



ADRENALİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI

Selma DURMUŞ

YÜKSEK LİSANS

KİMYA ANABİLİM DALI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2016

Selma DURMUŞ tarafından hazırlanan “ADRENALİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Fatma ARSLAN

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Başkan : Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye : Prof. Dr. Emel EMREGÜL

Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Tez Savunma Tarihi: 01/06/2016

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Metin GÜRÜ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza

Selma DURMUŞ

01/06/2016

ADRENALİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI
(Yüksek Lisans Tezi)

Selma DURMUŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2016

ÖZET

Bu çalışmada, adrenalin tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Bu amaçla platin elektrot yüzeyi pirolun polivinilsülfonat varlığında elektrokimyasal polimerleşme ile kaplandı. Ardından lakkaz enzimi gluteraldehit ile çapraz bağlanarak polimer kaplı platin yüzeye immobilize edildi. Adrenalin tayini, enzimatik reaksiyon sonucu ortaya çıkan epinefrinekinonun $-0,220'$ da indirgenmesine dayanarak yapıldı. Hazırlanan biyosensörün adrenalin tayini için iki doğrusal çalışma aralığı belirlendi. Biyosensör cevabına pH'nın ve sıcaklığın etkisi araştırıldı. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü tayin edildi ve sentetik numunedeki performansı incelendi.

Bilim Kodu : 20104

Anahtar Kelimeler : Adrenalin, lakkaz, biyosensör, polivinilsülfonat (PVS), pirol (Ppy)

Sayfa Adedi : 73

Danışman : Doç. Dr. Fatma ARSLAN

A NEW LACCASE-BASED BIOSENSOR FOR ADRENALINE
DETERMINATION

(M. Sc. Thesis)

Selma DURMUS

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2016

ABSTRACT

In this paper, a novel amperometric epinephrine (adrenaline) biosensor with immobilization of laccase on polypyrrole–polyvinylsulphonate (PPy-PVS) film has been accomplished. Laccase enzyme was immobilized on PPy-PVS film by cross-linking with glutaraldehyde. Determination of adrenaline (EP) was carried out by the reduction of enzymatically produced epinephrinequinone at - 0.220 V vs. Ag/AgCl. The effects of pH and temperature were investigated. There are two linear parts in the region between 0.1 - 1.0 μM and 1.0 - 10.0 μM . The storage stability and operation stability of the enzyme electrode were also studied. Interference effects were investigated on response of the biosensor.

Science Code : 20104

Key Words : Adrenaline, laccase, biosensor, polypyrrole (PPy), polyvinylsulphonate (PVS)

Page Number : 73

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Fatma ARSLAN

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca bilgi birikimi ve tecrübesi ile beni yönlendiren, desteğini esirgemeyen, ufkumu açan, sürekli cesaretlendiren, sadece teze çalıőmalarıma değil hayata dair bana rehberlik eden değerli hocam Sayın Doç. Dr. Fatma ARSLAN' a en içten teőekkürlerimi sunarım.

Çalıőmamın en başından itibaren, deneyimlerini paylaşan Sayın Doç. Dr. Halit ARSLAN'a çok değerli çabaları ve yol göstericiliği için teşekkür ederim. Arő. Gör. Özlem ÇOLAK ve Arő. Gör. Demet UZUN deneysel çalışmalar sırasındaki yardımları samimi dostlukları için çok teşekkür ederim. Hiçbir zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Adrenalin.....	3
2.2. Enzimler	6
2.3. Lakkaz Enzimi	10
2.3.1. Lakkazın tepkime mekanizması.....	11
2.3.2. Lakkaz'ın Uygulama Alanları	13
2.4. Biyosensörler	14
2.4.1. Biyomoleküller (Biyosensörler).....	16
2.4.2. Çeviriciler (Transduserler)	16
2.4.3. Biyosensör uygulamaları.....	17
2.4.4. Biyosensör dizaynında dikkat edilmesi gerekenler	18
2.5. Enzim Sensörleri.....	18
2.6. Elektrokimyasal Esaslı Biyosensörler	20
2.6.1. Amperometrik sensörler	20
2.6.2. Potansiyometrik sensörler	20

	Sayfa
2.6.3. Yarı iletkenlik sensörleri	21
2.7. Enzim Sensörlerinin Performans Faktörleri	21
2.7.1. Kararlılık	22
2.7.2. Duyarlılık	22
2.7.3. Seçicilik.....	23
2.7.4. Ölçüm süresi.....	23
2.7.5. Tekrarlanabilirlik	23
2.7.6. Ölçüm sınırı.....	24
2.7.7. Ölçüm aralığı.....	24
2.7.8. Ömrü.....	24
2.8. İletken Polimerler	24
2.8.1. PiroI.....	26
2.8.2. PiroIün Elektrokimyasal Polimerizasyonu	27
2.9. Biyobileşen İmmobilizasyonu.....	29
2.9.1. Kovalent bağlanma.....	31
2.9.2. İyonik bağlanma	32
2.9.3. Adsorpsiyon	32
2.9.4. Tutuklama	32
2.9.5. Çapraz bağlama yöntemi.....	33
2.10. Kaynak Araştırması	34
3. DENEYSEL KISIM	39
3.1. Cihazlar ve Malzemeler	39
3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı.....	39
3.1.2. Hücre ve elektrotlar.....	39

	Sayfa
3.1.3. pH metre	39
3.1.4. Su banyosu	40
3.1.5. Mikro pipet	40
3.1.6. Argon gazı	40
3.1.6. Saf su cihazı.....	40
3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri	40
3.2.1. Kullanılan çözeltiler.....	40
3.3. Platin Yüzeyin Polipirol-Polivinilsülfonat (PPy-PVS) Film ile Kaplanması	43
3.4. Pt/PPy-PVS Elektrodunun Serbest Lakkaz Enzimi Varlığında Adrenokinona Duyarlılığının ve Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi	43
3.5. Adrenalin Biyosensörünün Hazırlanması.....	44
3.6. Çapraz Bağlama Yöntemine Gluteraldehit Miktarının Etkisi	44
3.7. Adrenalin Biyosensörünün En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi	45
3.7.1. pH etkisi.....	45
3.7.2. Sıcaklığın etkisi	45
3.7.3. Substrat derişiminin etkisi	46
3.7.4. Enzim elektrodunun tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi.....	46
3.7.5. Raf ömrünün belirlenmesi	46
3.7.6. Biyosensör üzerine girişim yapan maddeler	47
3.7.6. Sentetik numune çalışması	47
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	49
4.1. Pt/PPy-PVS Elektrodunun Serbest Lakkaz Enzimi Varlığında Adrenokinona Duyarlılığının ve Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi.....	50
4.2. Gluteraldehit Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi.....	51
4.3. Enzim Elektrodunun En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi	53

4.3.1. pH etkisi.....	53
4.3.2. Sıcaklığın etkisi.....	54
4.3.3. Substrat derişiminin etkisi	55
4.3.4. Enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi	59
4.3.5. Enzim elektrodun raf ömrünün belirlenmesi.....	60
4.4. Hazırlanan Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler.....	61
4.5. Sentetik Numunede Adrenalin Tayini.....	62
4. SONUÇLAR	63
KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ	73

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Enzimlerin sınıflandırılması	6
Çizelge 2.2 İmmobilize enzimlerinin üstünlükleri.....	29
Çizelge 2.3. Enzim immobilize tekniklerinin kıyaslanması	31
Çizelge 3.1. Kullanılan reaktifler.....	41
Çizelge 4.1. Farklı pH koşullarında adrenalin biyosensörüne ait $K_m(göz)$ ve $I_{maks(göz)}$	54
Çizelge 4.3. Biyosensör üzerine girişim yapabilecek türlerin incelenmesi (0,1 M pH 5,0 fosfat tamponu, 25 °C, -0,220 V).....	62
Çizelge 4.4. Çalışma sonuçları ile literatürün karşılaştırılması	65

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Adrenalin açık formülü.....	3
Şekil 2.2. Adrenalin biyosentezi	4
Şekil 2.3. Enzimle ile katalizlenen ve katalizlenmeyen iki reaksiyonun enerji değişimi serbest enerji diyagramı	8
Şekil 2.4. Lakkaz enziminin katalizlediği reaksiyon mekanizması	12
Şekil 2.5. Trametes versicolordan elde edilen lakkazın üç boyutlu bakır-bağlama bölgeleri gösterimi	12
Şekil 2.6. Lakkaz enziminin bakır merkezlerinin gösterilmesi.....	13
Şekil 2.7. Bir biyosensörün genel şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.8. Biyosensörün çalışma prensibi	16
Şekil 2.9. Çeviriciler	17
Şekil 2.10. Enzimlerinin biyosensörlerinin sınıflandırılması	19
Şekil 2.11. Pirol.....	26
Şekil 2.12. Pirolün elektrokimyasal yükseltgenme ile polimerleşme mekanizması.....	28
Şekil 2.13. İmmobilizasyon teknikleri, E: enzim, P: protein	30
Şekil 4.1. Adrenalin tayinin reaksiyon şeması.....	49
Şekil 4.2. (a) pH 7,0 fosfat tamponu içinde PPy-PVS film (b) $1,0 \times 10^{-7}$ M adrenalin (c) $5,0 \times 10^{-7}$ M adrenalin (d) $1,0 \times 10^{-6}$ M adrenalin (e) $5,0 \times 10^{-6}$ M adrenalin ilavesi ile alınan voltamogramlar	51
Şekil 4.3. Çapraz bağlama immobilizasyon yönteminde kullanılan gluteraldehit miktarının etkisinin incelendiği derişim-akım grafiği (0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C, -0,220V)	52
Şekil 4.4. Biyosensörün adrenalin duyarlılığına sıcaklığın etkisi (0,1 M pH 5,0 ve pH 8,0 fosfat tamponu, $1,0 \times 10^{-6}$ M adrenalin, -0,220 V)	55
Şekil 4.5. Biyosensörün amperometrik cevabına karşı adrenalin derişiminin etkisi (0,1 M pH 5,0 ve pH 8,0 fosfat tamponu, 25 °C, -0,220 V)	56

Şekil	Sayfa
Şekil 4.6. Biyosensörün amperometrik cevabına adrenalin derişiminin etkisi (Lineweaver- Burk grafiği, 0,1 M pH 5,0 fosfat tamponu, 25 °C, -0,220 V).....	57
Şekil 4.7. Adrenalin biyosensörü için kalibrasyon grafiği a (0,1 M pH 5,0 fosfat tamponu, 25 °C).....	58
Şekil 4.8. Adrenalin biyosensörü için kalibrasyon grafiği b (0,1 M pH 5,0 fosfat tamponu, 25 °C).....	58
Şekil 4.9. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi (0,1 M pH 5,0 fosfat tamponu, 25 °C, -0,220 V).....	59
Şekil 4.10. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi (0,1 M pH 8,0 fosfat tamponu, 25 °C, -0,220 V).....	60
Şekil 4.11. Biyosensörün raf ömrü (0,1 M pH 5,0 fosfat tamponu, 25 °C, -0,220 V)....	61

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Rhus vernicifera bitkisi.....	10
Resim 3.1. Elektrokimyasal deneylerde kullanılan üç elektrotlu hücre sistemi	39



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
$^{\circ}\text{C}$	Derece Celcius
M	Molar derişim
g	Gram
$\%$	Yüzde
K_m	Michaelis-Menten sabiti
I_{maks}	Maksimum hız
$^{\circ}\text{C}$	Derece Celcius
mg	Miligram
s	Saniye
mg	Miligram
mV	Milivolt
μA	Mikroamper

Kısaltmalar

Açıklamalar

BSA	Bovin serum albumin
GA	Gluteraldehit
Lac	Lakkaz
PPy	Polipirol
PVS	Polivinilsülfonat

1. GİRİŞ

Her canlı çevresinde yaşanan değişimleri algılama ve yanıt verme mekanizmalarına sahiptir. Canlılarda bulunan bu mekanizmalar, biyosensörlerin geliştirilmesi için önemli bir temel oluşturur. En genel anlamı ile biyosensörler, analizler için kullanılan biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özelliklerinden faydalanılarak geliştirilen özel cihazlardır. Biyosensörler; "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) tarafından, "kimyasal bir bileşige karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar" olarak tanımlanmıştır. Biyosensörler, biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm sisteminden oluşur. Biyoaktif tabakada, biyomolekül olarak enzimlerin kullanılması ile hazırlanan sensörlere enzim biyosensörleri denir [1,2].

Enzim biyosensörleri klinik, teşhis, tıbbi uygulamalar, proses kontrol, biyoreaktörler, ilaç sanayi, madencilik, savunma sanayi, arıtma ve kontrol teknolojileri gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır [1,2]. Bu zamana kadar değişik formlarda pek çok enzim sensörü geliştirilmiştir. Ancak önemli bir nörotransmitter olan adrenalin tayini için geliştirilen enzim biyosensörleri son zamanlarda önem kazanmaktadır [2,11].

Adrenalin veya bilinen diğer adıyla epinefrin [1-(3,4-dihidroksifenol)-2-metilamino-etanol] büyük organik katyonlar formunda vücut sıvısı ve sinir dokularında bulunmaktadır. Adrenalin iç ve dış stres etkenlerine yanıt olarak salgılanan ve memelilerin merkezi sinir sisteminde bulunan ve hormon olarak işlev gören önemli bir katekolamindir. Adrenalin vücudun akut ve kronik strese adaptasyonunda önemli rol oynar. Böbrek üstü bezlerde ve sempatik sinirlerde sentezlenir [3,9].

Adrenalin, özellikle çizgili kaslarda glikojenin yıkılımını artırır ve glikojen biyosentezini azaltır. Kalp kası üzerine etkilidir ve kalp debisini hızla artırır. Düz kasların tonusunu belirli ölçüde düşürür. Yağ dokuda yağların parçalanmasına ve yağ asitlerinin dolaşıma salınmasına neden olur. Glukagon, tiroksin, kalsitonin, parathormon, renin, eritropoietin ve gastrin salınımını artırır. Ayrıca adrenalin, pankreasta α -reseptörlere bağlanarak insülin salıverilişini direkt olarak inhibe eder [4].

Acil durumlarda bütün organizmayı harekete geçiren adrenalin bütün organlara giden kalp atışını, kalp debisini yüzde yüz oranında arttırabilir. Bu sebeple adrenalinin acil durumlarda özellikle kalp krizi esnasında sıkça kullanılır. Düşük derişimi bile etkilidir.

Ayrıca adrenalin vasokonstriktör şokta, anafilaksi tedavisinde, epilepsi tedavisinde, venom ve besin alerjisi tedavisinde, kalp ritmi bozukluklarında, Parkinson, hiperglisemi, alzheimer ve glaucoma göz rahatsızlığı tedavisi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır [5-10,28].

Genellikle adrenalin tayini yapılırken HPLC, kapiller elektroforezi akış, enjeksiyon, floresans , optik fiber biyosensörü gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Ayrıca değişik sensörlerle uygulanan elektrokimyasal yöntemler kullanılmıştır. Bunlara 2,3-dimercaptosüksinik asit kendiliğinden oluşan tek tabakalı altın elektrot, ozmiyum kompleks ve nasyon çift tabakalı membran modifiye elektrot , cafeik asit modifiyeli camı karbon elektrot, elektrotlar örnek olarak verilebilir. Ancak kullanılan metotlar karmaşık ön hazırlıklar gerektirmektedir. Buna karşın lakkaz enzimi ile hazırlanan amperometrik biyosensörler kolay ve etkili olması açısından umut vadetmektedir [9,11-19,21].

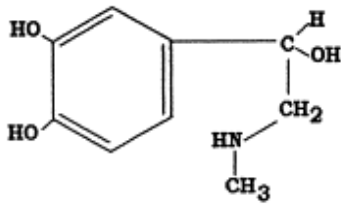
Çoklu-bakır içeren bir protein olan lakkaz, radikal-katalizli reaksiyon mekanizması ile aromatik ve aromatik-olmayan farklı bileşiklerin oksidasyonu için moleküler oksijeni kullanarak suya indirgenmesi sağlar [11].

Bu çalışmada, adrenalin tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Bu amaçla platin elektrot yüzeyinde pirolün polivinilsülfonatlı ortamda elektropolimerleşmesiyle polipirol-polivinilsülfonat filmi elde edildi. Ardından lakkaz enzimi gluteraldehit ile çapraz bağlanarak polimer kaplı platin yüzeye immobilize edildi. Adrenalin biyosensörünün en iyi çalışma koşulları ve performansını etkileyen faktörler belirlendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adrenalin

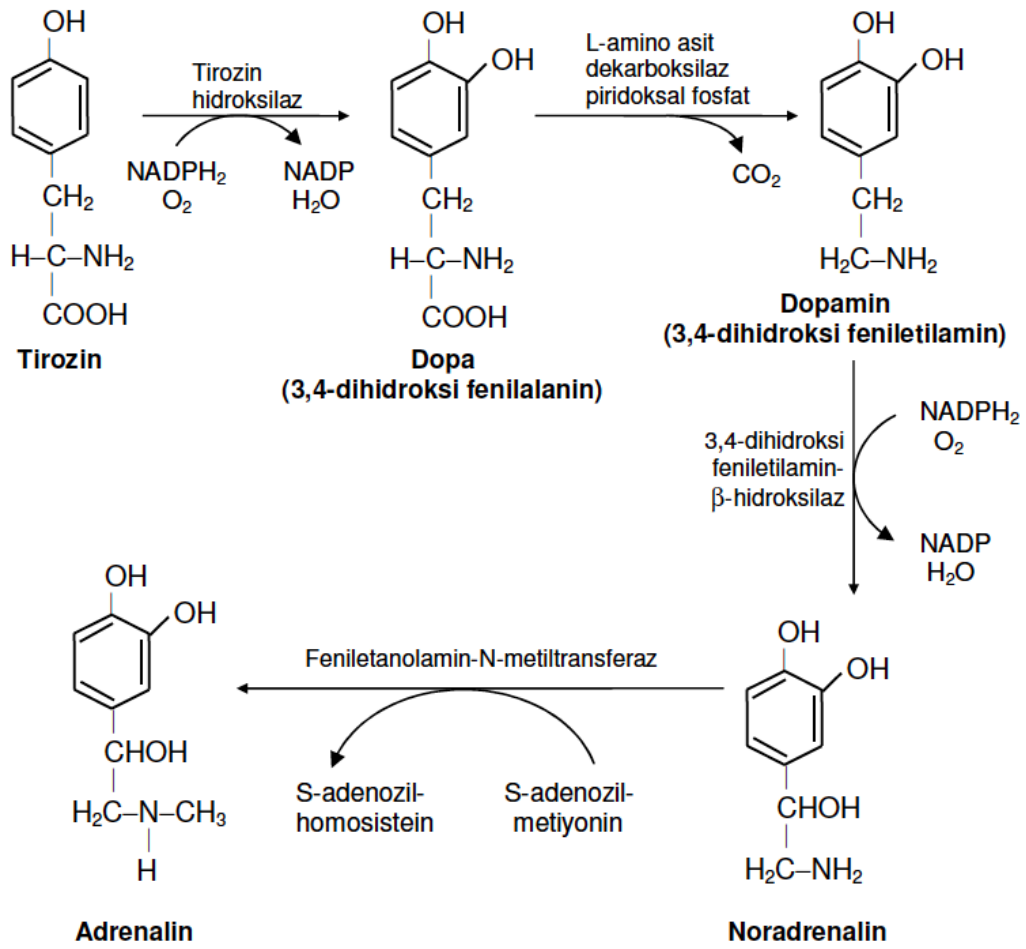
Adrenalin veya bilinen diğer adıyla epinefrin [1-(3,4-dihidroksifenol)-2-metilamino-etanol] büyük organik katyonlar formunda vücut sıvısı ve sinir dokularında bulunur. Adrenalin iç ve dış stres etkenlerine yanıt olarak salgılanan ve memelilerin merkezi sinir sisteminde bulunan önemli bir katekolamindir. Adrenalinin açık formülü şekil 1.1’deki gibidir [4,24].



Şekil 2.1. Adrenalin açık formülü

Kimyasal olarak monoamin yapısına sahip olan adrenalin (epinefrin), noradrenalin (norepinefrin) ve dopamin *katekolaminler* olarak adlandırılırlar. Yaşam için mutlak olarak gerekli olmayan bu bileşikler vücudun akut ve kronik strese adaptasyonunda önemli rol oynarlar. Katekolaminler vücutta hormon ve nörotransmitör olarak fonksiyon görürler. Bu bileşikler böbrek üstü bezlerde ve sempatik sinirlerde sentezlenirler. Böbrek üstü bezlerde katekolaminleri sentezleyen hücreler “*kromaffin hücreler*” olarak adlandırılır. Bu hücreler böbrek üstü bezleri dışında kalp, karaciğer, böbrek, gonadlar, postganglionik simpatik sistemin adrenerjik nöronlarında ve merkezi sinir sisteminde de bulunurlar [23].

Katekolaminlerin sentezlendiği öncül bileşik tirozin amino asididir. Katekolaminlerin sentez mekanizması sentezi yapabilen bütün hücrelerde aynıdır. Şekil 1.2’de gösterildiği gibi sentezin ilk ve başlıca kontrol enzimi olan tirozin hidroksilaz tirozinin DOPA’ya (dihidroksifenil alanin) hidroksilasyonunu katalizler. Norepinefrinden adrenalin biyosentezini katalizleyen feniletanolamin-N-metil transferaz(PNMT) sitoplazmik bir enzimdir [27].



Şekil 2.2. Adrenalin biyosentezi

Adrenalinin keşfi yaklaşık yüz on yıl öncesine dayanmaktadır. 1886 yıllarında Bates böbrek üstü bezlerinden elde edilen zengin karışımı ameliyatlarda ilaç olarak kullandı. Ardından 1954'de Napoleon Cybulski bu karışımdan adrenal salgıları izole etmiş ve nadnerczyna adı verilmiştir. 1900'lü yıllarda Japon kimyager Jokichi Takamine ve asistanı adrenalini keşfetmiştir. 1904 yılında Friedrich Stolz ve Henry Dakin tarafından adrenalin ilk defa laboratuvar ortamında sentezlenmiştir [24].

Adrenalinin en büyük görevi nörotransmitter olarak etki göstermesidir. Adrenalin, diğer endokrin organlar dahil bir çok dokuda β - ve α -adrenoreseptörlere bağlanır ve uyarır. β -adrenoreseptörler çizgili kaslarda ve karaciğerin parankim hücrelerinde bulunurlar. β -adrenerejik uyarılma, cAMP üzerinden hormonal etki oluşturur [5,22].

Adrenalin, β -adrenerjik uyarılma yoluyla çeşitli organlarda farklı etkilerin ortaya çıkmasına neden olur:

- Özellikle çizgili kaslarda glikojenin yıkılımını artırır ve glikojen biyosentezini azaltır.
- Kalp kasını etkiler ve kalp debisini hızla artırır.
- Düz kasların tonusunu belirli ölçüde düşürür.
- Yağ dokuda yağların parçalanmasına ve yağ asitlerinin dolaşıma salıverilmesine neden olur.
- Adrenalin, glukagon, tiroksin, kalsitonin, parathormon, renin, eritropoietin ve gastrin salıverilişini artırır [4,27].

α -adrenoreseptörler ise, başlıca damarların düz kaslarında bulunurlar. α -adrenerjik uyarı, kan basıncının yükselmesine neden olur. Adrenalin, pankreasta α -reseptörlere bağlanarak insülin salıverilişini direkt olarak inhibe eder; ancak fentolamin ile α -adrenerjik etki bloke edildiğinde adrenalin, insülin salıverilişini artırır [4,25].

Adrenalinin Biyolojik reaksiyonları genel olarak şu şekilde sıralanabilir:

- Heyecan hissi
- Göz bebeklerinin büyümesi
- Terleme
- Bronşlarda genişleme
- Kalp çarpıntısı
- Düz kaslarda kasılımda değişim
- Gevşeme rahatlama
- Vücut sıcaklığında artma

Ayrıca acil durumlarda bütün organizmayı harekete geçiren adrenalin bütün organlara giden kalp atışını, kalp debisini yüzde yüz oranında arttırabilir. Bu sebeple adrenalin acil durumlarda özellikle kalp krizi esnasında sıkça kullanılır. Düşük derişimi bile etkilidir [9,10]. Ayrıca adrenalin vasokonstriktör şokta, anafilaksi tedavisinde, epilepsi tedavisinde, kalp ritmi bozukluklarında, Parkinson, venom ve besin alerjisi tedavisinde, hiperglisemi, Alzheimer ve glaucoma göz rahatsızlığı tedavisi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır [5-8,28].

2.2. Enzimler

Biyolojik kataliz olan enzimler ilk defa 1700'leri sonlarında etin mide salgılarıyla sindirilmesi üzerine yapılan çalışmalarda fark edildi ve tanımlandı. 1800'lerde tükürük ve değişik bitki özütleriyle nişastanın şekere dönüştürülmesi çalışmaları ile devam etti. Louis Pasteur 1850'lerde maya tarafından şekerin alkole fermantasyonunun fermentler tarafından katalizlendiği sonucuna vardı. Daha sonra 1897'de Eduard Buchner maya özütlerinin şekeri alkole dönüştürdüğünü buldu. Daha sonra Frederick W. Kuhne, Buchner tarafından keşfedilen bu moleküllere enzim adını verdi [29].

Enzimler bir çoğu protein yapısında olan biyolojik katalizlerdir kısaca biyokatalizörler de denilebilir. Reaksiyonları hızlandıran katalizörler, reaksiyondan ürünlerin oluşmasıyla bozulmadan çıkarlar. Enzimlerin katalitik aktiviteleri protein konformasyonunun bütünlüğüne bağlıdır. Eğer bir enzim onu oluşturan aminoasitlere parçalanırsa katalitik aktivitesi kaybolur. Bu nedenle enzim proteinlerinin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül protein yapıları onların katalitik aktivitelerinin temelidir [29].

Enzimler Çizelge 2.1'de de gösterildiği gibi katalizledikleri tepkimelere göre sınıflandırılırlar. Enzimlerin tümünün resmi E.C. numaraları ve isimleri vardır. Ayrıca çoğu enzimin genel yaygın isimleri de bulunmaktadır [26].

Çizelge 2.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Sınıf No	Sınıf Adı	Katalizlenen tepkimenin Türü
1	Oksidoreduktazlar	Elektronların aktarımı (hibrit iyonları veya H atomları)
2	Transferazlar	Grup aktarım tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri
4	Liyazlar	Grupların çift bağlara katılması veya grupların uzaklaşması ile çift bağ oluşumu
5	İzomerazlar	Molekül içi grupların aktarımı ile izomerik yapıların oluşumu
6	Ligazlar	ATP veya benzeri bileşiklerin katkıları ile gerçekleşen kondensasyon tepkimelerinin ile C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşumu

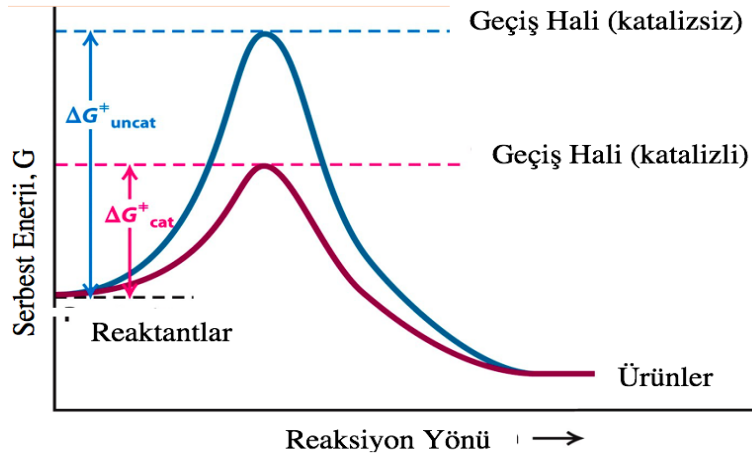
Tepkimelerin enzimatik olarak katalizi canlı sistemler için önemli bir gereksinimdir. Biyolojik şartlar altında katalizlenmeyen tepkimeler, biyolojik moleküllerin çoğu kararlı yapıda olduklarından dolayı yavaş gerçekleşme eğilimindedirler [30]. Bir enzimin verilen bir tepkimenin çok hızlı gerçekleşebildiği özel bir çevre sağlanarak bu problem çözülebilir. Enzimle katalizlenmiş bir tepkimenin ayırt edici özelliği tepkimenin enzim üzerinde bulunan ve aktif bölge olarak adlandırılan kısmın içerisinde gerçekleşmesidir. Aktif bölgeye bağlanan ve enzimin reaksiyon verdiği substrat olarak adlandırılır. Basit bir enzimatik reaksiyon şu şekilde yazılabilir:



Burada E enzimi, S substratı, P ürünü temsil etmektedir; ES enzim-substrat kompleksi, EP enzim-ürün kompleksidir. Enzim-substrat kompleksi, enzim etkisi için temeldir. Aktif merkez için, enzim- substrat bağlanmasını açıklayan iki model ileri sürülmüştür:

- 1) Fisher'in anahtar-kilit modelinde, substrat ve enzimin aktif yerinin birbirine uyacak şekilde önceden belirlenmiş olduğu varsayılır.
- 2) Koshland'ın uyum oluşturma modeline göre aktif merkez esnek yapıdadır; substrat varlığında, proteinin tersiyer yapısında oluşan bir değişiklik, enzim substratını katalize uygun en doğru biçimde bağlayacak biçimsel bir değişikliğe uğrar [31].

Bir kimyasal reaksiyonda belirli bazı maddelerden (substratlar, S) belirli başka bazı maddeler (ürünler, P) oluşur. Geçiş düzeyi kuramına göre, her kimyasal tepkimede, substrat ve ürünler arasında kararsız bir ara ürün oluşumu öngörülür; geçiş durumundaki kararsız bileşik, kararlı temel bileşiklere göre daha çok serbest enerji içerir ve daima daha kararlı bir bileşiğe dönüşmek üzere parçalanır. Bir kimyasal reaksiyonda geçiş durumuna ulaşmak için gerekli enerji aktivasyon enerjisi olarak bilinir. Şekil 2.3' de enzimle ile katalizlenen ve katalizlenmeyen iki reaksiyonun enerji değişimi serbest enerji diyagramında gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Enzimle ile katalizlenen ve katalizlenmeyen iki reaksiyonun enerji değişimi serbest enerji diyagramı

Enzim etkisini açıklamak için substrat ve enzimin fonksiyonel grupları arasındaki kimyasal reaksiyonlar iyice incelenmiştir. Enzimleri enzim olmayan birçok katalizörden ayıran, spesifik enzim-substrat kompleksi (ES) oluşmasıdır [31].

Enzim üzerindeki spesifik amino asit yan zincirleri, metal iyonları, koenzimler gibi fonksiyonel gruplar, substrat ile geçici olarak etkileşebilirler ve reaksiyon için substratı aktive ederler. Enzim üzerindeki, substrat ile etkileşen küçük gruplar, birçok durumda düşük enerjili reaksiyon yolu sağlayarak aktivasyon enerjisini azaltırlar ve bu nedenle reaksiyonu hızlandırırlar.

Daha düşük aktivasyon enerjisi için gerekli enerji, genellikle enzim ve substrat arasındaki zayıf, non-kovalent etkileşimden türer. ES kompleksinde enzim ile substrat arasındaki etkileşime, protein yapısını stabilize eden hidrojen bağları, iyonik bağlar ve hidrofobik Van der Waals etkileşimleri gibi güçler aracı olur. ES kompleksinde her zayıf etkileşimin oluşması, etkileşim için bir stabilite derecesi sağlayan küçük miktarda serbest enerji salınması ile birlikte dir. Enzim-substrat etkileşiminden türeyen bu enerji, bağlanma enerjisi olarak adlandırılır; reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürmek için enzimler vasıtasıyla kullanılan serbest enerjinin ise başlıca kaynağıdır [26,29].

Enzim katalizi için genel bir açıklama sağlayan temel ve birbiriyle ilişkili iki prensip, böylece ortaya çıkar:

1. Enzimlerin katalitik gücü, bir enzim ve substratı arasında meydana gelen etkileşim ve birçok zayıf bağ oluşmasında salıverilen serbest enerjiden (bağlanma enerjisi) türer.
2. Zayıf etkileşimler, reaksiyonun geçiş durumunda optimize edilir; enzimin aktif yeri

substratların kendileri için değil, katalize ettikleri reaksiyonların geçiş durumu için tamamlayıcıdır. 1894’de Emil Fischer, enzimlerin substratlarını bir “kilit-anahtar” gibi birbirlerine uyacak şekilde yapısal olarak tamamlayıcı olduklarını ileri sürmüştür. Enzimatik kataliz için modern görüş, ise ilk kez 1930’da J.B.S.Haldane tarafından ileri sürülmüş ve 1946’da Linus Pauling tarafından işlenmiştir [30].

Bir enzimatik reaksiyonun hızı, enzim etkisiyle zaman birimi başına (1 dakikada veya 1 saniyede) oluşan ürünün veya ürüne dönüşen substratın miktarına göre ifade edilir. Bir enzimin bir doku ekstratı veya biyolojik bir sıvı içindeki miktarını ölçmek için, örnek içinde bulunan enzimin katalize ettiği tepkimenin hızı ölçülür. Ölçülen hız, var olan aktif enzimin miktarıyla doğru orantılıdır. Ancak birçok enzimin saf örnekleri olmadığından veya miktarlarını saptamak zor olduğundan bu enzimlerin miktarları yerine aktivite ünitesi kullanılır. Çeşitli enzimatik reaksiyonların hızlarının farklı olması, ilgili enzimlerin aktivitelerinin veya etkinliklerinin farklı olması ile açıklanır. Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonun hızının, enzim etkisiyle optimal koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir.

Etkinliği veya aktivitesi fazla olan bir enzim, belirli bir sürede daha fazla substrat molekülünü ürün haline dönüştürür. Optimal pH, 25°C sıcaklık ve doymuş substrat derişiminde bir tek enzim molekülü tarafından birim zamanda ürüne dönüştürülen substrat molekülü sayısına, enzime ait *dönüşüm sayısı* denir ve kısaca k_{cat} sembolü ile gösterilir. En çok kullanılan enzim aktivitesi birimi, IU’dur. 1 IU enzim aktivitesi, optimal koşullarda, 1 dakikada 1µmol substratı değiştiren enzim etkinliğini ifade eder. Bu da 1 saniyede 16,67 nmol substratın ürüne dönüştürülmesine anlamına gelmektedir [31].

Enzimlerin spesifikliğı veya özgüllüğü, katalize ettikleri belirli reaksiyonlar ile ilgili özellikleridir. Enzimler için çeşitli spesifiklikler şu şekilde tanımlanmıştır:

1. Mutlak spesifiktik: Bir enzimin, yalnızca spesifik substratın spesifik bir reaksiyonunu katalize etmesi özelliğidir. Enzimlerin çoğı mutlak spesifiktik gösterirler.
2. Grup spesifikliğı: Bir enzimin, benzer fonksiyonel grupları içeren sınırlı sayıda substrat ile reaksiyona özelliğidir. Örneğın glukozidazlar glukozidler üzerine, alkol dehidrojenaz ise alkol üzerine etkilidir.
3. Bağ spesifikliğı: Bir enzimin proteinlerin peptid bağı, karbonhidratların glikozidik bağı

gibi belli bağ tipleri üzerine etkili olması özelliğidir. Kimotripsin, peptit bağlarının hidrolitik parçalanmasında görevli bir enzimdir; etkili olduğu bağlar ise aromatik halkalı amino asitlerin oluşturduğu peptit bağlarıdır.

4. Stereospesifiklik: Bir enzimin yalnızca glukozun D veya L izomerleri gibi belli optik izomere etkili olması özelliğidir. Örneğin maltaz, α glukozidlere etkili fakat β glukozidlere etkili değildir [31].

2.3. Lakkaz Enzimi

Lakkaz enzimleri doğada oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. Lakkaz adı ise ilk kez 1883 yılında bu enzimin tanımlanmış olduğu Japon vernik ağacı (lacquer) olan *Rhus vernicifera*'dan türetilmiştir. Daha sonraları ise şeftali, firavuninciri, tütün ve kavak gibi çok sayıdaki bitkide de lakkaz enzimlerinin varlığı belirlenmiştir [32].



Resim 2.1. *Rhus vernicifera* bitkisi [39]

Lakkaz enzimleri bitkilerin yanı sıra mantarlarda ve bazı bakteri türlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Lakkazların genel olarak karakterizasyonu ve kullanımı kolaydır [36]. Lakkazlar geniş substrat seçiciliğine sahiptirler.

Lakkazlar için K_m değerleri onların organik substratlarına göre oldukça geniştir. Bu aralık

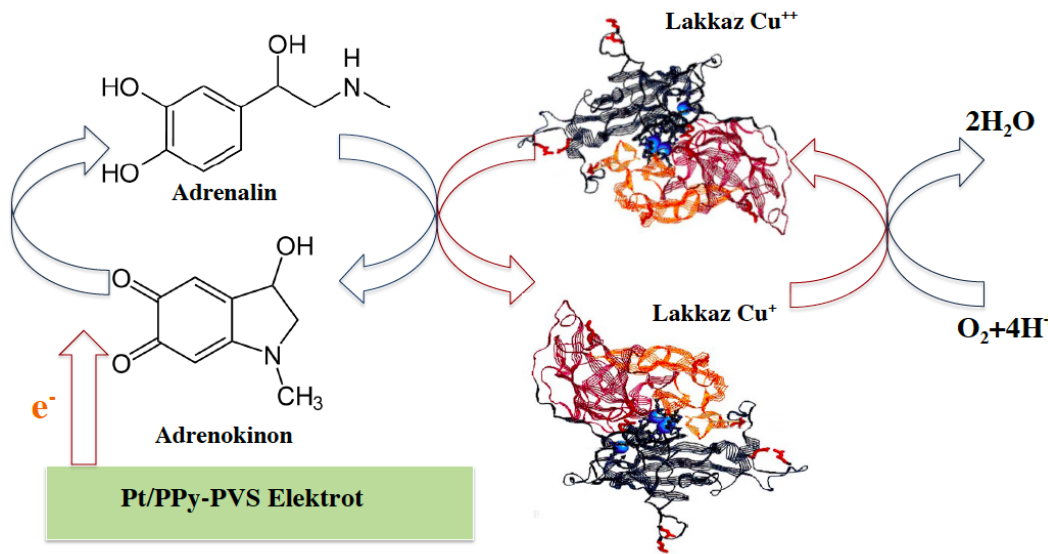
1-10 mM arasında değişmektedir. Lakkaz enziminde elde edildiği kaynağa göre moleküler kütlesi 50–140 kDa arasında değişiklik göstermektedir [32].

Lakkaz enzimleri için önemli bir parametre, bu enzimlerin aktivitelerinin pH'a bağımlı olmasıdır. Fenolik substratlar için lakkaz enzimlerinin pH bağımlılıkları çan eğrisi şeklindedir. Çan eğrisi şeklindeki eğrinin maksimum noktası ise genellikle asidik pH'larda meydana gelmektedir, fakat maksimum aktivitenin pH 9-10 gibi bazik bölgelerde meydana geldiği lakkaz enzimleri de bulunmaktadır. Ayrıca lakkaz enzimleri 70 °C gibi yüksek sıcaklıklarda dahi etkinlik gösterebilmektedir [32].

2.3.1. Lakkaz'ın tepkime mekanizması

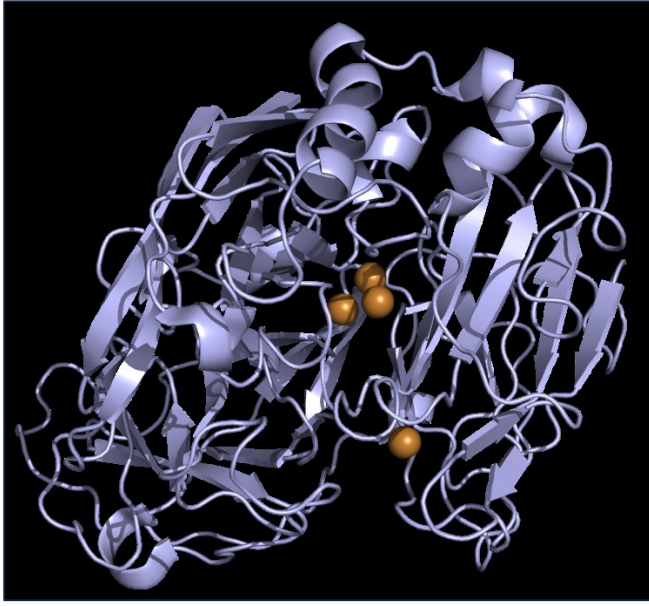
Lakkaz enzimleri düşük substrat özgülükleri ile karakterize edilmekte olup, difenoller, polifenoller, farklı substitüye fenoller, diaminler, aromatik aminler ve hatta iyodin gibi inorganik bileşikler de dahil olmak üzere çok fazla çeşitlilikteki substratları okside etmektedirler. Hatta şiringaldezin gibi metoksi-aktif fenollerin oksidasyonu ise sadece lakkaz enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir [35].

Çoklu-bakır içeren bir protein olan lakkaz, radikal-katalizli reaksiyon mekanizması ile aromatik ve aromatik-olmayan farklı bileşiklerin oksidasyonu için moleküler oksijeni kullanmaktadır. Kullanılan moleküler oksijenin suya indirgenmesi sağlanarak, fenolik bileşiklerin oksidasyonu katalizlenmektedir [35]. Şekil 2.5'de Lakkaz enziminin katalizlediği reaksiyon resmedilmiştir.



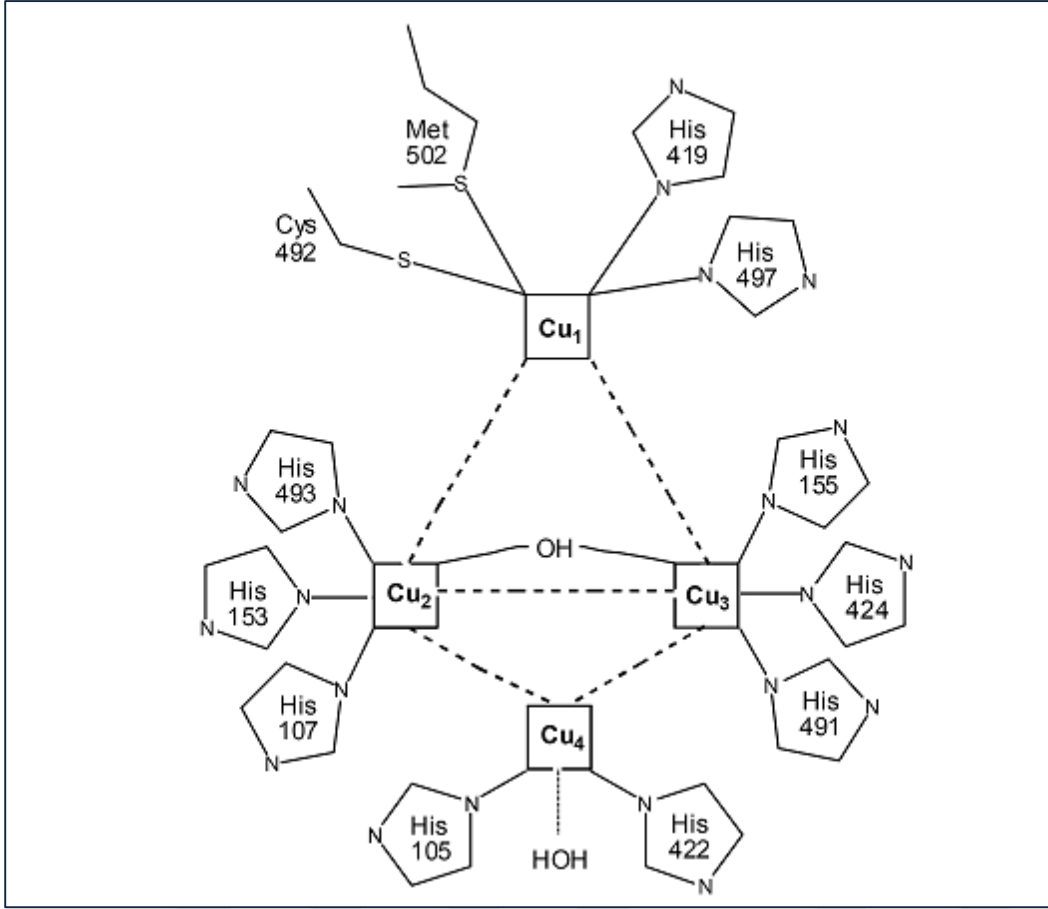
Şekil 2.4. Lakkaz enziminin katalizlediği reaksiyon mekanizması

Lakkaz enzimleri spektroskopik olarak farklı olan 3 tip bakır iyonuna (Tip1, Tip2 ve Tip3) sahip olmaları nedeniyle bu enzimler, çoklu-bakır içeren mavi proteinler sınıfına dâhil edilmektedirler. Bu bakır merkezleri aynı zamanda enzimin aktif merkezleridir ve yüzeye yakın yerlerde bulunur [11]. Lakkaz enzimlerin indüksiyon mekanizmaları, fiziko-kimyasal özellikleri (örneğin, izoelektrik noktaları ve karbonhidrat içerikleri) ve biyokimyasal özellikleri değişse de lakkaz enzimlerinin bakır-bağlama bölgeleri sıkı bir şekilde korunmuştur [35].



Lakkazlar genellikle bir tane T1, bir tane T2 ve iki tane T3 olmak üzere dört tane bakır iyonu içerirler. Bakır molekülleri genellikle histidin, sistein kalıntıları ile koordine bağ yaparlar. T2 ve T3 bakır merkezleri oksijenin suya indirgenmesi sırasında trinükleer bakır kümesi oluştururlar. T1 bakır merkezi indirgenen substratların yükseltgenmesi reaksiyonunu içerir. Bu sırada oluşan elektronlar tekrar T2 ve T3 bakır merkezlerine transfer edilir. Şekil 2.6'da lakkaz ve bakır merkezleri gösterilmiştir [32,35].

Şekil 2.5. Trametes versicolordan elde edilen lakkazın üç boyutlu bakır-bağlama bölgeleri gösterimi [38]



Şekil 2.6. Lakkaz enziminin bakır merkezlerinin gösterilmesi [32]

2.3.2. Lakkaz'ın uygulama alanları

Lakkaz enzimi oldukça fazla uygulama alanı olan bir enzimdir. Organik sentez, renk giderimi, atık su arıtımı, kağıt hamurunun ağartılması gibi daha birçok alanda kullanılmaktadır [33].

Gıdaların veya meşrubatların renklerinin artırılması veya modifiye edilmesi amacıyla lakkaz enzimleri kullanılmaktadır. Bu yolla, meyve sularında, biralarda ve şaraplarda kararmaya, puslanmaya ve bulanıklığa yol açan istenmeyen fenolik bileşiklerin giderilmesi amacıyla lakkazlar kullanılmaktadır. Lakkaz enzimleri, biyopolimerlerin çapraz bağlanmasını sağlaması nedeniyle, hamurun karışma özelliklerini ve hamur ürününün yapısal özelliklerini iyileştirmek amacıyla fırıncılıkta dahi kullanılmaktadırlar [33].

Son yirmi-yirmi beş yıldır, biyoelektrokimya alanında yapılan çalışmalar oldukça yoğunluk kazanmıştır. Biyoelektrokimya alanında kaydedilen ilerlemeler ise analitik kimya uygulamalarına entegre edilmiştir. Lakkazlar, ilave kofaktörlere gerek duymadan elektron transfer reaksiyonlarını katalizleme yeteneğinde olduklarından, çeşitli fenolik bileşiklerin oksijenin veya azidlerin belirlenmesi amacıyla bu enzimlerin biyosensörlerde kullanılmasına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Lakkaz enzimlerine ilişkin olarak biyosensör duyarlılığı üzerine ise enzim tutuklanmasının önemli bir etkisi bulunmaktadır [34].

Lakkaz enzimleri biyo-yakıt hücrelerinin katotlarına tutuklanarak, örneğin küçük transmitter sistemleri için gerekli olan gücü üretmek amacıyla kullanılabilir. Biyo-yakıt hücreleri ise yakıt kullanmadan elektrik enerjisi ürettikleri için ve temiz bir enerji kaynağı sağladığı için, çevresel açıdan oldukça önemlidir.

Sonuç olarak, lakkazlar olağanüstü çok-yönlü enzimler olup, bütün aktivitelerin orijinlendiği temel bir reaksiyonu katalizlemektedirler. Lakkazlar canlıların bütün domainlerinde yayılmış olarak bulunan enzimler olup, bu enzimlerin fizyolojik rollerinin çok daha iyi anlaşılması için daha ileri çalışmaların yapılması ve bu enzimlerin potansiyel biyoteknolojik uygulamalarının daha ileri düzeylerde tanımlanması gerekmektedir [33].

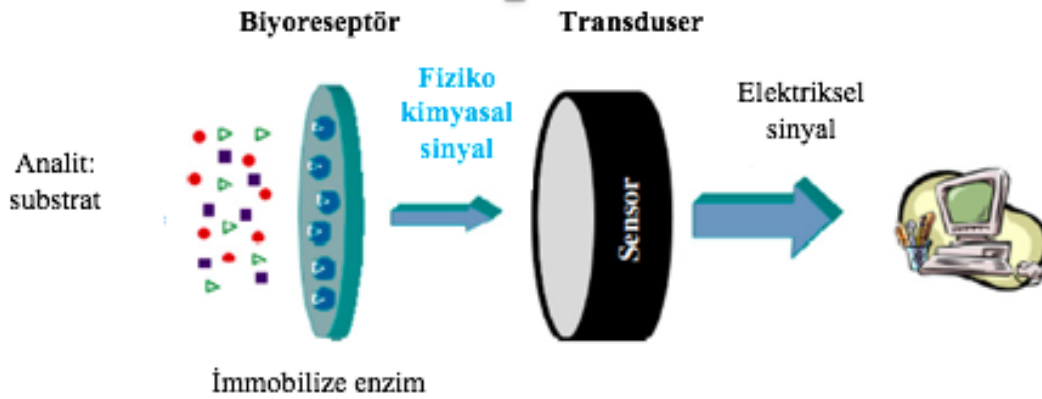
2.4. Biyosensörler

Her canlı çevresinde yaşanan değişimleri algılama ve yanıt verme mekanizmalarına sahiptir. Canlılarda bulunan bu mekanizmalar, biyosensörlerin geliştirilmesi için önemli bir temel oluşturur. En genel anlamı ile biyosensörler, analizler için kullanılan biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özelliklerinden faydalanılarak geliştirilen özel cihazlardır. Biyosensörler; "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC)

tarafından, "kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar" olarak tanımlanmıştır [1,29].

İlk biyosensör uygulamaları 1960 yıllarında tıp alanında başlamıştır. Günümüzde ise biyoteknolojideki köklü değişimin verdiği hız ile birçok alanda biyosensör kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Biyosensörler klinik, teşhis, tıbbi uygulamalar, proses kontrol, biyoreaktörler, ilaç sanayi, madencilik, savunma sanayi, arıtıma ve kontrol teknolojileri gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yine bu konularda yoğun araştırma çalışmaları yapılmaktadır. Hatta son yıllarda görme, işitme, koku gibi algılama mekanizmaları ideal biyosensör olarak görülmekte ve bu mekanizmaların yapay olarak üretilmesi çalışmalarına hızla devam edilmektedir [8,29].

Biyosensörler üç temel bileşenden oluşur, bunlar seçici tanıma mekanizmasına sahip biyomolekül (biyoajan), çevirici (transducer) ve elektrondür. Bir başka deyişle biyosensörler, ölçümü istenen bileşen ile uygun bir biyomolekül arasındaki etkileşimin çeviriciler tarafından elektrik sinyallerine dönüştürüldüğü ve bu sinyallerin elektronik yöntemlerle analit derişimi cinsinden ifade edildiği cihazlardır [29].



Şekil 2.7. Bir biyosensörün genel şematik gösterimi [51]

2.4.1. Biyomoleküller (Biyoajan)

Analizi yapılacak madde ve yapılar genellikle analit olarak adlandırılır. Biyosensör teknolojisinde kullanılan analitlere örnek olarak; metaller, substratlar, aktivatörler, inhibitörler, enzimler, ko-enzimler, hormonlar, antikorlar, antijenler, nükleik asitler, mikroorganizmalar, makro moleküller, virüsler, anorganik ve organik maddeler verilebilir.

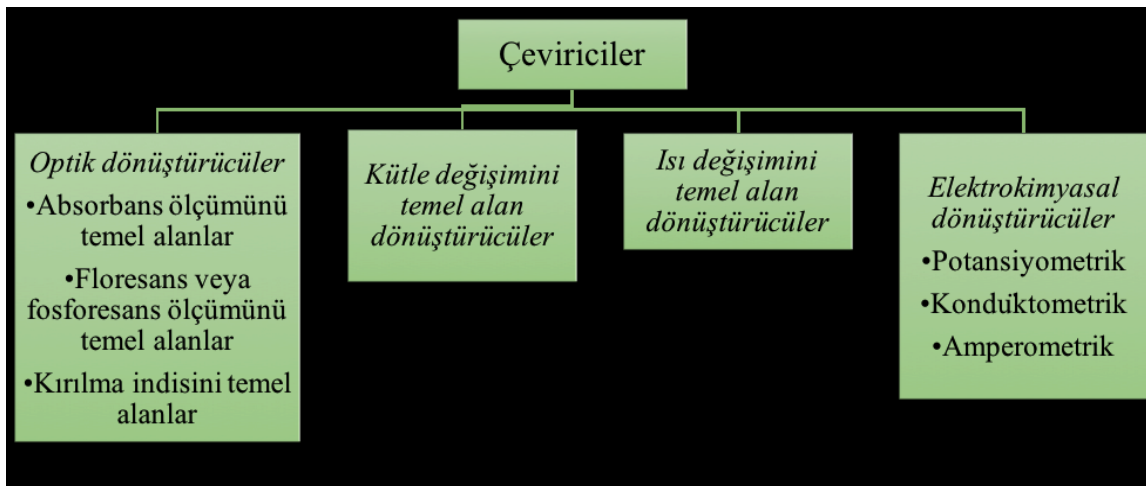
Biyosensörlerde kullanılan analit ile spesifik bir şekilde etkileşime giren biyomoleküller, komplekslik hiyerarşisine göre basitten karmaşığa doğru şu şekilde sınıflandırılabilir; iyonoforlar, antikorlar, enzimler, nükleik asitler, lipozomlar, biyomembranlar (örneğin; membran reseptörleri), hücre organelleri (örneğin; mitokondri), tüm hücreler, doku kesitleri ve homojenatları ve organlar (örneğin; görme organı gibi) [40].



Şekil 2.8. Biyosensörün çalışma prensibi

2.4.2. Çeviriciler (Transduserler)

Biyolojik veya biyokimyasal sinyalleri ölçülebilir fiziksel bir dönüştürebilen sistemlere çevirici denir. Sistemde kullanılan tekniğe göre isimlendirilir [41]. Çeviriciler temelde dört grup altında toplanırlar:



Şekil 2.9. Çeviriciler

2.4.3. Biyosensör uygulamaları

Biyosensörler birçok alanda kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak:

- Tıp: Metabolitlerin ölçülmesi, insülin eksikliği belirtilerinin ölçülmesi, hastane koşullarının gözlenmesi , yapay pankreasın çalışma koşullarının kontrolü vb.
- Endüstri: Endüstriyel proses kontrollerinde gereklidir. Biyoreaktörlerin kontrolü, giren hammadde ve çıkan ürünlerin ölçülmesi, vb.
- Çevresel Denetim: Çevre Koruma Ajansı (ing: EPA (Environmental Protection Agency) EPA tarafından hava ve su düzenli olarak izlenmektedir. Ayrıca yerel idari mercilerin de bölgesel izleme birimleri bulunmaktadır. Bu birimler düzenli olarak hava ve suyu tahlil etmektedirler.
- Savunma (askeri ve sivil): Askeri ve sivil savunma alanında kullanılmak üzere bir çok sensor ve biyosensör dizaynı ve imalatına, son körfez krizi ve 11 Eylül sonrasında hız verilmiştir. Herhangi bir biyoterör ve biyosaldırı sonrası erken tespit ve analiz için çok güçlü ve taşınabilir biyosensörler en elzem cihazlardandır [42,43].

2.4.4. Biyosensör dizaynında dikkat edilmesi gerekenler

Biyosensör tasarımlarında önce biyosensörün hangi analiti tanıyacağı tespit edilmelidir. Sonrasında ise aşağıdaki maddeler dikkate alınarak biyosensörler dizayn edilmelidir. Bunlar sırasıyla;

- Analite uygun biyomolekülün seçimi,
- Biyoreseptörü dönüştürücüye sabitlemede kullanılacak uygun ve verimli immobilizasyon metodunun seçimi,
- Biyoreseptörün analiti tanınmasıyla oluşan kimyasal veya fiziksel sinyali anlaşılabilir sinyal formuna dönüştürecek olan dönüştürücünün seçimi ve dizaynı,
- Ölçüm aralığının, duyarlılığın ve ölçümlerdeki parazitlerin dikkate alınması,
- Cihazın kompakt bir hale dönüştürülmesi,

olarak sıralanabilir. Tüm bunları yapmak için ise bir çok alanda geniş bir bilgi birikimine ihtiyaç vardır. Mesela, birinci şık için biyokimya ve biyoloji, ikinci ve üçüncü için kimya, elektrokimya ve fizik ve dördüncü için kinetik ve kütle transferi alanları bunlardan bazılarıdır. Modern imalat teknolojileri ve stratejileri sayesinde çok daha az maliyetle biyosensör üretimi mümkün olmaktadır. Tasarıdan imalata tüm bu basamaklarda çoklu-disiplinlerin bir arada çalışması son derece önemlidir [41,42].

2.5. Enzim Sensörleri

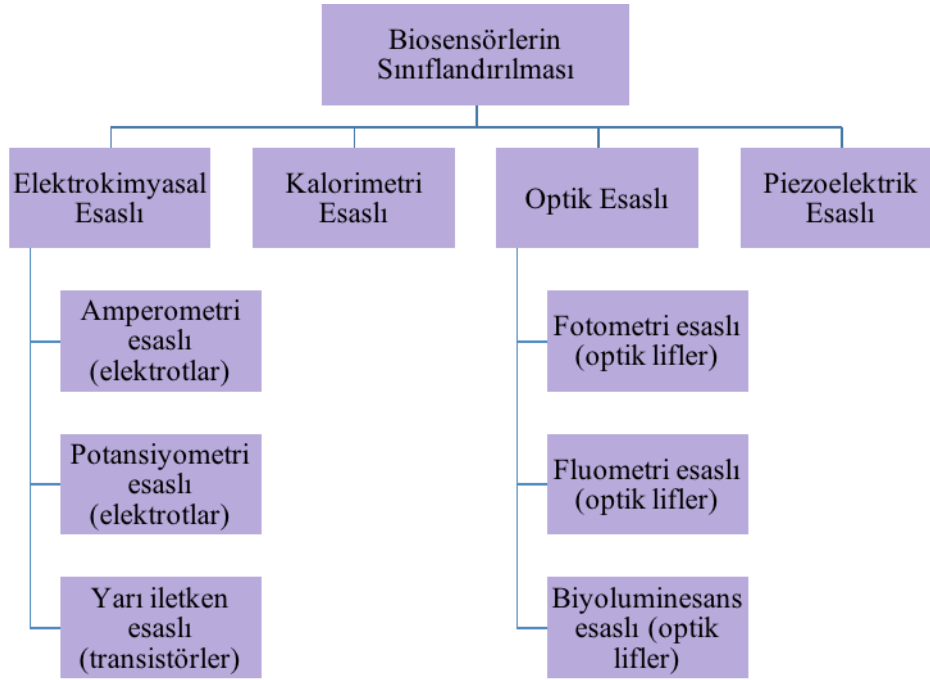
En genel anlamda bakıldığında bir biyosensör biyobileşen, dönüştürücü ve ölçüm sisteminden oluşmaktadır. Enzim sensörlerini diğer biyosensörlerden ayıran tek fark biyoaktif tabakada biyobileşen olarak enzimlerin kullanılmasıdır.

Enzimler, biyolojik yapılardaki reaksiyonların ılımlı şartlarda gerçekleşmesine imkan sağlayan ve bu reaksiyonları düzenleyen genel olarak protein yapılı yaygın olarak kullanılan biyokatalizörlerdir. Enzimler canlı sistemlerdeki önemli biyolojik reaksiyonları katalizleyen protein yapısındaki makro spesifik moleküllerdir. Enzimler katalizledikleri reaksiyonlar için çok duyarlıdırlar. 10^{-8} M ve daha düşük derişimlerde bile katalizör görevi yapabilirler [35].

Bir enzim elektrotunda enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği tepkimeye uygun bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir iletilci ile birleştirilmektedir. İletim sistemi biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan ürünün miktarındaki artışı tespit edebilecek şekilde seçilmelidir. Biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka iletilci ara yüzeyindeki derişimlerin hızlı bir şekilde dengeye ulaşabilmesi için difüzyon engelini en aza indirmek amacıyla biyoaktif tabaka kalınlığının mümkün olduğunca ince olması gerekmektedir. Bunun yanı sıra biyoaktif tabakada sabit bir substrat derişimi sağlayabilmek için ölçme çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması gerekmektedir. İletici sistemin ölçme sistemine gönderdiği sinyal biyoaktif tabaka ile iletilci ara yüzeyindeki derişimlerdeki değişikliğe bağlıdır. Ancak söz konusu derişimler denge halinde ölçme çözeltisindeki derişimlerLE orantılı olduğu için çoğu zaman

kalibrasyon grafiği çizilerek sonuca varılır [44,47].

Enzim sensörlerinin sınıflandırılması en yaygın şekilde, enzimatik reaksiyon uyarınca oluşan sinyalin ölçüm yöntemine göre yapılmaktadır. Bu sınıflandırma çizelge 2.10' da verilmiştir;



Şekil 2.10. Enzimlerinin biosensörlerinin sınıflandırılması [44]

2.6. Elektrokimyasal Esaslı Biyosensörler

2.6.1. Amperometrik sensörler

Bir mikro çalışma elektrodu ile bir karşıt elektrot arasına dışardan denge geriliminden farklı bir gerilim uygulanırsa, sistem yeniden dengeye ulaşmaya çalışır ve bu sırada bir elektrot tepkimesi olur yani iki elektrot arasında bir akım geçer. Bu yöntem amperometri adı verilir. Çalışma elektrodunda indirgenen veya yükseltgenen madde bir katyon, bir anyon veya yüksüz bir bileşik olabilir [46].

Amperometrik ölçümlere dayanan sensörler giderek önem kazanmaktadır. Bu tür sensörlerin öncüsü ve en çok kullanılanı oksijen elektrodudur. Clark oksijen sensörü olarak

da bilinen bu sistemde altın, gümüş veya platin katot, silikon ve teflondan yapılmış bir gaz geçirgen membran ile kaplıdır. Bu katot ile aynı zamanda bir karşılaştırma elektrodu olan bir gümüş anot arasına 1.5 Voltluk bir pil bağlanır ve iki elektrot arasından geçen akım bunların arasına yerleştirilen bir mikroampermetre ile ölçülür. Bu elektrot sisteminin daldırıldığı çözeltilerde çözünmüş olan oksijen membrandan geçer ve katoda ulaşır ve uygulanan gerilimde indirgenir [46].

2.6.2. Potansiyometrik sensörler

Bir karşılaştırma elektrodu ve uygun bir çalışma elektrodu ile oluşturulan bir elektrokimyasal hücrede ölçülen gerilim değerleri yardımı ile hücre çözeltisindeki türlerin nicel analizine potansiyometri denir. Çalışma elektrodu, çözeltideki türlerden bazılarında seçicilik gösteren ve iç kısmında bir başka karşılaştırma elektrodu ile nicel analizi yapılacak türün belli derişimdeki çözeltisi bulunan ve bir membran ile analizi yapılacak çözeltiden ayrılmış bir elektrotur. Analizi yapılacak çözeltiye daldırılan bu elektrot ile aynı çözeltiyle temasta olan bir karşılaştırma elektrodu arasında oluşan gerilim değeri ile analizi yapılan türün derişimi arasında logaritmik ilişki vardır. Bu hücre geriliminin ölçümü sırasında iki elektrot arasında uygun bir devre yardımıyla bir akımın geçmemesi sağlanır. İçte ve dışta bulunan çözeltilerde analizi yapılacak türün derişimi açısından bir fark varsa membranın iç yüzeyi ve dış yüzeyi arasında bir gerilim farkı oluşur. Bu gerilim farkının değeri analizi yapılan türe ve derişimine bağlı olduğu gibi, membranın cinsine ve çözeltide bulunan öteki bileşenlerin cins ve miktarlarına da bağlıdır [48].

2.6.3. Yarı iletkenlik sensörleri

Elektriksel alanın varlığında bir çözeltide elektrik yükü, iyonlar tarafından taşınır. Çözeltinin iletkenliği çözeltideki tüm iyonik türlerin katkısı ile oluşur. İki elektrot arasına bir alternatif akım uygulandığında düşük frekanslarda yük taşınımı iyonların elektriksel alandaki göçü ile taşınırken, yüksek frekanslarda çözücünün polarlanması nedeni ile yük taşınımına çözücünün de katkısı olur. İki elektrot arasına alternatif sinyalin uygulanması elektrotlarda elektrolizle olabilecek madde kaybını en aza indirmek içindir. İletkenlik sensörlerinin bir örneği oksijen sensörüdür. Suda çözünmüş O_2 miktarı, bu molekülün metal ile oluşturduğu iyonlar nedeni ile artan iletkenliğin ölçülmesi ile bulunur [48].

2.7. Enzim Sensörlerinin Performans Faktörleri

Biyosensörler sekiz parametreye göre nitelendirilirler:

Duyarlılık: Cihazın analitteki değişime birebir cevap vermesi demektir.

Seçicilik: Cihazın sadece analite özgünlüğünü gösterir. Cihaz başka reaktiflere ilgi göstermez ve hatalı sonuç vermez.

Ölçüm Aralığı: Cihazın ölçebildiği analit derişim aralığıdır. Analit belli bir derişiminden az veya çoksa cihaz iyi bir duyarlılıkta sonuç vermeyebilir.

Ölçüm Süresi: Analit derişimindeki bir basamak değişime karşı cihazın vereceği nihai yanıtın sadece %63'lük kısmını ölçmek için gösterdiği ölçüm süresidir.

Tekrarlanabilirlik: Cihazın sonuçlarındaki tutarlılığı ifade eder.

Tespit Sınırı: Cihazın tespit edebileceği en düşük analit derişimini ifade eder.

Ömrü: Cihazın, performansında gözle görülür bir azalma olup olmadığını ifade eder.

Kararlılık: Belirli bir süre içinde cihazın duyarlılığındaki veya baz çizgisinde değişimleri dikkate alan bir kalite ölçüm değeridir [42].

2.7.1 Kararlılık

Kararlılık, biyosensörün kullanım ömrü hakkında bilgi verir. Aynı bir sensör ile çok sayıda ölçüm yapılabilmesi, iş gücü ve maliyet açısından çok önemli avantajlar sağlar. Biyosensörün ömrü, onların saklanma ve çalışma koşullarına bağlıdır. Hibrit bir yapıya sahip olmaları nedeniyle enzim sensörlerini, hem sensör hem de enzim kararlılığı açısından değerlendirmek gerekir. Amperometrik sensörlerde özellikle yüksek potansiyelde çalışıldığında, reaksiyon ürünleri tarafından yüzeyin bozulması problemi ile karşılaşılabilir.

Enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi enzim sensörünün kararlılığını önemli ölçüde etkilemektedir. Saflık düzeyi ile kararlılık arasında doğrusal bir ilişki yoktur. Safsızlığın artması durumunda ise ilgilenilen enzimatik reaksiyonla girişim

yapacak türler arası olumsuz reaksiyonların olabileceği düşünülmelidir. Hazırlanan bir biyosensör ile rutin uygulamaya geçmeden önce çalışma ve depolama kararlılığının spesifik olarak belirlenmesi gereklidir [44].

2.7.2. Duyarlılık

Kalibrasyon grafiğinde substrat derişimi ile sensör yanıtı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu bölgeye “doğrusal aralık” denir. Hazırlanan elektroda immobilize edilmiş olan enzim; sadece belirli maddelere (substratlara) karşı duyarlı olmalıdır. Duyarlılık, akım-derişim eğrisinin eğimi ile orantılıdır. Eğim değeri büyüdükçe duyarlılıkta da artış gözlenir. Kullanılan enzimin substratları dışında biyosensörlerin girişim yapan maddelerden etkilenmemesi istenir.

Potansiyometrik enzim sensörlerinde kalibrasyon grafiği, ürün derişiminin logaritması ile potansiyel arasında çizilir. Amperometrik esaslı enzim sensörlerinde ise ürün derişimi ile akım arasında doğrusal grafikler elde edilir. Biyosensör yanıtını etkileyen parametrelerin sensör kalibrasyonunu etkileyeceği unutulmamalıdır. Örneğin sıcaklık, optimum koşuldan uzaklaştığında enzim sensörünün yanıtı olumsuz yönde etkilerken, bazı kimyasal türlerin difüzyon hızlarının sıcaklıkla artması enzim sensörü yanıtında artışa sebep olur. Aynı analit derişime karşılık ne kadar büyük yanıt elde edilirse duyarlılığın o kadar iyi olduğu söylenir.

2.7.3. Seçicilik

Diğer analiz sistemleri ile kıyaslandığında biyosensörler için en önemli özelliktir. Enzimler, spesifik enzimler hariç seçicilik sırasında antikor ve nükleik asitlerden sonra gelmektedir. Seçiciliği etkileyen bazı parametreler vardır. Bunlar; sensörle girişimler, biyokatalizörle girişimler ve pH'dır. Sensörde meydana gelebilecek girişimleri önlemenin en iyi yolu örnekteki diğer maddelere yanıt vermeyen, sadece ilgili reaksiyonu izleyebilecek bir sensör kullanmaktır. Amperometrik sensörler sabit bir potansiyelde çalışmalarına rağmen potansiyometrik olanlara nazaran daha spesiftir.

2.7.4. Ölçüm süresi

Bir biyosensör ile pratik bir işlem sonucunda kısa sürede sonuç alınabilmesi biyosensörlerin yaygınlaşmasını sağlamıştır. Bir biyosensörün ölçüm süresini aşağıda

belirtilen üç aşama etkilemektedir;

- Substratın analiz ortamından membran yüzeyine difüzyon hızı
- Substratın membran içine difüzyon hızı ve biyokatalizörün aktif merkezi ile ne kadar hızlı reaksiyon verdiği
- Elde edilen ürünün sensör yüzeyine ne kadar hızlı difüzyon hızıdır.

Çözeltinin karıştırılma hızı, substrat derişimi, enzim derişimi, pH, sıcaklık ve sensör yüzeyinde herhangi bir membranın kullanılıp kullanılmadığı ve kullanılıyorsa membranın niteliği ile kalınlığı ve morfolojisi yanıt süresini etkileyen başlıca unsurlardır.

2.7.5. Tekrarlanabilirlik

Enzim aktivitesi, kararlılığı ve saflık düzeyi hazırlanacak olan enzim sensörü ile tekrarlanabilir sonuçlar alınmasında oldukça önemlidir. En basit anlamıyla tekrarlanabilirlik, aynı örnekte art arda ölçüm yapılması ile elde edilen değerlerden sapma ve korelasyon katsayısının hesaplanmasıyla ifade edilir.

2.7.6. Ölçüm sınırı

Tasarlanan biyosensörün ideal tanımına uyması için tayin sınırının belirli bir derişim değerinin altında olması gerekmektedir. Genelde ölçüm sınırının 10^{-5} M'dan daha düşük olması istenir. Belirtilen bu tayin sınırı elektrot yüzeyinin büyüklüğü, enzimin tayin edilecek maddeye karşı olan afinitesi, immobilize edilen enzim miktarı, enzimin immobilizasyonunda kullanılan polimer tabakasının kalınlığı gibi faktörlerden etkilenir.

2.7.7. Ölçüm aralığı

Ölçüm aralığı denen bölge, biyosensörden alınan akım-derişim eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır. Tüm biyosensör uygulamalarında çalışma ortamında belirli bir derişim değerine ulaşıldıktan sonra akım-derişim eğrilerinde lineerlikten sapma gözlenir. Bu durum enzimatik eğrilerin en önemli ve de karakteristik özelliğidir. Lineerlikten sapmanın

nedeni enzimin substrata doymasından kaynaklanır.

2.7.8. Ömrü

Biyolojik çevirici olarak enzim kullanıldığı durumlarda enzim aktivitesindeki azalma kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktördür. Enzimin yaşam süresi, biyosensörün kullanım ömrü yanı sıra kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi parametreleri de etkilemektedir [44,35].

2.8. İletken Polimerler

Polimerler, ilk kullanımlarından bu yana elektriksel yalıtkanlığı iyi maddeler olarak bilinirler. Bu özelliklerinden dolayı elektriksel yalıtkanlığın arandığı, kabloların kılıflanması gibi alanlarda önemli kullanım yerleri bulmuşlardır. Kolay işlenmeleri esnek olmaları, estetik görüntüleri, hafiflikleri, ve kimyasal açıdan inert olmaları diğer bazı üstün özellikleridir. Metaller ise; elektriksel iletkenliği yüksek, üstün mekaniksel özelliklere sahip bir başka madde grubudur. Ancak metaller polimerlerden ağır ve pahalıdır. Ayrıca polimerler gibi kolayca şekillendirilemezler. Korozyon metaller için önemli bir başka sorundur [45].

Metallerin elektriksel iletkenliği ve mekaniksel özelliklerini, polimerlerin özellikleri ile birleştirerek bir tek malzemede toplayabilmek her zaman ilgi çeken bir araştırma olmuştur. Bu amaçla yapılan ilk yaklaşımlar, uygun iletken maddelerle karışımının hazırlanmasına yöneliktir. Denenen yollardan birisi polimerlere metal tozları gibi parçacıkların katılmasına ve iletkenliğin polimer örgüsüne sokulan metal faz üzerinden sağlanması olmuştur. Polimer içerisinde uygun bir tuz çözüp iyonik iletkenlikten yararlanmak bir başka yaklaşımdır. Her iki yöntemde de polimer, iletkenliği sağlayan parçacıklar için bir bağlayıcı faz olarak işlev yapar ve kendisi elektrik iletimine katılmaz. Sözü edilen yöntemlerle polimerlere ancak belli düzeyde iletkenlik kazandırılabilir [45].

Yukarıda değinilen iki yaklaşımda da polimerlerin kendisi yalıtkanlık özelliğini korur ve yalnız iletkenliği sağlayan faz için taşıyıcı görevi yapar. Bir polimerin kendisinin doğrudan

elektriği elektronlar üzerinden iletebileceği ilk kez poliasetilen üzerinde yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır.

Poliasetilen, uzun yıllardır iletken olmadığı bilinen ve normalde siyah toz halinde bulunan bir polimerdir. H. Shirakawa, 1974'te, Ziegler-Natta katalizörü kullanarak metalik görüntüde ancak yeterince iletken olmayan gümüş renginde poliasetilen filmler hazırlamıştır. 1977 yılında H. Shirakawa, A.J. Hegeer ve A.G. MacDiarmid sözü edilen poliasetilen filmlerin iyot, flor veya klor buharına tutularak yükseltgendiğinde, iletkenliğin 10^9 kat artarak gümüş ve bakırın iletkenliğine yakın bir iletkenlik sergilemiştir. Shirakawa, Hegeer ve MacDiarmid bu çalışmalarından dolayı 2000 yılı Kimya Nobel Ödülünü almışlardır [45].

Günümüzde polipirol, polianilin, politiyofen, polifuran gibi çok sayıda polimerin iletken olduğu bilinmektedir. Bazılarının toz, süspansiyon, film veya levhalar halinde ticari üretimi yapılmaktadır. Ana bileşeni polipirol olan lifler, polipirol ve polianilin kaplı karbon tozları, polipirol kaplı lifler diğer ticari ürünlere örnektir. İletken polimerler içerisinde polipirol ve polianilin özel bir yeri vardır ve bu iki polimer organik metal olarak adlandırılır [45,49].

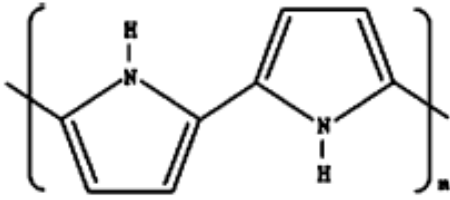
Analitik kimya ve biyosensör alanlarında iletken polimerler ile çalışan pek çok araştırmacı vardır. Yeni ve ilginç özellikler sunan bu maddelerle yaygın olarak kullanılan elektronların yüzey modifikasyonları için farklı imkanlar oluşmakta ve elektrokataliz, membran ayırmaları ve kromatografi alanlarında uygulanmaktadır. Aynı zamanda kimyasal ve biyokimyasal sensor üretiminde de yeni teknolojik imkanlar oluşmaktadır [45,49]

2.8.1. Pirol

1937 yılında Pratsi, pirolü kimyasal olarak yükseltgeyerek siyah renkli bir bileşik elde etmiştir. Yapısını aydınlatamadığı bu bileşiğe pirol siyahı adını vermiştir. 1968 yılında Dall'olio sülfürik asit ortamında ilk defa elektrokimyasal yolla, pirolü yükseltgeyerek 8 S/cm iletkenliğe sahip polipirol (PPy) elde etmiştir. 1979 yılında Diaz ve arkadaşları tetraetilamonyumtetrafloroborat destek elektrolit içerisinde %1'lik sulu asetonitril

çözeltisinde pirolü yükseltgeyerek iletkenliği 10-100 S/cm arasında değişen iletken PPy filmi elde etmişlerdir. Bu çalışmadan sonra pirolün polimerleşme koşullarının optimizasyonu için birçok çalışma yapılmıştır. Elektrolit anyonları, elektrolit çözücüler, çözeltinin pH'sı, polimerizasyon sıcaklığı, potansiyel-akım miktarları gibi birçok parametrenin optimizasyonu için hala çalışmalar devam etmektedir [49].

Pirol kaynama noktası 130°C, yoğunluğu 0,948 g/mL olan kokulu renksiz bir sıvıdır. Mineral asitleri ile çabucak polimerleşir. Pirol aromatik bileşiktir ve deneysel rezonans enerjisi 22-27 kcal/mol'dür [49].



Şekil 2.11. Pirol

Önemli

iletkenlerden olan polipirol kimyasal veya elektrokimyasal yol ile sentezlenebilir. Kimyasal yöntemde, örneğin Fe^{+3} gibi bir yükseltgen kullanılırsa, toz halinde polipirol elde edilir.

Erimez ve çözünmez olduğu için kimyasal yöntemlerle elde edilen toz halindeki polipirolün işlenmesi söz konusu değildir, presleme gibi yöntemlerle ancak belli şekillere sokulabilir. Polipirol filmler, *elektrokimyasal polimerizasyonu* ile hazırlanır. Levha ya da tambur şeklindeki elektrotlar kullanılarak farklı boyutlarda ya da sürekli polipirol filmler elde edilir. Polipirol filmlerin mekanik özellikleri diğer iletken polimerlerden daha iyidir ve atmosfer koşullarında daha karalıdır [45].

2.8.2. Pirolün Elektrokimyasal Polimerizasyonu

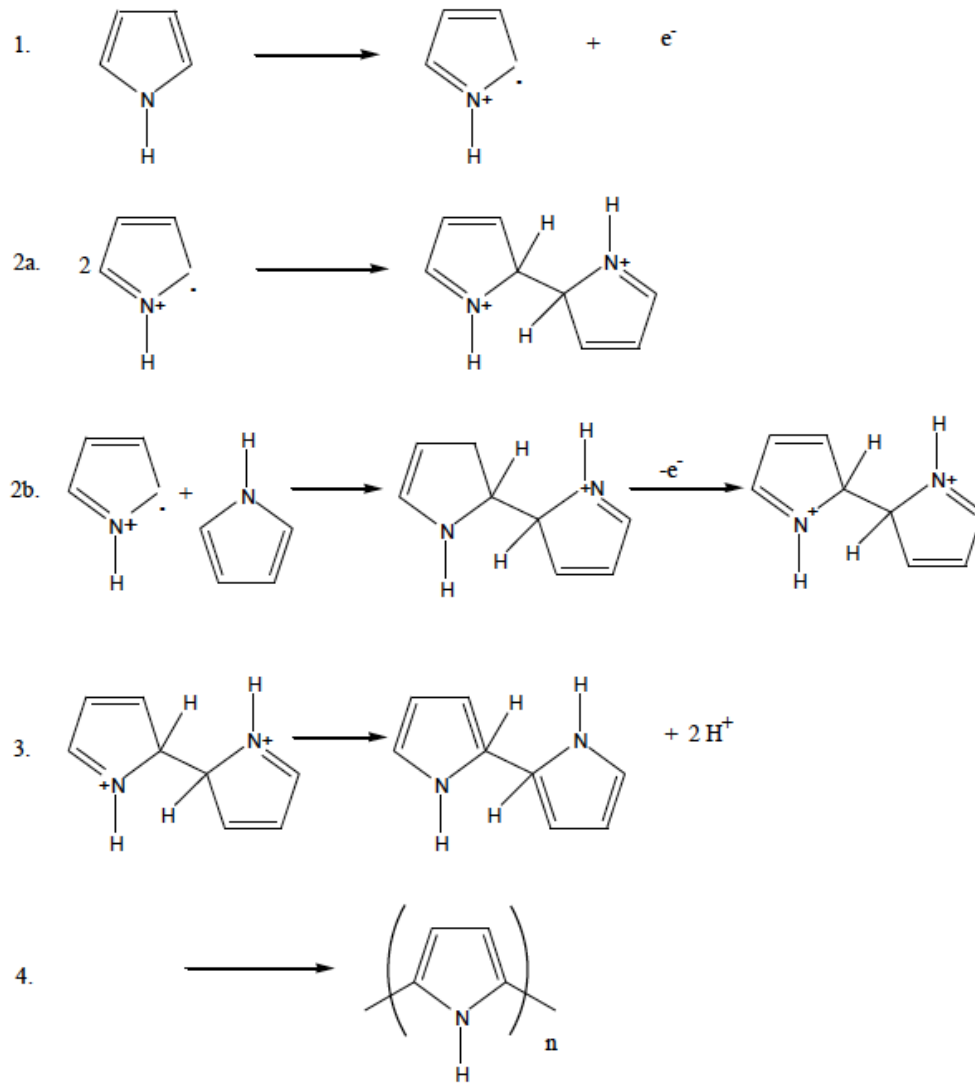
İletken polipirol filmlerinin oluşumu anodik olarak asetonitrilin yükseltgenmesiyle ilk olarak Diaz tarafından yapılmıştır. Çözücü, elektrolit, fonksiyonel gruplar, elektrot potansiyeli, ve diğer özelliklerin değiştirilmesiyle literatürde oldukça fazla miktarda çalışma bilinmektedir. Fakat polimerizasyon mekanizmasını anlamak uzun sürmüştür [50].

Elektrokimyasal sentez, basitliği ve yeniden üretilirliğinden dolayı, elektrik iletken polimerlerin sentezi için hızla genel bir metot olarak kabul görmeye başlamıştır. Elektrokimyasal sentezin oda sıcaklığında gerçekleşebilmesi de onun önemli bir avantajıdır. Hem potansiyel hem de akım zamanla değiştirilerek film kalınlığı da kontrol edilebilir. İletken polimerlerin elektrokimyasal polimerizasyonu genellikle şu metotlarla yapılır: Akıma karşı (galvanostatik), potansiyele karşı (potansiyostatik) ya da potansiyel taraması [49].

Çalışma elektrotu, referans elektrot ve karşıt elektrottan oluşan standart üçlü elektrot sistemi ile genellikle en iyi filmler elde edilmektedir. Elektrokimyasal sentez homojen bir monomerle yapılabildiği gibi, kopolimerizasyonla da yapılabilmektedir.

Polipirol filmler elektrokimyasal olarak pirolün sulu veya susuz çözeltilerinde ve anodik yükseltgenme ile elde edilir. Şekil 2.12' de verilen pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu, bir elektronun serbest bırakılmasıyla, monomerin yükseltgenmesini içerir. Pirolün yükseltgenmesiyle iki radikal katyon birleşerek dimer oluşturur. Radikal katyonun dimerizasyonu, pirol halkasının 2,5- pozisyonundan 2 hidrojen iyonunun ayrılmasıyla olur. Dimer, monomerden daha düşük yarı-dalga potansiyeline sahiptir. Bu yüzden, dimerin ileri yükseltgenmesi tercih edilir.

Polipirolün ileri yükseltgenmesiyle pirol halkasında kısmi pozitif yük oluşur. Bunun sonucunda, polimer, nötral yükleri korumak için anyonik yüklerle birleşir. Bu mekanizma polimerleşme duruncaya kadar tekrarlanır [49].



Şekil 2.12. Prolün elektrokimyasal yükseltgenme ile polimerleşme mekanizması[49]

2.9. Biyobileşen İmmobilizasyonu

Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleşir. Katalizör olarak kullanılan ve suda çözünen serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanmak veya reaksiyonu kontrol altında tutmak çok zordur. Reaksiyonun kontrol etmek için istenildiği an inhibitör

kullanılabilir. Fakat serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olur. Oluşacak ürünlerin bu kirliliklerden arındırılmasının maliyeti daha yüksektir. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimin reaksiyon ortamından ayrılması ve yeniden kullanılması mümkün değildir. Bu durum çok iyi bir katalizör olan enzimler için maliyeti artıran önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimlerin devamlı üretim sistemlerinde kullanılması da mümkün değildir. Bu sorunlardan ötürü enzimi suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlamak oldukça önemlidir. Enzimler farklı ve uygun yöntemlerle uygun taşıyıcılara bağlanabilir. Bu işleme *immobilizasyon* denir [51].

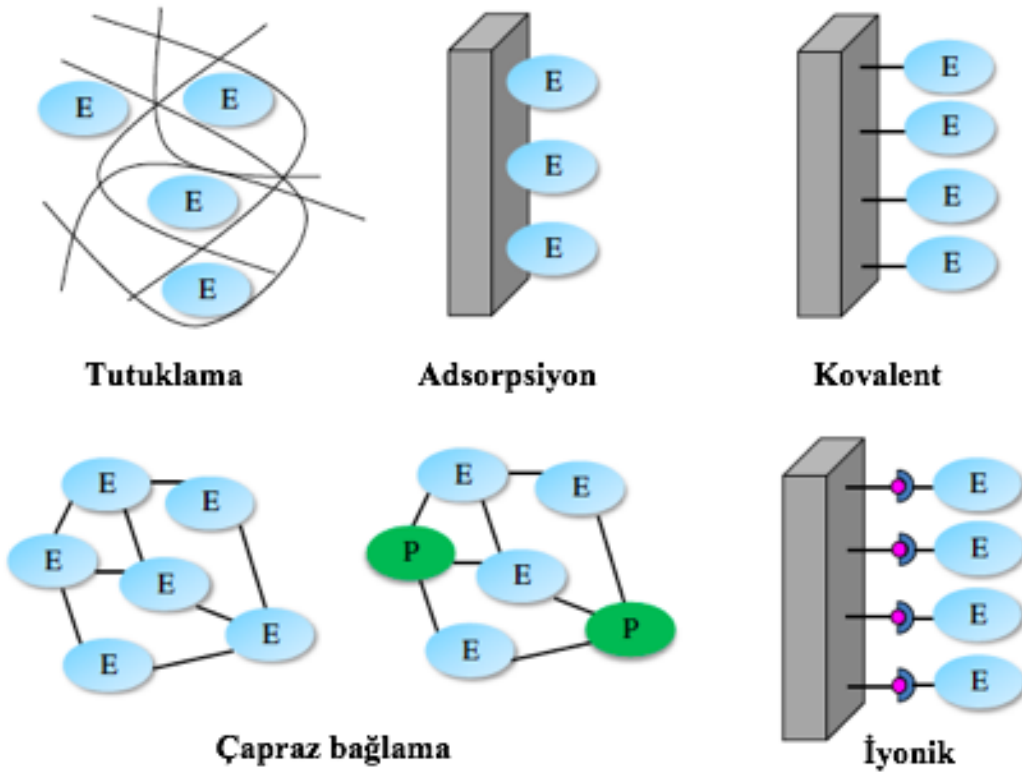
İmmobilizasyon, enzim teknolojisinin en eski ve pratik tekniklerinden birisidir. İmmobilize enzimler ve bunların uygulamaları sürekli gelişerek devam etmektedir. Bu enzimler klinik alanında, gıda sanayisinde ve endüstriyel alanda değişik ve kesikli uygulamalarda kullanılmaktadır. Enzimlerin katalitik potansiyellerinden maksimum şekilde faydalanmak için uygun immobilizasyon yönteminin belirlenerek şartların optimize edilmesi gerekir. İmmobilize enzimler serbest enzimlere göre daha kullanışlı ve avantajlıdır. Çizelge 2.2' de immobilize enzimlerin üstünlükleri verilmiştir [35].

Çizelge 2.2. İmmobilize enzimlerinin üstünlükleri

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri:

- ✓ Reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilirler ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem oluşturmaz.
- ✓ Sıcaklık, pH gibi çevre koşullarına karşı dayanıklıdırlar.
- ✓ Sürekli işlemlere uygulanabilirler.
- ✓ Doğal enzime kıyasla daha karalıdırlar.
- ✓ Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- ✓ Bir birini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- ✓ Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterir.
- ✓ Mekanik çalışmalar için uygundur.
- ✓ Otomatik işlemlere imkan verir.
- ✓ Ekonomiktir ve üretim kaybı azdır.

Bağlama işleminde çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen dönüştürücü ve enzime göre belirlenir. Enzim immobilizasyon kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. Bunlar; kovalent bağlama, iyonik bağlama, adsorpsiyon, çapraz bağlama ve tutuklama yöntemidir. Şekil 2.13’ de bağlama yöntemleri resmedilmiştir. Taşıyıcıya bağlanmada bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanır. Molekül yapısındaki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlanmada rol alırlar [51].



Şekil 2.13. İmmobilizasyon teknikleri, E: enzim, P: protein [51]

Kovalent bağlama, iyonik bağlama, adsorpsiyon, çapraz bağlama ve tutuklama olmak üzere başlıca kullanılan immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması Çizelge 2.3 olarak tablo halinde verilmiştir. Ayrıca İmmobilizasyon yöntemine göre biyosensörün ortalama ömürleri ise: adsorpsiyon: 1 gün, membranda tutuklama: 1 hafta, fiziksel tutuklama: 3–4 hafta, kovalent bağlama: 4–14 ay seklindedir.

Çizelge 2.3. Enzim immobilize tekniklerinin kıyaslanması

Özellik	Kovalent Bağlama	Adsorpsiyon	İyonik Bağlama	Çapraz Bağlama	Tutuklama
Hazırlanması	Zor	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Enzim Aktifliği	Yüksek	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek
Bağ Gücü	Kuvvetli	Zayıf	Düşük	Kuvvetli	Kuvvetli
Substrat Spesifikliğı	Değişebilir	Değişmez	Değişmez	Değişebilir	Değişmez
Rejenerasyon	Mümkün değil	Mümkün	Mümkün	Mümkün değil	Mümkün değil
Genel Uygulanabilirlik	Orta	Düşük	Orta	Düşük	Yüksek
Masraf	Yüksek	Düşük	Düşük	Orta	Düşük

2.9.1. Kovalent bağlanma

Kovalent bağlanma enzimin dönüştürücü yüzeyine kimyasal bir reaksiyon sonucu kovalent bağlanmasıdır. Enzimler aktifleştirilmiş dönüştürücü yüzeylerine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanarak immobilize edilen enzim preparatının dönüştürücü yüzeyinde bir film veya tabaka oluşturmasıyla da biyosensörler hazırlanabilir.

Enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktifliği için aktif merkezdeki amino asitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların sterik olarak engellenmemesidir. Kovalent bağlanma enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir [51,52].

2.9.2. İyonik bağlanma

İyonik bağlanma enzimin dönüştürücü yüzeyine kimyasal bir reaksiyon sonucu iyonik olarak bağlanmasıdır. Bazı durumlarda iyonik bağlama yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden, enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak; enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçıışı söz konusudur [51,52].

2.9.3. Adsorpsiyon

Bu yöntemde enzimin film veya tabakaya adsorbe olması sağlanır. Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Adsorpsiyonun asıl amacı enzim immobilizasyonu olmayıp, enzim saflaştırmaktır. Fakat suda çözünmeyen taşıyıcılarda adsorpsiyon yönteminin enzim immobilizasyonunda oldukça sık kullanıldığını görülmektedir. Enzimlerin kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna göre immobilizasyon yöntemi belirlenir.

Yöntem, yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Taşıyıcıya bağlanmada etkin olan Van der Waals kuvvetleridir. Adsorbanlar çok değişik türde olmakla birlikte iyi bir adsorpsiyon sağlayabilmek için genellikle adsorbanın bir ön işlemden geçirilmesi gerekir [35,51].

2.9.4. Tutuklama

Enzimin bir membran veya tabaka (matriks) içerisinde hapsedilmesidir. Enzimler makro moleküler yapıları proteinler olup polimer jel tabakalarda ve daha basit olarak diyaliz membranlarında tutuklanabilirler. Elektrokimyasal polimerizasyon diğer bir tutuklama yöntemidir. Örneğin; altın kaplanmış cam slaytlarda potansiyometrik elektropolimerizasyon ile m-fenilendiaminin polimerleştirilmesiyle oluşan film içinde glukoz oksidaz immobilize edilmiştir. Bu yöntemin başka birçok uygulaması vardır.

2.9.5. Çapraz bağlama yöntemi

Tutuklama yöntemi ile kimyasal bağlamanın birleştirilmiş şekli olarak uygulanır. Tutuklanmış biyoreseptör glutraldehit gibi iki fonksiyonlu reaktiflerle film veya tabakaya kovalent bağlanır. Bu yöntem biyosensör hazırlanmasında daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde uygulanmaktadır.

Düşük molekül kütleli bi- veya multi- fonksiyonel gruplar taşıyan reaktifler kullanımıyla, enzim molekülleri arasında kovalent bağlar oluşturularak suda çözünmeyen çapraz bağlı enzim kompleksleri hazırlanabilir. Enzim molekülleri arasındaki çapraz bağlanma derecesi; ortam pH'sına, ortam sıcaklığına, protein/reaktif derişim oranına ve kullanılan enzime göre değişiklik gösterebilir. Moleküller arası bağlanmanın yanı sıra molekül içi bağlanmalarda söz konusu olabilir [35,49].

Çapraz bağlama yöntemi enzimin;

- Yalnız bifonksiyonel ajan ile reaksiyonu,
- İkinci bir protein varlığında bifonksiyonel ajan ile reaksiyonu,
- Suda çözünen bir taşıyıcıya adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel ajan ile reaksiyonu,
- Bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu sonucu gerçekleştirilebilir.

Çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutraldehit, hexameten diizosiyanat, diflorodinitrobenzen, bismaleimidoheksen, disüksinilsuberat sık bir şekilde kullanılan bileşiklerdir. Çapraz bağlamada iki yöntem kullanılır; bunlar daldırma ve direkt bağlama yöntemidir.

Daldırma yöntemi

Elektrot önce enzim ve çapraz bağlayıcının bulunduğu karışıma veya enzim, albümin, jelatin gibi suda çözünen protein ve çapraz bağlayıcının bulunduğu karışıma daldırılır. Sonra kendi ekseni etrafında homojen bir enzim tabakası elde edilecek şekilde döndürülür. Bundan sonra elektrot glisin çözeltisine daldırılır ve çapraz bağlayıcının fazlası ve diğer reaksiyona girmeyen maddeler yıkanarak uzaklaştırılır.

Direkt bağlama yöntemi

Bu yöntemde yaklaşık 10 L enzim çözeltisi bir kılcal boru yardımıyla dönüştürücü yüzeyine ince bir tabaka oluşturacak şekilde damlatılır. Daha sonra çapraz bağlayıcı reaktif ilave edilir. Bu yöntemde daldırma yöntemine göre daha az biyobileşen ile çalışılabilmektedir [35,49].

2.10. Kaynak Araştırması

D'Annibale, A. ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada; Lentinula edodes kullanılarak elde edilen lakkaz, zeytinyağı fabrikalarında atık sulardaki fenollerin uzaklaştırılması üzerine çalışılmıştır. Çalışmada lakkaz, glutaraldehit ile çapraz bağlanma ve adsorpsiyon yöntemiyle kitosan üzerine immobilize edilmiştir. Optimum pH, serbest ve immobilize enzim için 4,0 , optimum sıcaklık sırasıyla 50 °C ve 60 °C, K_m değerleri sırasıyla 77 μ M ve 256 μ M olarak bulunmuşlardır [53].

D'Annibale ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı başka bir çalışmada ise yine Lentinula edodes'ten elde edilen lakkazın atık sulardaki fenol bileşikleri üzerine etkilerini incelenmiştir. Çalışmada lakkaz, adsorpsiyon ile immobilize edilmiştir ve ilgili parametreler incelenmiştir. Serbest lakkazın K_m sabiti 0,07 mM dan, immobilize edildiğinde 0,15 mM'a artmıştır ancak I_{mak} değerinin $1,9 \times 10^{-2}$ mM den $7,6 \times 10^{-3}$ mM e düştüğünü gözlenmişlerdir [54].

Freire, R.S. ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılan bir çalışmada Trametes versicolor'dan elde edilen lakkazın immobilizasyonu adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemi ile yapılmıştır ve enzim aktifleştirilmiş karbon fiber mikro elektrotlar üzerine immobilize edilmiştir. Substrat olarak katekol kullanılmıştır ve optimum pH 5,0 olarak bulunmuştur. Ayrıca, immobilize lakkazın aktifliğini 2 ay süresince koruduğunu belirlemişlerdir [55].

Oldair D. Leite ve arkadaşları 2003 yılında, katekolaminlerin tayini için Pleurotus ostreatus'tan ekstrakte edilen lakkaz ile modifiye edilmiş karbon pasta biyosensörü hazırlamışlardır. Katekolamin olarak adrenalin, hidrokinon ve dopamin ile çalışmışlardır. Karbon pasta elektrot 375 mg grafit, 23 mg ham lakkaz özü ve 110 mg nujol karıştırılması ile hazırlamışlardır. Ölçümleri diferansiyel puls voltametriyi kullanarak 0,1 M fosfat tamponu (adrenalin için pH 7, dopamin için pH 6) içerisinde 25 °C sıcaklıkta almışlardır. DPV voltogramalarını 50 ila 400 mV potansiyel arasında adrenalin için 400-500 mV potansiyel aralığında dopamin için ve 30 mV s-tarama hızında almışlardır. Ayrıca adrenokinon bileşiğinin -174 mV'da dopaminkinin 238 mV'da indirildiğini bulmuşlardır. Adrenalin için doğrusal çalışma aralıklığını $6,0 \times 10^{-5} - 7,0 \times 10^{-4}$ M ve dopamin için $7,0 \times 10^{-5} - 4,0 \times 10^{-4}$ M olarak bulmuşlardır. Enzim elektrotla yapılan adrenalin tayini için tayin sınırını $7,9 \times 10^{-6}$ M ve dopamin tayini için tayin sınırını $9,8 \times 10^{-6}$ M olarak tespit etmişlerdir. pH 3 - pH 8 aralığında farklı pH çalışmaları yapmış ve optimum pH'yı adrenalin için 7 ve dopamin için 6 olarak tespit etmişlerdir. Hazırladıkları biyosensör ile sentetik örneklerde adrenalin ve dopamin tayini yapmış ve sonuçları % 95 güven sınırı içerisinde bulmuşlardır [56].

Haghighi ve arkadaşları 2003 yılında lakkaz enzim modifiyeli grafit elektrotlar geliştirmişlerdir. Hazırlanan enzim elektrotlarını fenolik bileşiklerin akış enjeksiyonu ile tayininde kullanmışlardır. Trametes versicolor'dan elde edilen lakkaz enzimi adsorpsiyon yöntemi ile grafit üzerine immobilize edilmiştir. Çalışmalar -50 mV'da, 0,1 M pH 5,0 sitrat tamponu içerisinde gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda optimum pH 5,0 olarak bulunmuştur. Adrenalin için 1×10^{-6} M ile $7,9 \times 10^{-5}$ M derişimleri arası doğrusaldır [57].

Leite ve arkadaşları tarafından 2003 yılında katekolaminlerin voltametrik tayini için peroksidaz ve lakkaz enzimlerini kullanarak sinerjik bir çalışma yapmışlardır. Çalışma elektrodu olarak grafit, nujol ve değişik kaynaklardan elde edilen lakkaz-peroksidaz enzimlerinin ham karışımını kullanmışlardır. Elektrodun optimasyonundan sonra adrenalin, dopamin ve L-dopa DPV yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Dopamin için $6,6 \times 10^{-6} - 3,9 \times 10^{-4}$ M derişimleri arası, adrenalin için $6,1 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$ M derişimleri arası, L -dopa için $6,7 \times 10^{-6} - 7,0 \times 10^{-5}$ M derişimleri arası doğrusal bulunmuştur. Tüm katekolaminler için optimum sıcaklık 35°C bulunmuştur. Optimum pH adrenalin için 7,0 ; dopamin için 6,0 ; L-dopa için 6,5 bulunmuştur [58].

Ferry ve Leech 2004 yılında nörotransmitlerin amperometrik tayini için lakkaz elektrodu geliştirmişlerdir. Çalışma elektrodu osmium redoks polimerinin ve lakkazın camsı karbon elektrot üzerine tutuklanması ile oluşturulmuştur. Çalışmalarını pH 4,5 0,05 M asetat tamponu kullanarak -0,20 V'da gerçekleştirmişlerdir. Deneylede nörotransmitter olarak adrenalin, noradrenalin ve dopamin kullanılmıştır. Enzim elektrodunun tayin sınırı adrenalin için 11 nM; noradrenalin için 8 nM ve dopamin için 4 nM'dır. Optimum pH 4,5 olarak bulunmuştur [59].

Suna Timur ve arkadaşları 2005 yılında fenolik bileşiklerin tayini için lakkaz enziminin katalizlediği ince cıva film kullanılan bir biyosensör geliştirmişlerdir. Lakkaz enzimi ince cıva film ile kaplı cam karbon elektrot üzerine gluteraldehit kullanarak çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edilmiştir. Ölçümler oksijen tüketiminin amperometrik olarak ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Sensörün cevabı ile analit konsantrasyonu ile çizilen grafik incelendiğinde; $0,5 \times 10^{-6}$ - $5,0 \times 10^{-6}$ M katekol konsantrasyonu için ve $2,5 \times 10^{-6}$ - $2,0 \times 10^{-6}$ M fenol konsantrasyonu için lineerdir. Çalışmalar optimum pH olan pH 4,5 asetat tamponu ile gerçekleştirilmiştir. Biyosensör için optimum sıcaklık 35°C bulunmuştur ancak çalışmalar 25°C 'de gerçekleştirilmiştir [60].

Wilkołazka ve arkadaşları 2005 yılında substrat yapısı ve ölçüm hassasiyeti arasındaki ilişkiyi bulmak için lakkaz enzimi kullanarak grafit elektrot geliştirmişlerdir. Bu amaçla lakkaz modifiyeli grafit elektrot kullanarak otuz farklı bileşiğin amperometrik tayinini gerçekleştirmişlerdir. Lakkaz enzimi adsorbiyon yöntemi ile immobilize edilmiştir. Lakkazın fenolik bileşiklerle etkileşmesinin daha iyi anlaşılması için sıvı akış sistemi kullanarak çalışmışlardır. Çalışmalarında pH 5 0,1 M sitrat tamponu kullanmış ve -50 mV potansiyelde gerçekleştirmişlerdir. Adrenalin için $1,5 \times 10^{-4}$ M ile $1,0 \times 10^{-6}$ M derişimleri arası doğrusaldır [61].

Daniela B. ve arkadaşları 2009 yılında iyonik 1-bütül-3-metil-imidazolyum heksafluorofosfat (Pt-BMI.PF₆) sıvı içinde dağıtılmış platin nanopartiküller ile sentetik formüllerde adrenalin tayininde kullanılmak üzere kare dalga voltametri ile karbon pasta biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensör yapımında *Aspergillus oryzae*'den elde edilen lakkaz kullanılmıştır. Grafit tozu, lakkaz, Nujol ve Pt-BMI.PF₆ sırası ile % 50, 20, 15, 15 oranlarında, 0.1 M pH 6.5 fosfat tamponu ortamında 20 Hz tarama hızında, 80 mV genlikle ve 5.0 V tarama artışıyla biyosensörü oluşturmuşlardır. Sensörün cevabını 9.99×10^{-7} M ile 2.13×10^{-4} (R = 0.9998) adrenalin derişim aralığında lineer ve tayin sınırını 2.93×10^{-7} M olarak bulunmuşlardır. Biyosensörün % 4.8 standart sapma oranı ile üç ayda yapılan üç yüz ölçümden elde edilen verilerle iyi bir tekrarlanabilirlik ve uzun raf ömrüne sahip olduğu tespit etmişlerdir. İlaç örneklerinde standart metot kullanılarak adrenalin tayini yapmışlardır. Buldukları % 95,5'ten %104,2'ye kadar olan değerler % 95 güven tayin sınırları içerisinde [62].

Monteali ve arkadaşları 2010 yılında şarapta bulunan fenolik bileşiklerin tayini için ferrosen ile modifiye edilmiş grafit perde baskılı elektrotlara tirozinaz ve lakkaz enzimleri immobilize edilerek biyosensör geliştirilmişlerdir. Enzimler tutuklama yöntemi kullanılarak immobilize edilmiştir. Optimum pH'yı 6 olarak bulunmuşlardır. 21 gün sonunda aktivitenin % 81 i kalmıştır. Tüm deneyleri oda sıcaklığında gerçekleştirmişlerdir [63].

Akyılmaz ve arkadaşları 2011 yılında beyaz çürükçül mantarın liyofilize biyokütlesinin jelatin ile gluteraldehit çapraz bağlayıcı maddesi ile platin elektrot üzerine immobilize etmişlerdir. Mantar hücreleri lakkaz aktivitesini korumuştur. İmmobilize hücreler adrenalinin amperometrik tayini için lakkaz kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu biyosensör için optimum pH 4,5'tur ve asetat tamponu kullanılmıştır. Biyosensör cevabı 5×10^{-6} - $1,0 \times 10^{-4}$ M adrenalin konsantrasyonu aralığında doğrusaldır. Biyosensörün tayin sınırını $1,04 \times 10^{-6}$ M olarak bulmuşlardır. İdeal sıcaklık değerini 20 °C bulmuşlardır ve biyosensörün cevap süresi otuz saniyedir. Elde ettikleri biyosensör ile farmokolojik örnekte adrenalin tayini yapmışlardır [64].

Jun Huang ve arkadaşları 2012 yılında immobilize lakkaz katalizli adrenalin tayini için ve floresans yeni bir fiber optik biyosensör tasarlanmışlardır. Lakkaz enzimi glutraldehit yardımı ile CuTAPc-Fe₃O₄ nanopartikülleri üzerine çapraz bağlama ile immobilize edilmiştir. Floresan oksijene duyarlı membran harcanan oksijeni tayin etmek için kullanmışlardır. Optimum pH 5,0 ve sıcaklık 55 °C olarak bulmuşlardır. İmmobilize lakkazın otuz gün sonunda sadece %15 aktivitesini kaybederken serbest lakkaz % 70 aktivitesini yitirmiştir. Normal cevap süresi yirmi dakika iken mediatör olarak ABTS kullanarak bu süreyi otuz saniyeye düşürmüşlerdir. Biyosensör $2,0 \times 10^{-7}$ - $9,0 \times 10^{-7}$ M ile $1,0 \times 10^{-8}$ ile $9,0 \times 10^{-8}$ M adrenalin konsantrasyon aralığında iyi bir performans göstermiştir. Sonuç olarak adrenalin tayini için; kararlı, hızlı, sıcaklığa dayanıklı ve uzun raf ömrüne sahip immobilize lakkazla ve oksijen geçirgenli membranla hazırlanan bir biyosensör geliştirmişlerdir [65].

Ronen Fogel ve arkadaşları 2013 yılında fenolik substratların lakkaz temelli amperometrik biyosensörlerle elektrokimyasal tayine yatkınlığını araştırmışlardır. Seçtikleri on farklı fenolik bileşiğin tayinlerini dönüşümlü voltametri ile gerçekleştirmişlerdir. Çalışma elektrotunu cam karbon elektrot olarak belirlemiş ve lakkaz enzimi glutraldehit yardımı ile yüzeye çapraz bağlanarak hazırlamışlardır. Çalışmalarını pH 3,5 , pH 4,5 ve pH 5,5 ortamında gerçekleştirmişlerdir. Çalışmaları sonucu biyosensörün fenolik bileşiklere duyarlılığı ile ilgili buldukları temel bulgular şu şekildedir: Biyosensörün duyarlılığı modifiye edilmemiş biyosensörlerdeki oksidasyon piki ve substratlı ortamda görünen Micheal Menten sabiti ile korrolasyon içerisindedir [66].

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Cihazlar ve Malzemeler

3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

Amperometrik ölçme işlemlerinde elektrokimyasal analiz cihazı olarak Epsilon-EC-Ver 1.40.67 NT kullanıldı.

3.1.2. Hücre ve elektrotlar

Amperometrik ölçme işlemlerinde Şekil 3.1' de verilen üç elektrotlu ölçme sistemi kullanıldı. Referans elektrot olarak BAS RE-5B no'lu Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak MW-1032 no'lu platin tel ve çalışma elektrotu olarak 0,5 cm² yüzey alanlı ve polipirol-polivinilsülfonat ile kaplanmış platin levha elektrotlar kullanıldı.



Resim 3.1. Elektrokimyasal deneylerde kullanılan üç elektrotlu hücre sistemi

3.1.3. pH metre

Tampon çözeltilerinin pH'larının ölçülmesinde ORION Model 720A pH iyonmetre cihazı kullanıldı.

3.1.4. Su banyosu

Isıtma ve sabit sıcaklık gerektiren çalışmalarda Grant W14 marka termostatlı dolaşimli su banyosu kullanıldı.

3.1.5. Mikro pipet

5 µL – 100 µL ve 100 µL - 1000µL çözelti ilaveleri için Brand marka $\pm 0,05$ µL hassasiyeti olan mikro pipetler kullanıldı .

3.1.6. Argon gazı

Çözeltide çözünmüş halde bulunan oksijeni uzaklaştırmak amacıyla Kargaz firmasından temin edilen yüksek saflıktaki (% 99,99) argon gazı kullanıldı.

3.1.7. Saf su cihazı

Çalışmalar boyunca kullanılan saf su GFL marka saf su cihazından sağlandı.

3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri

3.2.1. Kullanılan çözeltiler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan reaktifler

Kimyasal Madde	Saflık Derecesi	Temin Edildiği Firma
Pirol (C ₄ H ₅ N)	%98,0 $\delta=0,987 \text{ g/cm}^3$	Fluka
Polivinilsülfonat	%25,0 $\delta=1,18 \text{ g/cm}^3$	Aldrich
Lakkaz (Rhus Vernicifera)	$\geq 50 \text{ unit/mg}$	Sigma
Adrenalin	>95%	Sigma
Glutaraldehit (C ₅ H ₈ O ₂)	%25 $d=0,78$	Aldrich
Sodyum Dihidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	-	Sigma
Sodyum monohidrojen fosfat (NaHPO ₄)	-	Sigma
KCl	%96	Sigma
Hidroklorik asit (HCl)	%36,5	Merck
Dopamin	%99	Sigma
Noradrenalin	-	Sigma
Askorbik asit (C ₆ H ₈ O ₆)	%99,7	Sigma
Ürik asit (C ₅ N ₄ O ₃ H ₄)	%99	Sigma

Fosfat tamponu: 2,3910 g Monosodyum hidrojen fosfat ve 1,3744 g disodyum hidrojen fosfatdan sırası miktarlarda tartılarak saf suda çözüldü. Hazırlanan çözeltinin pH'sı 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl çözeltileri kullanılarak pH 7'ye ayarlandı ve çözeltideki analitik derişimi 0,1 M olacak şekilde seyreltildi. Farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltileri için de aynı yol izlendi. Hazırlanan tampon çözeltiler ölçülü balonda içerisinde +4 °C'ta buzdolabında saklandı.

Enzim çözeltisi: Toplam aktivitesi 9960 ünite olan lakkaz enzimi alındı ve saf su ile çözüldü. Çözelti manyetik karıştırıcı yardımı ile bir buçuk saat karıştırıldı. Ardından çözelti hacmi balon joje içerisinde saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Çözelti her biri 1 mL çözelti içerecek şekilde 10 adet temiz deney tüpüne konuldu. Deney sırasında kullanılacak olan bir deney tüpü enzim çözeltisi buzdolabında bekletildi. Geri kalan dokuz tüp enzim çözeltisi derin dondurucuda muhafaza edildi.

Adrenalin çözeltisi: Katı halde bulunan adrenalinden 18,3 mg tartılarak temiz bir behere alındı. Üzerine bir miktar pH 7 fosfat tamponu ilzve edilerek manyetik karıştırıcıda karıştırıldıç Daha sonra bu karışım 10' mlik balona alınarak pH' sı 7,0 olan 0,1 M fosfat tamponuyla tamamlanarak 0,1 M 10 mL stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden belirli bir miktar alınarak ve aynı şekilde $1,0 \times 10^{-2}$ M fosfat tamponuyla seyreltilerek 10,0'ar mL $1,0 \times 10^{-2}$ M adrenalin çözeltisi hazırlandı. Bu şekilde 0,1 M - $1,0 \times 10^{-5}$ M derişimlerine sahip adrenalin çözeltileri hazırlandı. Farklı pH' larda adrenalin çözeltisi hazırlamak için 0,1 M hazırlanmak istenen fosfat tamponu ile çözülme ve seyreltilme işlemi yapıldı. Hazırlanan adrenalin çözeltileri kullanılmadıklarında buzdolabında saklandı.

Glutaraldehit çözeltisi: %25'lik glutaraldehit çözeltisinin seyreltilmesiyle %5'lik glutaraldehit çözeltisi hazırlandı. %5'lik glutaraldehit çözeltisinden %0,1'lik glutaraldehit çözeltisi hazırlandı.

Askorbik asit çözeltisi: Katı askorbik asitten 17,6 mg tartılarak derişimi 0,1 M olan fosfat tamponunda 0,1 M 10 mL stok askorbik asit çözeltisi hazırlandı. Farklı derişimlerdeki askorbik asit çözeltileri belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

Ürik asit çözeltisi: Katı ürik asitten 0,395 gram tartılarak 0,1 M Na_2CO_3 çözeltisinde çözüldükten sonra fosfat tamponu eklenerek $5,0 \times 10^{-3}$ M 25 mL stok ürik asit çözeltisi hazırlandı.

Hidroklorik asit çözeltisi: Derişik HCl'den belli bir miktar alınıp uygun şekilde seyreltilerek 0,1M 250 mL çözeltisi hazırlandı.

Sodyum hidroksit çözeltisi: Katı sodyum hidroksitten belirli bir miktarda tartılıp saf suda çözülerek 1,0 M 25 mL çözeltisi hazırlandı.

Potasyum Klorür çözeltisi: Katı potasyum klorür belirli bir miktarda tartılıp saf suda çözülerek 0,1 M 25 mL çözeltisi hazırlandı.

3.3. Platin Yüzeyin Polipirol-Polivinilsülfonat (PPy-PVS) Film ile Kaplanması

Elektrot yüzeyinin temizlenmesi: Kaplama işlemi yapılmadan önce platin levhanın yüzeyi mekanik ve kimyasal olarak temizlendi. İlk olarak platin yüzey sıfır numara zımpara ile zımparalandı, ardından bir müddet aleve tutuldu. Daha sonra platin levha 5 dakika süre ile derişik HCl asit çözeltisi içerisinde bekletildi. Tekrar bol saf su ile yıkandı ve kurutuldu. Her kaplama işleminden önce platin levhalar bu şekilde temizlendi.

Temizlenmiş Pt levha elektrodunun yüzeyi polipirol-polivinilsülfonat film ile kaplandı. Polipirol, elektrot yüzeyine pirolün elektropolimerleşmesi ile biriktirildi. Elektropolimerleşmede üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Çalışma elektrotu olarak platin levha (0,5 cm²), karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak da Ag/AgCl elektrot kullanıldı. Polipirolpolivinilsülfonat film elde etmek amacıyla pirolün hücre içi derişimi 0,1 M olacak şekilde 71 µL pirol, 2,5 mL polivinilsülfonat (%25), 7,43 mL saf su ilavesi ile toplam 10 mL'lik bir çözelti hazırlandı. Bu çözeltiye temizlenmiş platin elektrot daldırıldı. Daha sonra 10 dakika argon gazı geçirilerek çözeltideki oksijen uzaklaştırıldı. Elektropolimerizasyon işlemi dönüşümlü voltametri tekniği ile -1,0 V – +2,0 V potansiyelleri arasında 50 mV/s tarama hızında 2 dönüşümde yapıldı. Kaplama işleminden sonra elektrot önce saf su sonra da tampon çözelti ile yıkanarak yüzeydeki kalıntılardan temizlendi. Pt/PPy-PVS elektrot bu şekilde hazırlandı ve kaplama işleminden sonra tampon çözelti içerisinde bekletildi [69,71].

3.4. Pt/PPy-PVS Elektrodunun Serbest Lakkaz Enzimi Varlığında Adrenokinona Duyarlılığının ve Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi

Bu tezde hazırlanan biyosensörün adrenaline duyarlılığı lakkaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyon sonucu açığa çıkan adrenokinonun indirgenme akımının ölçümüne dayanmaktadır. Adrenaline duyarlı bir biyosensör hazırlamak amacıyla ilk önce adrenaline ile serbest lakkaz enzimi arasındaki reaksiyonu sonucu adrenokinon oluşturuldu. Daha sonra enzimatik reaksiyon sonucu oluşan adrenokinonun indirgenme yönündeki davranışı diferansiyel puls voltametri (DPV) ile takip edilerek Pt/PPy-PVS elektrodun adrenokinon bileşimine duyarlılığı ve çalışma potansiyeli belirlendi.

Bu amaçla Pt/PPy-PVS elektrot pH' sı 7 olan 9 mL 0,1 M fosfat tamponu, 1 mL KCl (0,1 M) bulunan çözeltiye daldırıldı. Öncelikle Pt/PPy-PVS elektrodunun fosfat tamponu içerisinde diferansiyel puls voltogramı (DPV) alındı. Ardından 50 µL lakkaz enzimi çözeltiye ilave edildi ve 15 s karıştırıldı. Daha sonra artan miktarlarda ($1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ M) adrenalin ilaveleri yapıldı. Her ilaveden sonra 15 saniye karıştırıldı ve DPV si alındı. (Şekil 4.2) Ardışık çekilen DPV'ler yorumlanarak elektrodun serbest enzim varlığında adrenokinona duyarlılığı belirlendi.

3.5. Adrenalin Biyosensörünün Hazırlanması

Enzim elektrot çapraz bağlama yöntemi kullanılarak hazırlandı. 20 µL, % 2,5'luk Glutaraldehit (GA), 1 mg bovin serum albumin (BSA), 50 µL pH 7,0 fosfat tamponu, 50 µL lakkaz enziminden oluşan bir karışım hazırlandı. Bu karışım, Bölüm 3.3'e göre hazırlanan PPy-PVS elektrodun her iki yüzeyine eşit miktarlarda damlatıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Hazırlanan enzim elektrot önce saf su ile sonra tampon çözelti ile yıkandı ve kullanılmadığı zamanlarda tampon çözelti içerisinde buzdolabında saklandı.

Elektrokimyasal hücre içerisine 9,0 mL tampon çözelti ve 1,0 mL 0,1 M KCl (destek elektrolit) konuldu. Pt/PPy-PVS-Lac çalışma elektrodu diğer elektrotlar ile birlikte hücre içerisine yerleştirildi. Çalışma potansiyelinde elektrot akımı sabitleninceye kadar beklendi ve sabitlenen akım değeri denge akımı olarak kaydedildi. Dengeye gelen enzim elektrot çözeltisi içerisine taze hazırlanmış adrenalin çözeltisinden belirli derişimlerde ilavelerle çözelti bir süre karıştırarak adrenokinon oluşturuldu. Adrenokinonun katodik akımları okunarak değerler kaydedildi.

3.6. Çapraz Bağlama Yöntemine Glutaraldehit Miktarının Etkisi

Çapraz bağlama immobilizasyon yönteminde kullanılan glutaraldehit miktarının etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.5'e göre hazırlanan %2,5'luk glutaraldehit çözeltisinden 10 µL, 20 µL ve 30 µL içeren enzim elektrotlar hazırlandı. Elektrotlar -0,220 V potansiyelde sabit akıma getirildi ve denge akımları kaydedildi. Daha sonra artan miktarlarda ($1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ M) adrenalin ilaveleri yapıldı. Her ilaveden sonra çözelti 300 saniye karıştırıldı ve 200 s sonra akım ölçüldü. Eklenen adrenalin derişimine karşı akım farkı grafiği çizildi ve sonuçlar karşılaştırıldı.

3.7. Adrenalin Biyosensörünün En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi amacıyla , pH'nın etkisi, sıcaklığın etkisi, substrat derişiminin etkisi, enzim elektrodunun tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrünün belirlenmesi çalışmaları yapıldı.

3.7.1. pH etkisi

Bölüm 3.5'e göre hazırlanan enzim elektrodun amperometrik cevap akımı üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla 0,1 M derişiminde pH'sı 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 8,0 ve 9,0 olan fosfat tamponları hazırlandı. Bu tampon çözeltilerle aynı pH'da adrenalin çözeltileri hazırlandı. Elektrot -0,220 V potansiyelde sabit akıma getirildikten sonra denge akımı kaydedildi.

Sonra hücreye artan miktarlarda ($1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ M) çalışılan pH'daki tampon ile taze hazırlanan adrenalin çözeltilisinden ilaveler yapıldı. Her ilaveden sonra çözelti 300 saniye karıştırıldı ve 200 s sonra akım ölçüldü. Bu işlem yukarıda belirtilen farklı pH değerindeki bütün tampon çözeltileri ile tekrarlandı. Her bir tampon çözeltisi için Lineweaver-Burke grafikleri çizildi ve bu grafiklerden yararlanarak $K_{m(göz)}$ ve $I_{maks(göz)}$ değerleri hesaplandı. Sonuçlar tablo haline getirilerek karşılaştırıldı (Çizelge 4.1)

3.7.2. Sıcaklığın etkisi

Hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için elektrot -0,220 V potansiyelde sabit akıma getirildikten sonra denge akımı kaydedildi. Grant GD 120 marka termostatlı dolaşımli su banyosu kullanılarak hücre içindeki çözeltilinin sıcaklığı 15 °C'ye ayarlandı. Sonra hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde adrenalin ilave edildi. 300 saniye karıştırıldı ve 200 s sonra akım değeri okunup, denge akımı ile farkı alınarak 15 °C için Δi değeri hesaplandı. Aynı işlemler sırasıyla 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C ve 45°C sıcaklıkları için tekrarlanarak her bir sıcaklık için Δi değeri hesaplandı. Farklı sıcaklıklardaki her bir çözelti için ölçülen amperometrik cevap akımları grafiğe geçirildi ve grafikten enzim elektrodun en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık değeri bulundu. Aynı işlemler pH 8,0 fosfat tampon çözeltisi ile tekrar edildi (Şekil 4.6).

3.7.3. Substrat derişiminin etkisi

Hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine substrat derişiminin optimum şartlarda etkisini incelemek amacıyla önce biyosensör -0,220 V'da sabit akıma getirildi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra $1,0 \times 10^{-7}$ M; $5,0 \times 10^{-7}$ M; $1,0 \times 10^{-6}$ M; $5,0 \times 10^{-6}$ M; $1,0 \times 10^{-5}$ M; $5,0 \times 10^{-5}$ M ve $1,0 \times 10^{-4}$ M derişimlerinde pH 5,0 fosfat tamponuyla hazırlanan adrenalın çözeltisi ilaveleri yapıldı. Her ilave sonunda çözelti 300 s karıştırılıp 200 s sonunda amperometrik cevap akımları ölçüldü ve denge akımı ile arasındaki farklar alınarak her bir adrenalın derişimi için Δi değerleri belirlendi. Bulunan değerler adrenalın derişimine karşı grafiğe geçirildi. Ayrıca elde edilen verilerden Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten yararlanarak enzime özgü $K_m(\text{göz})$ ve $I_{\text{maks}(\text{göz})}$ değerleri belirlendi. Çizilen kalibrasyon grafiği ise Şekil 4.4'de gösterildi. pH 8 fosfat tamponu için de amperometrik cevap akımları ölçüldü ($1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ M) ve denge akımı ile arasındaki farklar alınarak her bir adrenalın derişimi için Δi değerleri belirlendi.

3.7.4. Enzim elektrodunun tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi

Bölüm 3.5'e göre Hazırlanan biyosensörün optimum şartlarda tekrar kullanılabilirliği incelendi. Bu amaçla önce biyosensör pH 5 fosfat tamponu kullanılarak -0,220 V'da sabit akıma getirildi. $5,0 \times 10^{-6}$ M adrenalın derişimi ile arka arkaya yapılan ölçümler sonucu amperometrik cevap akımları elde edildi ve ölçüm sayısına karşı grafiğe geçirildi. Aynı işlemler pH 8 fosfat tamponu kullanılarak tekrar edildi. (Şekil 4.5)

3.7.5. Raf ömrünün belirlenmesi

Bölüm 3.5'e göre hazırlanan enzim elektrodunun raf ömrünün belirlenebilmesi için dokuz gün boyunca her gün -0,220 V sabit potansiyelde dengeye getirilmiş elektrodun bulunduğu hücreye 5×10^{-6} M derişiminde adrenalın çözeltisi eklendi ve 300 s karıştırıldı ardından 200 s ölçüm alındı. Ölçüm işlemi tamamlanan enzim elektrot, bir sonraki ölçüm yapıncaya kadar pH 5,0 tamponu içerisinde $+4^\circ\text{C}$ 'da buzdolabında saklandı. Bekletme süresine karşı cevap akımları grafiğe geçirildi ve bu grafikten ölçülen akım değişimleri kullanılarak aktivitedeki azalma miktarı hesaplandı.

3.7.6. Biyosensör üzerine girişim yapan maddeler

Hazırlanan biyosensörün ölçüm ortamında bulunabilecek diğer maddelerin enzim elektroduna yapabileceği etkiler incelendi.

Bölüm 3.5'e göre hazırlanan enzim elektrodu, içinde 0,1 M 9,0 mL pH 5,0 fosfat tamponu ve 0,1 M 1 mL KCl bulunan toplam 10 mL'lik hücrede, -0,220 V sabit potansiyelde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücreye derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde adrenalin ilavesi yapıldı. Çözelti 300 s karıştırılıp 200 s sonrasındaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak $1,0 \times 10^{-6}$ M adrenalin sebep olduğu cevap akımı kaydedildi. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde ürik asit çözeltisi ilave edildi. Çözelti 300 s karıştırılıp 200 s sonundaki akımı okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak $1,0 \times 10^{-6}$ M adrenalin ve $1,0 \times 10^{-6}$ M ürik asitin sebep olduğu toplam okunan akım kaydedildi. Bu okunan akımdan $1,0 \times 10^{-6}$ M adrenalinin neden olduğu okunan akım çıkarılarak $1,0 \times 10^{-6}$ M ürik asidin neden olduğu cevap akımı hesaplandı. Hesaplanan bu akım, toplam cevap akımına oranlanarak $1,0 \times 10^{-6}$ M ürik asitin yüzde girişimi bulundu. Aynı işlemler $1,0 \times 10^{-6}$ M askorbik asit, $1,0 \times 10^{-6}$ M noradrenalin ve $1,0 \times 10^{-6}$ M dopamin için tekrarlanarak yüzde girişimleri hesaplandı.

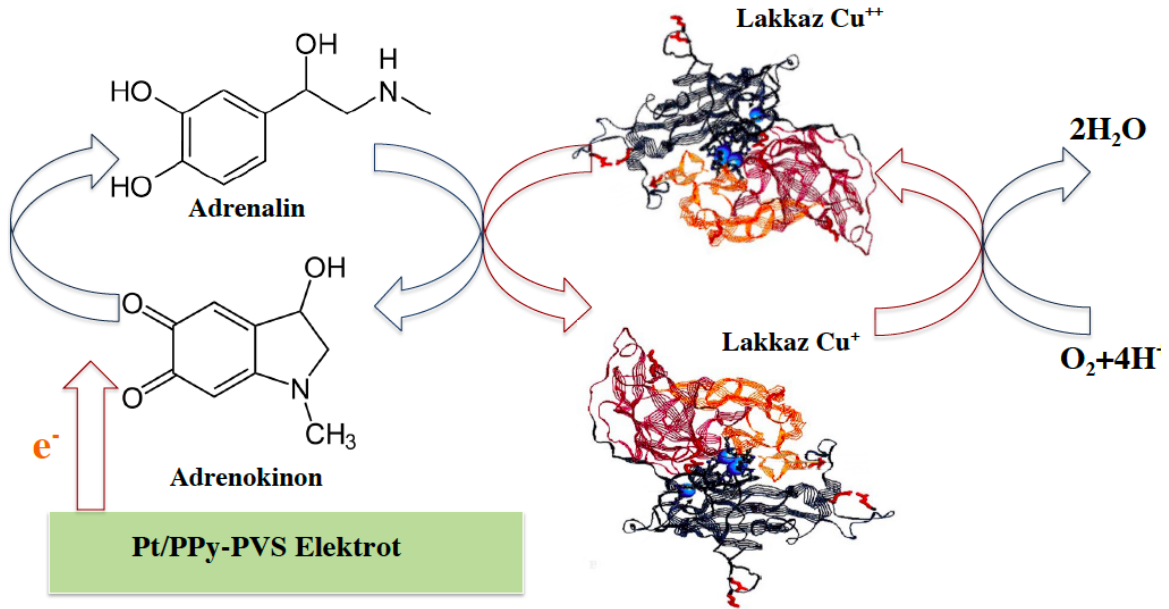
3.7.7. Sentetik numune çalışması

Bölüm 3.5'e göre hazırlanan ve dengeye getirilen enzim elektrot ile sentetik numunedeki adrenalin miktarının belirlenmesi amacıyla üçlü elektrot sisteminden oluşan elektrokimyasal hücre kullanıldı. Bu hücrede çalışma elektrodu olarak hazırlanan enzim elektrot, karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot kullanıldı. Elektrokimyasal hücreye pH 5,0 9 mL fosfat tamponu ve 0,1 M KCl çözeltisi konuldu. Dengeye gelmiş hücre içerisine, iki yüz kat seyrelme olacak şekilde sentetik numune çözeltisinden hücre çözeltisine ilave edildi. 300 s karıştırılıp, 200 s potansiyel uygulandı ve amperometrik cevap akımı ölçüldü. Bu akım değerine karşı gelen adrenalin derişimi kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplandı.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, adrenaline duyarlı yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Bunun için öncelikle, platin yüzey üzerine iletken bir polimer olan pirol, polivinilsülfonatlı ortamda kaplandı. Sonra lakkaz enzimi, gluteraldehit ve BSA ile çapraz bağlanarak immobilize edildi. Adrenalin tayini enzimatik reaksiyonu sonucu oluşan adrenokinonun $-0,220$ V'da indirgenmesine dayanarak yapıldı.



Şekil 4.1. Adrenalin tayinin reaksiyon şeması

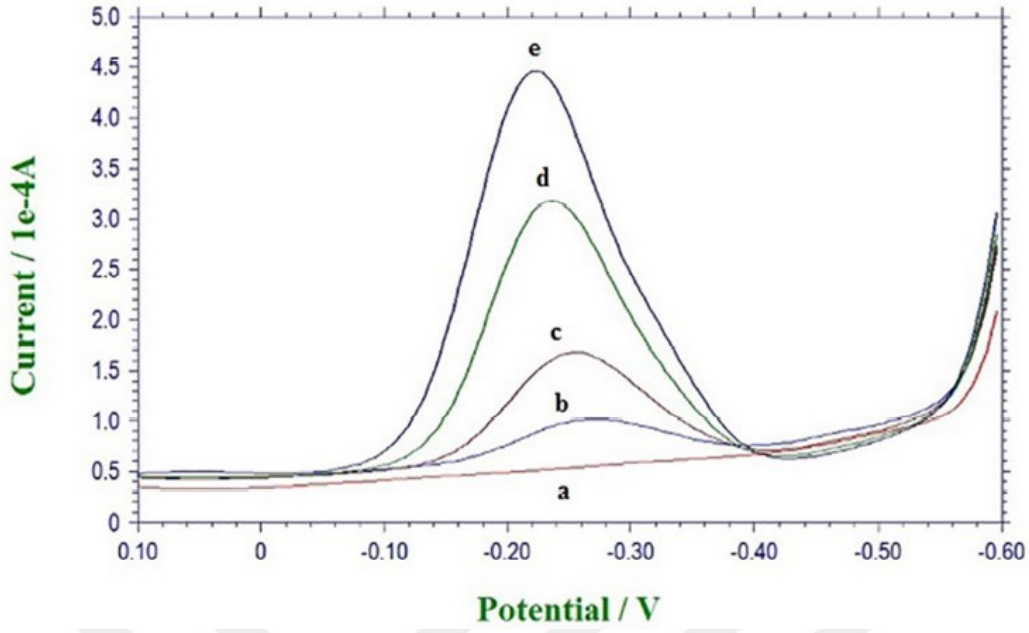
Şekil 4.1'e göre; PPy-PVS elektrot üzerinde immobilize olan lakkaz ile adrenalin arasında biyokimyasal reaksiyonlar meydana gelmektedir. İlk olarak; adrenalin, lakkaz enzimi ile adrenokinona yükseltgenir. Lakkaz enzimi üzerindeki Cu merkez elektron alarak indirgenir. Daha sonra enzim, çözelti içerisindeki oksijene indirgenmiş bakır üzerindeki elektronlarını vererek yükseltgenir. Böylelikle enzim ilk formuna geri döner. Biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda açığa çıkan adrenokinon PPy-PVS elektrot yüzeyinde adrenaline indirgenir. Adrenalin tayini elektrot yüzeyinde adrenokinonun katodik akımının ölçülmesi ile yapılır.

Hazırlanan biyosensörün performansını etkileyen parametreler ve en iyi çalışma koşulları (pH, sıcaklık, tekrar kullanılabilirlik, raf ömrü v.b) araştırıldı. Daha önce PPy-PVS filme lakkaz immobilize edilerek hazırlanmış bir biyosensör çalışmasına rastlanılmamıştır. Bu yüzden yapılan biyosensör çalışması orijinal bir çalışmadır.

4.1. Pt/PPy-PVS Elektrodunun Serbest Lakkaz Enzimi Varlığında Adrenokinona Duyarlılığının ve Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi

Pt/PPy-PVS elektrodun enzimatik reaksiyonu sonucu oluşan adrenokinona duyarlılığı ve adrenokinonun indirgenme potansiyelinin DPV ile belirlenmesi Şekil 4.2’de görülmektedir. a voltamogramı, Pt/PPy-PVS elektrodun fosfat tamponu içindeki DPV’sini göstermektedir. b voltamogramı, çözeltiliye $1,0 \times 10^{-7}$ M adrenalin ilave edilmesine, c voltamogramı $5,0 \times 10^{-7}$ M adrenalin ilave edilmesine, d voltamogramı $1,0 \times 10^{-6}$ M adrenalin ilave edilmesine ve e voltamogramı $5,0 \times 10^{-6}$ M adrenalin ilave edilmesine aittir.

Şekil 4.2 incelendiğinde ortama adrenalin ilavesiyle $-0,220$ V’da bir katodik pik görüldü. Adrenalin derişiminin artmasıyla bu pikin büyüdüğü gözlemlendi. Bu durum Pt/PPy-PVS elektrodun adrenalinin lakkaz enzimi ile reaksiyonu sonucu oluşan adrenokinon bileşiğine duyarlı olduğunu gösterdi. Ayrıca adrenalin ilavesi ile $-0,220$ V’da pik yüksekliklerinin artması da enzimatik ürün olan adrenokinonun $-0,220$ V’da indirgenmiş olduğunu gösterdi. Böylece çalışma potansiyeli $-0,220$ V olarak belirlenmiş oldu. Literatürde farklı materyallerle hazırlanmış adrenalin biyosensörleri bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, çalışma potansiyeli $-0,20$ V ve $-0,21$ gibi değerler bulunmuştur. Bizim çalışma potansiyelimiz de literatürle uyum içerisindedir [64,67].



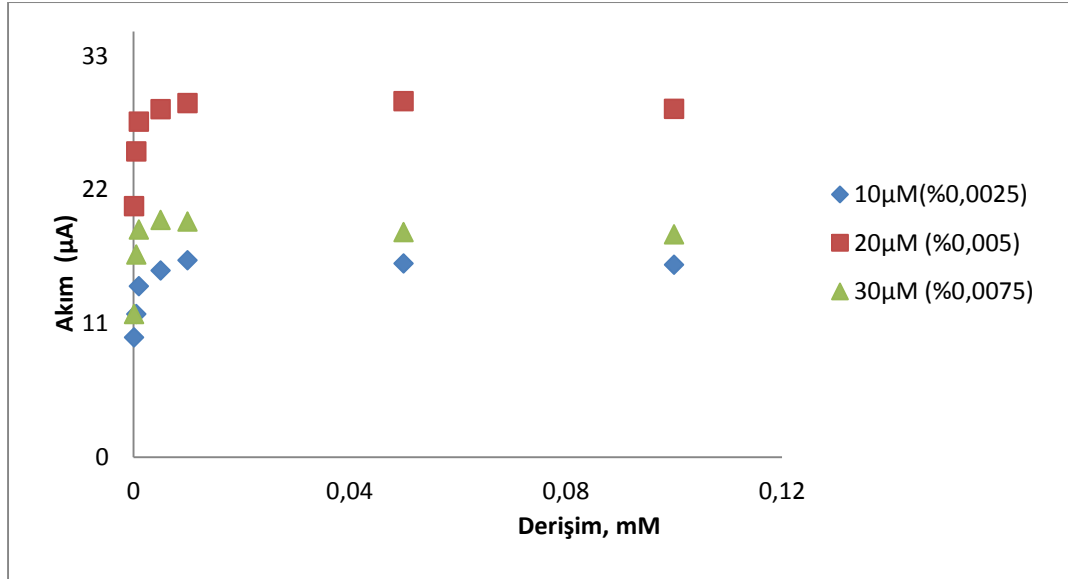
Şekil 4.2. (a) pH 7,0 fosfat tamponu içinde PPy-PVS film (b) $1,0 \times 10^{-7}$ M adrenalin (c) $5,0 \times 10^{-7}$ M adrenalin (d) $1,0 \times 10^{-6}$ M adrenalin (e) $5,0 \times 10^{-6}$ M adrenalin ilavesi ile alınan voltamogramlar

4.2. Gluteraldehit Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi

Çapraz bağlama biyosensör tasarımı sırasında en çok tercih edilen enzim immobilizasyon yöntemlerinden birisidir. Yöntem uygulanabilirlik açısından basit ve kolaydır, ayrıca biyomolekül ve taşıyıcı arasında güçlü kimyasal bağlanma sağlar. Ancak çapraz bağlama boyunca enzimin aktif bölgesinde meydana gelen kimyasal değişimlerden dolayı aktivite kaybına da yol açabilmektedir [53,67].

Biyosensörün cevabına gluteraldehit miktarının etkisini incelendi. Bunun için %2,5'luk gluteraldehit çözeltisinden 10 μ L, 20 μ L ve 30 μ L içeren üç farklı enzim elektrodu hazırlandı. Şekil 4.3'de üç farklı miktarla hazırlanan elektrotlara ait grafik verilmektedir. Grafik incelendiğinde 20 μ L gluteraldehit çözeltisi kullanılarak hazırlanan elektrodun 10 μ L gluteraldehit çözeltisi kullanılarak hazırlanan elektroda göre aktivitesinin daha yüksek olduğu görülür. Bu durum immobilize olan lakkaz enzimi miktarı ile açıklanır. Gluteraldehit miktarı arttıkça immobilize olan lakkaz miktarı da artar ve elektrodun performansı artmaktadır.

Ancak 30 μL gluteraldehit çözeltisi kullanılarak hazırlanan elektrodun 20 μL gluteraldehit çözeltisi kullanılarak hazırlanan elektroda göre aktivitesinin daha düşük olduğu görülür. Gluteraldehit fazla kullanıldığında enzimin aktivitesini azaltmaktadır. O nedenle gluteraldehit miktarının optimizasyonu her çalışmada yapılmaktadır. Ayrıca bu durum film kalınlığının artması ile artan yüksek difüzyon bariyeri ile de açıklanabilir. Sonuç olarak 20 μL gluteraldehit çözeltisi kullanılarak hazırlanan enzim elektrodu en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Biyosensörün karakterizasyon çalışmalarında 20 μL gluteraldehit çözeltisi kullanılarak hazırlanan enzim elektrodu kullanıldı [64].



Şekil 4.3. Çapraz bağlama immobilizasyon yönteminde kullanılan gluteraldehit miktarının etkisinin incelendiği derişim-akım grafiği (0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C, -0,220V)

4.3. Enzim Elektrodunun En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

4.3.1. pH'nın etkisi

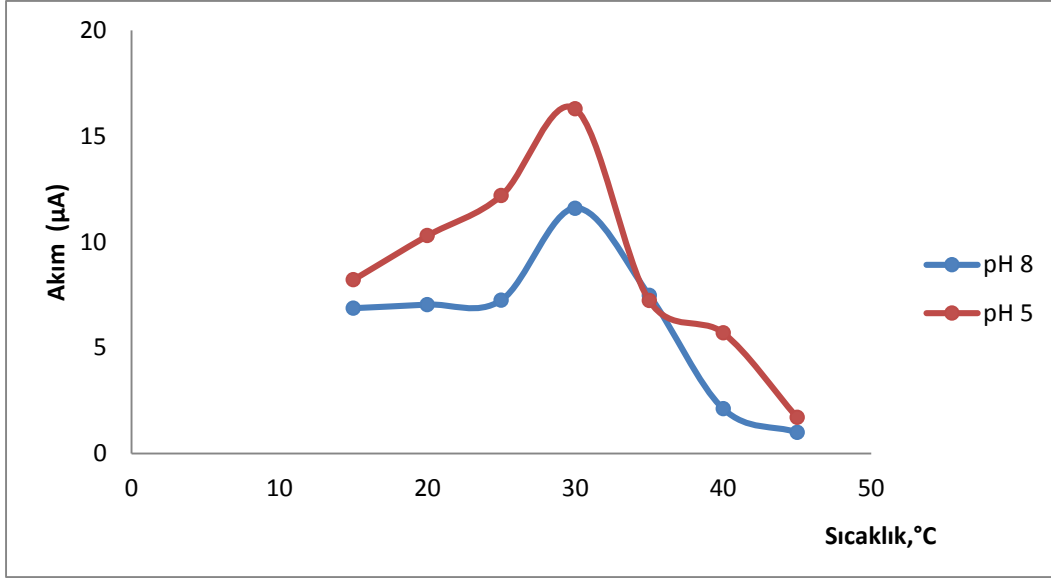
pH, enzimin uygun konformasyonunun muhafaza edilmesinde önemli bir rol oynar, çünkü enzim aktivitesi, aktif bölgedeki aminoasitlerin iyonizasyon durumuna bağlıdır. Bu amaçla bölüm 3.5'e göre hazırlanan enzim biyosensörünün cevap akımı üzerine pH etkisi araştırıldı. Deneyler öncelikle pH 3,0-9,0 arasındaki 0,1 M fosfat tampon çözeltileri ile yapıldı. Akıma karşı pH grafiğe geçirildi. Ancak bu şekilde yapılan deneyler sonucunda keskin bir tepe noktası görülemedi. Bundan dolayı her bir pH değeri için $1,0 \times 10^{-7}$ M ile $1,0 \times 10^{-4}$ M arasında artan adrenalin ilavelerine karşı elde edilen akım değerlerinden yararlanarak Lineweaver-Burke grafikleri çizildi. Bu grafiklerden $K_{m(göz)}$ ve $I_{maks(göz)}$ değerleri hesaplandı. (Çizelge 4.1) Enzimler için spesifik bir veri olan Michealis-Menten sabiti (K_m), enzimin substratına karşı ilgisini ifade eder ve düşük K_m değerleri enzimin substratına yüksek ilgisini gösterir. Çizelge 4.1'e bakıldığında azalan $K_{m(göz)}$, artan $I_{maks(göz)}$ eğilimine en iyi pH 5,0 ve pH 8,0 fosfat tamponlarının sahip olduğu görülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar dahilinde biyosensörün optimum pH'sının 5,0 ve 8,0 olduğuna karar verildi. Literatürde lakkazla yapılan çalışmalarda pH 5 in yanı sıra pH 7, pH 6,5 , pH 4,5 gibi değişik pH sonuçlarına da rastlanmıştır [53,55,61]. Bitki, mantar ve bakteri kaynaklı lakkazların her birinin farklı pH'ya sahip oldukları bilinmektedir [32,33]. Değişik pH sonuçlarının bu durumdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca kullanılan polimer ve immobilizasyon bileşikleri de pH değerini etkiler. Enzimin aktif bölgesi değişik şartlarda farklı karakteristikler sergiler. Polimerin ve immobilizasyon materyalinin enzim ile etkileşimi sonucu sergilediği karakteristik de değişiklik gösterebilir. Literatürde bazik ortamda lakkaz enzimi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Ancak bizim çalışmamızda pH 8'de de optimum aktivite gösterdiği görülmüştür. PPy-PVS film ile hazırlanmış farklı enzim elektrotları için optimum pH'nın bazik ortamda olduğu önceki çalışmalarda görülmüştür [71,72].

Çizelge 4.1. Farklı pH koşulları altında adrenalin biyosensörüne ait $K_{m(göz)}$ ve $I_{maks(göz)}$

pH (fosfat tamponu, 25°C)	$K_{m(göz)}$ değeri (M)	$I_{maks(göz)}$ değeri (mA/dk)
3	$5,17 \times 10^{-5}$	25,84
4	$8,50 \times 10^{-5}$	14,24
5	$1,49 \times 10^{-5}$	24,94
6	$8,16 \times 10^{-5}$	20,41
7	$4,25 \times 10^{-5}$	21,23
8	$1,11 \times 10^{-5}$	18,68
9	$8,90 \times 10^{-5}$	14,83

4.3.2. Sıcaklık etkisi

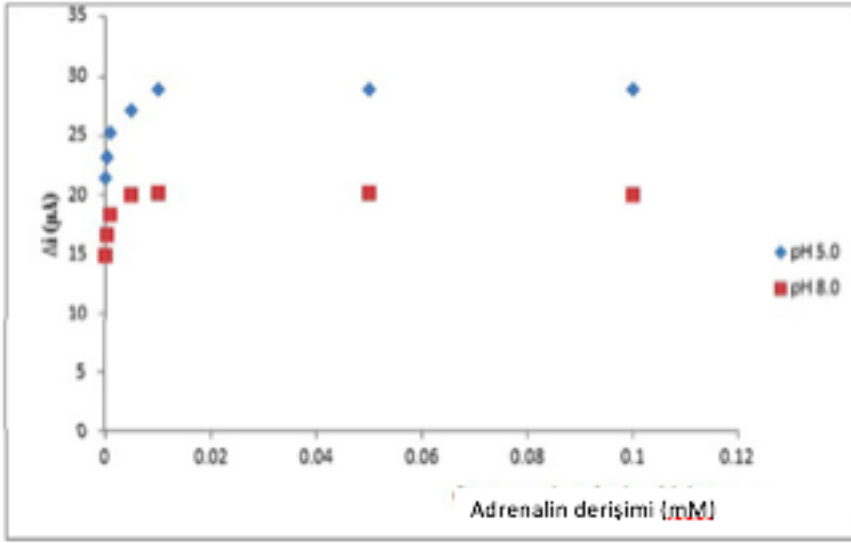
Enzim reaksiyon hızı ile sıcaklık arasında doğru orantılı bir ilişki vardır [53]. Bölüm 3.5'e göre hazırlanan biyosensörün sabit adrenalin derişiminde ($1,0 \times 10^{-6}$ M) farklı sıcaklıklardaki (15-45 °C) amperometrik cevap akımları elde edilerek grafiğe geçirildi. (Şekil 4.4) Şekil incelendiğinde düşük sıcaklık değerlerinde enzimin düşük aktivite gösterdiği ve amperometrik cevap akımlarının sıcaklık arttıkça arttığı görülmektedir. Maksimum cevap akımının her iki pH değeri için 30 °C' olduğu gözlemlendi. 30 °C'tan sonra enzimin aktivitesinin düştüğü gözlemlendi. Literatürde değişik immobilize lakkaz için 35; 40; 55; °C gibi optimum sıcaklıklar bulunmuştur [59-61]. Sıcaklıktaki bu farklılığın; enzimin protein yapısının polimer ve immobilizasyon materyalinden etkilenmesinden ve bundan aktif merkezin ve enzim aktif merkezindeki koenzimin etkilenmesinden kaynaklandığı söylenebilir. Ayrıca sıcaklık arttıkça kullandığımız adrenalinin sıcaklıktan etkilendiği düşünülmektedir. Çalışma şartlarının kolay olmasını sağlamak amacıyla bundan sonraki çalışmalarda oda sıcaklığı olan 25°C kullanıldı.



Şekil 4.4. Biyosensörün adrenalin duyarlılığına sıcaklığın etkisi (0,1 M pH 5,0 ve pH 8,0 fosfat tamponu, $1,0 \times 10^{-6}$ M adrenalin, -0,220 V)

4.3.3. Substrat derişiminin etkisi

Enzimin tepkime hızını etkileyen önemli faktörlerden birisi de substratın derişimidir. Enzimler artan substrat derişimlerinde sürekli olarak aynı şekilde davranmazlar. Başlangıçta ilave edilen substrat, hemen ürüne dönüşür. Belli bir substrat derişimine gelindiğinde ise enzimin aktif merkezi, substrata doyar. Oluşan ürünün miktarı substrat derişimi artsa bile sabit kalır. Hazırlanan Pt/PPy-PVS-Lac enzim elektrodunun doğrusal çalışma aralığını ve substrat derişiminin etkisini belirlemek amacıyla, Bölüm 3.7’de anlatılan şekilde deney gerçekleştirildi ve her bir adrenalin çözeltisi için iki farklı ortamında amperometrik akım değişimleri kaydedilerek grafiğe geçirildi. (Şekil 4.5)

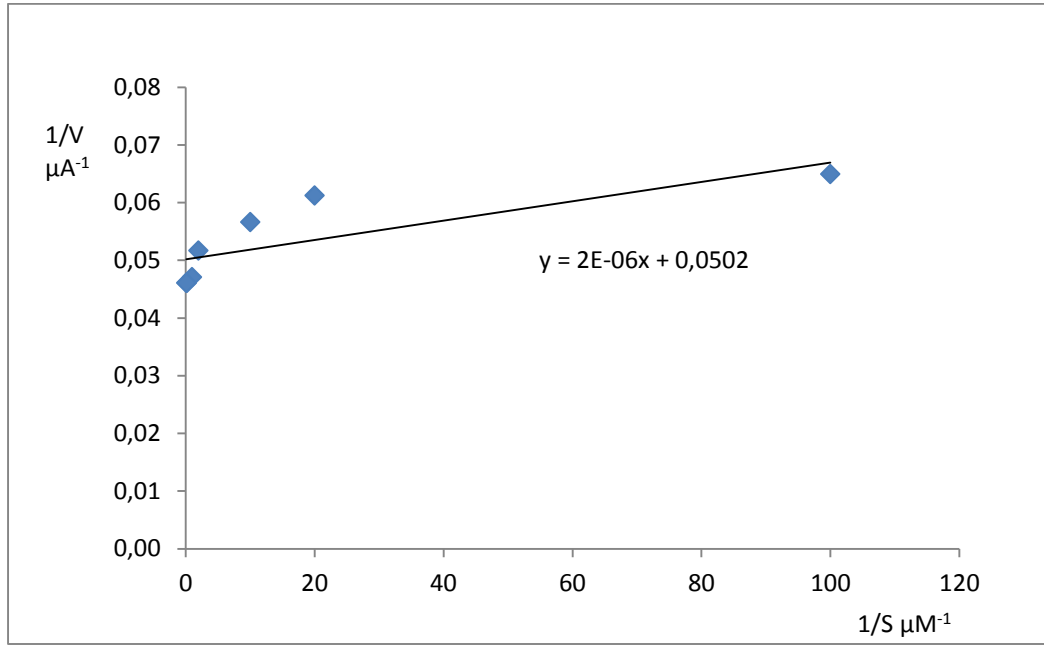


Şekil 4.5. Biyosensörün amperometrik cevabına karşı adrenalin derişiminin etkisi (0,1 M pH 5,0 ve pH 8,0 fosfat tamponu, 25 °C, -0,220 V)

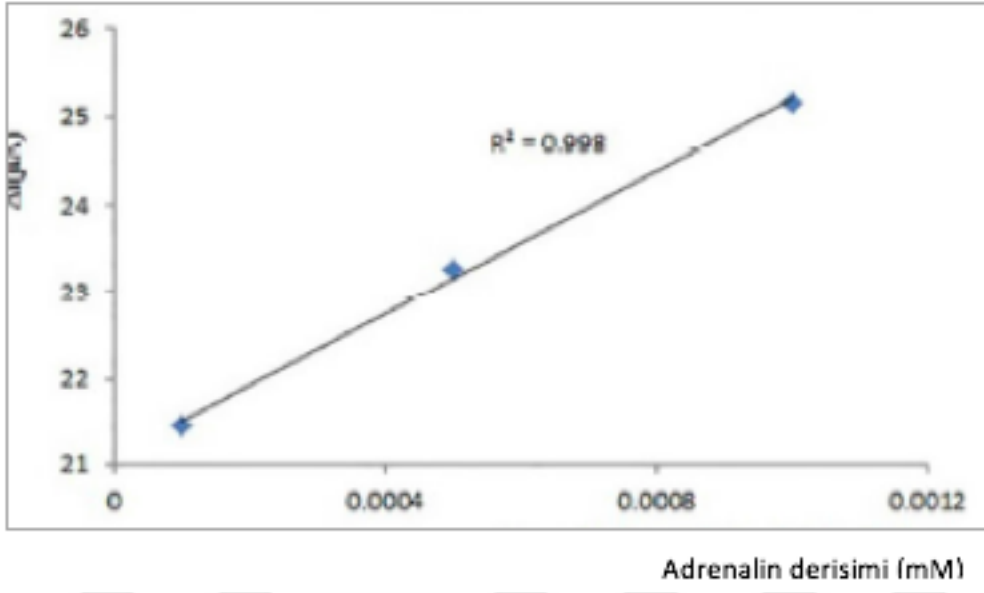
Bu elde edilen grafiğin adı Michaelis-Menten grafiğidir. Michaelis-Menten grafiği incelendiğinde akımların belli bir derişim değerine kadar doğrusal olarak arttığı, daha sonra ise sabit kaldığı görülmektedir. Sabit kaldığı noktadan itibaren enzim aktif merkezi, substrata doymuş ve artan adrenalin derişimine karşılık amperometrik cevap akımı sabit kalmıştır. Fosfat 5 tamponu ile elde edilen sonuçlarda akım değerleri daha yüksek çıktığı için fosfat 8 tamponu dikkate alınmamıştır.

Enzim elektrodun artan adrenalin derişimine karşı, artan akım değerleri ile verdiği doğrusal aralık kalibrasyon bölgesi olarak seçilir. Seçilen bu bölgeler değerlendirildiğinde lakkaz enziminin iki farklı kalibrasyon bölgesi olduğu görüldü. (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Bu grafiklerden yola çıkarak elektrodun çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M ve $1,0 \times 10^{-6}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ M olarak bulundu. Tayin sınırı $1,0 \times 10^{-8}$ olarak bulundu. Literatür ile karşılaştırıldığında hazırlanan biyosensörün çalışma aralığının geniş ve düşük adrenalin derişimlerine karşı hassas olduğu görülmektedir. [10,11] Bu aralıklarda doğrusallığın iyi olduğu ve bu aralıkların kantitatif analizlerde kullanılabileceği söylenebilir. Sonuç olarak, enzim elektrotuna ait en düşük tayin sınırı $1,0 \times 10^{-8}$ M olarak bulundu. Biyosensörün cevap süresi ise 200 s olarak belirlendi.

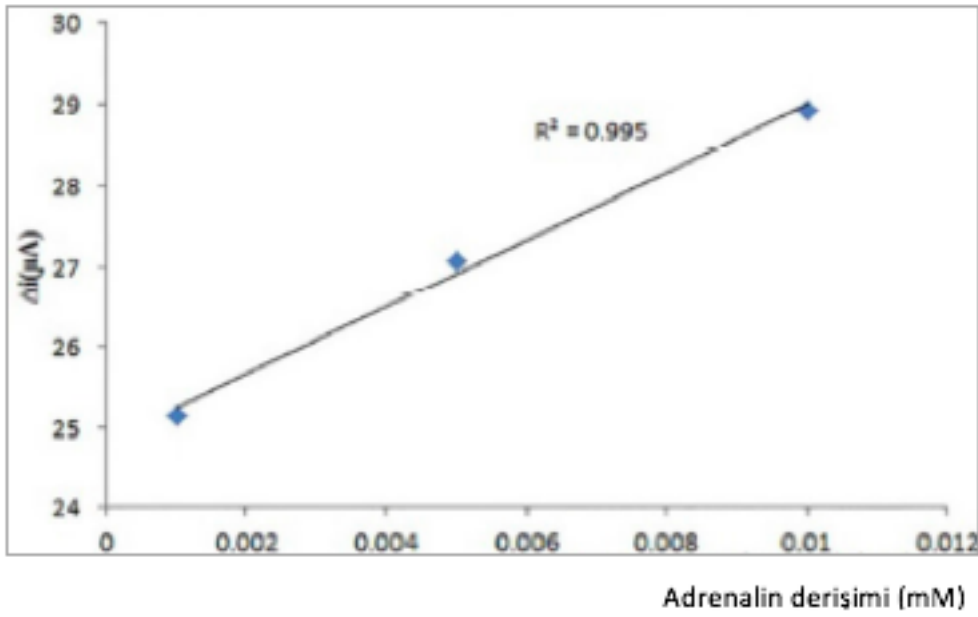
Michaelis – Menten eşitliğinin her iki tarafının da tersi alınarak yeni bir eşitlik ve doğrusal olan bir grafik Lineweaver – Burk grafiği elde edildi. Doğrusal olarak elde edilen bu grafikten yararlanılarak $K_m(\text{göz})$ ve $I_{\text{maks}}(\text{göz})$ değerleri hesaplandı. Sırasıyla $K_m(\text{göz})$ ve $I_{\text{maks}}(\text{göz})$ 0,027 μM ve 27,3 μA şeklinde bulundu. Biyosensörün $K_m(\text{göz})$ değeri literatürdeki diğer adrenalin biyosensörlerine ait K_m değerleri ile kıyaslandığında biyosensörümüze ait değerin daha düşük olduğu görüldü [10,54].



Şekil 4.6. Biyosensörün amperometrik cevabına adrenalin derişiminin etkisi
(Lineweaver- Burk grafiği, 0,1 M pH 5,0 fosfat tamponu, 25 °C, -0,220 V)



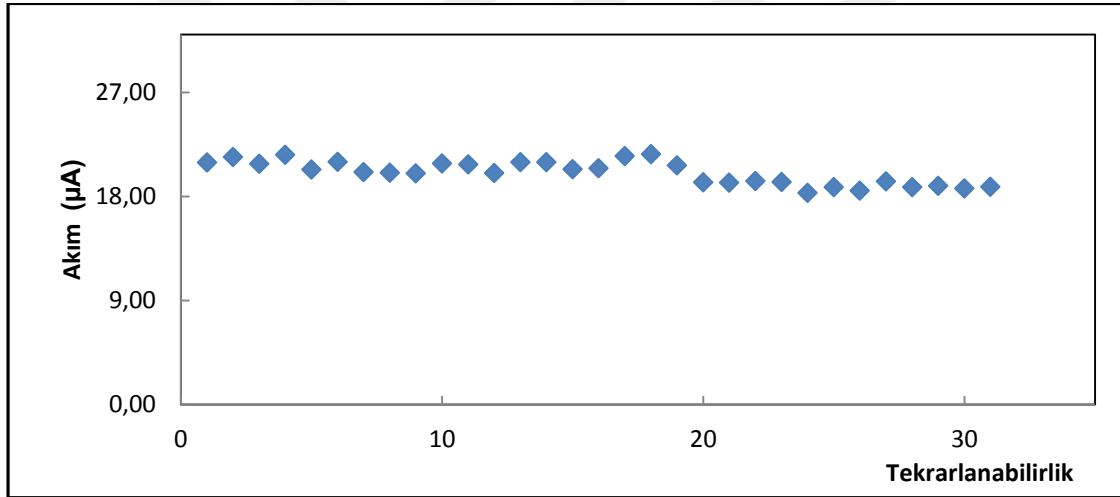
Şekil 4.7. Adrenalin biyosensörü için kalibrasyon grafiği a (0,1 M pH 5,0 fosfat tamponu, 25 °C, -0,220 V)



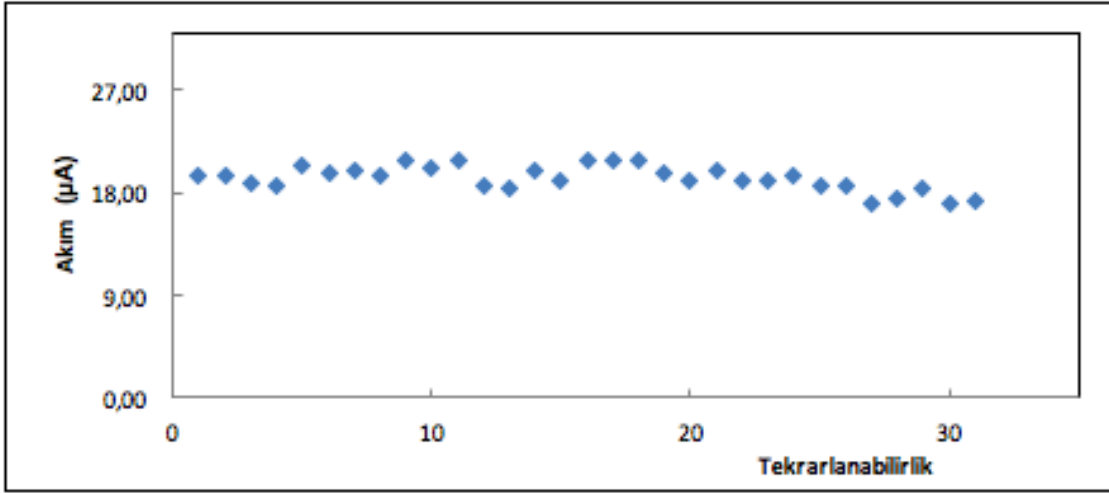
Şekil 4.8. Adrenalin biyosensörü için kalibrasyon grafiği b (0,1 M pH 5,0 fosfat tamponu, 25 °C, -0,220 V)

4.3.4. Enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

Bölüm 3.5’de anlatıldığı şekilde hazırlanan elektrot ile arka arkaya ölçümler alınarak enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliği ölçüldü. 5×10^{-6} M hücre içi derişimine sahip adrenalin çözeltisi hücreye eklenmek üzere bu şekilde arka arkaya 31 ölçüm alındı. Ölçme sayısına karşı amperometrik akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.9). 31 ölçüm sonucunda bağıl standart sapma pH 5 için % 4,007 olarak bulundu. Aynı işlemler pH 8 tamponu içinde yapıldı. 31 ölçüm sonucunda bağıl standart sapma pH 8 için % 5,88 olarak bulundu (Şekil 4.10). Grafikler ve elde edilen veriler incelendiğinde pH 5 fosfat tamponu ile biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin pH 8 tamponuna göre daha iyi olduğu gözlemlenmiştir.



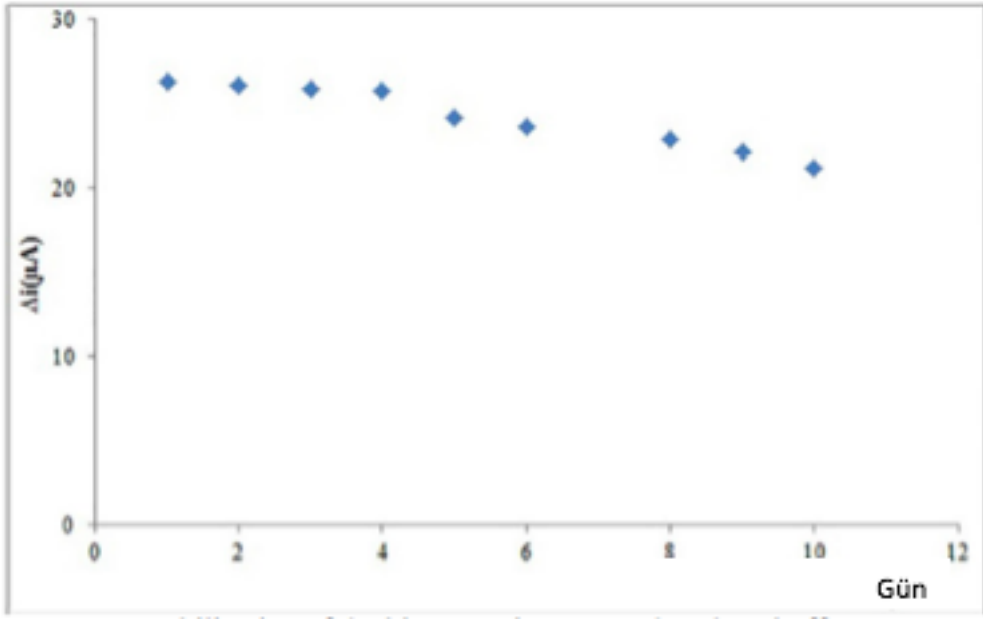
Şekil 4.9. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi (0,1 M pH 5,0 fosfat tamponu, 25 °C, -0,220 V)



Şekil 4.10. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi (0,1 M pH 8,0 fosfat tamponu, 25 °C, -0,220 V)

4.3.5. Enzim elektrodun raf ömrünün belirlenmesi

Zamanla enzimlerin aktif merkezlerinde bozulmalar meydana gelmekte ve enzimler, zaman içerisinde elektrot yüzeyinden ayrılarak tampon çözeltiye geçebilmektedirler. Bu ve benzeri etmenler, enzim elektrodun amperometrik cevap akımlarında bir süre sonra azalmalara sebep olabilir. Bölüm 3.7' deki gibi hazırlanan elektrot ile on gün boyunca pH 5 fosfat tamponu kullanılarak ölçümler alındı. Hücre içi derişimi $5,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde adrenalin ilaveleri yapıp, on gün boyunca elde edilen akım farkı değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.11). Elde edilen veriler değerlendirildiğinde elektrodun on gün sonunda % 80,90 oranında aktivitesini koruduğu, % 19,10 oranında aktivitesini kaybettiği görülmektedir.



Şekil 4.11. Biyosensörün raf ömrü (0,1 M pH 5,0 fosfat tamponu, 25°C, -0,220 V)

4.4. Hazırlanan Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler

Tayin yapılacak ortamda bulunan bazı elektro aktif türler çalışılan potansiyelde indirgenip/yükseltgenerek bozucu etkiye sebep olabilir. Çalışma potansiyeli düşürülerek veya çalışılacak numune seyreltilerek elektro aktif türlerin bozucu etkisi ortadan kaldırılabılır. Bölüm 3.7’ de bahsedildiği şekilde girişim yapabilecek türlerin etkisi belirlendi. Çalışılan türler ve etkileri Çizelge 4.3’te gösterilmiştir. Bu maddelerin seyrelme sonucu girişim etkisi incelendi ve herhangi bir girişim etkisine rastlanmadı. Çünkü bütün maddelerden elde edilen akım değerleri farklı olduğu için hepsi kalibrasyon grafiğinin dışında kaldı. Girişim etkisi, amperometrik biyosensör çalışmalarının gerçek numune analizleri esnasında karşılaşılan en önemli sorunlardan birisidir. Bu yüzden en çok girişim etkisi görülen iki tür olan askorbik asit ve ürik asitin çalışılan potansiyelde girişim yapmadığı görülmektedir. Girişimin olmaması gerçek numune analizlerinin doğruluğu hakkında önemli bir gelişmedir.

Çizelge 4.3. Biyosensör üzerine girişim yapabilecek türlerin incelenmesi (0,1 M pH 5,0 fosfat tamponu, 25 °C, -0,220 V)

Girişim Yapan Tür	Hücre İçi Derişim(M)	Adrenalin Konsantrasyonu(M)	% Girişim
Ürik Asit	1×10^{-6}	1×10^{-6}	-
Askorbik Asit	1×10^{-6}	1×10^{-6}	-
Dopamin	1×10^{-6}	1×10^{-6}	-
Noradrenalin	1×10^{-6}	1×10^{-6}	0,32

4.5. Sentetik Numunede Adrenalin Tayini

Bölüm 3.9.'da anlatılan şekilde Drogsan'dan temin edilen sentetik numunede adrenalin analizi, hazırlanmış olan kalibrasyon grafiği kullanılarak gerekli hesaplamalar yapıp sonuçlar incelenerek biyosensörün tayini ne kadar doğru yaptığı araştırıldı. Elektrokimyasal hücreye pH 5,0 9 mL fosfat tamponu ve 0,1 M KCl çözeltisi konuldu. Dengeye gelmiş hücre içerisine, iki yüz kat seyrelme olacak şekilde sentetik numune çözeltisinden hücre çözeltisine ilave edildi. 300 s karıştırılıp, 200 s potansiyel uygulandı ve amperometrik cevap akımı ölçüldü. Bu akım değerine karşı gelen adrenalin derişimi kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplandı. Adrenalin miktarı $5,0 \times 10^{-6}$ M olarak alındı. Hazırlanan sentetik numune içerisindeki adrenalin derişimi $5,21 \times 10^{-6}$ M bulundu. Standart sapma değeri ise $(5,21 \pm 0,105) \times 10^{-6}$ M olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar üç ölçümün ortalamasını yansıtmaktadır. Elde edilen sonuçlar %90 güven aralığına girmektedir. Bu sensörümüzün sentetik numune analizleri için uygun olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇLAR

Sonuç olarak, bu çalışmada hazırladığımız adrenalin biyosensörünün;

- Doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M ve $1,0 \times 10^{-6}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ M olarak bulundu. Geniş bir derişim aralığında çalışlabilmektedir.
- Düşük bir tayin sınırına ($1,0 \times 10^{-8}$ M) sahiptir.
- Kabul edilebilir bir cevap süresine sahiptir. (200s)
- Arka arkaya alınan 31 ölçüm sonucunda standart sapma %5,08 olarak, kalan aktivite ise %89,9 olarak hesaplandı. Dolayısıyla biyosensör iyi bir tekrar kullanılabilirliğe sahiptir.
- Raf ömrünün belirlenmesinde, 10. günün sonunda enzim elektrodun % 80,90 oranında aktivitesini koruduğu, % 19,10 oranında aktivitesini kaybettiği görülmektedir. Dolayısıyla biyosensör iyi bir raf ömrüne sahiptir.
- Optimum çalışma pH'sı, pH 5,0 ve pH 8,0 fosfat tamponları olarak belirlendi.
- $K_{m(göz)}$ ve $I_{maks(göz)}$ değerleri pH 5 tamponu için sırasıyla $0,027 \mu M$ ve $27,3 \mu A$ olarak bulundu.
- Optimum sıcaklık değeri $30^{\circ}C$ olarak bulundu.
- Sensörümüz %90 güven aralığına analiz yapabilmektedir.

Adrenalin biyosensörü çalışmasından elde edilen sonuçların literatür sonuçları ile karşılaştırılması:

- Biyosensör çalışmamızda doğrusal çalışma aralıkları $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M ve $1,0 \times 10^{-6}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ M olarak bulundu. Literatür ile karşılaştırıldığında hazırlanan biyosensörün çalışma aralığının geniş ve düşük adrenalin derişimlerine karşı hassas olduğu görülmektedir.
- Hazırlanan biyosensör düşük tayin sınırına sahiptir. Tayin sınırının düşüklüğü küçük derişimlerdeki madde miktarı tayinine olanak tanınması açısından önemlidir.
- Biyosensörün $K_{m(göz)}$ değeri, $0,027 \mu M$ olarak bulundu. Literatürdeki diğer adrenalin biyosensörlerine ait K_m değerleri ile kıyaslandığında biyosensörümüze ait değer daha düşük olduğu görüldü. K_m değerinin küçük olması sayesinde, enzimlerin immobilize edildiği PPy-PVS filmin enzimlerin substratlara karşı ilgisini artırdığı söylenebilir.
- Hazırlanışı basit ve ucuzdur.
- %90 güven aralığı ile sensörümüz sentetik numune analizleri için uygundur.

- Kanda en çok girişim etkisi görülen iki tür olan askorbik asit ve ürik asit girişim yapmamaktadır.
- Bazik ortamda çalışılması gereken durumlar için de uygundur.
- Oldukça iyi bir tekrarlanabilirliğe sahiptir.
- Ard arda yapılan çalışmalar için uygundur ancak geniş zaman aralığı gerektiren çalışmalar için uygun değildir.



Çizelge 4.4. Çalışma sonuçları ile literatürün karşılaştırılması

Çalışma Elektrodu/Yöntem	Substrat	Çalışma Potansiyeli	Doğrusal Aralık	İmmobilizasyon tekniği	Opt pH	Opt. sıcaklık	Raf Ömrü	Ref.
Çalışmada lakkaz kitosan üzerine immobilize edilmiş/clark elektrot	fenol	-	-	çapraz bağlanma ve adsorpsiyon	4,0	60 °C	-	53
Karbon pasta elektrot 375 mg grafit, 23 mg ham lakkaz özü ve 110 mg nujol karıştırılması ile hazırlanmış/DPV	adrenalin	-174	$6,0 \times 10^{-5}$ - $7,0 \times 10^{-4}$ M	-	7,0	-	-	56
Grafit, nüjol ve değişik kaynaklardan elde edilen lakkaz-peroksidaz enzimlerinin ham karışımını/DPV	adrenalin	-	$6,1 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ M	adsorpsiyon	7,0	35 °C	-	58
Lakkaz enzimi ince cıva film ile kaplı cam karbon elektrot üzerine immobilize edilmiş/amperometrik	katekol	-	$0,5 \times 10^{-6}$ - $5,0 \times 10^{-6}$ M	çapraz bağlama	4,5	35 °C	-	60
Lakkaz modifiyeli grafit elektrot/akış enjeksiyon	adrenalin	-50 mV	$1,0 \times 10^{-6}$ - $7,9 \times 10^{-5}$ M	adsorpsiyon	5,0	-	-	61
Grafit tozu, lakkaz, Nujol ve Pt-BMI.PF ₆ /kare dalga	adrenalin	-0,21 V	$9,99 \times 10^{-7}$ M - $2,13 \times 10^{-4}$	adsorpsiyon	6,5	-	90 gün % 95,2 aktivite kalmıştır	62
Sol-jel üzerine ferrosen varlığında lakkaz enzimi immobilize edilmiş/	fenol	+50 mV	-	tutuklama	6,0	-	21 gün sonunda % 81 aktivite kalmıştır	63
Beyaz çürükçül mantarın liyofilize biyokütlesinin jelatin ile platin elektrot üzerine immobilize edilmesi/CV	adrenalin	-	5×10^{-6} - $1,0 \times 10^{-4}$ M	çapraz bağlama	4,5	20 °C	-	64
Pt-PPy-PVS elektrot üzerine lakkaz enzimi immobilize edildi/amperometrik	adrenalin	-0,220V	$1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M ve $1,0 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M	çapraz bağlama	5,0 ve 8,0	30 °C	10 gün sonunda %89,9 aktivite kalmıştır	Bu çalışma



KAYNAKLAR

1. Bulut, Y. (2011, 16-18 Mayıs). *Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış*. 6th International Advanced Technologies Symposium, Elazığ.
2. Ni, J., Ju, H., Chen, H. and Leech D. (1999). Amperometric Determination of Epinephrine With An Osmium Complex And Nafion Double-layer Membrane Modified Electrode. *Analytica Chimica Acta*, 378(15), 151-157.
3. Yang, Z., Hu, G., Chen, X., Zhao, J. and Zhao G. (2007). The nano-Au Self-assembled Glassy Carbon Electrode for Selective Determination of Epinephrine in The Presence of Ascorbic Acid . *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 54(1) 230-235.
4. İnternet:URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fdocuments.tips%2Fdocuments%2Fkatekolaminler-ve-metabolizmalari.html&date=2016-06-21>, Son Erişim Tarihi: 21.06.2016.
5. Marangoz, C. (2012, 25-29 Eylül). *Bir Epilepsi Modelinin Bizdeki Hikâyesi*. TFBD 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Trabzon.
6. Ağyön, E. (2012). *Genç Kayakla Atlamacılarda Gevşeme Egzersizlerinin Bazı Stres Hormonları ve Proteinleri Üzerine Etkileri*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 8-10.
7. Keskin, Ö. ve Tuncer, A. (2005). Anafilaksi. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 36(2), 98-104.
8. Karaman, S. ve Oğuz, H. (2011). Glukomda Tıbbi Tedavi. *Glaucoma Cataract Journal*, 6(Özel Sayı), 97-103.
9. Felix, F.S., Yamashita, M. and Angnes, L. (2006). Epinephrine Quantification in Pharmaceutical Formulations Utilizing Plant Tissue Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(12), 2283-2289.
10. Shakrokhian S., Ghalkhani M. and Amini M.K. (2009). Application of Carbon-Paste Electrode Modified With Iron Phthalocyanine For Voltammetric Determination Of Epinephrine In The Presence Of Ascorbic Acid And Uric Acid. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 137(2), 669-675.
11. Ren W., Luo H.Q. and Li N.B (2006). Simultaneous Voltammetric Measurement of Ascorbic Acid, Epinephrine and Uric Acid at a Glassy Carbon Electrode Modified With Caffeic Acid. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(7), 1086-1092.
12. Thevenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S (2001). Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions And Classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(1-2), 121-131.
13. Carrera, V., Sabater, E., Vilanova, E. and Sogorb, M. (2007). A Simple And Rapid HPLC-MS Method For The Simultaneous Determination of Epinephrine,

- Norepinephrine, Dopamine And 5-Hydroxytryptamine: Application to The Secretion Of Bovine Chromaffin Cell Cultures. *J Chromatogr B Analytical Technologic Biomedical Life Science.*, 847(2), 88-94.
14. Chicharro, M., Sanchez, A., Zapardiel, A., Rubianes, M.D. and Rivas, G. (2004). Capillary Electrophoresis Of Neurotransmitters With Amperometric Detection At Melanin-Type Polymer-Modified Carbon Electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 523(2), 185-191.
 15. Michalowski, J. and Halaburda, P. (2001). Flow-Injection Chemiluminescence Determination Of Epinephrine In Pharmaceutical Preparations Using Raw Apple Juice As Enzyme Source. *Talanta*, 55(6), 1165-1171.
 16. Solich, P., Polydorou, K., Koupparis, M.A. and Efstathiou, C.E. (2000). Basic Concepts of Artificial Neural Network (ANN) Modeling and Its Application in Pharmaceutical Research. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22(5), 781-789.
 17. Fotopoulou, M. A. and Ioannou, P.C. (2002). Post-Column Terbium Complexation and Sensitized Fluorescence Detection for The Determination of Norepinephrine, Epinephrine and Dopamine Using High-Performance Liquid Chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 462(2), 179-185.
 18. Silva, L.I.B., Ferreira, F.D.P., Freitas, A.C., Santos, R. and Duarte, A.C. (2009). Optical Fiber Biosensor Coupled to Chromatographic Separation For Screening Of Dopamine, Norepinephrine and Epinephrine in Human Urine and Plasma. *Talanta*, 80(2), 853-857.
 19. Kang, W.J., Niu, L.M. and Ma, L. (2009). 2,3-Dimercaptosuccinic Acid Self-Assembled Gold Electrode for The Simultaneous Determination of Epinephrine and Dopamine. *Chinese Chemical Letters*, 20(2), 221-224.
 20. Xin, Y., Fu Wang, S., Hua Zhang, X. and Fang Huang, Y. (2006). Simultaneous Determination Of Epinephrine And Ascorbic Acid At The Electrochemical Sensor of Triazole SAM Modified Gold Electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 113(1), 156-161.
 21. Wang Y.S., Fice, D.F. and Yeung, P. (1999). A Simple High-Performance Liquid Chromatography Assay for Simultaneous Determination of Plasma Norepinephrine, Epinephrine, Dopamine and 3,4-Dihydroxyphenyl Acetic Acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21(3), 519-525.
 22. Bayşu Sözbilir N. ve Bayşu N. (2008). *Biyokimya*.(İkinci Baskı). Ankara: Güneş Yayınları, 320-378.
 23. Doğan, P. (2005). Katekolamin Biosentezi ve Metabolik Etkileri. *Türkiye Klinikleri Journal of International Medical Science*, 1(3), 88-92.

24. İnternet:URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.newworldencyclopedia.org%2Fentry%2FEpinephrine&date=2016-06-21>, Son Erişim Tarihi: 21.06.2016.
25. Tüzün, C. (1992). *Biyokimya*. (İkinci Baskı). Ankara: Palme Yayıncılık, 124-150.
26. Nelson, D.L. and Cox M.M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. (4th Edition). New York: W.H. Freeman and Company, 192-193.
27. Asi, T. (Editörler). (1999). *Tablolarla Biyokimya Cilt 2*, Ankara: Nobel Tıp Kitapevi, 84-85.
28. Altınışık, M. (2010). Karbonhidrat Metabolizması Bozukluklarına Biyokimyasal Yaklaşım. *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 11(1), 51-59.
29. Talens-Perales,D., Marín-Navarro,J. and Polaina, J. (Editörler). (2016). *Encyclopedia of Food and Health*, United Kingdom: Elsevier, 430-538.
30. Fersht, A. (1999). *Structure and Mechanism In Protein Science : A Guide To Enzyme Catalysis And Protein Folding*.(2rd Edition). New York: W.H. Freeman and Company, 85-86.
31. Damodaran, S., Parkin, K.L. and Fennema, O.R. (2007). *Fennema's Food Chemistry*, United States of America: CRC Press, 333-393.
32. Tuncer, M. (2010). Lakkaz, Kısım 1: Yapısı, Katalitik Özellikleri Ve Dağılımları. *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22(1), 16-63.
33. Tuncer, M. (2010). Lakkaz, Kısım 2: Potansiyel Endüstriyel ve Biyoteknolojik Uygulamaları. *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22(1), 65-103.
34. Demiralp, B., Büyük, İ., Aras, S. ve Duman, D. (2015). Lakkaz Enziminin Endüstriyel Ve Biyoteknoloji Alanında Kullanımı . *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72(4), 351-368.
35. Sulak M.T. (2009). *Laccase Enzimini Temel Alan Amperometrik Fenol Biyosensörünün Geliştirilmesi*, Doktora Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, 32-36.
36. Cañas, A.I. and Camarero, S. (2010). Laccases and Their Natural Mediators: Biotechnological Tools for Sustainable Eco-Friendly Processes. *Biotechnology Advances*, 28(6), 694-705.
37. Fernández, J.L.M. (2011). *Laccases from New Fungal Sources and Some Promising Applications*, Yüksek Lisans Tezi, Lund University Department of Biotechnology, Sweden, 27-32.

38. İnternet:URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Farmstrong.chem.ox.ac.uk%2F%2Flaccase.html&date=2016-06-21>, Son Erişim Tarihi: 21.06.2016
39. İnternet:URL:<http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fen.wikipedia.org%2Fwiki%2FToxicodendron&date=2016-06-21>, Son Erişim Tarihi: 21.06.2016
40. Otlu, B. (2011, 16-18 Mayıs). *Biyosensörler: Biyoreseptör Moleküller*. 6th International Advanced Technologies Symposium, Elazığ.
41. Hasançebi, Ö. (2008). *Biyosensör Hazırlamada Enzim Kaynağı Olarak Değerlendirilmek Üzere Bazı Bitkisel Dokuların İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 20-23.
42. Abasıyanık, M.F., Şakalar, E., Şenel, M. (2010). *Biyosensörlere Genel Bir Bakış ve Biyosavunmada Kullanılan Biyosensörler*. Fatih Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Biyoloji Bölümü, Kimya Bölümü, 1-6.
43. Aykut, U. ve Temiz, H. (2006). Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3(1), 51-59.
44. İnternet:URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Feng.ege.edu.tr%2F%2F7Eotles%2FBiyosensörler%2Fturkce%2Fcesit.html&date=2016-06-21>, Son Erişim Tarihi: 21.06.2016
45. Saçak, M. (2004). *Polimer Kimyası* (İkinci Baskı). Türkiye: Gazi Kitabevi, 423-440.
46. Dzyadevych, S. V., Arkhypova, V. N., Soldatkin, A. P., Elskaya, A. V., Martelet, C., and Jaffrezic-Renault, N., (2008), Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future, *ITBM-RBM*, 29: 171–180.
47. Skoog, D. A., West, D. M. and Holler, F. J. (1996). *Fundamentals of Analytical Chemistry*.(7th Edition). Orlando: Saunders College Publishing, 350-397.
48. Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J. and Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors (Basel)*, 8(3), 1400-1458.
49. Yıldırımoğlu, F. (2009). *Kolesterol Tayini İçin Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 17-19.
50. Gade, V.K., Shirale, D.J., Gaikwad, P.D., Savale, P.A., Kakde, K.P., Kharat, H.J. and Shirsat, M.D. (2006). Immobilization Of GOD On Electrochemically Synthesized Ppy-PVS Composite Film by Cross-Linking via Glutaraldehyde for Determination of Glucose. *Reactive and Functional Polymers*, 66(12), 1420-1426.
51. Sassolas, A., Blum, L.C. and Leca-Bouvier B.D. (2012). Immobilization Strategies to Develop Enzymatic Biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489-511.

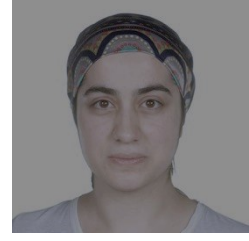
52. Makas, Y.G. (2008). *Poli(Akrilamit-Akrilik Asit)/Aljinat, Poli(Akrilamit-Itakonik Asit)/Aljinat, Poli(Akrilamit-Akrilik Asit)/K-Karragenan, Poli(Akrilamit-Itakonik Asit)/K-Karragenan Hidrojellerinde Lakkaz Immobilizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 13-25.
53. D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Mattia, E.D. and Sermanni, G.G. (1999). Characterization of Immobilized Laccase From *Lentinula Edodes* and Its Use in Olive-Mill Wastewater Treatment. *Process Biochemistry*, 34(6-7), 697-706.
54. D'Annibale, A. Stazi, S.R., Vinciguerra, V. and Sermanni, G.G. (2000). Oxirane-Immobilized *Lentinula Edodes* Laccase: Stability And Phenolics Removal Efficiency In Olive Mill Wastewater. *Journal of Biotechnology*, 77(2), 265-273.
55. Freire, R.S., Duran, N. and Kubota, L.T. (2001). Effects of Fungal Laccase Immobilization Procedures for The Development of a Biosensor for Phenol Compounds. *Talanta*, 54(5), 681-686.
56. Leite, O.D., Fatibello-Filho, O. and Barbosa A.M. (2003). Determination of Catecholamines in Pharmaceutical Formulations Using a Biosensor Modified with a Crude Extract of Fungi Laccase (*Pleurotus ostreatus*). *Journal of Brazilian Chemistry Society*, 14(2), 297-303.
57. Haghghi, B., Gorton, L., T. Ruzgas, T. and Jönsson, L.J. (2003). Characterization Of Graphite Electrodes Modified With Laccase From *Trametes Versicolor* and Their Use for Bioelectrochemical Monitoring of Phenolic Compounds in Flow Injection Analysis. *Analytica Chimica Acta*, 487(1), 3-14.
58. Leite, O.D., Lupetti, K.O., Fatibello-Filho, O., Vieira, I.C. and Barbosa, A.M. (2003). Synergic Effect Studies of The Bi-Enzymatic System Laccase Peroxidase in a Voltammetric Biosensor for Catecholamines. *Talanta*, 59(5), 889-896.
59. Ferry, Y. and Leech, D. (2005). Amperometric Detection of Catecholamine Neurotransmitters Using Electrocatalytic Substrate Recycling at a Laccase Electrode. *Electroanalysis*, 17(2), 113-119.
60. Kirgöz, Ü.A., Tural, H., Timur, S., Pazarlıoğlu, N., Telefoncu, A. and Pilloton, R. (2005). Laccase Biosensors Based on Mercury Thin Film Electrode. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 33(4), 447-456.
61. Jarosz-Wilkolazkaa, A., Ruzgas, T. and Gorton, L. (2005). Amperometric Detection of Mono- And Diphenols At *Cerrena Uicolor* Laccase-Modified Graphite Electrode: Correlation Between Sensitivity And Substrate Structure. *Talanta*, 66(5), 1219-1224.
62. Brondani, D., Scheeren, C.W., Dupont, J. and Vieira, I.C. (2009). Biosensor Based On Platinum Nanoparticles Dispersed in Ionic Liquid and Laccase for Determination of Adrenaline. *Sensors and Actuators B*, 140(1), 252-259.

63. Montereali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W. and Pilloton R. (2010). A Disposable Laccase-tyrosinase Based Biosensor for Amperometric Detection of Phenolic Compounds in Must and Wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64(3-4), 189-194.
64. Akyilmaz, E., Turemis, M. and Yasa, I. (2011). Voltammetric Determination of Epinephrine By White Rot Fungi (Phanerochaete Chrysosporium ME446) Cells Based Microbial Biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 2590-2594.
65. Huang, J., Fang, H., Liu, C., Gu, E. and Jiang D. (2008). A Novel Fiber Optic Biosensor for the Determination of Adrenaline Based on Immobilized Laccase Catalysis. *Analytical Letters*, 41(8), 1430-1442.
66. Fogel, R. and Limson, J.L. (2013). Electrochemically Predicting Phenolic Substrates' Suitability for Detection by Amperometric Laccase Biosensors. *Electroanalysis*, 25(5), 1237-1246.
67. Cesarino, I., Galesco, H.V., Moraes, F.C., Lanza, M.R.V. and Machado, S.A.S. (2013). Biosensor Based on Electrocodeposition of Carbon Nanotubes/ Polypyrrole/Laccase for Neurotransmitter Detection. *Electroanalysis*, 25(2), 394-400.
68. Xu, X., Guo, M., Lu, P. and Wang R. (2010). Development of Amperometric Laccase Biosensor Through Immobilizing Enzyme in Copper-Containing Ordered Mesoporous Carbon (Cu-OMC)/Chitosan Matrix. *Materials Science and Engineering C*, 30(5), 722-729.
69. Chaubey, A., Gerard, M., Singhal, M., Singh, V.S., Malhotra, B.D. (2000). Immobilization of Lactate Dehydrogenase on Electrochemically Prepared Polypyrrole-Polyvinylsulphonate Composite Films for Application to Lactate Biosensors. *Electrochimica Acta*, 46(5), 723-729.
70. Silva, T.R. and Vieira, I.C. (2015). A Biosensor Based on Gold Nanoparticles Stabilized In Poly(Allylamine Hydrochloride) and Decorated With Laccase for Determination of Dopamine. *The Analyst*, 141(1), 216-224.
71. Çolak, Ö. (2014). *Sakkaroz Tayini İçin Biyosensör Hazırlanması*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 153-182.
72. Özdemir, M. (2012). *Kolin Tayini İçin Polipirol-Polivinilsülfonat Filme Kolin Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu İle Biyosensör Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 82-83.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DURMUŞ, Selma
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 14.09.1988, Ankara
Medeni hali : Evli
Telefon : 0 (545) 979 32 26
e-mail : selmadurmus@outlook.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Kimya	Devam Ediyor
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi/ Kimya Öğretmenliği	2010

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1- Arslan, F., Durmuş S., Çolak ve Arslan, H. (2015). A New Laccase-Based Biosensor for Epinephrin Determination. *Gazi University Journal of Science*, 28(1), 1-9.



GAZİ GELECEKİR..