

**POLİVİNİL FERROSEN
MODİFİYE ELEKTRODUNU TEMEL ALAN
GLUKOZ BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ**

AYŞE GÜL YAVUZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA 2005**

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİVİNİL FERROSEN MODİFİYE
ELEKTRODUNU TEMEL ALAN
GLUKOZ BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ**

AYŞE GÜL YAVUZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA, 2005**

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kuramsal Temeller.....	3
1.1.1. Enzim Teknolojisinin Tarihi.....	3
1.1.2. Enzimler.....	4
1.1.2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	6
1.1.2.2. Enzimlerin Çalışma Mekanizması.....	7
1.1.2.3. Enzim Reaksiyonlarının Kinetiği.....	8
1.1.2.4. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri.....	11
1.2. Biyosensörler.....	12
1.2.1. Biyosensörlerde Kullanılan Biyokatalizörler.....	14
1.2.2. Biyosensörlerin Çalışma Mekanizması.....	15
1.2.3. Biyosensör Performans Kriterleri.....	15
1.2.3.1. Kalibrasyon Karakteristikleri.....	15
1.2.3.2. Seçicilik ve Güvenirlik.....	16
1.2.3.3. Tekrarlanabilirlik, Kararlılık ve Ömür.....	16
1.2.3.4. Kararlı Hal ve Geçiş Cevap Süreleri.....	16
1.2.4. Biyosensörlerde Kullanılan Metal-Nanotanecikleri.....	17
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	18
2.1. Metal Nanotaneciklerin Kullanıldığı Bazı Uygulamalar.....	18
2.2. Glukoz Biyosensörleri ile Yapılan Bazı Uygulamalar.....	20
2.3. Polivinilferrosen Modifiye Elektrotlar ile İlgili Bazı Uygulamalar.....	25
3. MATERYAL ve METOT.....	32
3.1. Kullanılan Deneysel Yöntemler.....	32
3.1.1. Dönüşümlü Voltametri.....	32
3.2. Deneysel Kısım.....	35
3.2.1. Kullanılan Çözücünün Saflaştırılması.....	35
3.2.2. Kullanılan Elektrotlar.....	35
3.2.3. Kullanılan Aletler.....	35
3.2.4. Elektroliz Hücresi.....	35
3.2.5. Enzim Çözeltilisinin Hazırlanması.....	36
3.2.6. Tampon Çözeltilisinin Hazırlanması.....	36
3.2.7. Glukoz çözeltisinin Hazırlanması.....	36
3.2.8. KAuCl ₄ çözeltisinin Hazırlanması.....	37
3.2.9. Vinilferrosenin Kimyasal Polimerizasyonu.....	37
3.2.10. Serbest Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	37
3.2.11. Enzim Elektrodunun Hazırlanması.....	37
3.2.12. Enzim Elektrot Aktivitesinin Belirlenmesi.....	38
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	40
4.1. Serbest Glukoz Oksidaz Enzimi İçin Optimum Koşulların ve Kinetik	41

Parametrelerin Saptanması.....	
4.1.1. Serbest Enzim İçin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi.....	42
4.1.2. Sıcaklığın Etkisi.....	43
4.1.3. Substrat Derişiminin Etkisi.....	45
4.2. Enzim Elektrot Aktivitesine Deneysel Parametrelerin Etkisinin İncelenmesi.....	46
4.3. (PVF-GOD) Enzim Elektrot Aktivitesinin Belirlenmesi.....	47
4.3.1. PVF Derişiminin Etkisi.....	48
4.3.2. PVF’de Bekletme Süresinin Etkisi.....	49
4.3.3. Enzim Derişiminin Etkisi.....	50
4.3.4. Enzimde Bekletme Süresinin Etkisi.....	51
4.3.5. PVF-GOD Enzim Elektroduna Substrat Derişiminin Etkisi.....	52
4.4. PVF-Au-GOD Enzim Elektrot Aktivitesinin Belirlenmesi.....	54
4.4.1. KAuCl ₄ Derişiminin Etkisi.....	56
4.4.2. KAuCl ₄ Çözeltisinde Bekletme Süresinin Etkisi.....	57
4.4.3. Çalışma pH’ının Etkisi.....	58
4.4.4. Sıcaklık Etkisi.....	59
4.4.5. PVF-Au-GOD Enzim Elektroduna Substrat Derişiminin Etkisi.....	62
4.5. Geliştirilen Elektrodun Uzun Süreli Kararlılığı.....	63
4.6. Girişimler.....	64
5. SONUÇLAR.....	65
6. KAYNAKLAR.....	68

ÖZET

Polivinilferrosen Modifiye Elektrodunu Temel Alan Glukoz Biyosensörünün Geliştirilmesi

Kolay ve hassas voltametrik glukoz enzim elektrodunun tasarlanması için yeni bir yöntem tanımlanmıştır. Polivinilferrosen (PVF) kaplı Pt elektroda dayanan enzim elektrodunun geliştirilmesini sağlayacak basit bir enzim tutuklama yöntemi araştırılmış, bu çalışmada iki yeni glukoz enzim elektrodu geliştirilmiştir.

Çalışmanın birinci adımında, PVF kaplanmış Pt elektrot enzim çözeltisine daldırılarak glukoz oksidaz enziminin (GOD) polimer matriks içerisinde tutuklanması sağlanmıştır ve bu enzim elektrot PVF-GOD enzim elektrodu olarak tanımlanmıştır. Elektrot cevabı üzerine polimerik film kalınlığı, pH, sıcaklık, substrat ve enzim konsantrasyonu etkisi araştırılmıştır. 25°C sıcaklıkta pH 7,4 olarak bulunmuştur. Lineer çalışma aralığının üst sınırı 73,86 mM glukoz derişimidir. Tutuklanmış enzim sistemi için görünür Michaelis-Menten sabiti (K_{mg}) ve aktivasyon enerjisi sırasıyla 417,57 mM glukoz ve 14,48 kJ/mol olarak bulunmuştur.

Çalışmanın ikinci adımında GOD, PVF kaplanmış ve ardından Au biriktirilmiş Pt elektrot üzerinde aynı yöntemle tutuklanmıştır ve bu enzim elektrot PVF-Au-GOD enzim elektrodu olarak tanımlanmıştır. Enzim elektrot cevabı üzerine Au etkisi araştırılmıştır. 25°C sıcaklıkta pH 7,4 olarak bulunmuştur. Lineer çalışma aralığının üst sınırı 105,26 mM glukoz derişimidir. Tutuklanmış enzim sistemi için görünür Michaelis-Menten sabiti (K_{mg}) ve aktivasyon enerjisi sırasıyla 371 mM glukoz ve 18,76 kJ/mol olarak bulunmuştur.

Girişim yapabilecek maddelerin etkisi ve enzim elektrodunun kararlılığı araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Polivinilferrosen, Altın biriktirme, Oksijenin indirgenmesi

ABSTRACT

Development of The Glukoz Biosensor Based on PVF Modified Electrode

A novel strategy to construct a simple and sensitive voltammetric glucose enzyme electrode were described. A simple method of enzyme immobilization was investigated which is useful for devolopment of enzyme electrodes based on polyvinylferrocene (PVF)coated, Pt electrodes. Two novel glucose enzyme electrode were investigated.

In the first step of this study, the glucose oxidase enzyme (GOD) was incorporated into the polymer matrix by immersing PVF coated Pt electrode in enzyme solution for several times, and this enzyme electrode was called as PVF-GOD enzyme electrode. The effects of the thickness of the polymeric film, pH, temperature, substrate and enzyme concentration on the response of the enzyme electrode were investigated. The optimum pH was found to be 7,4 at 25°C. The upper limit of the linear working portion was found to be 73,86 mM glucose concentration. The apparent Michaelis-Menten constant (K_{mg}) and the activation energy of this immobilized enzyme system were found to be 417,57mM glucose and 14,48 kJ/mol, respectively.

In the second step of this study, GOD was immobilized on PVF coated and then Au deposited Pt electrode by the same strategy, and this enzyme electrode was called as PVF-Au-GOD enzyme electrode. The effects of the amount of Au on the response of the enzyme electrode were investigated. The optimum pH was found to be 7.4 at 25°C. The upper limit of the linear working portion was found to be 105,26 mM glucose concentration. The apparent Michaelis-Menten constant (K_{mg}) and the activation energy of this immobilized enzyme system were found to be 317 mM glucose and 18,76 kJ/mol, respectively.

The effects of interferents and stability of the enzyme electrode were also investigated.

Keywords: Polyvinylferrocene, Gold deposition, Oxygen reduction

TEŐEKKÖR

Bu alıőmayı hazırlamamda desteğini esirgemeyen danıőmanın Sayın Prof. Dr. Handan GÖLCE'ye ayrıca alıőmalarım boyunca beni yalnız bırakmayan aileme sonsuz teőekkÖrlerimi sunarım.

Ayşe GÖl YAVUZ

Isparta- 2005

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 1.1.	Biyosensörlerle tayin edilebilen maddeler	13

1.GİRİŞ

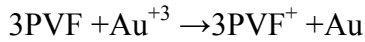
Metalik bir elektrodu, elektroaktif ince bir filmle kaplayarak modifiye elektrot hazırlamak oldukça uygun ve çok kullanılan bir yöntemdir. Polimer film ile kaplanan elektrotların yüzey özellikleri kontrol edilebildiğinden bu elektrotlar elektroanaliz, elektrokataliz ve enerji dönüşümü amacıyla kullanılabilir. Modifiye edilmiş elektrotlar, eser miktardaki iyonların seçimli ve duyarlı olarak belirlenmesinde kullanılan analitik yöntemlerin geliştirilmesinde önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Bunun yanında uygun modifiye edici ve kontrollü elektrot gerilimi sayesinde elektrokimyasal tepkime hızının denetlenmesi ve seçimliliği gibi özellikler elde edilebilmektedir.

Son yıllarda enzim elektrotların biyosensörlerde kullanımı ile ilgili önemli çalışmalar yapılmıştır. Glukoz tayini ile ilgili olarak geliştirilen enzim elektrotlar GOD'ın uygun yüzeyde tutuklanması temeline dayanır.

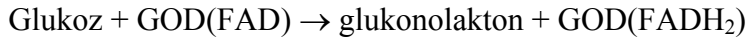
Biyosensörler sağlık alanında tıbbi teşhislerde (glukoz, fruktoz, üre) kan analizleri ile çeşitli hastalıkların teşhisi ve tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Biyolojik reaksiyon sırasında elektron gibi elektrokimyasal taneciklerin harcanması veya oluşumu, elektrokimyasal sinyali oluşturur ve elektrokimyasal dedektörle ölçülür. Bu biyosensörler bulanık ortamda çalışabilir, hassastır ve minyatürize edilebilirler. Elektrokimyasal biyosensörlerde genellikle potansiyometrik ve amperometrik yöntemler kullanılır.

Çalışmamızda kimyasal olarak hazırlanan polyvinilferrosen (PVF) modifiye elektroduna altın biriktirilmiş ve ardından glukoz oksidaz (GOD) enziminin tutuklanmasıyla glukoz tayininin basit ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilmesi için voltametrik glukoz biyosensörünün geliştirilmesi amaçlanmıştır.

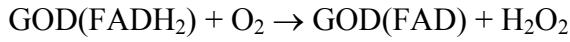
İlk aşamada polivinilferrosen (PVF), vinilferrosenin kimyasal polimerizasyonu ile hazırlanmış ve elektrodun kaplanmasında metilen klorürdeki PVF çözeltisi kullanılmıştır. Çalışma elektrodunun polimerle kaplanması daldırma kurutma yöntemi ile yapılmıştır. Pt elektrot belirli derişimdeki polimer çözeltisine belirli bir süre bekletilip çıkarıldıktan sonra kurutularak yüzeyin polimer film ile kaplanması sağlanmıştır. Daha sonra PVF modifiye elektrot altın çözeltisinde bekletilerek aşağıdaki reaksiyona göre altının elektrot yüzeyinde önderiştirilmesi yapılmıştır.



Au tanecikleri biriktirilmiş modifiye elektrotta glukoz oksidaz enzimi tutuklanarak glukoz biyosensörü hazırlanmıştır. Glukoz, glukoz oksidaz (GOD) enziminin yükseltgenmiş formu olan GOD(FAD) ile reaksiyona girer ve enzim indirgenirken glukoz yükseltgenir.



Enzimin indirgenmiş formu olan GOD(FADH₂) ise oksijen varlığında tekrar yükseltgenerek GOD(FAD)'ye dönüşür.



Böylece katalitik döngü devam ederken O₂ harcanır. Bu enzimatik reaksiyonlarda harcanan O₂ ve oluşan H₂O₂ derişimi glukoz derişimi ile orantılıdır. Bundan yararlanılarak ya O₂ derişimindeki azalmanın ya da H₂O₂ derişimindeki artmanın incelenmesi ile glukoz tayini yapabilmek amacıyla O₂ derişimindeki azalmanın glukoz derişimi ile orantılı olmasından yararlanılmıştır. Bu amaçla öncelikle hazırlanan elektrotta O₂'nin indirgenme reaksiyonu incelenmiştir. O₂'nin indirgenme reaksiyonuna modifiye yüzeyin etkisi araştırılmıştır. Hazırlanan biyosensöre PVF derişimi, kaplama süresi, altın derişimi, altında bekletme süresi, ortam pH sı gibi çeşitli deneysel parametrelerin etkileri araştırılarak optimum koşullar saptanmıştır. Tüm bu çalışmalar oksijence doygun ortamda yapılmıştır. Biyosensörün hazırlanmasında glukoz oksidaz enzimi tutuklanmış olarak kullanılmıştır. Deneilerin sonucunda tutuklanmış enzim için Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek görünür Michaelis-Menten sabiti, elektrot aktivitesinin sıcaklıkla artış gösterdiği aralıktaki deneysel veriler kullanılarak Arrhenius eşitliğine göre reaksiyonun aktivasyon

enerjisi hesaplanmıştır. Tutuklanmış enzim için yapılan çalışmalar serbest enzim sistemi içinde tekrarlanmış ve serbest enzim için en uygun çalışma koşulları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar tutuklanmış enzim için bulunan sonuçlarla karşılaştırılarak tutuklama işleminin enzim yapısında herhangi bir deformasyona neden olup olmadığı yorumlanmıştır. Oksijenin indirgenme akımının ölçülmesine dayanan glukoz tayini için altın biriktirilmiş PVF modifiye elektrodu ilk kez bu çalışmada geliştirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada hazırlanan enzim elektrodunun özellikleri literatürde verilen çalışmalarla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

1.1. Kuramsal Temeller

1.1.1. Enzim Teknolojisinin Tarihsel Gelişimi

Enzimler konusundaki ilk bilgiler ve çalışmalar sindirim ve fermantasyonla ilgili olmuştur. Van Helmont (17. yüzyılda yaşamıştır.), üstün bir sağduyu ile sindirim olayının 'ferment' adı verilen maddeler aracılığı ile gerçekleştirilen ve gıdaların parçalanmasını sağlayan kimyasal bir dönüşüm olayı olduğunu ileri sürmüştür. Sindirim konusunda ilk çalışma Spallanzani (1729-1799) tarafından gerçekleştirilmiştir. Daha sonra Kirchoff 1814 yılında, nişastanın buğday ekstraktı kullanılarak basit şekerlere parçalanabileceğini göstermiştir. Payen ve Persoz ise, 1833 yılında, malt ekstraktının etil alkol presipitantında nişastayı basit şekerlere dönüştüren termolabil bir maddenin varlığına işaret etmiştir. Bu madde daha sonra diastaz olarak adlandırılmıştır. Benzeri aktivitenin varlığı daha sonraları tükürükte de ortaya konmuştur.

Enzimlerin canlı hücrelerden izole edilmesini takiben, 1920'li yıllarda, bir enzim karışım sisteminden belli bir enziminin ayrılıp saf enzim preparatının elde edilmesi çalışmalarına ağırlık verilmiştir. Bu çerçevede Sumner 1926 yılında jack fasulyesinden üreaz enzimini kristal formda ve saf olarak elde etmeyi başarmıştır. Sumner bu enzimin protein yapısında olduğunu da göstermiştir. Bu çalışmaları Sumner'e Nobel ödülü kazandırmıştır.

Enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılmasıyla birlikte bunların karakterizasyonu, spesifikliği ve kinetiği üzerinde de yoğun çalışmalar başlamıştır. Bugüne kadar izole edilen ve saflaştırılan bütün enzimlerin protein yapısında olduğu ortaya çıkmıştır. Fischer, 1984 yılında, enzimlerin spesifikliğini ‘anahtar-kilit’ modeliyle açıklamıştır. Koshland, 1959 yılında, enzim spesifikliği konusunda ‘uyum meydana getirme’ modelini ne sürmüştür. Enzim kinetiği konusu, Michaelis ve Menten tarafından 1913 yılında bugün de geçerliliğini koruyan temeller üzerine oturtulmuştur.

Uluslar arası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry)’nin oluşturduğu Enzim Komisyonu, 1956 yılında, enzimlerin gelişi güzel isimlendirilmesi ve sınıflandırılmasını engellemek ve olayı daha sistematik hale getirmek için yeni bir sınıflandırma, isimlendirme ve numaralandırma sistemi önermiştir. Bu sistem günümüzde de geçerliliğini korumaktadır.

Çok yakın bir geçmişi olan tutuklanmış enzim ve tutuklanmış hücre konularına günümüzde de büyük bir ilgi duyulmakta ve üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Günümüzde değişik endüstrilerde ve alanlarda serbest ve tutuklanmış enzimlerden çok yaygın bir şekilde faydalanılmaktadır (Saldamlı 1998).

1.1.2. Enzimler

Enzimler, canlı için yaşamsal önemi olan pek çok fonksiyonun kontrolünde rol alan, bir yandan da organizmada hemen hemen bütün kimyasal tepkimelere katılarak, oluşumlarını inanılmaz boyutlarda hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Etki ettiği maddenin sonuna "Ase = Az" eki getirilerek ya da katalizlediği tepkimenin çeşidine göre adlandırılırlar (Örneğin, kitine etki eden kitinaz enzimi vs). Çok defa renksizdirler, bazen sarı, yeşil, mavi, kahverengi ya da kırmızı olabilirler. Suda ya da tuz çözeltilisinde çözülebilirler. İşlem sonunda, tepkimeye girdikleri ilk hallerinde tepkimeden çıkarlar. Bu nedenle, her enzim bir biyokatalizrdür. Başka bir deyişe, enerji açısından normal koşullarda hiç geekleşemeyecek ya da çok yavaş geekleşebilecek kimyasal tepkimelere katılarak, kendileri bir değişikliğe uğramadan, bu tepkimelerin çok hızlı bir şekilde geekleşmesini sağlarlar. Kuramsal

olarak bir enzim belli bir tepkimeye girip, bir değişikliğe uğramadan çıktığı için, sürekli olarak aynı türden tepkimelere katılabilmelidir. Ancak gerçekte durum böyle değildir, çünkü enzimlerin de bir ömrü vardır (Arnold, 1999).

Enzimler birer proteindir ve bu nedenle de amino asit denen temel yapı taşlarından oluşmuşlardır. Amino asitler bir tane karbon atomuna (C) bağlanmış bir amino grubu (NH₂), bir hidrojen (-H), bir karboksil grubu (-COOH) ve bir de değişken yan gruptan (-R) oluşurlar. Yirmi amino asitin hepsi de bu temel yapıya sahiptir. Onları farklı yapan tek şey, taşıdıkları yan grupların büyüklük, şekil, elektrik yükü, suya duyulan ilgi ve aktiflik açısından farklı olmalarıdır. İşte enzimi oluşturan bu amino asitler birbirleriyle etkileşerek, zincirin kıvrılıp bükülmesine ve sonuçta da üç boyutlu bir yapı kazanmasına neden olurlar. Yapıdaki bazı amino asitlerin taşıdıkları yan gruplar, enzimin üç boyutlu yapısında bir bölgede toplanarak "aktif bölge" denen bir alan oluştururlar. İşte enzimlerin tepkimeleri kataliz etme ve çok seçici olmalarının sırrı bu bölgedir. Bölgenin oluşturduğu boşluğun şekli o kadar özeldir ki, sadece o enzimin katalize edeceği tepkimeye girecek madde, başka bir deyişle enzimin substratı, bu boşluğa girebilir. Bir kez enzimin içine girdikten sonra, substratla enzimin bu aktif bölgesinde bulunan kimyasal gruplar arasında kimyasal etkileşimler meydana gelir. Sonuçta substrat, "geçiş durumu yapısı" denen ve normalde çok kararsız olan bir yapıya dönüşür. Daha sonra bu yapı ya ürünü oluşturacak, yada substrata geri dönecektir. Enzimin saniyede etki ettiği substrat molekül sayısına Enzimin Etkinlik Değeri = Turnover Sayısı denir.

Substrat + Enzim \longrightarrow Ürünler

İşte enzimin aktif bölgesinde oluşan bağlar, bu kararsız yapıyı kararlı kılmaya yarar ve böylece, ürünün oluşması için enzime daha fazla zaman tanınmış olur. Normalde kimyasal tepkimenin oluşması için bu geçiş durumu yapısının oluşması, bunun için ise aktivasyon enerjisi denen bir miktar enerjinin sağlanması gerekir. Katıldıkları tepkimelerde enzimler, aktif bölgelerinin üç boyutlu özel şekilleri sayesinde, bu geçiş durumunun oluşumunu kolaylaştırır ve dolayısıyla gerekli enerjiyi azaltırlar. Böylece, tepkimenin daha az enerjiyle daha çabuk gerçekleşmesini sağlarlar.

Asitler, bazılar ya da metal oksitler gibi inorganik katalizörlerin tersine enzimler, son derece seçicidir. Başka bir deyişle, her enzim tek bir madde, ya da birbiriyle çok yakın ilişkili olan bir grup madde üzerinde etkilidir. Bazı durumlarda bu seçicilik öyle boyutlardadır ki, enzim tepkime için maddenin yalnızca belli bağlarını seçer. Enzimlerin bu seçicilikleri sayesinde, endüstriyel uygulamalarda, istenilen ürün çok büyük miktarlarda ve saf olarak üretilirken, işlem sonucunda oluşabilecek istenmeyen maddeler de en az düzeye indirilmiş olur.

Enzimlerin başka bir özelliği de son derece verimli çalışmalarıdır. Örneğin, karaciğer ve kırmızı kan hücrelerinde bol miktarda bulunan katalaz enzimi o kadar etkindir ki, bir enzim molekülü bir dakika içinde 5.000.000 hidrojenperoksit (H_2O_2) molekülünü su (H_2O) ve oksijene (O_2) parçalayabilir. Enzimlerin önemli olan başka bir özelliği ise ılımlı şartlar altında çalışıyor olmalarıdır. Canlılarda çalıştıkları için, atmosferik basınç altında ve çok uç olmayan sıcaklık ve asiditedeki ortamlarda etkinlerdir.

1.1.2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Her enzimin 4 rakamlı bir numarası vardır, örneğin, 3.6.1.3. 'de birinci numara sınıfını, ikinci numara alt sınıfını, üçüncü numara grubunu, dördüncü numara da kendine özgü sıra numarasını verir. Buna göre enzim sınıfları şunlardır:

1. Oksidoredüktazlar: Redoks tepkimelerini katalizler.

- a) Dehidrogenazlar: Elektron kazandırıcı tepkimeleri etkilerler.
- b) Oksidazlar: Elektron kaybeden tepkimeleri etkilerler.
- c) Redüktazlar: Substratı bir redüktör aracılığıyla indirgeyen enzimlere denir. Örneğin, asetaldehit redüktaz, asetaldehiti alkole indirger.
- d) Transhidrogenazlar: Bir molekülden diğerine hidrojen taşıyarak onu indirgerler.
- e) Hidroksilazlar: Substratlarına bir hidroksil ya da su molekülü katan enzimlere denir, örneğin, fenilalanin hidroksilaz bir hidroksil grubunu fenilalanine ekleyerek onu tirozine dönüştürür.

2. Transferaz Enzimler: Hidrojenin dışında bir atomun veya atom grubunun (metil, karboksil, glukozil, amino, fosfat grupları) bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlarlar.

Dekarboksilazlar: Karboksilik asitlerden CO₂ çıkmasını sağlarlar.

3. Hidrolaz Enzimler: Bir molekül su katmak suretiyle ya da su molekülü aracılığıyla moleküllerin yıkılmasını sağlayan enzimlerdir. Ester, peptit, asetanhidrit ve glukozidik bağlarına etki ederler.

a) Esterazlar: Ester bağını yıkan enzimlerdir (lipaz, ribonükleaz, fosfataz, pirofosfataz, glukozidaz).

b) Proteazlar: Peptit bağını yıkan enzimlerdir (proteinaz).

4. Liazlar: Su molekülü çıkarmadan molekülleri yıkan enzimlerdir, örneğin C-C bağı, aldolaz ve dekarboksilazla yıkılır. Keza C-O ve C-N bağını yıkanlar da vardır.

5. İzomerazlar: Molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişini değiştiren enzimlerdir. Örneğin razemaz, epimeraz.

6. Ligazlar (Sentetazlar): Enerji kullanarak substrat moleküllerinin birbirine bağlanmasını sağlarlar.

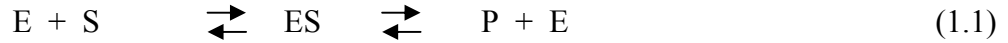
1.1.2.2. Enzimlerin Çalışma Mekanizması

Enzimin hangi substratla çalışılacağını saptayan kısmı apoenzim kısmıdır. Demek ki apoenzim kısmıyla substrat arasında bir ilişki vardır. Alman kimyacı EMIL FISCHER tarafından bunun kilit anahtar uyumu gibi olacağı savunulmuştur. Koenzim kısmı daha çok kimyasal bağa yakın olarak işlev gösterir, örneğin ester bağlarını parçalar. Enzimin apoenzim kısmı bir ya da birkaç yerinden (aktif bölgelerden) substrat molekülüne yapışır ya da bağlanır (yani bir enzim-substrat kompleksi oluşturuyor) ve bu arada koenzim kısmı substrat üzerindeki bağlarla gerçek anlamda birleşmeye veya bağlanmaya giderek onu parçalar. Enzimlerin kimyasal yapıları, özellikle üçüncül yapıları tam olarak bilinmediğinden (ilk yapısı

açıklanan enzim ribonükleaz, 124 amino asitten meydana gelmiştir) çalışma mekanizmaları da hala tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır (Arnold vd., 1999).

1.1.2.3. Enzim Reaksiyonlarının Kinetiği

Enzimler reaksiyon kinetiği ve mekanizması yönünden kimyasal katalizörlere benzerler. Reaksiyonda önce enzim ile substrat arasında bir ara bileşik oluşur. Bu kararsız ara bileşiğin oluşma hızı enzim ve substrat derişimine bağlıdır. Reaksiyon koşulları ve enzim derişimi sabit tutulurken substrat derişimi arttırılırsa reaksiyon hızı belli bir maksimum değere erişir. Bu değerden sonra, substrat derişimi arttırılsa bile reaksiyon hızında bir değişme gözlenmez. Bunun nedeni, ortamdaki enzim moleküllerinin ortam substrat moleküllerini karşılayamamasıdır. Başka bir deyişle enzim-substrat ara bileşiğinin oluşum hızında enzim derişiminin kısıtlayıcı rol oynamasıdır. Enzimlerin bu davranışı 1913 yılında L. Michaelis ve M. Menten tarafından önerilen bir mekanizmayla açıklanmıştır.



Burada; E enzimi, S substratı, ES arabileşiği ve P ürünü göstermektedir. Bu mekanizmanın kinetik analizi 1926'da Brips ve Haldane tarafından yapılmıştır.

Reaksiyon hızı için;

$$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_{mg} + S} \quad (1.2)$$

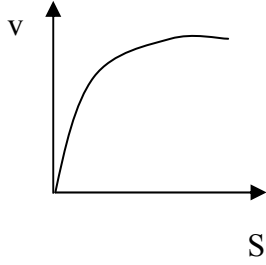
eşitliği elde edilir. Bu eşitlik (2.2)'de görüldüğü gibi belli bir değerden sonra substrat derişiminin arttırılmasıyla tepkime hızının artmayıp sabit değerde kalmasını sağlar. Bu denklem Michaelis-Menten eşitliği ve "K_{mg}" de Michaelis-Menten sabiti diye tanımlanır. Fiziksel olarak K_{mg} katsayısı enzim ve substratın birbirine olan ilgisini

göstermektedir. Enzim ve substrat arasındaki ilgi fazla ise oldukça düşük substrat derişimlerinde enzimi substrat ile doyurmak mümkün olur (Devlin, 1997).

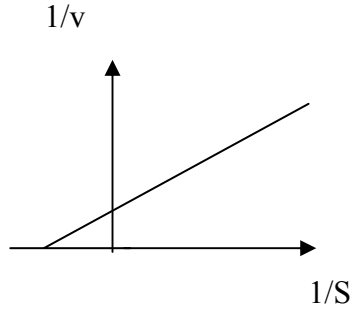
Lineerleştirmek için eşitlik (1.2)'nin tersi alınır ve düzenlenirse;

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{mg}}{V_m} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m} \quad (1.3)$$

denklemini elde edilir. (1/[S])'e karşı (1/v) grafiği çizildiğinde doğru elde edilir.



Şekil 1.1. Reaksiyon Hızının Substrat Derişimi ile Değişimi (Devlin, 1997).



Şekil 1.2 Lineweaver-Burk Grafiği (Devlin, 1997).

Enzimin K_{mg} değeri bulunurken Şekil 1.2.'de görünen ve (1.3) denklemi ile tanımlanan Lineweaver-Burk çiziminden yararlanılır.

Michaelis-Menten eşitliği, çözülmüş substratlar ve kütle aktarım kısıtlaması olmayan sistemler için geçerlidir. Bu nedenle çözünmez substrat sisteminde ve immobilize enzimlerde difüzyon kısıtlamalarından ötürü görünür K_{mg} değerleri verilir (Bailey ve Ollis, 1997).

Enzim reaksiyonlarının hızı kimyasal kinetikten farklılık göstererek, sıcaklıkla önce artar; sonra azalır (Şekil 1.3). Başka bir deyişle enzim aktivitesi belirli bir optimum sıcaklığa kadar artar, sonra ısısal deaktivasyon nedeniyle düşer. Enzimatik reaksiyonlar, kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi bu optimum sıcaklığa kadar Arrhenius kanununa uyar. Bu bölgede reaksiyon hız sabiti ve maksimum hız için;

$$k=A.e^{-E_a/RT} \quad (1.4)$$

$$V_m=k_3[E]_o \quad (1.5)$$

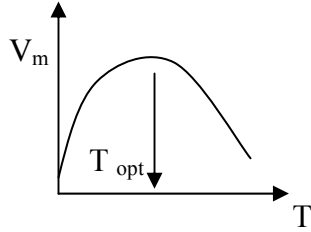
yazılabilir. Bu eşitlikler birleştirilirse;

$$V_m=E_o.A.e^{-E_a/RT} \quad (1.6)$$

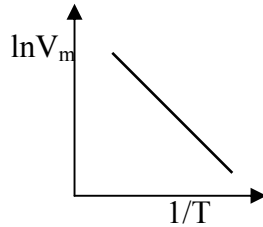
[E_o].A= α sabit ise

$$\ln V_m=\ln \alpha -E_a/RT \quad (1.7)$$

bulunur. Belirli sıcaklık değerlerine karşı gelen maksimum reaksiyon hızları eşitlik 1.7'ye göre grafiğe geçirilirse elde edilen doğrunun eğiminden enzimin aktivasyon enerjisi hesaplanır (Şekil 1.4.).



Şekil 1.3. Sıcaklıkla reaksiyon hızının değişimi (Devlin, 1997).



Şekil 1.4 Aktivasyon enerjisinin belirlenmesi (Devlin, 1997).

1.1.2.5. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Enzimler suda çözünen spesifik katalizörlerdir. Biyosensör sisteminde en yaygın kullanılan biyokatalizörler enzimlerdir. Serbest enzim reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından uygulamalarda reaksiyonu kontrol etmek oldukça güçtür. Ortama inhibitör katılması düşünülebilir. Fakat buda reaksiyon ürünlerini yeni bir kirlilik unsuru olacaktır. Ürünlerin arıtılması ek bir maliyet doğuracaktır. Ayrıca enzimi reaksiyon ortamında aktivitesini yitirmeden çıkarmak olanaksız olduğundan enzimin tekrar kullanılması söz konusu değildir. Enzimler spesifik fakat pahalı katalizörlerdir.

Tüm bu problemleri ortadan kaldırmak için enzimler immobilize edilmektedir. İmmobilize enzimlerin serbest enzime üstünlükleri;

- Reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilir.
- Çevre koşullarına karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Enzimin kendini parçalama olasılığı azalır.
- Mekanistik çarpışmalar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzime daha fazla aktivite gösterebilir.

Enzim immobilizasyon yöntemleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

1. Taşıyıcıya Bağlama: a. Kovalent Bağlama, b. İyonik Bağlama, c. Adsorpsiyon
2. Çapraz Bağlama
3. Tutuklama, a. Polimer Kafeste Tutuklama, b. Mikrokapsülleme

1.2. Biyosensörler

Sensör ölçüm yapılacak türe duyarlı kısım anlamına gelir. Bir sensör fiziksel boyuttaki değişimleri elektriksel boyuttaki değişimler olarak ölçer. Bu değişimler akım, gerilim, sıcaklık vs olabilir.

Gelişmekte olan eşsiz ilgi ve analitik aletlerin keşfi ve belirli kimyasal türlerin izlenmesi biyosensörlere dayandırılmaktadır. Biyosensörler doğadaki canlıların izlenip, gözlenmesinden sonra ortaya çıkmıştır. Örneğin yılan balıklarının su içine atılan çok az miktarda zehri bile algılayabilmeleri gibi.

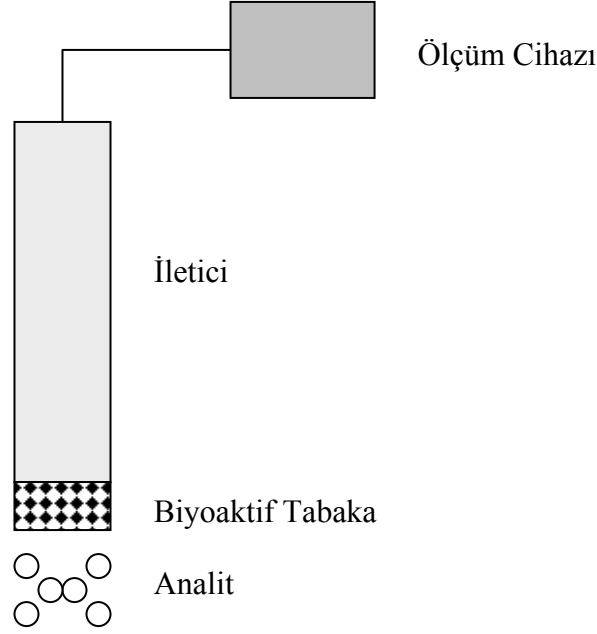
Biyosensörler, diğer adıyla biyospesifik elektrotlar, biyoajanları immobilize halde kullanan, çeşitli gaz, iyon ve biyolojik maddelerin teşhisi, kantitatif tayini ve orjinal sistemlerde izlenmesi amacıyla geliştirilmiş problemlerdir. Biyosensörler klinik tıpta teşhis ve tayin amacıyla, fermantasyon analizi ve kontrolünde biyoloji, kimya, gıda endüstrisi, ziraat ve veterinerlikteki çeşitli analizlerde, endüstriyel gaz ve sıvıların analizinde, çevre kirlenmesinin izlenmesinde, patlayıcılar ve diğer askeri alanlarda kullanılmaktadır (Campanella ve Tomasetti, 1989). En basit tanımıyla biyolojik katalizör taşıyan sensörler olarak tanımlanır. Biyosensörler canlılardaki çeşitli maddelerin algılanmasını mümkün kılan biyolojik maddelerin birleştirilmesiyle ortaya çıkmıştır. Bu sistemler bir yandan biyolojik sistemin yüksek seçiciliğini diğer yandan sensörlerin tayin duyarlılığını birleştirmiş ve çok geniş uygulama alanı bulmuştur. 1962 yılında Clark ve Lyons'un ilk enzim elektrot fikrini ortaya atmasıyla başlayan, sonraki yıllarda gelişen biyosensör teknolojisinin ürünleri günümüzde çok değişik alanlarda çok sayıda maddenin tayin ve izlenmesinde yaygın olarak kullanılır hale gelmiştir. Aşağıdaki çizelgede biyosensörlerle tayin edilebilen maddeler verilmektedir.

Çizelge 1.1. Biyosensörlerle tayin edilebilen maddeler (Pişkin, 1986).

<u>Analizi Yapılan Maddeler</u>	<u>Örnekler</u>
Amino Asitler	Alanin, arginin, asporjin, aspartik asit, sistin, glutamin, glutamik asit, glutation histidin, levsin, lisin, metionin, fenil alenin, sarkosin, serin, tayrosin, teitofan, valin
Gazlar	NH ₃ , H ₂ , CH ₄ , SO ₂ , NO
Kofaktörler	AMPT, ATP, NAD(P)H
Amidler ve aminler	Aminopirin, anilin, aromatik aminler, asetil kolin, kreatin, kreatinin, guanidin, guanosin, penisilin, spermin, ürik asit, üre, zantin
Karboksilik asitler	Asetik asit, formik asit, glukonik asit, izositrik asit, askorbik asit, laktik asit, malik asit, okzalik asit, pruvik asit, süksinik asit
Kompleks maddeler	Antibiotikler, mutojenler, vitaminler
İnorganik iyonlar	F ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₃ ⁻² , SO ₃ ⁻² , SO ₄ ⁻² , Hg ⁺² , Zn ⁺²

Bir biyosensör algılayıcı ile bütünleşmiş veya tamamen birleştirilmiş hassas biyolojik element içeren bir alettir. Biyosensörler esas olarak üç temel bileşenden ibarettir. Birinci kısım biyolojik olarak duyarlı materyal yani biyokatalizör tabakası. İkinci kısım kovalent bağlı biyolojik bileşenlerle temas edecek şekilde olan algılayıcı (transducer,sensör). Bu kısım kovalent bağlı aktif biyolojik bileşenlerin absorpsiyonuna ve eliminasyonuna izin veren yarı geçirgen bir zar içerir.

Biyosensörün üçüncü kısmı ise doğrudan biyokatalizör tabakasına bağlı elektronik aygıttır. Bu kısımda biyokatalizör ile tayin edilecek maddenin teması sonucu ortaya çıkan biyokimyasal sinyal uygun bir mekanizmayla kantitatif olarak elektrik sinyaline dönüştürülür. Aşağıda bir biyosensörün şematik gösterilimi verilmiştir.



Şekil 1.5 Bir biyosensörün genel şematik gösterimi (Dinçkaya, 1998).

Biyosensörler çeşitleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir,

1. Elektrokimyasal Biyosensörler
 - a. Amperometrik Biyosensörler
 - b. Potansiyometrik Biyosensörler
 - c. Kondüktometrik Biyosensörler
2. Optik Biyosensörler
3. Kalorimetrik Biyosensörler
4. Piezoelektrik Biyosensörler

1.2.1. Biyosensörlerde Kullanılan Biyokatalizörler

Biyokatalizör, enzim ve enzim sistemleri, dokular (hayvansal, bitkisel), bakteriler, mayalar, antibadiler, antijenler, organeller, biyolojik membran bileşenleri olabilir. Biyokatalizör seçimliliği ve duyarlılığı probun özellikleri yönünden en önemli noktalardan birisidir. Biyokatalizör kullanan sensörlerin diğerlerine göre önemli avantajları seçimli ve duyarlı olmalarıdır. Biyomolekülleri tanımayı kapsayan biyosensör mükemmel düzeyde seçiciliğe sahiptir. Fakat sıcaklık, pH, iyonik kuvvet gibi aşırı uç olan durumlarda sorun yaşanabilir.

1.2.2. Biyosensörlerin Çalışma Mekanizması

Biyosensörlerin çalışması sırasında ilk önce substratın çözelti içerisinde biyosensör yüzeyine taşınması gerçekleşir. Substratın taşınması difüzyon, karıştırma vb. gibi çeşitli şekillerde olabilir. Substrat biyokatalizörün aktif bölgesine difüze edilir. Biyokatalizör polimerik gözenekli membrana (selülozik diyaliz membranı gibi) emdirilmiş veya algılayıcı ile polimerik membran (selofan, selüloz asetat/nitrat, polivinil alkol, poliüretan vb) arasına sandviç edilmiş veya polimerik bir jel içinde hapsedilmiş olabilir. Bu hapsedme işlemi için poliakrilamid, jelatin, kalojen, agaroz vb gibi doğal veya sentetik polimerler kullanılabilir. Biyokatalizör ve substrat arasında reaksiyon meydana gelir. Bu etkileşme sonucu gaz molekülleri (O_2 , CO_2 , NH_3 , vb) salınabilir veya kullanılabilir, seçimli iyonlar oluşabilir. (H^+ , NH_4^+ , diğer tek değerlikli anyon ve katyonlar), ısı ortaya çıkar veya kaybolur, optik yoğunluk değişebilir, elektron salınabilir veya kullanılabilir. Biyokatalizör ve substrat reaksiyonu sonucu oluşan ürün algılayıcı yüzeyine taşınır. Algılayıcı yüzeyinde yukarıda bahsedilen değişimler algılanıp elektriksel devrelerle ölçülebilecek bir boyuta dönüştürülür. Ölçülen elektriksel sinyal analit derişimiyle orantılıdır.

1.2.3. Biyosensör Performans Kriterleri

Biyosensör cevaplarının karakterize edilmesi önemlidir. Verilen bir ortamda biyosensör optimizasyonunu kolaylaştırmak ve doğal olan hız basamaklarını göstermekteki parametreler bunu daha da önemli kılmıştır. Bu bölümde temel performans kriterleri kısaca listenecektir. Performans kriterleri biyosensörlere özgü değildir. Fakat yaygın olarak kimyasal sensör tiplerinin çoğunda veya analitik metotlarda bahsedilir.

1.2.3.1. Kalibrasyon Karakteristikleri

Elektrokimyasal sensörler her zaman üst limitte lineer konsantrasyon aralıklarına sahiptirler. Bu limit biyolojik reseptör veya biyokimyasal reseptörlerdeki biyokompleksler veya biyokatalizörlerle doğrudan ilişkilidir.

1.2.3.2. Seçicilik ve Güvenirlik

Biyosensör seçiciliği Mc Naught ve Willimsan tarafından, potansiyometrik sensörler veya amperometrik sensörler için ölçülmüş ve denenmiştir. Seçicilik algılayıcı veya biyolojik reseptör seçimine bağlı olarak değişir. Enzimlerin çoğu seçicidir. Buna karşın alkol, şeker grupları veya aminoasit oksidaz, peroksidaz, laktaz, tirozinaz gibi bazı sınıf enzimler geliştirmekte olan biyosensör sınıflaması için kullanılabilir. Bakteri ve doku kültürleri genellikle seçici değildir. Biyosensörlerin güvenirliliği verilen numune için seçicilik ve tekrarlanabilirliğinin her ikisine birden bağlı olarak değişir. Diğer açıdan analiz güvenirliliği verilen numune için, biyosensör cevapları doğrudan analit konsantrasyonuna bağlı olmalıdır.

1.2.3.3. Tekrarlanabilirlik, Kararlılık ve Ömür

Biyosensör cevaplarının tekrarlanabilir olması büyük önem taşır. Biyosensörlerdeki biyoaktif bileşen kararlı olmalıdır. Biyoaktif bileşenin kararlı olması çok sayıda analize imkan vereceği için biyosensörün ekonomik olmasını sağlar.

1.2.3.4. Kararlı Hal ve Geçiş Cevap Süreleri

Kararlı hal cevap süresi ölçüm hücresine her bir analit eklenmesi için kolaylıkla belirlenebilir. Kararlı hal cevabı çıkış sinyali %90'nın oluşması için gerekli süre olarak tanımlanır. Geçiş cevap zamanı analit eklenmesini izleyen çıkış sinyalinin maksimum değerinin birinci türevi $\{dR/dt\}_{max}$ için gerekli süreye karşılık gelir. Her iki cevap süresi analit, substrat ve ürünün farklı tabaka yada membranlardan aktarım hızlarına bağlıdır. Bu yüzden film kalınlığı ve geçirgenliği esas parametrelerdir. Her iki cevap süresi ayrıca kullanılan biyomoleküllerin aktivitesine bağlıdır. Bu aktivitenin yüksek olması cevap süresini kısaltır. Son olarak cevap süreleri ölçüm hücresine numunenin eklenme ve karıştırılma koşullarına bağlıdır.

1.2.4. Biyosensörlerde Kullanılan Metal-Nanotanecikleri

Metal-nanotanecikler farklı reaksiyonlar için katalizör gibi hareket ederler. Bazı metal-nanotanecikler (örneğin platin) bazı moleküllerin redoks özelliklerini katalizler bu etki elektroanalitik teknikler kullanılarak izlenir. Diğer taraftan metal-nanotanecikler elektronik geçişi kolaylaştırır ve ayrıca ligandlar ve biyomoleküller modifiye edilebilir. Sonuçta elektroanalitik teknikler, metal-nanoparçacıkların elektrokimyasal özelliklerinin tanımlanmasında faydalı bir araç olan elektrotlara sahiptir.

Metal-nanoparçacıkların diğer önemli bir uygulaması enzimatik sensörlerin yapımıdır ki bunların çoğunda altın nanoparçacıkları kullanılmıştır. Kolloidal altın ana parçacıklar olarak adlandırılan çok küçük oktahedral birimlerden oluşmuş metalik kolloid parçacıklarıdır. Altın parçacıklarının büyüklüğü esas olarak kolloidal altının oluşturulma yoluna bağlıdır. Altın nanoparçacıkları net negatif yük taşırlar. Bir protein ve diğer biyolojik molekül kolloidal altına eklendiğinde bu negatif yük parçacıkların yüzeyine, bu moleküllerin fiziksel adsorpsiyonuyla nötralize edilir. Elektron mikroskopisi ile yapılan işlemler kolloidal altının yaygın bir şekilde kullanılmasını açıklamakta kullanılmıştır ki pek çok makromolekül kolloidal altın üzerine adsorplandığında biyolojik aktivitelerini kaybetmemişlerdir. Bu gözlemler altının iletkenliğinin de dikkate alınmasıyla araştırma gruplarını kolloidal altın üzerine adsorplanmış enzimleri temel alan biyosensör elektrotlarını hazırlamaya sevketmiştir (Santoz vd., 2002).

2.KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Metal Nanotaneciklerin Kullanıldığı Bazı Uygulamalar

González-García ve Costa-García, karbon pasta elektrotta koloidal altın ve koloidal altın etiketlenmiş antihuman IgG (immunogold)'nin elektrokimyasal davranışlarını incelemişlerdir. Her iki kolloid elektrot yüzeyinde kuvvetle adsorplanmıştır. Onlar HCl ortamında $AuCl_4^-$ komplekslerinin oluşmasıyla yüksek potansiyelerde yükseltgenmişlerdir. Bundan sonra $Ag/AgCl$ 'e karşı +0.4 V civarında indirgenmişlerdir. Bu yöntem ve diferansiyel puls voltametri elektrokimyasal tekniğinin kullanılmasıyla düşük tayin sınırlarına ulaşmıştır. Ayrıca bu yöntem streptavidin-biyotin etkileşmelerinin incelenmesinde kullanılmıştır. Bu durumda karbon pasta elektrotu biyoince tabaka albumin ile modifiye edilmiştir ve streptavidin tayini için kullanılmıştır (González-García ve Costa-García, 2000).

Dequaire ve çalışma grubu tek kullanımlık karbon pasta elektrotunda anodik sıyırma voltametriyle indirekt tayin için koloidal altın etiketlenmiş elektrokimyasal immunoölçüm cihazı kullanmışlardır. İmmunoglobulin G'nin yarışmasız heterojen immunoölçümü gerçekleştirilmiştir. Anodik sıyırma voltametri yöntemiyle koloidal altın etiketinin tayini için immunoölçümün son basamağında altın metali salıverilmiştir. Bu salıverilme tutuklanmış bağlı kısmın çözünebilir iyonik Au^{3+} formuna yükseltgemesi yoluyla gerçekleştirilmiştir. Tayin sınırı pikomolar düzeyindedir (Dequaire vd., 2000).

Raj ve çalışma grubu yaptıkları çalışmada polikristalin altın elektrot üzerindeki amin mono tabakalarına immobilize edilmiş altın nanoparçacıklarını, askorbat içinde bulunan dopaminin seçici bir şekilde ölçümü için başarılı bir şekilde kullanmışlardır. Altın nanoparçacık immobilize edilmiş elektrotla dopamin ve askorbat için voltametik pikler ayrı ayrı gözlenmiştir. Altın nanoparçacıklarının yüksek katalitik aktivitesi yüzünden askorbat için yükseltgenme potansiyeli daha düşük pozitif potansiyele kaymıştır. Altın nanoparçacıklı elektrot mükemmel hassaslık ve iyi

seçicilik göstermiştir. Altın nanoparçacıklı elektrotla askorbat içinde mikromolar seviyede bulunan dopaminin ölçümünü yapmak mümkündür (Raj vd., 2003).

Endo ve arkadaşları dendrimer-stabilize altın nanoparçacıklarının GCE (camı karbon elektrot) üzerindeki elektrokimyasal aktivasyonunu incelemişlerdir. Bunun için sodyum hipokloratın dönüşümlü voltamogramlarını kullanmışlardır. Dendrimer-stabilize altın nanoparçacıkları elektroforez ile GCE yüzeyine depolanmış ve depolanma TEM (geçirimli elektron mikroskopisi) ve X-ışınları fotoelektron spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir. Dendrimer-stabilize altın nanoparçacıklarının depolanmasından sonra anodik ve katodik pik akımlarının arttığı bulunmuştur. GCE yüzeyine dendrimerlerin depolanmasındaki akım büyüklüğü, dendrimer-stabilize altın nanoparçacıklarının depolanmasındakinden daha küçüktür. Bu, elektroliz hızını altın nanoparçacıklarının arttırdığını göstermiştir (Endo vd., 2004).

Zhang ve arkadaşları Au nanoparçacıklarının sulfhidril-terminated monotabakalar aracılığı ile GCE yüzeyine bağlandığını bulmuşlardır ve bu olayı X-ray fotoelektron spektroskopisi, atomik kuvvet mikroskopisi, elektrokimyasal empedans spektroskopisi ve voltametri yöntemleri ile karakterize etmişlerdir. Altın nanoparçacıkları hemoglobini, yaklaşık $2,1 \times 10^{-10}$ mol/cm²'lik bir monotabaka yüzeyi ile adsorbe etmiştir. Altın nanoparçacıkları, elektron transferinde bir köprü gibi hareket etmişler ve modifiye GCE ile hemoglobin arasında direkt elektron transferine, başka bir elektron aracısının yardımına ihtiyaç duyulmaksızın katkıda bulunmuştur. pH 6,8 fosfat tamponunda, formal potansiyel yaklaşık -0,085V'ta, hemoglobin bir çift redoks piki gösterir. İmmobilize olmuş hemoglobin biyolojik aktivitesini devam ettirmiştir. Yüzey kontrollü elektrot prosesi ile heterojen elektron transfer hızı 1,05/s olarak ölçülmüş ve transfer yük katsayısı 0,46 olarak bulunmuştur. H₂O₂'nin elektrokatalitik indirgenmesi peroksit özellikleri göstermiştir. H₂O₂ konsantrasyonu 2×10^{-6} ile $2,4 \times 10^{-4}$ M arasında iken sabit akım cevabı doğrusal olarak artmıştır. H₂O₂ için tayin sınırı $9,1 \times 10^{-7}$ M'dır (Zhang vd., 2004).

2.2. Glukoz Biyosensörleri ile Yapılan Bazı Uygulamalar

Saito ve arkadaşları yaptıkları çalışmada radikal kopolimerizasyonla hazırlanan polivinil ferrosen ve co-2 hidroksietil metakrilat, amperometrik glukoz sensörleri için polimerik aracı olarak kullanılmıştır. GOD ve redoks kopolimerleri karbon pasta ile karıştırılmış ve karbon pasta enzim elektrodu glukozun amperometrik ölçümü için hazırlanmıştır. Bu kopolimerler GOD'ın aktif merkezi ve elektrot arasında polimerik araçlar olarak görev almışlardır. Biyosensörün cevap süresi 20 saniyedir (Saito ve Watanabe, 1997).

Chuang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada karbon pasta ve grafit elektrot gibi iki tip elektrot kullanmışlardır. Her iki elektrotta da glukoz oksidaz ve polietiliminin ferrosen içeren bölümü (B-PEI) birleştirilmiştir. B-PEI yüksek konsantrasyonda birincil amino grupları içermiş ve basit enzim ve taşıyıcı araçlar oluşturmak için kolayca modifiye edilebilmiştir. Polietiliminin ekstra avantajı esnek karakterinden dolayı etkili bir elektron aracısı olmasıdır. Her iki elektrotta da ferrosen içeren polietilimin polimerine kovalent bağla GOD'ın hidrofilik polimer matris içinde modifiye edilmiştir. Hazırlanan elektrotlar glukoz konsantrasyonlarını hızlı bir şekilde yanıtlamış ve kararlı hal akım cevapları 10 s'den daha az sürede elde edilmiştir. Amino gruplarını kapsayan polietilimin polimerinin yüksek glukoz tepki hızı, yükseltgenme indirgenme polimerinin amino grupları ile enzim arasında etkileşiminden dolayı polimer ve enzimin yakın ilişkisinin elektron transfer hızını değiştirdiğini göstermiştir (Chuang vd., 1997).

Xu ve Chen yaptıkları çalışmada etakridin potansiyostatik ve dönüşümlü voltametri yöntemleri ile Pt elektrotta başarılı bir şekilde polimerleştirilmiştir. GOD ince polietakridin matriksi içine tutuklanmış ve bu elektrot 2 s içinde glukozla amperometrik cevap sergilemiştir. Michealis-Menten sabiti ve maksimum akım sırasıyla 15,7 mM ve 209 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ olarak bulunmuştur. Polietakridin seçici geçirgen özelliğinden dolayı L-askorbik asit, ürik asit, asetaminofenol ve L-sistein gibi elektroaktif maddelerin girişimlerini azaltmıştır. Hazırlanan bu elektrot bazı türlerin

girişim etkisini azalttığını ve 18 mM kadar glukoz konsantrasyonunda geniş bir doğrusal cevap aralığına sahip olduğu bulunmuştur (Xu ve Chen, 1999).

Xu ve arkadaşları glukoz oksidaz varlığında platin elektrotta p-klorofenolün elektrokimyasal polimerizasyonu ile yeni amperometrik glukoz biyosensörü geliştirmişlerdir. Biyosensörün amperometrik cevabı enzimatik reaksiyonun hidrojen peroksitin yükseltgenme geriliminde (+0,6V'da) fosfat tamponunda ölçülmüştür. Sensörün performansı farklı monomer konsantrasyonlarında ve polimerizasyon potansiyellerinde incelenmiştir. Biyosensör optimum şartlar altında $2,4 \times 10^{-4}$ ile $1,5 \times 10^{-2}$ M arasında doğrusal cevap vermiş ve cevap süresinin iki saniyeden daha az olduğu bulunmuştur. Askorbik asit ve ürik asit için girişimlere bakılmış ve fark edilebilir bir girişim gözlenmemiştir. 90 gün sonra biyosensörün cevabı neredeyse hiç değişmemiştir (Xu vd., 2001).

Yang ve arkadaşları biyosensör uygulamalarında enzimin yüzeye kovalent bağlanması için, gözenekli organik-inorganik sol jel bileşiklerini kullanmışlardır. Bu bileşikler grafit tozu, ferrosen, amino ve metil silikattan oluşmuşlardır. Grafit tozu elektrot için iletkenlik sağlarken, ferrosen ise yüzey ve enzimin aktif bölgesi arasında aracılık yapmıştır. Amin grupları ise karboimid reaksiyonu üzerinden enzim için kovalent bağ oluşturmuşlardır. Deneysel pH=7 ve 26°C'de yapılmıştır. Glukoz biyosensörünün seçiciliğini değerlendirmek için sukroz, fruktoz, maltoz, ksiloz, sülfat, oksalat, ürik asit gibi girişim yapabilecek maddelerin etkisi araştırılmıştır. Fruktoz, maltoz, ksiloz, sukroz, oksalat (0,5 mM) çalışılan şartlarda %2 bulunduğu hiçbir girişime yol açmadığı bulunmuştur. Asetaminofenol ve ürik asit 0,5 mM konsantrasyonda girişim yapmıştır. Sülfat ve askorbik asit elektrot yüzeyinde doğrudan okside olduğundan ciddi bir girişime sebep olduğu bulunmuştur. Elektrot yüzeyindeki hidrofilik ve hidrofobik davranışlar silikat yapısındaki amino ve metil grupları tarafından kontrol edilmiştir. Glukoz için optimal elektrot cevabı 0,1-27 mM arasında doğrusal, hassaslık $1,3 \mu\text{A mM}^{-1}$, kararlılık 2 ay ve tespit sınırı 26 μM olarak bulunmuştur (Yang vd., 2002).

Sung ve Bae yaptıkları çalışmada yeni bir glukoz biyosensörü hazırlamak için pirol ile birlikte polianyon, polietilen glikol ve GOD konjugatlarının elektrokimyasal polimerizasyonunu kullanmışlardır. Pt elektrot yüzeyinde polipirol matriksi içinde tutuklanan GOD, PEG (polietilen glikol) üzerinden polianyon ile birleşmiştir. Çalışmada PEG 1000, 2000, 3000, 4000 gibi dört farklı zincir uzunluğu denenmiş, bunların enzim immobilizasyonu ve elektrot işlevi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Enzim elektrodun hazırlanmasında 800mV potansiyel ve 225 mC/cm^2 film kalınlığı kullanılmıştır. Elektrot üzerindeki immobilize enzimin aktivitesi $119\text{-}209 \text{ mU/cm}^2$ arasında değişmiş biyoaktivite daha uzun PEG'lerde artmıştır. Amperometrik cevap $270 \text{ nA mM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ kadar değişen duyarlılık ile 20 mM glukoz konsantrasyonuna kadar doğrusallık gözlenmiştir (Sung ve Bae, 2002).

Bir başka çalışmada GOD, enzim ile poli-lizin zinciri arasında araya eklenen peptit bağlayıcısı ile genetik olarak değiştirilmiştir. Duyarlılık ve glukoz biyosensörünün kararlılığını geliştirmek amacıyla GOD'a ferrosen karboksilik asit ilave edilmiştir. Glukoz biyosensörü gen düzeyinde değiştirilen GOD ile geliştirilmiştir. Bu değişiklik sinyal düzeyi, cevap hızı, glukoz alıcısının ömrünü geliştirmiştir (Chen vd., 2002).

Uang ve Chou yaptıkları çalışmada birçok enzimle uyum gösteren, pirol monomerinden kolayca sentezlenen polipirol kullanmışlardır. Pt çalışma elektrodu yüzeyinde galvanostatik elektropolimerizasyonla hazırlanan polipirol filmi hazırlanmış ve GOD bu film içinde tutuklanmıştır. Biyosensörün amperometrik akımı H_2O_2 konsantrasyonuna bağlı olarak değişmiştir. Glukoz biyosensörünün hassaslığı tutuklanan enzim miktarı ve film kalınlığına bağlı olarak değişmiştir. Girişime neden olan askorbik asitin girişim etkisi ise film kalınlığı artıkça azalmıştır. Geliştirilen sensörün doğrusal aralığı $0\text{-}10 \text{ mM}$ ve duyarlılık 7 nA/mM olarak ölçülmüştür. Cevap süresi 15s ve Michaelis–Menten sabiti $37,6 \text{ mM}$ olarak bulunmuştur (Uang ve Chou, 2003).

Bir başka çalışmada poliglutamat–GOD kompleksi hazırlanmış ve hazırlanan kompleks sistemin modifiye altın elektrodu üzerine damlatılmıştır. Elektrot

yüzeyindeki sistemin ve poliglutamam arasında elektrostatik bağ oluşumu sonucunda GOD'ın elektroda bağlanması sağlanmıştır. Hazırlanan enzim elektrodu <15 s gibi oldukça hızlı cevap göstermiştir çünkü enzim tabakası oldukça incedir. Poliglutamam-GOD yerine modifiye edilmemiş GOD kullanıldığı zaman enzim elektrodunun hassaslığı oldukça düşmüştür. Bu da kompleksteki poliglutamam zincirlerinin modifiye elektrot yüzeyindeki immobilizasyon için gerekli olduğunu açıkça göstermiştir. 5-100 µM arasında glukoz konsantrasyonu ve kompleks immobilize edilen elektrodun akım cevabı arasında doğrusal bir ilişki vardır. Yapılan deneylerin sonucu bu immobilizasyon tekniği biyoçiplerin ve biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılabileceğini göstermiştir (Yabuki vd., 2003).

Luo ve arkadaşları glukozun nicel tayini için kolay hazırlanabilen ve homojen bir biokompoziti temel alan amperometrik bir biyosensör yapmışlardır. Bu biokompozit chitosan hidrojel, glukoz oksidaz ve altın nanoparçacıklarının direkt ve kolay elektrokimyasal tutuklanma methodlarından yararlanılarak hazırlanmıştır. Biyosensörün cevap süresi çok kısa ve glukoz için tayin sınırı 2,7µM, 5,0 ile 2,4 mM arasında doğrusallık sergilemektedir (Luo vd., 2004).

Yeni bir yaklaşıma göre, PB-modifiye camı karbon elektrot üzerindeki glukoz oksidaz immobilizasyonu silika sol-jel dış tabaka ile sağlanabilir olarak tanımlanmıştır. Biyosensör sandwich biçimindedir. Sensör düşük potansiyel ve sol-jel mikroortamında H₂O₂ için PB-modifiye elektrodunu elektroindirgenmesi ile yüksek seçicilik ve hassaslık göstermektedir. Sol-jel film enzim tabakasının dış yüzeyinde kararlılık ve hassaslığın artmasına katkıda bulunmuştur. Biyosensör 0,475mM glukoz konsantrasyonunda yükses hassaslık, 1,182µAmM⁻¹ eğim ve 0,02mM tayin sınırı bulunmuştur. Biyosensör diyabetik hastaların kan şekeri tayininde kullanılmak üzere denenmiştir (Li vd., 2004).

Bakır modifiye edilmiş altın elektrotundaki elektrokimyasal olarak polimerize olmuş iletken olmayan poli(o-aminofenol) filmi içerisinde, glukoz oksidaz'ın immobilizasyonuna dayalı amperometrik glukoz biosensörü geliştirilmiştir. Pürüzlü yüzey ve elektrokimyasal olarak Cu nanoparçacıklarının glukozu elektrokimyasal

oksidize etme yeteneği, tayin sınırının geliştirilmesi ve maksimum cevap akımı ve hassasiyetinin artışıyla sonuçlanmıştır. Au/Cu/POAP/GOD elektrotuna dayalı biyosensor'ün, Au/POAP/GOD elektrotuna dayalı biosensor'den 2 kat daha düşük tayin sınırı, üç kat daha büyük maksimum akım ve 2.5 kat daha yüksek hassaslığı vardır. İlaveten, hızlı yanıt alma süresi ve askorbik asit, ürikasit ve asetaminofen için de iyi seçicilik elde edilebilmektedir. Diğer taraftan, Cu'ın elektrokimyasal depolanma süresinin, uygulanan potansiyelin etkileri ve enzimatik sensörün amperometrik cevabına ortamdaki elektroaktif bileşiklerin etkileri incelenmiş ve tartışılmıştır. Biyosensor'ün kararlılığı ve mükemmel yeniden üretilebilirliği de gözlenmiştir (Pan vd., 2005).

Hu ve arkadaşları tarafından kolloidal altın modifiye edilmiş karbon pasta elektrot üzerine adsorplanmış GOD'ın elektrokimyası araştırılmıştır. Adsorplanmış GOD'ın 0,1 M pH=5 tamponunda 449±1 mV formal potansiyelde bir çift indirgenme piki görülmüştür. 10-100 mV/sn arasındaki tarama hızında yüzey kontrollü elektrot prosesi ile sabit elektron transfer hızı (38,9±5,3)/s olarak ölçülmüştür. Altın nanoparçacıkları üzerinde adsorplanmış GOD'ın biyoaktivite ve kararlılığı incelenmiştir. İmmobilize GOD'ın indirgenmesinde çözünmüş O₂ indirgenme pik akımını artırmıştır. Glukoz ilavesi ile indirgenme pik akımı düşmüştür. Hazırlanan sensör 8,4 µA/mM hassaslıkta 0,004-0,28 mM doğrusal çalışma aralığı ve 0,01 mM tespit sınırında glukoz ölçümü için kullanılabilmiştir. Ayrıca hazırlanan sensör ürik asit ve askorbik asit gibi girişime neden olabilecek maddelerin girişim etkisini dışlamaktadır (Liu ve Ju, 2003).

Huang ve arkadaşları CdS nanoparçacıkları modifiye edilmiş pirolitik grafit elektrot üzerine adsorplanmış glukoz oksidazın direkt elektrokimyasını incelemiştir. CdS nanoparçacıklarına tutuklanmış GOD'ın biyoaktivitesi ve yapısı bozulmamış ve çözünmüş oksijenin indirgenmesini elektrokatalizlemiştir. İndirgenme pik akımında büyük bir artış olmuştur. Glukoz eklenmesi ile indirgenme pik akımı azalmış ve bu sonuç glukoz tayini için kullanılmıştır. Üretilen glukoz biyosensörünün performans ve karakteristik özellikleri, kararlılık, hassaslık, tayin sınırı incelenmiştir. Sonuçlar üretilen biyosensörün hassas ve glukoz tayini için uygun olduğunu göstermiştir. CdS

nanoparçacıklarının glukoz biyosensörü yapımında enzim immobilizasyonu için iyi bir materyal olduğu gözlenmiştir (Hung vd., 2005)

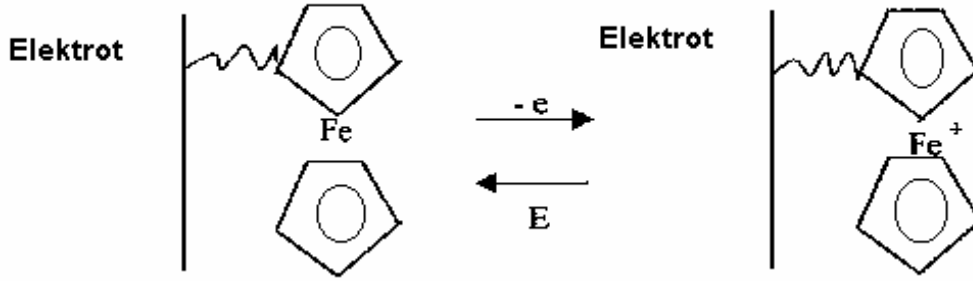
Wu ve arkadaşları yumurta kabuğu membranı kullanarak bir glukoz biyosensörü yapmayı denemişlerdir. Bu membranı enzim immobilizasyon platformu ve bir çözülmüş oksijen elektrodunu dönüştürücü gibi kullanmışlardır. Mükemmel gaz ve su geçirgenliği ve enzim ile iyi biyolojik uyumu yüzünden yumurta kabuğu membranın enzim immobilizasyonu için ideal bir platformdur. Ayrıca yumurta kabuğu membranı diğer membran materyallerine göre daha ucuz ve kolay elde edilebilir. Glukoz oksidaz öncelikle yumurta kabuğu membranın yüzeyine tutuklanmış, sonra çözülmüş oksijen sensörünün yüzeyine tutuklanmıştır. Birçok araştırmacı grup glukozun enzimatik dönüşümü sırasındaki oksijen konsantrasyonundaki değişimi ölçmek için halen Clark elektrotlarını kullanmaktadır. Bu çalışmada daha ucuz ve Clark oksijen elektrodundan geliştirilmiş bir biyosensör geliştirilmiştir. Elektrokimyasal yöntemler kullanıldığında glukoz konsantrasyonu arttıkça çözülmüş oksijen seviyesi azalmıştır. Tutuklanmış enzim membranı analitiksel değişimlere hassastır. Glukoz tayini için biyosensörün doğrusal cevabı $1 \times 10^{-5} - 1,3 \times 10^{-3}$ M arasındadır. Biyosensör kullanılmadığı zamanlarda $+4$ °C'de buzdolabında saklanmış ve raf ömrünün uzun olduğu bulunmuştur.

2.3. Polivinilferrosen Modifiye Elektrotlar ile İlgili Bazı Uygulamalar

Ferrosen tersinir bir elektron aktarımıyla kolaylıkla ferrosenyum katyonuna yükseltgenebilen fonksiyonel bir moleküldür. Ferrosen içeren doymamış bileşiklerden vinilferrosenin radikal homo ve kopolimerizasyonu, serbest radikal başlatıcılarla polimerleştiği bulunmuştur. (Aso vd., 1969).

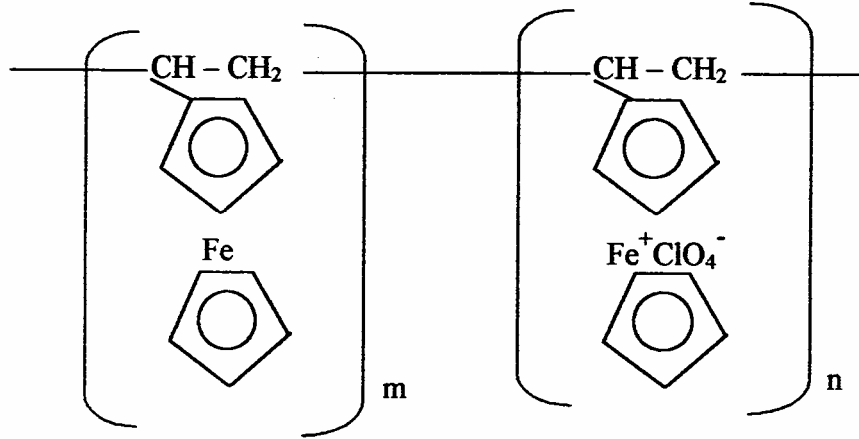
Kimyasal polimerizasyonla elde edilmiş polivinilferrosenin (PVF) elektrot yüzeyine kaplanmasında metilen klorürdeki PVF çözeltisinden; a) Elektrot yüzeyine elektrokimyasal çöktürme; b) Daldırıp kurutma ya da damlatma-döndürerek buharlaştırma yöntemleri kullanılabilir. Elektrokimyasal çöktürme yönteminde polimer çözeltisine daldırılan elektroda uygun bir gerilim uygulanarak yapılan

elektrolizle polimerin yükseltgenmiş formu elektrot yüzeyinde biriktirilir. Daldırıp-kurutma yönteminde elektrot polimer çözeltisinde bir süre bekletildikten sonra kurutulur, damlatma-döndürerek buharlaştırma yönteminde ise elektrot yüzeyine polimer çözeltisi damlatılıp elektrodun döndürülmesi yoluyla çözücü buharlaştırılır. PVF bir redoks polimeridir, yani polimerin kendisi de elektroaktiftir. Elektriksel iletkenlik polimerin yapısındaki yükseltgenmiş ve indirgenmiş gruplar arasında elektron atlaması yolu ile sağlanır. Değişik yöntemler kullanılarak PVF ile kaplanan elektrotlarda yüzeye bağlanmış bir ferrosen polimerinin tersinir bir yükseltgenme indirgenme tepkimesi verdiği bulunmuştur (Umana, 1980; Gülce, 1993).



Şekil 2.1. Ferrosen Polimerinin yükseltgenme-indirgenme tepkimesi (Umana, 1980).

Elektrokimyasal olarak katkılanmış PVF filmleri, metilen klorürde çözülmüş PVF'nin sabit gerilimdeki anodik elektrolizi ile hazırlanmıştır. Elektrot yüzeyine biriktirilen polimerin ClO_4^- karşıt anyonu ile ferrosen ve ferrosenyum gruplarını içeren kısmen yükseltgenmiş bir yapıda olduğu ileri sürülmüştür (Shirota vd., 1984).



Şekil 2.2. Elektrokimyasal olarak katkılanmış PVF (Shirota vd., 1984).

Elektrokimyasal olarak biriktirilmiş PVF'nin dağılmış yansıma (elektronik diffuse reflection) spektrumunda, 460 ve 625 nm' de ferrosen ve ferrosenyuma ait adsorbsiyon pikleri gözlenmiştir. Bu polimerin oda sıcaklığındaki yaklaşık iletkenliği 1.10^5 cm^{-1} olarak ölçülmüştür. Bu iletkenliğin katkılama derecesine bağlı olduğu %60 katkılama ile en büyük iletkenlik değerinin elde edildiği belirtilmiştir.

Gülce ve çalışma grubu yaptıkları bir çalışmada dönüşümlü voltametri ve diferansiyel pulse anodik sıyırma metodunu kullanarak polivinilferrosenyum kaplı Pt elektrotlarla iyodür, tiyosiyanat ve siyanürün elektroyükseltgenme davranışlarını incelemişlerdir. IR ve UV spektroskopik data ve diferansiyel tarama kalorimetri (DSC) ölçümleri bu anyonların polimerik yapıda anyon değişiminin sonucu olarak biriktirilmekte olduğunu göstermiştir. Bu anyonların filmde anodik sıyırma ile ayrılmaları önderiştirmeden sonra gerçekleştirilmiştir. Tiyosiyanat ve iyodür iyonları karşıt iyonlar olarak film yapısı içinde biriktirilirken, siyanürün fazlası filmin fiziksel özelliklerinde geri dönüşümü olmayan değişikliklere neden olmuştur. Buradan anlaşıldığı gibi PVF modifiye yüzeylerin elektrokimyasal özelliklerinin anyonik çözeltilerde oldukça duyarlı olduğu ve fosfat gibi diğer elektroaktif anyonların polimerik filmin elektroaktifliğini kaybetmesinde etkili olduğu belirlenmiştir (Gülce vd., 1993).

Gülce ve arkadaşlarının başka bir çalışmasında antrasen ve bunun bazı türevlerinin polivinilferrosenyum kaplı Pt elektrot yüzeyindeki elektroindirgenme davranışları incelenmiş ve kaplanmamış Pt yüzeyde asetonitril/0,1 M TBAP çözeltisinde dönüşümlü voltametri yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Filmde elektrot reaksiyonlarından sonra meydana gelen yapısal değişiklikler IR spektroskopisi ve DSC ölçümleri ile takip edilmiştir. Antrasen türevlerinin katalitik indirgenmesi elektrot reaksiyonlarının kaplanmamış yüzeyde yapılmasıyla meydana gelmiştir. Bu çalışma, $PVF^+ClO_4^-$ 'nin çözeltideki türlerin indirgenmesi için kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot olarak kullanıldığında katalitik özelliklerinin ne kadar önemli olduğunu göstermiştir (Gülce vd., 1994-a).

Aynı grup tarafından polivinilferrosenyum kaplı Pt elektrodunda antrasen ve 9,10-difenil antrasenin elektroyükseltgenme davranışı incelenmiş ve asetonitril / 0,1 M TBAP çözeltisinde dönüşümlü voltametri kullanılarak kaplanmamış Pt yüzeydeki cevap karşılaştırılmıştır. Elektrot reaksiyonundan sonra film yapısında meydana gelen değişiklikler IR spektroskopisi ile tayin edilmiştir. Elektrot potansiyeli +1,5 ve 0,00 V arasında döndürüldüğünde kinon ve hidroksi substite tipi ürünlerinin oluşumunun açıklanabileceği gösterilmiştir. Antrasenin katalitik yükseltgenmesi, potansiyel döngüsünün +1,50 ve -2,30 V arasında tutulmasıyla elde edilmiştir. Bu çalışma ortamında PVF^+ merkezlerinin antrasenin indirgenmesini katalizlediği ortaya çıkmıştır (Gülce vd., 1994-b).

Gülce ve arkadaşları diğer bir çalışmalarında aerobik çözelti koşullarında basit, duyarlı, kararlı, düşük maliyetli ve hızlı cevap alınabilen bir glukoz sensörü tanımlamışlardır. Elektrodun akım cevabı hem voltametrik pik akımı değerleri hem de kararlı akım değerleri elde edilerek tayin edilmiştir. Bu çalışmada aerobik koşullar altında glukoz tayini için glukoz oksidazın PVF redoks polimere immobilize edilerek kullanılabilmesi ilk kez belirlenmiştir. Polimerik materyalin ferrosenyum merkezlerinin, enzimatik reaksiyon boyunca üretilen hidrojenperoksitin yükseltgenmesi için görünür bir aracı olduğu belirlenmiştir (Gülce vd., 1995-a).

Aynı çalışma grubu bir diğer çalışmasında, glukoz oksidaz ve invertazın polivinil ferrosenyum perklorat film içine birlikte immobilize edilmelerine dayanarak, basit, hassas, kararlı ve düşük maliyetli bir sukroz sensörü geliştirmiştir. İvertaz, α glukoz ve β fruktozun sukroza dönüşümünü katalizler. Sık kullanılan bir üçüncü enzim olan ve mutarasyon için kullanılan mutorazın kullanımını elimine eden ortam katalizörü olan fosfat iyonları α glukoz ve β fruktoza dönüşümü sağlar. Glukoz oksidaz H_2O_2 üreterek glukonik asitin β glukozu yükseltgenmesini katalizler. O_2 'nin indirgenme akımına dayalı sukroz elektrotlarının aksine H_2O_2 'nin yükseltgenmesine dayanan akımı PVF^+ merkezlerinin katalizlediğini ortaya çıkarmışlardır (Gülce vd., 1995-b).

β galaktosidaz ve glukoz oksidazın redoks polimeri olan polyvinilferrosenyum perklorat ($PVF^+ClO_4^-$) içinde birlikte immobilize edilmesiyle laktoz tayini için bir enzim elektrot geliştirilmiştir. Elektrodun amperometrik cevabı enzimatik olarak üretilen H_2O_2 'nin elektroyükseltgenmesini sağlayan $+0,7$ V'da ölçülmüştür. Optimum pH=7,8 olarak belirlenmiştir. Substrat, tampon derişimi ve pH'nın elektrot cevabına etkisi incelenmiştir. Laktoz tayini için polarimerik, kromatografik, spektroskopik ve titrimetrik metotlar çok kullanılmaktadır. Bu yöntemler genellikle yorucu, zaman alıcı ve pahalıdır. Enzim immobilizasyon tekniklerinin elektrokimyasal sensörlerle kullanıldığında daha hızlı ve ucuz analiz metotları olarak çok daha kullanışlı olduğu belirlenmiştir (Gülce vd., 2002-a).

Polivinilferrosenyum perklorat kaplı Pt elektrot yüzeyine galaktoz oksidaz immobilize edilerek galaktoz tayini için, yeni bir enzim elektrodu geliştirilmiştir. Enzim elektrodunun amperometrik cevabı SCE'ye karşı $+0,70$ V'da ölçülmüştür. Enzim elektrot cevabı üzerine galaktoz derişimi ve sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Doğrusal çalışma aralığı $40,0$ mM'a kadar ve cevap süresi 30-40 s olarak bulunmuştur (Gülce, 2002-b).

Gülce ve çalışma grubu diğer bir çalışmasında, alkol tayini için polivinilferrosenyum perklorat kaplı Pt elektrot yüzeyinde alkol oksidaz tutuklayarak, yeni bir enzim elektrodu geliştirmişlerdir. Enzimatik olarak üretilen H_2O_2 'nin elektroyükseltgenmesi sabit $+0,7$ V'da ölçülerek amperometrik cevap alınmıştır.

Enzim elektroduna substrat tampon ve enzim derişimi, pH ve sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Çalışma sıcaklığı 30°C ve optimum pH=8,0 olarak belirlenmiştir. Enzim elektrodunun duyarlılığı sırasıyla: metanol > etanol > n-butanol > benzil alkol şeklindedir. Lineer cevabın metanol için 3,7 mM, etanol için 3,0 mM, n- butanol için 6,2 mM, benzil alkol için 5,2mM'a kadar olduğu belirlenmiştir. İmmobilize enzim sisteminde metanol için görünür Michaelis-Menten sabiti (K_{Mapp}) 5,78 mM ve aktivasyon enerjisi 38,07 kJ/mol olarak bulunmuştur (Gülce vd., 2002-c).

Bir diğer çalışma grubu yaptıkları çalışmada laktatın amperometrik ölçümü için, Pt elektrot üzerine kaplanan $PVF^+ClO_4^-$ de laktat oksidaz tutuklamışlardır. Geliştirilen elektroda sıcaklık, pH, polimer film kalınlığı ve enzim konsantrasyonu araştırılmıştır. Bu enzim elektrodu için doğrusal konsantrasyon aralığı 0,05-0,6 mM olarak bulunmuştur. Bulunan maksimum akım değeri diğer çalışmalarda bulunan değerlerden daha yüksektir. Hazırlanan enzim elektrot için günlük olarak ölçülen akım değerlerine bakılarak kararlılık 15 gün olarak bulunmuştur (Aydın vd., 2002).

Yıldız ve çalışma grubu organik peroksitler, t-bütilhidroperoksit, 2-bütanon peroksit, kümen hidroperoksit ve t-bütil perasetat ölçümü için amperometrik bir enzim elektrodu geliştirmişlerdir. Enzim elektrodu polivinilferrosenyum film içinde horseradish peroksidaz elektrostatik immobilizasyon ile hazırlanmıştır. $PVF^+ClO_4^-$ film Pt elektrot üzerine 0,7 V'ta 0,1 M TBAP'daki metilenklorid içindeki polivinilferrosenin elektroyükseltgenmesi ile kaplanmıştır. Modifiye enzim elektrodu pH=8,5 0,05 M fosfat tamponunda HRP'nin anyon değiştirmesi ile hazırlanmıştır. Film kalınlığı, immobilizasyon sırasındaki enzim konsantrasyonu, sıcaklık gibi parametrelerin enzim elektrodunun performansı üzerine etkileri araştırılmıştır (Yıldız vd., 2002).

Gülce ve arkadaşları bir diğer çalışmalarında kolin tayini için yeni bir enzim elektrodu geliştirmişlerdir. Enzim elektrodu polivinilferrosenyum perklorat kaplı Pt yüzeyine kolin oksidaz tutuklanarak hazırlanmıştır. Kolin oksidaz, H_2O_2 üreterek kolinin betaine yükseltgenmesini katalizler. Polivinilferrosenyum merkezlerinin H_2O_2 yükseltgenmesini katalizlemesi ile akım ölçülmüştür. Kolin derişimi, çalışma

sıcaklığı ve pH'ın enzim elektrodun cevabı üzerine etkileri çalışılmıştır. Cevap süresi 60-70 sn ve lineer çalışma aralığı 1.2 mM kolin derişimi olarak bulunmuştur. Ölçülebilir akımı üreten minimum substrat derişimi $4 \cdot 10^{-6}$ mM olarak bulunmuştur. Hazırlanan bu enzim elektrot için Michaelis-Menten sabiti aktivasyon enerjisi sırasıyla 2.32 mM ve 38.91 kJ/mol olarak bulunmuştur (Gölce vd., 2003).

Bir başka çalışmada Pt elektrot yüzeyindeki polivinilferrosenyum perklorat matriksi içerisinde asetilkolin esteraz ve kolin oksidaz tutuklanarak sulu çözeltide asetilkoline duyarlı yeni bir enzim elektrot geliştirilmiştir. Enzim elektrot cevabı üzerine polimerik film kalınlığı, pH, sıcaklık, substrat ve enzim konsantrasyonlarının etkileri araştırılmıştır. Optimum pH 7,4 ve çalışma sıcaklığı 25 °C olarak kullanılmıştır. Cevap süresi 30-50 s, lineer çalışma aralığının üst sınırı 1,17 mM asetil kolin derişimi olarak bulunmuştur. İmmobilize enzim sistemi için görünür Michealis-Menten sabiti ve aktivasyon enerjisi sırasıyla 1,74 mM asetilkolin ve 14,92 kJ/mol'dur (Şen vd., 2004).

3. METARYAL ve METOT

3.1. Kullanılan Deneysel Yöntem

3.1.1. Dönüşümlü Voltametri

Voltametik yöntemlerde kullanılan elektrokimyasal hücreler üç elektrotludur. Çalışma elektrodu olarak mikro, yarı mikro elektrotlar tercih edilir. Karşılaştırma elektrodu sulu ortamda kalomel, susuz ortamda Ag/AgCl elektrodudur. Karşıt elektrot olarak alanı büyük Pt tel kullanılır.

Dönüşümlü voltametri yönteminde zamanla artan potansiyel programı uygulanır ve istenilen gerilim değerine ulaşıncaya uygulanan gerilimi zamanla doğrusal olarak azalacak şekilde ters çevrilir. Kütle aktarımı sadece difüzyon ile aktarılır. Bu yüzden pik şeklinde eğriler elde edilir ve bu eğrilere dönüşümlü voltamogram adı verilir.

Gerilim tarama yönü ters çevrildiğinde başlangıçta indirgenen tür yükseltgenir ve buna ait yükseltgenme piki gözlenir. Anodik ve katodik pik gerilimlerinin tam ortası o sistemin E^0 (formal gerilim) değerine eşittir. Tersinir sistemler için ileri yöndeki pik akımı geri yöndeki pik akımına eşit olmalıdır.

Dönüşümlü voltamogramların ayrıntılı bir şekilde incelenmesi ile bir sistemin kaç adımda ve hangi gerilimlerde indirgenip yükseltgenebileceğini, elektrot tepkimesinin tersinir olup olmadığını, tepkime ürünlerinin kararlı olup olmadığını, elektrot tepkimesinin bir çözelti tepkimesi ile elele gidip gitmediğini, yüzeye tutunma olup olmadığını anlamak mümkündür.

Tersinir bir sistem için pik akımı, i_p , (3.1) eşitliği ile verilir (Bard ve Faulkner, 1944).

$$i_p = kn^{3/2} AD^{1/2} Cv^{1/2} \quad (3.1)$$

Burada;

i_p : Pik akımı (amper)

n: Elektrot tepkimesinde aktarılan mol elektron sayısı

A: Çalışma elektrodunun alanı (cm²)

D: Difüzyon katsayısı (cm²/s)

C: Elektroaktif maddenin derişimi (mol/cm³)

v: Gerilim tarama hızı (volt/s)

k: Randles-Sevcik sabiti (2,69.10⁵)'dir.

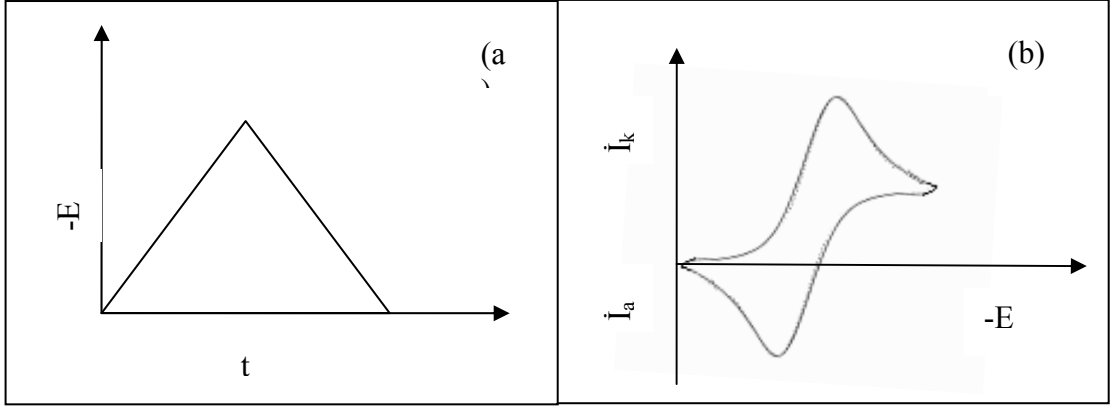
Gerilim tarama programı bir kez uygulanabileceği gibi ard arda istenilen sayıda da uygulanabilir. Tek program uygulandı ise bu voltamograma tek döngülü voltamogram denir.

Voltamogramda geri pik gözleniyor ve pik akımı tarama hızının karekökü ile artıyorsa elektrot tepkimesinin tersinir olduğuna karar verilir.

Akım-potansiyel eğrileri, hem katodik hem de anodik olayları gösterir. Tepkime tersinir olduğunda taramanın bir yönünde indirgenme ve diğer yönünde de yükseltgenme olacağı için, her iki olaya karşın gelen katodik ve anodik pikler elde edilir. Bu piklerin yükseklikleri birbirine eşit olur ve pik potansiyelleri arasında da

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 0.0591 / n \quad (3.2)$$

kadarlık fark oluşur. Olayın tersinirliği azaldıkça tersinmez olaya ilişkin pikin yüksekliği giderek azalır ve pik potansiyelleri arasındaki fark da artar. Tamamen tersinmez durumlarda tersinmez olaya karşı pik kaybolur. Böylelikle yöntem bu özelliğinden yararlanılarak elektrot tepkimesinin tersinir olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanılır.



Şekil 3.1 (a) Dönüşümlü voltamtride elektroda uygulanan gerilim programı
(b) Elde edilen akım gerilim eğrisi (Yıldız vd., 1993)

3.2. Deneysel Kısım

3.2.1. Kullanılan Çözücünün Saflaştırılması

Bu çalışmada, polimer çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan metilen klorür (Merck) önce H_2SO_4 ile daha sonra destile su ve %5'lik Na_2CO_3 ile son olarak da destile su ile tekrar yıkandı. Metilen klorüre, $CaCl_2$ eklenerek ön destilasyon yapıldı. İki kez de P_2O_5 üzerinden destillenerek artıldı. Enzim elektrot aktivitesinin belirlenmesinde çözücü olarak kullanılan su, Millipore saf su cihazından alındı.

3.2.2. Kullanılan Elektrotlar

Elektrokimyasal deneylerde çalışma elektrodu olarak 2 mm çapında Pt disk elektrot ($0,0314 \text{ cm}^2$), karşılaştırma elektrodu olarak doygun kalomel elektrot ve karşıt elektrot olarak Pt levha elektrot ($0,5 \text{ cm}^2$) kullanıldı. Pt disk elektrot her elektrokimyasal çalışmada önce su ile bulamaç hale getirilen Cr_2O_3 ile düzgün bir yüzey üzerinde parlatıldı. Bu elektrot daha sonra sırasıyla destile su ve çalışılacak çözücü ile yıkayıp kurutulduktan sonra kullanıldı.

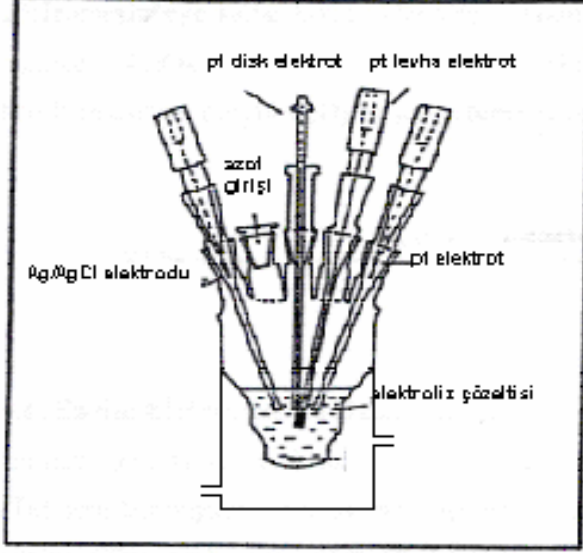
3.2.3. Kullanılan Aletler

Çalışmada, potansiyostat olarak bilgisayar kontrollü CHI 660 A Electrochemical Analyzer kullanılmıştır. Sıcaklık denetleyici sirkülatör Selecta 1000'dir. pH ölçümlerinde, pH/iyon analiz cihazı (Mettler Toledo MA 235) kullanılmıştır. pH ölçümlerinde sabit sıcaklık banyosu kullanılarak $25^\circ C \pm 0,1^\circ C$ sıcaklıkta çalışılmıştır. Manyetik karıştırıcı Snijders 34532 markadır. Oksijen Tüpü Habaş,tan.'den temin edilmiştir.

3.2.4. Elektroliz Hücresi

Elektrokimyasal çalışmalar rodajlı, beş girişi bulunan, ceketli bir cam hücrede yapıldı (Şekil 3.2). Beş girişin üç tanesine; Pt çalışma elektrodu, Pt karşıt elektrodu ve

karşılaştırma elektrodu yerleştirildi. Diğer iki girişten birine gaz giriş borusu, diğerine ise gaz çıkış musluğu takıldı.



Şekil 3.2 Elektrokimyasal çalışmaların yapıldığı hücre (Gülce, 1993).

3.2.5. Enzim Çözeltisinin Hazırlanması

Gerekli miktardaki glukoz oksidaz (E.C. 1.1.3.4, G-6125/G-7773, Sigma from *Aspergillus niger*), 1,00 mL, pH 7,4 olan 0,01 M fosfat tampon çözeltisinde çözülmüştür. Enzim çözeltisi buzlukta muhafaza edilmiştir.

3.2.6. Tampon Çözeltinin Hazırlanması

Tampon çözeltilerin hazırlanmasında NaH_2PO_4 (Merck), NaOH (Merck) ve Millipore destile su kullanılmıştır.

3.2.7. Glukoz çözeltisinin hazırlanması

Glukoz (Merck) çözeltisi konsantrasyonu 0,5 M olacak şekilde pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponunda hazırlanmıştır.

3.2.8. KAuCl₄ çözeltisinin hazırlanması

Au³⁺ çözeltisi katı KAuCl₄'ün (Aldrich) 1 M NaCl çözeltisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır.

3.2.9. Vinilferrosenin Kimyasal Polimerizasyonu

Polimerizasyon için Carius tüpü kullanılmıştır. 4,24 g vinilferrosen (Aldrich), 5,00 mL benzen ve katalizör olarak 0,0328 g AIBN (azobisizobutironitril) azot atmosferinde Carius tüpüne konulmuştur. Elde edilen çözelti birkaç kez sıvı azotta dondurulup eritilerek gazsızlaştırılmış ve benzen ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra tüp vakumda kapatılarak 70°C'da 24 saat süre ile polimerizasyon yapılmıştır. Tüpün ağız kısmı kırılmış ve PVF destile benzende çözülerek dışarı alınmıştır. Çözelti, içinde saf metil alkol bulunan behere aktarılarak PVF çöktürülmüştür. Birkaç kez benzende çözme ve metil alkolde çöktürme işlemleri tekrarlanmıştır. Elde edilen çökelek süzülerek ayrılmış ve vakum etüvünde 24 saat 60°C'da kurutulmuştur (Smith vd., 1976).

3.2.10. Serbest Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

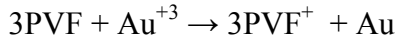
Temiz Pt elektrot serbest enzimin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. pH'ı 7,4 olan 30,00 mL, 0,1 M fosfat tamponu elektroliz hücresine konularak O₂ ile doyurulmuştur. Daha sonra 5,00 mg GOD/mL derişimdeki enzim çözeltisinden 100µL'lik enzim çözeltisi hücreye eklenmiştir. GOD enzimi eklendikten sonra boş çözeltide voltamogramlar alınarak kararlı hale ulaşması sağlanmıştır ve sonra da her defasında 200 µL glukoz eklenerek voltamogramları alınmıştır. Akım değerinde azalma gözlenmeyinceye kadar glukoz eklenmeye devam edilmiştir.

3.2.11. Enzim Elektrodun Hazırlanması

Enzim elektrodu hazırlanırken belirli derişimdeki polivinilferrosen (PVF) çözeltisine daldırılan Pt çalışma elektrodu belirli bir süre bekletilerek elektrodun polimer filmle kaplanması sağlanmıştır. Polimer filmle kaplanan elektrot glukoz oksidaz (GOD)

çözeltisinde bekletilerek enzimin elektrot yüzeyinde tutuklanması sağlanmıştır. Çalışmamızda bu yöntemle hazırlanan elektrot PVF-GOD olarak tanımlanmıştır. Hazırlanan PVF-GOD enzim elektroduna PVF derişimi, PVF’de bekletme süresi, enzim derişimi ve enzimde bekletme süresi gibi deneysel parametrelerin etkisi araştırılmıştır.

İkinci yöntemde enzim elektrot hazırlanırken ilk yöntemde olduğu gibi Pt çalışma elektrodu polimer film ile kaplanmıştır. PVF kaplanmış elektrot belirli derişimdeki KAuCl_4 çözeltisinde belirli bir süre bekletilerek aşağıdaki reaksiyona göre altının elektrot yüzeyinde ön deriştirilmesi yapılmıştır (Kavanoz vd., 2001).



Au biriktirilmiş çalışma elektrodu GOD çözeltisinde bekletilerek GOD’ın elektrot yüzeyinde tutuklanması sağlanmıştır. PVF-GOD enzim elektrodu ile saptanan optimum koşullar kullanılarak PVF-Au-GOD enzim elektrodunda Au taneciklerinin etkisi araştırılmıştır. Au taneciklerinin etkisi araştırırken polimer kaplanmış elektrotta altın biriktirme işlemi GOD tutuklamadan önce yapılmıştır.

3.2.12. Enzim Elektrot Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu deneylerde çalışma elektrodu olarak önceden hazırlanmış enzim elektrodu, karşıt elektrot olarak Pt levha, karşılaştırma elektrodu olarak da doygun kalomel elektrot kullanılmıştır.

Hücreye 30 mL tampon konularak hücre etrafındaki ceket sayesinde çözeltinin sabit sıcaklığa gelmesi sağlanmıştır. Bu işlem yapılırken çözeltiye oksijen gönderilip, böylece çözeltinin oksijence doygun hale gelmesi sağlanmıştır. Sonra oksijen giriş borusu kapatılmış ve gaz çıkış borusu çıkarılıp yerine parafilm takılmıştır. Çalışma voltaj aralığı ayarlanarak elektrot voltametrik olarak işleme alınmıştır. Elektrodu kararlı hale ulaştırmak için substrat içermeyen çözeltide kararlı hal akım değerine ulaşıncaya kadar voltamogramlar alınmıştır. Kararlı hal akım değerine ulaştığında

ölçüm ortamına bilinen derişimlerdeki substrat (glukoz) çözeltilisinden belli hacimde eklenmiş ve her glukoz eklemekten sonra voltamogramları çekilerek oksijenin indirgenme akımları ölçülmüştür. Deneyler sırasında manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırma işlemi yapılmış, karıştırıcı kapatılarak akımın sabitlenmesi beklenmiş ve bu durumdaki difüzyon akımı ölçülmüştür. Oksijenin indirgenme akım değeri sabitlenene kadar glukoz eklenerek voltmogram çekilmiştir. Enzim elektrodunun aktivitesine PVF derişimi, enzim derişimi, tampon derişimi, pH ve sıcaklık gibi deneysel parametrelerin etkisi incelenmiştir. Enzim elektrodunun tekrar kullanımından kaynaklanabilecek hataların önüne geçebilmek için deneysel parametrelerin her değıştirilişinde yeni enzim elektrodu hazırlanarak, enzim elektrodunun en uygun çalışma koşulları belirlenmiştir.

4. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada PVF modifiye elektrodunu temel alan yeni glukoz enzim elektrotları geliştirilmiştir. Enzim elektrotlarının hazırlanması iki şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bunlardan biri Pt elektrot yüzeyinde oluşturulan PVF filmine GOD enziminin tutuklanmasıyla hazırlanan ve PVF-GOD enzim elektrodu olarak tanımlanan enzim elektrodudur. Bu enzim elektrodunun aktivitesine enzim elektrodunun hazırlanması sırasında kullanılan PVF derişimi, PVF’de bekletme süresi, enzim derişimi, enzimde bekletme süresi, çalışma pH’ı gibi deneysel parametrelerin etkileri araştırılarak elektrodun maksimum aktivite gösterdiği koşullar belirlenmiştir.

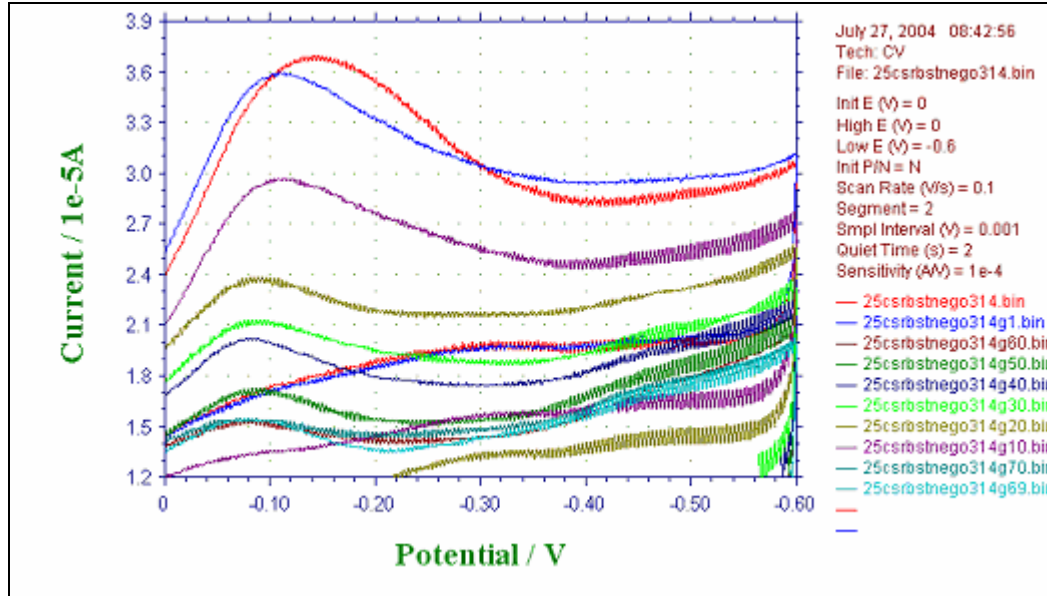
Bu çalışmada geliştirilen ikinci enzim elektrodu ise Au biriktirilmiş PVF modifiye elektroduna GOD enziminin tutuklanmasıyla hazırlanan ve PVF-Au-GOD enzim elektrodu olarak tanımlanan enzim elektrodudur. Bu elektrodun hazırlanmasında PVF-GOD enzim elektrodu için bulunan optimum koşullar kullanılarak yüzeyde altın biriktirmesinin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla PVF-Au-GOD enzim elektrodunun aktivitesine, elektrodun hazırlanması sırasında kullanılan çözeltideki Au³⁺ derişimi, Au³⁺ çözeltisinde bekletme süresi gibi deneysel parametrelerin etkileri araştırılarak optimum koşullar belirlenmiştir. Ayrıca her iki enzim elektrot için substrat derişimi ve sıcaklığın etkileri de araştırılarak tutuklanmış enzim sistemi için görünür Michealis-Menten (K_{mg}) ve aktivasyon enerjileri (E_a) hesaplanmıştır.

Enzim elektrotların hazırlanmasında GOD enzimi tutuklanmış olarak kullanılmaktadır. Tutuklama işleminin enzim yapısında herhangi bir deformasyona yol açıp açmadığının belirlenmesi için yapılan çalışmalar serbest enzim içinde tekrarlanarak serbest enzim için optimum çalışma koşulları belirlenmiş, K_m ve E_a değerleri de hesaplanmıştır. Bulunan değerler tutuklanmış enzim için bulunan değerlerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Enzimatik reaksiyonlar sırasında O_2 harcanmaktadır ve oksijenin indirgenme akımındaki azalma glukoz derişimi ile orantılıdır. Bu çalışmada enzim elektrot cevabı O_2 'nin indirgenme akımının ölçülmesiyle voltametrik olarak belirlenmiştir. Deneysel parametrelerin etkileri araştırılırken her bir parametre için $\% \Delta i$ değerleri hesaplanmıştır. $\% \Delta i$ değerleri hesaplanırken glukoz ekmeden önceki oksijene ait indirgenme pik akım değerleri ile oksijenin indirgenme pik akımının sabitlendiği değer arasındaki farkın glukoz ekmeden önceki oksijene ait indirgenme pik akım değerlerine bölünmesi ile bulunmuştur.

4.1. Serbest Glukoz Oksidaz Enzimi İçin Optimum Koşulların ve Kinetik Parametrelerin Saptanması

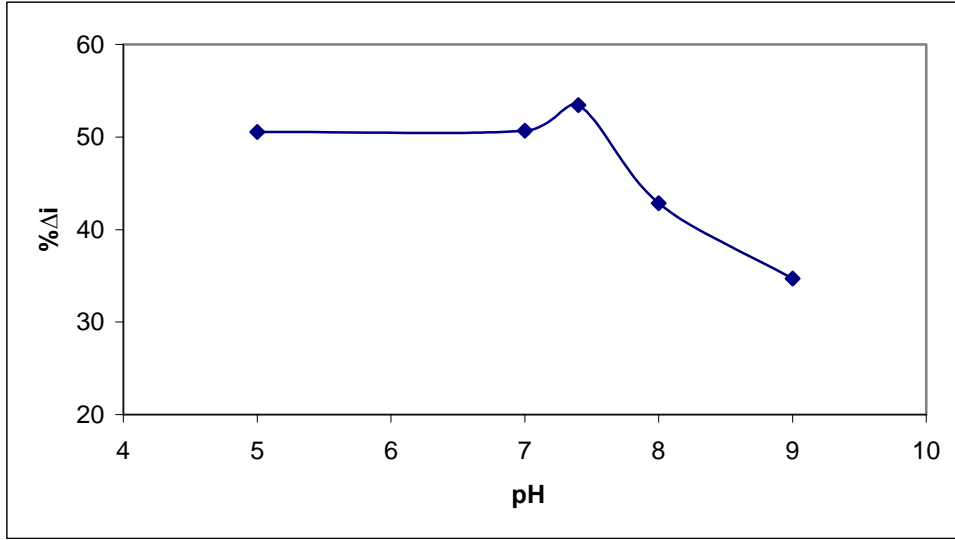
Enzim aktivitesini etkileyen en önemli faktörler, ortamın pH'ı, sıcaklığı ve substrat konsantrasyonudur. Bu nedenle öncelikle bu faktörlerin serbest GOD aktivitesine etkileri incelenmiştir. Serbest enzim aktivitesinin belirlenmesi ile yapılan çalışmalarda kaplanmamış Pt elektrot kullanılmıştır. Şekil 4.1'de serbest enzim için elde edilen cevap eğrileri verilmiştir.



Şekil 4.1 Kaplanmamış elektrot için serbest enzim çalışmasında elde edilen voltamogramlar (0,1 M 7,4 fosfat tamponu, 5 mg GOD, 25°C).

4.1.1. Serbest Enzim İçin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Enzim reaksiyon hızı farklı hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Enzimin en fazla aktivite gösterdiği pH'ya o enzimin optimum pH 'sı adı verilmektedir. Enzimlerin tipik pH eğrileri çan şeklindedir. Enzimlerin optimum pH'ları 2-10 arasında değişmektedir. Optimum pH'ın her iki yanında enzim reaksiyonu yavaşlamaktadır. Çok ekstrem uçlarda ise enzim ya in aktivite olmakta veya yıkılmaktadır. Bu nedenle enzim çalışmalarında pH'ı optimumda sabit tutmak veya en azından hidrojen iyonu konsantrasyonunu elverişli durumda tutmak için tamponlar kullanılmaktadır. pH aktivite eğrileri elde edilirken enzimin doymuş substrat konsantrasyonundaki aktivitesi ölçülür. Enzimlerin optimum pH 'sı çeşitli koşullara bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Optimum pH'da değişikliğe neden olan faktörler; enzimin elde edildiği kaynak, enzimin kullanıldığı substratın tipi ve konsantrasyonu, sıcaklık, kofaktör tipi ve süresi olarak sıralanabilir. Enzimler bütün pH değerlerinde kararlı değildirler. Her enzimin kararlı kaldığı bir pH aralığı vardır. Bir enzimin optimum pH'ının deneysel olarak belirlenmesi için daha önceden bu enzimin farklı pH'larda kararlı olup olmadığı test edilmelidir. Enzimlerin kararlılığını belirlemek için çeşitli yöntemlerden yararlanılabilmektedir. Optimum pH değerinin saptanması için farklı pH değerlerinde serbest enzim aktivitesi belirlenmiştir. Bu çalışmalar sırasında 0,1 M fosfat tamponu kullanılmış ve sıcaklık 25°C'de sabit tutulmuştur. Çalışma elektrodu olarak temiz Pt elektrot kullanılmıştır. Farklı pH değerlerinde glukoz ilavesinden sonra ölçülen % Δi değerleri şekil 4.2'de verilmiştir. Şekil 4.2'deki grafikten görüldüğü üzere maksimum akım değeri pH 7,4'de elde edilmektedir. Enzimlerin genel özelliklerinden beklendiği gibi optimum değer dışındaki asidik ve bazik bölgelerde enzim de aktivasyonu gözlenmektedir.

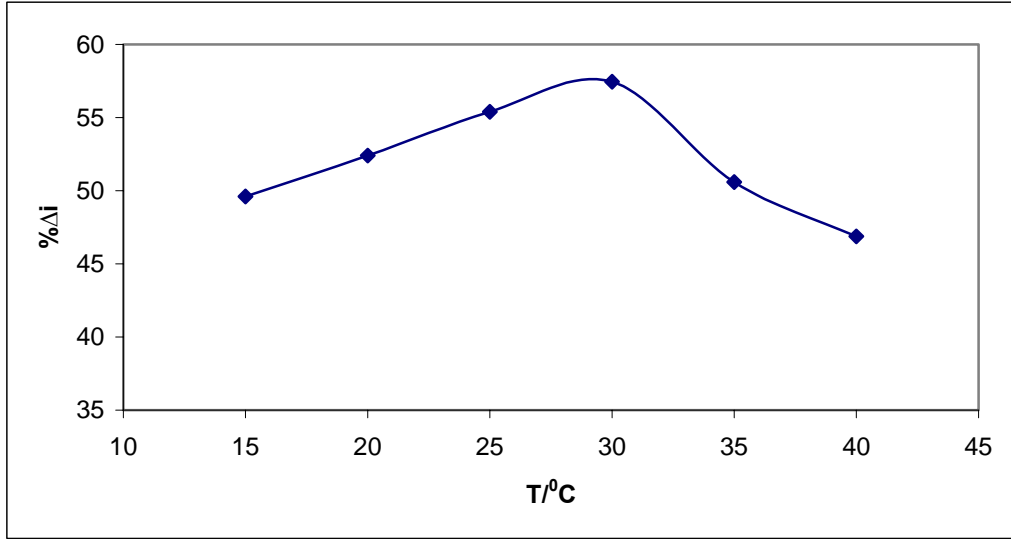


Şekil 4.2 Serbest enzim için ortamın pH değerinin reaksiyon hızına etkisi (0,1 M fosfat tamponu, 5,00 mg GOD, 25°C).

4.1.2. Sıcaklığın Etkisi

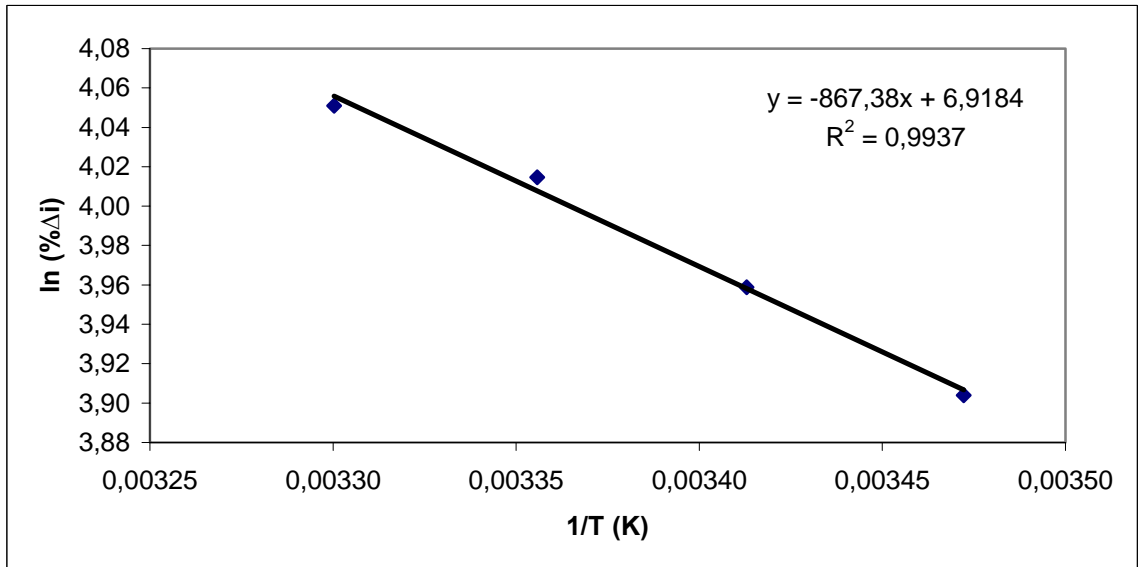
Sıcaklık, enzimlerin kararlılığını ve enzimatik reaksiyonların hızını etkileyen önemli bir faktördür. Tepkime hızının artması, sıcaklıkla doğru orantılıdır. Belirli bir noktadan sonra reaksiyon hızında düşme meydana gelir. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği bu dönüş noktasına optimum sıcaklık denir. Enzimlerin pek çoğu 30-50°C'ler arasında optimum sıcaklık gösterirler. Bunun yanı sıra pek çoğu da 60°C 'nin üzerinde denatüre olup aktivitesini yitirmektedir. Düşük sıcaklıklar enzim etkinliğini azaltır. 0°C' de enzim ya hiç ya da çok az işlev görür, fakat soğğun enzim yapısını bozduğu görülmemiştir. Sıcaklık eski hale döndüğünde etkinlik yine başlar.

Serbest enzim ile glukoz arasındaki reaksiyonun aktivasyon enerjisinin belirlenmesi amacıyla farklı ortam sıcaklıklarında elde edilen akım değerlerindeki maksimum yüzde azalma belirlenmiştir. Bu deneylerin yapılması sırasında 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu kullanılmıştır. Sıcaklık 15°C ile 40°C arasında değiştirilmiş ve her bir sıcaklık için akım değerlerindeki maksimum yüzde azalma belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 4.3'de görülmektedir. Grafikten görüldüğü üzere maksimum %Δi 30°C'de gözlenmiştir.



Şekil 4.3 Serbest enzim için reaksiyon hızının sıcaklıkla değişimi (0,1 M fosfat tamponu, 5,00 mg GOD Enzim, 25°C).

Reaksiyon hızının sıcaklıkla artış gösterdiği aralıktaki deneysel veriler kullanılarak serbest glukoz oksidaz ile yürütülen reaksiyonun aktivasyon enerjisi Arrhenius eşitliğinden yararlanılarak bulunmuştur. Bu amaçla $1/T$ 'ye karşı $\ln\%Δi$ değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.4). Elde edilen doğrunun eğiminden serbest enzim için aktivasyon enerjisi 7,21 kJ/mol bulunmuştur.

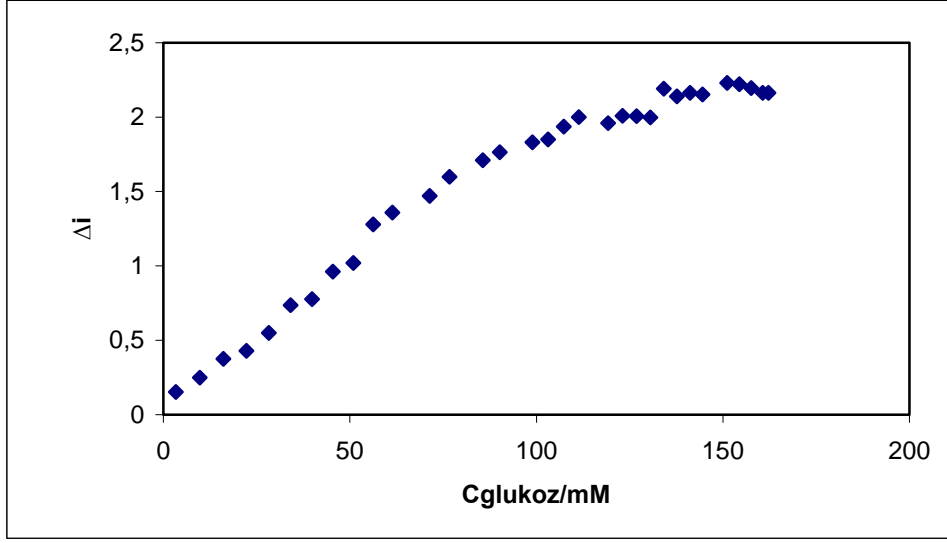


Şekil 4.4 Serbest enzim için Arrhenius bağıntısına göre çizilen $\ln\%Δi$ değerine karşı $1/T$ grafiği

4.1.3. Substrat Derişiminin Etkisi

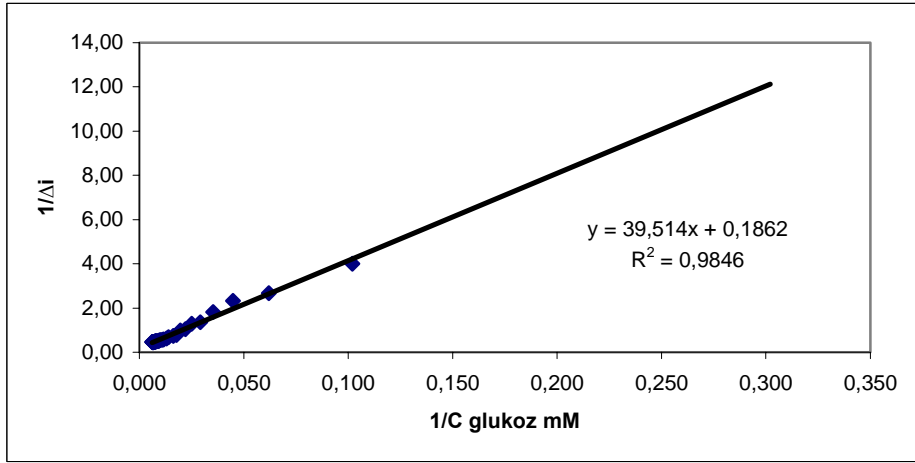
Enzim konsantrasyonu ve diğer faktörlerin sabit tutulduğu koşullarda, enzimatik reaksiyon hızı artan substrat miktarına bağlı olarak belli bir artış göstermekte ve maksimum bir düzeye eriştikten sonra da sabit kalarak devam etmektedir. Başlangıçta bu ilişki doğrusal devam etmekte ve daha sonra da hiperbolik bir şekil almaktadır. Düşük substrat konsantrasyonlarında doğrusal bir ilişki vardır. Buna göre de, reaksiyon hızı substrat konsantrasyonundaki artışa paralel olarak artışlar göstermektedir. Bu noktada ortamdaki enzimlerin ancak belli bir kısmı substrat ile birleşebilmektedir. Bu durum enzimatik reaksiyonun denge sabitinin sonsuz derecede büyük olmamasından kaynaklanmaktadır. Başlangıçtaki bu ilişkide sınırlayıcı faktör substrat konsantrasyonudur. Substrat konsantrasyonundaki artış veya düşüşler enzimatik reaksiyon hızında artış ve düşüşlere neden olur.

Temiz Pt elektrotta farklı glukoz derişimleri için oksijenin indirgenme akımındaki azalmanın ölçülmesiyle elde edilen akım değerleri ölçülerek glukoz derişiminin enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Bu deneyler sırasında 0,1 M pH 7,4 tamponu kullanılmış ve ortam sıcaklığı 25°C olarak sabit tutulmuştur. Enzimle katalizlenen tepkimelerde Michaelis-Menten kinetiğine göre substrat derişimi arttıkça reaksiyon hızı artar ve sonuçta sabit bir plato değerine ulaşır. Bunun sebebi, ortamdaki enzim miktarının sabit olmasıdır. Belli bir substrat konsantrasyonundan sonra reaksiyon hızı ortamdaki enzim miktarı ile kısıtlandığı için akım sabit kalmaktadır. Glukoz derişimine karşı gözlenen akım değerlerindeki değişme şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5 Serbest enzim için gözlenen akım değerlerinin glukoz derişimi ile değişimi (0,1 M fosfat tamponu, 5,00 mg GOD Enzim, 25°C).

Serbest enzim için Michealis–Menten sabitinin hesaplanabilmesi için $1/C$ 'ye karşı $1/\Delta i$ değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen Lineweaver–Burk grafiği şekil 4.6'de verilmektedir. Bu grafiklere göre serbest enzim için Michealis–Menten sabiti 212,21 mM olarak bulunmuştur.



Şekil 4.6 Temiz Pt elektordun serbest enzim için Lineweaver–Burk grafiği

4.2.Enzim Elektrot Aktivitesine Deneysel Parametrelerin Etkisinin İncelenmesi

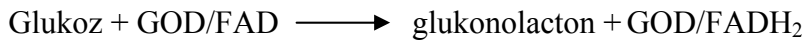
Bu bölümdeki deneyler hazırlanan enzim elektrodunun aktivitesine çeşitli deneysel parametrelerin etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Farklı şekilde

hazırladığımız enzim elektrotların aktivitesine etkili olabilecek faktörler elektrodun hazırlanması sırasında kullanılan çözeltilerdeki enzim derişimi, yüzeyde altının biriktirilmesi için kullanılan çözeltilerdeki Au^{3+} derişimi, yüzeydeki film kalınlığı ve ölçüm ortamı koşullarıdır. Substrat derişimi, ortam pH'ı, enzim derişimi, enzim çözeltilisinde bekletme süresi, altın derişimi, altında bekletme süresi ve sıcaklık enzim elektrot aktivitesi üzerinde etkili olabilecek ortam şartları olarak belirlenmiş ve bu faktörlerin etkileri incelenmiştir. Ayrıca optimum koşullarda hazırlanan farklı enzim elektrotlarının glukoza verdiği cevaplar araştırılarak enzim elektrotlar için görünür Michealis-Menten sabitleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır. Polimer ile kaplandıktan sonra Au biriktirilen elektrot için tutuklanmış ve serbest formdaki enzim aktivasyon enerjileri hesaplanarak karşılaştırılmıştır.

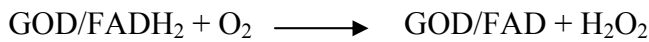
4.3. (PVF-GOD) Enzim Elektrot Aktivitesinin Belirlenmesi

Pt elektrot üzerine kaplanmış PVF yapısına GOD enziminin tutuklanmasıyla hazırlanan PVF-GOD enzim elektrodunun aktivitesine çeşitli deneysel parametrelerin etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalar farklı glukoz derişimleri için elde edilen kararlı hal akımlarının ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Zamana karşı akım daki yüzde azalma izlenerek elde edilen cevap eğrileri şekil 4.7'de verilmiştir. Şekil 4.7'da verilen cevap eğrileri O_2 ile doymuş tampon çözelti ortamında elde edilen cevap eğrileridir.

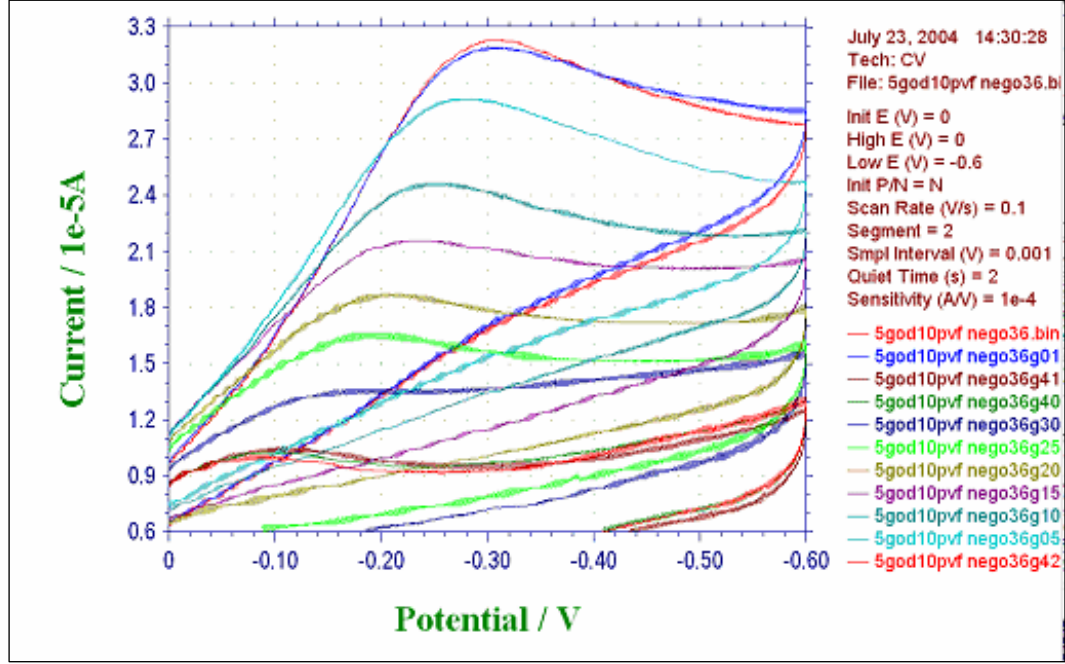
PVF-GOD enzim elektrodunda Pt elektrot yüzeyine kaplanan PVF yapısında tutuklanmış GOD enzimi varlığında aşağıdaki tepkimeye göre yükseltgenirken glukoz oksidaz enzimi indirgenmektedir.



İndirgenmiş olan GOD enzimi O_2 varlığında tekrar yükseltgenmektedir.



Yukarıdaki tepkimeden görüldüğü gibi enzim yükseltgenmesi sırasında O_2 harcanmaktadır. Buna bağlı olarak ortamdaki glukoz derişimi artıkça harcanan O_2 miktarı artacaktır. Böylece artan glukoz derişimi ile orantılı olarak O_2 'nin indirgenme akımındaki azalmanın ölçülmesiyle elektrot aktivitesi belirlenmektedir.

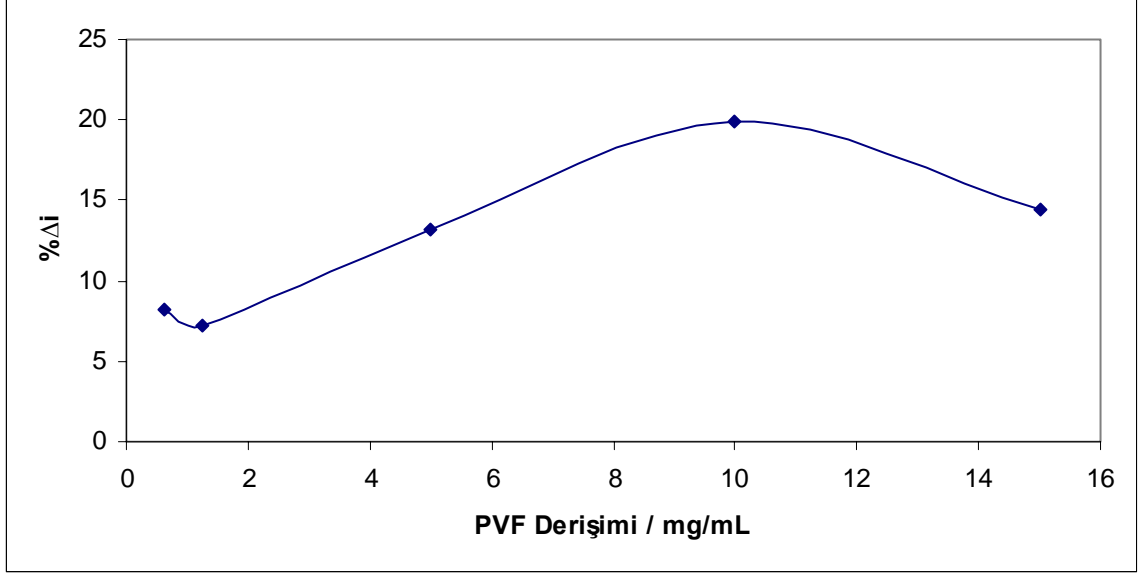


Şekil 4.7 PVF-GOD enzim elektrot aktivitesinin glukoz derişimi ile (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg PVF/mL 10,00 mg GOD/mL enzim, 25°C).

4.3.1. PVF Derişiminin Etkisi

PVF-GOD enzim elektrodunun akım cevabını etkileyen parametrelerden birisi olan elektrot yüzeyindeki PVF filminin kalınlığı incelenmiştir. Elektrot yüzeyindeki PVF filminin kalınlığı elektrodun kaplanması için kullanılan PVF çözeltisinin derişimine bağlıdır. Bu çalışmada PVF'de bekletme süresi 5 dakika ve 10,00 mg GOD/mL enzim çözeltisinde 30 dakika bekletme süresi sabit tutulmuştur. Çalışma sırasında PVF derişiminin etkisini belirleyebilmek için 0,625 mg/mL ile 15,00 mg/mL PVF derişimleri arasında değişen PVF miktarları kullanılmıştır. Çalışmalarda 0,1 M pH 7,40 tamponu kullanılmıştır. Glukoz ilavesinden sonra gözlenen akımlardaki maksimum yüzde azalma değerleri PVF derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi kullanılan PVF derişiminin artması ile % Δi artmakta ve

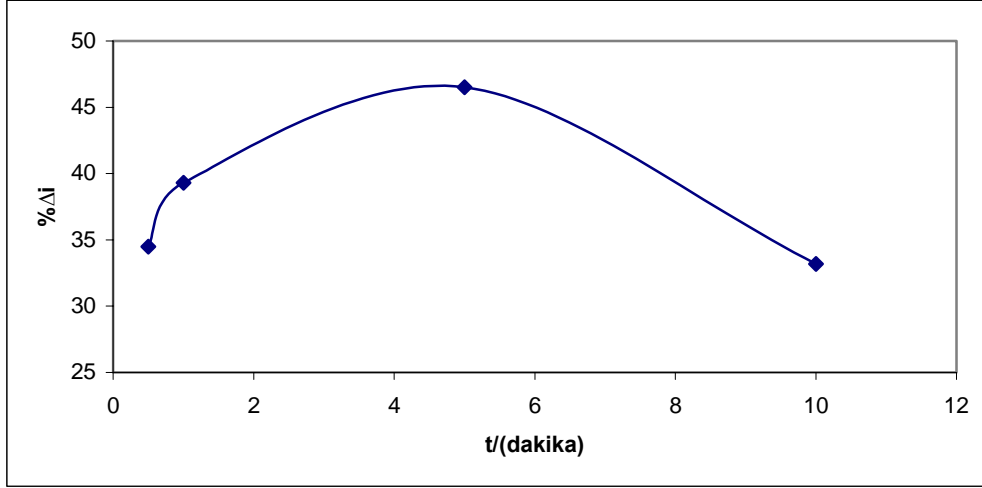
10,00 mg/mL PVF derişiminde maksimum olmakta ve bu derişimden sonra ise azalmaktadır. Bundan sonraki yapılan çalışmalarda maksimum % ΔI 'nin elde edildiği değer olan 10,00 mg PVF/mL derişimi kullanılmıştır.



şekil 4.8 PVF-GOD enzim elektrot aktivitesinin PVF derişimi ile değişimi (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg GOD/mL enzim, 25°C).

4.3.2. PVF'de Bekletme Süresinin Etkisi

PVF-GOD enzim elektrodunun akım cevabını etkileyen bir diğer parametrede elektrodun PVF çözeltisinde bekletme süresidir. Bu alışmada PVF'de bekletme süresinin elektrodun akım cevabına etkisini belirleyebilmek için 10,00 mg GOD/mL enzim çözeltisinde 30 dakika bekletme süresi sabit tutulmuştur. PVF çözeltisinde bekletme süresi 30 saniye ile 10 dakika arasında değiştirilmiştir. Kullanılan her bir bekletme süresi için elektrot aktivitesi incelenmiştir. Glukoz ilavesinden sonra gözlenen maksimum akım değerlerindeki azalma PVF çözeltisinde bekletme süresine karşı grafiğe geçirilmiştir. şekil 4.9'de görüldüğu gibi PVF'de bekletme süresinin artmasıyla gözlenen akım değerleri artmış ve 5 dakika bekletme süresinde en yüksek akım elde edilmiştir. Bundan sonraki yapılan çalışmalarda PVF çözeltisinde bekletme süresi 5 dakika olarak kullanılmıştır.

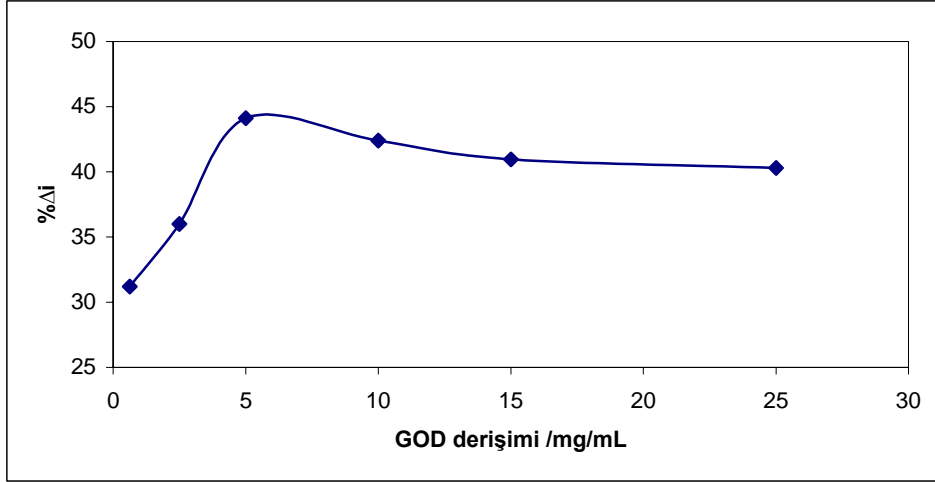


Şekil 4.9 PVF-GOD enzim elektrot aktivitesinin PVF de bekletme süresi ile değişimi (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg PVF/mL 10,00 mg GOD/mL enzim, 25°C).

4.3.3. Enzim Derişiminin Etkisi

Ölçüm koşullarında PVF-GOD enzim elektrodundan elde edilen akım değerini etkileyen parametrelerden bir tanesi de polimerik yapı içerisinde tutuklanan GOD miktarıdır. Tutuklanan enzim miktarı ise immobilizasyon işlemi sırasında kullanılan çözeltide bulunan çözülmüş enzimlerin miktarına bağlıdır. Tutuklama işlemi sırasında kullanılan çözeltideki enzim miktarı 0,625 mg/mL ile 25,00 mg/mL enzim derişimleri arasında değiştirilerek hazırlanan enzim elektrodunun aktivitesine enzim derişiminin etkisi incelenmiştir. Enzimde bekletme süresi 30 dakika olarak sabit tutulmuştur. Kullanılan her enzim derişiminde enzim elektrot aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışmalar sırasında 0,1M pH 7,4 tamponu kullanılmış ve sıcaklık 25°C’de sabit tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar kullanılarak enzim derişimine karşı akım değerlerindeki maksimum yüzde azalmalar grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.10’den de görüldüğü gibi immobilizasyon işlemi sırasında kullanılan GOD derişiminin artmasıyla gözlenen maksimum %Δi değeri artmaktadır. Daha yüksek enzim derişimlerinde ise maksimum %Δi değerinde önemli değişme olmamaktadır. Düşük GOD derişiminde daha düşük akım değerlerinin elde edilmesi polimerik yapı içerisinde daha az miktarda enzim tutuklanması nedeniyledir. Belli bir enzim derişiminden sonra ise polimer yapı içerisinde maksimum miktarda enzim tutuklanmaktadır. Çözeltideki GOD miktarının artırılmasıyla maksimum %Δi

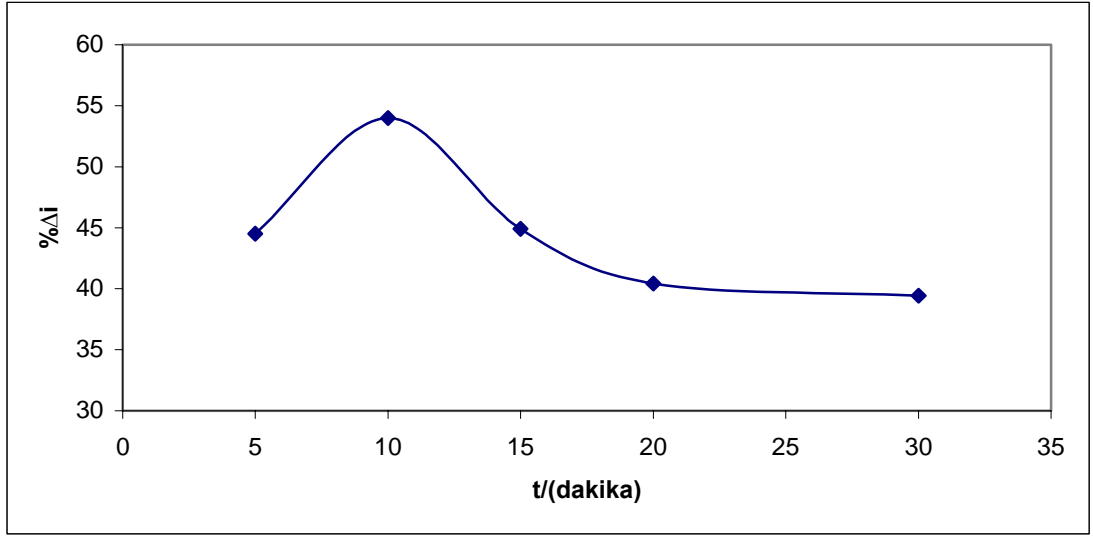
değerinin önemli miktarda değişmediği görülmüştür. Bundan sonraki çalışmalarda grafikten de görüldüğü gibi maksimum % Δ i değerinin gözlemlendiği 5,00 mg/mL GOD derişimindeki çözeltiler kullanılmıştır.



Şekil 4.10 PVF-GOD enzim elektrodunda tutuklama işlemi sırasında kullanılan çözeltilerdeki enzim derişimine karşı elde edilen maksimum % Δ i değerleri (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg PVF/mL, 25°C).

4.3.4.Enzimde Bekletme Süresinin Etkisi

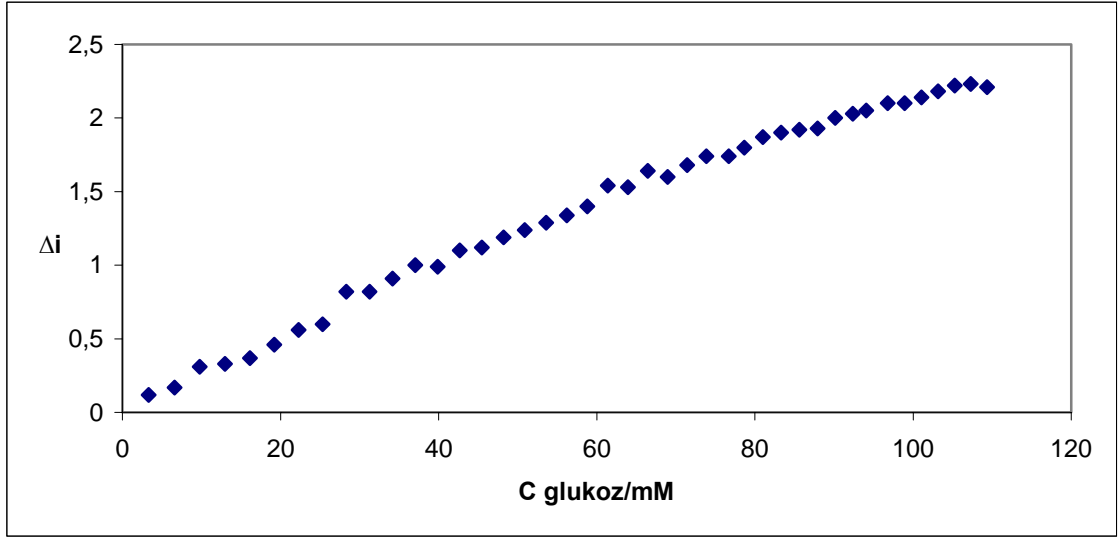
PVF-GOD enzim elektrodundan elde edilen akım değerini etkileyen parametrelerden biri de enzim çözeltilisinde bekletme süresidir. Hazırlanan enzim elektrodunun aktivitesine enzim çözeltilisinde bekletme süresinin etkisini incelemek amacıyla kullanılan enzim çözeltilisindeki bekletme süresi 5 dakika ile 30 dakika arasında değiştirilmiştir. Her bir bekletme süresinde elektrot aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışmalar sırasında 0,1M pH 7,4 tamponu kullanılmış ve sıcaklık 25°C’de sabit tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar kullanılarak enzim çözeltilisinde bekletme süresine karşı glukoz ilavesinden sonraki akım değerlerindeki maksimum yüzde azalmalar grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.11’de görüldüğü gibi enzimde bekletme süresinin artmasıyla akım değerlerinde gözlenen maksimum yüzde azalmalar artmakta ve belli bir bekletme süresinden sonra azalmaktadır. Akım değerlerindeki maksimum yüzde azalma 10 dakikada gözlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda enzim çözeltilisine bekletme süresi 10 dakika olarak kullanılmıştır.



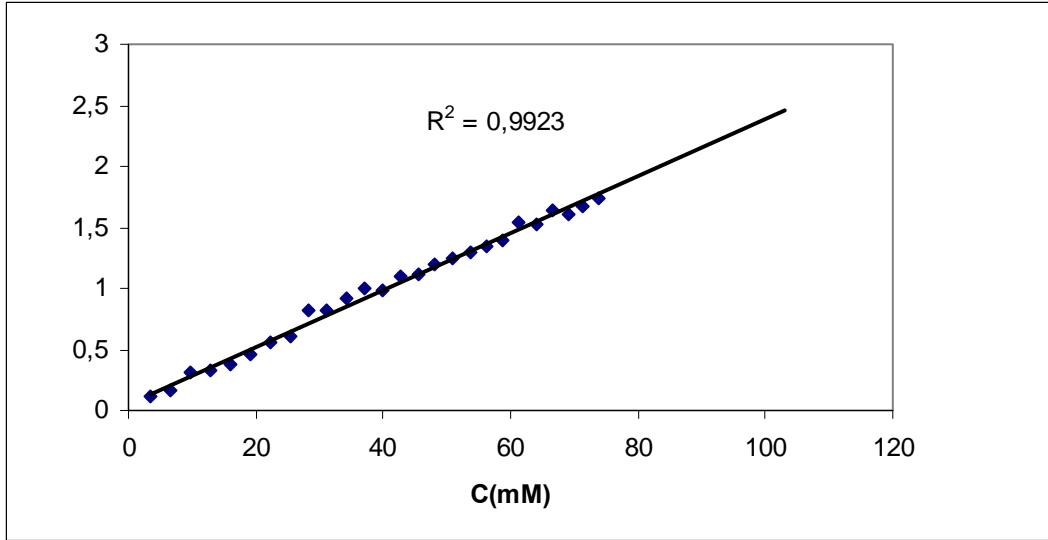
Şekil 4.11 PVF-GOD enzim elektrodunda tutuklama işlemi sırasında kullanılan enzim çözeltisinde bekletme süresine karşı elde edilen maksimum % Δi değerleri (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg PVF/mL, 5,00 mg GOD/mL enzim, 25°C).

4.3.5. PVF-GOD Enzim Elektroduna Substrat Derişiminin Etkisi

Hazırlanan enzim elektrodu ile yapılan ölçümlerin tutarlı bir şekilde yapılabilmesinin ilk koşulu çalışma ortamındaki substrat derişimi ile orantılı akım değerlerinin elde edilmesidir. Bu koşulun sağlandığı substrat derişim aralığı enzim elektrodunun doğrusal çalışma aralığı olarak tanımlanır ve bu aralığın geniş olması istenir. PVF-GOD elektrodu maksimum aktivitesinin ve doğrusal çalışma aralığının saptanması için ölçülen akım değerlerine substrat derişimi etkisi incelenmiştir. Daha önce saptanan optimum koşullarda hazırlanan PVF-GOD enzim elektrodunun 0,10 M pH 7,40 fosfat tamponunda ve 25°C sıcaklıkta farklı glukoz derişimlerinde verdiği akım değerleri saptanmıştır. Ölçülen akım değerlerinin glukoz derişimi ile değişimi şekil 4.12(a)'da verilmiştir.



Şekil 4.12 (a) PVF-GOD enzim elektrot aktivitesinin glukoz derişimi ile değişimi (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg PVF/mL, 5,00 mg GOD/mL enzim, 25°C).

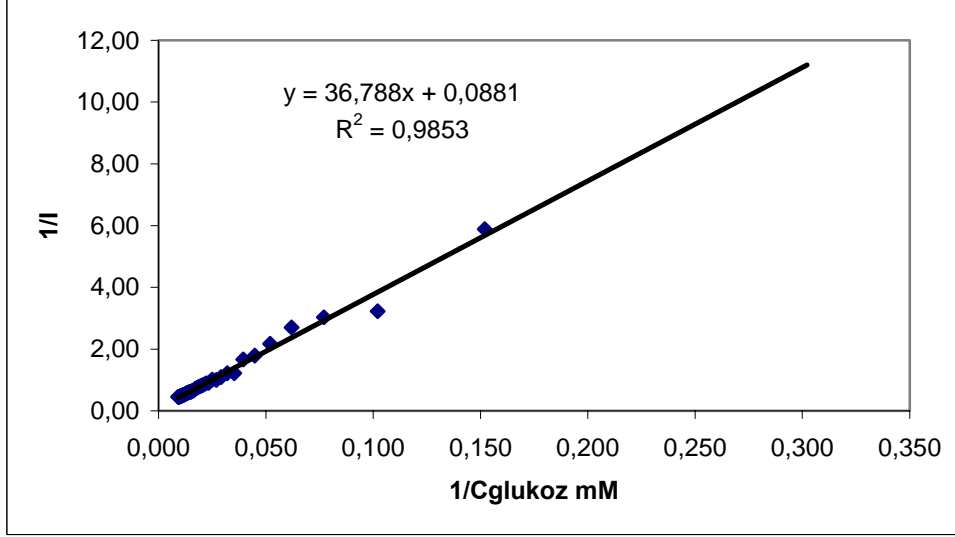


Şekil 4.12 (b) PVF-GOD enzim elektrot aktivitesinin glukoz derişimi ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı

Şekil 4.12 a/b den görüldüğü gibi geliştirilen enzim elektrodu 73,86 mM'a kadar glukoz derişimi ile orantılı akım değerleri vermektedir. Bu nedenle hazırlanan PVF-GOD enzim elektrodunun pratik kullanım aralığı 73,86 mM'a kadar glukoz derişimi olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan glukoz derişimine karşılık elektrot cevabı yaklaşık 105,26 mM civarında sabit değere ulaşmakta ve daha yüksek derişimlerde akım değerinde bir artış olmamaktadır. Bu durum hazırlanan elektrot için ölçüm

ortamındaki koşullarda 105,26 mM glukoz derişiminde, polimer film içerisindeki enzimin substrata karşı doğunluğa ulaştığını göstermektedir. Dolayısıyla bu koşullarda 105,26 mM ve daha yüksek glukoz derişimin de elektrot aktivitesinde difüzyon kısıtlamasının önemi olmayacaktır.

Tutuklanmış enzim için Michaelis-Menten (K_{mg}) sabiti tayin edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13'deki verilere göre yapılan hesaplamalar sonucu PVF kaplanmış Pt çalışma elektrodunda tutuklanan enzim için $K_{mg}=417,571$ mM glukoz değeri bulunmuştur.

4.4. PVF-Au-GOD Enzim Elektrot Aktivitesinin Belirlenmesi

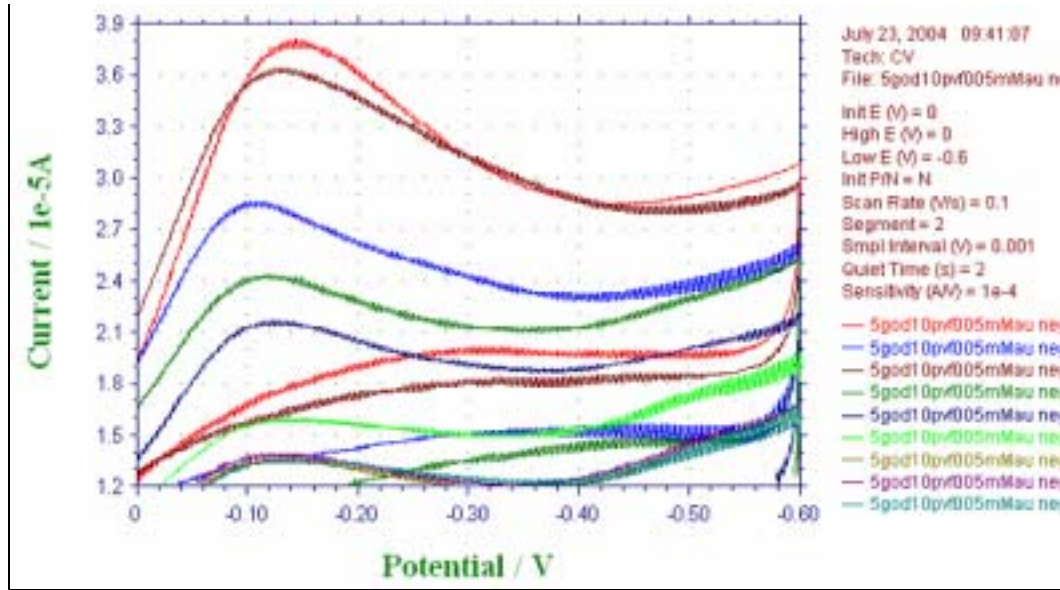
Hazırladığımız enzim elektrodun aktivitesine yüzeyde biriktirilen altının etkisini araştırmak için polimer film ile kaplanan çalışma elektroduna Au biriktirilip daha sonra GOD tutuklanmıştır (PVF-Au-GOD).

PVF-Au-GOD enzim elektrodunda glukoz eklenmesi ile O_2 indirgenme akımında bir azalma olmaktadır. Elektrot aktivitesinin belirlenmesinde bu durumdaki difüzyon kontrollü akım değeri ölçülmüştür.

Pt elektrot üzerine kaplanmış PVF yapısına altın biriktirilip, GOD enziminin tutuklanmasıyla hazırlanan PVF-Au-GOD enzim elektrodunun aktivitesine Au derişimi, Au çözeltisinde bekletme süresi, çalışma potansiyeli, ortam pH, sıcaklık etkisi araştırılmıştır. PVF-Au-GOD enzim elektrodu ile yapılan çalışmalarda diğer

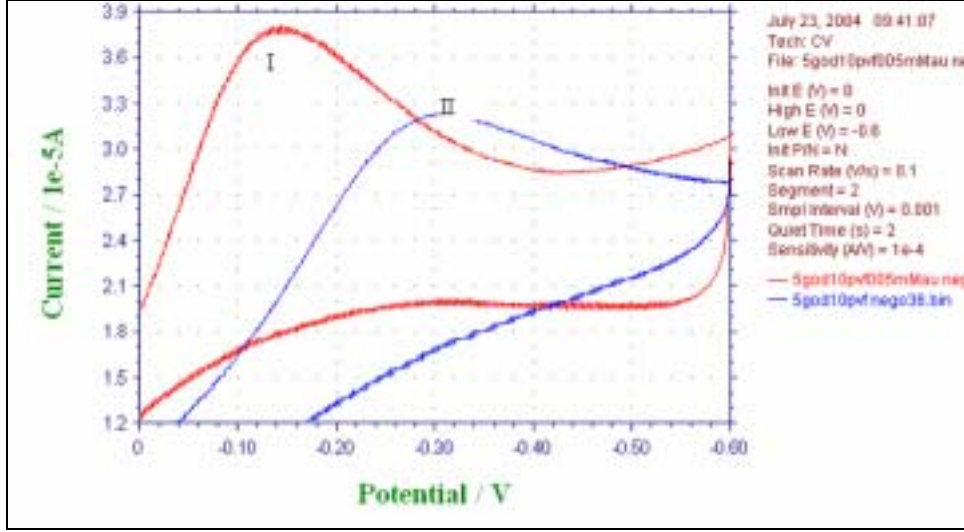
parametreler için PVF-GOD enzim elektrodu ile bulunan optimum değerler kullanılmıştır.

PVF-Au-GOD enzim elektrodu için zamana karşı akım değişimi izlenerek elde edilen cevap eğrileri şekil 4.14’de verilmiştir.



Şekil 4.14 PVF-Au-GOD enzim elektrot aktivitesinin glukoz derişimi ile değişimi (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg PVF/mL, 0,50 mM KAuCl₄, 5,00 mg GOD/mL enzim, 25°C).

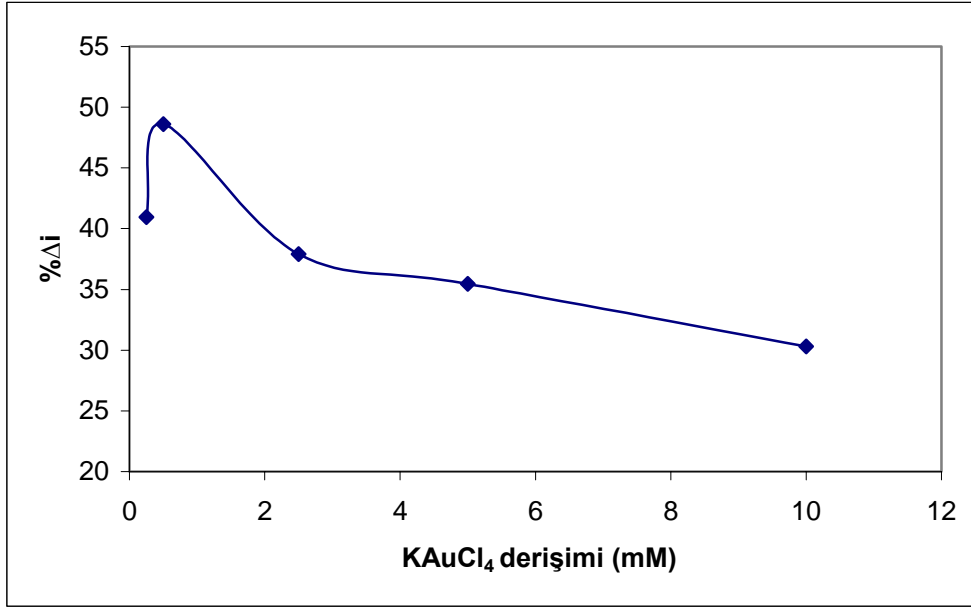
Hazırladığımız PVF-GOD ve PVF-Au-GOD enzim elektrotlarının oksijence doğun tampon ortamındaki akım cevapları dönüşümlü voltametri yöntemiyle incelenmiştir. Şekil 4.15’de PVF-GOD ve PVF-Au-GOD enzim elektrotlarının dönüşümlü voltomogramları verilmiştir. Voltomogramlardan görüldüğü gibi PVF-Au-GOD enzim elektrodu ile elde edilen akım değeri PVF-GOD enzim elektrodu ile elde edilen akım değerinden daha yüksektir.



Şekil 4.15 (I) PVF-Au-GOD enzim elektrodu, (II) PVF-GOD enzim elektrodunun dönüşümlü voltamogramları.

4.4.1. KAuCl_4 Derişiminin Etkisi

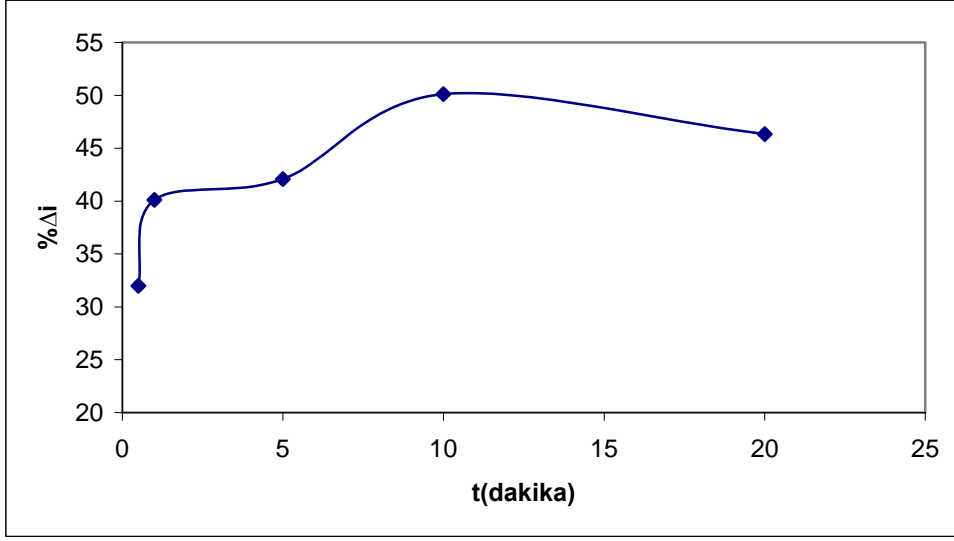
Hazırlanan PVF-Au-GOD enzim elektroduna KAuCl_4 derişiminin etkisini belirlemek için KAuCl_4 derişimi 0,25 mM ile 10 mM arasında değiştirilmiştir. Kullanılan her bir derişimde elektrot aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışmalar sırasında 0,10 M pH 7,40 fosfat tamponu kullanılmıştır. Bunun yanı sıra enzim derişimi, enzimde bekletme süresi, PVF derişimi, PVF’de bekletme süresi için PVF-GOD enzim elektrodu ile yapılan çalışmalarda saptanan optimum değerler kullanılmıştır. KAuCl_4 çözeltisinde bekletme süresi 5 dakika olarak sabit tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar kullanılarak farklı KAuCl_4 derişimine karşı glukoz ilavesinden sonraki akım değerlerindeki maksimum yüzde azalmalar grafiğe geçirilmiştir. Şekil 8.16’de görüldüğü gibi KAuCl_4 çözelti derişiminin artmasıyla gözlenen akım değeri artmakta ve belirli bir derişimden sonra akım azalmaktadır. Bundan sonra yapılan çalışmalarda 0,50 mM KAuCl_4 derişimi kullanılmıştır.



Şekil 4.16 PVF-Au-GOD enzim elektrodunda kullanılan KAuCl₄ derişimine karşı elde edilen %Δi değerleri (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg PVF/mL, 5,00 mg GOD/mL enzim, 25°C).

4.4.2. KAuCl₄ Çözeltisinde Bekletme Süresinin Etkisi

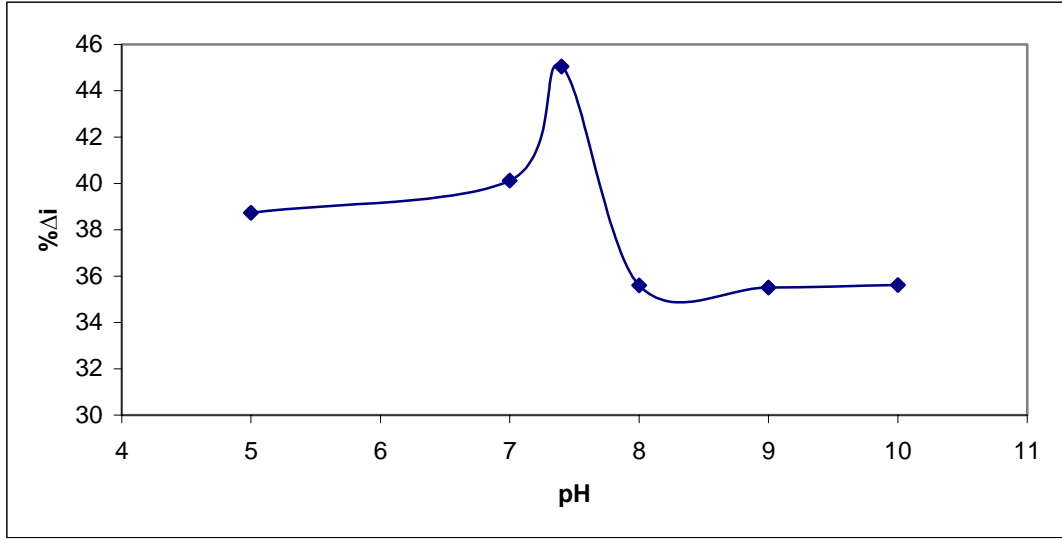
Hazırlanan PVF-Au-GOD enzim elektrodunu akım cevabını etkileyen parametrelerden birisi olan KAuCl₄ çözeltisinde bekletme süresinin etkisi incelenmiştir. KAuCl₄ çözeltisinde bekletme süresi etkisini belirlemek için bekletme süresi 30 saniye ile 20 dakika arasında değiştirilmiştir. Kullanılan her bir bekletme süresinde elektrot aktivitesi incelenmiştir. Kullanılan her bir bekletme süresi için elektrot aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışmalar sırasında 0,10 M pH 7,40 fosfat tamponu kullanılmıştır. Glukoz ilavesinden sonra gözlenen akım değerlerindeki maksimum yüzde azalma KAuCl₄ çözeltisinde bekletme süresine karşı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.17'de görüldüğü gibi KAuCl₄ bekletme süresinin artmasıyla gözlenen akım değeri artmış ve 10 dakika bekletme süresinde en yüksek %Δi eğeri elde edilmiştir. Bundan sonraki yapılan çalışmalarda KAuCl₄ çözeltisinde bekletme süresi 10 dakika olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.17 PVF-Au-GOD enzim elektrodunda tutuklama işlemi sırasında kullanılan KAuCl_4 çözeltisinde bekletme süresine karşı elde edilen $\% \Delta i$ değerleri (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg PVF/mL, 0,50 mM KAuCl_4 , 5,00 mg GOD/mL enzim, 25°C).

4.4.3. Çalışma pH'nın Etkisi

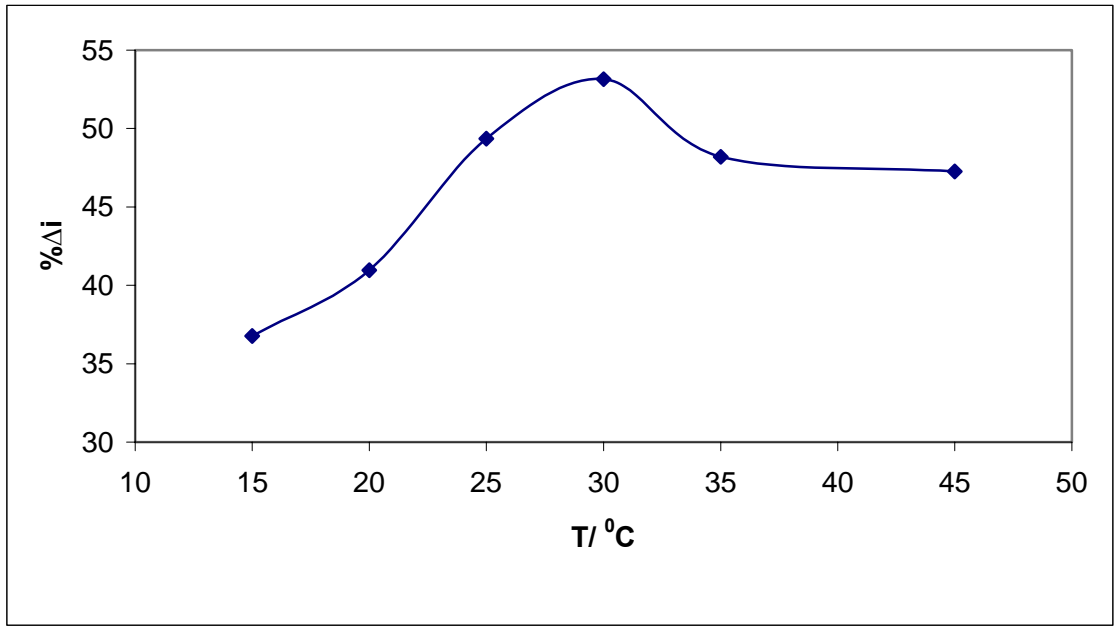
Enzim elektrotlarının aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri de çalışma ortamının pH'sıdır. Çünkü enzimlerin aktivitesi pH'a bağlı olarak değişmektedir. PVF-Au-GOD enzim elektrodunun aktivitesine ortam pH'nın etkisini araştırmak amacıyla pH 5,00–10,00 arasında değişen 0,10 M tampon çözeltisinde glukoz ilavesinden sonra elde edilen akım değerlerindeki maksimum yüzde azalmalar ölçülmüştür. Farklı pH değerlerinde glukoz ilavesinden sonra ölçülen akım değerlerindeki maksimum yüzde azalmalar şekil 4.18'de görülmektedir. Bu grafikte enzim elektrodunun maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 7,40 olarak belirlenmiştir.



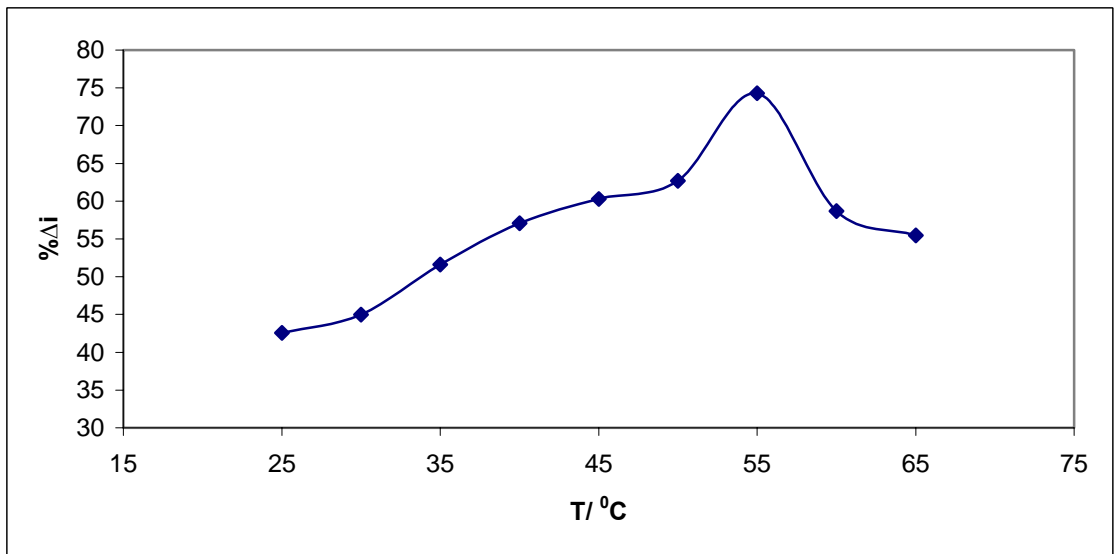
Şekil 4.18 PVF-Au-GOD enzim elektrodunda kullanılan tampon çözelti pH'ına bağlı olarak elde edilen %ΔI değerleri (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg PVF/mL, 0,50 mM KAuCl₄, 5,00 mg GOD/mL enzim, 25°C).

4.4.4. Sıcaklık Etkisi

Sıcaklık, enzimlerin kararlılığını ve enzimatik reaksiyonların hızını etkileyen önemli bir faktördür. Bütün diğer koşulların sabit olduğu durumlarda (özellikle pH'nın tampon kullanılarak sabit tutulduğu ortamlarda), reaksiyon ortamının sıcaklık arttıkça reaksiyon hızı da belli bir noktaya kadar artmaktadır. Bu noktadan sonraki sıcaklık artışlarında enzimatik reaksiyon hızında ani düşüşler meydana gelmektedir. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği bu dönüş noktasına optimum sıcaklık denir. 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda PVF-Au-GOD ve PVF-GOD enzim elektrodunun her biri için, GOD enzimi ile glukoz arasındaki aktivasyon enerjisinin belirlenmesi amacıyla farklı ortam sıcaklıklarında deneyler yapılmıştır. PVF-Au-GOD enzim elektrodu için sıcaklık 15°C ile 45°C arasında, PVF-GOD enzim elektrodu için 25°C ile 65°C arasında değiştirilmiş ve her bir sıcaklık için akım değerlerindeki maksimum % azalma belirlenmiştir. Şekil 4.19 ve şekil 4.20'de görüldüğü gibi PVF-Au-GOD enzim elektrodu için maksimum % azalma 30°C de, PVF-GOD enzim elektrodu için 55°C de elde edilmiştir.



Şekil 4.19 PVF-Au-GOD enzim elektrodu için reaksiyon hızının sıcaklıkla değişimi. (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg PVF/mL enzim, 0,5 mM KAuCl₄, 5,00 mg GOD/mL enzim, 25°C).

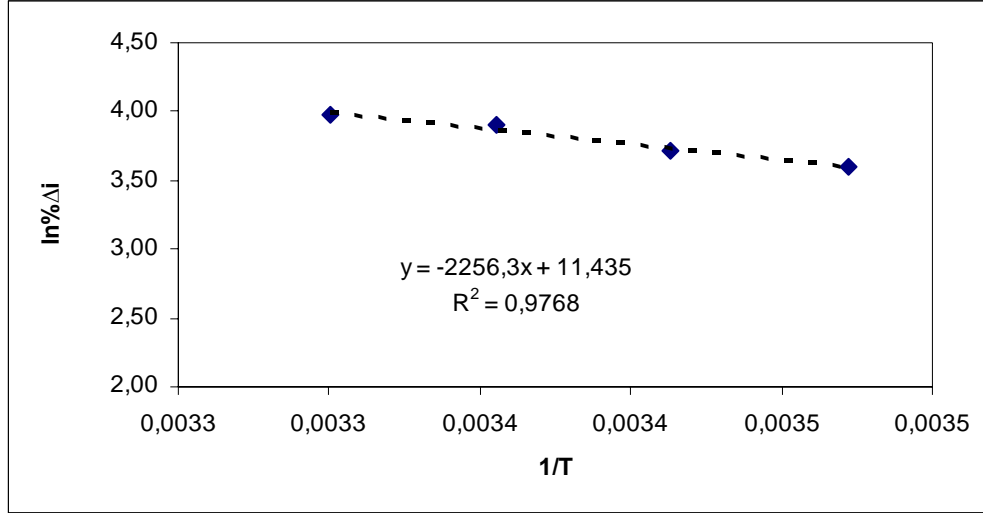


Şekil 4.20 PVF- GOD enzim elektrodu için reaksiyon hızının sıcaklıkla değişimi. (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg PVF/mL enzim, 5,00 mg GOD/mL enzim, 25°C).

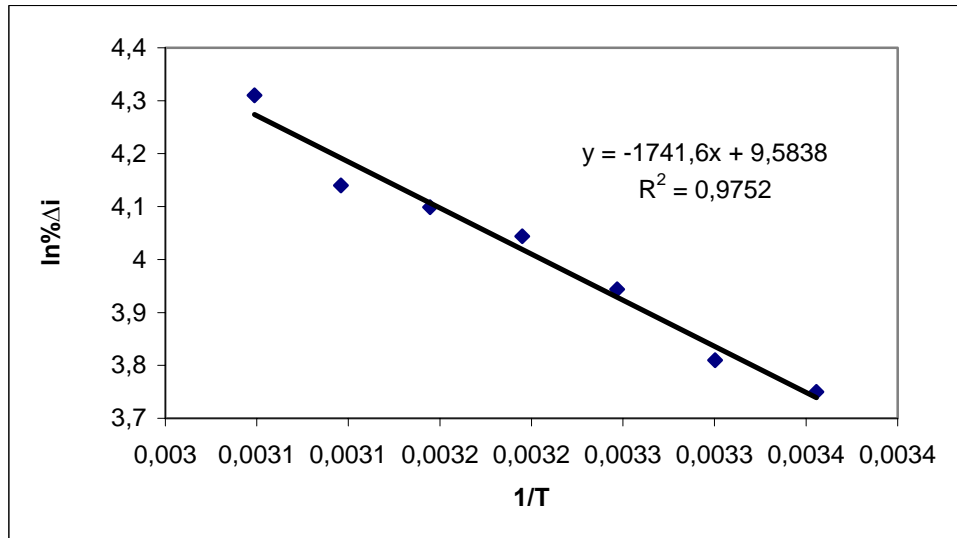
Deneysel veriler ve Arrhenius eşitliğinden yararlanılarak tutuklanmış GOD ile yürütülen reaksiyonun aktivasyon enerjisi bulunmuştur. Bu amaçla $1/T$ 'ye karşı ln

% Δi değerleri grafiğe geğirilmiştir. Elde edilen doğrular şekil 4.19 ve şekil 4.20'de görülmektedir.

Elde edilen doğruların eğiminden PVF-Au-GOD için aktivasyon enerjisi 18,76 kJ/mol, PVF-GOD için 14,48 kJ/mol olarak bulunmuştur.



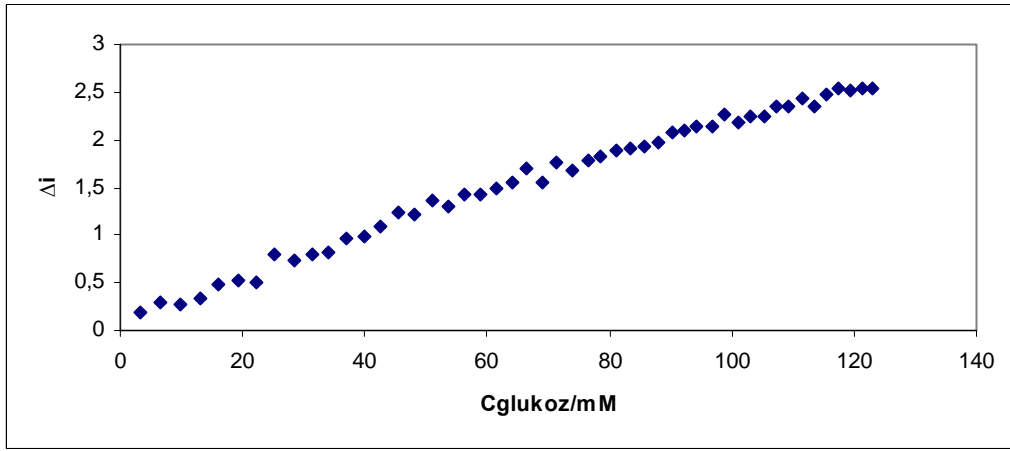
şekil 4.21 PVF-Au-GOD enzim elektrodu için Arrhenius grafiği. (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg PVF/mL enzim, 0,5 mM KAuCl₄, 5,00 mg GOD/mL enzim, 25°C).



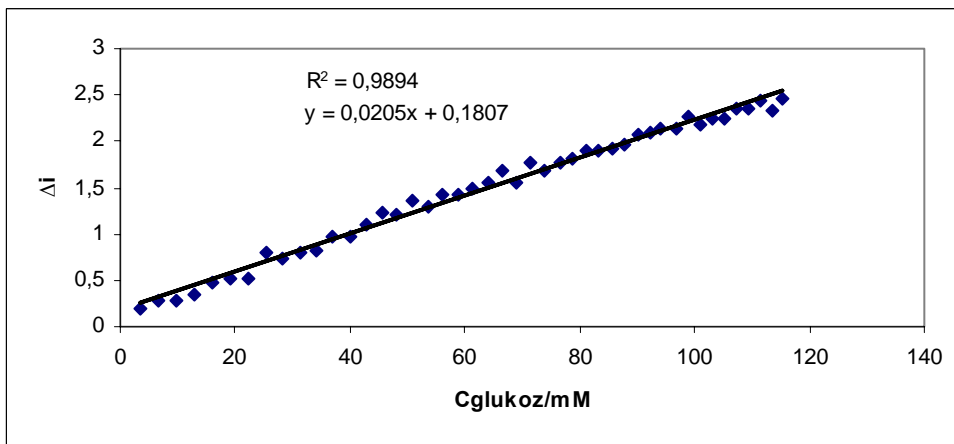
şekil 4.22 PVF-GOD enzim elektrodu için Arrhenius grafiği. (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg PVF/mL enzim, 5,00 mg GOD/mL enzim, 25°C).

4.4.5. PVF-Au-GOD Enzim Elektroduna Substrat Derişiminin Etkisi

Hazırlanan PVF-Au-GOD elektrodunun maksimum aktivitesinin ve doğrusal çalışma aralığının saptanması için ölçülen akım değerlerine substrat derişimi etkisi incelenmiştir. Daha önce saptanan optimum koşullarda 0,10 M pH 7,40 fosfat tamponunda ve 25°C sıcaklıkta farklı glukoz derişimlerinde verdiği Δi değerleri saptanmıştır. PVF-Au-GOD ölçülen Δi değerlerinin glukoz derişimi ile değişimi Şekil 4.23’de verilmiştir.



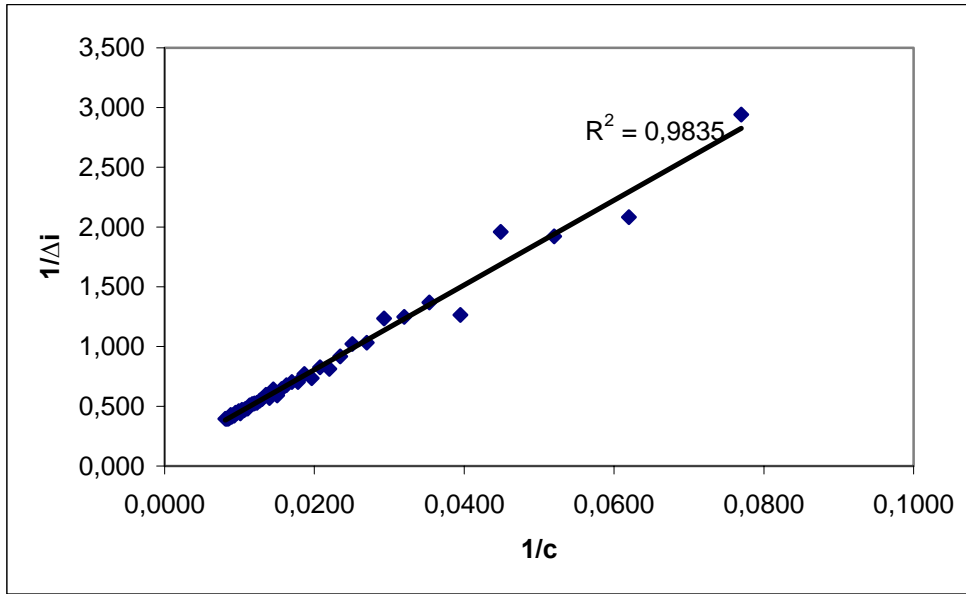
Şekil 4.23 PVF-Au-GOD enzim elektrot aktivitesinin glukoz derişimi ile değişimi (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg PVF/mL enzim, 0,5 mM KAuCl₄, 5,00 mg GOD/mL enzim, 25°C).



Şekil 4.24 PVF-Au-GOD enzim elektrot aktivitesinin glukoz derişimi ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı. (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,00 mg PVF/mL enzim, 0,5 mM KAuCl₄, 5,00 mg GOD/mL enzim, 25°C).

Şekilden de görüldüğü gibi hazırlanan PVF-Au-GOD enzim elektrodu 105,26 mM'a kadar glukoz derişimi ile orantılı akım değerleri vermektedir. Bu nedenle hazırlanan PVF-Au-GOD enzim elektrodunun pratik kullanım aralığı 105,26 mM'a kadar glukoz derişimi olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan glukoz derişimine karşılık elektrot cevabı PVF-Au-GOD enzim elektrodu için 117,34 mM civarında sabit değere ulaşmakta ve daha yüksek derişimlerde akım değerinde bir artış olmamaktadır.

Polimer yapıda difüzyon kısıtlaması olup olmadığını ortaya koymak amacıyla çeşitli glukoz derişimlerinde alınan akım değerleri kullanılarak PVF-Au-GOD enzim elektrodu için görünür Michaelis-Menten (K_{mg}) sabitleri tayin edilmiştir (Şekil 4.25). Michaelis-Menten (K_{mg}) sabiti 371 mM olarak bulunmuştur.

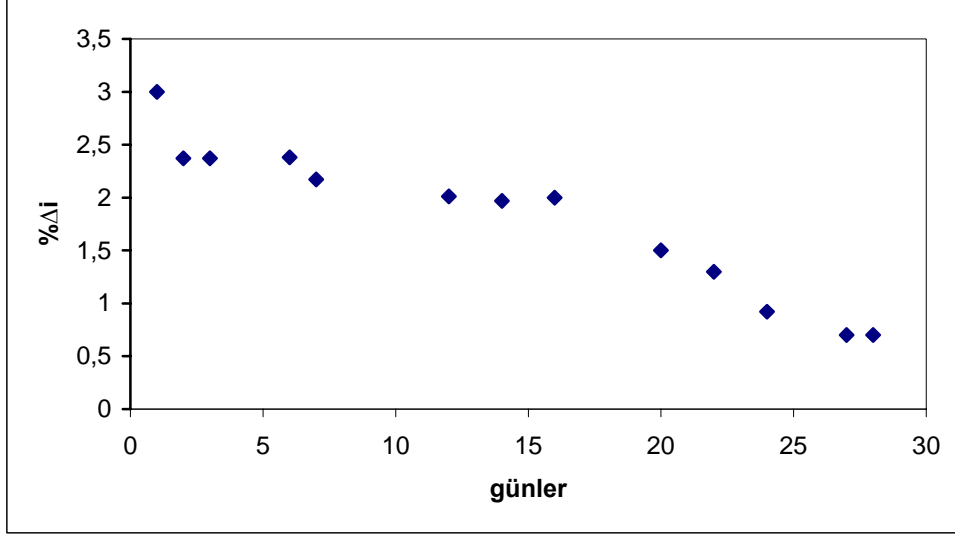


Şekil 4.25 PVF-Au-GOD enzim elektrot için Lineweaver-Burk grafiği (0,1 M fosfat tamponu, pH 7,40, 10,0 mg PVF/mL, 0,5 mM KAuCl₄, 10,00 mg GOD/mL enzim, 25°C)

4.5. Geliştirilen Elektrodun Uzun Süre Kararlılığı

Enzim elektrotlarında aranan en önemli özelliklerden biri de elektrodun uzun ömürlü olmasıdır. Bu çalışmada enzim elektrodun uzun süre kararlı olduğu gözlenmiştir. Elektrodun aktivitesi belirlenen optimum koşullarda ölçülmüş ve enzim enzim elektrodu kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında saklanmıştır. Aynı elektrodun

aktivitesine belirli aralıklarla 30 gün boyunca bakılmıştır. Bu süre sonunda elektrodun aktivitesini yitirdiği gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar kullanılarak zamana karşı % Δ i değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 Aynı elektrot ile farklı günlerde alınan maksimum akım değerleri (25°C, 0,1 M Tampon, pH 7,4).

4.6. Girişimler

Ölçüm ortamında bulunabilecek bazı maddelerin hazırlanan enzim elektrodundaki cevapları incelenmiştir. Bu çalışmada glukoz derişimi ve girişim yapabilecek maddelerin derişimleri 0,5 M'da sabit tutulmuştur. Ölçüm ortamında bulunabilecek ve girişim yapabilecek maddeler metanol, asetilkolin, trietanolamin, formaldehit, dietanolamin, kolin ve askorbik asit olarak belirlenmiştir. Bu amaçla 0,5 M glukoz için kararlı hal akım değeri elde edildikten sonra hücreye girişim yapabilecek madde eklenmiş ve akım değerlerindeki maksimum % azalma ölçülmüştür. Bu maddelerin hiçbirisi hazırlanan enzim elektrodunda bir girişime neden olmamıştır.

5. SONUÇLAR

Oksijenin indirgenme akımının ölçülmesine dayanan glukoz tayini yapmak amacıyla yeni bir enzim elektrodunun geliştirildiği bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiş ve diğer çalışmalarla karşılaştırılarak eleştirilmiştir.

Hazırladığımız enzim elektrodunda GOD enzimi tutuklanmış olarak kullanılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında, hazırlanan enzim elektroduna referans oluşturmak üzere GOD enzimi için optimum çalışma koşulları araştırılmış ve serbest enzim için bazı kinetik parametreler hesaplanmıştır. Enzim elektrodunun hazırlanmasında GOD enzimi PVF kaplanmış elektrotta ve PVF kaplanmış Au biriktirilmiş Pt elektrotta tutuklanmıştır. Serbest enzim için yapılan çalışmalar kaplanmamış Pt elektrot için yapılmıştır. Maksimum $\% \Delta i$ değerinin gözlemlendiği pH 7,4 ve sıcaklık ise 30°C olarak bulunmuştur. Yapılan bu çalışmalar sonucunda serbest GOD enziminin glukozla reaksiyonu için Arrhenius grafikleri çizilmiştir. Bu reaksiyonun aktivasyon enerjisi kaplanmamış Pt elektrot için 7,21 kJ/mol, K_{mg} değerleri ise 212,21 mM olarak bulunmuştur.

Çalışmanın ilk aşamasında Pt elektrot yüzeyinde kaplanmış PVF üzerine glukoz oksidaz (GOD) tutuklanmıştır. PVF-GOD olarak tanımladığımız elektrotla PVF derişimi (10,0 mg/mL), PVF’de bekletme süresi (5 dakika), enzim derişimi (5,00 mg/mL), enzimde bekletme süresi (10 dakika) olarak saptanmıştır. Çalışmalar O_2 ce doygun ortamda yapılmıştır.

Çalışmada daha sonra polimer ile kaplanmış Pt elektrot yüzeyinde Au biriktirilerek ardından glukoz oksidaz (GOD) tutuklanmıştır. PVF-Au-GOD enzim olarak tanımladığımız bu elektroda Au’nun etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalarda PVF-GOD enzim elektrodu ile saptanan optimum koşullar kullanılmıştır.

PVF-Au-GOD enzim elektrodu için maksimum $\% \Delta i$ değerinin gözlemlendiği altın derişimi 0,5 mM ve altın çözeltisi içinde bekletme süresi de (10 dakika) olarak bulunmuştur. Ayrıca hazırlanan PVF-Au-GOD enzim elektrodunun aktivitesine

sıcaklığın etkisi incelenmiş ve maksimum $\% \Delta i$ değerinin gözlemlendiği sıcaklık 30°C olarak bulunmuştur. Enzimin substratına doymuş olduğu glukoz derişiminde sıcaklık artmasıyla aktivitenin arttığı bölgedeki verilerin Arrhenius bağıntısına göre değerlendirilmesiyle PVF-Au-GOD enzim elektrodunda glukoz oksidaz ile glukoz arasındaki reaksiyonun aktivasyon enerjisi $18,76 \text{ kJ/mol}$, PVF-GOD enzim elektrodunda ise $14,48 \text{ kJ/mol}$ olarak bulunmuştur. Glukoz derişiminin etkisinin incelenmesi sırasında elde edilen veriler kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. PVF-Au-GOD enzim elektrodu ve PVF-GOD enzim elektrodunda tutuklanmış enzimin pH'ı $7,4$ olan $0,1 \text{ M}$ fosfat tamponunda ve 25°C 'da görünür Michealis-Menten sabitleri (K_{mg}) sırasıyla 371 mM ve $417,57 \text{ mM}$ glukoz olarak bulunmuştur.

Serbest enzim sistemi için bulunan E_a değerleri kaplanmamış Pt elektrotta $7,21 \text{ kJ/mol}$, tutuklanmış enzim sistemi için ise PVF-GOD elektrotta $14,48 \text{ kJ/mol}$, PVF-Au-GOD elektrodunda $18,76 \text{ kJ/mol}$ olarak bulunmuştur. Serbest enzim ve tutuklanmış enzim reaksiyonları için bulunan E_a değerleri karşılaştırılacak olursa, Au biriktirilmiş elektrotta tutuklanmış enzim sistemi reaksiyonu için aktivasyon enerjisinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Serbest enzim sistemi için bulunan Michealis-Menten sabitleri kaplanmamış Pt elektrotta $212,21 \text{ mM}$ glukoz değeri olarak bulunmuştur. Tutuklanmış enzim sistemi için ise, PVF-GOD elektrodu için $417,57 \text{ mM}$ glukoz, PVF-Au-GOD elektrodu için 371 mM glukoz olarak bulunmuştur. Serbest enzim ve tutuklanmış enzim sistemleri için bulunan K_{mg} değerleri karşılaştırılacak olursa tutuklanmış enzim sistemi için bulunan K_{mg} değerlerinin daha büyük olduğu görülmektedir.

Hazırlanan PVF-GOD enzim elektrodunun glukoz için doğrusal çalışma aralığı $73,86 \text{ mM}$ 'a kadar, PVF-Au-GOD enzim elektrodu için ise $105,26 \text{ mM}$ 'a kadar bulunmuştur. Literatürde doğrusal çalışma aralığı; 18 mM (Xu ve Chen, 1999), 9 mM (Chen ve Dong, 2002), $0,1-27 \text{ mM}$ (Yang vd., 2002), 20 mM (Sung ve Bae, 2002), $5-100 \mu\text{M}$ (Yabuki vd., 2003), $0,004-0,28 \text{ mM}$ 'a kadar (Liu ve Ju, 2003) olarak verilmiştir.

Hazırladığımız enzim elektrodunun gözlenebilme sınırı 5×10^{-4} M olarak bulunmuştur. Ayrıca bu enzim elektrodu ile 30 gün boyunca ölçüm yapılmış ve 28. günden sonra enzim elektrot aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada geliştirilen enzim elektrodu, literatürde verilen çalışmalarla karşılaştırıldığında hazırlanmasının kolay, ucuz, doğrusal çalışma aralığının geniş olması gibi avantajlara sahip olduğu söylenebilir. Kullanılan enzim tutuklama yöntemi daha basittir ve enzim yapısında deformasyona yol açmamaktadır.

6.KAYNAKLAR

- Arnold, S. Donnert C., (1999). Directed evolution of industrial enzymes, *Trens in Biotechnology*, 17, 135-136.
- Aso, B.C. Kunitake, T. Nakashima, T., (1969) Cationic Polymerization and Copolymerization of Vinylferrocene, *Die Makromolekulare Chemie*, 124, 232-240.
- Aydın, G. Çelebi, S.S. Özyörük, H. Yıldız, A. (2002) Amperometric Enzyme Electrode for L(+)-lactate Determination Using Immobilized L(+)-lactate Oxidase in Poly(vinylferrocenium) Film, *Sensors and Actuators B*, 87, 8-12.
- Bailey, J.E Ollis, F.D., (1997) *Biochemical Engineering Fundamentals*. Mc Graw-Hill Kogakusha Ltd, Tokyo. 198s.
- Bard, A.J. and Faulkner, L.R., (1980) *Electrochemical Methods (Fundamentals and Applications)*. John Wiley & Sons, Inc. 5,136-212.
- Chen, L. Zhang, X. Xi, W. Zhou, Y. Zang, Z. Cass, A., (2002). Genetic modification of glucose oxidase for improving performance of an amperometric glucose, *Biosensors & Bioelectronics*, 17, 851-857.
- Chuang, C.L. Wang, Y.J. Lang, H.L., (1997). Amperometric glucose sensor based on ferrocene-containing B-polyethylenimine and immobilized glucose oxidase, *Analytica Chimica Acta*, 353, 37-44.
- Dequaire, M. Degrand, C. Limoges, B., (2000). An electrochemical metalloimmunoassay based on a colloidal gold label. *Analytica Chimica Acta*, 72, 5521.
- Devlin, T., (1997). *Text book of Biochemistry with clinical correlations* 136-139.
- Dinçkaya, E., (1999). *Biyosensörler*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, 81s., İzmir.
- Endo, T. Yoshimura, T. Esumi, K., Voltammetric study of sodium hypochlorite using dendrimer-stabilized gold nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 269, 364-369.
- González-García, M.B. Costa-García, A., (2000). Silver electrodeposition catalyzed by colloidal gold on carbon paste electrode: application to biotin–streptavidin interaction monitoring. *Biosensors & Bioelectronics*, 15, 663-670.

- Gülce, H., (1993) Polivinilferrosen Modifiye Elektrodunun Sulu ve Susuz Ortamlardaki Elektrokimyasal Davranışı, Hacettepe Ün. Fen Bil. Enst, Doktora Tezi, 111 s, Ankara.
- Gülce, H. Özyörük, H. Yıldız, A., (1993) Electrochemical Response of Poly(vinylferrocenium)-coated Pt Electrodes to Some Anions in Aqueous Media, *Electroanalysis*, 2, 178-183.
- Gülce, H. Özyörük, H. Yıldız, A., (1994-a) Electrochemical Reduction of Anthracenes on Poly(vinylferrocenium) Coated Pt electrodes in Acetonitrile, *Phys. Chem*, 98, 228-233.
- Gülce, H. Özyörük, H. Yıldız, A., (1994-b) Electrochemical Oxidation of Anthracenes on Poly(vinylferrocenium) Coated Pt electrodes in Acetonitrile, *Phys. Chem*, 98, 828-832.
- Gülce, H. Özyörük, H. Çelebi, S.S. Yıldız, A., (1995-a) amperometric enzyme electrode for aerobic glucose monitoring prepared by glucose oxidase immobilized in Poly(vinylferrocenium), *Journal of Electroanalytical Chem*, 394, 63-70.
- Gülce, H. Özyörük, H. Çelebi, S.S. Yıldız, A., (1995-b) amperometric enzyme electrode for sucrose determination prepared from glucose oxidase and invertase co- immobilized in Poly(vinylferrocenium), *Journal of Electroanalytical Chem*, 397, 217-223.
- Gülce, H. Gülce, A. Yıldız, A., (2002-a). A Novel Two-Enzyme Amperometric Electrode for Lactose Determination, *Analytical Sciences*, 18, 1-3.
- Gülce, H. Ataman, I. Gülce, A. Yıldız, A., (2002-b). A new amperometric enzyme electrode for galactose determination. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 41-44.
- Gülce, H. Gülce, A. Kavanoz, M. Coşkun, H. Yıldız, A., (2002-c). A new amperometric enzyme electrode for alcohol determination, *Biosensors & Bioelectronics*, 17, 517-521.
- Gülce, H. Aktaş, Y.S. Gülce, A. Yıldız, A., (2003). Polyvinylferrocenium immobilized enzyme electrode for choline analysis, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 895-899.

- Gündoğan, M. Çelebi, S.S. Özyörük, H. Yıldız, A., (2002). Amperometric enzyme electrode for organic peroxides determination prepared from horseradish peroxidase immobilized in poly(vinylferrocenium) film, *Biosensors & Bioelectronics*, 17, 875-881.
- Huang, Y. Zhang, W. Xiao, H. Li, G., (2005). An electrochemical investigation of glucose oxidase at a CdS nanoparticles modified, *Biosensors & Bioelectronics*,
- Kavanoz, M., (2001). Modifiye elektrot kullanılarak altın tayini için yöntem geliştirilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 76 s, Isparta.
- Liu, S. Ju, H., (2003). Reagentless glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized on colloidal gold modified carbon paste electrode, *Biosensors & Bioelectronics*, 1-7.
- Li, T. Yao, Z. Ding, Liang., (2004) Development of an amperometric biosensor based on glucose oxidase immobilized through silica sol-gel film onto Prussian Blue modified electrode, *Sensors and Actuators B*, 101, 155-160.
- Luo, X. Xu, J. Du, Y. Chen, H., (2004) A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition, *Analytical Biochemistry*.
- Pan, D. Chen, J. Yao, S. Nie, L. Xia, J. Tao, W., (2005) amperometric glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized o-aminophenol film at copper- modified gold electrode, *Sensors and Actuators B*, 104, 68-74.
- Pişkin, E., (1986) *Biyosensörler. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir. 205-223.
- Raj, C.R. Okajima, T. Ohsaka, T., (2003). Gold nanoparticle arrays for the voltametric sensing of dopamine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 543, 127-133.
- Saito, T. Watanabe, M., (1997). Characterization of poly(vinylferrocene-co-2-hydroxyethyl methacrylate) for use as electron mediator in enzymatic glucose sensor. *Reactive & Functional Polymers*, 37, 263-269.
- Saldamlı,İ., 1998. *Gıda Kimyası*, Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, 261-262s., Ankara.

- Shirota, Y. Kakuta, T. Mikawa, H., (1984) Electrochemical oxidation of poly(vinylferrocene) with concurrent precipitation on the electrode; preparation of an electrically conducting polymer, *Makromol.Chem., Rapid Commun*, 5, 337-340.
- Smith, T.W. Kuder, J.E. and Wychick, D., (1976) *J. Polym. Sci*, 14, 2433.
- Sung, W. Bae, Y., (2002). A glucose oxidase electrode based on polypyrrol with polyanion / PEG / enzyme conjugate dopant, *Biosensors & Bioelectronics*, 18, 1231-1239.
- Sung, W. Bae, Y., (2002). A glucose oxidase electrode based on polypyrrol with polyanion / PEG / enzyme conjugate dopant. *Biosensors & Bioelectronics*, 18, 1231-1239.
- Şen, S. Gülce A. Gülce H., (2004). Polyvinlyferrocenium modified Pt electrode for the design of amperometric choline and acetylcholine enzyme electrodes, *Biosensors & Bioelectronics* , 19, 1261-1268.
- Uang, Y. Chou,T., (2003). Fabrication of glucose oxidase / polypyrrole biosensors by galvanostatic methode in various pH aqueous solutions, *Biosensors & Bioelectronics*, 1-7.
- Umana, M. Rolison, D.R. Nowak, R. Daum, P. Murray, R.W., (1980) X-Ray photoelectron spectroscopy of metal, metal oxide, and carbon electrode surfaces chemically modified with ferrocene and ferrocenium, *Surface Science*, 101, 295-309.
- Uslan A.H., (1986) *Enzim Kinetiği. Temel ve Uygulamalı Enzimolji. (Telefoncu,A.)*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir. 59-91.
- Xiao, Y. Ju, H.X. Chen, H.Y., (1999). Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase-labeled Au colloids immobilized on gold electrode surface by cysteamine monolayer, *Analytica Chimica Acta*, 391, 73-82.
- Xu, J. Zhang, X. Yu, . Fang, H. Chen, H., (1999). A stable glucose biosensor prepared by co-immobilizing glucose oxidase into poly(p-cholorophenol)at a platinumium electrode, *Fresenius J Anal Chem*, 369, 486-490.
- Yang, X. Hua, L. Gong, H. Tan, S., (2002). Covalent immobilization of an enzyme (glucose oxidase) onto a carbon sol-gel silicate composite surface as a biosensing platform, *Analytica Chimica Acta*, 478, 67-75.

Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S., 1993. Enstrümantal Analiz Yöntemleri. Hacettepe Üniversitesi Yayınları No:64, 506s. Ankara.

Zhang, L., Jiang, X., Wang, E., Dong, S., (2004) attachment of gold nanoparticles to glassy carbon electrode and its application for the direct electrochemistry and electrocatalytic behavior of hemoglobin, Biosensors & Bioelectronics, DTD5.