T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pt BİRİKTİRİLMİŞ POLİVİNİL FERROSEN MODİFİYE Pt ELEKTRODUNU TEMEL ALAN YENİ BİR KOLİN BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Mehmet ÇINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA MÜH. ANABİLİM DALI

Konya, 2006

T.C

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pt BİRİKTİRİLMİŞ POLİVİNİL FERROSEN MODİFİYE Pt ELEKTRODUNU TEMEL ALAN YENİ BİR KOLİN BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

MEHMET ÇINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA MÜH. ANABİLİM DALI

Bu tez 22.09.2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği /oyçokluğu ile kabul edilmiştir

Doç. Dr. Ahmet GÜLCE	**Prof. Dr. Handan GÜLCE**	**Prof. Dr. Refika KURBANLI**
(Danışman)	**(Üye)**	**(Üye)**

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Pt BİRİKTİRİLMİŞ POLİVİNİL FERROSEN MODİFİYE Pt ELEKTRODUNU TEMEL ALAN YENİ BİR KOLİN BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Mehmet ÇINAR

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Müh. Anabilim Dalı

Danışman : Doç.Dr. Ahmet GÜLCE
2006, 71 Sayfa
Jüri :
Doç.Dr. Ahmet GÜLCE
Prof.Dr. Handan GÜLCE
Prof.Dr. Refika KURBANLI

Basit ve hassas amperometrik kolin enzim elektrodunun tasarlanması için yeni bir yöntem hazırlanmıştır. Bu çalışmada iki yeni kolin enzim elektrodu geliştirilmiştir.

Çalışmanın birinci adımında, PVF kaplanmış Pt elektrot enzim çözeltisine daldırılarak kolin oksidaz enziminin (ChOx) polimer matriks içerisinde tutuklanması sağlanmıştır ve bu enzim elektrot PVF-ChOx enzim elektrodu olarak tanımlanmıştır. Elektrot cevabı üzerine polimerik film kalınlığı, pH, sıcaklık, substrat ve enzim konsantrasyonu etkisi araştırılmıştır. 25°C sıcaklıkta pH 7,4 olarak bulunmuştur. Cevap süresi 25-30 s ve lineer çalışma aralığının üst sınırı 3,9 mM kolin derişimidir. Tutuklanmış enzim sistemi için görünür Michaelis-Menten sabiti (Kmg) ve aktivasyon enerjisi sırasıyla 15,2 mM kolin ve 41,4 kJ/mol olarak bulunmuştur.

Çalışmanın ikinci adımında ChOx, PVF kaplanmış ve ardından Pt biriktirilmiş Pt elektrot üzerinde aynı yöntemle tutuklanmıştır ve bu enzim elektrot PVF-Pt-ChOx enzime elektrodu olarak tanımlanmıştır. Enzim elektrot cavabı üzerine Pt etkisi araştırılmıştır. 25°C sıcaklıkta pH 7,4 bulunmuştur. Cevap süresi 20-25 sn ve lineer çalışma aralığının üst sınırı 3,25 mM kolin derişimidir. Tutuklanmış enzim sistemi için görünür Michaelis-Menten sabiti (Kmg) ve aktivasyon enerjisi sırasıyla 3,19 mM kolin ve 34,38 kJ/mol olarak bulunmuştur.

Girişim yapabilecek maddelerin etkisi ve enzim elektrodunun kararlılığı da araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Kolin, Polivinilferrosen, Platin biriktirme, Enzim elektrot

ABSTRACT

Master Thesis

DEVOLOPMENT OF THE CHOLINE BIOSENSOR BASED ON THE Pt DEPOSITED PVF MODIFIED Pt EECTRODE

Mehmet CINAR

Selçuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemical Engineering

Supervisor : **Doç.Dr. Ahmet GULCE**

2006, 71 Page

Jury :

Doç.Dr. Ahmet GULCE

Prof.Dr. Handan GULCE

Prof.Dr. Refika KURBANLI

A novel strategy to construct a simple and sensitive amperometric cholin enzyme electrode was described. In this study, two novel choline enzyme electrodes were investigated.

In the first step of this study, the choline oxidase (ChOx) was incorporated into the polymer matrix by immersing PVF coated Pt electrode in enzyme solution for several times, and this enzyme electrode was called as PVF-ChOx enzyme electrode. The effects of the thickness of the polymeric film, pH, temperature, substrate and enzyme concentration on the response of the enzyme electrode were investigated. The optimum pH was found to be 7.4 at 25°C. The response time was found to be 25-30 sn and upper limit of the linear working portion was found to be 3.9 mM kolin concentration. The apparent Michaelis-Menten constant (Kmg) and the activation energy of this immobilized enzyme system were found to be 15.2 mM kolin and 41.4 kJ/mol, respectively.

In the second step of this study, ChOx was immobilized on PVF coated and then Pt deposited Pt electrode by the same strategy, and this enzyme electrode was called as PVF-Pt-ChOx enzyme electrode. The effect of the amount of Pt on the response of the enzyme electrode was investigated. The optimum pH was found to be 7.4 at 25°C. The response time was found to be 20-25 s and upper limit of the linear working portion was found to be 3.25 mM cholin concentration. The apparent Michaelis-Menten constant (Kmg) and the activation energy of this immobilized enzyme system were found to be 3.19 mM choline and 34.38 kJ/mol, respectively.

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

Key Words : Choline, Polyvinylferrocene, Platinum deposition, Enzyme electrode

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Kimya Müh. Bölümü Öğretim Üyelerinden Doç.Dr. Ahmet GÜLCE yönetiminde hazırlanarak, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Yüksek lisans tezimi yöneten ve çalışmalarım esnasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm ve her zaman destek olan sayın hocam Prof.Dr. Handan GÜLCE ve Doç.Dr. Ahmet GÜLCE' ye sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım esnasında sürekli yardım ve desteklerini gördüğüm arkadaşlarımdan ve özellikle Arş.Gör. Özlem GÖKDOĞAN'a, Arş.Gör. Eda TAĞA, Uzman Fatma SARIİPEK ve Zeynep GÖKTAŞ' a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tahsil hayatım boyunca her türlü fedakârlığı gösteren annem ve babama sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Mehmet ÇINAR

Konya-2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET……...….i
ABSTRACT……...……ii
ÖNSÖZ……...……iii
İÇİNDEKİLER……..……..……..iv
ŞEKİLLER İZİNİ…….……....vii
ÇİZELGELER İZİNİ……ix
1.GİRİŞ……...……1
2.KAYNAK RAŞTIRMASI...……..……..3
2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi……...……..…….3
2.1.1. Enzim Reaksiyonlarının Kinetiği….……...4
2.1.2. Enzim İmmobilizasyonu…….…..8
2.1.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri…….…….……8
2.1.3.1. Tutuklama yöntemi……..……..9
2.1.3.2. Çapraz bağlama yöntemleri…….……...10
2.1.3.3. Taşıyıcıya bağlama yöntemi…….…..……11
2.2. BİYOSENSÖRLER …….……13
2.2.1. Biyosensörlerin Kullanım Alanları……...15
2.2.2. Biyosensörlerde Kullanılan Biyokatalizörler……...…….....16
2.2.2.1. Enzimler……...…….16
2.2.2.2. Bakteri ve hücreler…….…….……...…….16
2.2.2.3. Dokular……...……..17
2.2.3. Biyosensörlerin Çalışma Mekanizması…….17
2.2.4. Kullanılan Sensörler…….……..18
2.2.4.1. Elektrokimyasal biyosensörler ….……18
2.2.4.1.1. Amperometrik biyosensörler…….…...……...18
2.2.4.1.2. Potansiyometrik biyosensörler…….……...19
2.2.4.1.3. Kondüktometrik biyosensörler…….…….....19
2.2.4.2. Optik biyosensörler…….……..…….20
2.2.4.3. Kalorimetrik biyosensörler …….……...20
2.2.4.4. Piezoelektrik biyosensörler …….……..20

2.2.5. Biyosensör Performans Kriterleri …….....21

2.3. KOLİN BİYOSENSÖRLERİ İLE YAPILAN BAZI UYGULAMALAR…23
2.4. POLİVİNİLFERROSEN MODİFİYE ELEKTROTLAR…….28
3. MATERYAL VE METOT……...36
3.1. Kronoamperometri……..……..36
3.2. Kullanılan Çözücünün Saflaştırılması.…….....37
3.3. Kullanılan Elektrotlar…….....37
3.4. Kullanılan Aletler……...……...…...37
3.5. Elektroliz Hücresi……..37
3.6. Enzim Çözeltisinin Hazırlanması…….38
3.7. Tampon Çözeltinin Hazırlanması ……...38
3.8. Kolin Çözeltisinin Hazırlanması…….……..38
3.9. $PtBr_2$ Çözeltisinin Hazırlanması ……..39
3.10. Vinilferrosenin Kimyasal Polimerizasyonu ……..…….....39
3.11. Enzim Elektrodunun Hazırlanması ……..39
3.12. Enzim Elektrot Aktivitesinin Belirlenmesi……...…….40
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA…….....……..42
4.1. (PVF-ChOx) Enzim Elektrot Aktivitesinin Belirlenmesi……...……43
4.1.1. Uygulanan gerilimin etkisi……..……..…….……44
4.1.2. PVF Derişiminin etkisi…….....45
4.1.3. PVF' de bekletme süresinin etkisi……..…….…….46
4.1.4. Enzimde bekletme süresinin etkisi…..……..46
4.1.5. Enzim derişimin etkisi…….…….……..…47
4.1.6. Çalışma pH'ının etkisi……....49
4.1.7. Çalışma sıcaklığının etkisi…….…….....50
4.1.8. PVF-ChOx enzim elektroduna substrat derişiminin etkisi…….....52
4.2. PVF-Pt-ChOx Enzim Elektrot Aktivitesinin Belirlenmesi……..……..54
4.2.1. $PtBr_2$ çözeltisinde bekletme süresinin etkisi …...…….....56
4.2.2. $PtBr_2$ derişiminin etkisi……..…….....57
4.2.3. PVF-Pt-ChOx enzim elektroduna substrat derişiminin etkis…….58
4.2.4. Sıcaklık etkisi…….…….....61
4.2.5. Geliştirilen elektrodun uzun süreli kararlılığı …...……...……..62

4.2.6. Girişimler……63
5. SONUÇ VE ÖNERİLER……...……...64
KAYNAKLAR…….....66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Reaksiyon Hızının Substrat Derişimi İle Değişimi...……..…….6
Şekil 2.2. Lineweaver-Burk Grafiği……..……6
Şekil 2.3. Sıcaklıkla reaksiyon hızının değişimi...……..…….....7
Şekil 2.4. Aktivasyon enerjisinin belirlenmesi…….…7
Şekil 2.5 Enzim immobilizasyon yöntemleri…….9
Şekil 2.6. Biyosensörlerin temel bileşenleri…….....14
Şekil 2.7. Redoks aracılı ve redoks aracısız elektron transferi…….19
Şekil 2.8. Ferrosen Polimerinin yükseltgenme-indirgenme tepkimesi…….....29
Şekil 2.9. Elektrokimyasal olarak katkılanmış PVF……..……30
Şekil 3.1. a) Kronoamperometrik uyarı……...…..36
Şekil 3.1. b) Kronoamperometrik cevap……36
Şekil 3.2 Elektrokimyasal çalışmaların yapıldığı hücre……38
Şekil 4.1. PVF-ChOx enzim elektrot aktivitesinin kolin derişimi ile değişimi…….....43
Şekil 4.2. PVF-ChOx enzim elektrot aktivitesinin PVF derişimi ile değişimi…….....45
Şekil 4.3. PVF-ChOx enzim elektrot için PVF çözeltisinde bekletme süresine karşı elde edilen akım değerleri……...46
Şekil 4.4. PVF-ChOx enzim elektrodunda tutuklama işlemi sırasında kullanılan enzim çözeltisinde bekletme süresine karşın elde edilen akım değerleri..……...47
Şekil 4.5. PVF-ChOx enzim elektrodunda tutuklama işlemi sırasında kullanılan çözeltideki enzim derişimine karşı elde edilen akım değerler...…….…..48
Şekil 4.6. PVF-ChOx enzim elektrodunda kullanılan tampon çözelti pH'sına bağlı olarak elde edilen akım değerleri……..……49
Şekil 4.7. PVF-ChOx enzim elektrodu ile sıcaklığa karşı elde edilen akım değerleri…….……50
Şekil 4.8. (PVF-ChOx) enzim elektrodu için Arrhenius grafiği……...51
Şekil 4.9.(a). PVF-ChOx enzim elektrot aktivitesinin kolin derişimi ile değişimi……..52

Şekil 4.9.(b). PVF-ChOx enzim elektrot aktivitesinin kolin derişimi ile değişimi veren doğrusal çalışma aralığı……...…….53
Şekil 4.10. Tutuklanmış enzim için Lineweaver-Burk grafiği……..54
Şekil 4.11. PVF-Pt-ChOx enzim elektrot aktivitesinin kolin derişimi ile değişimi.....56
Şekil 4.12. PVF-Pt-ChOx enzim elektrodunda kullanılan $PtBr_2$ çözeltisinde bekletme süresine karşı elde edilen akım değerleri……...57
Şekil 4.13. PVF-Pt-ChOx enzim elektrodunda kullanılan $PtBr_2$ derişimine karşı elde edilen akım değerleri…….....58
Şekil 4.14. PVF-Pt-ChOx enzim elektrot aktivitesinin kolin derişimi ile değişimi……..59
Şekil 4.15. PVF-Pt-ChOx enzim elektrot aktivitesinin kolin derişimi ile değişimi veren doğrusal çalışma aralığı……..……...59
Şekil 4.16. PVF-Pt-ChOx enzim elektrot için Lineweaver-Burk grafiği…….....60
Şekil 4.17. Tutuklanmış PVF-Pt-ChOx enzimi için reaksiyon hızının sıcaklıkla değişimi…….....61
Şekil 4.18. (PVF-Pt-ChOx) enzim elektrodu için Arrhenius grafiği……62
Şekil 4.19. Aynı elektrot ile farklı günlerde alınan maksimum akım değerleri..63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Biyosensörlerin uygulama alanları……..……15

Çizelge 2.2. Biyosensörlerlerle tayin edilebilen maddeler……..…(15-16)

1.GİRİŞ

Polimer film ile kaplanan elektrotların yüzey özellikleri kontrol edilebildiğinden bu modifiye elektrotlar elektroanaliz, elektrokataliz ve enerji dönüşümü amacıyla kullanılabilir. Modifiye edilmiş elektrotlar, eser miktardaki iyonların seçimli ve duyarlı olarak belirlenmesinde kullanılan analitik yöntemlerin geliştirilmesinde önemli bir potansiyel oluşturmaktadır.

Kolin insan organizmasında çok önemli fonksiyonu olan bir aminoalkoldur. Kolin safra sıvısı, beyin, yumurta sarısı, şerbetçi otu gibi birçok bitkisel ve bedensel organda ana bileşen olarak ya da insan sütündeki temel besin olarak, ya da amniotik sıvı, kan gibi farklı biyolojik sıvılarının bileşeni olarak bulunabilir. Ayrıca, lesitinin yapı taşıdır ve pek çok biyokimyasal prosesde anlamlı bir rol oynar. Hücre membranlarının yapımında kullanılan ve membranlardan geçişi kolaylaştıran temel membran fosfolipitlerinin yapımı için kolin gereklidir. Beyindeki kolin tayini, sinir sistemi iletimi ve düzenliliği mekanizmasının anlaşılmasında ve Parkinson ve Alzhemier hastalıkların tanımlanmasında önemlidir. Kolin ve kolin içeren fosfolipitlerin bu önemli fonksiyonları bu maddelerin tayini için analitik yöntemlerin geliştirilmesine olan ilgiyi giderek artırmaktadır. Kromotografik yöntemler bu maddelerin analizlerinde kullanılabilmektedir, ancak bunlar zaman alıcı ve pahalıdır.
Basit ve ucuz bir teknik olması sebebiyle kolin tayini için kolin oksidaz (ChOx) temelli enzim elektrotlarının geliştirilmesi araştırmacıların ilgisini çekmekte yeni enzim immobilizasyonu teknikleri ve yeni immobilizasyon materyalleri araştırılmaktadır.

Bu çalışmada PVF modifiye elektrodunu temel alan yeni kolin enzim elektrotları geliştirilmiştir.

İlk aşamada polivinilferrosen (PVF), vinilferrosenin kimyasal polimerizasyonuyla hazırlanmış ve elektrodun kaplanmasında metilen klorürdeki PVF çözeltisi kullanılmıştır. Çalışma elektrodunun polimerle

kaplanması daldırma kurutma yöntemi ile yapılmıştır. Pt elektrot belirli derişimdeki polimer çözeltisine belirli bir süre bekletilip çıkarıldıktan sonra kurutularak yüzeyin polimer film ile kaplanması sağlanmıştır. Böylelikle PVF modifiye elektrodu hazırlanmıştır.
Enzim elektrotlarının hazırlanması iki şekilde gerçekleştirilmiştir.

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

Bu çalışmada geliştirilen ikinci enzim elektrodu ise Pt biriktirilmiş PVF modifiye elektroduna ChOx enziminin tutuklanmasıyla hazırlanan ve PVF-Pt-ChOx enzim elektrodu olarak tanımlanan enzim elektrodudur. Bu elektrodun hazırlanmasında PVF-ChOx enzim elektrodu için bulunan optimum koşullar kullanılarak yüzeyde platin biriktirmenin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla PVF-Pt-ChOx enzim elektrodunun aktivitesine, elektrodun hazırlanması sırasında kullanılan çözeltideki Pt^{2+} derişimi, Pt^{2+} çözeltisinde bekletme süresi gibi deneysel parametrelerin etkileri araştırılarak optimum koşullar belirlenmiştir. Ayrıca her iki enzim elektrot için substrat derişimi ve sıcaklığın etkileri de araştırılarak tutuklanmış enzim sistemi için görünür Michealis-Menten (K_{mg}) ve aktivasyon enerjileri (E_a) hesaplanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi

Enzim terimi ilk defa Künhe tarafından 1878 yılında ortaya atılmıştır. Bu terim eski Yunancadaki "En" ve "Zyme" kelimelerinin bir araya getirilmesiyle oluşturulmuştur. En ve zyme kelimelerinin Türkçedeki karşılığı sırasıyla "içinde" ve "maya" olup en-zyme sözcüğü "maya içinde" veya "mayadaki madde" olarak Türkçeye çevrilebilir (Lodish ve ark. 1995).

Enzimler, canlı için yaşamsal önemi olan pek çok foksiyonun kontrolünde olan, bir yandan da organizmada hemen hemen bütün kimyasal tepkimelere katılarak, oluşumlarını çok hızlı bir şekilde hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Yalıtılan enzimlerin tümü protein yapısındadır ya da protein kısmı bulundururlar. Etki ettiği maddenin sonuna "ase = az" eki getirilerek ya da katalizlediği tepkimenin çeşidine göre adlandırılırlar. (Örneğin, kitine etki eden kitinaz enzimi gibi). Çok defa renksizdirler, bazen sarı, yeşil, mavi, kahverengi ya da kırmızı olabilirler. Suda ya da sulandırılmış tuz çözeltisinde çözülebilirler. Kuramsal olarak bir enzim belli bir tepkimeye girip, bir değişikliğe uğramadan çıktığı için, sürekli olarak aynı türden tepkimelere katılabilmelidir. Ancak gerçekte durum böyle değildir, çünkü enzimlerin de bir ömrü vardır (Arnold 1999).

Enzimlerin kimyasal katalizörlerden en önemli farkı özgün (spesifik) olmalarıdır. Genel olarak enzimler belirli maddeler arasındaki belirli reaksiyonları katalize ederler. Enzimlerin çoğu ancak belli özelliklere sahip bileşiklere karşı etkinlik gösterirler. Aynı bileşiğin çok ufak bir değişikliğe uğraması bile bu etkinliği yok edebilir. Bir enzimin ancak belli bir özellikteki substratı etkilemesine "Enzimin Seçiciliği" denir. Bu özellik enzimleri daha az seçici olan kimyasal katalizleyicilerden kesinlikle ayırır. Enzimler belirli tepkiyene, bağa veya gruba karşı seçicilik gösterebilirler.

Enzimlerin tümü protein yapısındadır (belirli reaksiyonları katalizleyen ve ribonükleoik asit yapısında olan ribozimler hariç). Enzimlerin protein kısmına apoenzim denir. Apoenzim ısı ile kolayca denatüre olur. Enzimlerin bazıları basit proteinlerdir. Bunların katalitik etki gösteren kısmı doğrudan doğruya proteinin polipeptit zinciridir. Birçok enzimin katalitik etki gösterebilmesi için proteinden başka metal iyonuna, bazılarının protein olmayan organik bir bileşiğe, bazılarının ise her ikisine de ihtiyacı vardır. Bu iyon veya bileşiğe genel olarak kofaktör adı verilir. Organik bileşik, enzimin protein kısmı ile oldukça sıkı birleşmiş ve ayrılmıyorsa prostetik grup, çok sıkı birleşmemiş ve ayrılabiliyorsa koenzim adını alır (Pişkin 1986).

Enzimler başlıca altı büyük sınıfa ayrılır. Bunlar kısaca şunlardır:

1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon-redüksiyon yani yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarını katalize eden enzimler bu sınıftandır.

2. Transferazlar: Fonksiyonel bir grubun transfer reaksiyonunu katalize eden enzimlerdir.

3. Hidrolazlar: Çeşitli bağların hidrolizini yani hidrolitik reaksiyonları katalize eden enzimlerdir.

4. Liyazlar: Bu enzimler C-C, C-O ve C-N arasındaki bağların hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla kırarlar veya bu atomlar arasına bir çift bağ ilave ederler.

5. İzomerazlar: Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri yani izomerirasyon reaksiyonlarını katalize ederler.

6. Ligazlar (Sentetazlar): C-O, C-S, C-N ve C-C arasında bir bağ oluşmasını sağlayan enzimlerdir. Bu enzimler genellikle ATP'deki yahut diğer trifosfatlardaki pirofosfatı hidrolize ederek iki molekülün birbirine bağlanmasını katalize ederler (Fennema 1996).

2.1.1. Enzim Reaksiyonlarının Kinetiği

Enzimler reaksiyon kinetiği ve mekanizması yönünden kimyasal katalizörlere benzerlerler. Reaksiyonda önce enzim ile substrat arasında bir ara bileşik oluşur. Bu kararsız ara bileşiğin oluşma hızı enzim ve substrat

derişimine bağlıdır. Reaksiyon koşulları ve enzim derişimi sabit tutulurken substrat derişimi artırılırsa reaksiyon hızı belli bir maksimum değere ulaşır. Bu değerden sonra, substrat derişimi artırılsa bile reaksiyon hızında bir değişme görülmez. Bunun nedeni, ortamdaki enzim moleküllerinin ortam substrat moleküllerini karşılayamamasıdır. Başka bir deyişle enzim-substrat ara bileşiğinin oluşum hızında enzim derişiminin kısıtlayıcı rol oynamasıdır. Enzimlerin bu davranışı 1913 yılında L. Michaelis ve M. Menten tarafından önerilen bir mekanizmayla açıklanmıştır.



(2.1)

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

Reaksiyon hızı için;

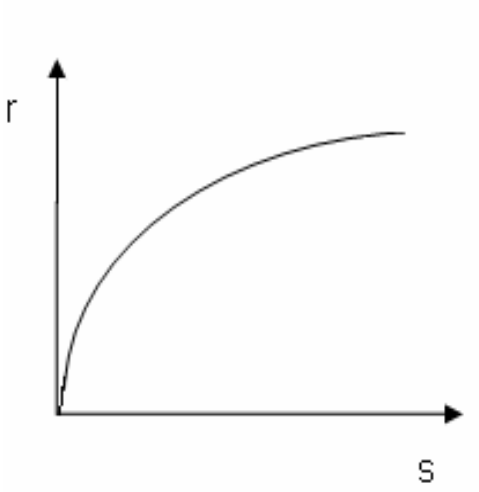
$$r = \frac{r_m . [S]}{Km + S} \qquad (2.2)$$

eşitliği elde edilir. Bu eşitlik (2.2)'de görüldüğü gibi belli bir değerden sonra substrat derişiminin artırılmasıyla tepkime hızının artmayıp sabit değerde kalmasını sağlar. Bu denklem Michaelis-Menten eşitliği ve "Km" de Michaelis-Menten sabiti diye tanımlanır. Fiziksel olarak Km katsayısı enzim ve substratın birbirine olan ilgisini olan ilgisini göstermektedir. Enzim ve substrat arasındaki ilgi fazla ise oldukça düşük substrat derişiminlerinde enzimi substrat ile doyurmak mümkün olur (Uslan 1986).

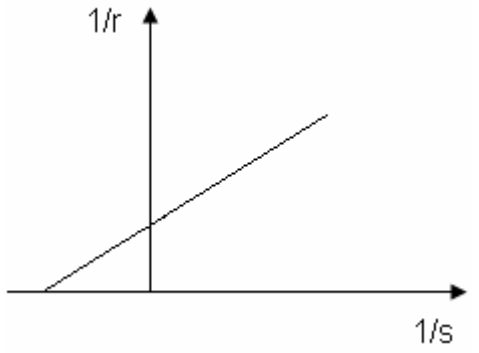
Lineerleştirmek için eşitlik 2.2'nin tersi alınır ve düzenlenirse;

$$\frac{1}{r} = \frac{Km}{r_m} . \frac{1}{S} + \frac{1}{r_m} \qquad (2.3)$$

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



Şekil 2.1 Reaksiyon Hızının Substrat Derişimi İle Değişimi (Uslan 1986)



Şekil 2.2. Lineweaver-Burk Grafiği (Uslan 1986)

Enzimin Km değeri bulunurken Şekil 2.2'de görünen ve 2.3 denklemi ile tanımlanan Lineweaver-Burk çiziminden yararlanılır.

Michael-Menten eşitliği, çözünmüş substratlar ve kütle aktarım kısıtlaması olmayan sistemler için geçerlidir. Bu nedenle çözünmez substrat sisteminde ve immobilize enzimlerde difüzyon kısıtlamalarından dolayı görünür Km değerleri verilir (Bailey ve Ollis 1997).

Enzim reaksiyonlarının hızı kimyasal kinetikten farklılık göstererek, sıcaklıkla önce artar; sonra azalır (Şekil 2.3.). Başka bir deyişle enzim aktivitesi

belirli bir optimum sıcaklığa kadar artar, sonra ısısal deaktivitasyon nedeniyle düşer. Enzimatik reaksiyonlar, kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi bu optimum sıcaklığa kadar Arrhenius kanuna uyar. Bu bölgede reaksiyon hız sabiti ve maksimum hız için;

$$k = A.e^{-Ea/RT} \quad (2.4)$$

$$r_m = k_3[E]_0 \quad (2.5)$$

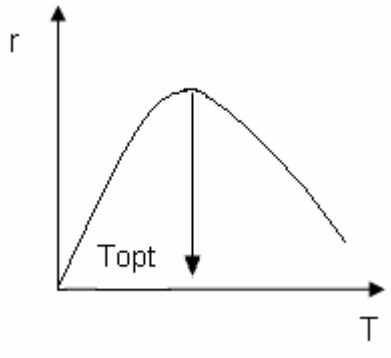
eşitlikleri yazılabilir. Bu eşitlikler birleştirilirse;

$$r_m = E_0.A.e^{-Ea/RT} \quad (2.6)$$

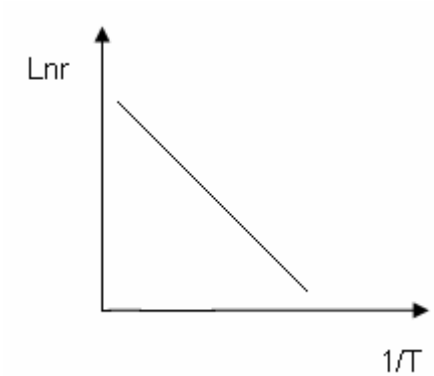
$[E_0].A = \alpha$ sabit ise

$$L_{nrm} = l_{n\alpha} - E_a/RT \quad (2.7)$$

bulunur. Belirli sıcaklık değerlerine karşı gelen maksimum reaksiyon hızları eşitlik 2.7'ye göre grafiğe geçirilirse elde edilen doğrunun eğiminden enzimin aktivasyon enerjisi hesaplanır (Şekil 2.4.).



Şekil 2.3. Sıcaklıkla reaksiyon hızının değişimi (Uslan 1986)



Şekil 2.4. Aktivasyon enerjisinin belirlenmesi (Uslan 1986)

2.1.2. Enzim İmmobilizasyonu

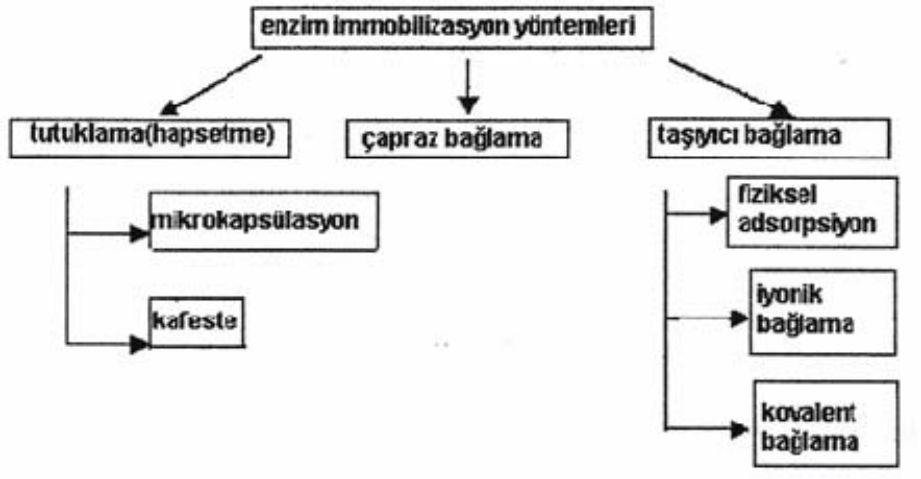
Tutuklanmış (immobilize) enzim tekniklerinin ortaya çıkışı çok yeni olmakla birlikte, tekniklerin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi konusunda kısa sürede büyük atılımlar yapılmıştır. Tutuklanmış enzimlerin serbest enzimlere göre belirgin üstünlükleri bulunmaktadır. Günümüzde, bu yeni teknikten bazı gıdaların üretiminde endüstriyel boyutta yararlanılmaktadır.

Tutuklanmış enzim yöntemleri ile gıda üretimi dışında, ticari öneme sahip bazı maddelerin (etil alkol, asetik asit, laktik asit, antibiyotik, hidrojen gazı vb.) üretimi ile bazı toksik maddelerin (fenol, benzen, atık su, nitrat, nitrit vb.) detoksifikasyonunda da yararlanılmaktadır.
İmmobilize enzimlerin serbest enzime göre üstünlükleri;

- **Çevre koşullarına karşı daha dayanıklıdır**
- **Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir.**
- **Bir çok kez ve uzun süre kullanılabilir.**
- **Sürekli işlemlere uygulanabilir.**
- **Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.**
- **Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.**
- **Enzimin kendini parçalama olasılığı azdır.**
- **Mekanistik çarpışmalar için uygundur.**
- **Bazı durumlarda serbest enzimden daha fazla aktivite gösterebiliriler.**

2.1.3. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyon yöntemlerini üç ana grupta toplamak mümkündür. Böyle bir sınıflandırma Şekil 2.5.'te gösterilmiştir (1975 Wiesman ve 1986 Telefoncu).



Şekil 2.5 Enzim immobilizasyon yöntemleri (Telefoncu 1986)

2.1.3.1. Tutuklama yöntemi

Tutuklama enzim molekülünü belli alanda durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır. Tutuklama yöntemi de iki farklı şekilde yapılır.

a. Mikrokapsülleme

Bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasından ibarettir. Enzimler daha çok kimyasal mikrokapsülleme ile immobilize edilmektedirler. Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu; sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen membran mikrokapsüllerde tutuklama olmak üzere iki grupta incelenebilir. Sürekli mikrokapsüllerde çerçeve membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde ise bir sıvı tabakadır. İmmobilizasyonda kullanılan çerçeve maddesinin (membran) yarı geçirgen olması zorunludur.

b. Polimer kafeste tutuklama

Yöntem; yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim molekülleri bağları arasında tutuklanmakta böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir. Polimerizasyon ve çapraz bağlanmanın oluştuğu ortamda enzim de bulunduğu takdirde enzim çapraz bağlama sonucu oluşan odacıklarda (kafes) tutuklanmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N-metilenbisakrilamit ile çapraz bağlanmış poliakrilamittir. Çapraz bağ yüzdesinin aşırı olması substratın enzim aktif merkezine ulaşmasını engellemekle kalmayıp enzimin zincir yapısını da zorlayıp aktivite kaybına veya tamamen inaktif olmasına neden olabilir.

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

Yöntemin sakıncaları; immobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun deney koşullarına çok sıkı bağımlı oluşu ve immobilize enzimin ancak küçük moleküllü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir (Tran Minh Canh 1993).

2.1.3.2. Çapraz bağlama yöntemleri

Küçük moleküllü iki veya çok fonksiyonlu reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlama derecesi ve immobilizasyon protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH'ya ve immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır. Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu dört farklı şekilde gerçekleştirilir.

a. **Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu**
b. **Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu**

c. **Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu**
d. **Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu**

Çapraz bağlı enzimler mekanik bakımından çok kararsızdır ve şimdiye kadar yalnız immunolojik testlerde ' "anılmıştır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri, glutaraldehit, izosiyanat türevleri, bisdiazobenzidin, N-N-polimetilen bisiyodasedanit ve 2-5-difloro-2,4-dinitro benzendir (Tran Minh Canh 1993).

2.1.3.3. Taşıyıcıya bağlama yöntemi

Taşıyıcı bağlama kimyasal kovalent, iyonik veya adsorptif biçimde uygulanılabilir. Enzime göre taşıyıcı seçimi çok önemlidir. Taşıyıcı seçiminde (partikül büyüklüğü, toplam yüzey, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı, taşıyıcının kimyasal bileşimi gibi) kriterler esas alınır. Bu tip enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar doğal veya sentetik olabilir. En çok kullanılan sentetik taşıyıcılar; polistiren, poliakrilamit, polimaleikanhidrit, polimetakrilat ve iyon değiştirici reçinelerdir. Doğal taşıyıcılar ise selüloz, nişasta, aktif karbon ve camdır. Ayrıca ticari amaçla üretilmiş ve değişik isimler altında piyasaya sunulmuş maddelerde enzimler için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (Tran Minh Canh 1993).

Taşıyıcıya bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyonunu da üç alt grupta inceleyebiliriz.

a. Adsorpsiyon

Yöntem; yüzey aktif, suda çözünmeyen adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleridir.

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

Bu yöntemin sağladığı yararlar; enzim immobilizasyon işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve bir yandan immobilizasyon gerçekleştirilirken diğer yandan enzim saflaştırılmasına olanak sağlamasıdır (Tran Minh Canh 1993).

b. İyonik bağlama

Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlama yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışı söz konusudur (Tran Minh Canh 1993).

c. Kovalent bağlama

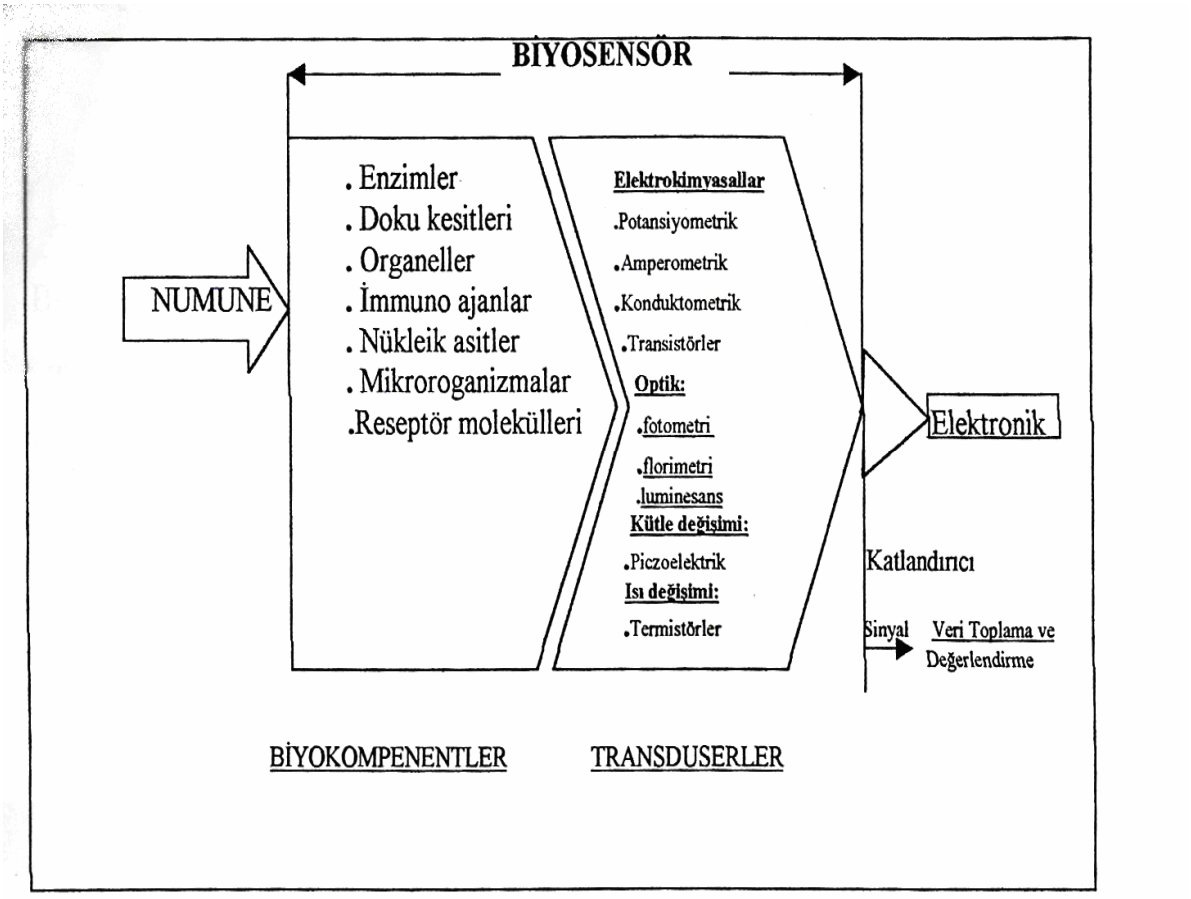
Taşıyıcıya kovalent bağlanma enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı reaktif gruplar üzerinden gerçekleşir. İmmobilizasyon çok yumuşak koşullarda gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karekterlide olamamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlı olmalıdır (Tran Minh Canh 1993).

2.2. BİYOSENSÖRLER

Biyosensörler, diğer adıyla biyospesifık elektrotlar, biyoajanları *immobilize* halde kullanılan çeşitli gaz, iyon, çözünmüş gaz ve maddelerin teşhisi, kantitatif tayini ve orjinal sistemlerde izlenmesi amacıyla geliştirilmiş problardır. En basit anlamıyla ise "Üzerinde immobilize halde biyolojik

katalizör taşıyan elektrotların kullanıldığı özel sistem" demektir. Bir biyosensör algılayıcı ile bütünleşmiş veya tamamen birleştirilmiş hassas biyolojik element içeren bir alettir. Biyosensörler genel olarak üç temel ana bileşenden ibarettir. Birinci kısım biyolojik duyarlı materyal yani biyokatalizör tabakası, ikinci kısım kovalent bağlı biyolojik bileşenlerle temas edecek şekilde olan algılayıcı (transducer), üçüncü kısım ise doğrudan biyokatalizör tabakasına bağlı elektronik aygıttır. Bu kısımda biyokatalizör ile tayin edilebilecek maddenin teması sonucu ortaya çıkan biyokimyasal sinyal uygun bir mekanizmayla kantitatif olarak elektrik sinyaline dönüştürülür. Aşağıda bir biyosensörün şematik gösterilimi verilmiştir.

Biyosensörler, genel olarak analizlenecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu etkileşim sonucunda ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemi kombinasyonuyla oluşturulurlar. Sitemin özelliğine bağlı olarak yükseltici, mikroişlemci, dijital görüntüleyici gibi kısımlar sistem içinde yer alabilirler.



Şekil 2.6. Biyosensörlerin temel bileşenleri

Uygun bir sinyal dönüştürücüyle ilişkilendirilmiş biyolojik birimlerin (enzimler, antikorlar, ilaç reseptörleri, bakteriler, DNA vs.) elektronik parçalarla entegrasyonu sonucu oluşan biyosensörer, fizyolojik değişimler, toksik, kanserojen madde veya organizmaların konsantrasyon bilgileri gibi biyokimyasal sinyalleri ölçülebilir elektriksel verilere dönüştüren analitik sistemlerdir.

Biyosensörlerde, esas olarak üç bileşen vardır.
1) Substrata duyarlı biyokatalizörler (biyoajanlar).
a. Enzim veya enzim sistemleri
b. Bakteriler ve diğer hücreler
c. Hayvansal ve diğer doku parçaları
d. Biyolojik membran komponentleri
e. İmmunolojik faktörler (antibadiler, antijenler ve diğer imminokompleksler)
f. Organeller.
2) Biyokatalizörden gelen sinyali elektrik sinyaline çevirerek ölçüm devrelerine iletilmesini sağlayan sensörler.
3) Ölçüm devreleri.

2.2.1. Biyosensörlerin Kullanım Alanları

Genel kullanım alanları incelendiğinde biyosensörlerin tıbbi analizlerden çevresel analizlere, proses izlenmesinden ilaç analizlerine ve savunma faaliyetlerine kadar pek çok alanda uygulama bulduğu görülmektedir.

Çizelge 2.1. Biyosensörlerin uygulama alanları (Campanella ve Tomassetti 1989)

-Temel ve klinik tıp teşhis, tayin ve incelemelerde
- Biyoteknolojide fermantasyon kontrolü ve analizinde
- Biyoloji, kimya, gıda endüstrisi, ziraat ve veterinerlikte çeşitli analizlerde
- Endüstriyel gaz ve sıvıların analizlerinde

- Çevre kirlenmesinin izlenmesinde **- Patlayıcılar ve diğer askeri alanlarda**

Çizelge 2.2. Biyosensörlerlerle tayin edilebilen maddeler (Pişkin 1986)

AMİNOASİTLER: Alanin, arginin, asparagin, Aspartik asit, sistin, glutamin, glutamik asit, glutation, histidin, leusin, lisin, metionin, fenil alenin, sarkosin, serin, tayrosin, triptofan, valin.
GAZLAR: NH_3, H_2, CH_4, SO_2, NO
KOFAKTÖRLER: AMP, ATP, NAD(P)H, H_2O_2
AMİTLER VE AMİNLER: Aminopirin, anilin, aromatik aminler, asetilkolin, kreatinin, kreatin, guanosin, guanidin, penisilin, spermin, ürik asit, üre, zantin
KARBOKSILİK ASİTLER: Asetik asit, formik asit, glukonik asit, izositrik asit, askorbik asit, laktik asit, malik asit, okzalik asit, purivik asit.
KOMPLEKS MADDELER: Antibiyotikler, kullanılır karbonhidratlar, vitaminler, mutajenler.
KARBONHİDRATLAR: Asetaldehit, biluribin, kolesterol ve esteri, etanol, gliserol ve esterleri, metanol ve fenol.
İNORGANİK İYONLAR: F^-, NO_2^-, NO_3^-, PO_3^{2-}, SO_3^-, SO_4^-, Hg^{++}, Zn^{++}

2.2.2. Biyosensörlerde Kullanılan Biyokatalizörler

Sensörlerde kullanılan biyokatalizörler, enzimler, mikroorganizmalar, bitkisel ve hayvansal dokular, antikorlar, antijenler, reseptörler, nükleik asit gibi bileşenler olabilir. Tespit edilmesi gereken materyale ilgisi olan ilgisi olan, bağlanabilecek olan alıcı eleman (veya elemanlar) biyosensör yüzeyine kimyasal metodlar ile sabitlenir, yani immobilize edilir. Daha sonra ortam içerinde istenen molekül veya mikroorganizma olan çözelti ilave edildiğinde, alıcı ile bu biyolojik materyal birbirlerine bağlanırlar. Bu bağlanma ise kullanılan sensör

cinsine göre elektrik veya optik metotlarla sinyale dönüştürülerek algılanır. Eğer ortamda istenen biyokimyasal madde yok ise, sinyal gönderilmez.

2.2.2.1. Enzimler

En çok kullanılan biyokatalizörlerdir. Enzimler katalizledikleri reaksiyonlar için çok duyarlıdır. 10^{-8} M ve daha düşük derişimlerde bile katalizör görevini yapabilirler. Enzimleri diğer kimyasal katalizörlerden ayıran en önemli özelliği seçimli olmalarıdır.

2.2.2.2. Bakteri ve hücreler

Saf enzim yerine hücrelerin çeşitli inert destek maddeleri üzerine toplanarak saklanabildikleri ortaya çıktıktan sonra çeşitli hücreler kullanılmaya başlanmıştır.

Avantajları;

a) **Saf halde kararsız olan enzimlerin hücrede kararlı olmaları ve hücre ile hazırlanan biyosensörlerin daha uzun ömürlü olması**

b) **Enzimatik reaksiyonlar için gerekli olan bütün kofaktör ve kimyasal maddeler hücrede bulunduğundan çoğu pahalı olan ve zor bulunan bu maddelerin ayrıca kullanılmasına gerek kalmamaktadır.**

c) **Canlı hücrelerle hazırlanan biyosensörlerin saf enzimlerle hazırlananlara göre daha ucuza mal olması.**

Dezavantajları;

a) **Sterilizasyon gerektirmeleri**

b) **Kullanılan hücrede istenilen enzimin dışında diğer enzimlerin de bulunması nedeniyle seçimliliğin azalması**

c) **Mekanik çalışma güçlükleri (Pişkin 1986).**

2.2.2.3. Dokular

Biyokatalizör olarak doku kesitleri de kullanılabilir. Dokularda mekanik dayanıklılık daha iyi olduğundan bir avantaj olarak gösterilebilir. Gelişmiş organizmalarda metabolizma iyi bilindiğinden amaca uygun seçim şansı vardır. Çeşitli gazların hayvansal organizmadaki difüzyon süreleri sabittir. Bu tip biyokatalizörler reaksiyonu belirli bir verim ve stokiyometri ile yürütürler.

2.2.3. Biyosensörlerin Çalışma Mekanizması

Bir biyosensör birbirini izleyen beş mekanizmayla çalışır. Bunlar:

i) Substrat çözeltiden biyosensör yüzeyine taşınır.

ii) Substrat, membran veya polimer içindeki enzimin aktif bölgesine difüzlenir.

iii) Enzim ve substrat arasında reaksiyon oluşur.

iv) Oluşan ürün sensör yüzeyine taşınır.

v) Sensör yüzeyinde ölçüm yapılır

2.2.4. Kullanılan Sensörler

Biyosensörlerin seri imalatı için en önemli noktalardan biri sensör tipidir. Biyokatalizörün ölçülecek madde ile etkileşmesi sonucu ortalama gaz molekülleri salınabilir veya ortamdan uzaklaştırılabilir. Seçimli iyonlar oluşabilir, ısı açığa çıkabilir ya da uzaklaştırılabilir. Optik özellikler değişebilir. Bu değişimleri algılayarak elektrik sinyaline çevirecek olan yapılar sensörlerdir. Kullanılan sensörler;

A. Elektrokimyasal algılayıcılar
   1. Amperometrik ölçüm esaslı olanlar
   2. Potansiyometrik ölçüm esaslı olanlar
   3. Kondüktometrik ölçüm esaslı olanlar

B. Optik algılayıcılar
   1. Absorbans ölçümünü temel alanlar
   2. Floresans, fosforesans ölçümlerini temel alanlar
   3. Kırılma indisi ölçümünü temel alanlar

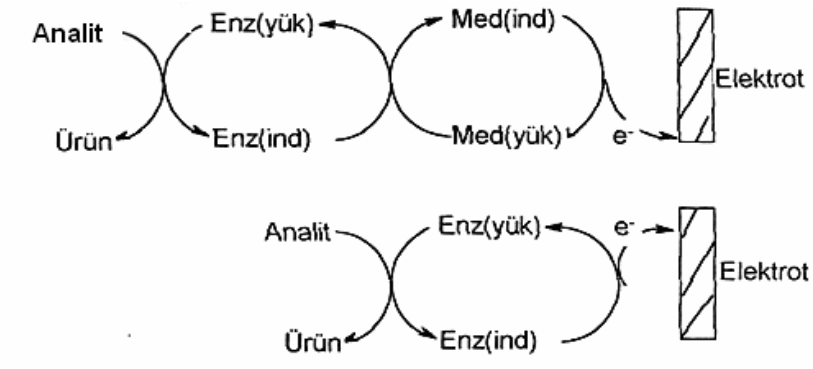
C. Kütle değişini temel alan algılayıcılar (piesoelektrik sistemler)

D. Isı değişini temel alan algılayıcılar (termistörler)

2.2.4.1. Elektrokimyasal biyosensörler

2.2.4.1.1. Amperometrik biyosensörler

Amperometrik biyosensörler, biyokimyasal reaksiyonda oluşan ürünlerin reaksiyonu sonucu çalışma elektrodundaki akım değişikliğini ölçer. Amperometrik teknikler analit konsantrasyonuna doğrusal olarak bağlıdır. Oksijen ve H_2O_2, bazı enzim reaksiyonunda ko-substrat ve ürün olup amperometrik yöntemle tayin edilirler. Elektrokimyasal biyosensörler, elektron transferi için redoks aracılı veya redoks aracısısız elektrokimya temeline dayanır. Ferrosen ve türevleri, ferrisiyanür, metilen mavisi, benzokinon ve N—metil fenazin vb. redoks aracılı biyosensörlerde en yaygın olarak kullanılan redoks aracılarıdır.



Şekil 2.7. Redoks aracılı ve redoks aracısız elektron transferi

Amperometrik biyosensörler; güvenilir, maliyeti düşük, klinik, çevre, endüstri alanındaki uygulamalarda oldukça seçicidir (Tran Minh Canh 1993).

2.2.4.1.2. Potansiyometrik biyosensörler

Potansiyometrik biyosensörler, referans elektroda göre çalışma elektrodundaki potansiyel ölçümüne dayanır. Denge koşulları altında fonksiyon gösterirler. Sisteme net akım geçişi olmaksızın, elektrot yüzeyine seçici bağlanmanın oluşturduğu yük birikimini izler. Potansiyometrik sensör

genellikle iyon aktivitesindeki değişikliğe cevap veren iyon seçimli elektrottur. Örneğin iyon seçimli elektrotlar (İSE), kompleks biyolojik matriksteki Na^+ , K^+ ,Ca^{++} , H^+ veya NH_4^+ gibi iyonları tayin eder. Uygun iyon değiştirici membrana iyonlar bağlandığında elektrot potansiyelinde oluşan hassas değişiklikten yola çıkarak bu iyonların tayini gerçekleşir. Bunun dışında gaz duyarlı elektrotlarında kullanılması söz konusudur. Gaz sensörlerinin (CO_2, NH_3 gibi) cevabı büyük ölçüde numunenin matriks etkisinden bağımsızdır (Tran Minh Canh 1993).

2.2.4.1.3. Kondüktometrik biyosensörler

Kondüktometrik biyosensörler, biyolojik bileşimin sonucu olarak, metal elektrot çifti arasındaki iletkenlik değişimini ölçer. Üreaz gibi birçok enzim reaksiyonları ve birçok biyolojik membran reseptörleri, mikro elektrotların kullanıldığı iyon kondüktometrik veya impedimetrik aletlerle izlenebilir. Çünkü ölçümdeki hassaslık örnek çözeltisindeki iletkenlikle paralel olarak değişir. Contractor (1994) tarafından hazırlanan biyosensörler, glukoz, lipaz ve hemoglobin/pepsin hakkında fikir edinmek için, polimer matriksin çevresindeki değişken pH veya redoks potansiyeli gibi değişken elektronik iletkenliğin izlenmesine olanak sağlar (Contractor 1994).

2.2.4.2. Optik biyosensörler

Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekülün immobilize edilmesiyle hazırlanan ölçüm aygıtlarıdır. Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal yanda fızikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alırlar. Sinyal, ışık yansıması, saçılımı ya da yayımı sonucu meydana gelir. Örneğin optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile hazırlanan optik esaslı enzim sensörleri temelde absorbsiyon, fluoresans, biyolüminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde işlev görürler. Bu tip biyosensörlerde ışık dalgaları fiber optik kablo yardımıyla uygun bir dedektöre iletilir. Bu biyosensörler O_2, pH, CO_2 teşhisi için kullanılmaktadır (Greard 1999).

2.2.4.3. Kalorimetrik biyosensörler

Kalorimetri esaslı enzim sensörleri, termal enzim sensörleri, enzim termistörleri ya da entalpimetrik enzim sensörleri gibi değişik isimlerle tanımlanırlar. Temel bir prensiple bu tip biyosensörler tüm biyokimyasal reaksiyonlardaki entalpi değişimini içerirler. Genel olarak enzimatik reaksiyonların ekzotermik doğasından yararlanılır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır. Masbach ve Danielson enzim termistörleri geliştirmişlerdir. Termistörle, enzim reaksiyonundaki sıcaklık değişimi ölçülmüştür. Substratlar, enzimler ve antijenler hakkında termistör biyosensörler kullanılarak tahmin yapılabilir (Mosbach ve Danielson 1981).

2.2.4.4. Piezoelektrik biyosensörler

Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlesinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensör seçimliliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki farklanmanın ölçülmesiyle sonuca ulaşılır.

Bir piezoelektrik sensörün üzerinde enzim immobilizasyonuyla gerçekleştirilen piezoelektrik enzim sensörlerinde, enzim moleküllerine substratların bağlanmasından dolayı meydana gelen kütle değişimlerinin, piezoelektrik kuartz diskin vibrasyonunda sebep oldukları farklanmadan yararlanılarak madde miktarına ulaşılır. Bu tip biyosensörler amonyum, hidrojen, metan, CO, nitröz oksit ve diğer organofosfor bileşikleri ölçümünde kullanılmaktadır.

2.2.5. Biyosensör Performans Kriterleri

Biyosensörleri esas alan analiz sistemlerinin avantaj ve dezavantajlarını belirleyen temel özellikler aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

- **Biyosensörlerdeki biyoaktif bileşen spesifik ve kararlı olmalıdır. Biyoaktif bileşenin spesifik olması girişim yapabilecek türleri içeren karmaşık içerikli ölçüm ortamlarında detaylı ön işlem yapılmaksızın analize imkan verir. Biyoaktif bileşenin kararlı olması ise çok sayıda analize imkan vereceği için biyosensörün ekonomik olmasına zemin hazırlar.**
- **Biyosensörlerdeki temel reaksiyonun fiziksel parametrelerden olabildiğince az etkilenmesi istenir. Bu özellik fiziksel koşulların değişebildiği laboratuvar dışı koşul ve ortamlarda da güvenilir analizlerin yapılabilmesine imkan verir.**
- **Biyosensör cevaplarının doğru, duyarlı ve tekrarlanabilir olması büyük önem taşır. Cevapların doğruluğu beklenen esas parametredir. Duyarlık, biyolojik sistemlerden gelen unsurlar kullanıldığı için genelde çoğu klasik yöntemden daha iyidir. Tekrarlanabilir sonuçlar alınması ise bir ölçüde daha önce sözü edilen parametrelerle de ilişkilidir. Cevap zamanının kısa olması ise genelde biyosensörlerin tercihli olarak kullanımlarına yol açan en önemli faktörlerden biridir.**
- **Biyosensörlerde algılayıcı elementin küçük ve bazen biyouyumlu olması beklenir. Küçük ve biyouyumlu sistemlerin özellikle *in vivo* ölçümlere uyarlamada önemli üstünlükleri vardır.**
- **Ölçüm ünitesinin ucuz ve taşınabilir olması değişik alanlarda yaygın kullanımına imkan verir.**
- **Biyosensörler düşük maaliyette seri olarak büyük miktarlarda üretilebilirler. Özellikle tek kullanımlık şekilde standardize edilebilen biyosensör türleri, kullanım kolaylığını arttırabildiği gibi kullanacak kişilerin de detaylı bir tecrübeye sahip olmasını gerektirmez. Bu nedenle yaygın kullanım olanakları ortaya çıkar.**

Doğal olarak tüm biyosensörlerin bu özelliklerin tümünü üzerinde taşıması söz konusu değildir. Ancak doğru, duyarlı ve tekrarlanabilir cevaplar kesinlikle beklenen özelliklerdir. Bunların dışındaki parametrelerdeki değişiklikler biyosensörlerin diğer yöntemlere avantaj ve dezavantajları olarak karşımıza çıkmaktadır (Tran Minh Canh 1993).

2.3. KOLİN BİYOSENSÖRLERİ İLE YAPILAN BAZI UYGULAMALAR

Doretti ve çalışma grubu (2000) tarafından asetilkolin tayini için bienzimatik sensör, asetilkolinesteraz ve poli(etilen glikol) modifiye edilmiş kolin oksidaz enzimlerinin birlikte poli(vinil alkol) kriyojel membranındaki fiziksel ko-immobilizasyonları dönüşümlü dondurma-eritme prosesi ile gerçekleştirilmiştir. Enzim tutuklanmış polimer Pt elektrot üzerine yerleştirilmiş ve elektrot cevabı enzimatik reaksiyonlar sonucunda oluşan hidrojen peroksitin yükseltgenme akımının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Bu sensörün anatiksel karakterizasyonları olarak kolin ve asetilkolinin kalibrasyon eğrileri, pH'ı, sıcaklık etkisi ve kararlılığı belirlenmiştir. Optimum pH 8.0, sıcaklık 30˚C ve elektrot cevabı kolin için 5-200 µM, asetilkolin için 5-100 µM derişim aralığında doğrusaldır.

Razola ve çalışma grubu (2003), canlı hücrelerden salınan mikromolar konsantrasyondaki koline duyarlı elektrokimyasal biosensör geliştirmişlerdir. Bu sensör kolin oksidaz enzimiyle, elektrot üzerinde oluşan hidrojen peroksitin tayinine dayalı kolin (CHO) biosensörüdür. Biyosensör horseradish peroksidaz immobilize edilmiş katı karbon pasta elektrot (HRPsCPE) üzerine tutuklanan CHOx'dan oluşmaktadır. HRPsCPE redoks aracısı olarak fenotiazin molekülünü içermektedir ve CHOx fiziksel olarak diyaliz membran kullanan elektrot yüzeyine tutuklanmıştır. Uygulanan potansiyelin etkisi, aracı miktarı gibi bazı parametreler çalışılmıştır. CHO ölçümleri pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponunda yapılmıştır. CHO'nun amperometrik tayini 30 mV potansiyelde Ag/AgCl elektroduna karşı gerçekleştirilmiştir. Amperometrik cevap $5x10^{-7}$-$7x10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında doğrusal ve tayin sınırı $1x10^{-7}$ M, cevap süresi 80 s'dir.

Rahman ve çalışma gurubu (2004) tarafından yapılan bir çalışmada amperometrik kolin biyosensörleri poli-5,2^{I}:5^{I},2^{II}-tertiyofen-3-karboksilik asit (poli-TTCA) modifiye elektrodu (CPMEs) üzerine kolin oksidaz (ChO) enziminin ChO ile horseradish peroksidaz (HRP) enziminin bir arada kovalent

immobilizasyonu ile hazırlanmıştır. ChO modifiye sensörü 0,6 V'da kolin çözeltisi içinde enzimatik olarak oluşan H_2O_2'in yükseltgenme prosesinde, ChO/HRP ile modifiye edilen diğer sensör ise -0,2 V'da H_2O_2'in indirgenme prosesinde kullanılmıştır. pH, uygulanan potansiyel ve sıcaklık gibi deneysel parametrelerin sensörün hassasiyetini etkilediğini gözlemişlerdir. İki sensörün performansları karşılaştırıldığında ChO/HRP/CPME temelli olanın doğrusal çalışma aralığının $1,0x10^{-6}$ - $8,0x10^{-5}$ M ve ChO/CPME temelli olanın ise $1,0x10^{-6}$-$5,0x10^{-5}$ M olduğu gözlenmiştir. Sensörün cevap süresi 5 s den daha düşük olduğu bulunmuştur. Girişim yapan maddelere karşı seçimliliğin iyi olduğu gözlenmiştir. ChO/HRP/CPME temelli olan sensörün kararlılığının ChO/CPME temelli olandan daha fazla olduğu bulunmuştur.

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

Jin ve çalışma grubu (2004), kolin ve asetilkolin modifiye karbon elektrotları hazırlamış ve x-ray fotoelektron spektroskopisi (XPS), UV-vis spektroelektrokimya, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ve dönüşümlü voltametri ile incelemişlerdir. ACh'in oluşumu asetat anyonları ve Ch'in, elektrot yüzeyine kovalent bağlanması ile gerçekleştirilir. İki bileşikten oluşan karbon modifiye elektrotlara bu iyi bir örnektir. Bu ikili modifiye elektrotlar dopamin, serotonin ve askorbik asidin elektrokatalitik yükseltgenmesinde uygulanır ve böylelikle bir karışımdaki türlerin eş zamanlı tespitinde kullanılır. Asetat/kolin/camsı karbon (ACh/GCE) elektrodun kararlılığını 30 gün boyunca koruduğu bulunmuştur ve kararlılığın oldukça iyi olduğu bildirilmiştir.

Langer ve çalışma grubu (2004), kolin tayini için polianilin biyosensörü geliştirmişlerdir. Kolin oksidaz, nano yapıdaki anilin tabakalarında mikrometre yada nanometre kalınlıkta biriktirilerek kolin sensörü yani polianilin-kolin oksidaz (PChO) biyosensörü hazırlamışlardır. Kontrollü kalınlıktaki polianilin filmlerinin hazırlanması ve enzim moleküllerinin immobilizasyonu için elektrokimyasal teknikler kullanılmıştır. PChO sensörünün elektriksel cevabı kolin konsantrasyonuna bağlı olduğunu ve duyarlılığın amperometrik ölçümlerde 5 μA/mM ve potansiyometrik ölçümlerde 10 mV/mM değerlerinde olduğunu bulmuşlardır. Amperometrik çalışmalar 0,4 V sabit potansiyel yapılmıştır. Askorbik asitin girişim yapmadığı bulunmuştur. Geliştirilen enzim elektrodunun kararlılığını oldukça iyi olduğunu bulmuşlardır. Sensörün bir ay sonunda elektriksel cevabında bir değişim gözlememişlerdir.

Yang ve çalışma grubu (2004), karbon pasta elektrot üzerinde tiyonin elektropolimerizasyonu yöntemi ile kolin tayini için bienzimatik amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Amperometrik enzim biyosensörler kolin oksidaz (CHOD) ve HRP (horseparadish proxidase) enzimleri karbon pasta elektrot üzerinde tutuklanarak hazırlanmıştır. Biyosensörler politiyoninin elektropolimerizasyonuyla karbon pasta içeren HRP enzimi ve tiyonin monomeri içinde hazırlanmıştır. Daha sonra CHOD chitosan film kullanılarak glutaraldehite karşıt bağlı olarak immobilize edildi. HRP enzim ve elektrot yüzeyi arasında üst düzeyde elektron transfer verimliliği politiyonin sayesinde gerçekleşir. Pasta içinde enzim immobilizasyonu polimerler yardımıyla olur. Tiyonin ve enzim miktarları, uygulanan potansiyel ve pH gibi birçok deneysel parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır. Amperometrik olarak kolini tayini -0,2 V sabit potansiyelde 1/15 M fosfat tampon çözeltide (pH=7,4), doğrusal cevap aralığı $5{,}0x10^{-6}$-$6{,}0x10^{-4}$ M ve cevap süresi 15 s olarak bulunulmuştur.

Yang ve çalışma grubu (2005), asetilkolin ve kolin tespiti için amperometrik enzim elektrodu tanımlamışlardır. Girişimleri engellemek için N-asetilanilin (nAN)'i Pt elektrot yüzeyinde elektropolimerize etmişlerdir. Bovin serum albumin (BSA) ve kolinoksidaz (ChOD), çinko oksit sol-jel membran içinde yukarıda belirtilen Pt elektrot yüzeyinde ko-immobilize edilerek Ch ya da ChOD sensörü için; asetilkolinesteraz (AChE) ve BSA birlikte immobilize

edilerek ACh/Ch sensörü için kullanılanabilmektedir. Poly(N-asetilanilin) (pnAN) filmi ilk kez ACh/Ch sensörü için kullanılmıştır ve girişimleri engellediği bulunmuştur. Oluşturulan sensörün cevap süresinin kısa olduğu, doğrusal aralığının geniş olduğu ve girişimin çok düşük olduğu bulunulmuştur ayrıca sıcaklık ve pH etkiside araştırılmıştır. ACh/Ch sensörünün ACh için doğrusal aralığının $1,0x10^{-6}$–$1,5x10^{-3}$ M aralığında ve tespit limitinin $6,0.10^{-7}$ M olduğu; Ch için doğrusal aralığın $1,6x10^{-3}$ M ve tespit limitinin $5,0x10^{-7}$ M olduğu bulunmuştur. Biosensör 10 s içinde %95 cevap vermektedir.

Schuvailo ve çalışma grubu (2005), asetilkolinesteraz (AChE) ve kolin (Ch)'ni bovin serum albuminde immobilize ederek in vivo ölçümlerde kullanmak üzere asetilkolin ve kolin tayinini sağlayan H_2O_2'ye duyarlı (tayin limiti 0,5 µM) karbon biosensör geliştirmişlerdir. Elde edilen optimize biosensör üretken ve kararlı olup, gerek asetilkolin gerekse kolin için 1 µM 'lik bir tayin limiti ortaya koymuştur. Ama kullanılan yüksek çalışma potansiyeli yüzünden, biosensör örneğin askorbik asit gibi elektroaktif bileşenler tarafından girişime yatkındır. Bu yüzden, ileriki aşamalarda elektrodun aktif yüzeyinde osmium tabanlı redox hidrojel katmanda birleştirilmiş horseradish peroksit aracı olarak kullanılmıştır. Bundan sonra bir nafyon katmanı ve kaplama ihtiva eden bir AChE ve/veya bir BSA membranda co-immobilize edilmiş bir ChOx başarılı bir şekilde tutuklanmıştır. Söz konusu sensörün iyi bir seçicilik in vivo asetilkolin ve kolin ölçümü için uygun bir konsantrasyon aralığında (0,3-100 µM) oldukça yüksek bir duyarlılık gösterdiği bulunmuştur.

Shi ve çalışma grubu (2005), farklı polikatyonlarla kolin sensörleri hazırlamak için katman (tabaka-tabaka) biriktirme tekniğini uygulamışlardır. Farklı polikatyonlara sahip kolin sensörlerin elde edilmesi için tabaka-tabaka biriktirme tekniğinden yararlanılmıştır. Her biri aynı enzime sahip olup faklı polikatyonlara poli(diallidimetilamonyum klorür) (PDDA) ve poli(etilenimin) (PEI) sahip platin elektrotları modifiye etmek için iki çeşit kolin oksidaz/polikatyon ince filmleri kullanılmıştır. ChOx/PEI veya ChOx/PDDA ince filmle kaplı olan Pt elektrotlar, kolin sensör olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır. ChOx/PEI film modifiye sensör ChOx/PDDA'kinden daha kısa bir süresine sahiptir. Polikatyon materyallerin farklı yapılarından dolayı bu

filmlerin farklı geçirgenlik özelliklerine sahip olmaları temel alınarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Söz konusu ince filmlerin oluşum süreçleri kuartz kristal mikrobalans (QCM) ile de gözlemlemişlerdir.

Guerrieri ve çalışma grubu (2006), poli(pirol)/poli(2-naftol) filmi kullanarak asetil kolin ve kolin biosensörü geliştirmişlerdir. Birçok sinir sistemi ile ilgili hastalık neroiletici asetilkolin ve onun metaboliti olan kolinin beyindeki seviyesiyle ilgilidir. Her iki analitin eş zamanlı tayini için girişimi olmayan çift amperometrik biosensör elektrodu elde hazırlamışlardır. Yükseltgenmiş polipropil ve poli-2-naftol filminden elektropolimerizasyonla polimer filmi oluşturulmuş ve bu film elektroaktif girişimleri engellemiştir. Askorbat için %0,04 ve dopamin için %0,3 ve sırasıyla ACh ve Ch için (11 ve 15 µA/µM) değerleri elde edilmiştir. ChO-AChE'da enjeksiyon analizi ACh ve Ch için tayin limiti 100 nM ve ChO sensöründe Ch için 40 nM'dir. Bu sistem; ACh, Ch ve hidrojen peroksitin tespit potansiyelinde elektroaktif olan girişim maddelerini kromotografik ayırmaya gerek kalmadan tayin edilebildiğinden gerçek matrikslerin analizi için çok kullanışlıdır.

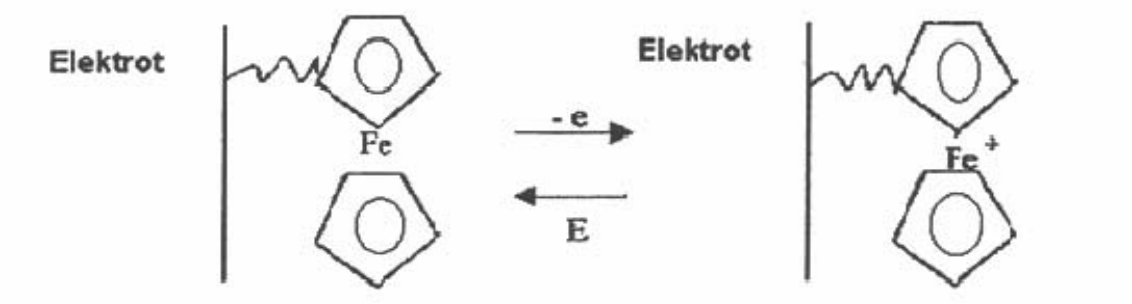
Shi ve çalışma grubu (2006), tabaka-tabaka (LBL) katmanlı çoklu film halinde bulunan ve Prusya mavisi (PB) ile modifiye edilmiş elektroda kolin oksidazın (ChOx) immobilizasyonu sonucunda amperometrik bir kolin biyosensörünü geliştirmişlerdir. Etoksitrimetilammonşitanklorür (EAACC), kolin oksidaz tabaka-tabaka (LBL) filmlerini hazırlamak için kullanmışlardır. Kolin biyosensörü 0,0 V'da Ag/AgCl referans elektroda karşı kullanılmış ve kolinin tespitinde; düşük tayin limiti ($5{,}0 \times 10^{-7}$ M), cevap süresi (10 s), yüksek duyarlılık (88,6 µA mM^{-1} cm^{-2}) ve iyi bir seçiciliğe sahiptir. Prusya mavisinin H_2O_2'in indirgenmesinde katalitik etki göstermesine dayandırılarak açıklanmıştır. İlaveten, kolin biyosensörünün amperometrik cevabında başvurulan pH'ın, sıcaklığın ve potansiyelin etkileri değerlendirilmiştir. Görünen Michaelis-Menten sabitinin $(0.083 \pm 0.001) \times 10^{-3}$ M olduğu tespit edilmiştir. Hazırlanan kolin biyosensörü ile serum örneklerindeki fosfatidilkolin analizi yapıldığında elde edilen sonuçlar hastane sonuçları ile uyuştuğu bulunmuştur.

Song ve çalışma grubu (2006) tarafından yapılan çalışmada H_2O_2'in tayini için çoklu karbon monotüplü modifiye platin elektrodu üzerine sol-jel silika filmine ChOx immobilizasyonu ile kolin oksidaz enzim elektrodu geliştirmişlerdir. Dönüşümlü voltametri sonuçları açıkça göstermiştir ki karbon monotüpler düşük potansiyelde (0,16 V karşı Ag/AgCl) H_2O_2'in yükseltgenmesinde mükemmel bir elektrokatalitik aktivite göstermektedir. Kolin sensörü için uygulama potansiyeli, pH ve sıcaklık gibi deneysel paremetreler çalışılmıştır. Sensörün doğrusal tespit limiti $5,0x10^{-6}$ M'dan $1,0x10^{-4}$ M'a kadar ve cevap süresi 8 s'den daha az olduğu bulunmuştur. Kolinin tespit limiti ise $1,0x10^{-7}$ M olarak tespit edilmiştir. Bu biosensör serum numunelerindeki fosfolipaz D (PLD) tarafından Lesitinden salınan kolinin tespitinde kullanılmıştır.

2.4. POLİVİNİLFERROSEN MODİFİYE ELEKTROTLAR

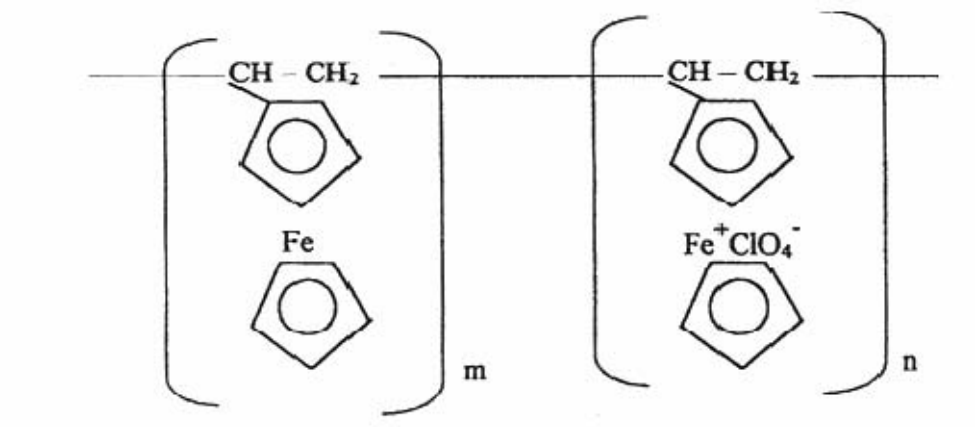
Ferrosen tersinir bir elektron aktarımıyla kolaylıkla ferrosenyum katyonuna yükseltgenebilen fonksiyonel bir moleküldür. Ferrosen içeren doymamış bileşiklerden vinilferrosenin radikal homo ve kopolimerizasyonu incelenmiş ve serbest radikal başlatıcılarla polimerleştiği bulunmuştur (Aso ve ark. 1969).

Kimyasal polimerizasyonla elde edilmiş polivinilferrosenin (PVF) elektrot yüzeyine kaplanmasında metilen klorürdeki PVF çözeltisinden; a) Elektrot yüzeyine elektrokimyasal çöktürme b) Daldırıp kurutma ya da c) Damlatma-döndürerek buharlaştırma yöntemleri kullanılabilir. Elektrokimyasal çöktürme yönteminde polimer çözeltisine daldırılan elektroda uygun bir gerilim uygulanarak yapılan elektrolizle polimerin yükseltgenmiş formu elektrot yüzeyinde biriktirilir. Daldırıp-kurutma yönteminde elektrot polimer çözeltisinde bir süre bekletildikten sonra kurutulur, damlatma-döndürerek buharlaştırma yönteminde ise elektrot yüzeyine polimer çözeltisi damlatılıp elektrodun döndürülmesi yoluyla çözücü buharlaştırılır. PVF bir redoks polimeridir, yani polimerin kendisi de elektroaktiftir. Elektriksel iletkenlik polimerin yapısındaki yükseltgenmiş ve indirgenmiş gruplar arasında elektron atlaması yolu ile sağlanır. Değişik yöntemler kullanılarak PVF ile kaplanan elektrotlarda yüzeye bağlanmış bir ferrosen polimerinin tersinir bir yükseltgenme indirgenme tepkimesi verdiği bulunmuştur (1980 Umana ve 1993 Gülce).



Şekil 2.8. Ferrosen Polimerinin yükseltgenme-indirgenme tepkimesi (Umana 1980)

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



Şekil 2.9. Elektrokimyasal olarak katkılanmış PVF (Shirota ve ark. 1984)

Elektrokimyasal olarak biriktirilmiş PVF'nin dağılmış yansıma (elektronic diffuze reflection) spektrumunda, 460 ve 625 nm'de ferrosen ve ferrosenyuma ait absorbsiyon pikleri gözlenmiştir. Bu polimerin oda sıcaklığındaki yaklaşık iletkenliği $1x10^5$ $ohm^{-1}cm^2$ olarak ölçülmüştür. Bu iletkenliğin katkılama derecesine bağlı olduğu %60 katkılama ile en büyük iletkenlikdeğerinin elde edildiği belirtilmiştir.

Pt elektrot üzerine anodik elektrolizle biriktirilmiş PVF filmlerinin kararlı hızlı ve tersinir redoks davranışları gösterdiği Bard grubu tarafından belirlenmiştir. Ferrosen ve ferrosenyum içeren kısmen yükseltgenmiş polimer filmleri sabit ve tekrarlanabilir gerilim göstermişlerdir. Bu elektrotların referans elektrot olarak kullanılabilirliği denenmiştir. 0,1 M TBAP içeren asetonitrilde 3,1 mM tiyoantrasenin bu referans elektrotta karşı bir Pt elektrottaki yükseltgenmesi amacıyla 21 saat sürekli gerilim taraması yapılmıştır. Bu süre içinde ±2mV ortalama bir sapma ile sabit pik gerilimi ölçülmüştür. Ancak benzonitril, metanol, dimetilformamit ve suyun çözücü

olarak kullanıldığı deneylerde elektrodun daha az kararlı olduğu gözlenmiştir (Peerce, 1980 ve Bard, 1997).

Daldırma kurutma yöntemiyle kaplanmış PVF film elektrotların dönüşü voltametrik ve kronoamperometrik davranışlarına destek elektrolitin türünün ve derişiminin etkisi incelenmiştir. Kullanılan destek elektrolitin türü ve derişimi ile pik gerilim ve akımlarının değiştiği gözlenmiştir. Bunun nedeni yüzeydeki filmin yükseltgenmesi sonucu elektrolit anyonlarının yapıya girerek tuz oluşturması ile açıklanmıştır. Elektrolit derişiminin artmasıyla yükseltgenmiş filmin daha da yoğun bir yapı oluşturduğu ve difüzyonun güçleştiği belirtilmiştir (Iwakura ve ark. 1987).

Çeşitli destek elektrolitlerde PVF'nin yükseltgenmiş ve indirgenmiş haline bağlı olarak polimer yapısındaki iyon ve çözücü içeriğini incelemek için [quartz crystal microbalance (QCM)] tekniği kullanılmıştır. ClO_4^- ve PF_6^- içeren elektrolitlerde, filmin yükseltgenmesi sırasında filmin çözücü içeriğinde çok az değişim olduğu ya da hiç değişim olmadığı gözlenmiştir. Sulu $NaClO_4$ çözeltilerinde PVF için elektrokimyasal kuartz kristal mikrobalans (EQCM) verilen incelenmiştir. Yüksek ve düşük elektrolit derişimlerinde, elektronötralliğin kısa zaman aralıklarında karşıt iyonun hareketi ile sağlandığı belirtilmiştir. Nötral tünlerin polimer yapısına girmesinin anyonlardan daha zor olduğu belirlenmiştir (Hillman ve ark. 1991-1992).

Inzelt ve Bacskai tarafından yapılan bir çalışmada gerilim taramaları sırasında PVF filmlerine çözücü molekülünün ve elektrolit anyonunun katılmaları EQCM yöntemiyle incelenmiştir (lnzelt ve Bacskai, 1992). PVF filmlerinin redoks davranışları ve film şişmesinin destek elektrolitin türü ve derişimine bağlı olduğu bulunmuştur. Ayrıca elektrokimyasal olarak biriktirilmiş PVF filmlerinde daha az sişme olduğu belirlenmiştir.

Gülce ve çalışma grubunu (1993), yaptıkları bir çalışmada iyodür, tiyosiyanat ve siyanürün elektroyükseltgenme davranışlarını polivinilferrosenyum kaplı Pt elektrotlarla, dönüşümlü voltametri ve diferansiyel pulse anodik sıyırma voltametri yöntemlerini kullanarak

araştırmışlardır. IR ve UV spektroskopik data ve diferansiyel tarama kalorimetri (DSC) ölçümleri göstermiştir ki; bu anyonların polimerik yapıda anyon değişiminin sonucu olarak biriktirilmekte olduğunu göstermiştir. Bu anyonların filmden anodik sıyırma ile ayrılmaları önderiştirmeden sonra gerçekleştirilmiştir. Tiyosiyanat ve iyodür iyonları karşıt iyonlar olarak film yapısı içinde biriktirilirken, siyanürün fazlası filmin fiziksel özelliklerinde geri dönüşümü olmayan değişikliklere neden olmuştur. Buradan anlaşıldığı gibi PVF modifiye yüzeylerin elektrokimyasal özelliklerinin anyonik çözeltilerde oldukça duyarlı olduğu ve fosfat gibi diğer elektroinaktif anyonların polimerik filmin elektroaktifliğini kaybetmesinde etkili olduğu belirlenmiştir.

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

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

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

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

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

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

Gülce ve çalışma grubu (2002-c) diğer bir çalışmasında, alkol tayini için polivinilferrosenyum perklorat kaplı Pt elektrot yüzeyinde alkol oksidaz tutuklayarak, yeni bir enzim elektrodu geliştirmişlerdir. Enzimatik olarak üretilen H_2O_2'nin elektroyükseltgenmesi sabit +0,7 V'da ölçülerek amperometrik cevap alınmıştır. Enzim elektroduna substrat tampon ve enzim derişimi, pH ve sıcaklığm etkisi araştırılmıştır. Çalışma sıcaklığı 30°C ve optimum pH=8,0 olarak belirlenmiştir. Enzim elektrodunun duyarlılığı sırasıyla: metanol > etanol > n-butanol > benzil alkol şeklindedir. Lineer cevabın metanol için 3,7 mM, etanol için 3,0 mM, n- butanol için 6,2 mM, benzil alkol için 5,2 mM'a kadar olduğu belirlenmiştir. İmmobilize enzim sisteminde metanol için görünür Michaelis-Menten sabiti (K_{Mapp}) 5,78 mM ve aktivasyon enerjisi 38,07 kJ/mol olarak bulunmuştur.

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

Yıldız ve çalışma grubu (2002), organik peroksitler, t-bütilhidroperoksit, 2-bütanon peroksit, kümenhidroperoksit ve t-bütil perasetat ölçümü için amperometrik bir enzim elektrodu geliştirmişlerdir. Enzim elektrodu polivinilferrosenyum film içinde horseradish peroksidaz elektrostatik immobilizasyon ile hazırlanmıştır. $PVF^+ClO_4^-$ film Pt elektrot üzerine 0,7 V'ta

0,1 M TBAP'daki metilenklorür içindeki polivinilferrosenin elektroyükseltgenmesi ile kaplanmıştır. Modifiye enzim elektrodu pH=8,5 0,05 M fosfat tamponunda HRP'nin anyon değiştirmesi ile hazırlanmıştır. Film kalınlığı, immobilizasyon sırasındaki enzim konsantrasyonu, sıcaklık gibi parametrelerin enzim elektrodunun performansı üzerine etkileri araştırılmıştır.

Patel ve çalışma grubu (2003), silikajel partükülleri üzerine polivinilferrosen içeren redoks aracının sentezini yapmışlardır. Bu polimerik aracı ile hazırlanan karbon pasta elektrotların sulu ortamda kararlılığına bir ay boyunca bakılmıştır. Sonuçlara göre bir ay sonunda başlangıçtaki aktivitenin yaklaşık %70'ni koruduğu gözlenmiştir. Farklı potansiyellerde bu aracıyı ve glukoz oksidazı içeren karbon pasta elektrodun amperometrik ölçümlerinin artan glukoz derişimiyle doğrusal ilişki gösterdiğini gözlemişlerdir.

Gülce ve çalışma grubu (2003), bir diğer çalışmalarında kolin tayini için yeni bir enzim elektrodu geliştirmişlerdir. Enzim elektrodu polivinilferrosenyum perklorat kaplı Pt elektrot yüzeyine kolin oksidaz tutuklanması ile hazırlanmıştır. H_2O_2'in yükseltgenmesine ait akımı ölçülmüştür. Kolin derişimi, çalışma sıcaklığı ve pH' in enzim elektrodun cevabı üzerine etkileri çalışılmıştır. Cevap süresi 60-70 s ve lineer çalışma aralığı 1,2 mM kolin derişimi olarak bulunmuştur. Hazırlanan bu enzim elektrot için Michaelis-Menten sabiti aktivasyon enerjisi sırasıyla 2,32 mM ve 38,91 kJ/mol olarak bulunmuştur.

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

Gülce (2005), tarafından yapılan bir çalışmada anaerobik çözelti ortamında glukoz tayini için Pt polivinilferrosenyum matriksine glukozoksidaz immobilizasyonu ile amperometrik enzim elektrodu geliştirmiştir. Polimer film kalınlığı, biriktirilen enzim miktarı, aracının miktarı, glukoz konsantrasyonu, uygulanan potansiyel, ortam pH'ı gibi paremetrelerin enzim elektrodunun cevabına etkileri incelenmiştir. Cevap süresi 30-40 s, elektrolit çözeltisinin pH'ı 7,4, çalışma sıcaklığı 25ºC ve doğrusal cevabın 5,0 mM'a kadar glukoz konsantrasyonunda olduğu bulunulmuştur. Girişim yapabilecek türlerin girişim sinyalleri ölçülmüştür.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Kronoamperometri

Amperometrik elekrotlar sabit voltaj altında çalışan bir hücreden oluşur. Elektroda sabit potansiyel uygulanarak sistemin termodinamik dengesi bozulur. Sistemde buna tepki olarak, elektrodun daldırıldığı çözeltide bulunan tayin edilecek maddenin, elektrot yüzeyinde indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucu bir akım oluşur. Amperometri yönteminin esası akım ölçümüne dayanmaktadır. Amperometrik yöntemin kullanıldığı biyosensör uygulamalarında elektrot seçimliliği ve duyarlılığı büyük ölçüde biyokatalizörün elektrot yüzeyinde tutuklanmasına bağlıdır.

Durgun bir çözeltide çalışma elektrodu ile karşılaştırma elektrodu arasına incelenen sistemin voltamogramında plato bölgesinde sabit bir gerilim değeri uygulanırsa basit elektrot tepkimesi için zamanın karekökü ile azalan bir akım oluşur. Uygulanan sabit bir gerilimde akımın zamanla gelişiminin ölçüldüğü bu yöntem kronoamperometri adını alır. Kronoamperometri deneylerinde çalışma elektroduna uygulanan etki sabit bir gerilim basamağı uyarmasıdır (Şekil 3.1.a). Başlangıçta çalışma elektrodunun gerilimi pozitiftir. t=0 anında çalışma elektrodunun gerilimi elektrot yüzeyinde tepkiyen derişimini bir anda sıfıra götürecek ölçüde negatif olan bir E_{son}, değerine atlatılmaktadır. Sistemin bu uyarıya cevabı zamana bağlı olarak değişen bir akımdır (Şekil 3.1.b).



Şekil 3.1 a) Kronoamperometrik uyarı b) Kronoamperometrik cevap (Bard ve Faulkner 1980)

3.2. Kullanılan Çözücünün Saflaştırılması

Bu çalışmada, polimer çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan metilen klorür (Merck) önce H_2S0_4 ile daha sonra destile su ve %5'lik Na_2CO_3 ile son olarak da destile su ile tekrar yıkandı. Metilen klorüre, $CaCl_2$ eklenerek ön destilasyon yapıldı. İki kez de P_2O_5 üzerinden destillenerek arıtıldı. Enzim elektrot aktivitesinin belirlenmesinde çözücü olarak kullanılan su, Millipore saf su cihazından alındı.

3.3. Kullanılan Elektrotlar

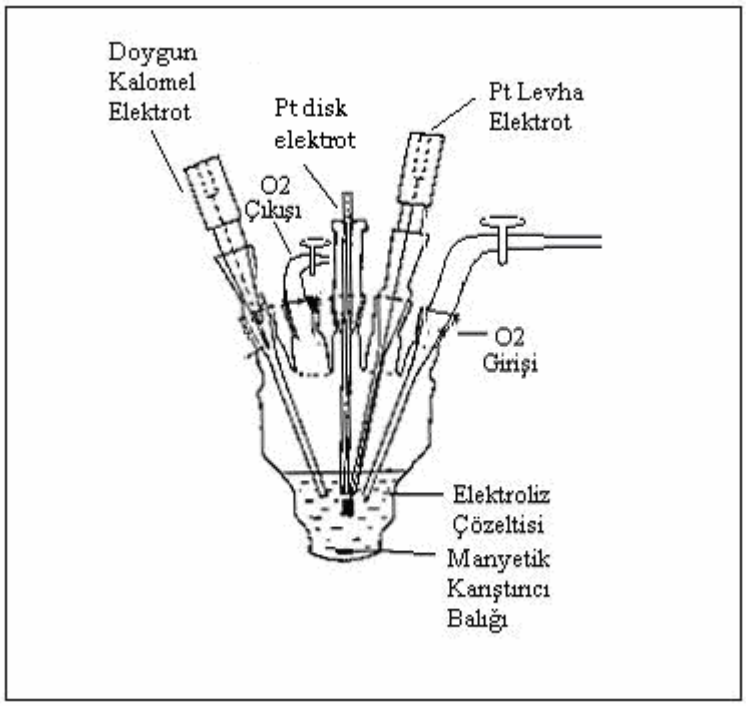
Elektrokimyasal deneylerde alışma elektrodu olarak 2 mm çapında Pt disk elektrot (0,0314 cm^2), karşılaştırma elektrodu olarak doygun kalomel elektrot ve karşıt elektrot olarak Pt spiral tel elektrot kullanıldı. Pt disk elektrot her elektrokimyasal çalışmada önce su ile bulamaç hale getirilen Cr_2O_3 ile düzgün bir yüzey üzerinde parlatıldı. Bu elektrot daha sonra sırasıyla destile su ve çalışılacak çözücü ile yıkanıp kurutulduktan sonra kullanıldı.

3.4. Kullanılan Aletler

Çalışmada, potansiyostat olarak bilgisayar kontrollü CHI 660 A Electrochemical Analyzer kullanılmıştır. Sıcaklık denetleyici sirkülatör Selecta 1000'dir. pH ölçümlerinde, pH/iyon analiz cihazı (CyberScan 510) kullanılmıştır. pH ölçümlerinde sabit sıcaklık banyosu kullanılarak 25°C±0,1°C sıcaklıkta çalışılmıştır. Manyetik karıştırıcı Snijiders 34532 markadır. Oksijen Tüpü Habaş, Bursan A.Ş.'den temin edilmiştir.

3.5. Elektroliz Hücresi

Elektrokimyasal çalışmalar rodajlı, beş girişi bulunan, ceketli bir cam hücrede yapıldı (Şekil 3.2.). Beş girişin üç tanesine; Pt çalışma elektrodu, Pt karşıt elektrodu ve karşılaştırma elektrodu yerleştirildi. Diğer iki girişten birine gaz giriş borusu, diğerine ise gaz çıkış musluğu takıldı.



Şekil 3.2. Elektrokimyasal çalışmaların yapıldığı hücre (Gülce 1993)

3.6. Enzim Çözeltisinin Hazırlanması

Gerekli miktardaki kolin oksidaz (E.C 1.1.3.17 C-5896), 1,00 mL, pH 7,4 olan 0,01 M fosfat tampon çözeltisinde çözülmüştür. Enzim çözeltisi her çalışmadan önce taze olarak hazırlanmıştır.

3.7. Tampon Çözeltinin Hazırlanması

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

3.8. Kolin Çözeltisinin Hazırlanması

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

3.9. $PtBr_2$ Çözeltisinin Hazırlanması

$PtBr_2$ (Merck) katısı 50 mg tartılarak daha sonra çözücü olarak 15 mL su ve 15 mL HBr (% 47, d=1,50) eklenerek çözelti hazırlanmıştır.

3.10. Vinilferrosenin Kimyasal Polimerizasyonu

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

3.11. Enzim Elektrodunun Hazırlanması

Enzim elektrodunun hazırlanması iki farlı yöntemle yapılmıştır. İlk yöntemde belirli derişimdeki polivinilferrosen (PVF) çözeltisine daldırılan Pt çalışma elektrodu belirli bir süre bekletilerek elektrodun polimer filmle kaplanması sağlanmıştır. Polimer filmle kaplanan elektrot kolin oksidaz (ChOx) çözeltisinde bekletilerek enzimin elektrot yüzeyinde tutuklanması sağlanmıştır. Çalışmamızda bu yöntemle hazırlanan elektrot PVF-ChOx olarak tanımlanmıştır. Hazırlanan PVF-ChOx enzim elektroduna çalışma potansiyeli, PVF derşimi, PVF'de bekletme süresi, enzim derişimi ve enzimde bekletme süresi gibi deneysel parametrelerin etkisi araştırılmıştır.

İkinci yöntemde enzim elektrot hazırlanırken ilk yöntemde olduğu gibi Pt çalışma elektrodu polimer film ile kaplanmıştır. PVF kaplanmış elektrot belirli derişimdeki $PtBr_2$ çözeltisinde belirli bir süre bekletilerek aşağıdaki reaksiyona göre Pt'nin elektrot yüzeyinde ön deriştirmesi yapılmıştır.

Reaksiyon ;

$$2\ PVF + Pt^{2+} \rightarrow 2\ PVF^{+} + Pt$$

Pt biriktirilmiş çalışma elektrodu ChOx çözeltisinde bekletilerek ChOx'ın elektrot yüzeyinde tutuklanması sağlanmıştır. PVF-ChOx enzim elektrodu ile saptanan optimum koşullar kullanılarak PVF-Pt-ChOx enzim elektrodunda Pt taneciklerinin etkisi araştırılmıştır. Pt taneciklerinin etkisi araştırmak için polimer kaplanmış elektrotta Pt biriktirme işlemi ChOx tutuklamadan önce Pt biriktirme ve ChOx tutuklanmasından sonra Pt biriktirme olarak iki farklı şekilde yapılmıştır. Polimer kaplı çalışma elektrodunda ChOx tutuklandıktan sonra Pt biriktirilen elektrot PVF-ChOx-Pt şeklinde tanımlanıştır.

3.12. Enzim Elektrot Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu deneylerde çalışma elektrodu olarak daha önce hazırlanan enzim elektrodu kullanılmıştır. Karşıt elektrot olarak Pt spiral tel, karşılaştırma elektrodu olarak doygun kalomel elektrot kullanılmıştır.

Hücreye 15,00 mL tampon konularak hücre etrafındaki ceket sayesinde çözeltinin sabit sıcaklığa gelmesi sağlanmıştır. Bu işlem yapılırken çözeltiye sabit akış hızında oksijen gönderilip, böylece çözeltinin oksijence doygunluk derişimine ulaşması beklenmiştir. Sonra kısa oksijen giriş borusu takılarak çözelti üzerinden reaksiyon boyunca oksijen geçirilmesi ve çözeltinin oksijenle doygunluk derişiminde tutulması sağlanmıştır. Çalışma voltajı ayarlanarak elektrot amperometrik olarak işleme alınmıştır.

Elektorodu kararlı hale ulaştırmak için substrat içermeyen çözeltide kararlı hal akım değerine ulaşıncaya kadar sabit gerilimde elektroliz yapılmıştır. Kararlı hal akım değerine ulaşıldığı zaman ölçüm ortamına bilinen derişimlerdeki substrat (kolin) çözeltisinden belli hacimde eklenerek, bu derişime karşılık gelen kararlı hal akım değeri (enzim elektrot aktivitesi) ölçülmüştür. Daha sonra kolin çözeltisi ilavesi ile, ölçüm ortamındaki kolin derişimi artırılmış ve yeni kararlı hal akım değerinin eldesi için beklenmiştir. Deneyler sırasında manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırma işlemi yapılmış,

karıştırıcı kapatılarak akımın sabitlenmesi beklenmiş ve bu durumdaki difüzyon akımı ölçülmüştür.

Enzim elektrodunun aktivitesine PVF derişimi, enzim derişimi, tampon derişimi, pH ve sıcaklık gibi deneysel parametrelerin etkisi incelenmiştir. Enzim elektrodunun tekrar kullanımından kaynaklanabilecek hataların önüne geçebilmek için deneysel parametrelerin her değiştirilişinde yeni enzim elektrodu hazırlanarak, enzim elektrodunun en uygun çalışma koşulları belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

Bu çalışmada kolin tayini için enzim elektrot hazırlanmasında daha önce kullanılmamış olan polivinilferrosen (PVF) modifiye elektrodu kullanılarak sulu çözeltilerde kolin tayini için yeni bir enzim elektrodu geliştirilmiştir. Kolin ChOx enzimi varlığında betain ve H_2O_2'e dönüşmektedir (Eşitlik 4.a). Oluşan hidrojen peroksitin elektrokimyasal olarak yükseltgenmesi sonucu, kolin derişimiyle orantılı bir anodik akım elde edilmesi elektrodun çalışma prensibini oluşturmaktadır.

$$\text{Kolin} + 2O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{ChOx}} \text{Betain} + 2H_2O_2 \qquad (4.a)$$

$$H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^- \qquad (4.b)$$

Enzim elektrotlarının hazırlanması iki şekilde gerçekleştirilmiştir.

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

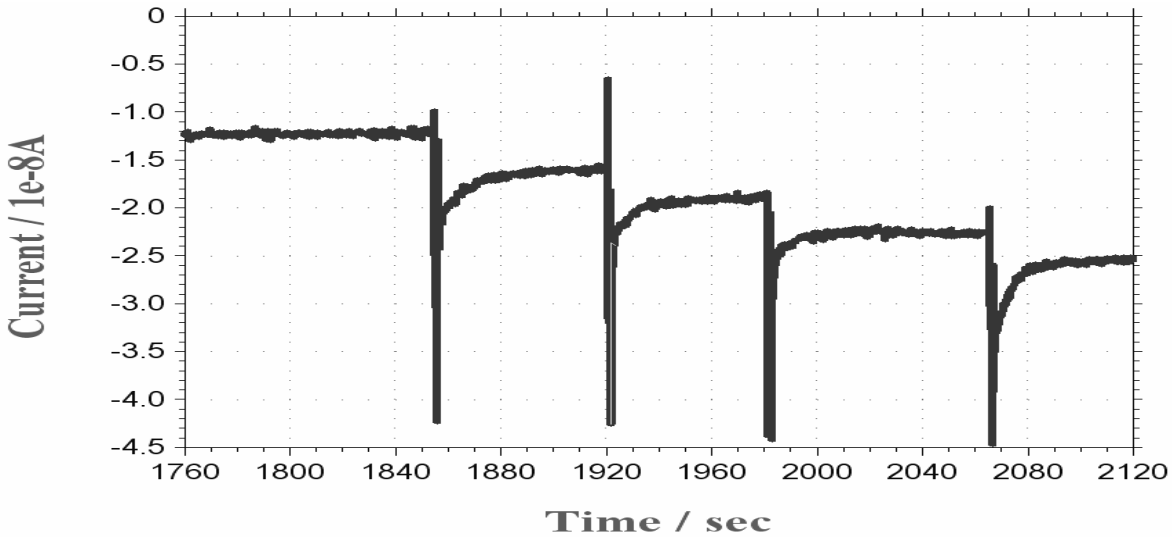
Bu çalışmada geliştirilen ikinci enzim elektrodu ise Pt biriktirilmiş PVF modifiye elektroduna ChOx enzimin tutuklanmasıyla hazırlanan ve PVF-Pt-ChOx enzim elektrodu olarak tanımlanan enzim elektrodudur. Bu elektrodun hazırlanmasında PVF-ChOx enzim elektrodu için bulunan optimum koşullar ele alınarak yüzeyde Pt biriktirmenin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla PVF-Pt-ChOx enzim elektrodunun aktivitesine, elektrodun kullanılması sırasında kullanılan çözeltideki Pt^{+2} derişimi, $PtBr_2$ çözeltisinde bekletme süresi gibi deneysel parametrelerin etkileri araştırılarak optimum koşullar belirlenmiştir. Ayrıca her iki enzim elekrot için substrat derişimi ve sıcaklığın etkileri de

araştırılarak tutuklanmış enzim sistemi için görünür Michaelis-Menten (K_{mg}) ve aktivasyon enerjileri (E_a) hesaplanmıştır.

4.1. (PVF-ChOx) Enzim Elektrot Aktivitesinin Belirlenmesi

Hazırladığımız enzim elektrodun aktivitesine etkili olabilecek faktörler elektrodun modifiye edilmesi sırasında kullanılan PVF derişimi, PVF'de bekletme süresi, enzimin tutuklanmasında kullanılan çözeltideki enzim derişimi, enzim çözeltisinde bekletme süresi ve ölçüm ortamı koşullarıdır. Ortam pH' ı, sıcaklık ve substrat derişimi ise elektrot aktivitesinde etkili olabilecek ortam koşulları olarak belirlenmiştir. Bu çalışmalar sabit bir çalışma voltajında farklı kolin derişimleri için elde edilen kararlı hal akımlarının ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Zamana karşı akım değişimi izlenerek elde edilen cevap eğrileri şekil 4.1'de verilmiştir. Şekil 4.1'deki eğriler elektrokimyasal hücreye her defasında 0,65 mM kolin eklenerek elde edilen cevap eğrileri verilmiştir. Cevap eğrilerinden görüldüğü gibi akımın sabitlenmesi için gereken süre yani enzim elektrodun cevap süresi 25-30 s arasındadır.



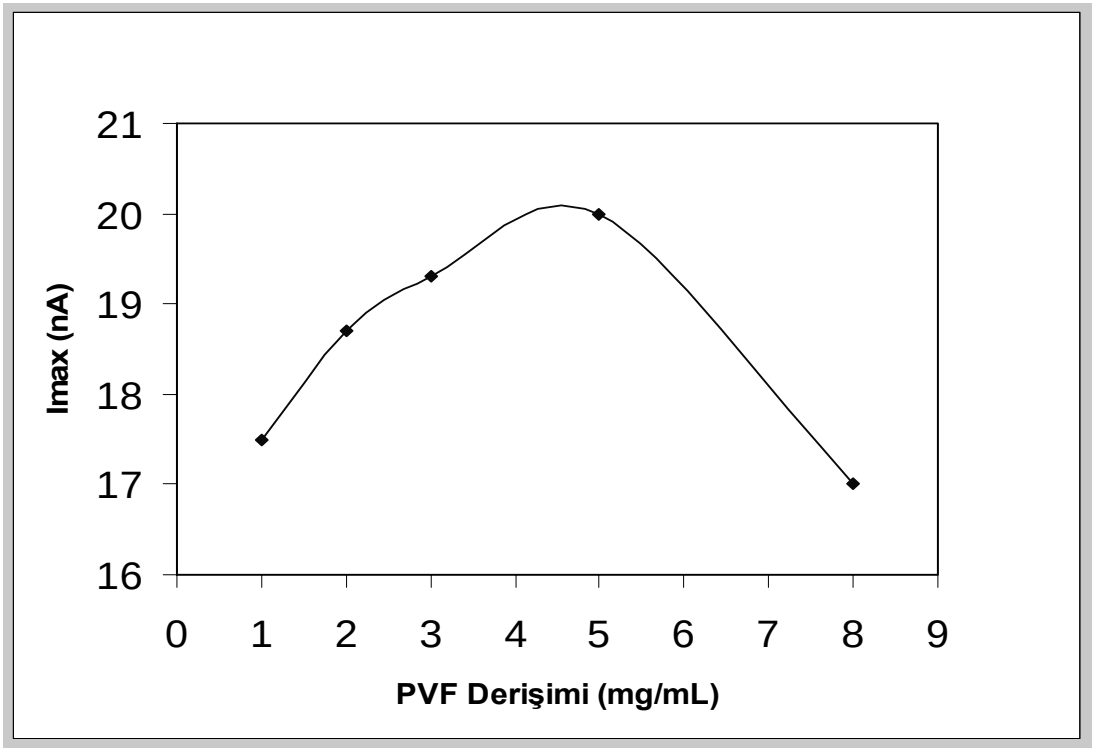
Şekil 4.1. PVF-ChOx enzim elektrot aktivitesinin kolin derişimi ile değişimi (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40 5,00 mg PVF/mL, 2,00 mg ChOx mg/mL enzim, 25°C)

4.1.1. Uygulanan gerilimin etkisi

PVF-ChOx enzim elektrodunun hazırlanmasında akım cevabını etkileyen faktörlerden birisi uygulanan potansiyeldir. Bu çalışmada, 5 mg/mL PVF'de 5 dakika ve 2 mg ChOx/mL enzim çözeltisinde 30 dakika bekletme süresi sabit tutulmuştur. Elektroda uygulanan gerilimin elektrot cevabına etkisini belirlemek için çalışma voltajı 0,40 V – 0,70 V aralığında değiştirilmiştir. Hazırlanan enzim elektrodunun aktivitesine, uygulanan gerilimin etkisini incelemek amacıyla 0,10 M pH 7,40 tamponu kullanılmıştır. Kolin ilavesinden sonra elde edilen sonuçlar kullanılarak uygulanan gerilime karşı maksimum akım değerlerinde en yüksek akım değeri 0,7 V'da elde edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda 0,7 V gerilim kullanılmıştır.

4.1.2. PVF derişiminin etkisi

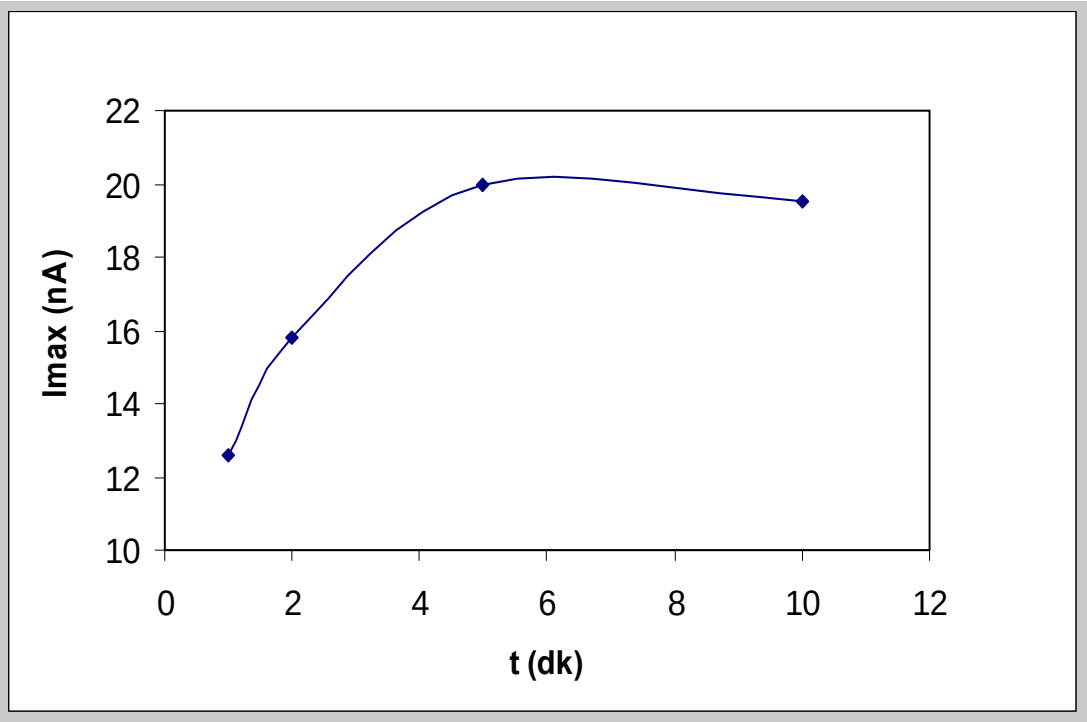
Elektrot yüzeyindeki PVF filminin kalınlığı elektrodun kaplanması için kullanılan PVF çözeltisinin derişimine bağlıdır. Bu çalışmada PVF de bekletme süresi 5 dakika ve 2,00 mg ChOx/mL enzim çözeltisinde 15 dakika bekletme süresi sabit tutulmuştur. PVF derişiminin etkisini belirleyebilmek için çalışma sırasında kullanılan PVF miktarı 1 mg/mL ile 8 mg/mL arasındaki değiştirilmiştir. Çalışmalarda 0,1 M pH 7,40 tampon çözelti kullanılmıştır. Kolin ilavesinden sonra sonra gözlenen maksimum akım değerleri PVF derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi kullanılan PVF derişiminin artmasıyla artmasıyla gözlenen akım değeri artmakta ve 5,0 mg/mL PVF derişiminde en yüksek değerini almaktadır. 5 mg/mL PVF derişiminden sonra ise akım azalmaktadır. Bundan sonraki çalışmalarda maksimum aktivitenin elde edildiği PVF derişimi 5 mg PVF/ mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2. PVF-ChOx enzim elektrot aktivitesinin PVF derişimi ile değişimi (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 2,00 mg ChOx mg/mL enzim, 25°C)

4.1.3. PVF' de bekletme süresinin etkisi

PVF-ChOx enzim elektrodunun akım cevabını etkileyen bir diğer parametrede elektrodun PVF çözeltisinde bekletme süresidir. PVF'de bekletme süresi 1 dakika ile 10 dakika arasında değiştirilmiş ve PVF'de bekletme süresi için elektrot aktivitesi incelenmiştir. Kolin ilavesinden sonra gözlenen maksimum akım değerleri PVF çözeltisinde bekletme süresine karşı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.3'de görüldüğü gibi PVF'de bekletme süresinin artması ile gözlenen akım değeri artmış ve 5 dakika bekletme süresinde en yüksek akım elde edilmiştir. Bundan sonraki yapılan çalışmalarda PVF de bekletme süresi 5 dakika olarak belirlenmiştir.

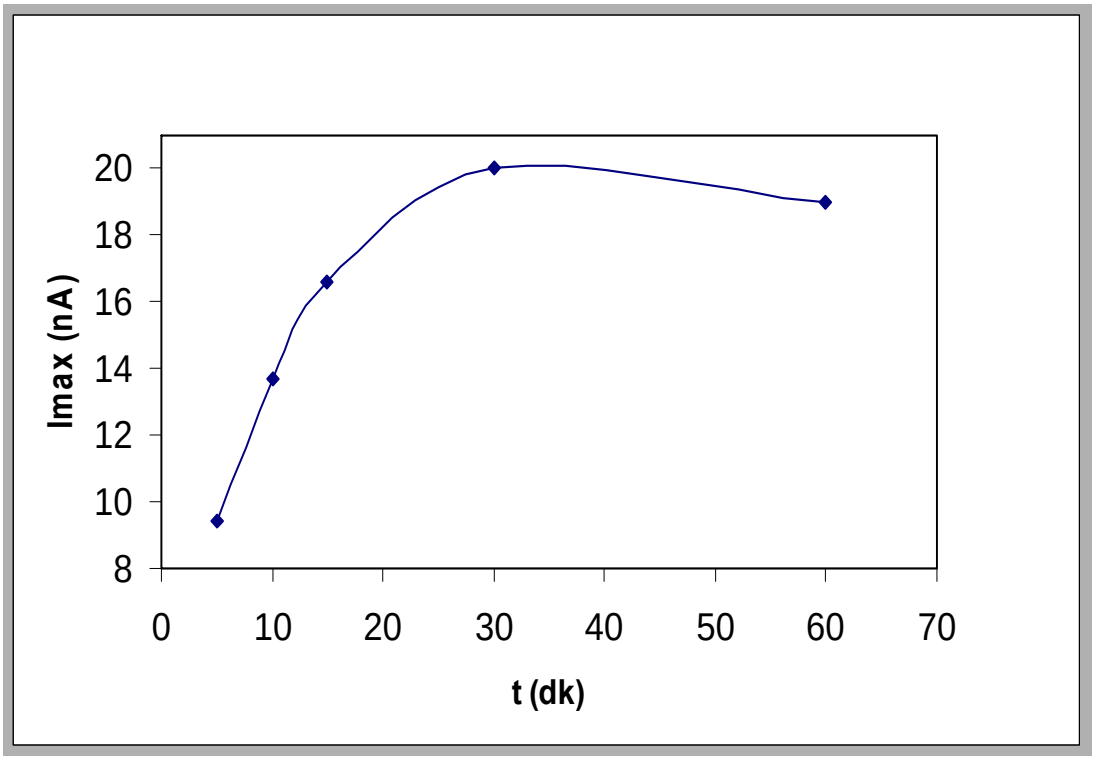


Şekil 4.3. PVF-ChOx enzim elektrot için PVF çözeltisinde bekletme süresine karşı elde edilen akım değerleri (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 5,00 mg PVF/mL, 2,00 mg ChOx mg/mL enzim, 25°C)

4.1.4. Enzimde bekletme süresinin etkisi

Hazırlanan PVF-ChOx enzim elektrodunun aktivitesine enzim çözeltisinde bekletme süreside maksimum aktiviteyi belirleyen etmenlerden biridir. Enzimde bekletme süresi 5 dakika ile 60 dakika arasında değiştirilmiştir. Kullanılan her bir bekletme süresinde elektrot aktivitesi

incelenmiştir. Bu çalışmalar sırasında 0,10 M pH 7,40 fosfat tamponu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar kullanılarak enzim çözeltisinde bekletme süresine karşı kolin ilavesinden sonraki maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir: Şekil 4.4'de görüldüğü gibi enzimde bekletme süresinin artmasıyla gözlenen akım değeri artmakta ve belirli bir bekletme süresinden sonra akım azalmaktadır. Maksimum aktivite 30 dakika da olmaktadır. Bundan sonra yapılan çalışmalarda enzim çözeltisinde bekletme süresi 30 dakika olarak kullanılmıştır.

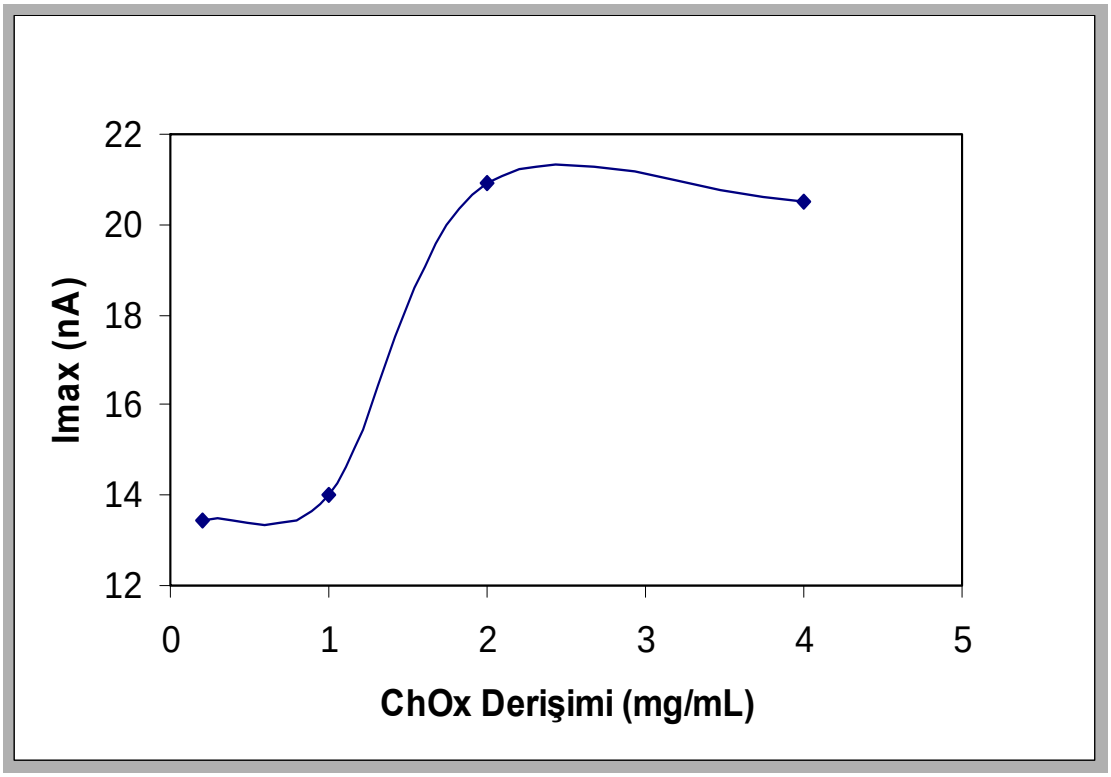


Şekil 4.4. PVF-ChOx enzim elektrodunda tutuklama işlemi sırasında kullanılan enzim çözeltisinde bekletme süresine karşın elde edilen akım değerleri (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 5,00 mg PVF/mL, 2,00 mg ChOx mg/mL enzim, 25°C)

4.1.5. Enzim derişimin etkisi

Polimerik yapı içerisinde tutuklanan ChOx miktarı, enzim elektrodun hazırlanması sırasında kullanılan çözeltideki enzim derişimine bağlıdır. Hazırlanan enzim elektrodun aktivitesine enzim derişiminin etkisini incelemek amacıyla tutuklama işlemi sırasında kullanılan çözeltideki enzim miktarı 1 mg ChOx/ mL ile 4 mg ChOx/mL enzim derişimleri arasında değiştirilmiştir.

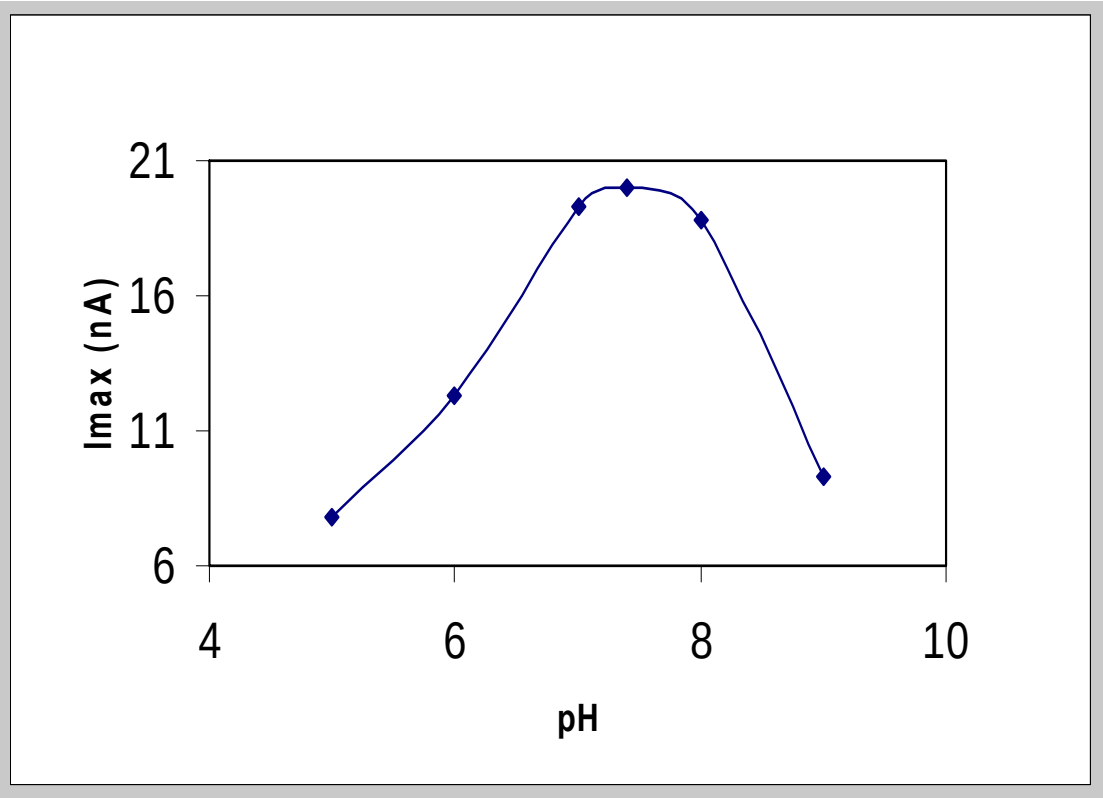
Enzimde bekletme süresi 30 dakika olarak sabit tutulmuştur. Kullanılan her bir enzim derişiminde elektrot aktivitesi incelemiştir. Bu çalışmalar sırasında 0,10 M pH 7,40 tamponu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar kullanılarak enzim derişimine karşı kolin ilavesinden sonraki maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.5'den görüldüğü gibi tutuklama işlemi sırasında kullanılan enzim derişiminin artmasıyla gözlenen akım değeri artmakta ve belli bir enzim derişiminden sonra ise akım değerleri önemli miktarda değişmemektedir. Düşük enzim derişiminde daha düşük akım değerlerinin elde edilmesi polimerik yapı içerisinde daha az miktarda enzim tutuklanması nedeniyledir. Belli bir enzim derişiminden sonra ise polimer yapı içerisinde maksimum miktarda enzim tutuklanmakta ve çözeltideki enzim miktarının artmasıyla polimer yapıda tutuklanan enzim miktarı değişmemektedir. Bundan sonraki çalışmalarda da 2,00 mg ChOx/mL enzim çözeltileri kullanılmıştır.



Şekil 4.5. PVF-ChOx enzim elektrodunda tutuklama işlemi sırasında kullanılan çözeltideki enzim derişimine karşı elde edilen akım değerleri (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40, 5,00 mg PVF/mL, 25°C)

4.1.6. Çalışma pH'ının etkisi

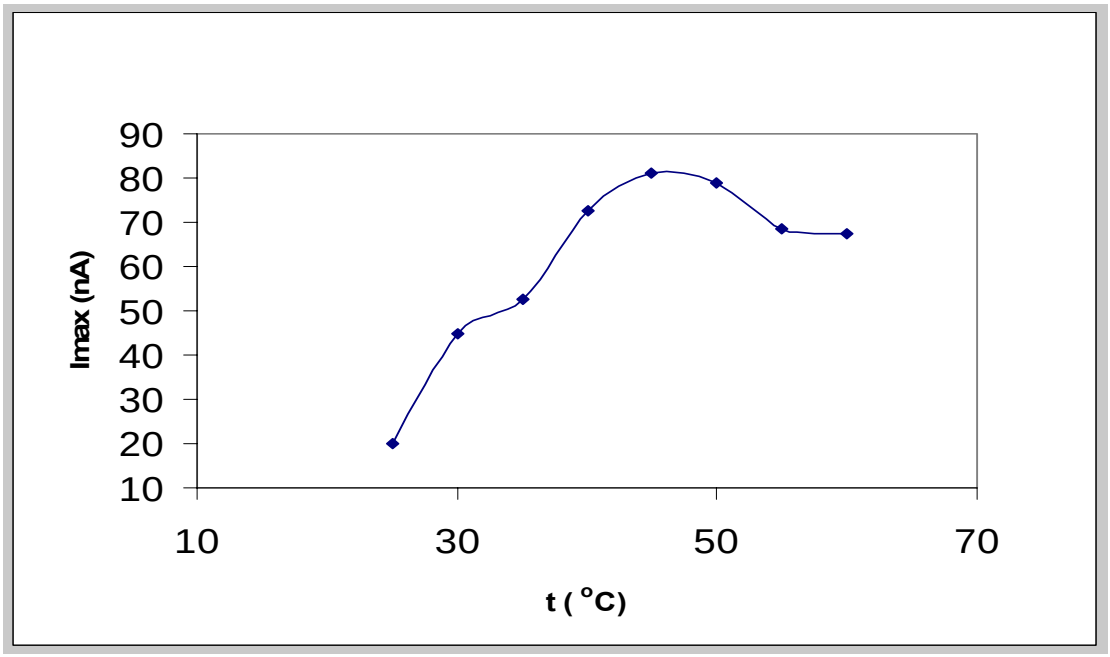
Enzimlerin aktivitesi pH' a bağlı olarak değiştiğinden, enzim elektrodun aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden biride çalışma ortamının pH' sıdır. Çünkü enzimlerin aktivitesi pH'a bağlı olarak değişmektedir. PVF-ChOx enzim elektrodunun aktivitesine ortam pH'ının etkisini araştırmak amacıyla pH 5,0 ile 9,0 arasında değişen 0,1 M tampon çözeltilerinde elde edilen maksimum değerleri ölçülmüştür. Farklı pH değerlerinde kolin ilavesinden sonra ölçülen maksimum akım değerleri Şekil 4.6'da görülmektedir. Bu grafikte enzim elektrodunun maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 7,4 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. PVF-ChOx enzim elektrodunda kullanılan tampon çözelti pH'sına bağlı olarak elde edilen akım değerleri(0,10 M fosfat tamponu, 5,00 mg PVF/mL, 2,00 mg ChOx/mL, 25°C)

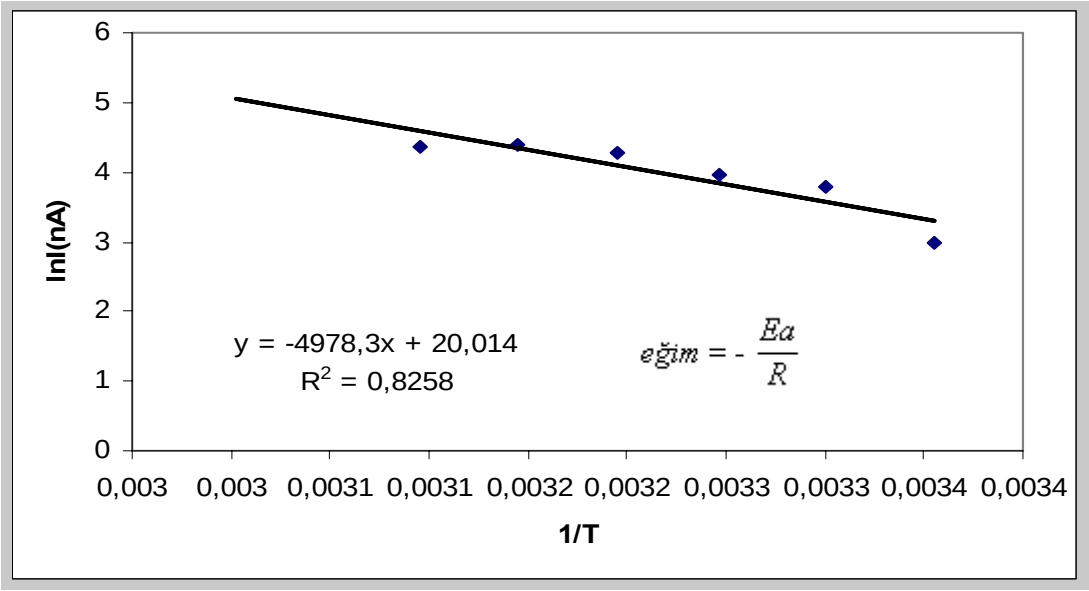
4.1.7. Çalışma sıcaklığının etkisi

Sıcaklık, enzimatik reaksiyonların kararlılığını ve hızını etkileyen önemli bir parametredir. Enzimatik reaksiyonlarda genellikle belli bir sıcaklığa kadar reaksiyon hızı sıcaklıkla artmakta daha yüksek sıcaklıklarda ise enzimin sıcaklıkla denatüre olması nedeniyle reaksiyon hızı düşmektedir. Bu çalışmamızda da 0,10 M fosfat tamponu, PVF de bekletme süresi 5 dakika ve enzimde bekletme süresi de 30 dakika olarak çalışılmıştır. Farklı sıcaklık değerlerinde kolin ilavesinden sonra ölçülen maksimum sıcaklık değerleri Şekil 4.7'de görüldüğü en yüksek akım değeri 45°C'de elde edilmiştir. Enzimatik reaksiyonlarda gözlenen davranışlara göre belli bir sıcaklığa kadar reaksiyon hızı sıcaklıkla artmakta, daha yüksek sıcaklıklarda ise enzimin denatüre olması nedeni ile reaksiyon hızı düşmektedir.



Şekil 4.7. PVF-ChOx enzim elektrodu ile sıcaklığa karşı elde edilen akım değerleri (0,10 M fosfat tamponu, 5,00 mg PVF/mL, 2,00 mg ChOx/mL)

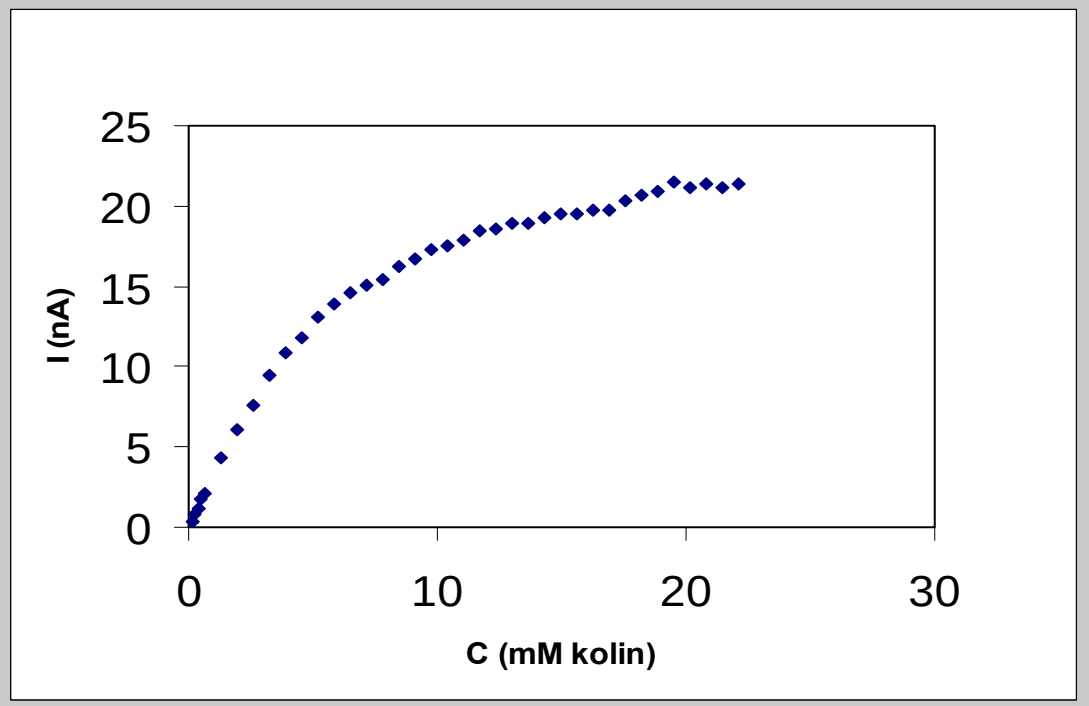
Reaksiyon hızının sıcaklıkla artış gösterdiği aralıktaki deneysel veriler kullanılarak tutuklanmış ChOx ile yürütülen reaksiyonun aktivasyon enerjisi Arrhenius eşitliğinden yararlanılarak bulunmuştur. Bu amaçla 1/T'ye karşı ln i değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.8). Elde edilen doğruların eğiminden PVF-ChOx sistemi için aktivasyon enerjisi 41,4 kJ/mol bulunmuştur.



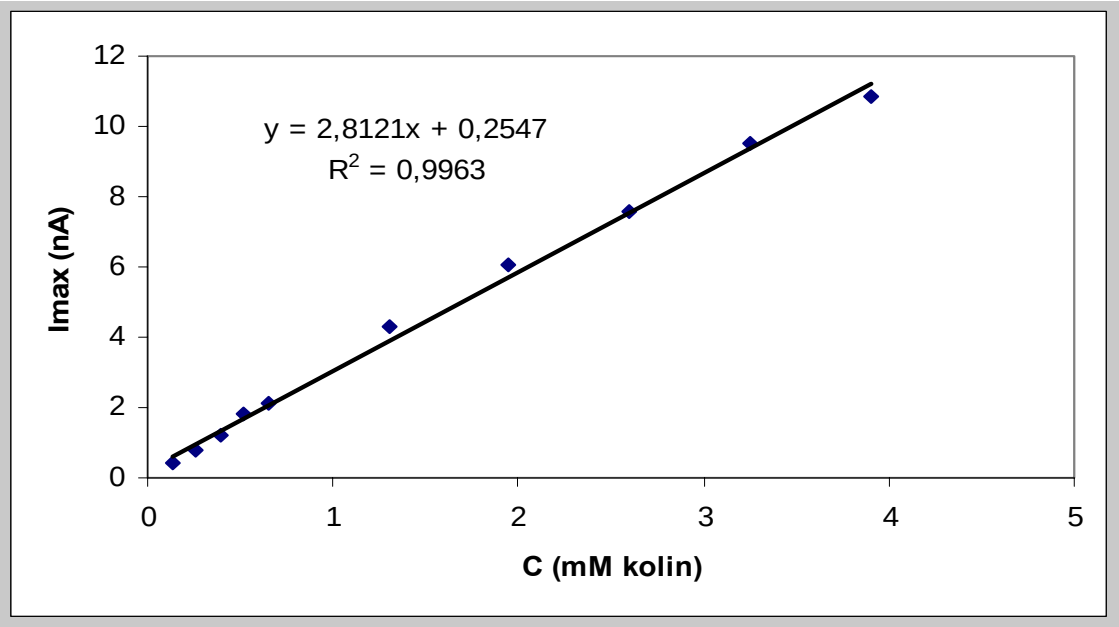
Şekil 4.8. (PVF-ChOx) enzim elektrodu için Arrhenius grafiği (0,1 M fosfat tamponu, pH 7,40, 5,0 mg PVF/mL, 2,0 mg ChOx/mL enzim, 25°C)

4.1.8. PVF-ChOx enzim elektroduna substrat derişimin etkisi

Enzim elektrotları ile sağlıklı ölçüm yapabilmenin ön koşulu ortamdaki substrat derişimi ile orantılı akım değerlerinin elde edilmesidir. Bu koşulun sağlandığı substrat derişim aralığı enzim elektrodunun doğrusal çalışma aralığı olarak tanımlanır ve pratikte bu aralığın geniş olması istenir. Bu aralığın ve elektrodun maksimum aktivitenin saptanması için ölçülen akım değerlerine kolin derişimi etkisi incelenmiştir. Daha önce saptanan optimum koşullarda, yani 2,00 mg ChOx/mL enzim derişimi ile hazırlanan enzim elektrodunun 0.1 M pH 7,4 fosfat tamponunda ve 25°C'de sıcaklıkta farklı kolin derişimlerinde verdiği akım değerleri saptanmıştır.



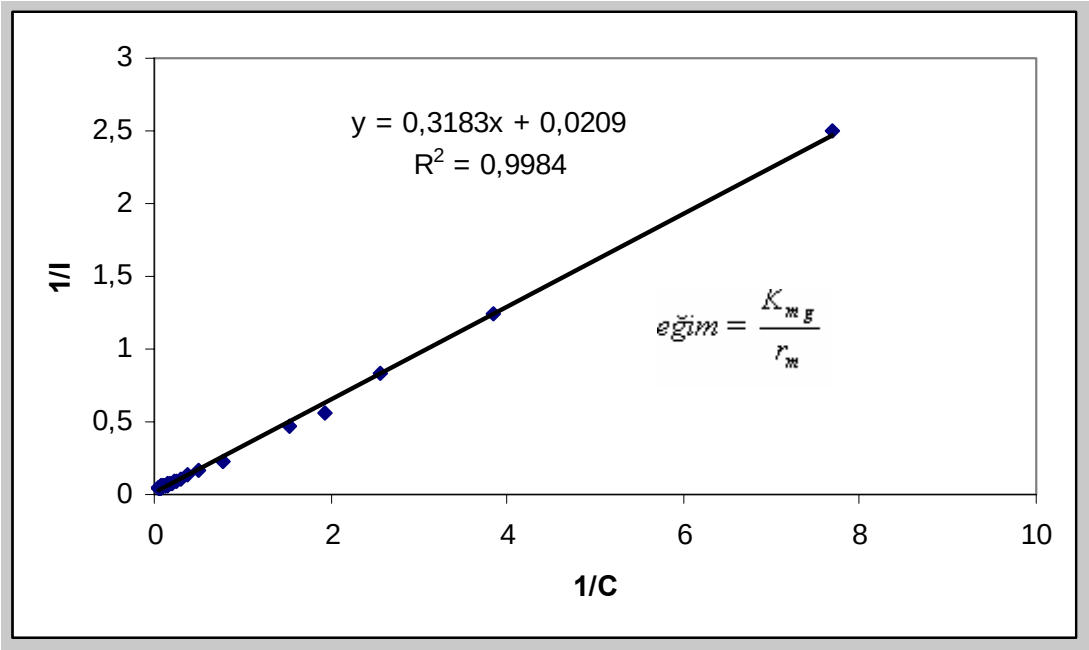
Şekil 4.9.(a). PVF-ChOx enzim elektrot aktivitesinin kolin derişimi ile değişimi (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40 5,00 mg PVF/mL, 2,00 mg ChOx mg/mL enzim, 25°C)



Şekil 4.9.(b). PVF-ChOx enzim elektrot aktivitesinin kolin derişimi ile değişimi veren doğrusal çalışma aralığı (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40 5,00 mg PVF/mL, 2,00 mg ChOx mg/mL enzim, 25°C)

Ölçülen akım değerlerinin kolin derişimi ile değişimi Şekil 4.9.(a/b)'de verilmiştir. Enzim elektrodu kolin derişimi ile orantılı akım değerleri verdiğinden hazırlanan enzim elektrodunun doğrusal çalışma sınırı 3,9 mM kolin derişimi olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan kolin derişimine karşılık elektrot cevabı yaklaşık olarak 19,5 mM civarında sabit değere ulaşmakta ve daha yüksek derişimlerde akım değerinde bir artış olmamaktadır. Bu durum hazırlanan elektrot için ölçüm ortamındaki koşullarda 19,5 mM kolin derişiminde, polimer film içerisindeki enzimin subsrata karşı doygunluğa ulaştığını göstermektedir. Dolayısıyla bu koşullarda 19,5 mM ve daha yüksek kolin derişimin de elektrot aktivitesinde difüzyon kısıtlamasının önemi olmayacaktır.

Çeşitli kolin derişimlerinde alınan akım değerleri kullanılarak PVF-ChOx enzim elektrodu için görünür Michaelis-Menten (K_{mg}) sabitleri tayin edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Tutuklanmış enzim için Lineweaver-Burk grafiği

Şekil 4.10'deki verilere göre yapılan hesaplamalar sonucu PVF-ChOx enzim elektrotta tutuklanmış enzim için K_{mg}=15,2 mM kolin değeri bulunmuştur.

4.2. PVF-Pt-ChOx Enzim Elektrot Aktivitesinin Belirlenmesi

Hazırladığımız enzim elektrotta platin biriktirmenin etkisini anlamak için platin biriktirme işlemi iki farklı yoldan yapılmıştır.

İlk yöntemde polimer film ile kaplanan çalışma elektroduna Pt biriktirilip daha sonra ChOx enzimi tutuklanmıştır (PVF-Pt- ChOx).

İkinci yöntemde ise polimer film ile kaplanan elektrotda ChOx tutuklanmış, Pt biriktirme işlemi ile ChOx tutuklanmış elektrot üzerine yapılmıştır (PVF-ChOx-Pt).

PVF-ChOx-Pt enzim elektrodunun koline cevap vermediği bulunmuştur. Bunun nedeni polimer-enzim tabakası üzerinin Pt filmi ile kaplanmasıdır. Elektrodun en dış katmanındaki Pt filmi kolinin film içerisine difüzlenmesini

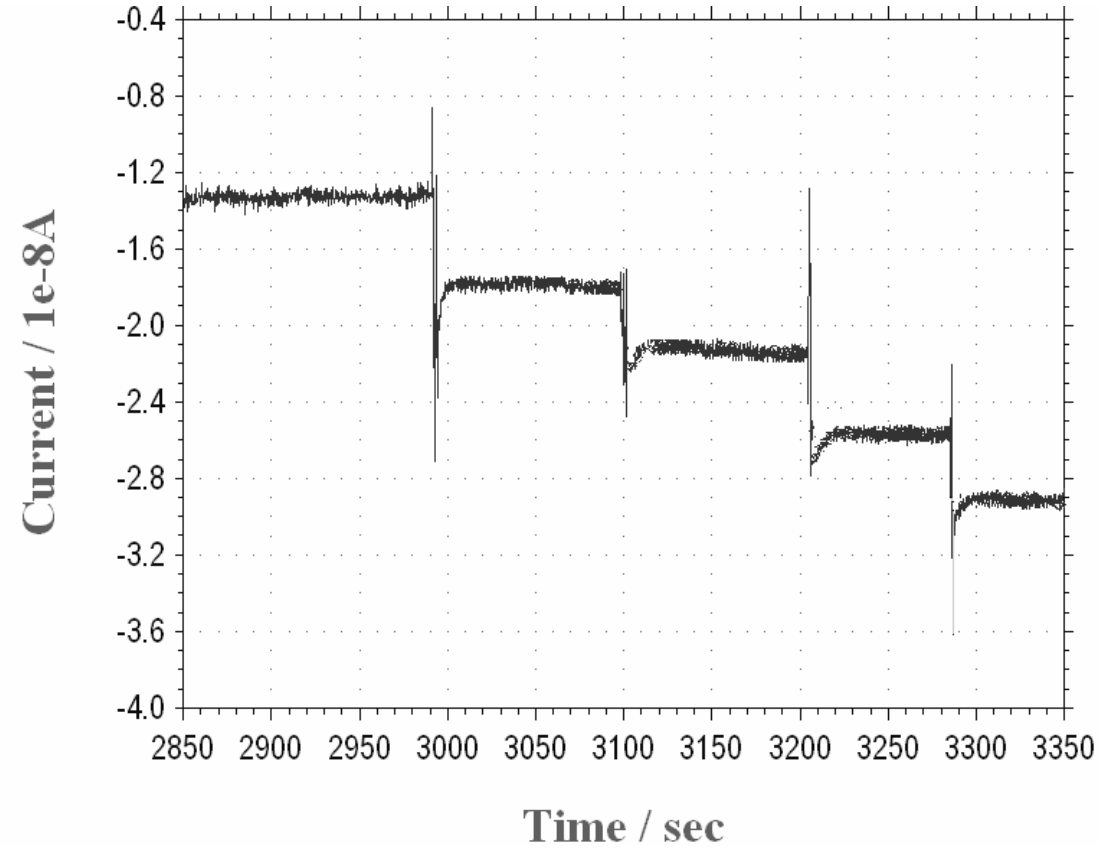
engellemektedir. Dolayısıyla kolinin enzim ile reaksiyonu gerçekleşmemekte ve bunun sonucunda bir akım artışı da gözlenmemektedir.

PVF-Pt-ChOx enzim elektrodunda ise kolin eklenmesi ile akımda hızlı bir artış olmakta, daha sonra ise akım azalarak kararlı-hal akımları oluşmaktadır. Elektrot aktivitesinin belirlenmesinde bu durumdaki difüzyon kontrollü akım değerleri ölçülmüştür. kolinin eklenmesi ile kararlı-hal akım değerlerinin oluşması arasında geçen süre 20-30 s arasındadır. Bu değer hazırlanan enzim elektrodunun cevap süresi olarak belirlenmiştir.

Şekil 4.11'de görülen cevap eğrileri O_2 atmosferinde elde edilen cevaplardır. PVF-Pt-ChOx enzim elektrodunun aktivitesi de enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan H_2O_2'ın yükseltgenme akımının ölçülmesiyle belirlenmektedir. Modifiye yüzeydeki Pt ChOx için redoks aracısı olarak davranmamaktadır.

Pt elektrot üzerine kaplanmış PVF yapısına Pt biriktirilip, ChOx enziminin tutuklanmasıyla hazırlanan PVF-Pt-ChOx enzim elektrodunun aktivitesine platin derişimi, platin çözeltisinde bekletme süresi, çalışma potansiyeli, ortam pH'ı, sıcaklık etkileri araştırılmıştır. PVF-Pt-ChOx enzim elektrodu ile yapılan çalışmalarda diğer parametreler için PVF-ChOx enzim elektrodu ile bulunan optimum değerler kullanılmıştır.

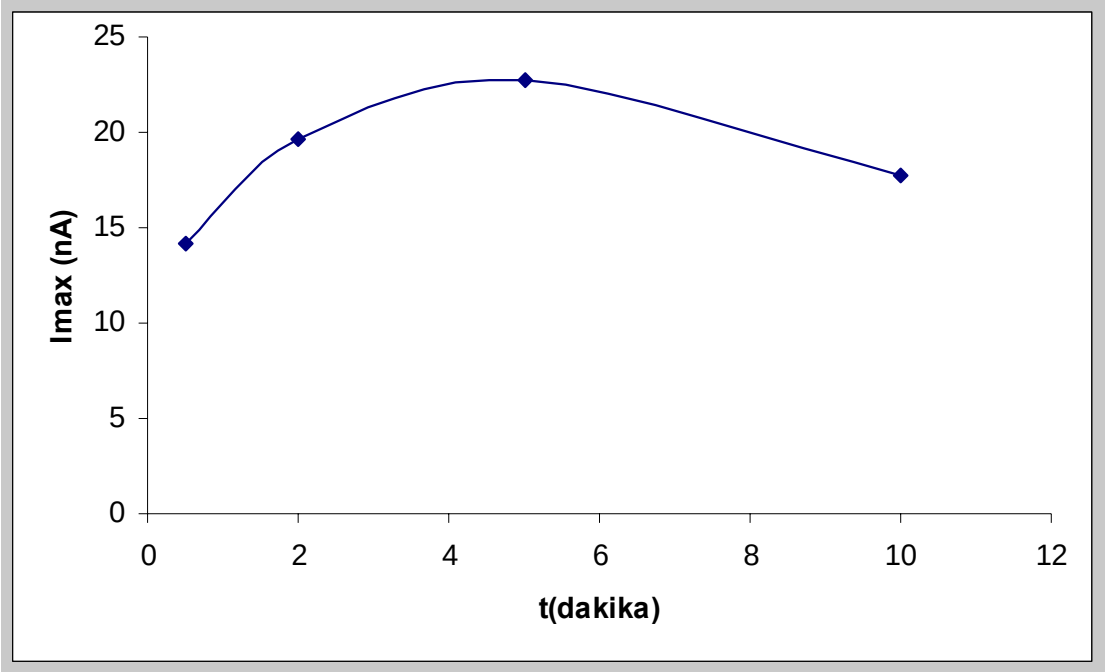
PVF-Pt-ChOx enzim elektrodu için zamana karşı akım değişimi izlenerek elde edilen cevap eğrileri şekil 4.11'de verilmiştir. Şekil 4.11'deki eğriler, her defasında 0,65 mM kolin eklenerek elde edilmiştir.



Şekil 4.11. PVF-Pt-ChOx enzim elektrot aktivitesinin kolin derişimi ile değişimi (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40 5,00 mg PVF/mL, 4,69 mM $PtBr_2$, 2,00 mg ChOx mg/mL enzim, 25°C)

4.2.1. $PtBr_2$ çözeltisinde bekletme süresinin etkisi

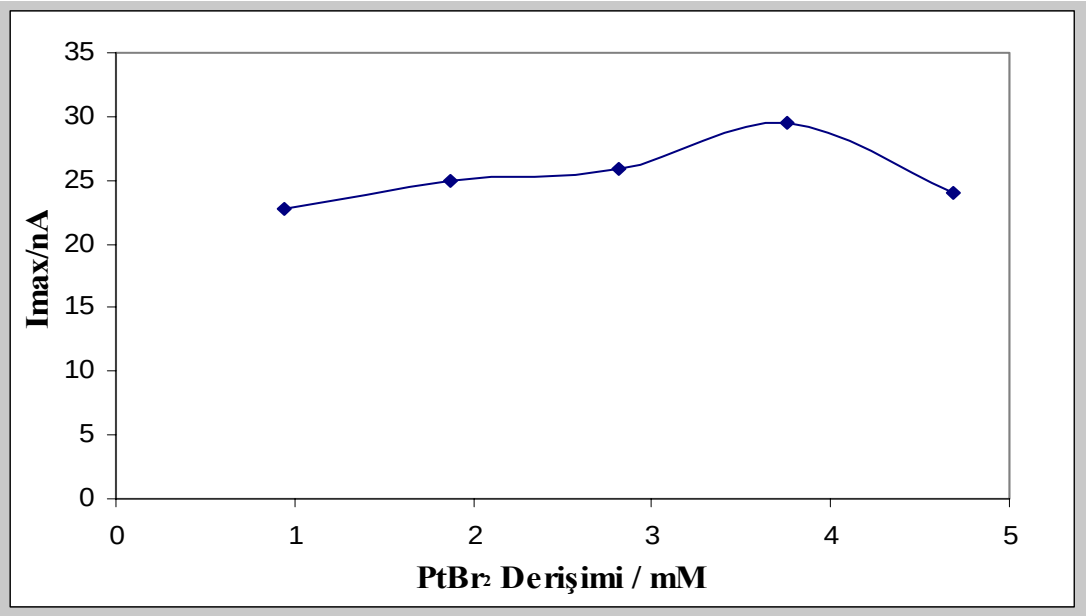
Hazırlanan PVF-Pt-ChOx enzim elektrodunun akım cevabını etkileyen paremetrelerden biri $PtBr_2$ çözeltisinde bekletme süresidir. $PtBr_2$ çözeltisinde bekletme süresi etkisini belirlemek için 4,69 mM $PtBr_2$ çözeltsinde bekletme süresi 0,5 dakika ile 10 dakika arasında değiştirilmiştir. Kullanılan her bir bekletme süresinde elektrot aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışmalar sırasında 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar kullanılarak farklı bekletme sürelerine karşı kolin ilavesinden sonraki maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi $PtBr_2$ çözeltisinde bekletme süresinin artmasıyla gözlenen akım değeri artmakta ve belirli bir bekletme süresinden sonra akım azalmaktadır. Bundan sonra yapılan çalışmalarda 5 dakikalık bekletme süresi kullanılmıştır.



Şekil 4.12. PVF-Pt-ChOx enzim elektrodunda kullanılan $PtBr_2$ çözeltisinde bekletme süresine karşı elde edilen akım değerleri (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40 5,00 mg PVF/mL, 4,69 mM $PtBr_2$, 2,00 mg ChOx mg/mL enzim, 25°C)

4.2.2. $PtBr_2$ derişiminin etkisi

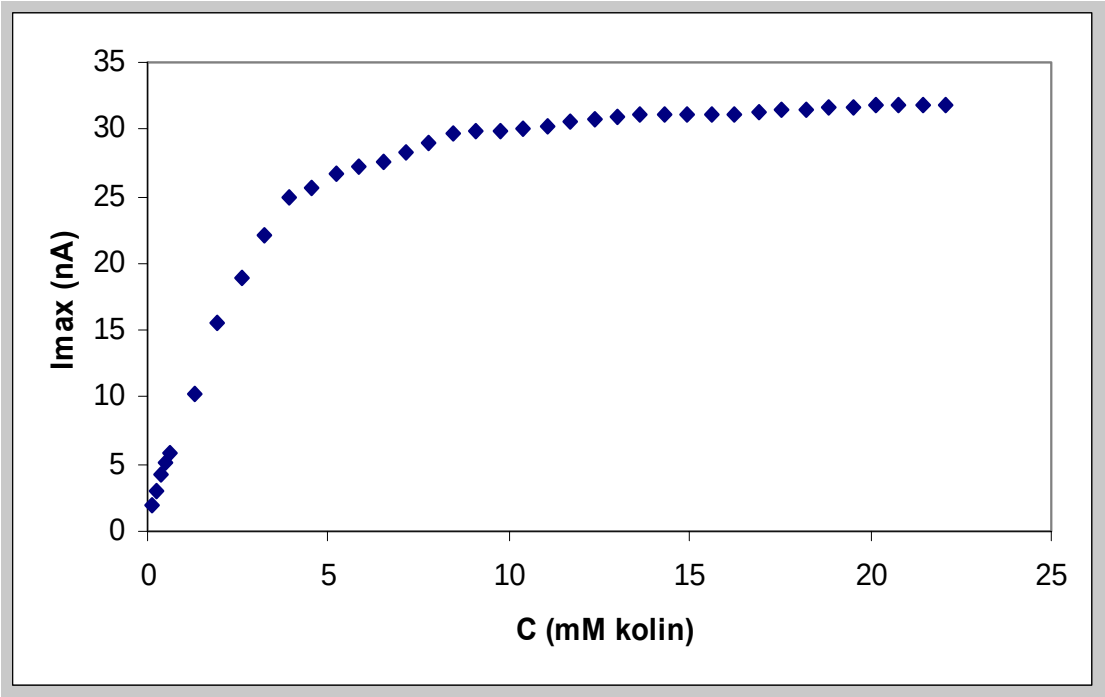
Hazırlanan PVF-Pt-ChOx enzim elektroduna $PtBr_2$ derişiminin etkisini belirlemek için $PtBr_2$ derişimi 0,938 mM ile 4,69 mM arasında değiştirilmiştir. Kullamlan her bir derişimde elektrot aktivitesi incelennıiştir. Bu çalışmalar sırasında 0,10 M pH 7,40 fosfat tamponu kullanılmıştır. Ayrıca PVF derişimi, PVF 'de bekletme süresi, enzim derişimi ve enzimde bekletme süresi için PVF-ChOx enzim elektrodu ile yapılan çalışmalarda saptanan optimum değerler kullanılmıştır. $PtBr_2$ çözeltisinde bekletme süresi 5 dakika olarak sabit tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar kullanılarak farklı $PtBr_2$ derişimine karşı kolin ilavesinden sonraki maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.13'de görüldüğü gibi $PtBr_2$ çözelti derişiminin artmasıyla gözlenen akım değeri artmakta ve belirli bir derişimden sonra akım azalmaktadır. Bundan sonra yapılan çalışmalarda 3,75 mM $PtBr_2$ derişimi kullanılmıştır.



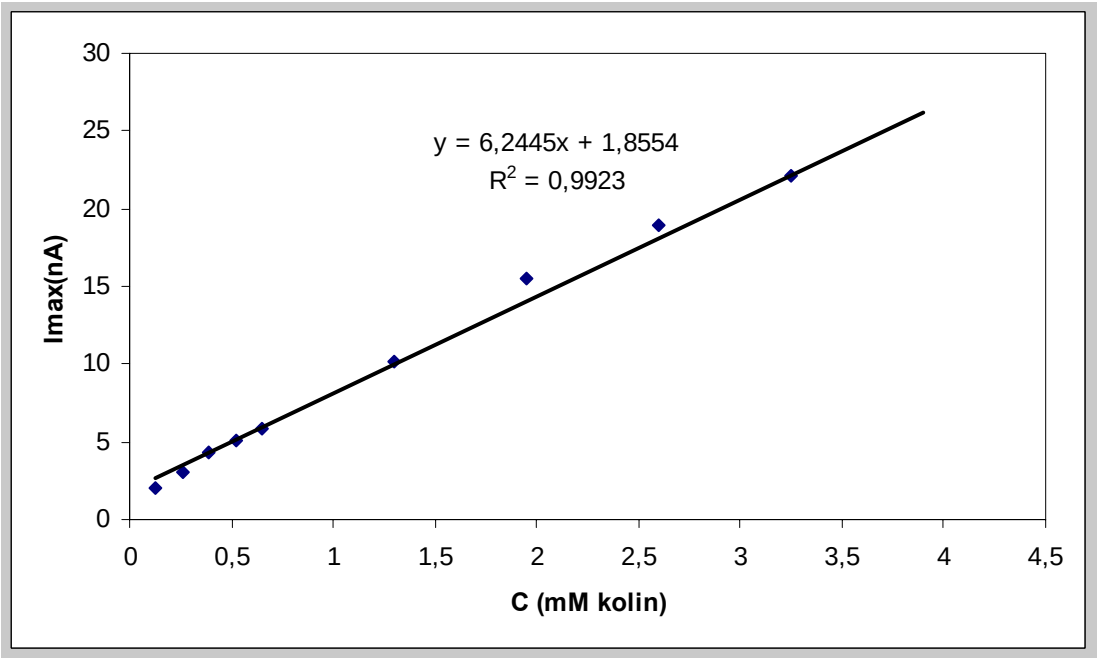
Şekil 4.13. PVF-Pt-ChOx enzim elektrodunda kullanılan $PtBr_2$ derişimine karşı elde edilen akım değerleri (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40 5,00 mg PVF/mL, 2,00 mg ChOx mg/mL enzim, 25°C)

4.2.3. PVF-Pt-ChOx enzim elektroduna substrat derişimin etkisi

Hazırlanan PVF-Pt-ChOx elektrodunun maksimum aktivitesinin ve doğrusal çalışma aralığının saptanması için ölçülen akım değerlerine substrat derişimi etkisi incelenmiştir. Daha önce saptanan optimum koşullarda 0,1 M pH 7,40 fosfat tamponunda ve 25°C sıcaklıkta farklı kolin derişimlerinde verdiği akım değerleri belirlenmiştir. PVF-Pt-ChOx enzim elektrodunda ölçülen akım değerlerinin kolin derişimi ile değişimi şekil 4.14'de verilmiştir.



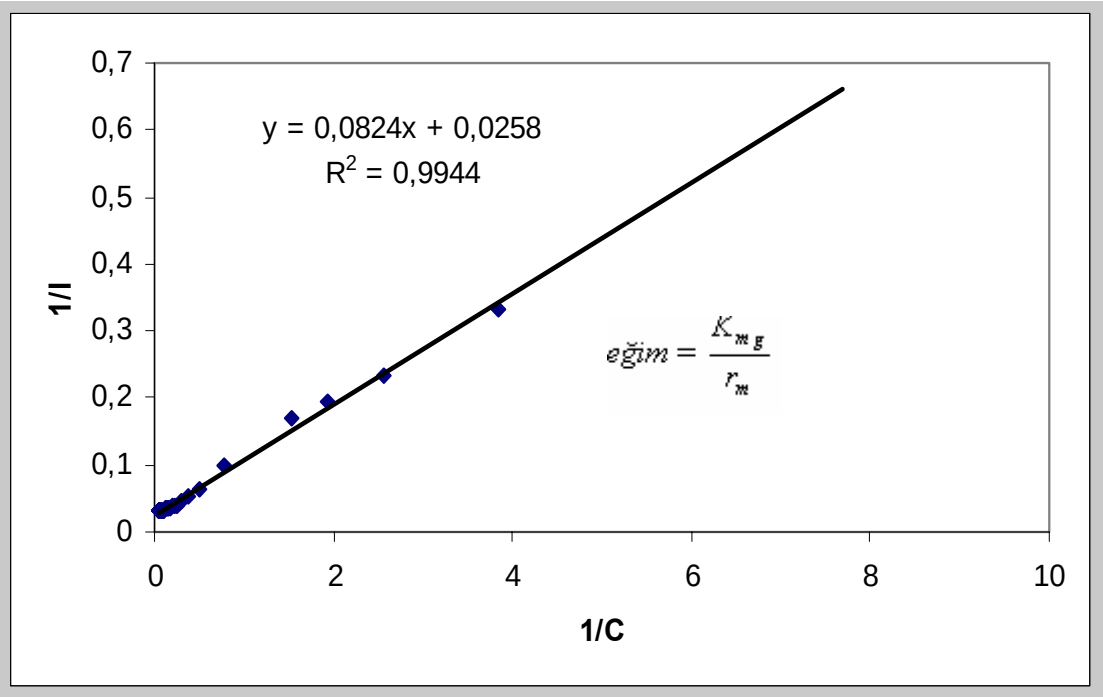
Şekil 4.14. PVF-Pt-ChOx enzim elektrot aktivitesinin kolin derişimi ile değişimi (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40 5,00 mg PVF/mL, 2,00 mg ChOx mg/mL enzim, 3,75 mM $PtBr_2$, 25°C)



Şekil 4.15. PVF-Pt-ChOx enzim elektrot aktivitesinin kolin derişimi ile değişimi veren doğrusal çalışma aralığı (0,10 M fosfat tamponu, pH 7,40 5,00 mg PVF/mL, 2,00 mg ChOx mg/mL enzim, 3,75 mM $PtBr_2$, 25°C)

Şekil 4.15'de görüldüğü gibi hazırlanan PVF-Pt-ChOx enzim elektrodu 3,25 mM'a kadar kolin derişimi ile doğru orantılı akım değeri vermektedir. Bu nedenle hazırlanan PVF-Pt-ChOx enzim elektrodunun pratik kullanım aralığı 3,25 mM'a kadar kolin derişimi olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan kolin derişimine karşılık elektrot cevabı PVF-Pt-ChOx enzim elektrodu için 20,2 mM civarında sabit değere ulaşmakta ve daha yüksek derişimlerde akım değerine bir artış olmamaktadır. Hazırlanan enzim elektrot ile 20,2 mM kolin ile 31,8 nA akım değeri elde edilmiştir (Şekil 4.14).

Çeşitli kolin derişimlerinde alınan akım değerleri kullanılarak PVF-Pt-ChOx enzim elektrodu için görünür Michaelis-Menten (K_{mg}) sabiti tayin edilmiştir (Şekil 4.16).

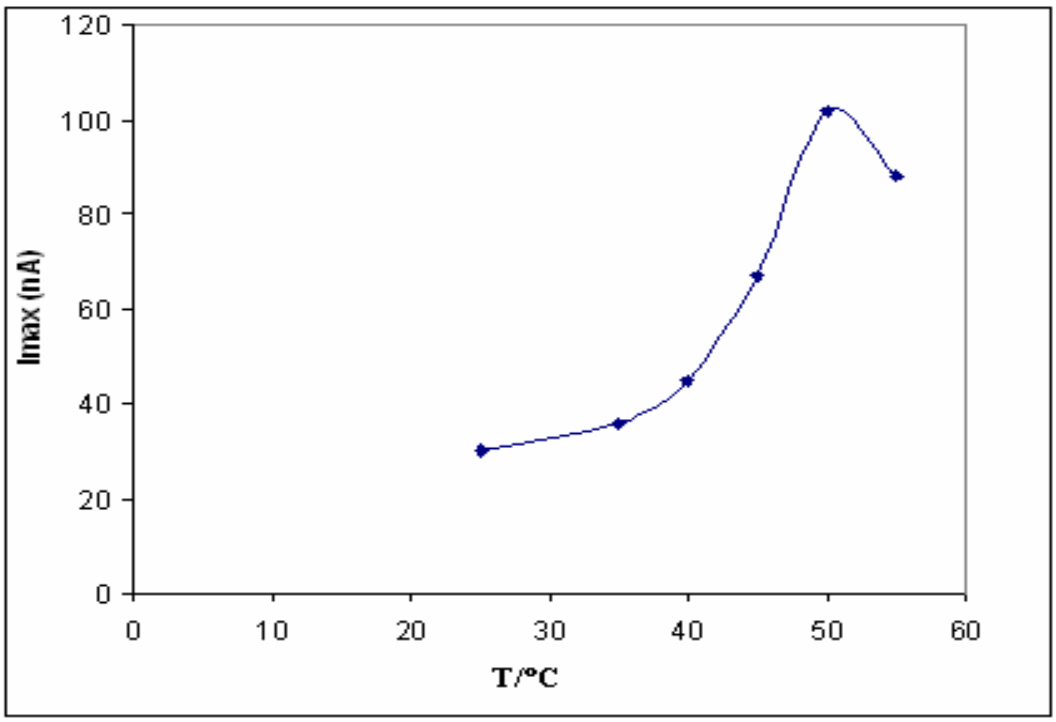


Şekil 4.16. PVF-Pt-ChOx enzim elektrot için Lineweaver-Burk grafiği (0,1 M fosfat tamponu, pH 7,40, 5,00 mg PVF/mL, 3,75 mM $PtBr_2$, 2,00 mg ChOx/mL enzim, 25°C)

Şekil 4.16'deki verilere göre yapılan hesaplamalar sonucu PVF-Pt-ChOx enzim elektrotta tutuklanmış enzim için K_{mg}=3,19 mM kolin değeri bulunmuştur.

4.2.4. Sıcaklık etkisi

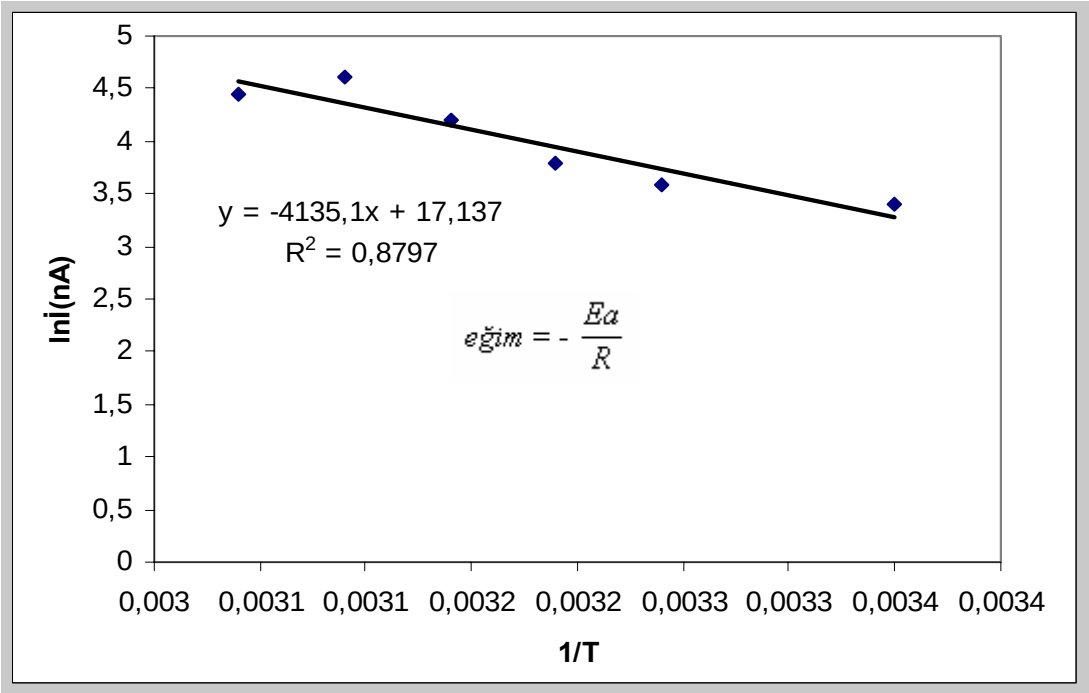
ChOx enzimi ile kolin arasındaki reaksiyonun aktivasyon enerjisinin belirlenmesi amacıyla farklı ortam sıcaklıklarda elde edilen maksimum akım değerleri belirlenmiştir. Bu deneylerin yapılması sırasında 0,10 M pH 7,40 fosfat tamponu kullanılmıştır. Bu çalışmalarda PVF-Pt-ChOx kullanılmıştır. PVF-Pt-ChOx enzim elektrodu için sıcaklık 25°C ile 55°C arasında, arasında değiştirilmiş ve her bir sıcaklıkta elde edilen maksimum akım değerleri ölçülmüştür. Şekil 4.17'deki grafikte görüldüğü gibi en yüksek akım değeri PVF-Pt-ChOx enzim elektrodu için 50°C dir. Enzimatik reaksiyonlarda gözlenen davranışlara göre belli bir sıcaklığa kadar reaksiyon hızı sıcaklıkla artmakta, daha yüksek sıcaklıklarda ise enzimin sıcaklıkla denatüre olması nedeniyle reaksiyon hızı düşmektedir.



Şekil 4.17. Tutuklanmış PVF-Pt-ChOx enzimi için reaksiyon hızının sıcaklıkla değişimi (0,1 M fosfat tamponu, pH 7,40, 5,00 mg PVF/mL, 3,75 mM $PtBr_2$, 2,00 mg ChOx/mL enzim)

Reaksiyon hızının sıcaklıkla artış gösterdiği aralıktaki deneysel veriler kullanılarak tutuklanmış ChOx ile yürütülen reaksiyonun aktivasyon enerjisi

Arrhenius eşitliğinden yararlanılarak bulunmuştur. Bu amaçla l/T'ye karşı ln i değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.18). Elde edilen doğruların eğiminden PVF-Pt-ChOx için aktivasyon enerjisi 34,8 kJ/mol olarak bulunmuştur.

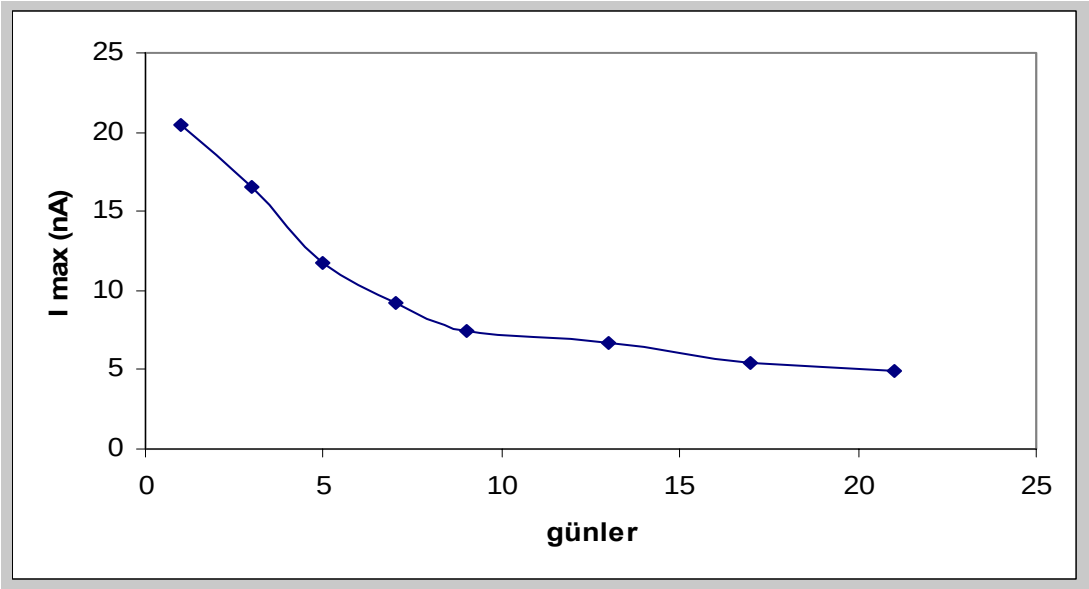


Şekil 4.18. (PVF-Pt-ChOx) enzim elektrodu için Arrhenius grafiği (0,1 M fosfat tamponu, pH 7,40, 5,00 mg PVF/mL, 3,75 mM $PtBr_2$, 2,00 mg ChOx/mL enzim, 25°C)

4.2.5. Geliştirilen elektrodun uzun süreli kararlılığı

Enzim elektrotlarında aranan en önemli özelliklerden biri elektrodun uzun ömürlü olmasıdır. Bu çalışmada enzim elektrodun aktivitesinin uzun süre korunduğu gözlenmiştir. Elektrodun aktivitesi belirlenen optimum koşullarda ölçülmüş ve enzim elektrodu kullanılmadığı zamanlarda çalışma tamponu içinde +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Aynı elektrodun aktivitesine ilk başlarda ikişer gün ara ile daha sonraki çalışmalarda üçer ve dörder gün ara ile 21 gün boyunca bakılmıştır. Bu süre sonunda 5 mM kolin için gözlenen 4,9 nA'de sabit kalmıştır. Elde edilen sonuçlar kullanılarak zamana karşı akım değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.19). Bu süre boyunca ilk 9 gün içerisinde elektrot aktivitesinin azaldığı bundan sonra ise elektrot aktivitesinde önemli bir

azalma olmadığı belirlenmiştir. 21. günde enzim elektrot aktivitesi başlangıçtakinin %24'ü kadardır.



Şekil 4.19. Aynı elektrot ile farklı günlerde alınan maksimum akım değerleri (0,1 M fosfat tampon, pH 7,4 , 25°C)

4.2.6. Girişimler

Ölçüm ortamında bulunabilecek bazı maddelerin hazırlanan enzim elektrodundaki cevapları incelenmiştir. Maddelerin derişimleri 5,0 mM'da sabit tutulmuştur. Ölçüm ortamında bulunabilecek ve girişim yapabilecek maddeler trietanolamin, metanol, etanol, asetaldehit, askorbik asit ve glukoz olarak belirlenmiştir. Bu amaçla 5,0 mM kolin için kararlı hal akım değeri elde edildikten sonra hücreye girişim yapabilecek madde eklenmiş ve akımdaki değişim ölçülmüştür. Bu maddelerin çoğu hazırlanan enzim elektrodunda bir girişime neden olmamıştır. İncelenen maddeler içerisinde askorbik asit ve trietanolaminin girişim yaptığı belirlenmiştir. 5,0 mM kolin varlığında ortamda askorbik asitin bulunması $5x10^{-5}$ M'a kadar trietanolaminin ise $6,7.10^{-6}$ M'a kadar girişime neden olmamaktadır. $5,0.10^{-3}$ M kolin ortamında, $5,0.10^{-3}$ M derişimdeki askorbik asit ve trietanolaminin yaptığı girişim yaklaşık %100 civarındadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yeni bir enzim elektrodunun geliştirildiği bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiş ve diğer çalışmalarla karşılaştırılarak eleştirilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında Pt elektrot yüzeyinde kaplanmış PVF üzerine kolin aksidaz (ChOx) tutuklanmıştır. PVF-ChOx olarak tanımladığımız elektrotta PVF derişimi (5,0 mg/mL), PVF'de bekletme süresi (5 dakika), enzim derişimi (2,0 mg/mL), enzimde bekletme süresi (30 dakika) olarak saptanmıştır. Çalışmalar O_2 atmosferinde yapılmıştır.

Çalışmada daha sonra polimer ile kaplanmış Pt elektrot yüzeyinde Pt biriktirilerek ardından kolin oksidaz (ChOx) tutuklanmıştır. PVF-Pt-ChOx enzim olarak tanımladığımız bu elektroda Pt'nin etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalarda PVF-ChOx enzim elektrodu ile saptanan optimum koşullar kullanılmıştır. $PtBr_2$ derişimi 3,75 mM bulunmuştur. Pt biriktirme işlemi, PVF kaplanmış Pt çalışma elektrodunda ChOx tutuklandıktan sonra da yapılmıştır. Çalışmamızda bu elektrot PVF-ChOx-Pt enzim elektrodu olarak tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlardan Pt'nin ChOx tutuklandıktan sonra biriktirildiğinde, Pt tanecikleri ChOx'ın tutuklanmış polimer matriks yüzeyinde birikerek kolin oksidaz ile ile kolin arasındaki reaksiyonu engellediği saptanmıştır.

Hazırlanan her iki enzim elektrodunun aktivitesine sıcaklığın etkisi incelenmiş ve maksimum aktivitenin gözlendiği sıcaklık PVF-ChOx için 45°C, PVF-Pt-ChOx için 50°C olarak bulunmuştur. Enzimin substratına doygun olduğu kolin derişiminde sıcaklık artmasıyla aktivitenin arttığı bölgedeki verilerin Arrhenius bağıntısına göre değerlendirilmesiyle PVF-Pt-ChOx enzim elektrodunda kolin oksidaz ile kolin arasındaki reaksiyonun aktivasyon enerjisi 34,38 kJ/mol, PVF-ChOx enzim elektrodunda ise 41,4 kJ/mol olarak bulunmuştur. Kolin derişiminin etkisinin incelenmesi sırasında elde edilen

veriler kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. PVF-Pt-ChOx enzim elektrodu ve PVF-ChOx enzim elektrodunda tutuklanmış enzimin pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponunda ve 25°C'de görünür Michealis-Menten sabitleri (K_{mg}) sırasıyla 3,19 mM ve 15,2 mM kolin olarak bulunmuştur. PVF-Pt-ChOx sistemi için Ea'nın ve K_{mg}'nin daha düşük olması Pt taneciklerinin katalitik etkisi olduğunu göstermektedir.

Hazırlanan PVF-ChOx enzim elektodunun kolin için doğrusal çalışma aralığı 3,9 mM'a kadar, PVF-Pt-ChOx enzim elektrodu için ise 3,25 mM'a kadar bulunmuştur. Literatürde doğrusal çalışma aralığı; 5-100 µM (Doretti ve ark. 2000), $5x10^{-7}$-$7x10^{-5}$ M (Razola ve ark. 2003), $1,0x10^{-6}$-$8,0x10^{-5}$ M (Rahman ve ark. 2004), 1,17 mM (Şen ve ark. 2004), $1,6x10^{-3}$ M (Yang ve ark. 2005), $(0.083 \pm 0.001)x10^{-3}$ M (Shi ve ark. 2006), $5,0x10^{-6}$-$6,0x10^{-4}$ M (Yang ve ark. 2004), 0,3-100 µM (Schuvalio ve ark. 2005), $1,0x10^{-4}$ M (Song ve ark. 2006)'a kadar olarak verilmiştir. Geliştirdiğimiz enzim elektrotlarının doğrusal çalışma aralıkları literatürde verilen değerlerden çok daha iyidir.

Hazırladığımız enzim elektrodunun cevap süresi PVF-ChOx için 25-30 s, PVF-Pt-ChOx için 20-25 s aralığında bulunmuştur. Literatürde cevap süreleri genellikle 5-80 s olarak verilmiştir. Literatürde verilen cavap süreleri; 80 s (Razola ve ark. 2003), 5s (Rahman ve ark. 2004), 30-50 s (Şen ve ark. 2004), 10 s (Yang ve ark. 2004), 15 s (Yang ve ark. 2005), 10 s (Shi ve ark. 2006), 8 s (Song ve ark. 2006).

Elde ettiğimiz cevap süreleri literatürdeki değerlerle yaklaşık düzeydedir.

Sonuç olarak bu çalışmada geliştirilen enzim elektrodu, literatürde verilen çalışmalarla karşılaştırıldığında hazırlanmasının kolay, ucuz, doğrusal çalışma aralığının geniş olması gibi avantajlara sahip olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

Arnold, S., Donnert C. 1999 Directed evolution of industrial enzymes, Trens in Biotechnology 17: 135-136.

Aso, B.C., Kunitake, T., Nakashima, T. 1969 Cationic Polymerization and Copolymerization of Vinyiferrocene, Die Makromolekulare Chemie 124 : 232-240.

Aydın, G., Çelebi, S.S., Özyörük, H., Yıldız, A. 2002 Amperometric Enzyme Electrode for L(+)-lactate Determination Using Immobilized L(+)-lactate Oxidase in Poly(vinylferrocenium) Film, Sensors and Actuators 87 : 8-12.

Bailey, J.E Ollis, F.D., 1997 Biochemical Engineering Fundamentals. Mc Graw-Hill Kogakusha Ltd, Tokyo. 1 98s.

Bard, A.J. and Faulkner, L.R. 1980 Electrochemical Methods (Fundamentals and Applications). John Wiley & Sons, hc. 5 : 136-212.

Campanella, L., Tomassetti, M., Sammartino, M.P. 1989 An Enzyme Sensor for Determination of Acetylholine and Choline in Rat Brain Extracts, Anal.Letters, 22 : 1389-1402.

Contractor, A.Q., Sureshkurnar, T.N., Narayanan, R., Sukeerthi, S., Lal, R., Srinivasa, RS. 1994 Conducting polymer-based biosensors, Electrochimica Acta 39 : 1321-1324.

Dinçkaya, E. 1999. Biyosensörler, Ege Üniversitesi Fen Fak. Yayınları, 81s., İzmir.

Doretti, L., Ferrara, D., Lora, S., Shhiavon, F., M.Veronce, F. 2000 Acetylcholine biosensor involving entrapment of acetylcholinesterase and poly(vinyl alcohol) cryogel membrane, Enzyme and Microbial Technology 27 : 279-285.

Gerard, M., Chaubey, A., Malhatro, B.D. 2001 Application of conducting polymers to biosensors, Biosensors & Bioelectronics 17 : 345-359.

Guerrieri, A., Lattanzio, V., Palmisano, F., Zambonin, P.G. 2006 Electrosynthesized poly(pyrrole)/poly(2-naphthol) bilayer membrane as an effective anti-interference layer for simultaheneous determination of acethylcholine and choline by dual electrode amperometric biosensor, Biosensors & Bioelectronics 21 : 1710-1718.

Gülce, A., Gülce, H. 2005 Polyvinylferrocenium modified Pt electrode for anaerobic glucose monitoring Biochemical and Biophysical Methods 62 : 81-92.

Gülce, H. 1993. Polivinilferrosen Modifiye Elektrodunun Sulu ve Susuz Ortamlardaki Elektrokimyasal Davranışı, Hacettepe Ün. Fen Bil. Enst, Doktora Tezi, 111s, Ankara.

Gülce, H., Aktaş, Y.S., Gülce, A., Yıldız, A. (2003) Polyvinylferrocenium immobilized enzyme electrode for choline analysis, Enzyme and Microbial Technology 32 : 895-899.

Gülce, H., Aktaş, Y.S., Gülce, A., Yıldız, A. 2003 Polyvinylferrocenium immobilized enzyme electrode for choline analysis, Enzyme and Microbial Technology 32 : 895-899.

Gülce, H., Ataman. I., Gülce, A., Yıldız; A. (2002-b) A new amperometric enzyme electrode for galactose determination. Enzyme and Microbial Technology 30 : 41-44.

Gülce, H., Gülce, A., Kavanoz, M., Coşkun, H., Yıldız, A. (2002-c) A new amperometric enzyme electrode for alcohol determination, Biosensors & Bioelectronics 17 : 517-521.

Gülce, H., Gülce, A., Yıldız, A. (2002-a) A Novel Two-Enzyme Amperometric Electrode for Lactose Determination, Analytical Sciences 18 : 1-3.

Gülce, H., Özyörük, F., Yıldız, A. (1994-b) Electrochemical Oxidation of Anthracenes on Poly(vinylferrocenium) Coated Pt electrodes in Acetonitrile, Phys. Chem 98 : 828-832.

Gülce, H., Özyörük, H., Çelebi, S.S., Yıldız, A. (1995-a) Amperometric enzyme electrode for aerobic glucose monitoring prepared by glucose oxidase immobilized in Poly(vinylferrocenium), Journal of Electroanalytical Chem. 394 : 63-70.

Gülce, H., Özyörük, H., Yıldız, A. (1994-a) Electrochemical Reduction of Anthracenes on Poly(vinylferrocenium) Coated Pt electrodes in Acetonitrile, Phys. Chem 98 : 228-233.

Gülce, H., Özyörük, H., Yıldız, A. 1993 Electrochemical Response of PoIy(vinylferrocenium)-coated Pt Electrodes to Some Anions in Aqueous Media, Electroanalysis 2 : 178-183.

Gülce, H., Özyürük, H. Çelebi, S.S., Yıldız, A. (1995-b) Amperometric enzyme electrode for sucrose determination prepared from glucose oxidase and invertase co- immobilized in PoIy(vinylferrocenium), Journal of Electroanalytical Chem. 397 : 217-223.

Gündoğan, M., Çelebi, S.S., Özyörük, H., Yıldız, A. (2002) Amperometric enzyme electrode for organic peroxides determination prepared from horseradish peroxidase immobilized in poly(vinylferrocenium) film, Biosensors & Bioelectronics 17: 875-881.

Hillman, A.R., Hughes, N.A. (1992) Solvation Phenomena in polyvinylferrocene films: effect of histoıy and redox state, J.Electrochem. Soc 139 : 74-77.

Inzlet, G., Bacskai, J. (1992) Electrochemical quartz crystal microbalance study of the swelling of poly(vinylferrocene) films, Electrochemica Acta 37 : 647-654.

Jin, Ping-Guan., Lin, Xiang-Qin., Gong, Jing-ming. 2004 Novel choline and acetylcholine modified glassy carbon electrodes for simultaneous determination of dopamine, serotonin and ascorbic acid, Electroanalytical Chemistry 569 : 135-42.

Lodish, H. 1995. Molecular celI biology. W.H. Freeman and Company

lwakura, C., Kawai, T., Nojima, M., Yoneyama, H. 1987 A new electrode-active material for polymer batteries, T Electrochem. Soc 134 : 791-795.

Mosbach, K., Danielsson, B. 1981. Thermal Bioanalyzers in flow streams-enzyme thermister devices. Anal. Chem. 53 : 83A-94A.

Patel, H., Li, X., Karan, H.I. 2003 Amperometric glucose sensors based on ferrocene containing polymeric electron transfer systems-a preliminary report, Biosensors & Bioelectronics 18 : 1073-1076.

Peerce, P.J., Bard, A.J. (1980-a). Polymer fılms on electrodes, Part 1 The application of poly(vinylferrocene)-coated platinum electrodesas reference electrodes in acetonitrile, J. Electroanal.Chem 108 : 11-125.

Peerce, P.J., Bard, A.J. (1980-b). Polymer films on electrodes, Part II film structure and mechanism of electron transfer with electrodeposited poly(vinylferrocene), J.Electroanal.Chem. 112 : 97-115.

Pişkin, E. 1986. Biyosensörler. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Izmir. 205-223.

Rahman, Md., Park, Deog-Soo., Shim, Yoon-Bo. 2004 A perfomance comparison of coline biosensors: anodic or cathodic detections of H_2O_2 generated by enzyme immobilized on a conducting polymer, Biosensors & Bioelectronics 19 : 1565-1571.

Razola, S.S., Pochet, S., Grosfils, K., Kauffmann, J.M. 2003 Amperometric determination of choline released from rat submandibular gland acinar cells using a choline oxidase biosensor, Biosensors & Bioelectronics 18 : 185-191.

Schuvalio, O.N., Dzyadevych, S.V., El'skaya A.V., Gautier-Sauvigné, S., Csöregi, E., Cespuglio, R., Soldatkin, A.P. 2005 Carbon fibre-based microbiosensors for in vivo measuremnts of acetylcholine and choline, Biosensors & Bioelectronics 21 : 87-94.

Shi, H., Song, Z., Huang, J., Yang, Y., Zhao, Z., Anzai, J.I., Osa, Tetsuo., Chen, Qiang. 2005 Effects of the type of polycation in the coating films prepared by a layer-by-layer deposition technique on the properties of amperometric choline sensors, Sensors and Actuators 109 : 341-347.

Shi, H., Yang, Y., Huang, J., Zhao, Z., Xu, X., Anzai, Jun-ichi., Osa, Tetsuo., Chen, Qiang. 2006 Amperometric choline biosensors prepared by layer-by-layer deposition of choline on the Prussian blue-modified platinum electrode. Talanta.

Shirota, Y., Kakuta, T., Mikawa, H. 1984 Electrochemical oxidation of poly(vinylferrocene) with concurrent precipitation on the electrode; preparation of an electrically conducting polymer, Makromol.Chem., Rapid Commun 5 : 337-340.

Smith, T.W., Kuder, J.E., Wychick, D. 1976 J. Polym. Sci 14, 2433.

Song, Z., Huang, Jia-Dong., Wu, Bao-Yan., Shi, Hai-Bin., Anzai, Jun-Ichi., Chen, Qiang. 2006 Amperometric aqueous sol-gel biosensor for low-potential stable choline detection at multi-wall carbon nanotube modified platinum electrode, Sensors and Actuators 115 : 626-633.

Şen, S., Gülce A., Gülce H. 2003 Polyviniyferrocenium modified Pt electrode for the design of amperometric choline and acetylcholine enzyme electrodes, Biosensors & Bioelectronics 19 : 1261-1268.

Tran Minh, Canh. 1993. Biosensors.

Umana, M., Rolison, DR., Nowak, R., Daum, P., Murray, R.W. 1980 X-Ray photoelectron spectroscopy of metal, metal oxide, and carbon electrode surfaces chemically modifed with ferrocene and ferrocenium, Surface Science 101 : 295-309.

Uslan, A.H. 1986. Enzim Kinetiği Temel ve Uygulamak Enzimolji. (Telefoncu, A.), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Izmir. 59-91.

Wiesman, A. 1975. Handbook of Enzyme Biotechnology. Halsted press. New York.

Yang, M., Yang, Y., Yang, Yu., Shen, Guoli., Yu, Ruquin. 2004 Bienzymatic amperometric biosensor for choline based on mediator thionine in situ electropolymerized within a carbon paste electrode, Analytical Biochemistry 334 : 127-134.

Yang, M., Yang, Y., Yang, Yu., Shen, Guoli., Yu, Ruquin. 2005 Microbiosensor for acetylcholine and choline based on electropolymerization/sol-gel derived composite membrane, Analytica Chimica Acta 530 : 205-211.