm uzunluğunda 0°C ve 14,4521 gram olan cıvanın bir doğru akıma gösterdiği direnç olarak tarif edilmiştir.

Burada cıvanın bir milimetre karelik kesite sahip olduğu da kabul edilmektedir. Bir mikroohm, 0,000.001 ohm'a ve bir mega-ohm, 1.000.000 ohm'a eşdeğerdedir. Bir diğer iletkenlik birimi Siemens (sembol: S) SI birim sisteminde elektrik iletkenliği birimi olup ohm'un tersidir ($\Omega^{-1} = \text{kg}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ A}^2 \text{ s}^3$). Adını, Alman kâşif ve iş adamı Ernst Werner von Siemens'den alır. Daha önceleri *mho* olarak da adlandırılmıştır. 1971'de, türetilmiş bir SI birimi olarak kabul edilmiştir.

$$\text{Ohm} = \frac{\text{Volt}}{\text{Amper}} = \frac{1}{\text{Siemens}} \quad (4.1)$$

İletken polimer kavramı, kendi örgüsü içerisindeki elektronlarla yeterli düzeyde elektriksel iletkenliği sağlayan polimerler için kullanılmaktadır. Polimerin elektronik iletkenlik gösterebilmesi için, polimer örgüsünde, elektronların zincir boyunca taşınmasını sağlayan uygun yerlerin bulunması gerekir. Bu koşulu ana zincirinde konjüge çift bağlar. (Şekil 4.1) bulunan polimerler sağlar. Konjügasyon, yüksek düzeyde iletkenlik için tek başına yeterli değildir. Dop işlemiyle polimer yapısına iletkenliği sağlayacak olan elektronlar verilerek veya alınarak polimer örgüsünde artı yüklü boşluklar oluşturulur. İletken polimerlerde iletkenliğin nasıl sağlandığı çok basit bir yaklaşımla bu boşluklar üzerinden açıklanabilir. Artı yüklü bir boşluğa başka bir yerden atlayan elektron, geldiği yerde de artı yüklü boşluk oluşturacaktır. Bu işlemler ard arda zincir boyunca veya zincirler arasında yinelenerek elektrik iletilir.

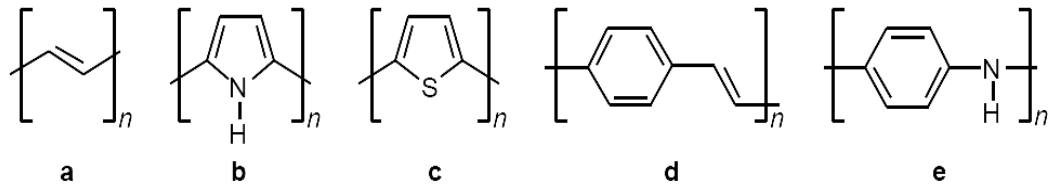


Şekil 4.1. Konjüge Çift Bağ.

Metaller elektriksel iletkenlik ve mekaniksel özelliklerini, polimerlerin özellikleriyle birleştirerek bir tek malzemede toplayabilmek daima ilgi çeken bir araştırma alanıdır. Bu amaçla yapılan ilk yaklaşımlar, polimerin uygun iletken maddelerle karışımlarının hazırlanmasına yöneliktir. Denenen yöntemlerden biri, polimerlere metal tozları gibi parçacıkların katılması ve iletkenliğin polimer örgüsüne sokulan metal faz üzerinden sağlanması olmuştur. Polimer içerisinde uygun bir toz çözüp iyonik iletkenlikten yararlanmak bir başka yaklaşımdır. Her iki yöntemde de polimer, iletkenliği sağlayan parçacıklar için bir bağlayıcı faz olarak işlev yapar ve kendisi elektrik iletimine katılmaz. Sözü edilen yöntemlerle polimerlere ancak belli düzeyde iletkenlik kazandırılabilir.

Yukarıda değinilen iki yaklaşımda da polimerin kendisi yalıtkanlık özelliğini korur ve yalnız iletkenliği sağlayan diğer bileşen için taşıyıcı faz işlevi yapar. Bir polimerin kendisinin doğrudan elektriği elektronlar üzerinden iletebileceği, ilk defa poliasetilen üzerine yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır. Poliasetilen, uzun yıllardır iletken olmadığı bilinen ve normalde. Poliasetilen 1958’de ilk kez Natta ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir (Natta vd., 1958). Bu bileşik 1967’ ye kadar bilimsel bir merak olarak kalmıştır. Tokyo Teknoloji Enstitüsü öğrencisi olan Hideki Shirakawa, bir hata sonucu gümüş renkli bir film olarak poliasetileni sentezlemiştir. Bu sentezde Ziegler Natta katalizörü olan $Ti(O-n-Bu)_4^t-Et Al$ ’nin 1000 kat daha fazla kullanıldığı belirlenmiştir. 1977 yılında Shirakawa, MacDiarmid ve Heeger; daha sonraki çalışmalarında Ziegler-Natta katalizörü kullanılarak metalik görüntüde ancak yeterince iletken olmayan gümüş renginde poliasetilen filmlerinin; klor, brom ve iyot buharlarıyla reaksiyonu sonucu mekanik özelliklerinin iyileştiğini ve ilk hallerinden 10^9 kat daha fazla iletken olabildiklerini görmüşlerdir (Shirakawa vd., 1977). Bu metotla dop edilmiş poliasetilenin iletkenliğini $10^5 S/m^2$ ’ye kadar çıkarmışlardır. Bu değer en iyi yalıtkan materyallerden biri olan teflonun iletkenliği ($10^{-18} S/cm$)’den çok yüksektir ve metallerin iletkenlik değerine yakındır. Bu gelişmeler sonucunda “İletken Polimer” terimi ortaya atılmıştır (Heinze, 1991). Shirakawa, MacDiarmid ve Heeger iletken polimerler konusunda yaptıkları çalışmalardan dolayı 2000 yılı Kimya Nobel Ödülünü kazanmışlardır.

Poliasetilenin işlenebilirliğinin zayıf olması ve iletkenliğinin açık hava koşullarında çok hızlı azalması uygulama alanlarında sınırlamalar getirmiştir. Bu yüzden, çevresel kararlılığı daha iyi ve hem kimyasal hem de elektrokimyasal yöntemlerle kolaylıkla sentezlenebilen diğer iletken polimerler ilgi çekmiştir. Böylece polipirol (PPy) (Diaz vd., 1979), politiyofen (PT) (Tourillon ve Garnier, 1982), polifenilen vinilen (Capistran vd., 1984) ve polianilin (Diaz ve Logan, 1980) (Şekil 4.2) gibi yeni iletken polimerler sentezlenmiştir.

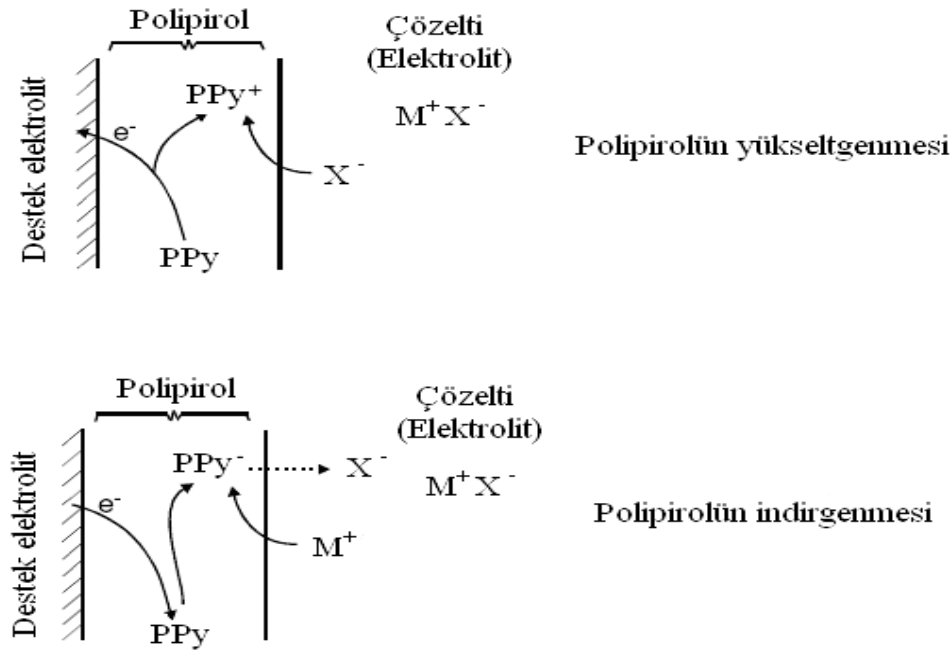


Şekil 4.2. İletken Polimerler: (a) Poliasetilen, (b) Polipirol, (c) Politiyofen, (d) Polifenilen vinilen ve (e) Polianilin.

İletken polimerler, son yıllarda kimyacı ve fizikçiler tarafından en çok çalışılan materyaller olmuştur. Polipirol (PPy), bu iletken polimerler arasında katı faz cihazlar ve elektronikler gibi çok çeşitli uygulamalarda kullanılabilmesi nedeniyle en çok çalışılanıdır (Tourillon., 1986).

Polipirol yirmi yıldan fazla süredir iletken polimerler içerisinde en çok çalışılanıdır. Pirol ilk kez 1916'da (Angeli, 1916; Angeli ve Alessandri, 1916) H_2O_2 ile yükseltgenerek, pirol siyahı olarak bilinen amorf bir toz olarak polimerleştirilmiştir. Polipirol, elektrokimyasal olarak ince film halinde sentezlendiğinde bu konuya olan ilgi daha da artmıştır. Polipirol siyahı platin elektrot üzerinde sülfirik asitli ortamda elektrokimyasal olarak ilk kez Dall'Ollio (Dall'Ollio vd., 1968) tarafından sentezlenmiştir. polipirol, kimyasal veya elektrokimyasal yolla sentezlenebilmektedir. Kimyasal yöntemde, örneğin Fe^{+3} gibi bir yükseltgen kullanılırsa toz halinde polipirol elde edilir. Erimez ve çözünmez olduğu için bu yolla elde edilen toz polipirolün işlenmesi söz konusu değildir, presleme gibi yöntemlerle ancak belli şekillere sokulabilir. Polipirol filmler, pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu ile hazırlanır. Bu amaçla farklı elektrot tipleri yüzeyinde, farklı boyutlarda ve

kalınlıklarda polipirol filmler elde edilir. Polipirol filmlerin mekanik özellikleri diğer iletken polimerlerden iyidir, atmosfer koşullarında daha kararlıdır. Laboratuvar koşullarında polipirol filmler, basit bir elektroliz hücresi ve farklı tipte elektrotlarla, destek elektrolit içeren uygun polimerizasyon ortamlarında +1 Voltluk potansiyel altında oluşturulurlar. İletken karakterinden dolayı elektrot yüzeyinde oluşan polipirol film, pirolün ileri polimerizasyonunu engellemez, elektroliz zamanı değiştirilerek film kalınlığını kontrol etmek mümkündür. Genel olarak polipirolün elektriksel iletkenliği 100 S/cm düzeyindedir ve değişik formlarda ticari polipirol üretimi yapılmaktadır.



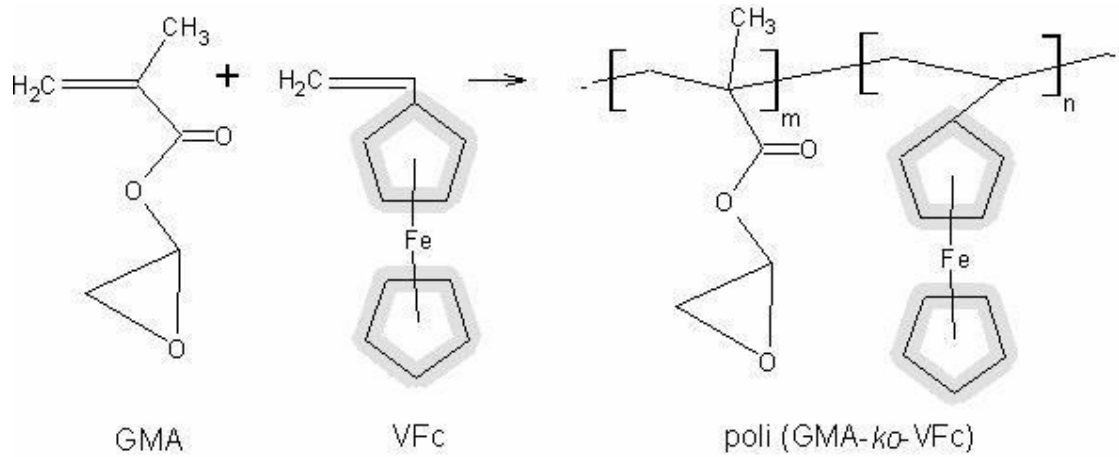
Şekil 4.3. Bir Polipirol Filminin Elektrokimyasal Olarak İndirgenmesi ve Yükseltgenmesine Ait Şematik Gösterim.

Diğer taraftan, ferrosen gibi organometalik materyaller, organik türler ve metallerin kombinasyonu ile oluşmaları nedeniyle, gelecekte kullanılacak elektronikler ve optik cihazlar gibi alanlarda organometalik polimer sistemlerini kullanışlı hale getirmektedir (Nalwa., 1997). Organometalik bileşikler, doğrusal olmayan optik cihazlar (Whittall vd., 1998), ışık emisyon diyotları (Grenier vd., 1996), elektrokimyasal sensörler (Sen vd., 2004), moleküler magnetler (Miller vd., 1996), ince film transistörleri (Dodabalapur vd., 1995), ve kimyasal reaksiyonlar için katalizör olarak kullanılabilmektedirler. Metallosen özellikleri ile elektroaktif polimerlerin özelliklerinin birleşmesi oldukça ilgi çeken bir konu olmuştur. Polipirol (PPy) gibi iletken polimerlerin işlenebilirlik, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin iyileştirilebilmesi için oldukça fazla çalışmaya konu olmuştur (Mravcakova vd., 2006). Son yirmi yıl boyunca polipirol ile çalışmalar özellikle işlenebilirlik ve kararlılık gibi fiziksel özelliklerinin geliştirilmesi üzerine olmuştur. Bu konudaki birçok çalışma polipirol türevleri, blendleri ve kompozitleri üzerinedir (Yang vd., 1996; Omastova vd., 1998; Papathananassiou vd., 2002). Polipirol en çok şarj edilebilir piller (Sanchez vd., 1997), iletken tekstiller (Kuhn vd., 1995) ve gaz ayırma proseslerinde membran olarak (Lin vd., 1998) kullanılabilmektedir. Kompozit materyaller hazırlandığı zaman, polimerin mekaniksel özellikleri iyileştirilirken iletkenlik özellikleri de korunmalıdır. Yani, iki polimer matriksin kombinasyonu, ilginç elektriksel ve mekaniksel özellikleri olan yeni bir polimerin oluşturulmasına izin vermelidir. İletken polimerlerin mekaniksel özelliklerini iyileştirmek için ticari yalıtkan polimerlerle kompozitleri hazırlanmaktadır. Polipirol (PPy) gibi iletken polimerlerle, poli (vinil klorür) (DePaoli vd., 1984), poli (vinil alkol) (Lindsey ve Street., 1984), poliüretan (Chiu vd., 1992) ve polikarbonat (Wangvd., 1990) ya da poli (etilen-vinil alkol) (Migahed vd., 2004) ile kompozitleri hazırlanarak, bu materyallerin yapısal ve elektriksel özellikleri geliştirilmeye çalışılmıştır.

4.1.1 Medyatör Bağlı Polimerler

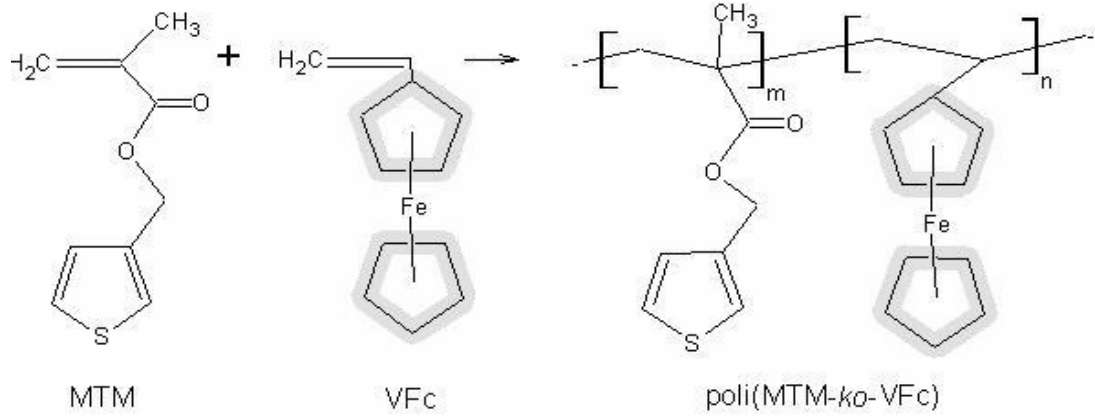
Son yıllarda polimerlerin biyosensör uygulamalarında sıklıkla kullanılmaya başlaması polimer yapılarına medyatör özelliği gösteren çeşitli yapıların entegre edilmesini beraberinde getirmiştir. Polimer yapılarına ko polimer olarak bağlanan medyatörler, elektropolimerizasyon ortamına atılan medyatörlere göre daha stabil elektrotlar meydana getirmiştir ve bu yüzden kullanım alanları hızla yayılmaktadır. Bu çalışmamızda vinylferrocene medyatörü bağlanmış epoksi ve tiyofen tabanlı kompozitler kullanılmıştır.

Polyglycidylmethacrylate-co-vinylferrocene (PolyGMA-co-VFC) GYTE'ye bağlı Kimya bölümünden sağlanmıştır.



Şekil 4.4 .(PolyGMA-co-VFC)' nin sentezi.

Polymethylthionylmethacrylate-co-vinylferrocene(PolyMTM-co-VFC)
GYTE'ye bağı Kimya bölümünden sağlanmıştır.



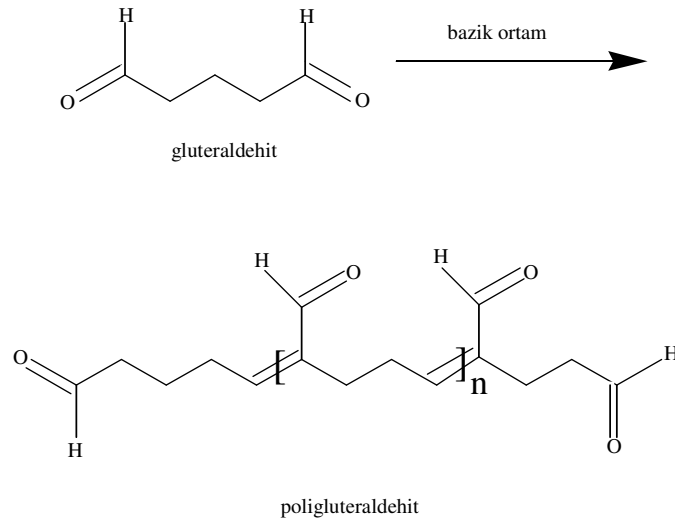
Şekil 4.5 .(PolyMTM-co-VFC)' nin sentezi.

4.2 Poliglutaraldehit ve Biyosensör Uygulamalarında Kullanımı

Glutaraldehit (1,5- pentandial; $\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$) enzim immobilizasyonu ve biyosensör uygulamalarında yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcı bir reaktiftir. Glutaraldehit çözelti şartlarına bağlı olarak çeşitli kimyasal yapılara sahiptir. Yapılan çalışmalar ticari GA çözeltilerinin (%25 ya da %70) çok bileşenli bir karışım olduğunu göstermiştir. Bu ticari çözeltilerdeki GA'in pH'sı bazı aldehit gruplarının kısmi olarak karboksilik aside yükseltgenmesinden dolayı 3.1'dir. Saf formunda 280 nm'de maksimum absorbans göstermesine rağmen polimerik safsızlıkların bulunduğu formları 235 nm'de ikinci bir maksimum absorbans göstermektedir. GA'in sulu çözeltisinin NMR analizleri sonucu beş farklı yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Bu yapılar; serbest GA (1), düzlemsel mono- (2) ve dihidratlar (3), halkasal hemiasetal (4) ve oligomerdir (5). Çözelti ortamındaki her bir yapı çapraz bağlanma reaksiyonlarına farklı katılır ve farklı ürünlerin oluşumu gözlenir.

Aldehitler proteinlerdeki lisin gruplarıyla Schiff bazı oluşturur. Schiff bazı asidik şartlar altında kararsızdır ve aldehit ve amin oluşumu için bozunur. Bu nedenle, Schiff bazını kararlı ikincil amin yapısına dönüştürmek için NaBH_4 gibi indirgeyici bir reaktif kullanılır. Bu indirgenme reaksiyonu Schiff bazı oluşumuyla benzer bir reaksiyon vermeyen halkasal hemiasetal ve oligomerik yapıların ürünlerini kararlı hale getirmek için gerekli değildir.

Poliglutaraldehit; biyosensör teknolojisinde, enzim immobilizasyon sistemlerinde, enzim modifikasyonunda kullanılan çapraz bağlayıcı bir bileşiktir. Üzerindeki karbonil grupları sayesinde poliglutaraldehit, amin grubu bulunduran bileşiklerle Schiff bazı reaksiyonu yaparak kovalent olarak bağlanır. Polimerizasyon reaksiyonu bir aldol kondenzasyon reaksiyonudur (Şekil 4.6).

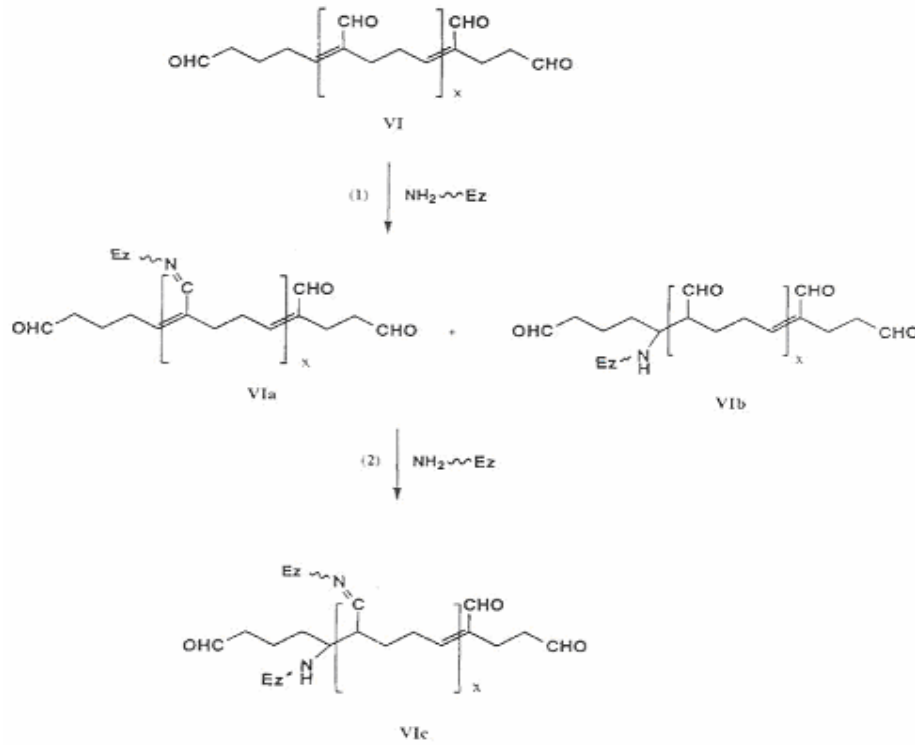


Şekil 4.6. Gluteraldehitin Polimerizasyon Reaksiyonu.

Poliglutaraldehit pekçok metodla elde edilebilir. Bazik veya nötr şartlarda pH 7-13.5 aralığında suda çözünen veya çözünmeyen, molekül ağırlığı 12.000-20.000'e değişen polimerler oluşur. Ayrıca yapılarda karboksil, hidroksil, aldehit grupları pH' a bağlı olarak değişen yoğunlukta olmaktadır. Karbon-karbon çifte bağları ise karbonil grupları ile orantılı miktarda bulunmaktadır. Suda çözünen poliglutaraldehitler, suda çözünmeyenlere kıyasla daha fazla karboksil grubu içermektedir. Bunun nedeni ortamın pH' sına bağlı olarak oluşan Cannizzaro tepkimesidir. Poliglutaraldehit 75–160 C° sıcaklığa maruz kaldığında ağırlığının %3.6' sını kaybetmektedir. Sıcaklık 160–300 C° arasında ise ağırlığının %37' sini kaybetmektedir. Poliglutaraldehit sulu çözeltilerinde 233 ve 285 nm'lerde pik vermektedir.

Polimerizasyon gerçekleştiğinde karbon-karbon çift bağı miktarı artacağından 233 nm'de optiksel yoğunluk artacaktır (Karbon- karbon çift bağı 233 nm' de karakteristik pik verir). Hidroksil grupları bu çifte bağlarla reaksiyon verebilmektedir. Aldehit grupları 285 nm'de absorbans verir. Aldol kondenzasyon reaksiyonu gerçekleştikçe karbonil grubu miktarı azalmaktadır.

Glutaraldehitin immobilizasyonda çeşitli kullanımları mevcuttur. Bunları şöyle sıralayabiliriz: taşıyıcı üzerindeki amino gruplarının ön aktivasyonu, adsorpsiyondan sonra taşıyıcı matrikse enzimlerin çapraz bağlanması, suda çözünabilir polimerlerle çapraz bağlanmış jel oluşturma ve suda çözünmeyen membran ya da suda çözünmeyen oligomerlerin içerisinde enzimlerin çapraz bağlanması, ayrıca GA bifonksiyonel çapraz bağlayıcı reaktifler arsında en yaygın kullanılan materyaldir



Şekil 4.7. Poliglutaraldehit Kullanarak Enzim İmmobilizasyonun Mekanizması.

İmmobilizasyonda glutaraldehite nazaran poliglutaraldehitin tercih edilmesinin birçok sebebi vardır. Glutaraldehitle enzim veya aminli bileşiklerin immobilizasyonunda oluşan reaksiyon, Schiff bazı reaksiyonu veya asetal reaksiyonlardır. Oluşan bağlar kararsız yapıdadır. Ortam pH' ından etkilenirler. Schiff bazı indirgenme reaksiyonu ile ancak sekonder amin durumunda kararlıdır. Bu işlem hem maliyetli, hemde enzim veya diğer biyolojik materyaller için bozucu etkiye sahiptir. Poliglutaraldehitte ise immobilizasyon için iki tarz reaksiyon oluşabilir. Biri yukarıda anlatıldığı Schiff bazı oluşumu diğeri ise Michael katılması denilen konjuge çift bağa enzimin amin gruplarının katılmasıdır. İki bağda rezonans stabilizasyonu nedeni ile kararlıdır. İndirgenme reaksiyonuna gerek duyulmaz

5.MATERYAL VE METOD

5.1. Materyal

5.1.1.Kullanılan Kimyasallar

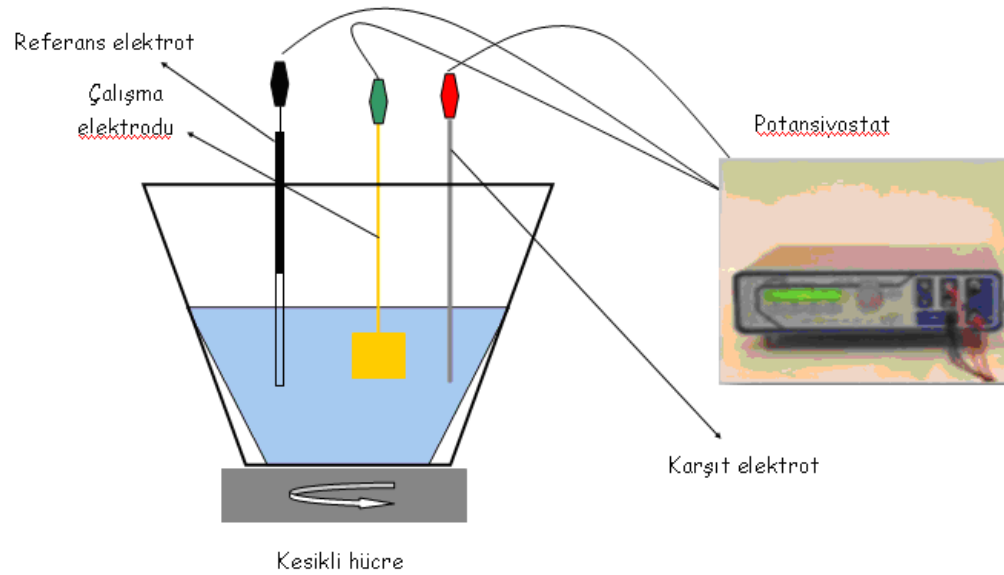
Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasallar çizelge 5.1. de verilmiştir:

Çizelge 5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.

MALZEMENİN ADI	MARKASI
Tyrosinase (E.C.1.14.18.1)	Fluka
SDS (Sodyum dodesil Sülfat)	Sigma
Lityum Klorid	Merck
Pirol %99	Sigma
Gluteraldehit %25	Merck
N, N-dimetil formamid (DMF)	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Fenol	Sigma
p-benzokinon	Sigma
Hidrokinon	Sigma
2, 6-dimetoksifenol	Sigma
2-klorofenol	Sigma
3-klorofenol	Sigma
4-klorofenol	Sigma
2-aminofenol	Sigma
4-metoksifenol	Sigma
Pirokatekol	Sigma
Guaiakol (2-metoksifenol)	Sigma
m-kresol	Sigma
o-kresol	Sigma
p-kresol	Sigma
Katekol	Sigma
4-asetamidofenol	Sigma
Pirogallol	Sigma

5.1.2. Çalışma Sistemi

Kesikli sistem, bir reaksiyon hücresi içerisine daldırılmış üçlü elektrot sisteminden oluşmaktadır. Kimyasal olarak enzim bağlanmış çalışma elektrodu ile birlikte, referans elektrot ve karşıt elektrot hücreye daldırılarak sisteme sabit bir elektrik potansiyeli uygulanmıştır. Belli hacimde 100 mM, pH 7.0 fosfat tamponu içeren hücreye farklı konsantrasyonlarda fenolik çözeltiler eklenerek reaksiyon sonucu oluşacak olan akım değerleri ölçülmüştür(Şekil 4.1). Bu akım değişimlerinden yararlanılarak, eklenen fenolik konsantrasyonuna karşı akım değişimleri grafiğe geçirilmiş, böylelikle ölçüm için gerekli kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Kesikli sistemde kullanılan elektrotlar; Karşıt elektrot olarak platin elektrot, referans elektrot olarak 3 M KCl içindeki Ag/AgCl elektrotu ve çalışma elektrodu olarak cam karbon elektrot (GC) CH Instruments firmasından temin edilmiştir. Kesikli sistem deneyleri için CHI 800B marka potansiyostat kullanılmıştır.



Sekil 5.1. Çalışma Sistemi.

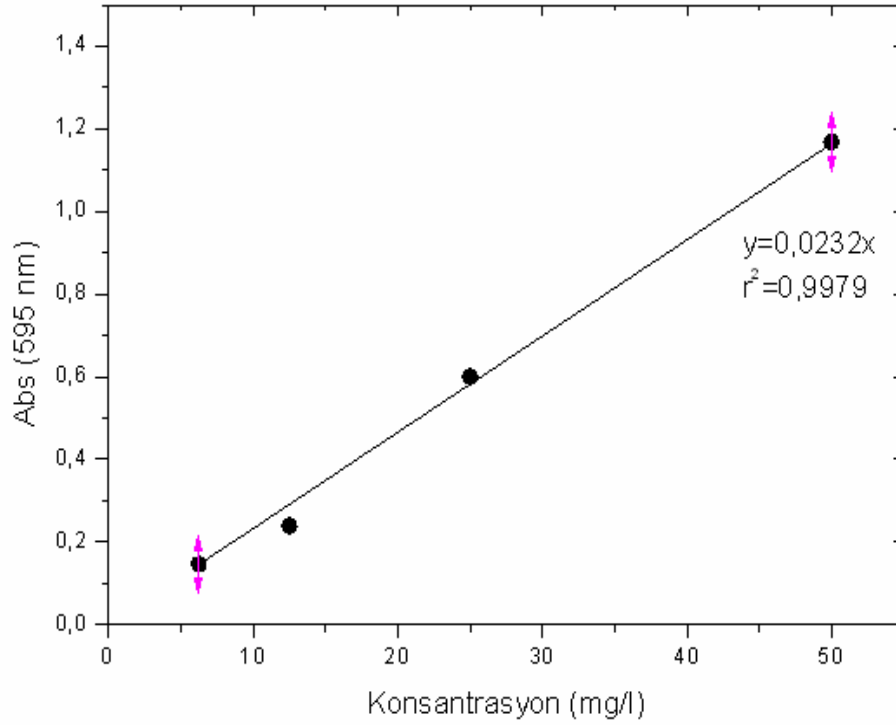
5.2.Metot

5.2.1. Bradford Protein Analizi

Metotta esas olarak Coomassie Brilliant Blue boyası kullanılır. Bu boya, ortamda bulunan proteinlerle kompleks oluşturarak ortamdaki proteinin yoğunluğuna göre açık veya koyu mavi renk verir. Metot, oluşan renklerin 595 nm dalga boyunda UV-Spektrofotometrede okunmasına dayanır. Bu analiz 0-50 ppm aralığında protein içeren çözeltilere uygulanabilmektedir.

Analizde kullanmak üzere 100 mg Coomassie Brilliant Blue, 50 mL metanolde çözülmüştür. Çözünen boya 100 mL %85'lik fosforik asite ilave edilerek karıştırılmış ve toplam hacim saf su ile 200 mL'ye tamamlanmıştır . Bu çözeltiden 21 mL alınmış, üzerine 27 mL saf su ile eklenerek karıştırılmış ve boya protein analizi için kullanıma hazır hale getirilmiştir

Protein kalibrasyonunda standart protein olarak Bovin Serum Albumin kullanılmıştır. Standart proteinden, konsantrasyonları 6,5, 12,5, 25 ve 50 mg/L olacak şekilde 4 çözelti hazırlanmıştır. Her bir çözeltiden deney tüplerine 1,5 mL alınmış ve üzerlerine 1,5 mL hazırlanan boyadan ilave edilmiştir. Aynı bir deney tüpüne 3mL saf su ve 3 mL boya eklenip karıştırılmıştır. UV-spektrofotometre dalga boyu 595 nm olacak şekilde ayarlanmış ve saf su içeren karışıma göre sıfırlanmıştır. Her bir örneğin 595 nm dalga boyunda absorbansları okunmuştur. Protein konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Protein kalibrasyon eğrisi Şekil 5.2'de gösterilmektedir.



Şekil 5.2. Protein Kalibrasyon Eğrisi

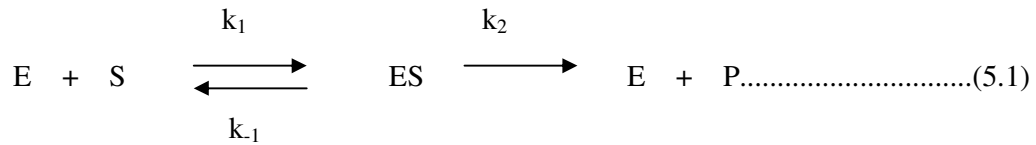
5.2.2. İmmobilize Enzim Miktarının Belirlenmesi

İmmobilize enzim miktarı, Bölüm 5.2.1’de açıklanan metota göre Poly(GMA-co-VFc) polimeri ile hazırlanmış çalışma elektrodu için belirlenmiştir. Bunun için iki adet deney tüpüne 1,5 mL saf su alınmış ve üzerlerine 1,5 mL hazırlanan boyadan ilave edilmiştir. Ayrı bir deney tüpüne 1480 μ L saf su, 20 μ L tyrosinase enzim çözeltisi (6 mg/ mL PBS) ve 1,5 mL boya eklenip karıştırılmıştır. UV-spektrofotometre dalga boyu 595 nm olacak şekilde ayarlanmış ve saf su içeren karışıma göre sıfırlanmıştır. Enzim çözeltisi içeren örneğin 595 nm dalga boyunda absorbansı okunmuştur. Absorbans değeri, protein kalibrasyon eğrisi denkleminde yerine konup örnekteki protein miktarı belirlenmiştir.

Bu metotla birlikte elektrot yüzeyinden enzim kaybı olmadığı varsayımı yapılmıştır. Bunu kanıtlamak için sızdırmazlık deneyi yapılmıştır. Hazırlanan elektrot saf su içerisinde 10-15 dk. bekletilmiş ve daha sonra bu bekletilen saf sudan 1,5 ml örnek alınarak üzerine 1,5 ml boya eklenmiş ve kör numuneye karşı (1,5 ml saf su- 1,5 ml boya) UV-spektrofotometre dalga boyu 595 nm’ de okutulmuş ve absorbans değerine bakılarak sızma olup olmadığı kontrol edilmiştir.

5.2.3. Enzim Kinetiği - Akıma Göre Modifiye Edilmiş Michealis-Menten Eşitliği ve I_M - K_M Parametrelerinin Belirlenmesi

Enzimatik tepkimelerin kinetiği, “Michealis-Menten” adıyla bilinir. Substrat, enzim molekülüne bağlanarak enzim-substrat (ES) kompleksi oluşturur. Bu kompleks kararsız olup, bozularak ürün verir ve enzim değişmeden açığa çıkar (Erarslan, 2003).



Enzimatik tepkimelerde ürün oluşum hızı aşağıdaki gibi ifade edilir:

$$V = \frac{dP}{dt} = -\frac{dS}{dt} = k_2 \times (ES) \dots\dots\dots(5.2)$$

$$\frac{dES}{dt} = k_1 \times (E) \times (S) - k_{-1} \times (ES) - k_2 \times (ES) \dots\dots\dots(5.3)$$

Enzimin korunumu:

$$(E_0) = (E) + (ES) \dots\dots\dots(5.4)$$

ES kompleksi kararsız bir molekül olup, kısa zamanda $E + P$ ' ye dönüşür. Kararlı halde; $\frac{d(ES)}{dt} = 0$ olur. (5.3) eşitliğinde gerekli düzenlemeler yapılırsa,

$$0 = k_1 \times [(E_0) - (ES)] \times (S) - k_{-1} \times (ES) - k_2 \times (ES) \dots \dots \dots (5.5)$$

$$0 = k_1 \times (E_0) \times (S) - k_{-1} \times (ES) \times (S) - k_{-1} \times (ES) - k_2 \times (ES) \dots \dots \dots (5.6)$$

$$0 = k_1 \times (E_0) \times (S) - (ES) \times [k_{-1} \times (S) + k_{-1} + k_2] \dots \dots \dots (5.7)$$

$$(ES) = \frac{k_1 \times (E_0) \times (S)}{k_{-1} \times (S) + k_{-1} + k_2} \dots \dots \dots (5.8)$$

(5.2) eşitliğinden, $(ES) = \frac{V}{k_2}$ yazılıp (5.8) denkleminde yerine konursa:

$$V = \frac{k_1 \times k_2 \times (E_0) \times (S)}{k_{-1} \times (S) + k_{-1} + k_2} \dots \dots \dots (5.9)$$

$$V = \frac{k_2 \times (E_0) \times (S)}{(S) + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \dots \dots \dots (5.10)$$

(5.10) eşitliğinde $k_2 \times E_0$ yerine V_m , $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ yerine K_m yazıldığında eşitlik,

$$V = \frac{V_m \times S}{K_m + S} \dots \dots \dots (\text{Michealis-Menten Eşitliği}) \dots \dots \dots (5.11)$$

şeklini alır. (5.11) denklemini çarpma işlemine göre ters çevrilip düzenlenirse,

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m} \dots \dots \dots (\text{Lineweaver-Burk Eşitliği}) \dots \dots \dots (5.12)$$

elde edilir.

5.11 denkleminin biyosensörler için akıma göre modifiye edilmiş şekli;

$$I = \frac{I_m \times [S]}{K_m^{app} + [S]} \dots\dots\dots(\text{Vidal et al.2003}) \quad (5.13) \text{ dir.}$$

(5.13) denklemi çarpma işlemine göre ters çevrilip düzenlenirse,

$$\frac{1}{I} = \frac{K_m^{app}}{I_m} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{I_m} \quad (\text{Lineweaver-Burk Eşitliği}) \dots\dots\dots(5.14)$$

elde edilir.

Burada;

I: Biyosensörde elde edilen akım değerleri (μA)

I_m : Maksimum Akım (μA)

S: Substrat Konsantrasyonu (μM)

K_m^{app} : Biyosensörlerde Michealis-Menten sabiti (μM)

dir.

I_m ve K_m^{app} değerleri 5.14 denkleminde elde edilmiştir ve Çizelge 6.1’ de verilmiştir.

5.2.4. Çözeltilerin Hazırlanması

Ölçüm deneylerinde kullanılan 0.1 M LiCl (0,7 g LiCl/ 1L) içeren fosfat tamponu 100 mM ve pH 7.0 olarak K_2HPO_4 (10,75 g/1L) ve KH_2PO_4 (5,205/1L) kullanılarak hazırlanmıştır.

Ölçüm deneylerinde kullanılan enzim çözeltisi 3 mg Tyrosinase enzimi/ 500 μ L fosfat tamponu (100 mM ve pH 7.0) olacak şekilde hazırlanmıştır.

Ölçüm deneylerinde kullanılan Polyglycidylmethacrylate-co-vinylferrocene (PolyGMA-co-VFC) polimeri çözeltisi 0,06 gr/ 10 ml (DMF) olacak şekilde hazırlanmıştır.

Ölçüm deneylerinde kullanılan Polymethylthionylmethacrylate-co-vinylferrocene(PolyMTM-co-VFc) polimer çözeltisi 0,03 gr/ 5 ml (DCM) olacak şekilde hazırlanmıştır.

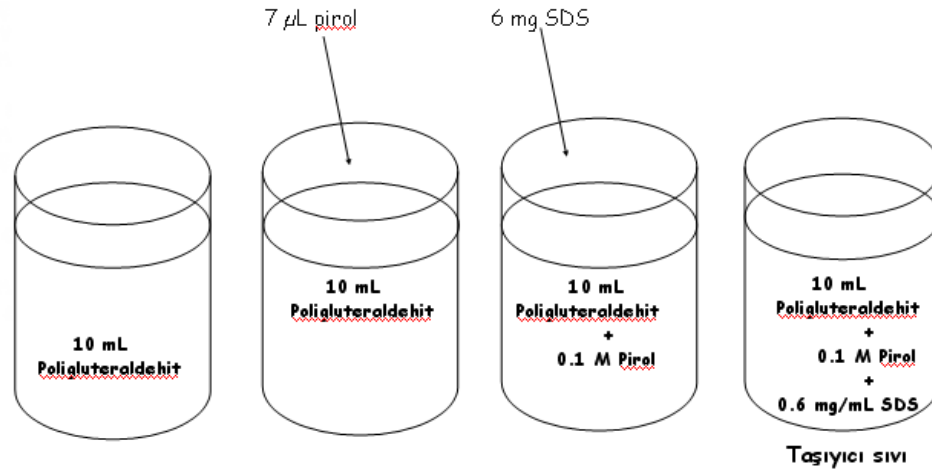
Poligluteralehit çözeltisi ; %25 lik gluteralehitten 50 ml alınarak (pH 3.52) NaOH ilavesi ile pH 10 seviyesine getirilmiş ve 30 dk. 600 rpm de karıştırılmıştır. Daha sonra HCl ilavesi ile pH 7 seviyesine indirilmiş ve çözelti kullanıma hazır hale gelmiştir.

Ölçüm deneylerinde kullanılan stok fenolik çözeltiler 20 mM olacak şekilde 100 mM ve pH 7.0 fosfat tamponunda hazırlanmıştır.

5.2.5. Poly(glycidylmethacrylate-co-vinylferrocene)/Tyrosinase/ Polygluteraldehit/Polypyrrol/Cam karbon{Poly(GMA-co- VFC)}/Tyr/PGA/PPy/GC Çalışma Elektrodunun Hazırlanması

Referans elektrot saf su ile yıkanmış ve sürekli olarak 3 M KCl çözeltisi içinde saklanmıştır. Karsıt elektrot olarak kullanılan platin elektrot ve çalışma elektrotu olarak kullanılan GC elektrotunun temizliği kadife disk üzerine bir miktar alümina tozu alınarak ve zımparalanarak yapılmıştır. Bu işlem 3 farklı boyuttaki(1-0,3-0,05 mikron) alümina tozları için tekrarlanmıştır.

Hazırlanmış olan (PolyGMA-co-VFC) çözeltisinden (0,06 gr/ 10 ml (DMF)) 2,5 μ L alınarak cam karbon elektrot yüzeyine damlatılmış ve solveni uçurulmuştur. Daha sonra enzim çözeltisinden (3 mg Tyrosinase / 500 μ L fosfat tamponu) 10 μ L damlatılmış ve kuruması beklenmiştir. Tamamen kuruduktan sonra enzim çözeltisinden tekrar 10 μ L damlatılmış ve kurutulmuştur. Kuruyan elektrot bir miktar saf su ile yıkanmış ve şekil 5.4 de gösterilen ortamda 0-1,2 V arasında 1 dk. polimerizasyona tabi tutulmuştur.

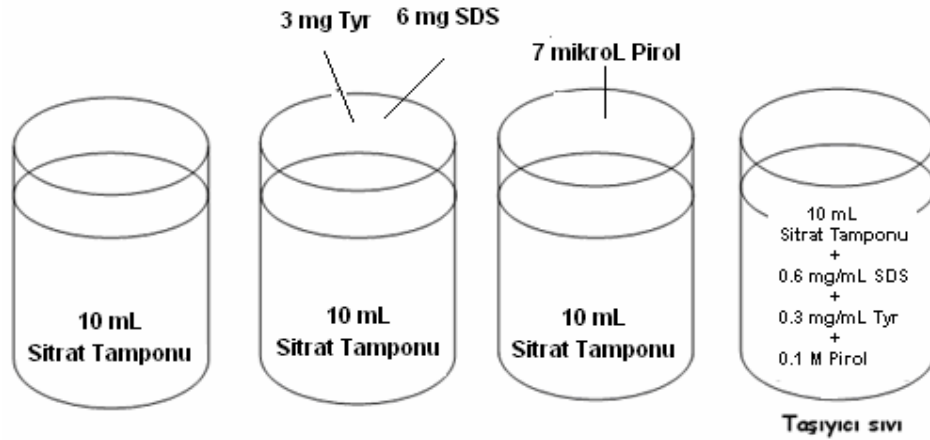


Şekil 5.3. Pirolün Polimerizasyonu İçin Hazırlanan Reaksiyon Ortamı

5.2.6. Poly(methylthionylmethacrylate-co-vinylferrocene)/Tyrosinase/ /Polypyrrol/Cam karbon{Poly(MTM-co -VFC)/Tyr/PPy/GC Çalışma Elektrodunun Hazırlanması

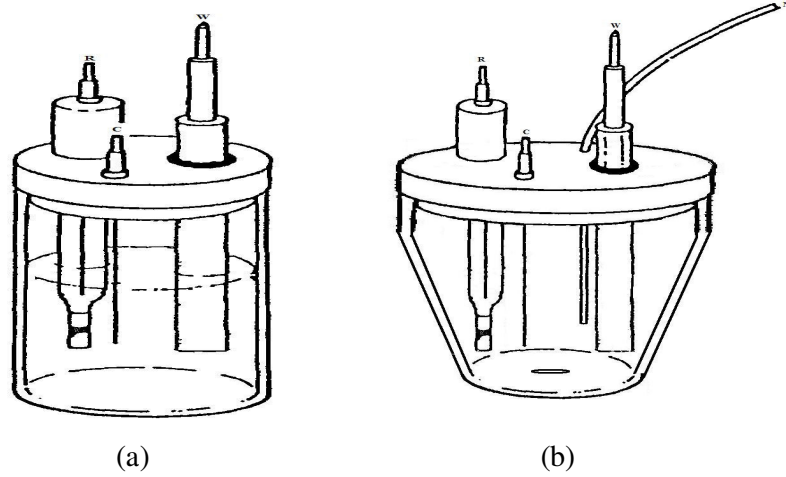
Referans elektrot saf su ile yıkanmış ve sürekli olarak 3 M KCl çözeltisi içinde saklanmıştır. Karsıt elektrot olarak kullanılan platin elektrot ve çalışma elektrotu olarak kullanılan GC elektrotunun temizliği kadife disk üzerine bir miktar alümina tozu alınarak ve zımparalanarak yapılmıştır. Bu işlem 3 farklı boyuttaki(1-0,3-0,05 mikron) alümina tozları için tekrarlanmıştır.

Hazırlanmış olan (0,03 gr/ 5 ml (DCM)) kompozit polimer çözeltisinden 2,5 μ L alınarak cam karbon elektrot yüzeyine damlatılmış ve solventi uçurulmuştur. Kuruyan elektrot bir miktar saf su ile yıkanmış ve şekil 5.5 de gösterilen ortamda 0-1,2 V arasında 1,5 dk. polimerizasyona tabi tutulmuştur.



Şekil 5.4. Pirol ve Tyrosinase Polimerizasyonu İçin Hazırlanan Reaksiyon Ortamı

Polimerizasyon çalışmalarımızda yaklaşık 10 mL hacimli (Şekil 5.5 (a)), amperometrik çalışmalarımızda ise yaklaşık 15mL hacimli (Şekil 5.5 (b)) cam hücreler kullanılmıştır.



Sekil 5.5. Çalışma Hücreleri. R; Referans Elektrot, W; Çalışma Elektrotu, C; Karsıt Elektrot.

5.3.Biyosensör Çalışmaları

GC elektrotu kullanılarak hazırlanan fenol biyosenörünün tüm ölçümleri amperometrik olarak alındı. Bunun için sabit tutulan potansiyelde arka arkaya artan konsantrasyonlarda fenolik çözeltileri eklemesi yapıldı ve akım değişimleri ölçüldü. Böylece fenolikler için kalibrasyon eğrileri elde edildi. Ölçümlerde üç elektrotlu sistem kullanıldı. Çalışma elektrotunun yanı sıra referans ve karsıt elektrot kullanıldı. Sisteme uygulanan potansiyel çalışma elektrotu ile referans elektrot arasında oluştu. Uygulanan potansiyelin sabit kalmasını sağlayan karsıt elektrot olarak platin kullanılmıştır. Çalışma potansiyelinin ve pH değişiminin etkisi amperometrik olarak ölçüldü.

Amperometrik çalışmaların tümünde 10 mL fosfat tampon çözeltisi içeren hücrede eklemeler yapıldı. Hücrenin içindeki bu çözelti dakikada 100 devirde dönen manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırıldı. Dönüştürücü voltametri (CV) çalışmaları yine 10 mL durgun çözelti içeren hücrelerde yapıldı. Elde edilen sonuçlar ve bulgular tartışma bölümünde ele alınmıştır.

5.3.1.Potansiyel

Uygun çalışma potansiyelinin bulunması için kullanılan elektrot Bölüm 5.2.5'deki gibi hazırlanmıştır ve amperometrik analizler (-25)-(-150) mV aralığında potansiyeller uygulanarak 6 mM katekol eklemesi yapılmış ve akım değerlerindeki değişim gözlenmiştir.

Uygun çalışma potansiyelinin bulunması için kullanılan elektrot Bölüm 5.2.6'deki gibi hazırlanmıştır ve amperometrik analizler (100)-(750) mV aralığında potansiyeller uygulanarak 100 mM katekol eklemesi yapılmış ve akım değerlerindeki değişim gözlenmiştir.

5.3.2.pH

Uygun pH değerinin bulunması için kullanılan elektrot Bölüm 5.2.5' deki gibi hazırlanmıştır ve amperometrik analizler pH (5-9) aralığındaki asetat (pH 5), fosfat (pH 6-7-8) ve ches (pH 9) tamponlarında 6 mM katekol eklemesi yapılarak uygulanmış ve akım değerlerindeki değişim gözlenmiştir.

Uygun pH değerinin bulunması için kullanılan elektrot Bölüm 5.2.6' deki gibi hazırlanmıştır ve amperometrik analizler pH (5-9) aralığındaki asetat (pH 5), fosfat (pH 6-7-8) ve ches (pH 9) tamponlarında 100 mM katekol eklemesi yapılarak uygulanmış ve akım değerlerindeki değişim gözlenmiştir.

6.BULGULAR VE TARTISMA

6.1. İmmobilize Enzim Miktarı

Bölüm 5.2.2 de açıklanan metoda göre UV spektrofotometrede 595 nm de okunan absorbans değeri 0,4155 dir. Buna göre bölüm 5.2.1 de açıklanan metoda göre elde edilen kalibrasyon eğrisinin denklemi $y = 0.0232x$ olarak bulunmuştur. Absorbans değeri bu denklemde yerine konulursa ;

$$0.4155=0.0232 \times (6.1)$$

$x= 18 \text{ mg/L}$ olarak bulunur.

Tyrosinase enzim çözeltisi 6 mg/L PBS olduğu için, bu çözeltiye göre immobilize enzim miktarını belirlemek için kullanılan enzim miktarı 75 kat seyrelmiş olmaktadır. Bu yüzden;

$$x= 18 \times 75=1343 \text{ mg/L}$$
 olarak bulunur.

20 μL enzim elektrot yüzeyine damlatıldığı için immobilize olan enzim miktarı;

$$\frac{20(\mu\text{L}) \times 1343(\text{mg})}{10^6 \mu\text{L}} = 26,86 \mu\text{g}$$
 olarak bulunur.

Bölüm 5.2.2’ de belirtilen sızdırmalık deneyinde 595 nm’ de absorbans ölçülmemiştir. Bu da elektrot yüzeyinden enzim kaybının olmadığını göstermekte ve 26,86 μg enzimin tamamının immobilize olduğunu göstermektedir.

Hesaplanan bu değerler Poly(GMA-co-VFc) polimeri ile hazırlanan çalışma elektrodu için belirlenmiştir. Poly(MTM-co-VFc) polimeri ile hazırlanan çalışma elektrodunda tyrosinase enziminin sızma yaptığı tespit edilmiştir.

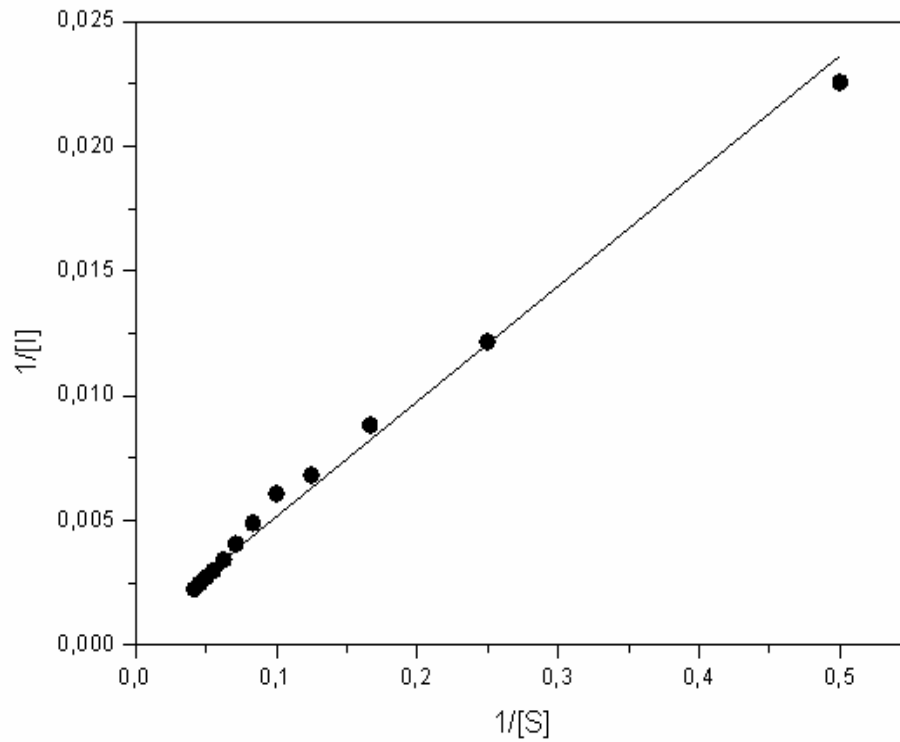
6.2 I_M - K_M Parametrelerinin Belirlenmesi

I_m ve K_m^{app} değerleri ;

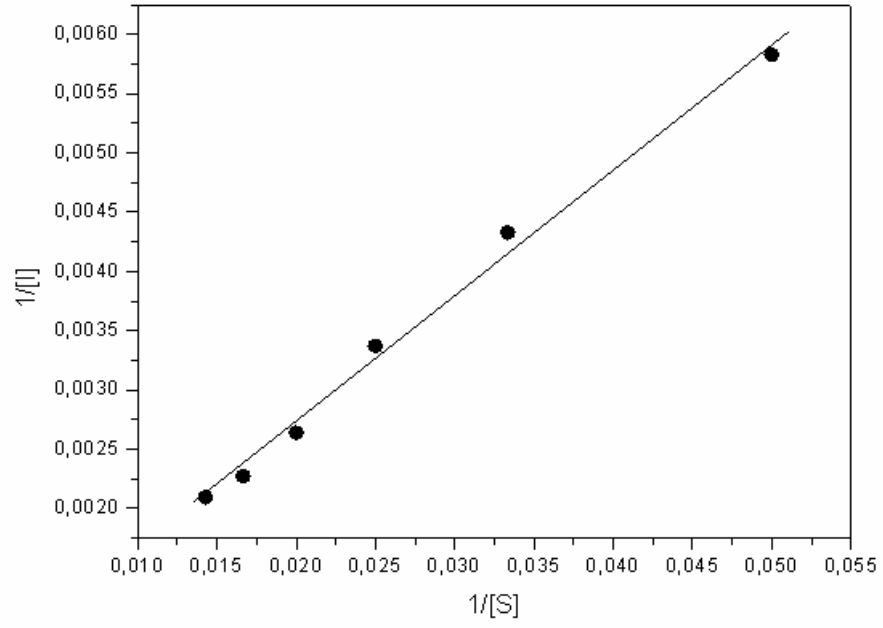
Bölüm 5.2.3' de verilen 5.14 denklemine göre;

Poly(GMA-co-VFc) polimeri ile hazırlanan çalışma elektrodu için ; $\frac{1}{I}$ değerlerine

karşılık $\frac{1}{[S]}$ değerleri grafiğe geçirilerek elde edilmiş ve Çizelge 6.1' de verilmiştir.



Şekil 6.1. 4-metoksifenol için Lineweaver-Burk Eğrisi



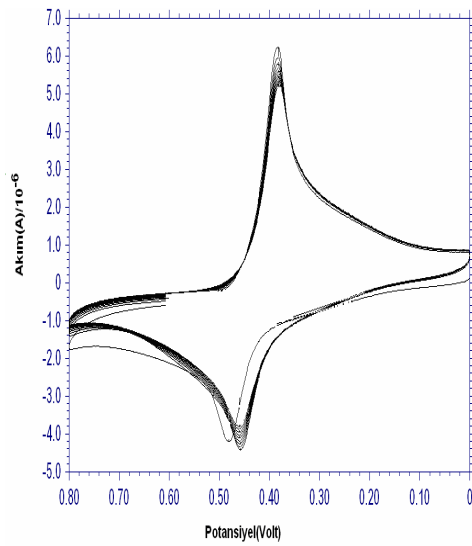
Şekil 6.2. fenol için Lineweaver-Burk Eğrisi

Çizelge 6.1. I_m ve K_M Değerleri

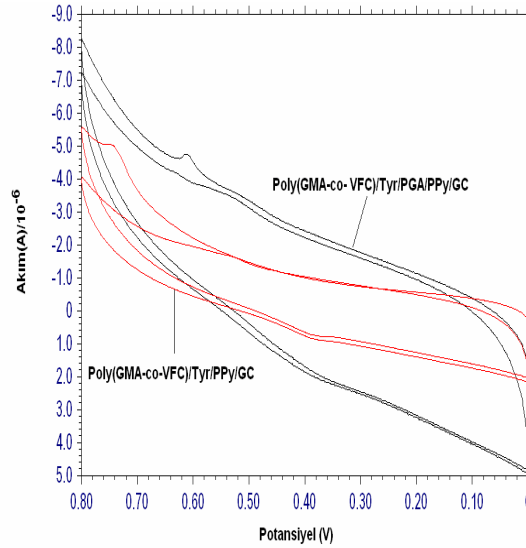
<i>Fenolik tür</i>	I_m (μA)	K_m^{app} (μM)
fenol	16,66	1786,33
4-metoksifenol	11,11	491,1
<i>m</i> -kresol	2,5	109
katekol	0,175	29,07
pirokatekol	0,555	38,44

6.3. Polyglycidylmethacrylate-co-vinylferrocene/Tyrosinase/ Polygluteraldehit/Polypyrrol/Cam karbon{Poly(GMA-co- VFC)/Tyr/PGA/PPy/GC Çalışma Elektrodu Bulguları

Bölüm 5.2.5' de hazırlanışı anlatılan çalışma elektrodu kesikli sistemde 18 farklı fenol türünün tespit edilebilmesi için kullanılmıştır. Poly (GMA-co-VFC)/Tyr/GC ve Poly(GMA-co-VFC)/Tyr/PGA/PPy/GC çalışma elektrotlarının elektropolimerizasyonlarına ait dönüşümlü voltametri grafikleri Şekil 6.3 ve Şekil 6.4 de verilmiştir. (0,1 V tarama hızı)



Şekil 6.3. Poly (GMA-co-VFC)/Tyr/GC

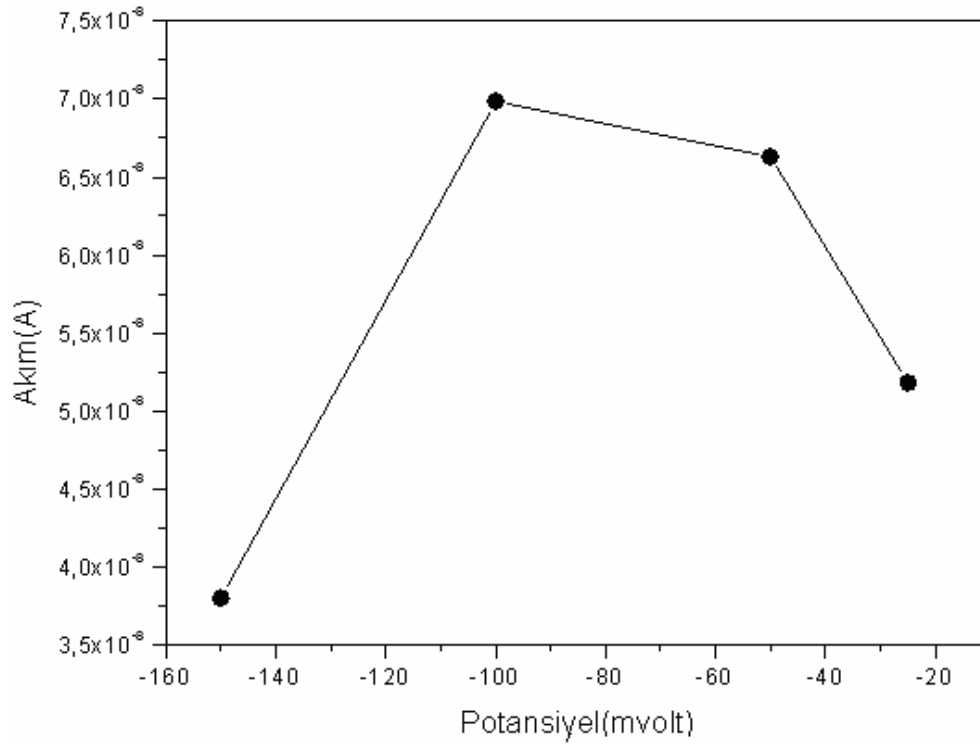


Şekil 6.4. Poly(GMA-co-VFC)/Tyr/PGA/PPy/GC
Poly(GMA-co-VFC)/Tyr/PPy/GC

Şekil 6.3 ve 6.4 de görüldüğü gibi kimyasal olarak tyrosinase bağlanmış olan elektrot yüzeyine polipirrol elektropolimerizasyonunda poligluteraldehit kullanıldığı zaman polimerizasyonun daha başarılı olduğu anlaşılmaktadır. Bu da kullanılan poligluteraldehitin etkisini açıkça ortaya koymaktadır.

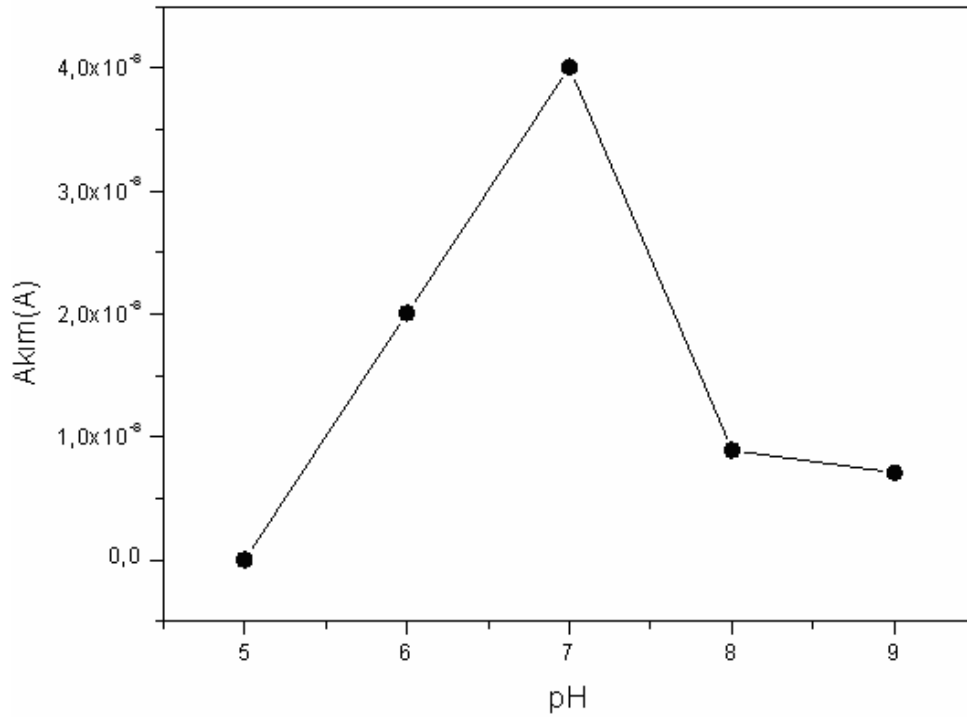
Hazırlanan Poly(GMA-co-VFC)/Tyr/PGA/PPy/GC çalışma elektrotuna farklı potansiyeller (-25m V, -50m V, -100m V,-150m V) uygulanmış ve akım değişimine bakılmıştır. Çıkan sonuçlar Şekil 6.5’de verilmistir.

Uygun çalışma potansiyelini belirlemek amacıyla potansiyel çalışmasında reaksiyon ortamına 6 mM katekol eklemesi yapılmış ve akım değerine bakılmıştır. Şekil 6.5 de görüldüğü gibi düşük potansiyelde akımında düşük olduğu, potansiyel arttıkça akımında arttığı ve -100m V da optimum değere ulaştığı görüldü.



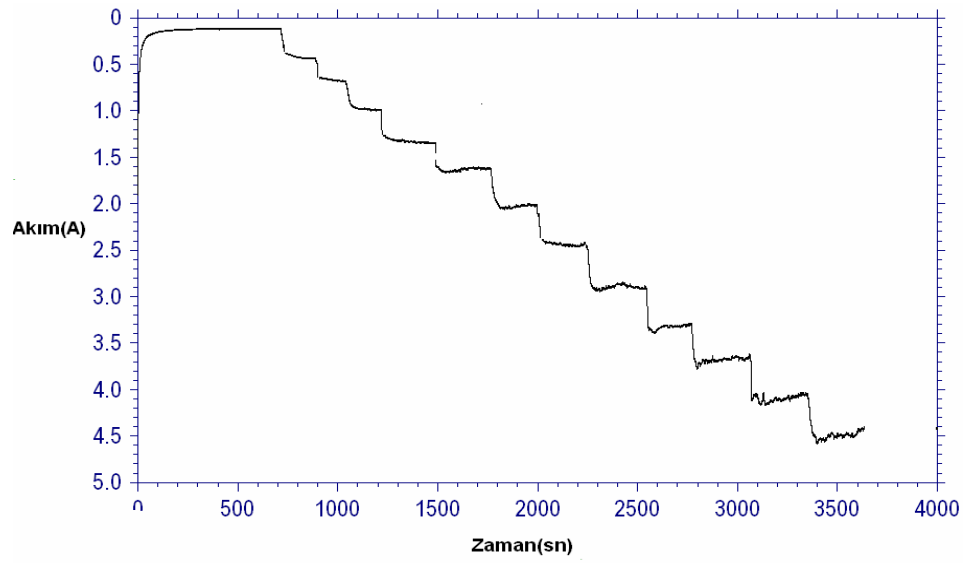
Şekil 6.5. Potansiyel-Akım İlişkisi

Enzimatik reaksiyonda fenoliklere alınan amperometrik yanıt üzerine tampon pH sınır etkisini incelemek amacıyla 5-9 pH aralığında çalışılarak elde edilen yanıtlar Şekil 6.6 de gösterilmiştir. pH'nın akıma etkisini görmek için reaksiyon ortamına 6 Mm katekol eklemesi yapılmıştır. Şekilden de anlaşıldığı gibi elde edilen sonuçlardan en yüksek amperometrik yanıt karşılık gelen optimum pH'nın 7.0 olduğu gözlenmiştir. Daha düşük ve yüksek pH'larda enzim aktivitesi azaldığından alınan yanıt değeri de düşmektedir.

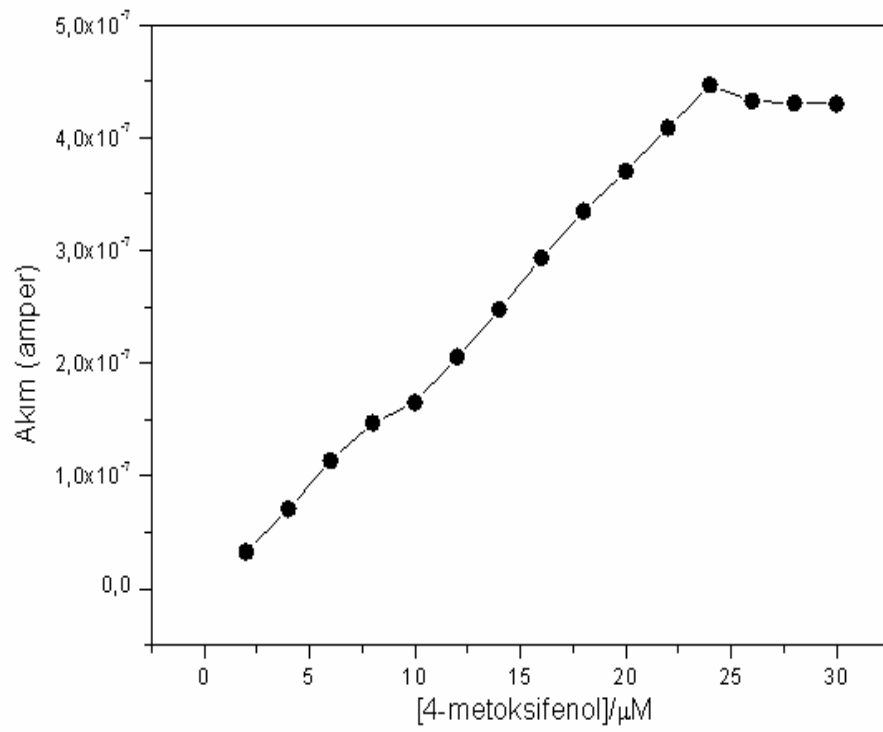


Şekil 6.6. pH Etkisi.

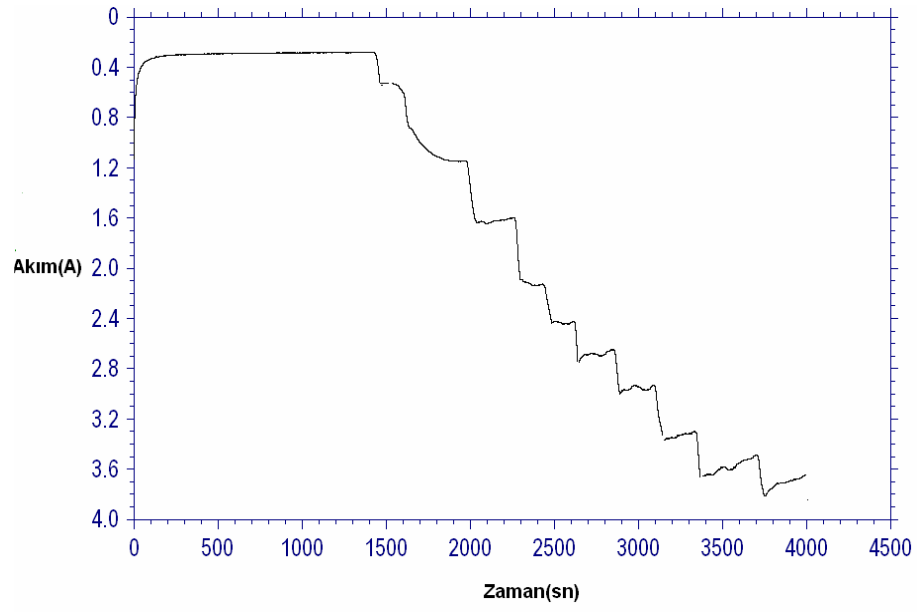
Kesikli ortamda, 100 rpm'lik karıştırma altında, -100 mv'luk (vs. Ag/AgCl) çalışma potansiyelinde pH 7.0 da, fenol hariç, her bir fenol bileşiği için $2 \mu\text{m}$ konsantrasyondan başlamak üzere (fenol için $20 \mu\text{m}$ dan başlamak üzere) düzenli olarak artan konsantrasyonlarda reaksiyon ortamına eklemeler yapılmış ve akım değişimleri gözlenmiştir. Bu denemelere ait akım zaman değişimleri ve kalibrasyon eğrileri Şekil 6.7, Şekil 6.8, Şekil 6.9, Şekil 6.10, Şekil 6.11, Şekil 6.12, Şekil 6.13, Şekil 6.14, Şekil 6.15, Şekil 6.16 de verilmiştir.



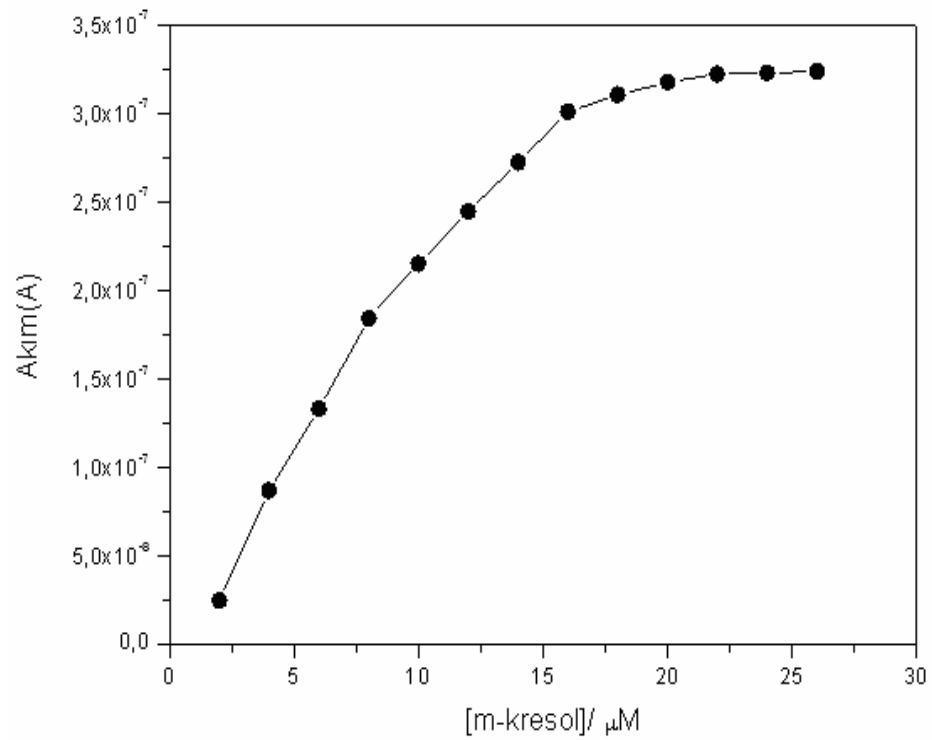
Şekil 6.7. 4-metoksifenol Akım-Zaman Grafiği



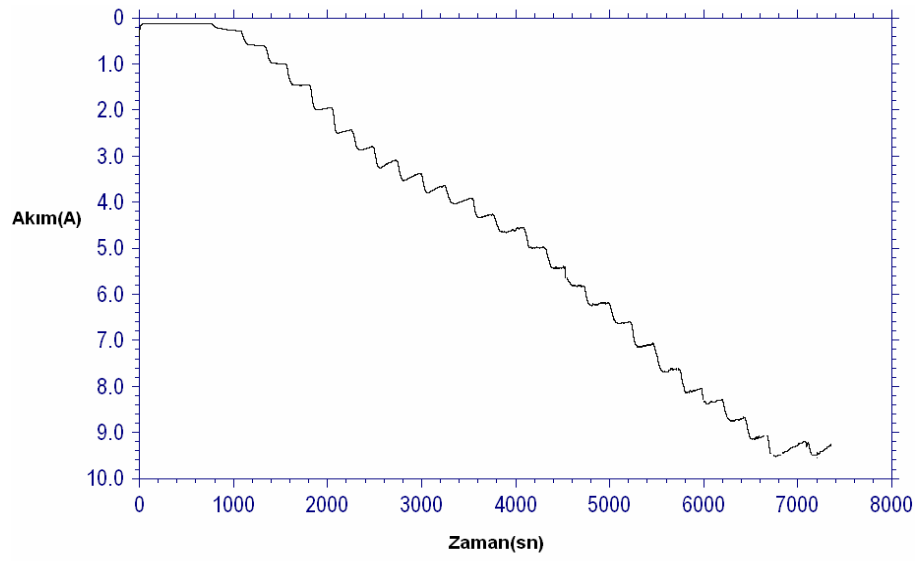
Şekil 6.8. 4-metoksifenol Kalibrasyon Eğrisi



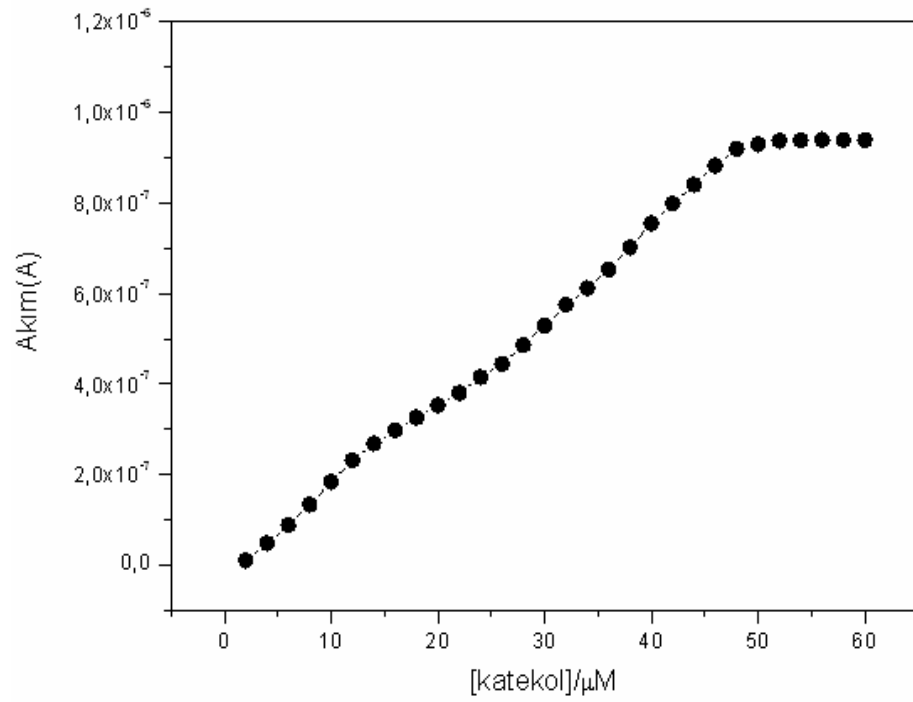
Şekil 6.9. m-kresol Akım-Zaman Grafiği



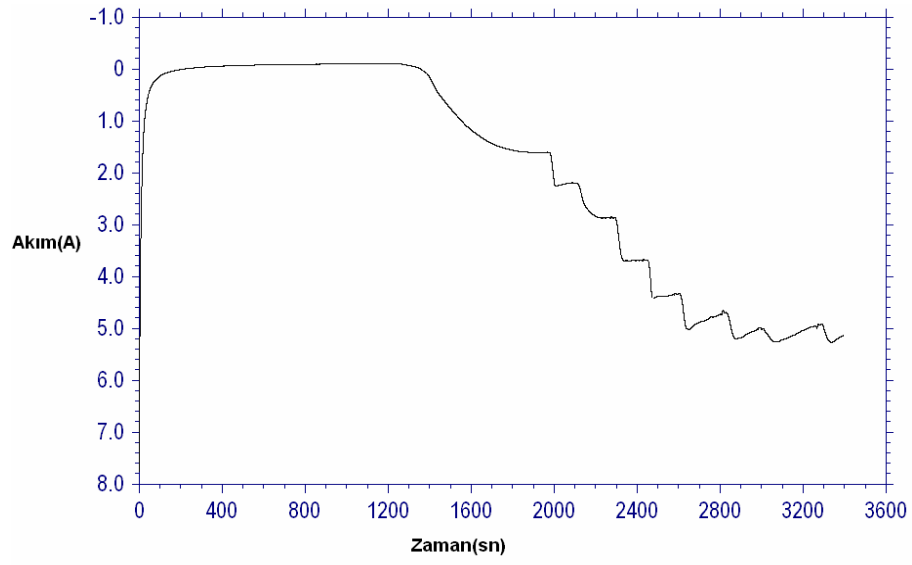
Şekil 6.10. m-kresol Kalibrasyon Eğrisi



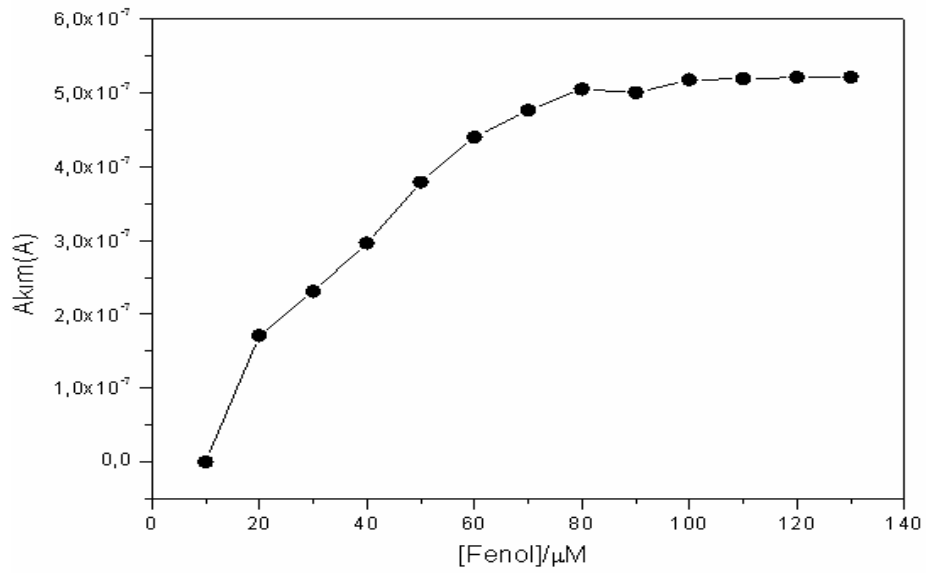
Şekil 6.11. Katekol Akım-Zaman Grafiği



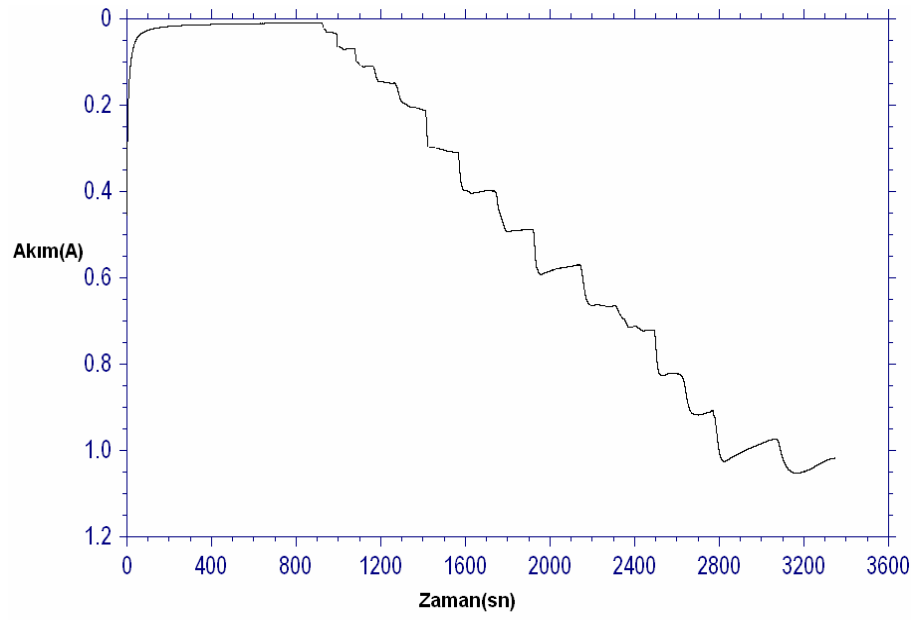
Şekil 6.12. Katekol Kalibrasyon Eğrisi



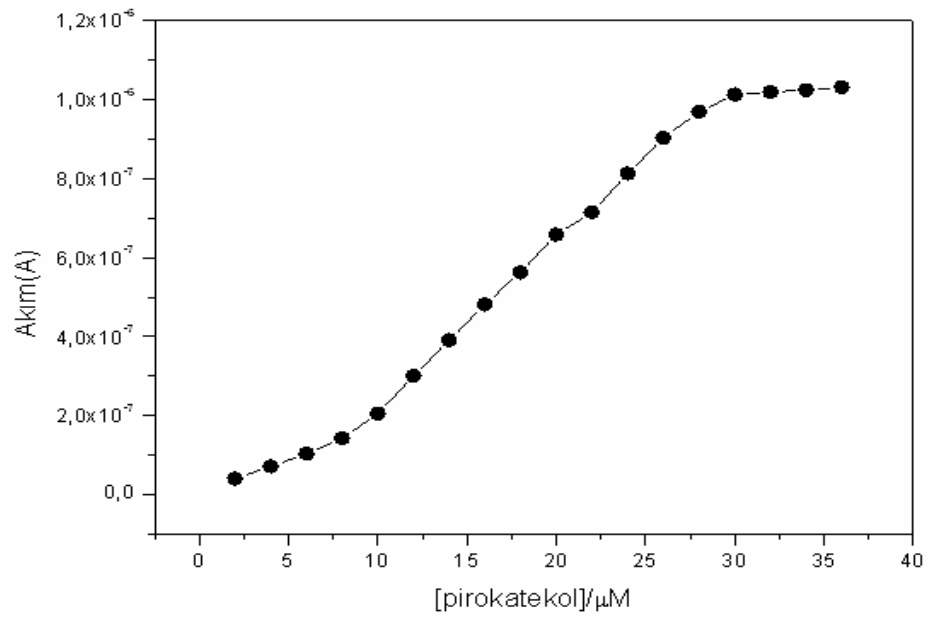
Şekil 6.13. Fenol Akım-Zaman Değişimi



Şekil 6.14. Fenol Kalibrasyon Eğrisi

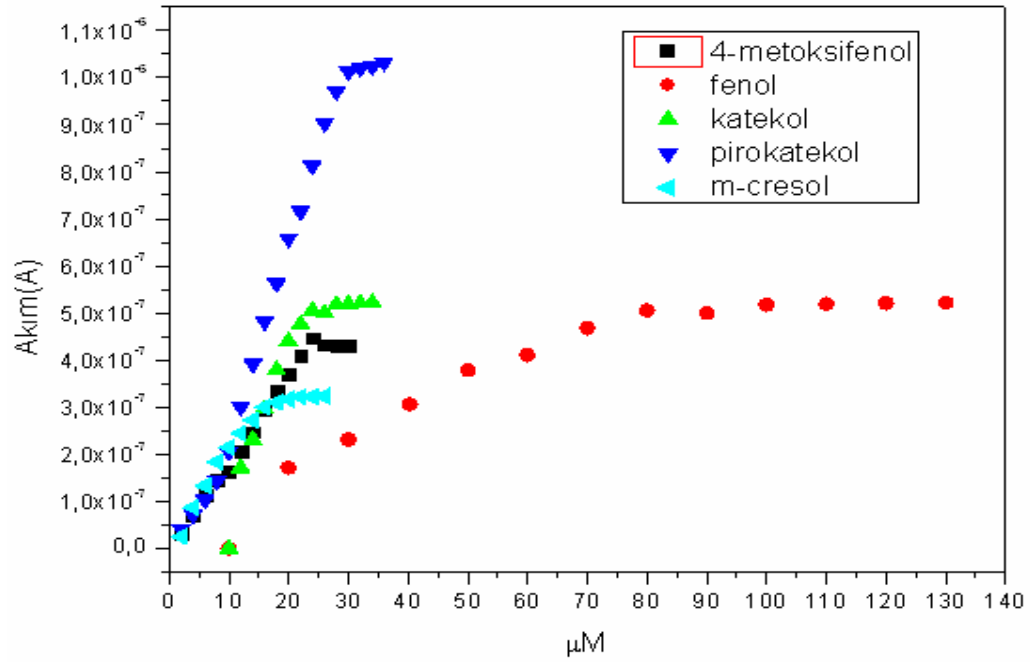


Şekil 6.15 Pirokatekol Akım-Zaman Değişimi



Şekil 6.16 Pirokatekol Kalibrasyon Eğrisi

Hazırlanmış olan kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanan analitik parametreler Çizelge 6.2 de verilmiştir. Çalışma elektrodunun fenol, 4-metoksifenol, m-kresol, katekol, pirokatekol bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. Çizelgeden de anlaşılaacağı gibi pirokatekol bileşiğı diğer fenol bileşiklerine göre daha yüksek bir hassasiyet değerine sahiptir. Fenol, 4-metoksifenol, m-kresol, katekol ve pirokatekol bileşikleri için belirleme limitleri sırasıyla 0.781, 0.113, 0.458, 0.539 ve 0.285 μM olarak bulunmuştur. Belirleme limitleri bakımından en düşük değer görüldüğü gibi 4-metoksifenol bileşiğine aittir. Standart sapma değerleri $^{+}_{-} 0.755$ ile $^{+}_{-} 3.806$ arasında değişmektedir. Ayrıca elektrodun geniş bir lineer aralığa sahip olduğu gözlenmiştir.



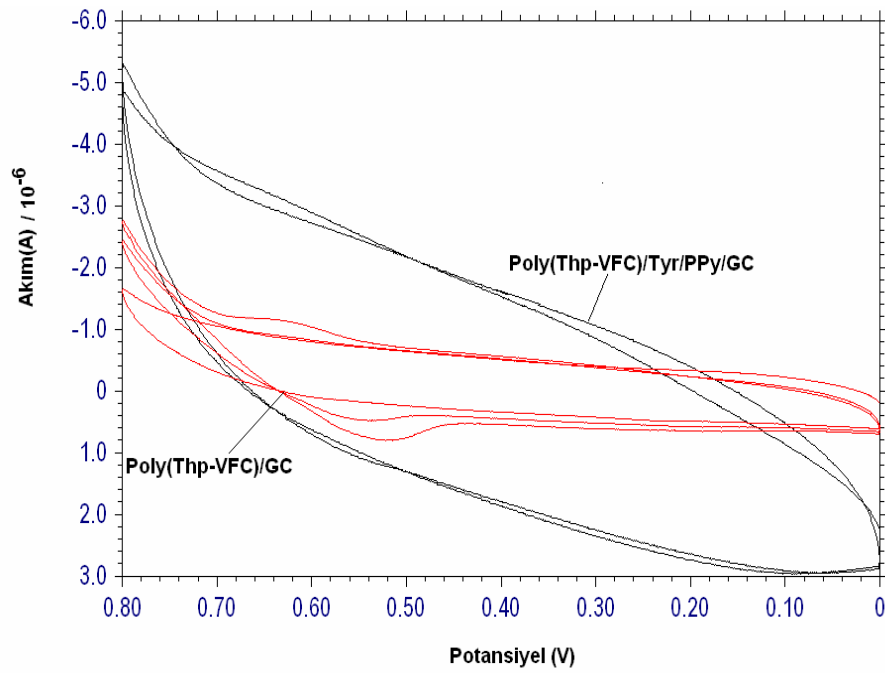
Şekil 6.17. Poly(GMA-co-VFC)/Tyr/PGA/PPy/GC Çalışma Elektrodunun Farklı Fenol Bileşikleri İçin Kalibrasyonlarının Karşılaştırılması

Çizelge 6.2. Poly(GMA-co-VFC)/Tyr/PGA/PPy/GC Çalışma Elektrodu İçin Analitik parametreler

<i>Fenolik tür</i>	r^2	<i>Hassasiyet</i> (nA/ μ M)	<i>Lineer</i> <i>aralık</i> (μ M)	<i>LOD</i> (μ M)	<i>Standart sapma</i> (nA)
fenol	0,9911	6	20-70	0,781	⁺ 1,573 ⁻
4-metoksifenol	0,9954	20	2-24	0,113	⁺ 0,755 ⁻
<i>m</i> -kresol	0,9831	20	4-16	0,458	⁺ 3,059 ⁻
katekol	0,9957	20	2-48	0,539	⁺ 3,600 ⁻
pirokatekol	0,9971	40	8-30	0,285	⁺ 3,806 ⁻
2-klorofenol	<i>Tepki yok</i>				
3-klorofenol	<i>Tepki yok</i>				
4-klorofenol	<i>Tepki yok</i>				
<i>p</i> -benzokinon	<i>Tepki yok</i>				
hidrokinon	<i>Tepki yok</i>				
guaiakol	<i>Tepki yok</i>				
pirogallol	<i>Tepki yok</i>				
<i>o</i> -kresol	<i>Tepki yok</i>				
<i>p</i> -kresol	<i>Tepki yok</i>				
2,6-dimetoksifenol	<i>Tepki yok</i>				
4-asetamidofenol	<i>Tepki yok</i>				
2-aminofenol	<i>Tepki yok</i>				
4-aminofenol	<i>Tepki yok</i>				

6.4. Poly(methylthionylmethacrylate-co-vinylferrocene)/Tyrosinase/ /Polypyrrol/Cam karbon{Poly(MTM-co-VFC)/Tyr//PPy/GC Çalışma Elektrodu Bulguları

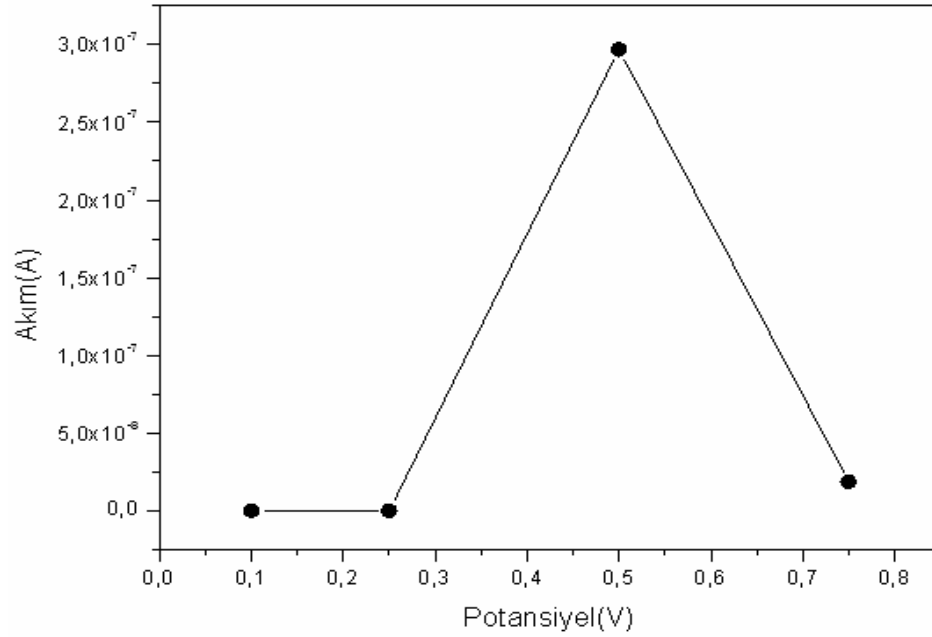
Bölüm 5.2.6' de hazırlanılışı anlatılan çalışma elektrodu kesikli sistemde 18 farklı fenol türünün tespit edilebilmesi için kullanılmıştır. Poly (MTM-co-VFC)/GC ve Poly(MTM-co-VFC)/Tyr/PPy/GC çalışma elektrotlarının elektropolimerizasyonlarına ait dönüşümlü voltametri eğrileri Şekil 6.18 de verilmiştir. (0,1 V tarama hızı)



Şekil 6.18. Poly(MTM-co-VFC)/Tyr/PPy/GC- Poly(MTM-co-VFC)/GC

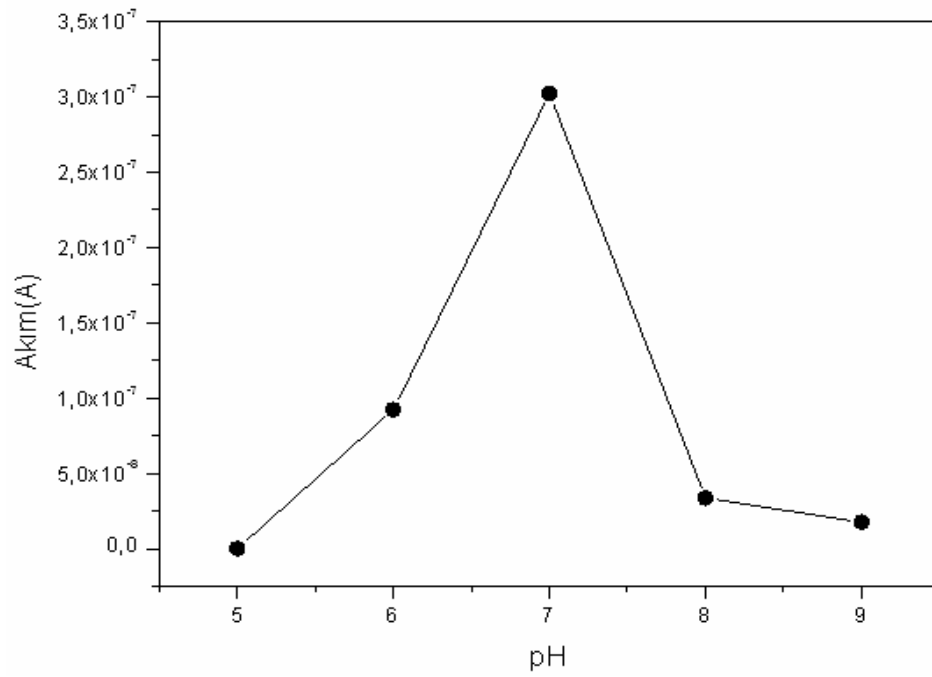
Hazırlanan Poly(MTM-co-VFC)/Tyr/PPy/GC çalışma elektrotuna farklı potansiyeller (0,1V, 0,25V, 0,5V ,0,75V) uygulanmış ve akım değişimine bakılmıştır. Çıkan sonuçlar Şekil 6.19’da verilmiştir.

Uygun çalışma potansiyelini belirlemek amacıyla potansiyel çalışmasında reaksiyon ortamına 100 mM katekol eklemesi yapılmış ve akım değerine bakılmıştır. Şekil 6.19’ da görüldüğü gibi düşük potansiyelde akımında düşük olduğu, potansiyel arttıkça akımında arttığı ve 0,5 V da optimum değere ulaştığı görüldü.



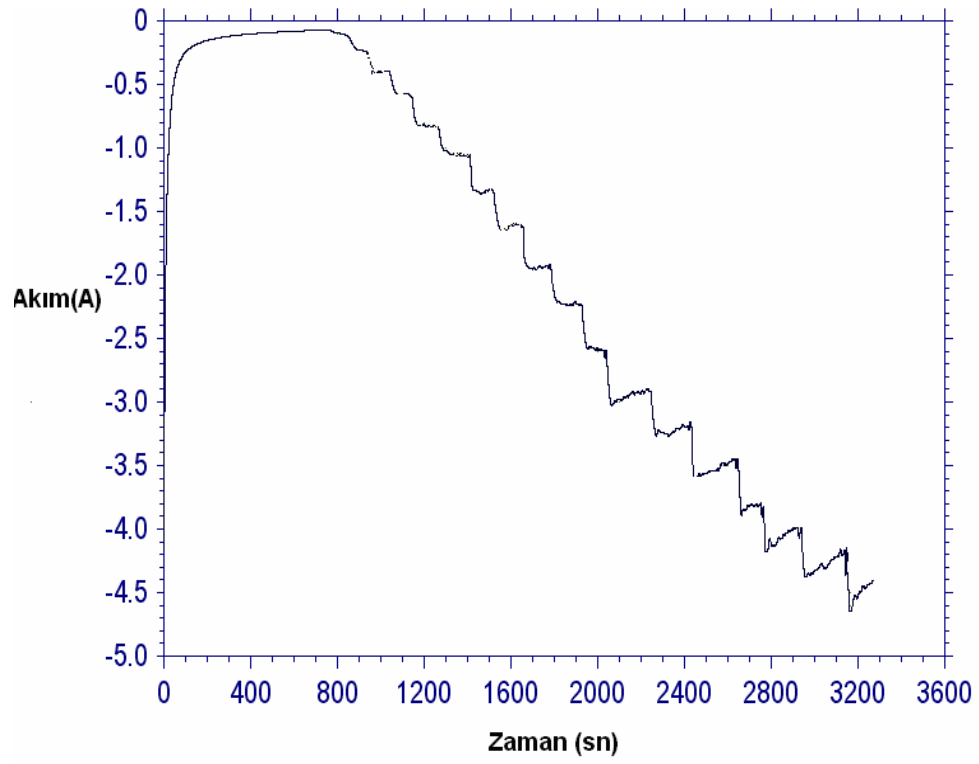
Şekil 6.19. Potansiyel-Akım İlişkisi-2

Enzimatik reaksiyonda fenoliklere alınan amperometrik yanıt üzerine tampon pH sınır etkisini incelemek amacıyla 5-9 pH aralığında çalışılarak elde edilen yanıtlar Şekil 6.20. de gösterilmiştir. pH'nın akıma etkisini görmek için reaksiyon ortamına 100 mM katekol eklemesi yapılmıştır. Şekilden de anlaşıldığı gibi elde edilen sonuçlardan en yüksek amperometrik yanıt karşılık gelen optimum pH'nın 7.0 olduğu gözlenmiştir. Daha düşük ve yüksek pH'larda enzim aktivitesi azaldığından alınan yanıt değeri de düşmektedir.

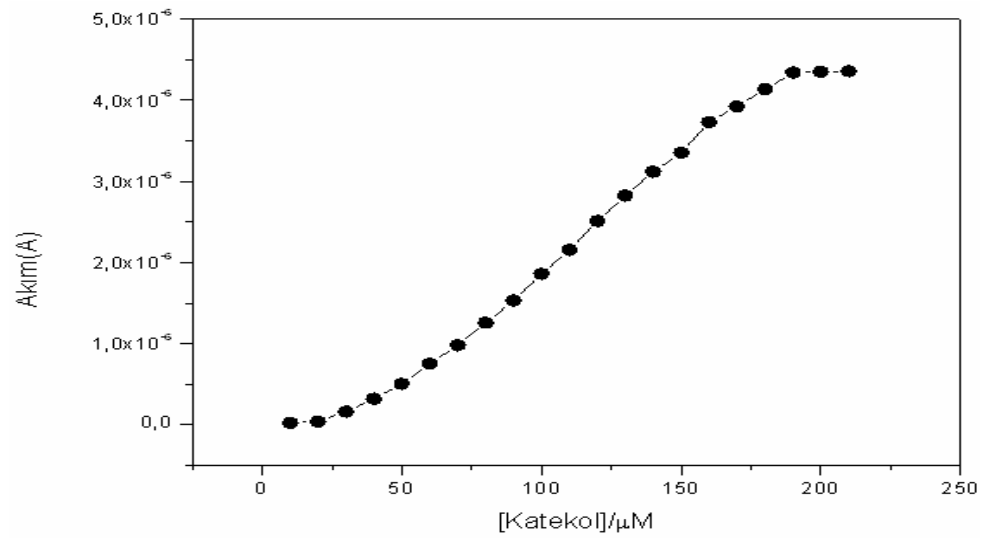


Şekil 6.20. pH Etkisi-2.

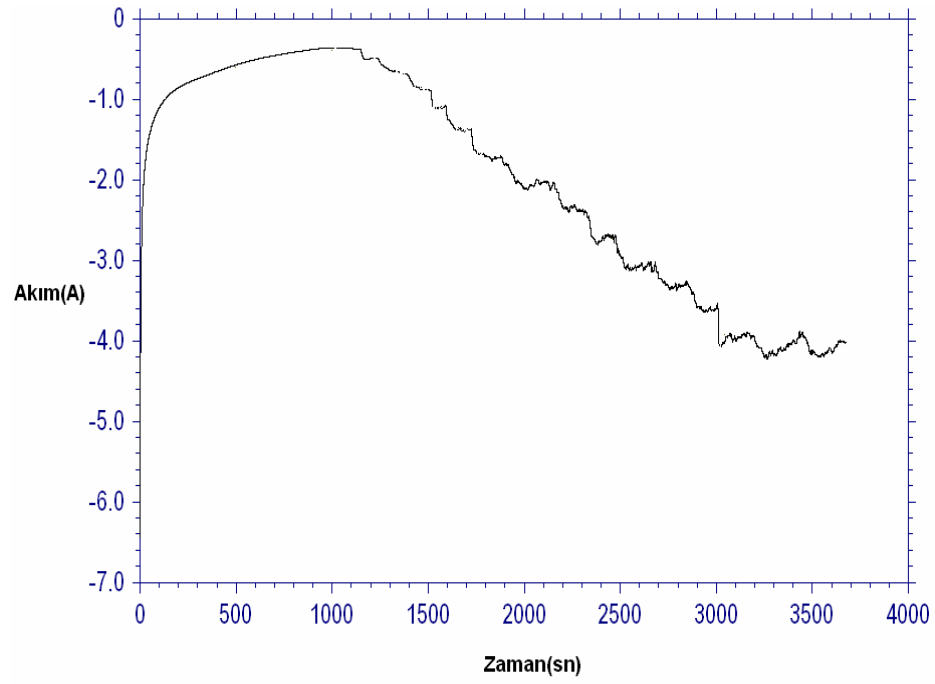
Kesikli ortamda, 100 rpm'lik karıştırma altında, 500 mv'luk (vs. Ag/AgCl) çalışma potansiyelinde pH 7.0 da, her bir fenol bileşiği için belirli bir konsantrasyondan başlamak üzere düzenli olarak artan konsantrasyonlarda reaksiyon ortamına eklemeler yapılmış ve akım değişimleri gözlenmiştir. Bu denemelere ait akım zaman değişimleri ve kalibrasyon eğrileri Şekil 6.21, Şekil 6.22, Şekil 6.23, Şekil 6.24, Şekil 6.25, Şekil 6.26'de verilmiştir.



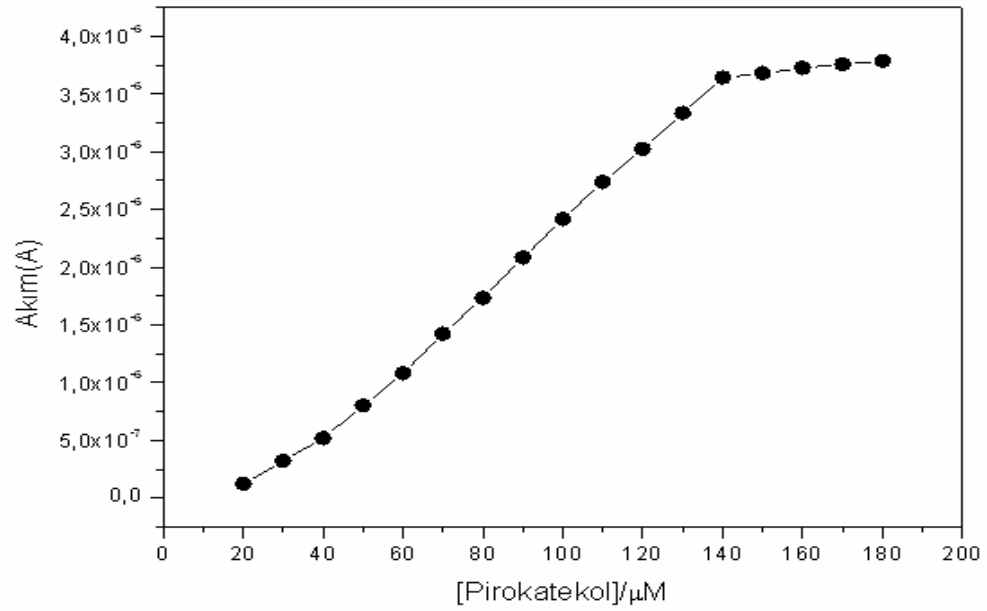
Şekil 6.21. Katekol Akım-Zaman Grafiği-2



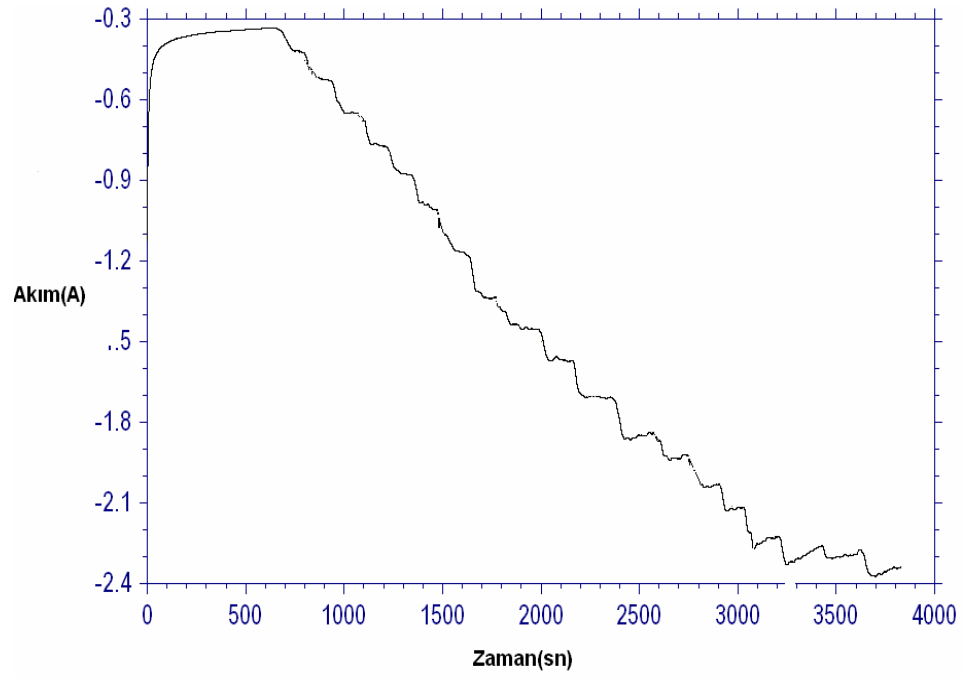
Şekil 6.22. Katekol Kalibrasyon Eğrisi-2



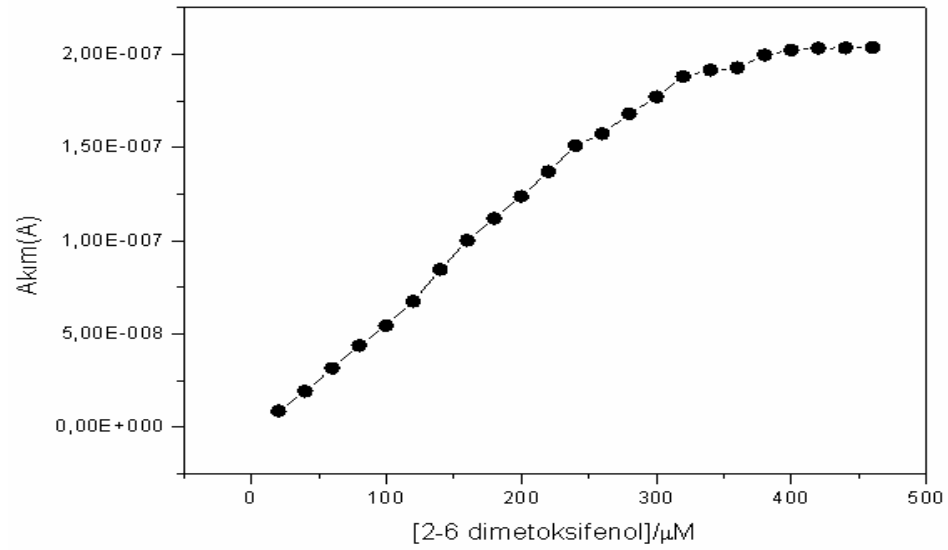
Şekil 6.23. Pirokatekol Akım-Zaman Grafiği-2



Şekil 6.24. Pirokatekol Kalibrasyon Eğrisi-2

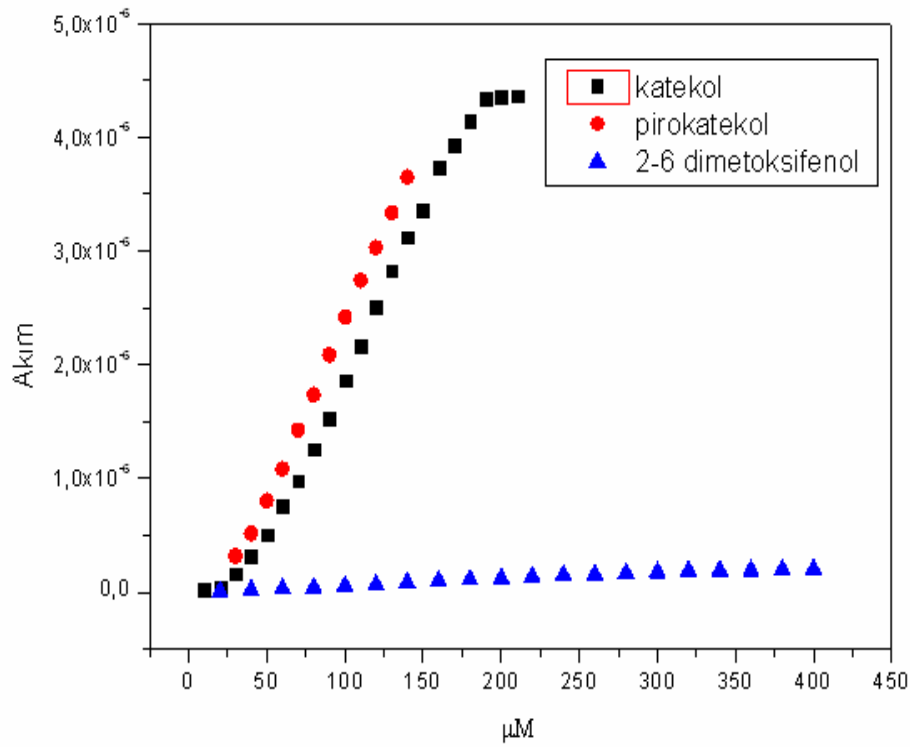


Şekil 6.25. 2,6-dimetoksifenol Akım-Zaman Grafiği-2



Şekil 6.26. 2-6 dimetoksifenol Kalibrasyon Eğrisi-2

Hazırlanmış olan kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanan analitik parametreler Çizelge 6.3 de verilmiştir. Çalışma elektrodunun , 2-6 dimetoksifenol, katekol,pirokatekol bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. Çizelgeden de anlaşılacağı gibi katekol ve pirokatekol bileşiği diğer fenol bileşiği olan 2-6 dimetoksifenole göre daha yüksek hassasiyet değerlerine sahiptir.2-6 dimetoksifenol, , katekol ve pirokatekol bileşikleri için belirleme limitleri sırasıyla 10,394, 4,4 ve 8,2 μM olarak bulunmuştur. Belirleme limitleri bakımından en düşük değer görüldüğü gibi katekol bileşiğine aittir. Standart sapma değerleri $^{+} 2,078$ ile $^{+} 8,256$ arasında $^{-}$ $^{-}$ değişmektedir. Ayrıca elektrodun oldukça geniş bir lineer aralığa sahip olduğu gözlenmektedir.



Şekil 6.27. Poly(MTM-co-VFC)/Tyr/PPy/GC Çalışma Elektrodunun Farklı Fenol Bileşiklerine Karşılık Kalibrasyonlarının Karşılaştırılması

Çizelge 6.3. Poly(MTM-co-VFC)/Tyr/PPy/GC Çalışma Elektrodu İçin Analitik Parametreler

<i>Fenolik tür</i>	r^2	<i>Hassasiyet</i> (nA/ μ M)	<i>Lineer</i> <i>aralık</i> (μ M)	<i>LOD</i> (μ M)	<i>Standart sapma</i> (nA)
fenol	<i>Tepki yok</i>				
4-metoksifenol	<i>Tepki yok</i>				
<i>p</i> -kresol	<i>Tepki yok</i>				
katekol	0,997	30	40-190	4,4	⁺ 4,486 –
pirokatekol	0,998	30	30-140	8,2	⁺ 8,276 –
2-klorofenol	<i>Tepki yok</i>				
3-klorofenol	<i>Tepki yok</i>				
4-klorofenol	<i>Tepki yok</i>				
guaiakol	<i>Tepki yok</i>				
<i>o</i> -kresol	<i>Tepki yok</i>				
<i>m</i> -kresol	<i>Tepki yok</i>				
2,6-dimetoksifenol	0,9958	6	20-320	10,394	⁺ 2,078 –
4-asetamidofenol	<i>Tepki yok</i>				

7.SONUÇLAR

Biyosensör teknolojileri çeşitli alanlarda pek çok bilim alanındaki gelişmeler paralelinde ve gereksinimler doğrultusunda kullanılarak çok hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Biyosensörlerin klasik tayin yöntemlerine nazaran çoğu zaman çok özel ve duyarlı sonuçların pratik ve kısa sürede alınmasını sağlamaları, tekrar kullanılabilir ya da düşük maliyetle tek kullanımlık şekilde tekrar üretilebilmeleri ve bu türlerin çoğu zaman kullanırken özel deneyim gerektirmeleri onları gelecek vaat eden biyoanalitik sistemler olarak ön planda tutmaktadır. Tyrosinase enzimiyle tasarlanan amperometrik biyosensörlerde ölçüm moleküler O_2 gazı varlığında yapılmaktadır. Enzimlerin immobilizasyonu için tezde de belirtildiği gibi birçok alternatif vardır. Ancak bunların ticari üretilmeye uygulanabilmesi için, basit mümkünse tek adımda ve yumuşak reaksiyon koşullarında gerçekleştirilebilen, biyomolekülün yapı ve fonksiyonunu etkilemeyen bir yöntem olması arzu edilir. Çalışmada fenol ve fenol türevlerinin tayini için, GC elektrot kullanılarak medyatör bağlı 2 farklı polimerik matriks üzerine Tyrosinase enzimi kimyasal olarak bağlanmış ve fenol ölçümünde kullanılmıştır. Ayrıca kullanılan medyatör bağlı matriksler ve iletkenlik artırıcı kompozitler göz önüne alındığında, geliştirilen fenol biyosensörleri bu alandaki diğer çalışmalarla kıyaslanabilir sonuçlar üretmiş ve literatüre katkı sağlamıştır.

Bu tez çalışması kapsamında 2 tip çalışma elektrodu hazırlanmıştır:

1-Geliştirilen Poly(GMA-co-VFC)/Tyr/PGA/PPy/GC çalışma elektrodunun amperometrik yanıtları, reaksiyon ortamına eklenen fenol ve fenol türevlerinin fonksiyonu olarak -0,1 V' luk çalışma potansiyelinde ve pH 7.0 de ölçülmüştür. Çalışma elektrodunun fenol, 4-metoksifenol, m-kresol, katekol, pirokatekol bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. Pirokatekol bileşiği diğer fenol bileşiklerine göre daha yüksek bir hassasiyet değerine sahiptir. Fenol, 4-metoksifenol, m-kresol, katekol ve pirokatekol bileşikleri için belirleme limitleri sırasıyla 0.781, 0.113, 0.458, 0.539 ve 0.285 μM olarak bulunmuştur. Belirleme limitleri bakımından en

düşük değer görüldüğü gibi 4-metoksifenol bileşiğine aittir. Standart sapma değerleri

$$\begin{array}{c} + \\ 0.755 \text{ ile } + \\ - \quad - \end{array} 3.806 \text{ arasında değişmektedir.}$$

Geliştirilen fenol biyosensörünün tepki süreleri fenol, katekol, m-kresol, 4-metoksifenol ve pirokatekol için sırasıyla 30, 60, 40, 30 ve 10 sn olarak elde edildi.

Ayrıca elektrodun geniş bir lineer aralığa sahip olduğu gözlenmiştir. PGA sayesinde mediyatör bağlı matriks üzerine kimyasal olarak bağlanan Tyrosinase molekülleri bir arada toplanmış ve PPy polimerizasyonu ile birlikte elektrotun stabilitesi iyileştirilmiştir.

2-Geliştirilen Poly(MTM-co-VFC)/Tyr/PPy/GC çalışma elektrodunun amperometrik yanıtları, reaksiyon ortamına eklenen fenol ve fenol türevlerinin fonksiyonu olarak 0,5 V' luk çalışma potansiyelinde ve pH 7.0 de ölçülmüştür. Çalışma elektrodunun katekol, pirokatekol ve 2-6 dimetoksifenol bileşiklerine tepki verdiği gözlenmiştir. Pirokatekol ve fenol bileşikleri 2-6 dimetoksifenol bileşiğine göre daha yüksek hassasiyet değerlerine sahiptir. katekol ,pirokatekol ve 2-6 dimetoksifenol bileşikleri için belirleme limitleri sırasıyla 4,4, 8,2 ve 10,394 μ M olarak bulunmuştur. Belirleme limitleri bakımından en düşük değer görüldüğü gibi katekol bileşiğine aittir. Standart sapma değerleri $\begin{array}{c} + \\ 2,078 \text{ ile } + \\ - \quad - \end{array}$ 8,276 arasında değişmektedir.

Geliştirilen fenol biyosensörünün tepki süreleri katekol, pirokatekol ve 2-6 dimetoksifenol için sırasıyla 20,30 ve 50 sn olarak elde edildi.

Hazırlanan 2 elektrot arasındaki temel farklar şunlardır:

- a-** 1. elektrotun tasarımında Poly(GMA-co-VFc) polimeri kullanılarak enzim polimer üzerindeki epoksi grupları aracılığıyla kimyasal olarak bağlanmıştır. Enzimin ve enzimin bağlı olduğu polimerik filmin iletken polipirol polimeri ile kaplanarak stabilize edilme işlemi sırasında PGA çapraz bağlama ajanı olarak reaksiyonda yer almıştır.
- b-** 2. elektrotun tasarımında Poly(MTM-co-VFc) polimeri kullanılmıştır ve elektrot yüzeyinde tiyofen tabanlı iletken polimerin, polipirol ile elektrokimyasal polimerizasyonu tekniği kullanılarak enzimin polimerik kompozit yapı içerisinde tuzağa düşürülerek (entrapment) tutuklanması ile hazırlanmıştır.

Her iki çalışma elektrodunda da vinylferrocene medyatörü polimerlerin kimyasal yapısı içerisinde hali hazırda mevcut olarak bulunmaktadır. Her iki çalışma elektrodu da tyrosinase tabanlı olup fenol ve türevlerinin amperometrik yöntemle ölçümü için denenmiştir. Literatürde fenol tayininde medyatör bağlı kompozit film hazırlanarak çalışma elektrodu tasarımı örnekleri sınırlıdır. Bu tez çalışması kapsamında denenmiş olan Poly(GMA-co-VFc) ve Poly(MTM-co-VFc) polimerleri literatürde enzim tabanlı amperometrik çalışma elektrodu tasarımında daha önce hiç kullanılmamıştır. Söz konusu polimerler bir dizi enzim tabanlı çalışma elektrodu tasarımında kullanılmak üzere orjinal olarak sentezlenmiş olup , henüz yayınlanmamıştır.

Bulgular ve tartışma bölümünde belirtildiği gibi medyatörün çalışma elektrodu yüzeyinde enzimin reaksiyon verdiği mikro çevrede sabitlenmiş olarak kullanılması gerek biyosensörün kararlılık düzeyini yükseltmiş gerekse – medyatör kullanılmamış olan reaksiyonlara kıyasla – fenolün kendisine tepki verecek şekilde biyosensör duyarlılığını artırdığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K., Cavaco-Paula A., and Gubitz G. M. Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase From *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 3357-3362, 2000.

Bailey James E., Ollis David F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. McGraw-Hill Book Company, Second Edition, 1986.

Bevilaqua J. V., Cammarota M. C., Freire D. M. G. and Sant Anna G. L. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. *Brazilian journal of chemical engineering*. 19, 151-158, 2002.

Christophe V., Silvia F., Canh T.M. Amperometric Tyrosinase Based Biosensor Using an Electrogenenerated Polythiophene Film as an Entrapment Support. *Talanta*, 59, 535-544, 2003

Duran N., Esposito E. Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenol oxidase-like Compounds in Wastewater and Soil Treatment: A review. *Applied Catalysis B: Environmental*. 28, 83-99, 2000.

Erarslan A., Enzim Karakteristiği ve Stabilizasyonu Uygulamalı Eğitim Kursu, Tübitak, Gen Müh. ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Enzim ve Fermentasyon Teknolojisi Laboratuvarı, Gebze/Kocaeli, 14-18 Temmuz 2003

Fabio V., Santa R., Maria T. C., Adelio R., A High Sensitivity Amperometric Biosensor Using Laccase as Biorecognition Element. *Biosensors and Bioelectronics* 21, 2155-2160, 2006

Freire R. S., Duran N., Kubota L. T. Development of a Laccase-based Flow Injection Electrochemical Biosensor for the Determination of Phenolic Compounds and Its Application for Monitoring Remediation of Kraft E1 Paper Mill Effluent. *Analytica Chimica Acta*. 463, 229-238, 2002.

Freire R. S., Duran N., Kubota L. T. Effects of Fungal Laccase Immobilisation Procedures for the Development of a Biosensor for Phenol Compounds. *Talanta* 54, 681-686, 2001.

Gomes S. A. S. S., Nogueira J. M. F., Rebelo M. J. F. An Amperometric Biosensor for Polyphenolic Compounds in Red Wine. *Biosensors and Bioelectronics*. 2004.

Gözükara, M., Engin., *Biyokimya*, Ankara, Türkiye, 1989

Groce G., Toscaona G., Cioffi M., Gianfreda L. and Sannio F. Dephenolisation of Olive -mill Wastewaters by Olive Husk. *Water Research*. 33(13), 3046-3050, 1999.

Ikehata K., Nicell J. A. Characterization of Tyrosinase for the Treatment of Aqueous Phenols. *Bioresource Technology*. 74, 191-199, 2000.

Korkut, Ş., (2005). Sürekli Akışlı Kesikli Yükleme Fenol Sensörlerinin Geliştirilmesi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi

Korkut, Ş., Keskinler, B., Erhan, E., An Amperometric Biosensor Based on Multiwalled Carbon Nanotube-Poly(Pyrrole)-Horseradish Peroxidase Nanobiocomposite Film for Determination of Phenol Derivatives. *Talanta* 76, 1147-1152, 2008

Körbahtı B. K., Tanyolaç A. Continuous Electrochemical Treatment of Phenolic Wastewaters in a Tubular Reactor. *Water Research*. 37, 1505-1514, 2003.

Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turanen O. Industrial Use of Enzymes. Helsinki University of Technology, Laboratory of Bioprocess Engineering, Finland and Hans Schoemaker, DSM Research, MD Geleen, The Netherlands, 2002.

Li Y. Aerobic Oxidation of Alcohols Catalyzed by Laccase and Nitroxyl Radicals, Delft University of Technology, PhD Thesis, 2003.

Liu S., Yu J., Hu H. Renewable Phenol Biosensor Based on a Tyrosinase-colloidal Gold Modified Carbon Paste Electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 540, 61-67, 2003.

Mai Anh T., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., Chien N. D., Jaffrezic-Renault N., Chovelon J.M. Development of Tyrosinase Biosensor Based on pH-Sensitive Field-effect Transistors for Phenol Determination in Water Solutions. *Talanta*. 56, 627-634, 2002.

Nicell J. A., Bewtra J. K., Taylor K. E., Biswas N. and Pierre C. St. Enzyme Catalyzed Polymerization and Precipitation of Aromatic Compounds From Wastewater. *Water Science and Technology*. 25, 157-164, 1992.

Nistor C., Emneus J., Gorton L., Ciucu A. Improved Stability and Altered Selectivity of Tyrosinase Based Graphite Electrodes for Detection of Phenolic Compounds. *Analytica Chimica Acta*. 387, 309-326, 1999.

Notsu H., Tatsuma T. Simultaneous Determination of Phenolic Compounds by Using a Dual Enzyme Electrodes System. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 566, 379-384, 2004.

Rajesh L., Takashima W., Kaneto K. Amperometric Phenol Biosensor Based on Covalent Immobilization of Tyrosinase onto An Electrochemically Prepared Novel Copolymer Poly(N-3-aminopropyl pyrole- co-pyrole) film. *Sensors and Actuators B*. 102,271-277, 2004.

Rengaraj S., Moon S. H., Sivabalan R., Arabindoo B., Murugesan V. Agricultural Solid Waste for the Removal of Organics: Adsorption of Phenol From Water and Wastewater by Palm Seed Coat Activated Carbon. *Waste Management*. 22, 543-548, 2002.

Rogers K. R., Mukhandans A., Zhan W., Biosensor and Chemical Sensor Technology: Process Monitoring and Control, Washington DC: American Chemical Society, 1995.

Ruzgas T., Emneus J., Gorton L. and Marko-Varga G. The Development of a Peroxidase Biosensor for Monitoring Phenol and Related Aromatic Compounds. *Analytica Chimica Acta*. 311, 245-253, 1995.

Seetharam G. B., Saville B. A. Degradation of Phenol Using Tyrosinase Immobilized on Siliceous Supports. *Water Research*. 37, 436-440, 2003.

Shaoming Y., Yangmei L., Xiuming J., Zhichun C., Xianfu L., Horseradish Peroxidase Biosensor Based on Layer-by-Layer Technique for the Determination of Phenoic Compounds. *Sensors and Actuators B*. 144, 774-780, 2006

Soichi Y., Fumio M., Yoshiki H., Preparation of d-amino Oxidase-Immobilized Polyion Complex Membranes. *Sensors and Actuators B*. 76, 142-146, 2001

Taylor,R.F., Marenchic I.G, Spencer R.H.," Antibody and Receptor Based Biosensors for Detection and Process Control", *Analytica Chimica Acta*, 249:67-70,1991

Telefoncu A., Enzimoloji (Lisansüstü Yaz Okulu), Ege Üniv., Fen Fakültesi, Kuşadası, Aydın,Türkiye, 1997.

Tembe ,S., Inamdar, S., Haram , S., Karve, M. and D'Souza , S.F., "Electrochemical Biosensor for Catechol Using Agarose-Guar Gum Entrapped Tyrosinase", *J of Biotech.*, 128:80-85, 2007

Toscano G., Colarieti M. L., Greco G. Oxidative Polymerisation of Phenols by a Phenol oxidase From Green Olives. *Enzyme and Microbial Technology*. 33, 47-54, 2003.

Turner, A.P.F., "Biochemistry: Biosensors-Sense and Sensitivity", *Science*, 290:1315-1317, 2000

Tsai, Y.C., and Chiu, C.C., "Amperometric Biosensors Based on Multiwalled Carbon Nanotube-Nafiontyrosinase Nanobiocomposites for the Determination of Phenolic Compounds", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 125:10-16, 2007

Verdine, C., Fabiano, S. and Tran-Minh, C., Amperometric Tyrosinase Based Biosensor Using an Electrogenated Polythiophene Film as an Entrapment Support, *Talanta*, 59:535-544, 2003

Vidal, J. C., Garcia-Luiz, E., Espuelas, J., Aramendia, T. Comparison of biosensors based on entrapment of cholesterol oxidase and cholesterol esterase in electropolymerized films of polypyrrole and diaminonaphthalene derivatives for amperometric determination of cholesterol. *Anal. Bioanal. Chem.*, 377: 273-280, 2003

Vincoli, J.W., Risk Management for Hazardous Chemicals, Lewis Publisher, New York, 1996

Wagner M., Nicell J. A. Peroxidase-catalyzed Removal of Phenols From a Petroleum Refinery Wastewater. *Water Science and Technology*. 43(2), 253-260, 2001.

Wang, B., Zhang, J., and Dong, S., Silica Sol-Gel Composite Film as an Encapsulation Matrix for the Construction of an Amperometric Tyrosinase Based Biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, 15:397-402, 2000

Wang, J., Lu, F. and Lopez, D., Amperometric Biosensors for Phenols Based on a Tyrosinase-Graphite-Epoxy Biocomposite, *Analyst*, 119:455-458, 1994

Wilberg K. Q., Nunes D. G. and Rubio J. Removal of Phenol by Enzymatic Oxidation and Flotation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 17(4-7), 2000.

Wu J., Taylor K. E., Bewtra J. K. and Biswas N. Optimization of the Reaction Condition for Enzymatic Removal of Phenol from Wastewater in the Presence of Polyethylene Glycol. *Water Research*. 27(12),1701-1706, 1993.

Xia Z., Yoshida T., Fnaoka M. Enzymatic Degradation of Highly Phenolic Lignin-based Polymers (lignophenols). *Europ. Polym. J.* 39, 909-914, 2003.

Yılmaz, F., Sel, O., Cirpan, A., Toppare, L., Hepuzer, Y., Yagci, Y., “Controlled Synthesis of Block Copolymers Containing Side Chain Thiophene Units and Their Use in Electropolymerization with Thiophene and Pyrrole” *J. Macromol.Sci Pure& Appl. Chem. A*, 41:403-411, 2004

Yılmaz ,F., Kasapoğlu, F., Hepuzer, Y., Yagci, Y., Toppare, L., Fernandes, E.G. Gali, G., *Des Monomers Polym.* 8,223, 2005

Yu J., Yu S., Ju H. Mediator-free Phenol Sensor Based on Titania sol-gel Encapsulation Matrix for Immobilisation of Tyrosinase by a Vapor Deposition Method. *Biosensors and Bioelectronics*. 19, 509-514, 2003

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında İstanbul’da doğan Fuat DURSUN , 2003 yılında Çağlayan Lisesinden mezun oldu. 2003 yılında Sakarya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2007 yılında mezun olarak aynı yıl Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü’nde yüksek lisans eğitimine başladı.