



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİSİN TAYİNİ İÇİN YENİ AMPEROMETRİK BİYOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Özlem GÖKDOĞAN

DOKTORA TEZİ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Şubat-2011
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Özlem GÖKDOĞAN

17/02 /2011

ÖZET

DOKTORA TEZİ

LİSİN TAYİNİ İÇİN YENİ AMPEROMETRİK BİYOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Özlem GÖKDOĞAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Handan GÜLCE
2011, 135 Sayfa
Jüri
Prof. Dr. Salih YILDIZ
Prof. Dr. Handan GÜLCE
Prof. Dr. Kadir PEKMEZ
Prof. Dr. Bekir SARI
Yrd. Doç. Dr. A. Abdullah CEYHAN

Bu doktora tez çalışmasında, amperometrik lisin tayini için polivinilferrosen (PVF) polimeri temelli ve metal parçacıkları biriktirilmiş Pt elektotlara lisin oksidaz (LyOx) enzimi immobilize edilerek lisin biyosensörleri tasarlanmıştır. Biyosensörlerin amperometrik cevapları enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan hidrojen peroksitin sabit potansiyelde yükseltgenme akımının ölçümü ile gerçekleştirilmiştir.

PVF polimerinin elektrot yüzeyine kaplanmasında iki farklı yöntem kullanılmıştır. İlk yöntemde elektrodun PVF polimeri ile kaplanması daldırma-kurutma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Polimer modifiye elektrot yüzeyinde LyOx enziminin immobilizasyonu ile PVF-LyOx biyosensörü, PVF modifiye elektrot üzerinde altın veya platin parçacıkları biriktirip daha sonra LyOx immobilizasyonu ile PVF-Au-LyOx ve PVF-Pt-LyOx biyosensörlerleri hazırlanmıştır. Biyosensörler için polimerik film kalınlığı, pH, sıcaklık, substrat ve enzim derişimi, kararlılık ve girişim etkileri araştırılmıştır. Polimer yüzeyde metal parçacıklarının biriktirilmesi ile hazırlanan biyosensörlerin cevap akımlarının, termal kararlılığının, doğrusal çalışma aralığının, depolama ve kullanım kararlılığının PVF-LyOx biyosensöründen daha yüksek olduğu gözlenmiştir. İkinci yöntemde ise PVF içeren 0,1 M tetrabutilamonyumperklorat (TBAP) -metilen klorür (CH_2Cl_2) çözeltisinde Ag/AgCl elektroda karşı 0,7 V sabit gerilimde polimerin yükseltgenmiş formu olan polivinilferrosenyum Pt elektrot yüzeyine kaplanmış ve LyOx immobilizasyonu ile PVF^+LyOx^- biyosensörü hazırlanmıştır. Polivinilferrosenyum yüzeyde H_2PtCl_6 çözeltisinde Ag/AgCl elektroda karşı -0,15 V'da platin biriktirilmesiyle PVF^+LyOx^--Pt biyosensörü hazırlanmış ve her iki elektrot için optimum çalışma şartları belirlenmiştir. Bu biyosensörlerin doğrusal çalışma aralığının, cevap akımının, kararlılığının ilk yöntem kullanılarak hazırlanan biyosensörlerden daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Polivinilferrosen, lisin, biyosensör, lisin oksidaz

ABSTRACT

Ph.D THESIS

THE CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF NOVEL AMPEROMETRIC LYSINE BIOSENSORS FOR LYSINE DETERMINATION

Özlem GÖKDOĞAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
DOCTOR OF PHILOSOPHY IN CHEMICAL ENGINEERING

Advisor: Prof. Dr. Handan GÜLCE
2011, 135 Pages
Jury
Prof. Dr. Salih YILDIZ
Prof. Dr. Handan GÜLCE
Prof. Dr. Kadir PEKMEZ
Prof. Dr. Bekir SARI
Yrd. Doç. Dr. A. Abdullah CEYHAN

In this PhD thesis study, for amperometric determination of lysine, biosensors were designed by immobilization of lysine oxidase, using polymer polyvinylferrocene based and metal particles accumulated Pt electrodes. The amperometric response of the biosensors were measured at constant potential, which was due to the electrooxidation of enzymatically produced H_2O_2.

Two different methods were used for coating of PVF to the electrode surface. In the first method, PVF polymer electrodes were constructed by the dip-coating method. PVF-LyOx prepared with immobilisation of lysine on PVF modified Pt electrode, PVF-Au-LyOx and PVF-Pt-LyOx biosensors were prepared with the accumulation of Au and Pt particles on the PVF modified Pt and immobilisation of Lysine oxidase. The effects of the thickness of the polymeric film, pH, temperature, the amount of the enzyme and substrate concentration, stability and interferences on these electrodes were investigated. The response current, thermal stability, linear range, storage and operational stability of the biosensors prepared with the accumulation of metal particles were found to be higher than the ones observed in PVF-LyOx biosensors. In the second method, $PVF^{+}LyOx^{-}$ biosensor were prepared with electrooxidizing of PVF in 0.10 M tetrabutylammonium perchlorate (TBAP)-methylene chloride (CH_2Cl_2) solution on the Pt electrode at + 0.70 V vs. Ag/AgCl and immobilisation of LyOx. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biosensor were prepared with electrodeposition of platinum from H_2PtCl_6 solution at - 0.15 V vs. Ag/AgCl on the polyvinylferrocenium matrix and optimum working conditions were determined for both of the biosensors. The biosensors prepared with the second method were reported to have higher linear range, response current and stability than the ones prepared with the first method.

Keywords: Polyvinylferrocene, lysine, biosensor, lysine oxidase

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Handan GÜLCE yönetiminde hazırlanarak, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsüne Doktora Tezi olarak sunulmuştur. Aynı zamanda bu çalışmayı BAP 07101012 nolu Proje ile destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimi yöneten ve çalışmalarıma değerli katkılarda bulunmuş, tez Danışman Hocam Sayın Prof.Dr. Handan GÜLCE'ye şükran ve saygılarımı sunarım. Çalışmalarımda kullandığım polimerin sentezi için Sayın Prof. Dr. Ahmet GÜLCE'ye, Tez İzleme Komitesi Üyeleri Sayın Prof. Dr. Erol PEHLİVAN'a ve Prof. Dr. Salih YILDIZ'a da teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim**.**

Ayrıca, tüm öğrenimim boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çalışmalarım boyunca bana güç ve cesaret veren aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özlem GÖKDOĞAN

KONYA, 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **x**

1. GİRİŞ **1**

2. BİYOSENSÖRLER **4**

2.1. Biyomoleküller 5
2.1.1. Antibadiler 5
2.1.2. Mikroorganizmalar 5
2.1.3. Enzimler 6
2.1.3.1. Enzim kinetiği 7
2.1.3.2. Enzim immobilizasyonu 8
2.1.3.2.1.Taşıyıcıya bağlama 8
2.1.3.2.2. Çapraz bağlama 9
2.1.3.2.3. Tutuklama 10
2.2. Dönüştürücüler 10
2.2.1 Amperometrik biyosensörler 11
2.2.1.1. Amperometrik biyosensörlerde altın ve platin nanoparçacıkların biriktirilmesi 13
2.2.1.2. Amperometrik biyosensörlerde girişim giderme 14
2.2.2. Potansiyometrik biyosensörler 16
2.2.3. Kondüktometrik biyosensörler 16
2.2.4. Kalorimetrik biyosensörler 17
2.2.5. Piezoelektrik biyosensörler 17
2.2.6. Optik biyosensörler 18
2.3. Biyosensörlerin Performans Kriterleri 18
2.4. Biyosensörlerin Uygulama Alanları 20
2.4.1. Tarım endüstrisi 20
2.4.2. Gıda endüstrisi 21

3. AMİNO ASİTLER **22**

4. REDOKS POLİMERLERİ **25**

4.1. Poli(vinil ferrosen) 26

5. LİSİN BİYOSENSÖRLERİ **29**

6. MATERYAL VE METOT **32**

6.1. Kullanılan Cihazlar 32
6.2. Kullanılan Elektrotlar 32
6.3. Elektroliz Hücresi 32
6.4. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler 33

6.5. Vinilferrosenin Kimyasal Polimerizasyonu 34
6.6. Kullanılan Deneysel Yöntemler 35
6.6.1. Gerilim kontrollu kulometri 35
6.6.2. Kronoamperometri 35
6.6.3. Dönüşümlü voltametri 36
6.6.4. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi 37
6.6.5. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) 39
6.7. Biyosensörlerin Hazırlanması 39
6.7.1. PVF-LyOx biyosensörünün hazırlanması 39
6.7.2. PVF-Au-LyOx biyosensörünün hazırlanması 40
6.7.3. PVF-Pt-LyOx biyosensörünün hazırlanması 40
6.7.4. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün hazırlanması 40
6.7.5. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün hazırlanması 40
6.7.6. Naf-PVF-LyOx ve Naf-PVF-Pt-LyOx biyosensörlerinin hazırlanması 40
6.8. Biyosensörlerin Aktivitesinin Belirlenmesi 41

7. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMA 42

7.1. PVF-LyOx Biyosensörünün Optimizasyonu 45
7.1.1.Uygulanan gerilimin etkisi 46
7.1.2. PVF derişiminin etkisi 47
7.1.3. PVF'de bekletme süresinin etkisi 48
7.1.4. LyOx'da bekletme süresinin etkisi 49
7.1.5. LyOx derişimi etkisi 50
7.1.6. pH etkisi 51
7.1.7. PVF-LyOx biyosensöründe girişim 52
7.1.8. PVF-LyOx ve Naf-PVF-LyOx biyosensörlerine substrat derişimin etkisi 53
7.1.9. PVF-LyOx biyosensörünün kullanım kararlılığı 55
7.1.10. PVF-LyOx biyosensörünün depolama kararlılığı 56
7.1.11. PVF-LyOx biyosensörünün aktivitesinin voltametrik yöntemle incelenmesi 57
7.2. PVF-Au-LyOx Biyosensörünün Optimizasyonu 59
7.2.1. Uygulanan gerilimin etkisi 60
7.2.2. $KAuCl_4$ çözeltisinde bekletme süresinin etkisi 61
7.2.3. $KAuCl_4$ derişiminin etkisi 62
7.2.4. PVF-Au-LyOx biyosensöründe girişim 63
7.2.5. PVF-Au-Lyox biyosensörüne substrat derişimin etkisi 64
7.2.6. PVF-Au-LyOx biyosensörünün kullanım kararlılığı 66
7.2.7. PVF-Au-LyOx biyosensörünün depolama kararlılığı 66
7.2.8. PVF-Au-LyOx biyosensörünün aktivitesinin voltametrik yöntemle 67
7.3. PVF-Pt-LyOx Biyosensörünün Optimizasyonu 69
7.3.1. Uygulanan gerilimin etkisi 70
7.3.2. $PtBr_2$ derişimi etkisi 71
7.3.3. $PtBr_2$'de bekletme süresi etkisi 72
7.3.4. PVF-Pt-LyOx biyosensöründe girişim 73
7.3.5. PVF-Pt-LyOx biyosensörüne substrat derişimin etkisi 74
7.3.6. PVF-Pt-LyOx biyosensörünün kullanım kararlılığı 76
7.3.7. PVF-Pt-LyOx biyosensörünün depolama kararlılığı 77
7.3.8. PVF-Pt-LyOx biyosensörünün aktivitesinin voltametrik yöntemle incelenmesi 77

7.4. $PVF^{+}LyOx^{-}$ Biyosensörünün Optimizasyonu 79
7.4.1. Uygulanan gerilimin etkisi 80
7.4.2. $PVF^{+}ClO_4^{-}$ film kalınlığı 81
7.4.3. LyOx derişimi etkisi 82
7.4.4. LyOx'da bekletme süresinin etkisi 83
7.4.5. pH etkisi 84
7.4.6. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensöründe girişim 85
7.4.7. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörüne substrat derişiminin etkisi 86
7.4.8. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün kullanım kararlılığı 88
7.4.9. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün depolama kararlılığı 88
7.4.10. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün aktivitesinin voltametrik yöntemle 89
7.5. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt Biyosensörünün Optimizasyonu 91
7.5.1. Uygulanan gerilimin etkisi 92
7.5.2. Platin biriktirme potansiyeli etkisi 93
7.5.3. Biriktirilen platin miktarının etkisi 94
7.5.4. Platin biriktirmede kullanılan H_2PtCl_6 çözeltisinin derişiminin etkisi 95
7.5.5. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensöründe girişim 96
7.5.6. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörüne substrat derişiminin etkisi 97
7.5.7. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün kullanım kararlılığı 100
7.5.8. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün depolama kararlılığı 100
7.5.9. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün aktivitesinin voltametrik yöntemle incelenmesi 101
7.6. Biyosensörlerin Aktivitelerine Sıcaklık Etkisi 103
7.7. Biyosensörlerin Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi ile İncelenmesi 106
7.8. Biyosensörlerin Morfolojik İncelenmesi 108
7.9. Biyosensörlerde Gerçek Numunelerin Analizi 111

8. SONUÇLAR 116

KAYNAKLAR 123

ÖZGEÇMİŞ 135

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

[E] : enzim derişimi
E_{pc} : katodik pik potansiyeli
E_{pa} : anodik pik potansiyeli
[ES] : enzim-substrat kompleks derişimi
$[E]_0$: enzim başlangıç konsantrasyonu
F : faraday sabiti
i : akım
i_{pc} : katodik pik akımı
i_{pa} : anodik pik akımı
k_1 **:** enzim ile substrat arasındaki reaksiyonun ileri yöndeki hız sabiti
k_{-1} : enzim ile substrat arasındaki reaksiyonun geri yöndeki hız sabiti
k_2 : enzim-substrat kompleksinde ürün oluşumuna ait ileri yöndeki hız sabiti
k_{-2} : enzim-substrat kompleksinde ürün oluşumuna ait ileri yöndeki hız sabiti
K_M : Michaelis-Menten sabiti
K_{mg} : görünür Michaelis-Menten sabiti
n : elektron sayısı
N : elektroliz olan maddenin mol sayısı
t : zaman
v : reaksiyon hızı
v_{max} : maksimum hız
Q : elektrik yükü
[S] : substrat derişimi

1. GİRİŞ

Lisin, kasların yapımı, onarımı ve gelişmesi için gerekli sekiz hayati amino asitten bir tanesidir ve miktarının bilinmesi yiyeceklerin besin değerinin ölçümü için gereklidir. Gıda endüstrisinde olduğu kadar klinik ve farmostatik örneklerde de lisin derişiminin tayin edilmesi önemlidir. Lisin içeriği hayvansal proteinlerde, bitkisel proteinlere göre daha çoktur fakat birçok besinde sınırlı bulunan bir amino asittir. Yiyeceklere uygulanan ısıl işlemlerle ve depolama şartları ile kolayca zarar görür. Çeşitli endüstriyel ya da pişirme işlemleri süresince lisin miktarının ölçümü yapılarak bu işlemlerin yiyecekler üzerine etkisi incelenmektedir.

Klinik ve kimyasal örneklerde olduğu kadar ilaç ve gıda endüstrisi gibi alanlarda da önemli olan lisin tayini için, floresans, elektrokimya ve akış enjeksiyon yöntemlerini temel alan pek çok teknik geliştirilmiştir. Lisin ve diğer amino asitlerin analizi, sıvı kromografisi ya da kapiler elektroforez teknikleri ile gerçekleştirilebilmektedir. Bir dizi numunenin analizini kromotografik yöntemle yapmak çok zahmetli ve zaman alıcıdır. Bu yüzden, daha hızlı ve basit bir yöntemin geliştirilmesine gerek duyulmuş ve seçici reaktif olarak enzimler kullanılarak elektrokimyasal yöntemlerle tayin yapılmaya başlanmıştır. Elektrot yüzeyine biyolojik reaktiflerin tutturulmasıyla elde edilen biyosensörler çok farklı alanlarda kullanılmaktadır.

Biyolojik türlerin analizi için elektrokimyasal tayinler çok basit ve duyarlı metotlardır. Tayin sistemi, elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak aktif türlerle yapılmaktadır. Bu açıdan bakıldığında proteinlerde elektroaktif türlerin yokluğu sorun yaratmaktadır. Bunun üstesinden gelmenin uygun bir metodu ise enzim elektrodu kullanarak, elektrot yüzeyinde elektroaktif türler üretmektir. Bu alanda yapılan çalışmaların birçoğu, çeşitli amino asitlerin tayini üzerine yoğunlaşmıştır. Bu amaçla camsı karbon, platin, karbon pasta gibi çeşitli elektrotlar kullanılmıştır. Tüm bu elektrotlar immobilize amino asit oksidazları kullanarak amino asidin yükseltgenmesi ile yan ürün olarak hidrojen peroksiti oluşturur. Hidrojen peroksit amperometrik olarak tespit edilir. Bu tür biyosensörler lisinin kromotografik tekniklerin aksine hızlı ve basit ölçümüne imkan sağladığı için ilgi çekici cihazlardır.

Son yıllarda biyosensörlerin kullanımı ile ilgili önemli çalışmalar yapılmıştır. L-lisin tayini için çeşitli biyosensörler ve enzim reaktör sistemleri geliştirilmiştir. Bu sensörlerin uygun maliyetli olması ve hızlı ölçüme izin vermesi bu cihazların başlıca avantajıdır. Bu tekniklerde L-lisin α-oksidaz kullanılarak, Clark tipi oksijen elektrotlarla

harcanan oksijen veya oluşan hidrojen peroksit platin ya da altın elektrotlarda ölçülmektedir.

Biyolojik reaksiyon sırasında elektron gibi elektrokimyasal taneciklerin harcanması veya oluşumu, elektrokimyasal sinyali oluşturur ve elektrokimyasal dedektörle ölçülür. Bu biyosensörler bulanık ortamda çalışabilir, hassastır ve minyatürize edilebilirler. Elektrokimyasal biyosensörlerde genellikle potansiyometrik ve amperometrik yöntemler kullanılır. Potansiyometrik biyosensörler, çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkından yararlanılarak analit derişiminin belirlenmesini sağlar. Amperometrik biyosensörler, biyokimyasal reaksiyonda oluşan ürünlerin reaksiyonu sonucunda çalışma elektrodundaki akım değişikliğini ölçer. Elektrokimyasal biyosensörler elektron transferi için redoks aracılı ve redoks aracısız elektrokimya temeline dayanır.

Elektrotların redoks aktif bileşenlerinin düzenli bir sırayla fonksiyonalize edilmesi sensörik aktivitelerin bir araya toplanmasını sağlamıştır. Bu yolla elektrot yüzeylerinin redoks aktif metal nanoparçacıklarla modifiye edilmesi pek çok elektrokimyasal sensörün hazırlanmasına olanak sağlamıştır. Bunlar enzimatik ve enzimatik olmayan sensörlerdir. Enzimatik olmayan sensörlerde metal nanoparçacıklar ya da fonksiyonalize edilmiş nanoparçacıklar duyucu faz olarak rol oynarlar, aynı zamanda nanoparçacıklar elektron transfer aracısı olarak görev yaparlar.

Nanoparçacık araştırmaları son yıllarda hızlı bir gelişme göstermiştir. Nanoparçacığa olan ilginin sebebi ise; bu materyalin olağan dışı fiziksel (organik, elektronik, manyetik ve optik) ve kimyasal özelliklere sahip olmasıdır. Nanopartikül olarak adlandırılan materyallerin büyüklüğü 100 nm'den daha düşüktür. Katalizleme metal-nanopartiküllerinin en önemli uygulamasıdır. Geçiş metalleri birçok organik reaksiyonda yüksek katalitik yetenek gösterir. Bu materyaller homojen ve heterojen katalizörlerin özelliklerini ortaya çıkarır.

Elektroanalizde enzimatik sensörlerin yapımında da metal-nanotanecikler kullanılmaktadır. Çoğunlukla kullanılan metal altın ve platin nanoparçacıklarıdır. Kolloidal altın nano parçacıklar, çok küçük oktahedral birimlerden oluşmuş metalik kolloidal parçacıklardır. Altın parçacıkları net negatif yük taşırlar. Elektron mikroskobu ile yapılan işlemler kolloidal altının yaygın bir şekilde kullanılmasını açıklamakta kullanılmıştır. Pek çok makromolekül kolloidal altın üzerine adsorplandığında biyolojik aktivitelerini kaybetmemişlerdir. Bu gözlemler altının iletkenliğinin de dikkate alınmasıyla araştırma gruplarını kolloidal altın üzerine adsorplanmış enzimleri temel

alan biyosensörleri hazırlamaya sevk etmiştir (Zhao, 1996, Crumbliss, 1993, Liu, 2003). Yüksek yüzey alanına sahip platin biriktirilmiş soy metal elektrotlar mikro katı hal, kimyasal ve biyolojik sensörlerin yapımında kullanılmaktadır (Kumar, 1988, Samms, 1996, Suda, 1999). Platin biriktirilmiş elektrotların en temel yararı katalizörün yüzey alanında artışa neden olmasıdır (Feltham, 1971, Marrese, 1987). Pt siyahı hidrojen peroksitin yükseltgenmesinde kullanılan en iyi materyallerden biri olarak nitelendirilmektedir. Hidrojen peroksitin yükseltgenme potansiyelini düşürerek biyosensörün çalışma kararlılığında artışa neden olmakta ve girişim akımlarını azaltmaktadır (Khan, 1996). Platin biriktirilmiş elektrotlar biyosensör dönüştürücüsü ve enzim immobilizasyonu için matriks olarak görev almaktadır (Ikariyama, 1989).

Bu çalışmada, biyosensörlerin hazırlanması sırasında membran kullanılmamış ve enzimler doğrudan elektrot yüzeyindeki polimer yapıda tutuklanmıştır. Geliştirilen biyosensörler poli(vinil ferrosen) (PVF) modifiye elektrotlarında lisin oksidaz enziminin tutuklanmasını temel almaktadır. Biyosensörlerde elektrot yüzeyinin polimer film ile kaplanması temel olarak iki farklı şekilde yapılmıştır. Bunlardan birincisi polimerin nötral hali olan PVF'nin elektrot yüzeyine daldırma-kurutma yöntemi ile kaplanması, ikincisi ise polimerin yükseltgenmiş hali olan $PVF^{+}ClO_4^{-}$'ın elektrot yüzeyine elektrokimyasal çöktürme yöntemi ile kaplanmasıdır. Her iki tür modifiye yüzeyde lisin oksidaz enzimi tutuklanarak temelde iki farklı tür lisin biyosensörü hazırlanmıştır. Ayrıca bu farklı türdeki lisin biyosensörlerinin performanslarına elektrot yüzeyinde metal tanecikleri biriktirilmesinin etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla bu biyosensörlerin hazırlanması sırasında Au, Pt gibi metaller uygun yöntemlerle elektrot yüzeylerinde biriktirilip lisin tayini için çeşitli tiplerde biyosensörler hazırlanmıştır.

Hazırlanan biyosensörlerin cevabı enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan hidrojen peroksitin yükseltgenme akımının ölçülmesi ile amperometrik ve voltametrik olarak izlenmiştir. Biyosensörlerin aktivitesine çeşitli deneysel parametrelerin etkileri araştırılarak optimum çalışma koşulları belirlenmiştir.

Biyosensör aktivitesine etki edebilecek faktörler, biyosensör hazırlama ve ölçüm ortamı koşullarıdır. Biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan polimer film kalınlığı, enzim çözeltisinin derişimi, enzimde bekletme süresi, biriktirilecek metalin türü ve miktarı biyosensörlerin hazırlanmasında söz konusu olan parametrelerdir. Ölçüm ortamı koşulları ise pH, sıcaklık, tampon türü ve derişimi, substrat derişimi gibi deneysel parametrelerdir.

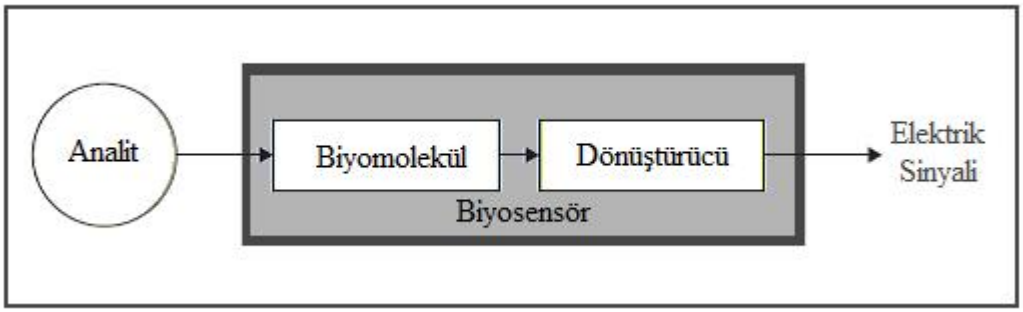
2. BİYOSENSÖRLER

Endüstriyel cihazlar, çalışma ortamı şartlarından kolaylıkla etkilenebildiğinden dolayı analizlerde bu tür cihazların kullanımı oldukça zahmetli ve pahalıdır. Endüstride, derişim tayini için refraktometre gibi on-line ölçüme imkan veren optik cihazlar kullanılmaktadır. Fakat bu tür cihazların biyolojik bileşiklerin analizinde kullanılması ortamdaki diğer türlerin girişim yapabilme ihtimalinden dolayı sorunlara yol açmaktadır.

Genel olarak tüm analitlerin ölçüm tekniklerine bakıldığında; analiz edilecek kimyasalı öncelikle bulunduğu kompleks yapıdan ayırma, girişim yapabilecek maddelerin uzaklaştırılması için saflaştırma ve daha sonrasında da tayini söz konusudur. Biyolojik türlerin analizinin yapılması için gelişmiş laboratuvarlara ihtiyaç vardır ve bu analizler oldukça pahalıdır. Bu yüzden, daha hızlı ve basit bir yöntemin geliştirilmesine gerek duyulmuş ve bünyesinde biyolojik bir duyargacı bulunan ve bir fizikokimyasal çevirici ile birleştirilmiş analitik cihazlar olarak tanımlanan biyosensörler kullanılmaya başlanmıştır. Biyolojik türlerin analizinde kullanılan biyosensörlerle yapılan analizler oldukça duyarlı, basit ve ucuz yöntemlerdir.

Biyosensörler; biyolojik veya biyolojik olarak türetilmiş sensör elementinin, bir fizikokimyasal çevirici ile bütünleştirilmesi veya birleştirilmesinden oluşan kompakt analitik araçlardır (Turner, 1987, Turner, 2000). Bir biyosensörün amacı, bir veya bir grup analitin miktarı ile orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir. İlk biyosensör, Clark ve Lyons tarafından geliştirilen enzim temelli glukoz sensörüdür. Bundan sonra dünya çapında çeşitli laboratuvarlarda yüzlerce biyosensör geliştirilmiştir. Geçmiş üç yıla bakıldığında yılda iki yüzün üzerinde makale yayınlanmıştır.

Biyosensörler; genel olarak analizlenecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşen, bu etkileşim sonucunda ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistem ve bir ölçüm sistemi olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar, seçimli tanıma mekanizmasına sahip "biyomolekül, biyoajan", bu biyoajanın incelenen madde ile etkileşimi sonucu oluşan fiziko kimyasal sinyalleri elektronik sinyallere çevirebilen dönüştürücü ve elektronik bölümlerdir. Bu bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli fakat tersinir bir şekilde etkileşime giren, duyarlı biyomoleküllerdir (Arnold, 1988).



Şekil 2.1. Bir biyosensörün şematik gösterimi.

2.1. Biyomoleküller

2.1.1. Antibadiler

Antibadiler, organizmada bir antijene karşı oluşturulan yüksek seçicilik gösteren proteinlerdir. Yüksek spesifikliğe sahip antibadilerin sadece biyosensörlerde değil ayrıca biyoanalitik kimyada da kullanımı oldukça popülerlik kazanmıştır. Antibadilerin en önemli analitik uygulamaları immünoesseyler, immünosensörler ve immünoafinite kolonlarıdır. İmmunokimyasal teknikler yüksek duyarlığa ve seçiciliğe sahip, basit ve ucuz tekniklerdir (Hock, 1995). Bu teknik antibadilerin uygun antijenlerle kompleks oluşturma temeline dayanır. Bu etkileşim çok özeldir ve seçiciliği yüksek immunoesseyler oluşturur. Antibadi parçaları ya da rekombinant antibadi üretimleri gibi yeni antibadi teknolojileri analit ve matriks gereksinimleri için biyomoleküllerin uyarlanmasına belirli sınırlar içinde izin vermektedir.

2.1.2. Mikroorganizmalar

Biyosensörlerde, biyolojik element olarak mikroorganizmaların kullanılması ile metabolizmalardaki değişimler tüketilen oksijen ya da karbondioksit miktarının elektrokimyasal olarak ölçülmesi ile gerçekleştirilir. Mikrobiyal hücreler; enzimlerden ve antibadilerden daha ucuzlardır, kararlılardır, enzimlerin ve kofaktörlerin yer aldığı çeşitli kompleks reaksiyonları yürütebilmesi gibi avantajları vardır. Fakat enzimlere göre seçicilikleri düşüktür, cevap ve geri kazanım süreleri uzundur, çok sık kalibrasyon gereklidir. Mikroorganizmalar; naylon ağlara, selüloz nitrat membranlara ya da asetil selülozlara immobilize edilirler (Karube, 1977, Suzuki, 1987, Endo, 1995).

2.1.3. Enzimler

Enzimler yüksek katalitik aktiviteye ve seçiciliğe sahip canlı organizmalardaki birçok kimyasal reaksiyondan sorumlu biyolojik katalizörlerdir. Organizmadaki organik moleküllerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve solunum gibi fizyolojik olaylar enzimler yardımıyla yürütülmektedir. Enzimler, yüksek saflıkta üretiminden dolayı enzim sensörlerinin üretiminde hayli ilgi çekmektedir.

Enzimlerin yapısı temel olarak tek polipeptid zincir ve bu polipeptid omurgaya bağlı aktif bölgeden oluşmaktadır. Bir enzimin "aktif bölgesi", birçok farklı organik reaksiyonu katalizleyebilir. Yan zincirlerin çeşitli karakteristiği, molekülün yapısını ve aktivitesini belirleyen molekül içi (intramoleküler) etkileşimlerden, peptidin diğer polipeptidler gibi moleküllerle aralarındaki ilişkiyi belirleyen moleküller arası etkileşimlere kadar birçok şeyi etkiler. Enzimler sadece belirli moleküllerin aktif bölgeye geçişine izin vermektedir. Enzimin spesifikliği sadece aktif bölge tarafından değil ayrıca protein kabuk ve bağlanılacak bölge tarafından da belirlenmektedir.

Uygun şartlar altında enzimler kararlıdır ve haftalarca ya da aylarca yüksek dönüşüm hızlarıyla çalışabilirler. Tek bir enzim dakikada 10^3 ile 10^8 arasında substrat molekülü ile reaksiyona girebilir. Enzimatik reaksiyonlar sırasında substratlar tüketilir ve ürünler oluşur. Bu bileşikler uygun dönüştürücüler yardımı ile gözlemlenir. Bazı enzimlerin NADH gibi kofaktör olarak tanımlanan ek aktif alanları vardır. Bu tür kofaktörler enzim aktivitesinin izlenmesi için kullanılmaktadır (Coulet, 1991).

Enzimlerin aktivitelerini sınırlayan en önemli parametreler pH, iyonik kuvvet, kimyasal inhibitörler ve sıcaklık etkisidir. Enzimler sıcaklık değişimlerine duyarlıdır. Sıcaklık artışı reaksiyon hızını artırır. Yüksek sıcaklıklarda protein yapısı bozulur ve enzim aktivitesini kaybeder. Birçok enzim 40-50 ^oC'nin üstündeki sıcaklıklara maruz bırakıldığında aktivitesini kaybetmektedir, çok az enzim 100 ^oC üzerinde yüksek termal kararlılığa sahiptir. Enzimler amino asit içerirler ve bu yüzden pH değişimlerine duyarlılardır. Çeşitli türlerden dolayı enzim reaksiyonları inhibe olabilirler. İnhibisyon tersinir olursa enzim bozunmadan sonra tekrar eski aktivitesini kazanır. Bu tür inhibitörler aktif siteyi bloke ederler ya da enzim aktivitesini diğer mekanizmalarla değiştirirler. Diğer inhibitörler ise enzimin aktivasyonunu tersinmez olarak inhibe ederler. Bu tersinmez inhibitörler bağlanma bölgesini bloke eder ve merkez metal iyonuyla reaksiyona girer ya da enzimi denature ederler (Tothill, 2001).

Biyosensör üretiminde kullanılan enzimlerin birçoğu enzimatik reaksiyonlarda oksijen kullanan ve hidrojenperoksit üreten oksidazlardır. Enzimler; adsorpsiyon, jelde ya da elektrokimyasal olarak üretilmiş polimerlerde tutuklama, kovalent bağlanma ve membranda tutuklama gibi yöntemlerle dönüştürücünün yüzeyine tutuklanmaktadır. Enzimler genellikle elektrokimyasal ve fiber optik dönüştürücülere bağlanırlar.

2.1.3.1. Enzim kinetiği

Substratın enzime bağlanması ile enzim substrat kompleksinden oluşan bir ara ürün (ES) oluşmaktadır. Bu kararsız ara ürünün oluşma hızı enzim ve substrat derişimine bağlıdır. Reaksiyon koşulları ve enzim derişimi sabit tutulurken substrat derişimi arttırılırsa reaksiyon hızı belli bir maksimum değere ulaşır. Bu değerden sonra, substrat derişimi artırılsa bile reaksiyon hızında bir değişme gözlenmez. Bunun nedeni, enzim moleküllerinin ortamdaki 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 (Reaksiyon 2.1).

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} P + E \qquad (2.1)$$

Reaksiyon 2.1'de enzim katalizli, tek substratlı bir tepkimenin reaksiyonu verilmiştir. Burada, E enzimi, S substratı, ES arabileşiği ve P ürünü göstermektedir. Aktif bölge yardımı ile bu kompleks (ES), E'ye ve ürün P'ye dönüşmektedir (2.1). Kompleks oluşum basamağı tersinir olmasına rağmen k_2 hız sabitine sahip ürün oluşma basamağı tersinmezdir çünkü enzimin P'ye ilgisi genellikle ihmal edilmektedir.

Enzim reaksiyonunun hızı (v) Michaelis-Menten denklemi ile ifade edilir (Denklem 2.2).

$$\nu = \frac{\upsilon_{max}[S]}{K_M + [S]} \qquad (2.2)$$

Enzim aktif sitelerinin substratla doygun olduğu şartlarda K_M Michaelis-Menten sabitini (Denklem 2.3) ve ν_{max} (Denklem 2.4) enzimatik reaksiyonun maksimum hızını ifade etmektedir (Copeland, 2000).

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \tag{2.3}$$

$$\nu_{max} = k_2 [E]_0 \tag{2.4}$$

2.1.3.2. Enzim immobilizasyonu

Enzimin dönüştürücüye bağlanmasında immobilizasyon yöntemi biyosensör performansı için oldukça önemlidir. Dönüştürücünün yüzeyine immobilize edilen biyomolekülün aktivitesini koruyarak uzun süre kararlı olması beklenir. Bundan başka biyomolekül substratın, analitin, koreaktantın, antijenin, antikorun ya da olionükleotidin geçişine izin vermelidir. Dönüştürücü immobilizasyon basamağından etkilenmemelidir. Birçok immobilizasyon yöntemi bu gerekleri yerine getirmekle beraber dezavantajları vardır. Bu yüzden, immobilizasyon yöntemi seçilirken enzimin, dönüştürücünün, matriksin ve diğer taşıyıcı elementlerinin özellikleri göz önünde bulundurulur. İmmobilizasyon işlemi uygun koşullarda gerçekleştirilmelidir. Yüksek sıcaklık, kuvvetli asidik veya bazik ortam, organik çözücüler ve yüksek tuz derişimi ile muamele denatürasyona dolayısı ile aktivite kaybına neden olur (Karyakin, 1999).

2.1.3.2.1.Taşıyıcıya bağlama

Taşıyıcıya bağlama yöntemi kimyasal (kovalent veya iyonik) veya fiziksel (adsorptif) biçimde gerçekleşir. Enzime göre taşıyıcı seçimi önemlidir. Taşıyıcı seçiminde, partikül büyüklüğü, toplam yüzey, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı ve taşıyıcının kimyasal bileşimi gibi kriterler esas alınır. Bağlanmış enzim miktarı ve enzimin immobilizasyonundan sonraki aktivitesi taşıyıcının yapısına çok bağımlıdır. Genel olarak taşıyıcının hidrofilik karakteri ve birim kütle yüzeyi arttıkça bağlı enzim miktarı da artar.

Kovalent bağlama, taşıyıcı ile enzim arasında kovalent bağ oluşumu temeline dayanan enzim immobilizasyon tekniklerinden bir tanesidir (Kojima, 1998, Li, 1998). Taşıyıcıdaki fonksiyonel gruplarla enzim zincirindeki amino asitlerin taşıdığı reaktif

gruplar üzerinden gerçekleşir. Bağlanma reaksiyonu enzimatik aktivitenin kaybına yol açmayacak şartlarda gerçekleştirilmeli ve enzimin aktif bölgesi kullanılan reaktiflerden etkilenmemelidir. Kovalent bağlanma yönteminin en büyük avantajı, bağların çok kuvvetli olmasından dolayı her türlü akış ortamında kullanılabilirliğidir. Enzim, destek materyali üzerinde yer aldığından substrat ile teması kolaydır. Yöntemin dezavantajı ise destek materyali ile enzim arasındaki sıkı etkileşimden dolayı enzimin doğal konformasyonunun bozulabilmesidir.

İyonik bağlama, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlama yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır. Taşıyıcı olarak iyon değiştirme merkezlerine sahip polimerler ve polisakkaritler kullanılmaktadır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz bu nedenle enzimin aktivitesi de oldukça yüksektir. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışı söz konusudur (Zaborsky, 1997).

Adsorpsiyonla immobilizasyon yöntemi; yüzey aktif, suda çözünmeyen, adsorpsiyon özelliklerine sahip bir yüzey aktif taşıyıcı ile enzim çözeltisinin karıştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında hidrofobik etkileşimler söz konusu olsa da Van der Waals başta olmak üzere iyonik ve hidrojen bağı etkileşimleri gibi elektrostatik güçler de etkindir. Tutuklanmamış enzimin aşırısının iyice uzaklaştırılması ile immobilizasyon işlemi tamamlanır. Yöntemin avantajları basit, hızlı, ucuz olması, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesidir; sakıncaları ise, enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma olmadığı takdirde, enzimin serbest halde reaksiyon ortamına geçerek ürünleri kirletmesidir (Canh, 1993).

2.1.3.2.2. Çapraz bağlama

Küçük moleküllü bifonksiyonel veya multifonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlama ile enzimlerin immobilizasyonu çok basit olmasına rağmen enzimlerdeki özel fonksiyonel grupların çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilmesi için gereken şartların seçimi ve oluşturulması zordur (Boz, 2001). Çapraz bağlama derecesi ve immobilizasyon; protein ve reaktif derişimine, pH'ya ve

immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır. Molekül içi bağlanmalar yanında moleküller arası bağlanmalarda söz konusudur (Kaul, 1984). Bu yöntemin en önemli avantajı, tek bir işlemde enzimleri immobilize etmek için fonksiyonlu maddelerin kullanılabilmesidir. Yöntemin dezavantajı ise moleküller arası çapraz bağlanma reaksiyonun kontrol edilmesindeki güçlüklerdir. Çapraz bağlanma reaksiyonu çok ılımlı şartlarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur. Bunun yanı sıra çapraz bağlı enzimler mekanik bakımdan çok kararsızdır. Bu sebeplerden dolayı sık kullanılan bir yöntem değildir (Telefoncu, 1986).

2.1.3.2.3. Tutuklama

Taşıyıcı matrikste tutuklama ve membran ile tutuklama olarak ikiye ayrılır. Taşıyıcı matrikste tutuklama yöntemi jelde ve fiberde tutuklanarak gerçekleştirilmektedir. İlkinde enzimler, suda çözünmeyen bir polimerle çapraz bağlanmış bir jelde tutuklanmaktadır. Polimer matriks enzim moleküllerinin dışarı difüzyonunu engellerken enzimatik reaksiyonun diğer substratlarının ve ürünlerinin giriş çıkışına izin vermelidir. Bundan başka enzimler, fiberde de tutuklanabilir. Fiber matrikste tutuklamanın jel matrikste tutuklamaya göre en önemli avantajı enzimlerin tutuklanması için yüksek yüzey alanı sağlamasıdır. Taşıyıcı matrikste enzim tutuklama yöntemi çok yaygın olarak kullanılmakta olup endüstriyel uygulama alanı bulan immobilize biyokatalizörlerin çoğu bu yöntemle hazırlanmıştır (Mori, 1972).

Membran ile tutuklama yönteminde ise enzim yarı geçirgen bir membran ile sarılmaktadır. Bu membran substrat ve ürünlerin geçişine izin verirken enzimin geçişine izin vermemektedir. Enzimde herhangi bir kimyasal değişim olmamaktadır ve çözeltide serbest halde bulunmaktadır. Enzimin substratla etkileşime girdiği alan klasik tutuklama yöntemlerindekine göre daha büyüktür. Bu yöntem substratı makromolekül olan enzimler için uygun değildir. Çünkü substrat molekülleri membrandan geçemediğinden enzimle etkileşime geçemez ve böylelikle reaksiyon gerçekleşemez (Taylor, 1996).

2.2. Dönüştürücüler

Dönüştürücü, bir sistemden aldığı enerjiyi diğer bir sisteme farklı şekilde ileten cihazlara denir (Blum, 1997). Biyosensörlerde, bir biyolojik reaksiyon tarafından doğrudan ya da dolaylı olarak üretilen enerji genellikle elektriksel sinyale dönüştürülür.

Biyosensörlerde kullanılan dört önemli dönüştürücü elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ve termal dönüştürücülerdir. Elektrokemiluminesans cihazlarda uyarılma için elektriksel enerji gerekli olsada optik olarak nitelendirilirler. Uygun dönüştürücü seçimininde biyolojik elementin önemi büyüktür. Enzimatik reaksiyonlar elektrokimyasal ve termodinamiksel olarak kolayca izlenirken kütle hassas biyosensörler enzimatik biyosensörlerde kullanılmamaktadır. Diğer taraftan piezoelektrik sensörler antijen ve antikorların afinite reaksiyonlarında ya da DNA çalışmalarında kullanılır.

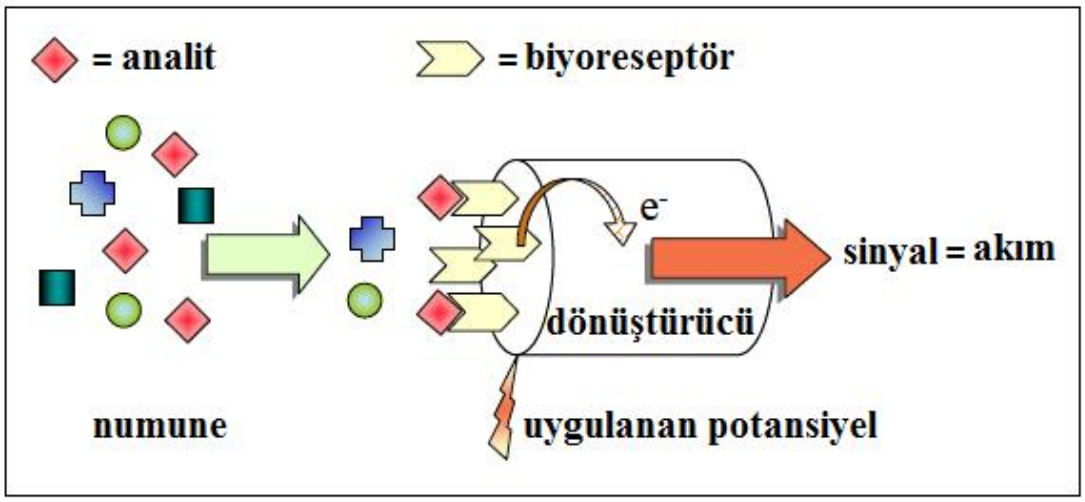
Biyosensörlerin sınıflandırılması yapılırken gerek çok farklı biyolojik elementler kullanıldığından gerekse çeviricilerdeki çeşitliliklerden dolayı kesin bir tanım yapmak çok zordur. Biyosensörler genellikle kullanılan biyoalgılayıcıya göre ya da dönüştürücüye göre sınıflandırılmaktadır. Bazen de bu sınıflandırma, biyoalgılayıcının dönüştürücüye bağlanması sırasında kullanılan immobilizasyon yöntemine göre de yapılmaktadır.

Enzim sensörlerinin sınıflandırılması genel olarak, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sinyalin belirlenme ilkesine göre yapılmaktadır. Biyosensörlerde, biyoaktif bileşenin tayin edilecek madde ile etkileşimi sonucu oluşan sinyalin iletim ve ölçümünde, genel olarak, elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik), optik, piezoelektrik ve kalorimetrik esaslı sistemler kullanılır.

2.2.1 Amperometrik biyosensörler

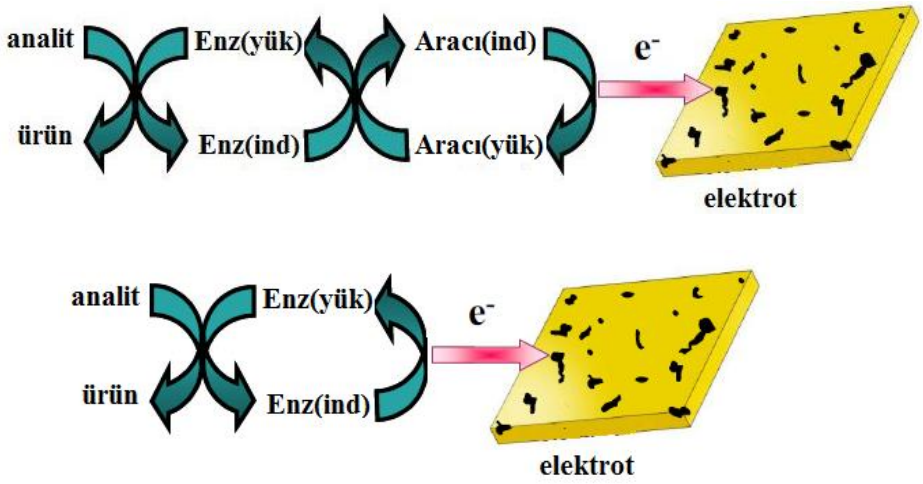
Amperometri yöntemi, elektron transfer prosesinin izlenmesi ve bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü temeline dayanan en eski elektrokimyasal yöntemlerden biridir. Duyarlı ve kolay bir yöntem olmasından dolayı biyosensörlerde kullanılan en yaygın analiz metotlarındandır. Biyolojik element genellikle elektrot üzerinde immobilize edilir. Amperometrik biyosensörler sabit potansiyel uygulandığında üretilen kararlı hal akımının ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Bu akım biyolojik element tarafından üretilen ya da tüketilen elektrokimyasal türle ilişkilidir. Enzimatik reaksiyon sırasında, elektrokimyasal aktif tür enzim tarafından üretilirken ya da tüketilirken bu türler elektrotta indirgenir ya da yükseltgenir. Amperometrik biyosensörler, biyokimyasal reaksiyonda oluşan ürünlerin reaksiyonu sonucu çalışma elektrodundaki akım değişikliğini ölçer. Ölçülen akım siddeti, çalışma elektrodunda yükseltgenen veya indirgenen elektroaktif türlerin derişiminin bir

fonksiyonudur ve analit derişimi ile orantılıdır. Enzim temelli biyosensör için en bilinen örnek glukoz oksidaz enzimi ile glukoz tayinidir. Enzimatik reaksiyon sırasında oksijen harcanırken H_2O_2 üretilir ve her ikiside amperometrik olarak tayin edilebilir. Amperometrik enzim biyosensörleri alanında birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan son çalışmalarda elektron transfer aracısı olarak mediyatörler kullanılmış ya da enzimler kullanılarak aktif merkezden elektroda direk elektron transferi gerçekleştirilmiştir. Şekil 2.2' de bir amperometrik biyosensörün çalışma prensibi görülmektedir (Belluzo, 2008).



Şekil 2.2. Amperometrik biyosensörün çalışma prensipleri

Oksijen ve hidrojen peroksit, bazı enzim reaksiyonlarında ko-substrat ve ürün olup amperometrik yöntemle tayin edilirler. Elektrokimyasal biyosensörler, elektron transferi için redoks aracılı veya redoks aracısısız (Şekil 2.3) elektrokimya temeline dayanır. Ferrosen ve türevleri, ferrisiyanür, metilen mavisi, benzokinon ve n-metil fenazin vb. Biyosensörlerde yaygın olarak kullanılan redoks aracılarıdır. Amperometrik biyosensörler; güvenilir, maliyeti düşük, klinik, çevre, endüstri alanındaki uygulamalarda oldukça seçicidir (Canh, 1993).



Şekil 2.3. Redoks aracılı ve redoks aracısız elektron transferi

2.2.1.1. Amperometrik biyosensörlerde altın ve platin nanoparçacıkların biriktirilmesi

Son yıllarda duyarlık, seçicilik, yapım kolaylığı ve ucuzluğu gibi performans kriterleri temel alınarak daha iyi elektrokimyasal biyosensörlerin tasarımı için analitik elektrokimya alanında çalışmalar yapılmaktadır. Biyosensörlerin performans kriterlerini artırmak için genellikle nanomalzemeler kullanılmaktadır. Gümüş(Ag) (Haes, 2002), altın (Au) (Liu, 2003, Wang, 2004, Xu, 2004), platin (Pt) (Huang, 2005) ve palladyum(Pd) (Gopidas, 2003) gibi metal nanoparçacıkları eşşiz kimyasal ve fiziksel özelliklerinden dolayı biyosensör yapımında kullanılmaktadır. Bu alanda en çok kullanılan metaller altın ve platin nanoparçacıklarıdır.

Altın parçacıklar son yıllarda katalizör ve sensör uygulamalarında yapılan araştırmalarda giderek artan bir ilgi görmektedir (Daniel, 2004, Raguse, 2007). Bu parçacıklar genellikle biyosensörlerin yapımında biyomoleküllerin immobilizasyonunda ve biyomoleküllerin biyokatalitik aktivitelerini korumalarında gösterdikleri üstün özelliklerden dolayı geniş kullanım alanı bulmaktadır. Enzim sensörleri (Xiao, 1999, Gole, 2001, Jia, 2002), immunobiyosensörler (Zhou, 2005) ve DNA sensörleri (Niazov, 2004) gibi birçok biyosensörün analitik performanslarını geliştirmek için altın nanoparçacıklar kullanılmaktadır. Altın nanoparçacıklar, enzimlerin aktif merkezleri ile elektrotlar arasındaki elektron aktarımını artırır ve ayrıca biyosensörlerde kullanılan zararlı mediyatörlerin yerini almaya aday malzemelerdir (Zhang, 2006). Ayrıca altın nanoparçacıklar enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan ürünlerin elektrokimyasal

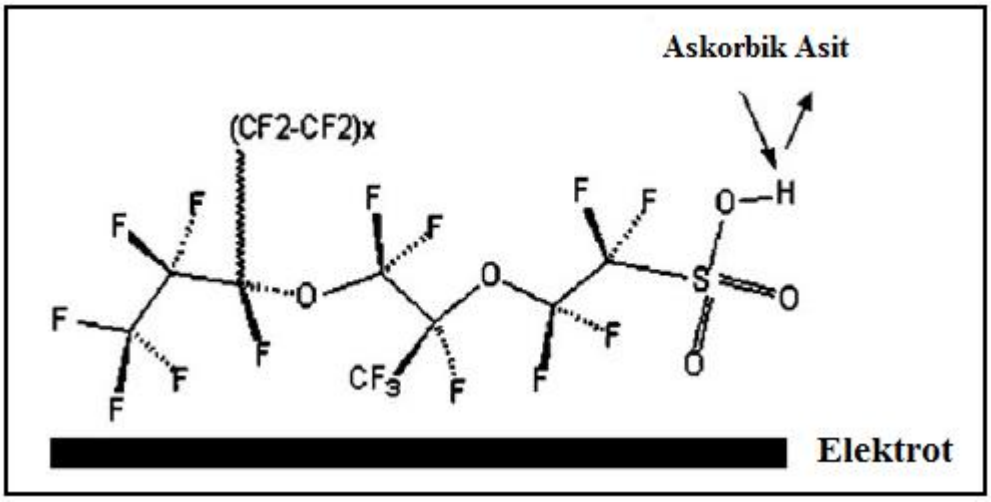
tayinini kolaylaştırmak ve biyosensör tasarımını geliştirmek için kullanmaktadırlar (Sotiropoulou, 2005, Schulze, 2005, Sotiropoulou, 2005).

Elektrot yüzeylerinin platinle kaplanması katalitik yüzey alanında artışa neden olduğundan dolayı yapılmaktadır. Platin kaplama 19.yy'ın sonlarına doğru başlamıştır. Önceki yıllarda platin kaplamada kloroplatinik asit kullanılmış ve çözelti bileşimi üzerinde durulmuştur. Kurşun asetat tanecik büyüklük inhibitörü olarak kullanılmıştır. 1960'ların başlarından itibaren potansiyostatların gelişimi ile kantitatif elektrokimyasal deneyler yapmak mümkün olmuştur. Platin kaplama üzerine yapılan çalışmalarda elektrobiriktirme şartlarının kaplamanın görünüşüne, büyümesine, yüzey alanına ve üretilebilirliğine etkileri incelenmiştir. Substrat hazırlamanın ve platin biriktirme şartlarının adhesyon üzerine etkileri araştırılmıştır. Birçok amperometrik enzim biyosensörü parlatılmış platin ya da camsı karbon elektrot kullanılarak hazırlanmaktadır. Mikroelektrotlar, platin ya da diğer elektrotlar platinle kaplanarak duyarlıkları artırılmaktadır (Zhang, 1996, Kim, 1996). Kaplamalarda platinik asitin %0,1'den %5'e kadar değişen derişimlerde çözeltileri kullanılmış ve platinle kaplama -150 mV ve daha negatif potansiyellerde potansiyostatik olarak gerçekleştirilmiştir. Başka bir çalışmada ise glukoz biyosensörünün yapımında kullanılan platin yığınlarının dağılımına potansiyelin etkisi (Kim, 1996) incelenmiştir. Galvanostatik (Castner, 1984, Kell, 1990) ve potansiyel tarama (Schuhmann, 1998) yöntemi ile platin kaplama çalışmalarıda yapılmıştır. Platinle kaplama şartlarının biyosensör cevabına etkisi ile ilgili çalışmalar çok azdır. Enzim temelli amperometrik biyosensörlerin cevabına platinle kaplama potansiyelinin etkisi çok az çalışmada incelenmiştir. CO'in geliştirilmiş yüzey infrared absorpsiyonu (Bjerke, 1999), glukozun enzimatik olmayan tayini (Park, 2003) ve hidrojen peroksit sensörlerinin üretimi (Evans, 2002) ise son yıllarda platin biriktirmenin yapıldığı diğer uygulamalardır.

2.2.1.2. Amperometrik biyosensörlerde girişim giderme

Birçok enzim ürünü amperometri yöntemi ile tayin edilirken numune matriksinde bulunan diğer türler de yükseltgenirler ya da indirgenirler. 0,4 V ve üzeri potansiyellerde yükseltgenen askorbik asit ve ürik asit gibi türler yüksek girişim etkisine neden olmaktadır (Mizutani, 1998). Elektroaktif girişim yapan türlerin girişim etkisinin giderilmesi için çeşitli metodlar geliştirilmiştir.

Elektrotlar yarı geçirgen polimer membranlarla modifiye edilerek girişim etkileri ortadan kaldırılabilmektedir (Anh, 2003, Ramkumar, 2004, Do, 2004, Gogol, 2000, Fang, 2002). Bu tür membranlar çözünen ile membran arasındaki boyut dışlama ya da yük etkileşime göre yarı geçirgen özellikler göstermektedir. Hidrofobik ($-CF_2-CF_2-$) omurga ve hidrofilik sülfonik asit ($-SO_3H$) gruplarından oluşan anyonik bir polimer olan nafyon girişim yapan anyonik türlerin yüzeye bağlanmasını engelleyen (Şekil 2.4) katyon değişim polimeridir. Nafyon; hidrojen peroksitin geçişine izin verirken askorbik asit ve ürik asit gibi anyonları uzaklaştırarak, geçişlerine izin vermeyerek girişim etkisini yok etmekte ve gözlenen cevap akımında hata gözlenme olasılığını ortadan kaldırmaktadır.



Şekil 2.4. Nafyonun girişim yapan madde ile etkileşimine ait mekanizmana (Yuan, 2005)

Girişim gidermenin başka bir yöntemi ise çalışmalarda aynı anda iki çalışma elektrodunun kullanılmasıdır. Bu yöntemde elektrotlardan birine enzim kaplanırken diğerine kaplanmaz. Girişim yapan maddelerden gelebilecek gürültü sinyalleri iki elektrotdan alınan akım değerlerinin farkının alınmasıyla ortadan kaldırılmaktadır (Kirk, 1994).

Biyosensör uygulamalarında girişimi azaltmanın bir diğer yöntemi de çift enzim kullanmaktır. Elektrot yüzeyine kaplanan enzimlerden bir tanesi analizlenecek maddeden biyolojik sinyali oluşturmakta görevliyken diğeri ortamda bulunan girişim yapabilecek maddeleri enzimatik olarak elektroaktif olmayan ürünlere parçalar. Böylece girişim yapabilecek maddelerin cevap akım değerlerinde pozitif ya da negatif yönde hataya sebep olmaları önlenmiş olur (Kirk, 1994).

Girişim yapabilecek maddelerin etkilerini izole etmenin son yöntemi ise çalışma potansiyelini düşük tutmaktır. Bu sayede analizlenecek madde yanında girişim yapan maddelerin de tepkimeye girmesi önlenmiş olur (Kirk, 1994). Çalışma potansiyelini düşürmek için çalışma elektrodunda elektrokatalitik etkiye sahip olduğu bilinen bir metal biriktirilir. Metal biriktirilmesi ile hazırlanan elekrotlarla daha düşük potansiyellerde tayin yapılabilmektedir. Bu şekilde tasarlanan biyosensörlerde mediyatörün potansiyel düşürme ve elektriksel iletkenliğe yardımcı olma gibi temel görevlerini, elektrot yüzeyine kaplanan metaller üstlenmişlerdir.

2.2.2. 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^{2+} , H^+ veya NH_4^+ gibi iyonları tayin ederler. 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 (Canh, 1993). Potansiyometrik sensörlerin düşük hassasiyet ve spesifik olmayan etkileşimlere ait aletsel sinyal alınması gibi problemleri vardır. Özellikle sinyal/gürültü oranı analitik problemlere sebep olabilmektedir.

2.2.3. Kondüktometrik biyosensörler

Kondüktometrik biyosensörler, biyolojik bileşimin sonucu olarak, metal elektrot çifti arasındaki iletkenlik değişimini ölçer. Üreaz gibi birçok enzim reaksiyonu ve birçok biyolojik membran reseptörü, mikro elektrotların kullanıldığı iyon kondüktometrik veya impedimetrik aletlerle izlenebilir. Çünkü ölçümdeki hassaslık örnek çözeltisindeki iletkenlikle paralel olarak değişir. Hazırlanan biyosensörler, glukoz, lipaz ve hemoglobin/pepsin hakkında fikir edinmek için, polimer matriksin

çevresindeki pH veya redoks potansiyeli gibi değişken elektronik iletkenliğin izlenmesine olanak sağlar (Contractor, 1994).

2.2.4. Kalorimetrik biyosensörler

Kalorimetri esaslı enzim sensörleri, termal enzim sensörleri, enzim termistörleri ya da entalpimetrik enzim sensörleri gibi farklı isimlerle tanımlanırlar. Temel prensipleri; bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanılarak substrat derişiminin belirlenmesine dayanır. Bütün biyolojik reaksiyonlar ekzotermiktir. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sıcaklık değişimi ile substrat derişimi arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır. Sıcaklık değişimleri termal olarak yalıtılmış ortamdaki termistörler veya termofiller aracılığıyla izlenir. Kullanılan termistörler çok küçük sıcaklık değişimlerine bile duyarlıdır. Dolayısıyla çok düşük miktardaki substrat derişiminin ölçümüne (10^{-5} M) olanak sağlarlar. Mosbach ve Danielson enzim termistörleri geliştirmişlerdir. Termistörlerle, enzim reaksiyonundaki sıcaklık değişimi ölçülmüştür. Substratlar, enzimler ve antijenler termistör biyosensörler kullanılarak tayin edilir (Mosbach, 1981).

2.2.5. Piezoelektrik biyosensörler

Piezoelektrik sensörler (kütle hassas sensörler) en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlesinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik cihazlardır. Sensör seçimliliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Rezonans frekanstaki değişime dayanarak santimetrekarede nanogram seviyesinde kütle değişimini ölçebilen ve bu yüzden de antikor-antijen etkileşimlerinde sıkça kullanılan biyosensörlerdir. Kütle hassas biyosensörlerin çalışma prensibi piezoelektrik etkiye dayanır. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki farklanmanın ölçülmesiyle sonuca ulaşılır. Bu tip biyosensörler amonyum, hidrojen, metan, CO, nitröz oksit ve diğer organo fosfor bileşikleri ölçümünde kullanılmaktadır.

2.2.6. Optik biyosensörler

Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekülün immobilize edilmesiyle hazırlanan ölçüm cihazlarıdır. Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alırlar. Optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile hazırlanan optik esaslı enzim sensörleri temelde absorbsiyon, fluoresans, biyolüminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde işlev görürler. Işığın iletimindeki değişimin ölçülmesine dayalı, optik esaslı sensörlerde, ölçüm sistemi, madde derişimine bağlı olarak absorbans ya da luminesansta değişim gösteren bir boya içerir veya CO_2, O_2 veya pH değişimi gibi bir fizikokimyasal özellikten faydalanılır. Bu sensörlerde en önemli etken fiber boyunca ışık iletiminin etkinliğidir (Gerard, 1999). Floresans ölçümünün söz konusu olduğu optik biyosensörler ise, fiberin kendi özeliklerindeki değişimleri kapsar, arka alan biyosensörler ve yüzey plazmon rezonans biyosensörler olarak iki gruba ayrılır.

2.3. Biyosensörlerin Performans Kriterleri

Biyosensör cevabının karakterize edilmesi herhangi bir analitik yöntemde olduğu gibi önemlidir. Kullanılan yöntemin amacına bağlı olarak gereken performans kriterleri değerlendirilmelidir (Thevenot, 1999). Bazı önemli performans kriterleri aşağıda verilmiştir.

Çalışma aralığı: Bir biyosensörün doğrusal çalışma aralığı analit derişimine karşı cevap değişiminin grafiğe geçirilmesi ile elde edilir ve belirli bir analit derişimine kadar doğrusaldır. Bu çalışma aralığı tayin edilebilen en düşük derişimden (tayin sınırı), kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan sapma gösterdiği (doğrusallık sınırı) derişimine kadar aralığı kapsar (Thevenot, 1999).

Duyarlık: Duyarlığın kantitatif tanımı kalibrasyon duyarlığı olarak yapılır. Duyarlık biyosensörün kalibrasyon eğrisindeki doğrusal çalışma aralığında tanımlanır. Kalibrasyon duyarlığı ölçümün yapıldığı derişime karşılık gelen noktada kalibrasyon eğrisinin eğimi olarak tanımlanır. Biyosensörün kalibrasyon eğrisinin eğimi, cevap değişimi/analit konsantrasyonu (R/C) ya da cevap değişimi/analit konsantrasyonunun logaritması (R/log C)'dır (Thevenot, 1999). Eğim değeri büyüdükçe duyarlıkta da artış

gözlenir. Sensörün büyüklüğü, ölçüm ortamına doğru kimyasal türün kütle aktarım hızı gibi faktörler duyarlığa etki etmektedir. Biyosensörlerin kullanılan enzimin substratları dışında potansiyel girişim yapan maddelerden etkilenmemesi istenir.

Tekrarlanabilirlik: Herhangi bir analitik yöntemde olduğu gibi biyosensörlerle yapılan ölçümlerde de tekrarlanabilirlik önemlidir. Tekrarlanabilirlik belirli bir zaman dilimi içinde gerçekleştirilen bir seri deney verisinin kendi aralarındaki uyum derecesi göstermektedir (Thevenot, 1999). Tekrarlanabilirlik, aynı zamanda rastgele veya belirsiz hataların bir ölçüsüdür ve hesaplanmasında standart sapma, varyans ve varyans katsayısı olarak verilen üç sayısal ölçüt kullanılmaktadır (Skoog, 1998). Biyosensör sistemlerinde yapılan tayinlerde beklenen tekrarlanabilirlik %5-10 (bağıl standart sapma, %RSD)' dur (Eggins, 1996).

Cevap zamanı: Algılayıcıların giriş parametresinde değişime karşı tepki vermesinin bir ölçüsüdür. Bir başka değişle tepki süresinin plato değerine ulaşması için geçen zamana yatışkın durum cevap zamanı denir. Toplam cevap zamanının (T_T) %90'ına ulaşmak için geçen süre ise T_{90} olarak adlandırılır. Birçok biyosensörde T_T çok uzun olduğu için T_{90} tercih edilir. Kararlı hal akım zamanı ölçüm hücresine her bir analit eklenmesi ile belirlenir ve kararlı hal akım cevaplarının %90'ına ulaşması için gerekli süreden cevap zamanı bulunur (Thevenot, 1999).

Seçicilik: Bir analitik yöntemin seçiciliği, numune matriksinde bulunan diğer türlerden etkilenmeden tayin edebilme özelliğidir. Biyosensörlerdeki biyoaktif bileşen spesifik, kararlı, sadece analit derişimine duyarlı olmalı ve diğer kimyasal türlerden etkilenmemelidir. Biyoaktif bileşenin spesifik olması girişim yapabilecek türleri içeren karmaşık içerikli ölçüm ortamlarında detaylı ön işlem yapılmaksızın analize imkan verir. Biyosensörlerin seçiciliğin bulunmasında farklı yöntemler kullanılmaktadır. Girişim yapan türler analit içeren hücre ortamına eklenerek biyosensör cevabından sapma oranı seçicilik olarak ifade edilir. Aynı çalışma koşullarında her bir girişim yapan tür için kalibrasyon eğrisi çizildikten sonra analit için elde edilen kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılarak biyosensörün girişim yapan türe cevabının ölçümü ile biyosensörün seçiciliği belirlenir. Seçicilik ayrıca analitle aynı derişime sahip girişim yapan türün cevap akımlarının oranı olarak da ifade edilmektedir. Bu çalışma kapsamında girişim etkisinin kantitatif değerleri amperometrik seçicilik katsayıları hesaplanarak

belirlenmiştir. Amperometrik seçicilik katsayısı substrat ile aynı derişime sahip olan girişim yapan maddenin cevap akım değerinin substratınkine oranı olarak belirtilmektedir (Wang, 1994).

Kararlılık: Biyosensör ile yapılan bir dizi ölçüm sonucunda biyomolekülün aktivitesindeki değişim sonucu çıkış sinyalindeki değişimin toplam ölçüm sayısı ile ya da gün sayısı ile ifade edilmesiyle biyosensörün kararlılık ömrü belirlenmektedir. Bir biyosörün gün içinde ardı sıra yapılan ölçümlerde başlangıç aktivitesini ne kadar koruduğunun ölçüsü kullanım kararlılığını, belirli gün aralıklarında ölçümü ile de depolama kararlılığı bulunur. Elektrot kararlılığının yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Biyoaktif bileşenin kararlı olması ise çok sayıda analize imkan vereceği için biyosensörün ekonomik olmasına zemin hazırlar. Kararlılık, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına, elektrodun geometrisine, biyosensör hazırlama yöntemine ve dönüştürücüye bağlıdır. Ayrıca; pH, sıcaklık, tampon çözelti bileşimi, O_2 derişimi gibi çalışma ortamı şartlarıda kararlılığı etkileyen faktörlerdir (Thevenot, 1999).

2.4. Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Biomedikal teşhis, biyosensörlerin gelişmesine olanak sağlayan en onemli alanlardan biridir. En popüler uygulaması ise şeker hastalığında kandaki glukoz seviyesinin izlenmesi için kullanılan glukoz oksidaz temelli biyosensörlerdir. Biyosensörlerin tarım ve gıda endüstrisinde de potansiyel kullanım alanları vardır. Fakat geliştirilen biyosensörlerin çok azı ticari hale getirilmiştir.

2.4.1. Tarım endüstrisi

Kolinesteraz temelli enzim biyosensörleri, pestisitlerdeki eser düzeydeki organofosfatları ve karbametleri tayin etmek için kullanılmaktadır. Amonyak ve metan ölçümü için seçici ve duyarlı mikrobial sensörlerle çalışılmıştır (Wittman, 1997). Atıksu kalite kontrolü için biyolojik oksijen ihtiyacının (BOİ) ölçümünün yapıldığı, kolajen ya da poliakrilamite immobilize edilmiş Rhodococcus erythropolis bakterisi gibi mikro organizma temelli analiz cihazları kullanılmaktadır. Standard biyolojik oksijen ihtiyacının ölçümünden önce atığa ön işlem yapmak gerekir, bakteriye ve protozayla

muamele edilmesi için ise 20 °C de 5 güne ihtiyaç duyulmaktadır. Buna karşın BOİ biyosensörleri 1 saat içinde 20 ölçüm sonucunu verir ve tayin limiti 0-500 mg/ L BOİ'dir (Wittman, 1997).

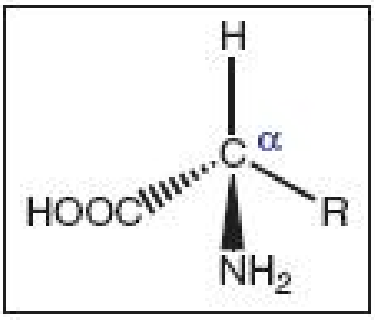
2.4.2. Gıda endüstrisi

Karbonhitratlar, alkoller ve asitlerin ölçümü için ticari biyosensörler vardır. Bu cihazlar genellikle kalite kontrol laboratuvarlarında ve işletim hattına akış enjeksiyon analiz sistemlerinin bağlanması ile kullanılmaktadır. Sterilizasyon, sık kalibrasyon, analit seyrelmesi vs. gibi sorunlardan dolayı akış sistemlerinde kullanımı sınırlanmaktadır. Enzim temelli biyosensörlerin gıda kalite kontrolünde uygulamaları; amino asitlerin, aminlerin, amitlerin, heterosiklik bileşiklerin, karbonhidratların, karboksilik asitlerin, gazların, kofaktörlerin, inorganik iyonların, alkollerin ve fenollerin ölçümünü kapsar (Despande, 1994). Biyosensörler şarap, bira ve yoğurt endüstrilerinde kullanılmaktadır. Ayrıca et, tavuk ve balıkdaki patojenik organizmaların immunosensörlerle tayini gıda güvenliğinin sağlanmasında kullanılmaktadır.

3. AMİNO ASİTLER

Amino ($-NH_2$) ve karboksilik asit (–COOH) gruplarını içeren amino asitler metobolizma için önemli olan moleküllerdir. Canlı organizmalarda 20 değişik amino asit bulunmaktadır. Bu amino asitler birbirlerine peptit bağları ile bağlanarak uzun zincirler meydana getirirler ve proteinleri oluştururlar. Polipeptidin ana zinciri, her amino asit için aynı olan grupların birleşimidir.

Amino asitlerin genel yapısı şekil 3.1'de gösterilmiştir. Tetrahedral karbon atomu (C-alfa) dört gruba bağlanmıştır: bazik bir amino grubundan ($–NH_2$), asidik karboksil grubundan (–COOH), hidrojen atomundan (–H) ve bir amino asitten diğerine değişen sübstitüye grup (–R) dan oluşmuştur. Amino grubu karboksil gruba göre alfa pozisyonunda olduğundan α-amino asit adını alır.



Şekil 3.1. α-L-amino asitin genel yapısı.

Yan zincir veya R grubu ise, α-karbonuna bağlıdır ve 20 amino asitin her birinde farklıdır. Bu farklılık, proteinlere kendine özgü değişik yapıları ve aktiviteleri kazandırır. Tüm amino asit yan zincirleri bir arada düşünüldüğünde, artı veya eksi yüklüden hidrofobiğe kadar çeşitli yapısal özellikler gösterirler. Ayrıca bu yan zincirler, farklı çeşitlilikte kovalent ve kovalent olmayan bağların yapısına katılabilirler.

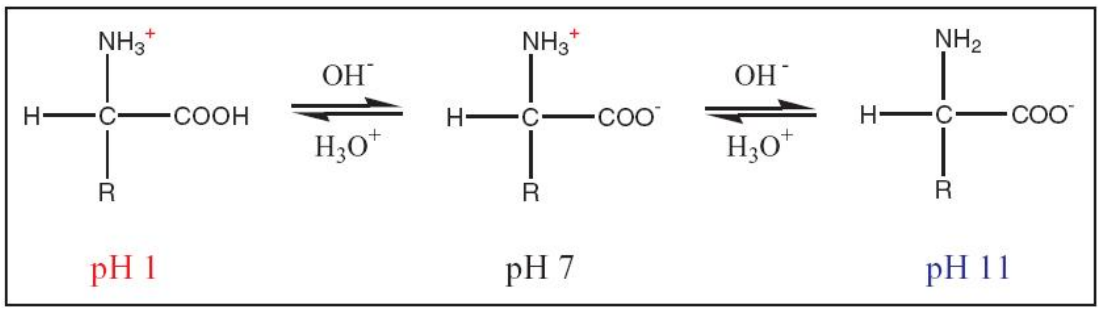
Amino asitlerin asimetrik merkezleri (kiral karbonları) vardır. Örneğin Glisin'de, amino asitin α-karbonu dört farklı gruba bağlanabilir. Bu sebepten her amino asit D veya L formunda bulunabilir. Ribozomlar üzerinde amino asit sentezinde her zaman L amino asit kullanılır. Sadece mikroorganizmalar, belli küçük peptidlerin sentezinde D amino asitlerini kullanırlar (Manz, 2004).

Amino asitler sübsitiye R gruplarına göre gruplandırılar. Bazik amino asitlerde R bir tane daha amino grubu içerirken, asidik amino asitlerde R bir tane daha karboksil

grubu içerir. Ayrıca alifatik, aromatik, hidroksil ve kükürt sübstitüye gruplarını içeren amino asitler ikincil amino asitler olarak adlandırılırlar. Amino asitlerin isimleri üç harfle ya da bir harfle kısaltma yapılarak ifade edilir. Amino asitler fizyolojik pH da sahip oldukları yüklerine ve polaritelerine göre sınıflandırılır. Polar olmayan amino asitlerde net yük yoktur. Glisin, Alanin, Valin, Lösin, İzolösin, Fenilalanin, Triptofan, Metiyonin ve Prolin bu gruba girerler. Polar amino asitler de ise net yük yoktur fakat sübstitüent R'de polar bir grup taşırlar. Serin, Treonin, Asparagin, Sistin, Glutamin ve Prolin bu gruba girerler. Polar asidik amino asitler, fizyolojik pH'da pozitif yüklüdürler ve asidik özellik gösterirler. Bu gruptaki amino asitler aspartik asit ve glutamik asittir. Polar bazik amino asitler, yan zincirlerinde proton alıcı moleküller taşırlar. Fizyolojik pH'da negatif yüklüdürler ve bazik özellik gösterirler. Lisin, Histidin ve Arginin bu gruba girerler (Manz, 2004).

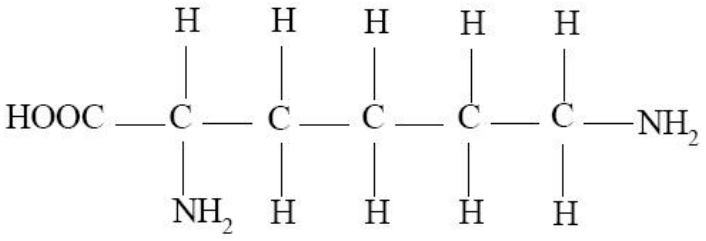
Amino asitler bazik ve iyonik fonksiyonel gruplar içerdiği için amfoterlerdir. Amino asitlerin karboksi gruplarının pK değerleri 1,8 ile 2,5 arasında iken amino gruplarının pK'sı ise 8,7 ile 10,7 arasındadır. pH 6 ve pH 7 fizyolojik şartlarda amino grubu $–NH_3^{+}$'e ve karboksil grubu ise $–COO^{-}$'a iyonlaşmaktadır. Yani fizyolojik pH'larda amino asitler dipolar iyondurlar. Daha düşük pH' larda, karboksil grubu –COOH'a proton alır ve amino asit pozitif yüklenir. Yüksek pH'larda amino grubu protonunu kaybeder, $–NH_2$ ve amino asit negatif yüklü hale geçer (Şekil 3.2).

Her amino asit için net yükün sıfır olduğu özel bir pH değeri vardır. Buna izoelektrik nokta, pI denir. Bu izoelektronik noktada bir amino asite elektrik alan uygulandığında kararlı haldedir ve ne negatif ne de pozitif kutba kayar.



Şekil 3.2. Farklı pH değerlerinde amino asitlerin yükleri: pH 7'de dipolar iyon, düşük pH'larda pozitif yüklü ve yüksek pH'larda negatif yüklü (Manz, 2004)

Lisin, vücut için gerekli fakat üretilemeyen ve sadece besinlerde bulunan amino asitlerden biridir. Ayrıca L-lisin ağız yoluyla ilaçla takviye edilebilir. L-Lisin (şekil 3.3) asetilkolinin biyosentezinde önemli bir enzim olan asetoasetil-CoA'nın merkezi sinir sisteminde üretiminde görev almaktadır. Ayrıca L-karnitinin biyosentezinde açil gruplarının mitokondiriye taşınımında beta yükseltgenmesi için gerekli bir amino asittir.



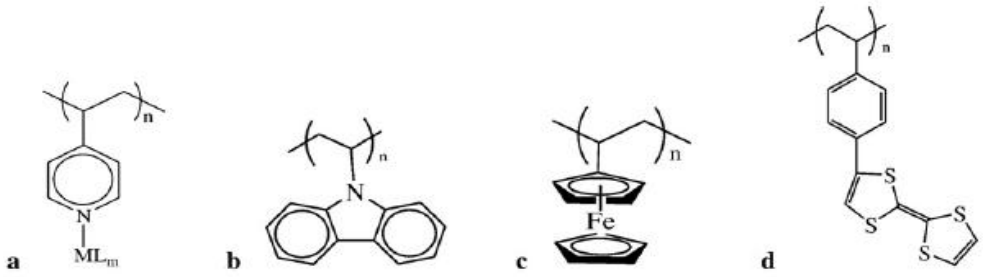
Şekil 3.3. L-lisinin yapısı.

Lisin tayini; sıvı kromotografisi (Fernandes, 1997, Lolic, 1997), iyon değişim kromotografisi (Yung-Feng, 1995) ve kapiler elektroforez (Cicitelli, 1992) gibi yöntemlerle yapılabilmektedir. Fakat ayırma basamakları çok zahmetli ve zaman alıcı olduğundan ve ayrıca pahalı cihazlara gereksinim duyulduğundan dolayı bu yöntemler bir dizi numunenin analizi için uygun değildir. Bu sebeple, lisin analizi için daha hızlı, ucuz ve basit metotların geliştirilmesi yönünde artan bir ilgi vardır. Biyosensörler hızlı ve daha ucuz analiz imkanı sağlarlar. Bu biyosensörlerin yapımında biyolojik bileşen olarak farklı enzimler kullanılmaktadır (Mooe, 1958, Heftman, 1992, Oxlund, 1995, Lunte, 1997). L-Lisin oksidaz, L-Lisinin enzimatik reaksiyonunda en yaygın olarak kullanılan enzimdir. Bu enzim Trichoderma Viride Y244-2 (EC 1.4.3.14) den izole edilmektedir (Li 1992). L-Lisinin enzimatik dönüşümü reaksiyon 2.5'de verilmektedir. Lisin oksidaz enzimin immobilizasyonu elektrot üzerine glutaral aldehitle polimer filme çapraz bağlanarak (Curulli, 1998) ya da silika jel (Simonian, 1991), naylon (Saurina, 1991), ya da membran (Buchholz, 1994) üzerine kovalent bağ yaparak gerçekleştirildiği bildirilmiştir.

$$\text{L-lisin} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{L-lisin } \alpha\text{-oksidaz}} \alpha\text{-keto-}\varepsilon\text{-aminokaproat} + NH_3 + H_2O_2 \qquad (2.5)$$

4. REDOKS POLİMERLERİ

Redoks polimerleri indirgenebilir veya yükseltgenebilir redoks bölgeleri içeren polimerlerdir. Redoks polimerlerinde polimer matriksi fonksiyonel gruplar için yükseltgenme halinin değiştiği destek materyallerdir. Redoks polimerlerinin birçoğu alifatik zincirlere ve farklı fonksiyonel gruplara sahip polimerlerdir. Bunlar farklı fonksiyonel gruplar da bulundurabilirler. Redoks polimer oluşturulmasında diğer bir yöntem ise inorganik polimer kullanılmasıdır. Bu sistemlerde inorganik katı içinde geçiş metal iyonu ya da kompleksi bulunmaktadır (Leidner, 1992). Metal komplekslerinin polimer matriks içinde birikimi için çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Polimer içindeki redoks bölgeler polimer zincire ya kovalent bağla ya da elektrostatik olarak bağlanabilirler. Serbest hallerinde kararsız olan ligantları içeren kompleksler (ferrosen (Merz, 1978, Daum, 1979) ya da kobaltosen (Roullier, 1982, Mallouk, 1986)) integral gruplar olarak ligantlarıyla matrikslerine kovalent bağla bağlanırlar. Bipiridin, piridin (Haas, 1980, Calvert, 1981, Abruna, 1981, Denisevich, 1982) ya da porpirinler (Bettelheim, 1980, Wan, 1984, White, 1985) gibi kimyasal olarak kararlı ligantlar yukarıda belirtilen yöntemle ya da ilk önce liganta daha sonra matrikse bağlanırlar. Komşu molekül merkezleri arasındaki elektron değişim reaksiyonu elektron atlama mekanizması ile gerçekleşir. Tüm bu sistemlerde her molekül merkezinde bir hareketli elektron olmasından dolayı polimer içindeki tüm merkezler indirgenmiş ya da yükseltgenmiş halde bulunurlar. Komşu merkezler arasındaki elektron değişimi bunlardan birisi indirgenmiş diğeri ise yükseltgenmiş olduğunda gerçekleşir. Polimer matriksine kovalent bağlanmış olan geçiş metal kompleksleri içeren redoks polimerlerinden bazıları poli(vinil piridin) (Kelly, 1996), poli(vinil karbazol) (Skompska, 1995), poli(vinil ferrosen) (Abruna 1991, Robinson, 2006) ve sübstitüye polistirenlerdir (Kaufman, 1980) (Şekil 4.1).



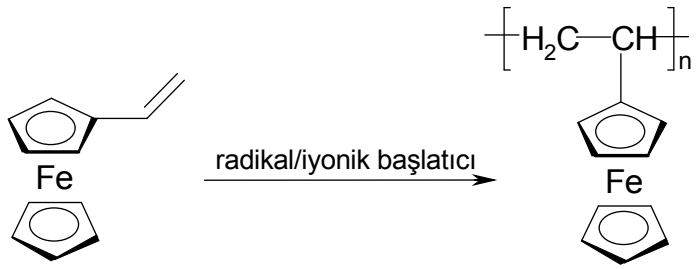
Şekil 4.1. a) poli(vinil piridin) metal kompleksleri, b) poli(vinil karbazol), c)poli(vinil ferrosen), d) tetratiafulvalen sübstitüye polistiren

4.1. Poli(vinil ferrosen)

Ferrosen grubu içeren birçok molekül elektriksel, manyetik, redoks ya da elektron değişim özelliklerine bağlı olarak son yıllarda çalışılmaktadır (Baldwin, 1967). 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, 1969).

Poli(vinil ferrosen), vinil ferrosenin serbest radikal polimerleşmesi ile oluşturulan bir polimerdir. Serbest radikal polimerizasyonu zincir polimerleşmesinin radikaller üzerinden yürüyen türüdür ve üç aşamadan oluşur. Başlangıçta monomer molekülleri çeşitli yöntemler kullanılarak radikal haline dönüştürülür. Radikal oluşumu, ısı, fotokimyasal, radyasyon veya çeşitli başlatıcılar tarafından sağlanır. Bu amaçla ortamda radikal oluşturmak için en yaygın yöntem ortama dışarıdan bir başlatıcı eklemektir. Başlatıcı olarak çeşitli peroksitler, diazo bileşikleri ve redoks çiftleri kullanılır. Bu başlatıcı ısı ile kolaylıkla parçalanarak serbest radikal oluşturarak monomerlerin bu radikallerle etkileşmesini sağlar. Serbest radikaller, vinil ferrosen monomerlerindeki karbon-karbon çift bağında bulunan π elektronlarına, birbirlerinden koparılmaları kolay olduğu için, saldırabilirler. Karbon-karbon çift bağından koparılan elektronla birleşen serbest radikal bu karbon molekülüne bağlanır ve vinil ferrosen monomerindeki karbon-karbon bağından arta kalan diğer tek elektron yeni bir serbest radikal oluşturur. Oluşan yeni radikaller ortamda bulunan monomerler ile reaksiyona girerek polimer zincirinin büyümesine neden olurlar. Polimerizasyon ilerledikçe polimer zinciri büyür ve molekül ağırlığı artar. Polimerizasyonun bu aşamasında artık ortamda monomer sayısı azalmıştır. Bu nedenle ortamdaki radikaller sönümlenmeye başlar. Ortamdaki radikaller çeşitli yollar ile (dallanma yeni çift bağ oluşturma veya bir başka radikal ile reaksiyona girerek) sönümlenir ve polimerizasyon işlemi tamamlanır.

Poli(vinil ferrosen), ferrosenin keşfedilmesinin ardından ilk kez 1955 yılında sentezlenmiştir. Poli(vinil ferrosen), vinil ferrosenin serbest radikal polimerleşmesi ile oluşturulan vinilferrosenden sentezlenen ilk polimerdir. Vinil ferrosenin polimerizasyonu, AIBN (azobisizobutironitril) radikal başlatıcısı ile gerçekleştirilir (Şekil 4.2). Bu yöntemle sentezlenen polimerlerin molekül kütlesi 10000'den küçüktür. Poli(vinil ferrosen)'in ilk detaylı karakterizasyonu Pittmann tarafından yapılmıştır.



Şekil 4.2. Vinilferrosenin polimerizasyonu

Poli(vinil ferrosen) (PVF) indirgenen ve yükseltgenen lokalize kısımlar içeren, ferrosen moleküllerinin oluşturduğu organometalic redoks bir polimerdir. Yük polimer zincir boyunca dağılmamış, pendant redoks bölgelerde (Fc/Fc^{+}) lokalize olmuştur. Ferrosenin başlangıçtaki yapısına ve temel redoks birimlerinin kendi aralarında pozisyonlarına bağlı olarak PVF'de meydana gelen konfigurasyonel değişimler poli(vinil ferrosen) molekülündeki yük transfer prosesini, karşıt iyonların ve nötral türlerin hareketlerini ve redoks potansiyellerini etkilemektedir (Schlindwein, 2002).

Poli(vinil ferrosen) polimer modifiye elektrot/elektrolit arayüz davranışının modellenmesi için temel iletken polimer sistemi olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. Tersinir bir elektron aktarımı, kararlılık, kısa sürede birçok ölçüme izin vermesi, farklı metodların kullanımı ile ince polimer filmin biriktirilmesi gibi basit elektrokimyasal özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir.

Pt elektrot üzerine anodik elektrolizle biriktirilmiş PVF filmlerinin kararlı ve tersinir redoks davranışları gösterdiği Bard grubu tarafından belirlenmiştir. Ferrosen ve ferrosenyum içeren kısmen yükseltgenmiş polimer filmleri sabit ve tekrarlanabilir gerilim göstermişlerdir (Peerce, 1980). Pt elektrot üzerine adsorpsiyonla elektroaktif PVF filmi tutturulması, elektrodu polimer çözeltisinde kısa bir süre beklettikten sonra çözücünün buharlaştırılmasıyla da yapılabilir. Metilen klorür çözücü olarak kullanıldığında ve UV ışınları altında yapıldığında PVF'nin fotolitik yükseltgenmesi söz konusu olduğundan bekletme işlemi kısa bir sürede tamamlanır (Rolison, 1981). Daldırma kurutma yöntemi ile kaplanmış PVF film elektrotların dönüşümlü voltametrik ve kronoamperometrik davranışlarına destek elektrolitin türünün ve derişiminin etkisi incelenmiştir. Kullanılan destek elektrolitin türü ve derişimi ile pik gerilim ve akımlarının değiştiği gözlenmistir. 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 (Inzelt, 1986).

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). PVF'nin yükseltgenmiş şekli olan poli(vinil ferrosenyum) (PVF^+) elektrot yüzeyinde immobilize edilebilir. Destek elektrolit tuzundan gelen ClO_4^- anyonları karşıt iyon olarak aşağıdaki tepkimeye göre polimer yapısına girmektedir:

$$PVF^+ + ClO_4^- \rightarrow PVF^+ClO_4^- + e^- \qquad (3.1)$$

Polimerlerin, ilaç ya da sağlık alanında kullanım başarısı dokularla biyolojik uyumu, kararlılık ve dayanıklılık gibi fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Amino asitler, peptitler ve DNA gibi biyomoleküllerin incelenmesinde polimer olarak PVF'nin tercih edilmesinin sebebi ise basit bir yapıya sahip olmasından dolayı ideal bir model sistem olarak davranmasındandır.

PVF, polimer modifiye elektrotları hazırlanarak birçok çalışmada kullanılmasının yanı sıra elektrokalizör ve sensör gibi alanlarada uygulanmaktadır (Murray 1984, Hillman, 1987). PVF temelli amperometrik sensörler; glukoz (Gülce, 1995-a, Patel, 2003, Gülce, 2005), kolin (Gülce, 2003), asetilkolin(Şen, 2004), laktoz (Gülce, 2002-a), organik peroksit (Gündoğan, 2002), laktat (Aydın, 2002), galaktoz (Gülce, 2002-b), üre (Kuralay, 2005), alkol (Gülce, 2002-c) tayini için kullanılmıştır. PVF modifiye elektrotlar ayrıca sitokrom c ve askorbat yük aktarımında aracılık ettiği bildirilmiştir (Chao, 1983, Dautartas, 1980).

5. LİSİN BİYOSENSÖRLERİ

Kelly ve çalışma grubu; besinlerdeki L-lisin tayini için seçiciliği yüksek, cevap süresi kısa, kullanışlı bir amperometrik biyosensör tanımlamışlardır. 1,2 diaminobenzen polimeri ile kaplı rutenyum/rodyum biriktirilmiş camsı karbon elektrot 100 mV potansiyel uygulandığında asetaminofen ve askorbik asit gibi elektrokimyasal girişim yapan türlerin girişim yapmadığını gözlemişlerdir. Bu hazırlanan elektrotda Tricoderma viride'den alınan L-lisin α-oksidazın immobilizasyonu ile uygun pH da L-ornitin, L-arjinin ve L-fenilalanin gibi klasik substratların girişimleri, L-lisinin cevabı %100 kabul edilirse sırasıyla %3,4; 1,1 ve 0,7'ye düşürülmüştür. Bu sensörün yapımının ucuz, tekrarlanabilirliğinin mükemmel ve kararlılığının ise çok iyi olduğu bulunmuştur. Bu elektrotlarla, besinlerin L-lisin (protein) içeriğini kolaylıkla tayin etmişlerdir (Kelly, 2000).

Karalemas ve çalışma grubu tarafından, Si-altın levha elektrodu kullanılarak lisin biyosensörü yapılmıştır. Poli(ortofenilendiamin) membranı elektropolimerizasyonla oluşturulmuş ve lisin oksidaz enzimi ile glutaraldehit altın/poli(o-PD) elektrotda immobilize edilmiştir. Altın/poli(o-PD) elektrodun H_2O_2 ve lisine karşı davranışı, elektropolimerizasyonun tekrarlanabilirliği ve polimerin kararlılığı çalışılmıştır. Çalışmalar sonunda elektropolimerizasyonun tekrarlanabilir ve polimerin 40 gün kararlılığını koruduğunu bulmuşlardır. Biyosensörün doğrusal çalışma aralığı 0,01-$1x10^{-5}$ M lisin olarak bulunmuştur. Diğer amino asitlerin girişim etkisi ve amperometrik seçicilik katsayıları hesaplanmıştır. Biyosensörün tirozin ve sistein için amperometrik seçicilik katsayısının daha büyük; fenilalanin, arjinin, histidin ve ornitin için ise daha küçük olduğu bulunmuştur. Elektropolimerizasyon şartları değiştirilerek girişim yapan maddelerin etkileri azaltılmıştır (Karalemas, 2000).

Saurina ve çalışma grubu tarafından lisin tayini için iletken kompozit temelli amperometrik biyosensörler geliştirilmiştir. Kimyasal olarak immobilize edilmiş lisin oksidaz membranları, grafit-metakrilat ya da peroksidaz modifiye grafit metakrilat elektrotlara takılmıştır. Lisinin enzimatik yıkımı ile amperometrik tayinin temelini oluşturan hidrojen peroksit açığa çıkar. Lisin biyosensörü için doğrusal çalışma aralığı $1,6x10^{-4}$ M, duyarlığı 11300 μA/M, tekrarlanabilirliği %1,8, tayin limiti $8,2x10^{-7}$ M ve cevap süresi 42 saniye olarak bulunmuştur. Önerilen biyosensör farmostatik numunelerdeki lisin tayininde kullanılmıştır. Standart metotlarla elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu gözlenmiştir (Saurina, 1999-a). Saurina ve çalışma grubu tarafından

yapılan diğer bir çalışmada ise lisinin potansiyometrik tayini için enzimatik lisin elektrodu geliştirilmiştir. Katı amonyum elektroda lisin oksidaz membranı immobilizasyonla takılarak lisin biyosensörü hazırlanmıştır. Bu sistemde lisinin enzimatik parçalanması ile amonyak üretildiğinden bu ürün amonyum elektrodu ile tayin edilmiştir. İmmobilizasyon şartlarının, potansiyometrik cevaba ve elektrodun kararlılık süresine etkisi araştırılmıştır (Saurina, 1998). Saurina ve çalışma grubu yaptıkları farklı bir çalışmada ise farmostatik numunelerde lisin tayinini potansiyometrik metotla yapmışlardır. Katı amonyum elektroda lisin oksidaz membranı immobilizasyonla takılarak hazırlanan lisin biyosensörünü kullanmışlardır. Numunelerdeki lisin tayini için standart ekleme metodunu kullanmışlardır (Saurina, 1999-b).

Curulli ve çalışma grubu, besin kalitesinin hızlı bir şekilde değerlendirilmesinde kullanılmak üzere lisin tayini için elektrokimyasal biyosensör geliştirmişlerdir. Platin elektrotları dönüşümlü voltametri tekniği kullanarak 1,2-diaminobenzenle elektropolimerizasyonla kaplamışlardır. Kaplanmamış Pt elektrot ile karşılaştırıldığında girişim yapan türlerin yükseltgenmesinde; askorbik asitte %100, asetaminofen ve sistein de %99 düşüş gözlemişlerdir. Polimer tabakası üzerine pasif adsorpsiyonla L-lisin-α-oksidaz enzimini immobilize etmişlerdir (Curulli, 1998). Curulli ve çalışma grubu, polimeri desteklemesi için gözenekli polikarbonat membranları Pt levhaya yerleştirmişler sonra kronokulometri yöntemi ile 1,2 diaminobenzen (1,2-DAB) iletken polimer nanotübüllerini hazırlamak için elektropolimerizasyon yapmışlardır. Elde edilen iletken polimer nanoyapılar Pt elektroda yerleştirildikten sonra yüksek dağılımlı Prusya mavisini (PB) desteklemede kullanılmışlardır. Hazırlanan bu polimer yapı H_2O_2 tayini için aktif bileşen olarak davranmıştır. H_2O_2'in katalizörü olarak PB'nin gözlenen kararlılığı kompozit nanoyapı filmdeki organik iletken polimerlerin varlığından kaynaklandığını bulmuşlardır. Bu nanoyapıdaki polimer/PB kompozit filmlerinin karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Raman spektroskopisi ile de yapılmıştır. Glukoz oksidaz (GOD), laktat oksidaz (LOD), L-aminoasit oksidaz (L-AAOD), alkol oksidaz (AOD), gliserin-3-fosfat oksidaz (GPD), lisin oksidaz (LyOx) ve kolin oksidaz (ChOx) 1,2 diaminobenzene (1,2-DAB) nanotübüller destekli PB tabakasına immobilize edilerek Pt elektrot üzerine kaplanmıştır. Enzim immobilizasyonu için farklı yöntemler kullanmışlardır. Tekrarlanabilirlik, girişim, cevap süresi, depolama ve kullanım kararlılığı gibi analitik parametreleri çalışmışlar ve optimize etmişlerdir (Curulli, 2004).

Sarkar ve çalışma grubu, protein tayini için yeni bir enzim biyosensörü tanımlamışlardır. Amino asit oksidazı, glutaraldehit ve polietilenimin ile birlikte karbondan yapılan elektrot üzerine yerleştirmişlerdir. Membran üzerine biriktirilen protein numunesi, proteaz varlığında amino asite hidroliz olmuştur ve bu dönüşüm sırasında hidrojen peroksit açığa çıkmıştır. Hidrojen peroksitin yükseltgenmesi Ag/AgCl referans elektroda karşı 400 mV'da gözlenmiştir. Düşük protein seviyesinde tayine imkan verdiğinden çok etkili bir metottur. Sensörün kararlılığının ise altı haftadan daha fazla olduğunu bulmuşlardır (Sarkar, 2000).

Dominguez ve çalışma grubunun yaptıkları çalışmada, L- ya da D- amino asitlerin seçimli tayini için çift enzim amperometrik kompozit biyosensörlerin yapıldığını bildirilmiştir. D- ya da L- amino asit oksidaz, horseradish peroksidaz enzimi ve ferrosenin aracı olarak kullanılması ile grafite eklenerek ve %70'inin ise teflon matrikse koimmobilize edilmesi ile hazırlanmıştır. Amino asit oksidaz kaplama ve pH gibi çalışma şartları optimize edilmiştir (Dominguez, 2001).

6. MATERYAL VE METOT

6.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada, potansiyostat olarak CHI 660 A Electrochemical Analyzer kullanılmıştır. Sıcaklık denetleyici sirkülatör Selecta 1000'dir. pH ölçümlerinde, pH/iyon analiz cihazı (CyberScan 510) kullanılmıştır. Manyetik karıştırıcı Snijiders 34532 markadır. Oksijen (%99,99 saflıkta) Habaş, Bursan A.Ş.'den temin edilmiştir. SEM görüntüleri, Phillips XL-30S FEG taramalı elektron mikroskobu kullanılarak alınmıştır.

6.2. Kullanılan Elektrotlar

Elektrokimyasal deneylerde çalışma elektrotu olarak 2 mm çapında Pt disk elektrot (0,0314 cm^2), referans elektrot olarak Ag/AgCl ve karşıt elektrot olarak Pt spiral tel elektrot kullanılmıştır. Pt disk elektrot her elektrokimyasal çalışmadan önce sırasıyla ile 1µm, 0,3 µm, 0,05µm tanecik boyutuna sahip alümina tozu ile parlatılmış daha sonra ultrasonik banyoda 10 dk sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu elektrot daha sonra sırasıyla destile su ve çalışılacak çözücü ile yıkanıp kurutulduktan sonra kullanılmıştır.

6.3. Elektroliz Hücresi

Elektrokimyasal çalışmalar, beş girişi bulunan, ceketli bir cam hücrede yapıldı (Şekil 6.1). Beş girişin üç tanesine; Pt çalışma elektrot, Pt karşıt elektrot ve referans elektrot yerleştirildi. Diğer iki girişten birine gaz giriş borusu, diğerine ise gaz çıkış musluğu takıldı.



Şekil 6.1. Elektrokimyasal çalışmaların yapıldığı hücre

6.4. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Lisin oksidaz ve lisin çözeltilerinin hazırlanmasında ve deneysel çalışmalarda ölçüm ortamında kullanılan fosfat tampon çözeltisi NaH_2PO_4 (Merck) ve ultra saf su ile hazırlanmıştır. Tampon çözeltinin pH'ının ayarlanmasında H_3PO_4 (Merck) ve NaOH (Merck) kullanılmıştır.

Deneysel çalışmalarda kullanılan enzim çözeltisi, lisin oksidaz (E.C. 1.4.3.14) (Sigma) enziminin pH'ı 7,4 olan 0,01 M fosfat tampon çözeltisinde çözülerek hazırlanmıştır. Enzim çözeltisi hergün yeniden hazırlanmış ve gün içinde + 4 ^oC'de saklanmıştır.

Substrat çözeltileri, belirli miktarlarda tartılan Lisin'in (Sigma) pH'ı 7,4 olan 0,1 M fosfat tamponunda çözülmesiyle hazırlanmıştır.

Altın biriktirilerek hazırlanan biyosensörlerde kullanılan potasyumtetrakloroaurat çözeltisi, $KAuCl_4$ (Aldrich) katısının 0,01 M KCl (Merck) çözeltisinde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

Platin biriktirilerek hazırlanan biyosensörlerde kullanılan platin bromür stok çözeltisi, 50 mg $PtBr_2$ (Aldrich) katısının 15 mL ultra saf su ve 15 mL % 47'lik HBr kullanılarak çözülmesi ile hazırlanmıştır.

Sabit potansiyelde elektrokimyasal olarak platin biriktirmek için $H_2PtCl_6.6H_2O$ (Alfa Easer) katısından belirli miktarda tartılıp 0,1 M HCl çözeltisinde çözülerek hekzakloroplatinik asit çözeltisi hazırlanmıştır.

Daldırma kurutma yöntemi kullanılarak elektrotların polimerle kaplanmasında kullanılan poli(vinil ferrosen) çözeltisi, poli(vinil ferrosen)'in metilen klorürde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

Sabit potansiyelde elektrokimyasal çöktürme yoluyla elektrot yüzeyine kaplanmasında kullanılan poli(vinilferrosen) çözeltisi, poli(vinilferrosen)'in 0,1 M tetrabutilamonyum perklorat (TBAP) içeren metilen klorürde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

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

Tetrabutilamonyum perklorat (TBAP), perklorik asitin (Merck) tetra-n-butilamonyum hidroksit (BDH) ile tepkimesi sonucu elde edilmiştir. Destek elektrolit tuzu 1:9 oranında su-etil alkol karışımında kristallendirilerek yüksek vakum altında 120 ^{o}C' de 12 saat kurutulup azot atmosferinde saklanmıştır.

Girişim çalışmalarında kullanılan arginin (Alfa Easer), histidin (Alfa Easer), ornitin (Alfa Easer), fenilalanin (Alfa Easer), tirosin (Alfa Easer) ve sistin (Alfa Easer) amino asit çözeltileri, ürik asit (Alfa Easer) ve askorbik asit (Alfa Easer) pH'ı 7,4 olan 0.1 M fosfat tampon çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Ürik asit ve askorbik asit girişimlerinin giderilmesinde %5'lik nafyon (Aldrich) çözeltisi kullanılmıştır.

Gerçek numunelerin analizinde kullanılan Aminess ve Ketosteril tabletler toz haline getirilip 25 mL'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. NephrAmine ise solüsyon halinde bulunduğu için direk olarak kullanılmıştır. Bu ilaç numunelerinin derişimleri üretici firma tarafından prospektüsünde belirtilen değerlere göre hesaplanmış ve NephrAmine 0,0438 M, Aminess 0,0178 M, Ketosteril 0,0204 M olduğu bulunmuştur.

6.5. 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' de 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'de kurutulmuştur (Smith, 1976).

6.6. Kullanılan Deneysel Yöntemler

6.6.1. Gerilim kontrollu kulometri

Gerilim kontrollü kulometride elektroliz sırasında harcanan toplam yük miktarı ile elektroliz edilen maddenin miktarı belirlenmektedir. Bir kulometrik yöntemi kullanabilmek için elektrotda gerçekleşen reaksiyonunun stokiyometrisi bilinmeli, basit bir reaksiyon olmalı ya da farklı stokiyometriye sahip yan reaksiyonlar olmamalı ve reaksiyonun %100'e yakın akım verimiyle gerçekleşmesi gerekir.

Gerilim kontrollü olarak elektrot yüzeyindeki tek bir maddenin indirgenmesi ya da yükseltgenmesi gerçekleştirilir ve elektroliz maddenin tümü harcanıncaya kadar devam eder ve akım zaman eğrisi elde edilir. N mol maddenin yükseltgenmesi ya da indirgenmesi sırasında harcanan toplam elektrik yük miktarı Q (culomb) Faraday kanunu ile belirtilmiştir:

$$Q\infty = \int_0^\infty idt = nFN \qquad (6.1)$$

Bu eşitlikte i akım(amper), t elektroliz süresi, n aktarılan elektron mol sayısı, F Faraday sabitidir (Bard, 2001).

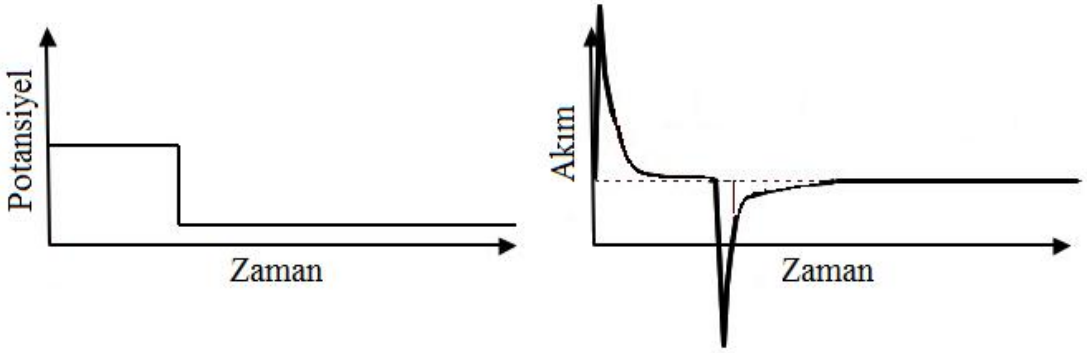
6.6.2. Kronoamperometri

Kronoamperometri yöntemi çalışma elektrodu ile referans elektrot arasına sabit bir potansiyel uygulayarak bu potansiyele bağlı olarak oluşan yükseltgenme veya indirgenme şeklindeki elektrot reaksiyonu sonucu gözlemlenen akım değerinin yorumlanmasıdır.

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. Amperometrinin esası oluşan bu akımın ölçülmesine dayanır (Thevenot, 1999).

Durgun çözeltide çalışma elektrodu ile karşılaştırma elektrodu arasına incelenen sistemin voltamogramında plato bölgesinde sabit gerilim değeri uygulanırsa basit elektrot tepkimesi için zamanın karekökü ile azalan bir akım oluşur. Uygulanan sabit bir

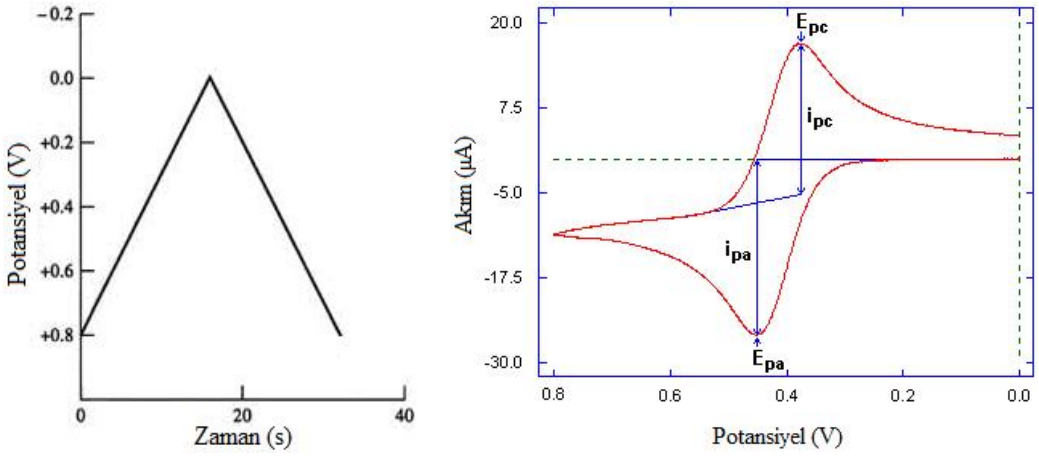
gerilimde akımın zamanla değişiminin ölçüldüğü bu yöntem kronoamperometri adını alır. Kronoamperometri deneylerinde çalışma elektroduna uygulanan etki, sabit bir gerilim basamağı uyarmasıdır (Şekil 6.2.a). Başlangıçta çalışma elektrodunun gerilimi pozitiftir, t=0 anında çalışma elektrodunun gerilimi elektrot yüzeyinde tepkiyen derişimini bir anda sıfıra götürecek ölçüde negatif olan bir gerilim değerine atlatılmaktadır. Sistemin bu uyarıya cevabı zamana bağlı olarak değişen bir akımdır (Şekil 6.2.b).



Şekil 6.2.a) Kronoamperometrik uyarı b) Kronoamperometrik cevap

6.6.3. Dönüşümlü voltametri

Bu yöntem, karşılaştırma elektroduna göre çalışma elektrodunun geriliminin belirli bir gerilim programına uyacak şekilde değiştirilmesiyle uygulanır. Gerilim taraması ileri yönde belli bir gerilim değerine ulaştıktan sonra yine doğrusal olarak azalacak biçimde ters çevrilir. İleri ve geri yöndeki gerilim tarama hızları aynı tutulabildiği gibi, istendiğinde farklı tarama hızlarıda kullanılabilir. İleri yöndeki gerilim taraması sırasında çalışma ve karşıt elekrotlar arasında geçen akım kaydedilirse pik şeklinde bir akım-gerilim eğrisi elde edilir. Bu pik çözeltideki elektroaktif maddenin yükseltgenmesine (ya da indirgenmesine) aittir. Gerilim tarama yönü ters çevrildiğinde yükseltgenmiş elektroaktif türün yeniden indirgenmesine (ya da yükseltgenmesine) karşı gelen bir geri pik gözlenir. Gerilim programı ard arda uygulandığında ise birçok döngülü dönüşümlü voltamogram elde edilir. Şekil 6.3'de dönüşümlü voltametride elektroda uygulanan gerilim programı ile elde edilen tipik bir dönüşümlü voltamogram görülmektedir. Bir dönüşümlü voltamogramın en önemli parametreleri katodik pik potansiyeli E_{pc}, anodik pik potansiyeli E_{pa}, katodik pik akımı i_{pc} ve anodik pik akımı i_{pa}'dır (Skoog, 1998).



a **b**

Şekil 6.3. a) Dönüşümlü voltametri de elektroda uygulanan gerilim programı,
b) Elde edilen akım-gerilim eğrisi

Gerilim taraması sırasında çalışma elektrodunda gerçekleşen elektrot tepkimesinin ürünü gerilim tarama yönü ters çevrildiğinde tekrar elektrot tepkimesine girebilir. İleri yöndeki gerilim taraması sırasında oluşan elektrot tepkimesi tersinir ise, geri yöndeki gerilim taraması sırasında gözlenen pik akımı ileri yöndeki gerilim taraması sırasında gözlenen pik akımına eşit olur (Heinze,1984).

6.6.4. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi

İmpedans spektroskopisi, elektrokimyasal sistemleri ve yöntemleri araştırmak için etkili bir tekniktir. Elektrokimyasal tekniklerden farklı olarak, hem hacim araştırmalarında hem de dakikalardan mikrosaniyelere uzanan zaman sabitleriyle bağlantılı arayüzey işlemlerinde kullanılabilmektedir.

Elektrokimyasal impedans, genellikle alternatif akım potansiyeli uygulanan devrelerde elektrokimyasal hücredeki akımın ölçümüdür. Alternatif akım yanıtı, uyarılmayı ve frekansı da içermektedir. İmpedans temelde yüksek frekanslar uygulandığında kapasitans ve indüktif değişikliklerden etkilenen direncin ölçümüne dayanmaktadır.

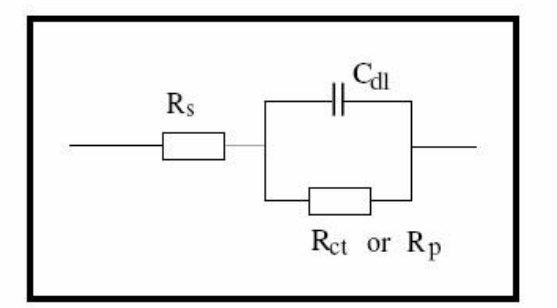
Elektriksel direnç, bir devre elemanının elektriksel akıma karşı gösterdiği dirençtir. İmpedans ile direnç arasındaki benzerlik; impedansta direnç gibi elektriksel akıma karşı bir devrenin direnç göstermesi ile ölçülen bir değerdir. Dirençten farkı ise, ideal direncin sahip olduğu basit özellikler ile sınırlandırılamamasıdır.

Elektrokimyasal impedans ve kapasitans biyosensörler, DNA hibridizasyonu ve antijen-antikor bağlanması gibi çalışmalarda da ölçümde yüksek hassasiyete sahip olmaları nedeniyle son yıllarda bilim dünyasında tercih edilmektedirler. Ölçümlerde, bağlanma gerçekleştiğinde impedans yanıtındaki değişime göre tayinler gerçekleştirilir. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi modifiye elektrot arayüzündeki özelliklerin, iletken desteklerde meydana gelen kimyasal dönüşümlerin ve proseslerin anlaşılması için etkili bir metotdur (Dong, 2001, Bardea, 2000, Feng, 2000). Biyosensörlerde, metal kaplama çalışmalarında, biyolojik sistemlerde, iletken polimerlerin özelliklerinin incelenmesinde, ince organik film özelliklerinin tespitinde, korozyon çalışmalarında, bataryalarda, yarı iletken elektrotlarda ve yarı iletken polimerlerin özelliklerinin incelenmesinde elektrokimyasal impedans spektroskopisi kullanılmaktadır.

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) verilerinin doğru olup olmadığı, denk olabileceği düşünülen bir elektriksel devre ile özdeşleştirilmek suretiyle kontrol edilir. Model devrelerde yaygın olarak bulunan başlıca devre elemanları:

1. Dirençler (Örneğin; hücredeki çözelti direnci)
2. Kapasitörler
3. Indüktörlerdir.

EİS'nin en basit devresi, Randles devresidir (Şekil 6.4). Çözelti direnci, bir çift tabaka kapasitörü ve bir yük transfer veya polarizasyon kapasitörüne sahiptir.



Şekil 6.4 Randles devresinin şematik gösterimi.

Araştırma yaparken çoğu zaman, yapılan çalışmadaki mekanizmanın nasıl yürüdüğü kesin olarak bilinemez. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi, deney verileri, eşdeğer devre modeline uyuyorsa, mekanizmayı ve yüzey özelliklerini bulmamızda çok yararlı olan bir yöntemdir. EİS, katılarda olduğu gibi çözelti içindeki fiziksel ve kimyasal birçok işlemde de oldukça güçlü bir tekniktir. Elektrokimyasal ölçümlerde, birçok karmaşık işlem dizisinde bile (elektron transferi, kütle transferi, kimyasal reaksiyon mekanizması gibi) olumlu sonuçlar verir.

6.6.5. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)

Taramalı Elektron Mikroskobu, kimyanın birçok alanında, malzeme biliminde, jeoloji, biyolojik bilimlerde, tıp ve kriminal uygulamalar gibi birçok dalda araştırma-geliştirme çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Taramalı Elektron Mikroskobunda görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilir. Modern sistemlerde bu algılayıcılardan gelen sinyaller dijital sinyallere çevrilip bilgisayar monitörüne verilmektedir. Gerek ayırım gücü, gerek odak derinliği gerekse görüntü ve analizi birleştirebilme özelliği, taramalı elektron mikroskobunun kullanım alanını genişletmektedir (Goldstein, 1981).

6.7. Biyosensörlerin Hazırlanması

Platin disk çalışma elektrodu daldırma-kurutma yöntemi ile poli(vinil ferrosen) polimeri ile kaplanıp enzim immobilizasyonu ile PVF-LyOx, polimer film yüzeyde altın veya platin biriktirip LyOx immobilizasyonu ile PVF-Au-LyOx ve PVF-Pt-LyOx olarak tanımlanan biyosensörler geliştirilmiştir. Polimerin yükseltgenmiş formu olan poli(vinil ferrosenyum perklorat) ($PVF^{+}ClO_4^{-}$) elektrot yüzeyine kaplanıp LyOx enziminin immobilizasyonu ile $PVF^{+}ClO_4^{-}$-LyOx, polimer yüzeyde platin biriktirilmesi ile PVF+$LyOx^{-}$-Pt biyosensörleri hazırlanmıştır. Girişim etkilerinin giderilmesi için elektrotlar polimer film ile kaplanmadan önce nafyon ile modifiye edilerek Naf-PVF-LyOx ve Naf-PVF-Pt-LyOx olarak adlandırılan biyosensörler geliştirilmiştir.

6.7.1. PVF-LyOx biyosensörünün hazırlanması

Biyosensör hazırlanırken belirli derişimdeki poli(vinil ferrosen) (PVF) çözeltisine daldırılan Pt çalışma elektrodu herhangi bir potansiyel uygulanmadan belirli bir süre bekletilerek elektrodun polimer filmle kaplanması ve daha sonra lisin oksidaz (LyOx) çözeltisinde bekletilerek enzimin elektrot yüzeyinde tutuklanması sağlanmıştır.

6.7.2. PVF-Au-LyOx biyosensörünün hazırlanması

Belirli derişimdeki $KAuCl_4$ çözeltisine daldırılan PVF kaplı Pt çalışma elektrodu belirli bir süre bekletilerek elektrodun altın ile kaplanması ve daha sonra LyOx çözeltisinde bekletilmesi ile enzimin elektrot yüzeyinde tutuklanması sağlanmıştır.

6.7.3. PVF-Pt-LyOx biyosensörünün hazırlanması

PVF-Pt-LyOx biyosensörü, belirli derişimdeki $PtBr_2$ çözeltisine daldırılan PVF kaplı Pt çalışma elektrodunun belirli bir süre bekletilerek platin ile kaplanmasının ardından LyOx enziminin tutuklanması ile hazırlanmıştır.

6.7.4. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün hazırlanması

Sabit gerilimli elektroliz işlemi ile polimerin yükseltgenmiş formu olan $PVF^{+}ClO_4^{-}$'ın Pt elektrot yüzeyine elektroçöktürülmesi sağlanmıştır. Gerilim kontrollü elektrolizle elektrodun modifiye edilmesi 0,1 M TBAP içeren metilen klorürde, 1 mg/mL PVF çözeltisinin + 0,7 V'daki elektrolizi ile yapılmıştır. Bu yolla kaplanan elektrot yüzeyinde yeşil renkli bir film oluştuğu görülmüştür. Daha sonra LyOx çözeltisinde belirli bir süre bekletilmesi ile $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün hazırlanması tamamlanmıştır.

6.7.5. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün hazırlanması

Biyosensörün hazırlanmasında polimerin yükseltgenmiş formu olan $PVF^{+}ClO_4^{-}$ ile kaplanan Pt çalışma elektroda 2 mM H_2PtCl_6 çözeltisinde - 0,15 V'da sabit gerilimde elektroliz uygulanarak polimer yüzeyinde platin parçacıkları biriktirilmiştir. Daha sonra LyOx enzimi tutuklanarak $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü hazırlanmıştır**.**

6.7.6. Naf-PVF-LyOx ve Naf-PVF-Pt-LyOx biyosensörlerinin hazırlanması

Çalışma elektrodu polimer filmle kaplanmadan önce elektrot yüzeyine 3 μL %5'lik nafyon çözeltisi damlatılarak 8 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılarak yüzeyin nafyon filmle kaplanması sağlanmıştır. Daha sonra bu elektrot PVF

çözeltisinde herhangi bir potansiyel uygulanmadan bir süre bekletilip daldırma-kurutma yöntemiyle kaplandıktan sonra LyOx enziminin immobilizasyonu ile Naf-PVF-LyOx biyosensörü hazırlandı. Aynı şekilde yüzeyi nafyon filmle modifiye edilmiş PVF kaplı çalışma elektrodu, $PtBr_2$ çözeltisine daldırılarak platin parçacıklarının bu elektrotda biriktirilmesi sağlandıktan sonra LyOx enziminin tutuklanması ile Naf-PVF-Pt-Lyox olarak tanımlanan biyosensör hazırlanmıştır.

6.8. Biyosensörlerin Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışmalarda ceketli hücre kullanılarak reaksiyonun sabit sıcaklıkta gerçekleşmesi sağlanmıştır. Çalışma elektrodu olarak önceden hazırlanan enzim elektrot, karşıt elektrot olarak Pt spiral elektrot, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot kullanılmıştır. Hücrenin içine fosfat tampon çözeltisi konulduktan sonra hücre içinden oksijen gazı geçirilerek oksijenle doygun hale getirilmiştir. Reaksiyon süresince çözelti yüzeyinden oksijen geçirilerek çözeltinin oksijenle doygunluk derişimde kalması sağlanmıştır.

Hazırlanan biyosensörle amperometrik ölçüme başlanmadan önce kararlı hal akım değeri elde edilene kadar sabit çalışma potansiyelinde elektroliz yapılmıştır. Kararlı hal akım değerine ulaşıldıktan sonra ortama derişimi bilinen substrat (lisin) çözeltisinden belirli derişimlerde eklenerek bu derişime karşılık gelen kararlı hal akım değerleri ölçülmüştür.

Voltametrik ölçümlerde ise çalışma potansiyel aralığı belirlendikten sonra elektrodu kararlı hale ulaştırmak için substrat içermeyen çözeltide kararlı hal akım değerine ulaşıncaya kadar çok döngülü voltamogramlar alınmıştır. Kararlı hal akım değeri elde edildikten sonra ölçüm ortamına bilinen derişimlerdeki substrat (lisin) çözeltisinden belli hacimde eklenmiş ve her lisin eklemeden sonra voltamogramları çekilerek enzimatik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan hidrojen peroksite ait yükseltgenme akımları ölçülmüştür.

Biyosensörlerin aktivitesine etkili olabilecek hazırlama ve çalışma koşulları incelenmiştir. Biyosensörlerin tekrar kullanımından kaynaklanabilecek hataların önüne geçebilmek için deneysel parametrelerin her değiştirilişinde yeni elektrot hazırlanarak, biyosensörler için en uygun çalışma koşulları belirlenmiştir.

7. DENEYSEL BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada PVF modifiye elektrotları kullanılarak sulu çözeltilerde lisin tayini için yeni biyosensörler geliştirilmiştir. Biyosensörlerde L-lisin α-oksidaz enzimi kullanılmıştır.

$$\text{L-lisin} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{L-lisin α-oksidaz}} \alpha\text{-keto-}\varepsilon\text{-aminokaproat} + NH_3 + H_2O_2 \qquad (7.1)$$

Lisin, elektrot yüzeyinde tutuklanmış olan Lisin oksidaz enzimi varlığında yukarıdaki reaksiyona göre hidrojen peroksiti oluşturmaktadır (7.1). Lisin derişimi ile orantılı olarak üretilen H_2O_2'in yükseltgenme akımının ölçülmesi ile elektrot aktivitesi belirlenmektedir (7.2).

$$H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^- \qquad (7.2)$$

PVF modifiye elektrodunu temel alan biyosensörlerin hazırlanması iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bunlardan biri çalışma elektrodu yüzeyinde oluşturulan PVF filmine Lisin oksidaz (LyOx) enziminin tutuklanması ile hazırlanan PVF-LyOx biyosensörüdür. Bu biyosensörün hazırlanmasında, PVF'nin metilen klorürde çözülmesiyle hazırlanan PVF çözeltisi kullanılarak daldırma kurutma yöntemi ile elektrotlar polimer filmle kaplanmıştır. Pt çalışma elektrodu farklı derişimlerdeki polimer çözeltilerinde belirli bir süre bekletilip çıkarıldıktan sonra kurutularak yüzeyin farklı kalınlıklardaki polimer film ile kaplanması sağlanmıştır. Daha önce grubumuz tarafından yapılan çalışmalarda PVF polimer yapısında enzimlerin tutuklanabildiği belirlenmiştir (Gülce, 1995-a, Gülce, 1995-b, Gülce, 2002-a, Gülce, 2002-b, Gülce, 2002-c). PVF modifiye elektrot, çalışmada kullanacağımız Lisin oksidaz enzim çözeltisinde bekletilerek yüzeyde enzim tutuklanması sağlanmıştır. Bu biyosensörün aktivitesine biyosensörün 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.

PVF modifiye elektrodu kullanılarak geliştirilen ikinci biyosensör ise metal biriktirilmiş PVF modifiye elektroduna LyOx enziminin tutuklanmasıyla hazırlanan biyosensördür. Bu elektrodun hazırlanmasında PVF-LyOx biyosensörü için bulunan

optimum koşullar kullanılarak yüzeyde metal biriktirilmesinin etkisi araştırılmıştır. Polimer yüzeyinde metal biriktirmenin hazırlanan biyosensöre etkisini incelemek için yukarıda anlatıldığı şekilde PVF ile modifiye edilen elektrot yüzeyinde metal biriktirilmiştir. Bu amaçla PVF modifiye elektrot, $KAuCl_4$ ya da $PtBr_2$ çözeltilerinde bekletilerek kimyasal indirgeme yoluyla bu metallerin elektrot yüzeyinde biriktirilmesi yapılmıştır (7.3). Daha önceki yapılan çalışmalarda PVF kaplı elektrotlarda metalik altın biriktirilmesinin herhangi bir elektrolize gerek duyulmaksızın elektrodun AuX_4^- çözeltisine daldırılması ile gerçekleştiği gösterilmiştir (Kavanoz, 2004).

$$nPVF + M^{n+} \longrightarrow nPVF^{+} + M^{0} \qquad (7.3)$$

Altın ya da platin metalleri biriktirilmiş PVF modifiye elektrotlarda lisin oksidaz enzimi tutuklanarak lisin biyosensörü hazırlanmıştır. Bu biyosensörlerin aktivitesine, elektrodun hazırlanması sırasında kullanılan çözeltideki metal derişimi, metal çözeltisinde bekletme süresi gibi deneysel parametrelerin etkileri araştırılarak optimum koşullar belirlenmiştir.

Çalışmanın diğer aşamasında $PVF^+ClO_4^-$ modifiye elektrodunu temel alan lisin biyosensörleri geliştirilmiştir. Biyosensörlerin hazırlanması iki şekilde gerçekleştirilmiştir. İlkinde $PVF^+ClO_4^-$ kaplı modifiye elektrotda enzim tutuklanmıştır. Diğerinde ise $PVF^+ClO_4^-$ modifiye elektrodu üzerinde sabit potansiyelde metal biriktirilmiş daha sonra hazırlanan modifiye elektrotda enzim tutuklanmıştır.

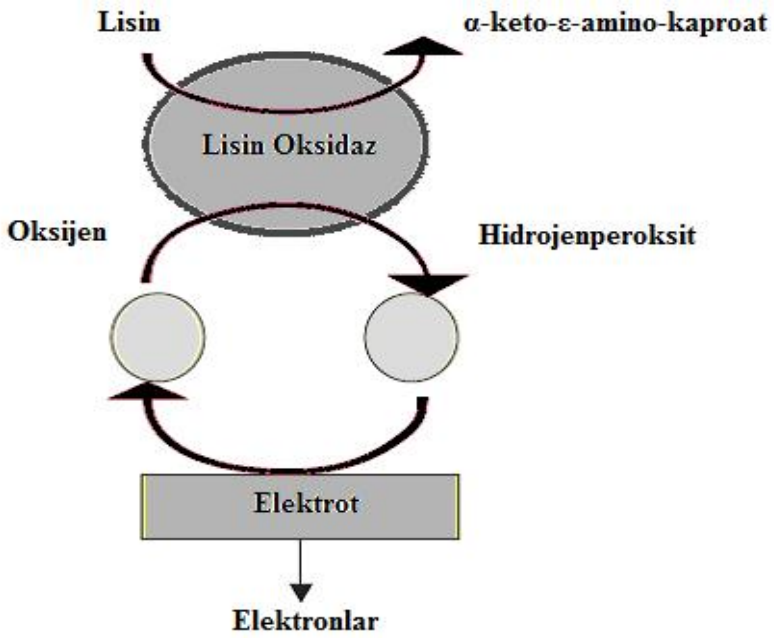
Çalışma elektrotlarının modifiye edilmesinde polimerin yükseltgenmiş formu olan $PVF^+ClO_4^-$ kullanılmıştır. $PVF^+ClO_4^-$ modifiye elektrodu 0,1 M tetrabutilamonyum perklorat içeren metilen klorür çözeltisindeki PVF'nin sabit gerilimli elektrolizi ile elde edilmiştir. Bu elektroliz işlemi sırasında çalışma elektrodu olarak kullanılan Pt elektrot yüzeyinde $PVF^+ClO_4^-$ elektrokimyasal olarak çöktürülerek, $PVF^+ClO_4^-$ modifiye elektrodu hazırlanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda bu modifiye elektrodun çözeltide bulunan anyonlara karşı oldukça duyarlı olduğu belirlenmiştir. $PVF^+ClO_4^-$ filminin karşıt iyonu çözeltide bulunan anyonlarla aşağıdaki reaksiyona göre yer değiştirebilmektedir (7.4) (Gülce, 1995-c).

$$PVF^+ ClO_4^- + A^- \rightarrow PVF^+ A^- + ClO_4^- \qquad (7.4)$$

Bu özelliğinden yararlanarak $PVF^{+}ClO_4^{-}$ modifiye elektroduna enzimler iyon değişimi yoluyla tutuklanmaktadır. Tutuklama işlemi sırasında enzim çözeltisinin pH'ı enzimlerin izoelektrik noktasından daha büyük tutularak enzimlerin negatif yüklü olması sağlanmakta ve böylelikle enzimler çalışma elektrodu yüzeyindeki polimer matrikste tutuklanmaktadır (7.5) (Gülce, 1995-b).

$$PVF^{+}\,ClO_4^{-} + E^{-} \rightarrow PVF^{+}\,E^{-} + ClO_4^{-} \qquad (7.5)$$

Bu çalışmada geliştirilen biyosensörlerde L-lisin α-oksidaz enzimi kullanılmıştır. Bu enzim, L-lisinin yükseltgenmesini α-keto-ε-amino-kaproat, amonyak ve hidrojen peroksit oluşturarak katalizlemektedir (Şekil 7.1).



Şekil 7.1. LyOx tarafından katalizlenen reaksiyon.

Lisin, elektrot yüzeyinde tutuklanmış olan Lisin oksidaz enzimi varlığında şekil 7.1'de verilen reaksiyona göre hidrojen peroksiti oluşturmaktadır. Oluşan hidrojen peroksitin yükseltgenme akımının ölçülmesiyle elektrot aktivitesi belirlenmiştir. Enzimatik reaksiyonlar sırasında açığa hidrojen peroksitin yükseltgenmesinde PVF polimerinin yapısında bulunan ferrosen merkezlerinin katalitik etki gösterdiği daha önce yapılan çalışmalarda (Gülce, 1995-a, Gülce, 1995-b, Gülce, 2002-a, Gündoğan, 2002, Gülce, 2003, Şen, 2003) bulunmuştur. Bu çalışmada da elektrotların modifiye edilmesinde PVF polimeri kullanılarak biyosensörlerin aktiviteleri incelenmiştir.

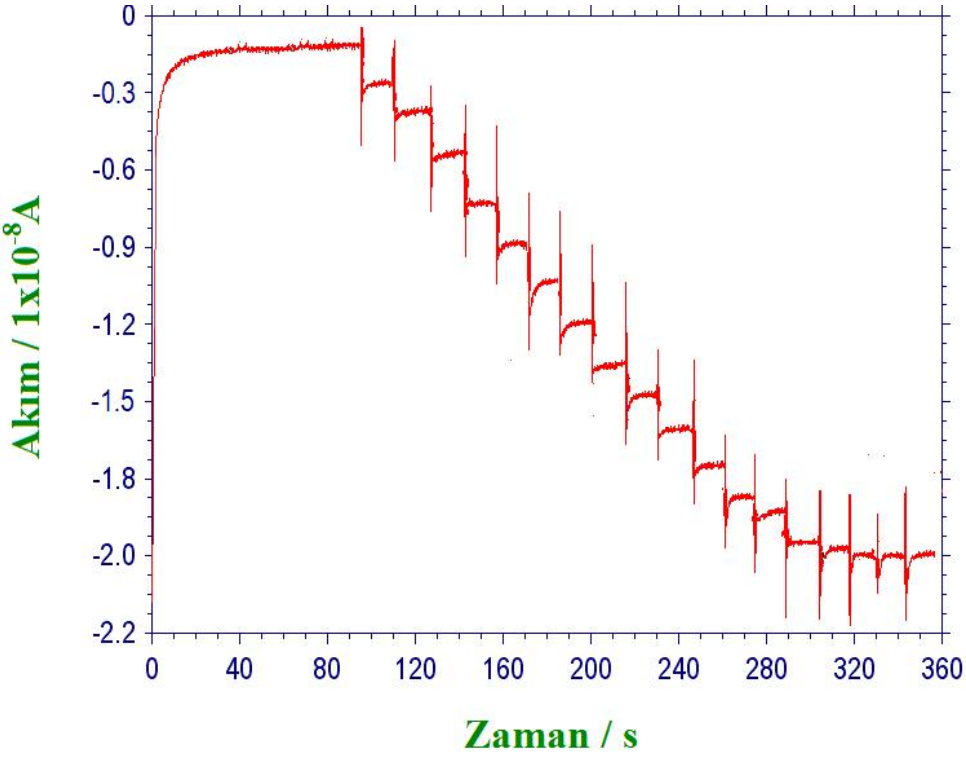
Hazırlanan biyosensörler için substrat derişimi ve sıcaklığın etkileri araştırılmıştır. Bu deneylerin sonuçlarından yararlanılarak tutuklanmış Lisin oksidaz için Lineweaver-Burk grafikleri çizilip görünür Michaelis-Menten sabiti, elektrot aktivitesinin sıcaklıkla artış gösterdiği aralıktaki veriler kullanılarak Arrhenius eşitliğine göre reaksiyonların aktivasyon enerjileri hesaplanmıştır.

Hazırlanan biyosensörler için doğrusal çalışma aralığı, depolama kararlılığı, tekrar kullanılabilirlik, gerçek numune analizi, girişim ve cevap süresi gibi performans kriterleri incelenmiştir.

7.1. PVF-LyOx Biyosensörünün Optimizasyonu

PVF-LyOx biyosensörünün aktivitesine etkili olabilecek biyosensör hazırlama ve çalışma parametreleri incelenerek biyosensörün maksimum aktivite gösterdiği koşullar belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle çalışma elektrodunun modifiye edilmesi sırasında kullanılan PVF derişimi, PVF'de bekletme süresi, enzimin tutuklanmasında kullanılan çözeltideki enzim derişimi, enzim çözeltisinde bekletme süresi gibi hazırlama koşulları incelenmiştir. Daha sonra ortam pH'ı, sıcaklık, substrat derişimi, girişim gibi biyosensörün aktivitesine etkili olabilecek çalışma ortamı koşulları incelenmiştir. Bu çalışmalar sabit bir çalışma potansiyelinde farklı lisin derişimleri için elde edilen kararlı hal akımlarının ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir.

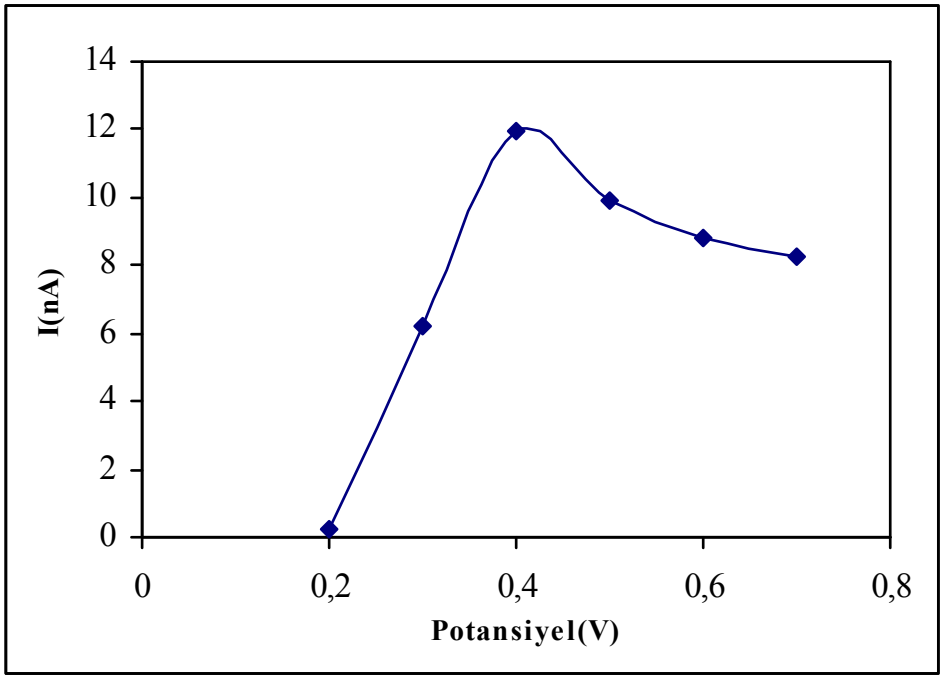
Elektrokimyasal hücreye lisin eklenerek zamana karşı akım değişimi izlenerek elde edilen cevap eğrileri (Şekil 7.2) verilmiştir. Cevap eğrilerinden görüldüğü gibi akımın sabitlenmesi için gereken süre yani biyosensörün cevap süresi 15-20 s arasındadır.



Şekil 7.2. PVF-LyOx biyosensörüne ait akım-zaman eğrisi (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

7.1.1.Uygulanan gerilimin etkisi

PVF-LyOx biyosensörünün hazırlanmasında cevap akımını etkileyen faktörlerden ilki uygulanan potansiyeldir. Bu çalışmada, 2,5 mg/mL PVF'de 5 dakika ve 1 mg LyOx/mL enzim çözeltisinde 20 dakika bekletme süresi sabit tutulmuştur. Biyosensöre uygulanan gerilimin elde edilen cevap akımına etkisini belirleyebilmek amacıyla çalışma gerilimi, 0,20-0,70 V aralığında değiştirilmiştir. Hazırlanan biyosensörünün aktivitesine, uygulanan gerilimin etkisini incelemek amacıyla 0,10 M pH 7,40 fosfat tamponu bulunan çalışma ortamına lisin ilave edilerek akım cevapları izlenmiştir. Lisin ilavesinden sonra elde edilen sonuçlar kullanılarak uygulanan gerilime karşı maksimum akım grafiğinin çizilmesi ile 0,4 V'a kadar cevap akımlarının arttığı daha yüksek potansiyellerde ise akımda bir miktar azalma ile birlikte akımın sabitlendiğini gözlenmiştir (Şekil 7.3). Uygulanan potansiyelin 0,2 V'dan 0,4 V'a değiştirilmesiyle birlikte hidrojen peroksitin yükseltgenmesi için gereken itici güç artığından cevap akımında da artış gözlenmektedir. Bundan sonraki yapılan çalışmalarda maksimum akımın gözlendiği 0,4 V sabit çalışma potansiyeli uygulanmıştır.

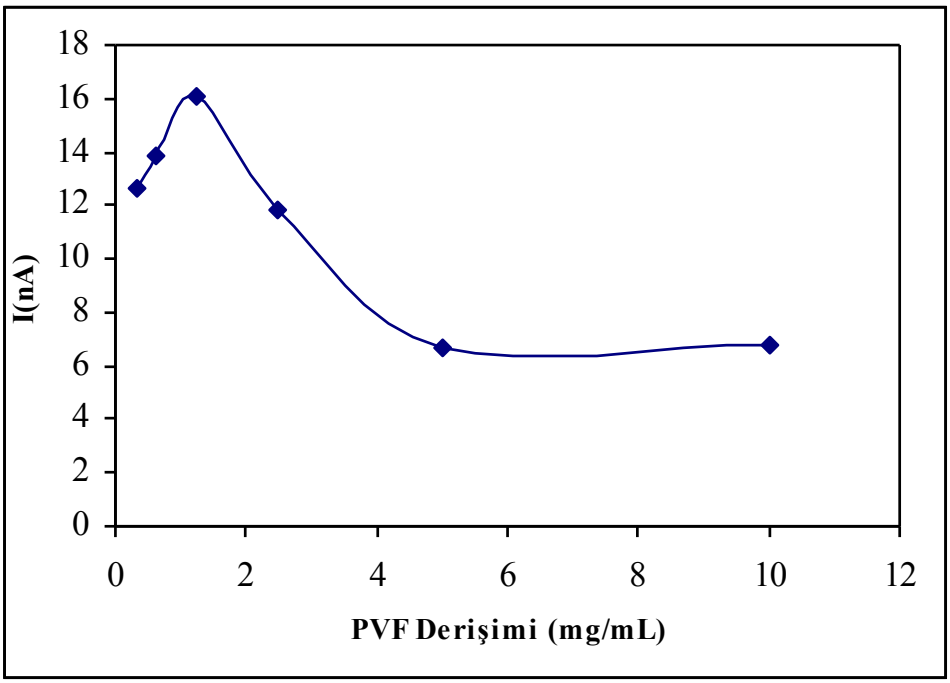


Şekil 7.3. PVF-LyOx biyosensörünün aktivitesinin uygulanan gerilim ile değişimi (2,5 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

7.1.2. PVF derişiminin etkisi

Elektrot yüzeyindeki PVF filminin kalınlığı elektrodun kaplanması için kullanılan PVF çözeltisinin derişimine bağlıdır. Farklı derişimlerde PVF çözeltileri kullanılarak PVF'de bekletme süresi 5 dakikada sabit tutularak hazırlanan elektrotlar daha sonra 1,00 mg LyOx /mL enzim çözeltisinde 20 dakika bekletilerek PVF-LyOx biyosensörleri hazırlanmıştır. PVF derişiminin etkisini belirleyebilmek için çalışma sırasında kullanılan PVF derişimi 0,3125 mg/mL ($3{,}9\times10^{-8}$ mol PVF/cm^2) ile 10 mg/mL ($4{,}7\times10^{-7}$ mol cm^{-2}) arasındaki değiştirilmiştir. Bu derişimlerde yüzeyde biriktirilen film kalınlığı ise $3{,}9\times10^{-8}$ mol PVF/cm^2 ile $4{,}7\times10^{-7}$ mol PVF/cm^2 aralığındadır. 0,1 M pH 7,40 fosfat tamponundan oluşan çalışma ortamına lisin ilavesinden sonra gözlenen maksimum akım değerleri PVF derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir. Cevap akımının 1,25 mg/mL PVF derişimine kadar arttığı ve daha yüksek derişimlerde ise azaldığı gözlenmiştir (Şekil 7.4). Polimer derişiminin artması ile yüzeyde biriken polimer film kalınlığının artması ve enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksitin platin elektrot yüzeyine difüzyonundaki kısıtlamadan dolayı cevap akımının azaldığı düşünülmektedir. Maksimum aktivitenin elde edildiği PVF derişimi 1,25 mg/mL ve

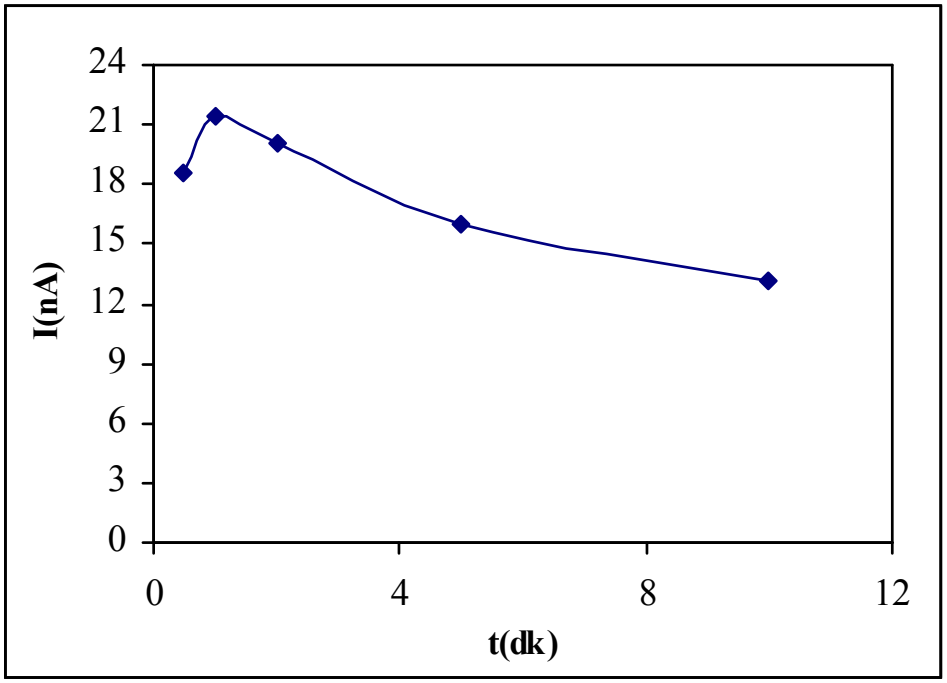
elektrot yüzeyindeki PVF film kalınlığı ise $1{,}8\times10^{-7}$ mol PVF/cm^2 olarak bulunduğundan bundan sonraki çalışmalarda bu derişim kullanılmıştır.



Şekil 7.4. PVF-LyOx biyosensör aktivitesinin PVF derişimi ile değişimi (1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

7.1.3. PVF'de bekletme süresinin etkisi

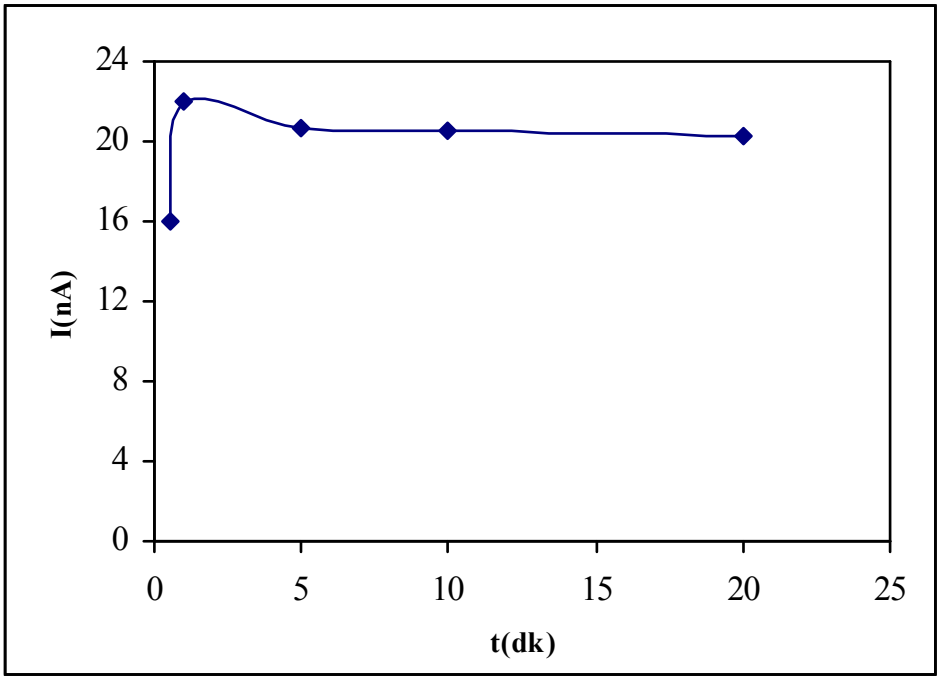
PVF-LyOx biyosensörünün cevap akımını etkileyen bir diğer parametrede elektrodun PVF çözeltisinde bekletme süresidir. PVF'de bekletme süresi 30 saniye ile 10 dakika arasında değiştirilerek elektrot aktivitesi incelenmiştir. Lisin ilavesinden sonra gözlenen maksimum akım değerleri PVF çözeltisinde bekletme süresine karşı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 7.5'de görüldüğü gibi PVF'de bekletme süresinin artmasıyla artan akım değeri 1 dakikadan sonra azalmıştır. Polimerde bekletme süresinin artmasıyla yüzeyde biriken polimer film kalınlığının bir miktar arttığı ve enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksitin platin elektrot yüzeyine difüzyonundaki kısıtlamadan dolayı cevap akımının azaldığı düşünülmektedir. Bundan sonraki yapılan çalışmalarda PVF'de bekletme süresi 1 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 7.5. PVF-LyOx biyosensörü için PVF çözeltisinde bekletme süresine karşı elde edilen maksimum akım değerleri (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

7.1.4. LyOx'da bekletme süresinin etkisi

Hazırlanan PVF-LyOx biyosensörünün aktivitesine enzim çözeltisinde bekletme süresinin etkisinin incelenmesi amacıyla enzimde bekletme süresi 30 saniye ile 20 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 lisin ilavesinden sonraki maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir. Enzimde bekletme süresinin artmasıyla gözlenen akım değeri artmakta ve belirli bir bekletme süresinden sonra akım değerinde bir miktar azalmayla birlikte akımın sabitlendiği şekil 7.6'da gözlenmektedir. Polimer matriks içerisinde biriken enzim miktarı bekletme süresiyle orantılıdır ve 1 dakikadan sonra polimer yapıdaki enzim miktarı doygunluğa ulaştığından cevap akımında çok fazla bir değişim olmamaktadır. Daha sonraki çalışmalarda enzim çözeltisinde 1 dakika bekletme süresi kullanılmıştır.

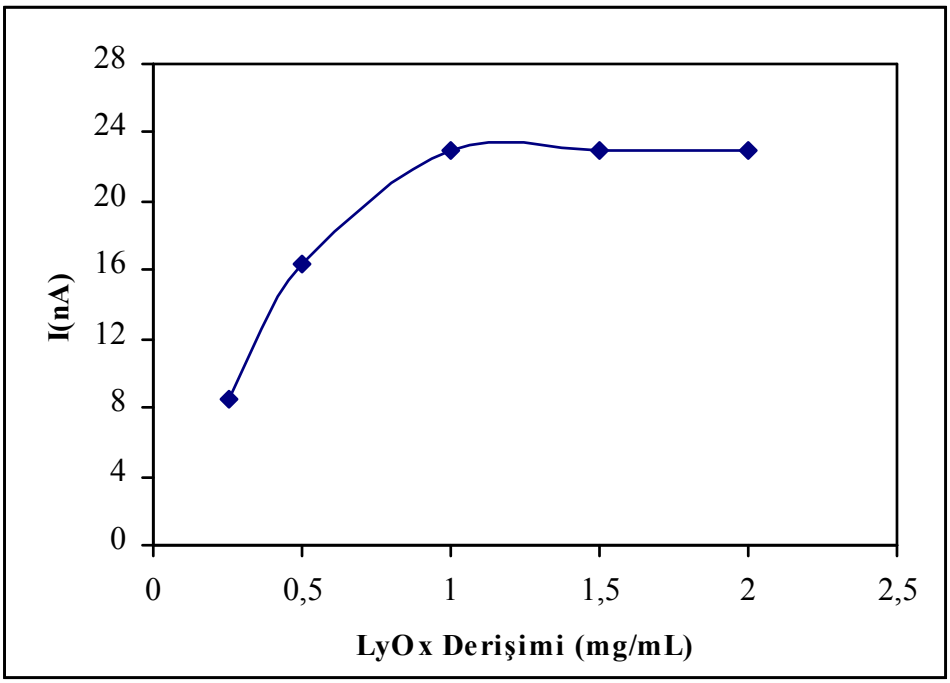


Şekil 7.6. PVF-LyOx biyosensörü için LyOx çözeltisinde bekletme süresine karşı elde edilen akım değerleri (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

7.1.5. LyOx derişimi etkisi

Polimerik yapı içerisinde tutuklanan LyOx miktarı biyosensörün hazırlanması sırasında kullanılan LyOx çözeltisinin derişimi ile orantılıdır. Hazırlanan biyosensörün aktivitesine enzim derişiminin etkisini incelemek amacıyla tutuklama işlemi sırasında kullanılan çözeltideki enzim miktarı 0,25 mg LyOx/mL ile 2 mg LyOx/mL arasında değiştirilmiştir. Enzimde bekletme süresi 1 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 lisin ilavesinden sonraki maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir. Şekil 7.7'de görüldüğü gibi tutuklama işlemi sırasında kullanılan enzim derişiminin artmasıyla gözlenen akım değerleri artmakta ve belli bir enzim derişiminden sonra ise akım değerleri önemli miktarda değişmemektedir. Düşük enzim derişiminde cevap akımı değerlerindeki azalmanın polimerik yapı içerisinde tutuklanan enzim miktarının daha az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Belli bir enzim derişiminden sonra ise polimer yapı içerisinde maksimum miktarda enzim tutuklandığı ve çözeltideki enzim miktarının artmasıyla polimer yapıda tutuklanan enzim miktarının değişmediği

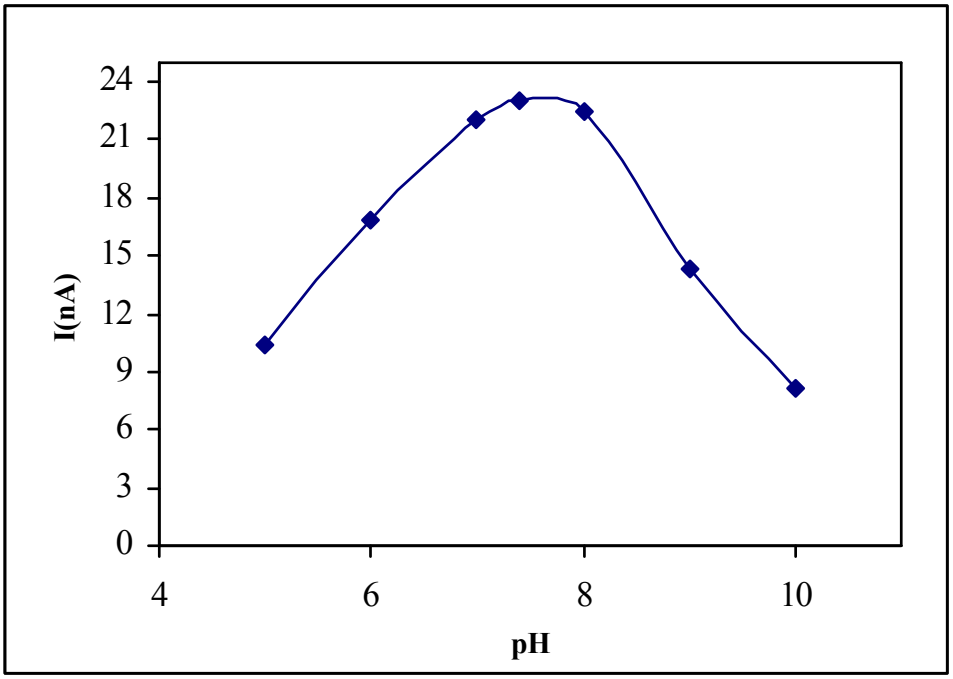
düşünülmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda 1,00 mg LyOx/mL enzim çözeltisi kullanılmıştır.



Şekil 7.7. PVF-LyOx biyosensörü için LyOx derişimine karşı elde edilen maksimum akım değerleri (1,25 mg PVF/mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

7.1.6. pH etkisi

Enzimlerin aktivitesi pH'a bağlı olarak değiştiğinden, biyosensörün aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri de çalışma ortamının pH'sıdır. Her enzim için aktivitelerin maksimum olduğu pH değerleri vardır. Bu değerlerin üzerinde ve altında enzim aktivitesi düşer. PVF-LyOx biyosensörünün aktivitesine ortam pH'sının etkisini araştırmak amacıyla pH 5,0 ile 10,0 arasında değişen 0,1 M fosfat tampon çözeltilerinde lisin ilavesinden sonra maksimum akım değerleri ölçülmüş ve pH değerine karşı cevap akımlarının grafiği çizilmiştir (Şekil 7.8). Bu grafikten de görüldüğü gibi pH 7,4'e kadar artan akım değeri daha yüksek pH'larda azalmaktadır. Biyosensörün maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 7,4 olarak belirlenmiştir.



Şekil 7.8. PVF-LyOx biyosensörü için kullanılan tampon çözelti pH'sına bağlı olarak elde edilen maksimum akım değerleri (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

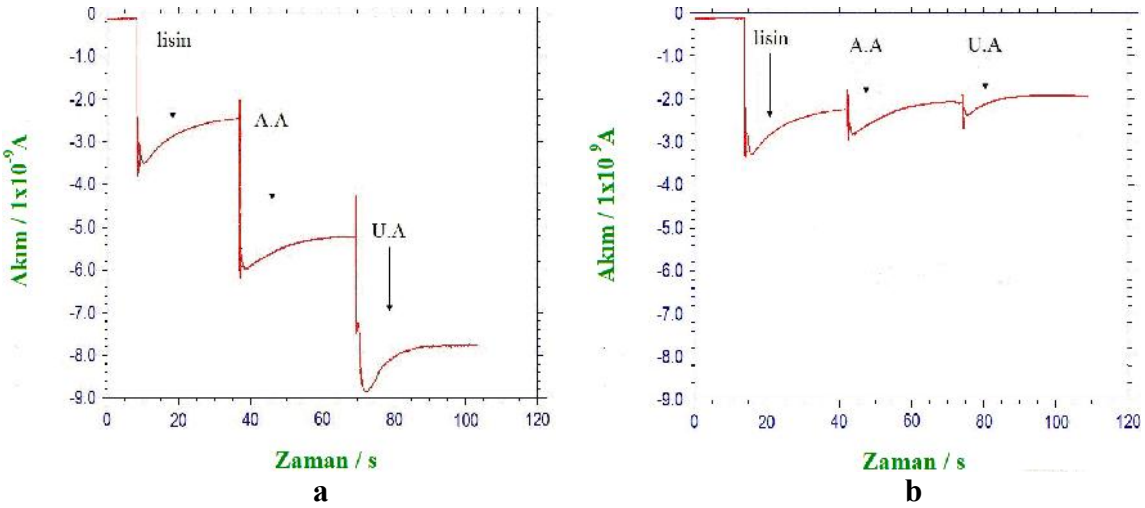
7.1.7. PVF-LyOx biyosensöründe girişim

Lisin oksidaz enziminin arginin, histidin, ornitin, fenilalanin, tirosin ve sistin gibi diğer elektroaktif bileşiklerin yükseltgemesini katalizlediği bilinmektedir (Kusakabe 1980). PVF-LyOx biyosensörünün girişim yapabilecek bileşiklere karşı cevabını incelemek amacı ile belirli derişimlerde bu amino asitlerden çalışma ortamına eklenerek akımdaki değişim izlendi. Girişim etkisi bölüm 2.3' de seçicilik kısmında belirtilen Wang ve grubu tarafından tanımlanan amperometrik seçicilik katsayılarının hesaplanması ile bulunmuştur. Amperometrik seçicilik katsayısı, her bir amino asit derişimi 0,1 mM'da sabit tutularak elde edilen cevap akımlarının ölçülmesi ile hesaplanmıştır (Çizelge 7.1). Sistin haricinde diğer amino asitlere belirgin bir girişim etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 7.1. PVF-LyOx biyosensörü için çeşitli amino asitlerin amperometrik seçicilik katsayıları

Biyosensör	**Amperometrik Seçicilik Katsayısı k_{ij}**					
	Ornitin	Tirosin	Arginin	Histidin	Fenilalanin	Sistin
PVF-LyOx	0,061	0,015	0,022	0,024	0,005	2,487

Ayrıca, ölçüm ortamında bulunabilecek ürik asit ve askorbik asit gibi girişim yapan türlerin hazırlanan biyosensörde cevapları incelenmiştir. Lisin ve girişim yapabilecek maddelerin derişimleri 0,05 mM'da sabit tutulmuştur. Çalışma sırasında ilk önce lisin için kararlı hal akım eğrisi elde edilmiş daha sonra hücreye girişim yapabilecek maddeler eklenmiş ve akımdaki değişim ölçülmüştür. Askorbik asidin ve ürik asidin hemen hemen lisin kadar cevap akımı verdiği gözlenmiştir (Şekil 7.9a). Bu girişim etkisinin engellenmesi için elektrot nafyon ile modifiye edilmiş ve girişim yapan türlerin cevap akımları incelenmiştir. Nafyonla modifiye edilen Naf-PVF-LyOx biyosensörde askorbik asit ve ürik asit girişiminin PVF-LyOx biyosensöre göre %97 azaldığı ve böylelikle nafyonun girişim yapan türleri engellendiği gözlenmiştir (Şekil 7.9b). Yuan ve grubu tasarladığı glukoz biyosensöründe girişim gidermek için nafyon film kullanmışlar ve girişim yapan maddenin glukoza cevap akımı oranını ölçmüşlerdir. Nafyon filmle modifiye edilmeden önce askorbik asit ve ürik asit girişimi sırasıyla 1,43 ve 1,27 iken; daha sonra bu oranın 0,24 ve 0,21 olduğunu bulmuşlardır (Yuan, 2005).

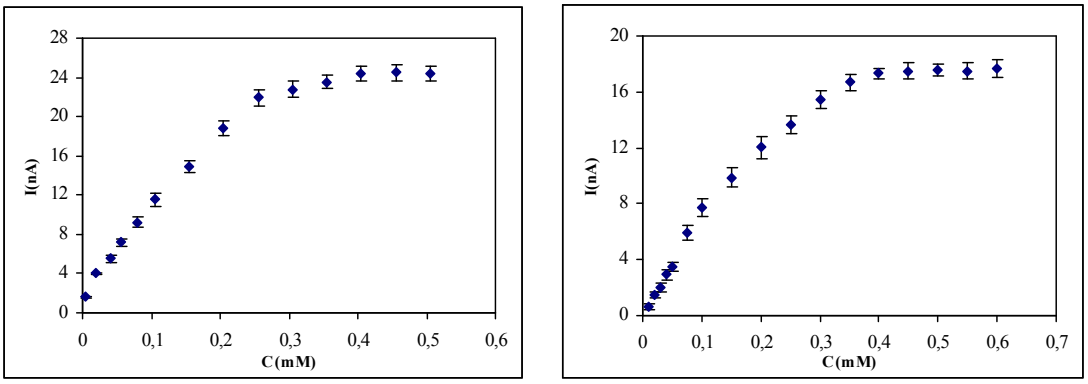


Şekil 7.9. a) PVF-LyOx, **b)** Naf-PVF-LyOx biyosensörlerinin 0,05 mM Lisin, 0,05 mM Askorbik Asit ve 0,05 mM Ürik Asit eklenmesi ile elde edilen cevap akımları (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

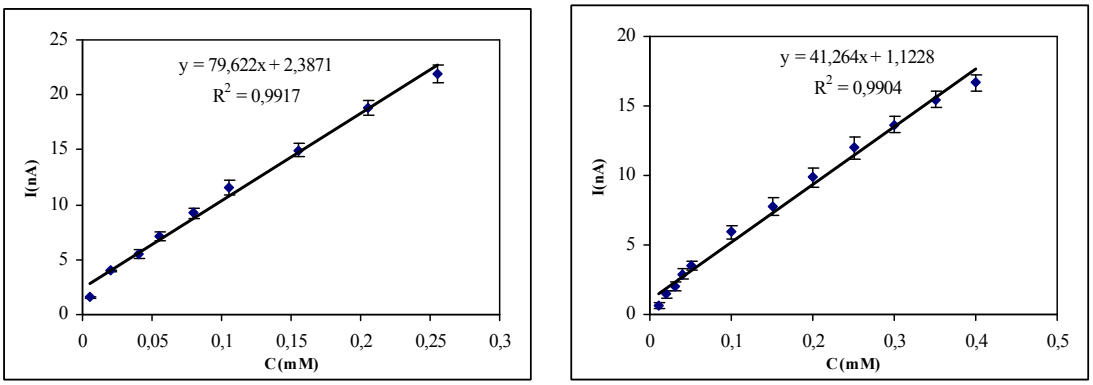
7.1.8. PVF-LyOx ve Naf-PVF-LyOx biyosensörlerine substrat derişimin etkisi

Biyosensörler ile sağlıklı ölçüm yapabilmenin ön koşulu ortamdaki substrat derişimi ile orantılı akım değerlerinin elde edilmesidir. Bu koşulun sağlandığı substrat derişim aralığı biyosensörlerin doğrusal çalışma aralığı olarak tanımlanır ve pratikte bu aralığın geniş olması istenir. Biyosensörlerin maksimum aktivitesinin ve doğrusal

çalışma aralığının saptanması için ölçülen akım değerlerine lisin derişimi etkisi incelenmiştir. Daha önce saptanan optimum koşullarda, yani 1,00 mg LyOx/mL enzim derişimi ile hazırlanan biyosensörünün 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda ve 30 °C sıcaklıkda 3'er kez tekrar edilen deneylerin standart sapmaları hesaplanarak lisin derişimine karşı akım grafikleri çizilmiştir. Şekil 7.10'de ölçülen akım değerlerinin lisin derişimi ile değişimi verilmiştir. PVF-LyOx ve Naf-PVF-LyOx biyosensörleri 0,25 mM ve 0,40 mM'a kadar lisin derişimi ile orantılı akım değerleri vermektedir (Şekil 7.11). Ölçülebilir akımı üreten minimum lisin derişimleri ise PVF-LyOx ve Naf-PVF-LyOx biyosensörleri için sırasıyla $3{,}75\text{x}10^{-2}$ mM ve $4{,}5\text{x}10^{-2}$ mM olarak bulunmuştur. Nafyon kaplı biyosensörlerde cevap akımlarında bir miktar düşüş gözlenmesine rağmen, doğrusal çalışma sınırının daha yüksek olduğu gözlenmiştir.



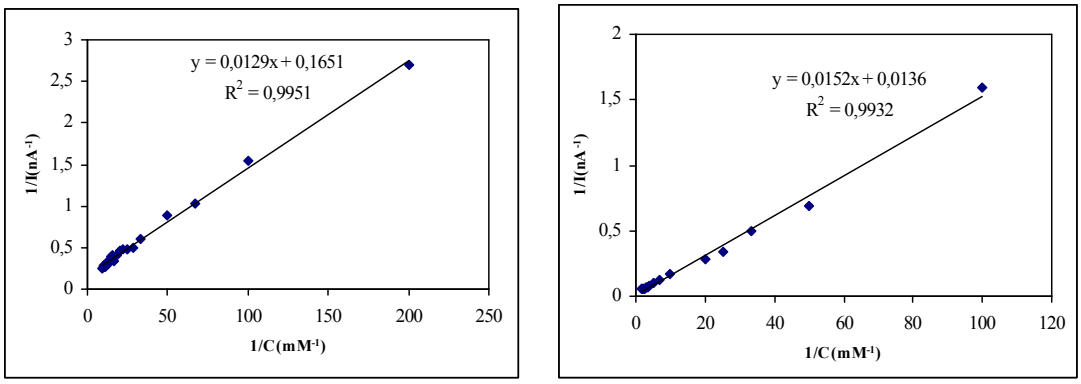
Şekil 7.10. a) PVF-LyOx b) Naf-PVF-LyOx biyosensör aktivitelerinin lisin derişimi ile değişimi (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)



Şekil 7.11. a) PVF-LyOx b) Naf-PVF-LyOx biyosensör aktivitelerinin lisin derişimi ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

Polimer yapıda herhangi bir difüzyon kısıtlaması olup olmadığını ortaya koymak amacıyla çeşitli lisin derişimlerinde alınan akım değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri (Şekil 7.12) çizilmiş ve görünür Michaelis-Menten (Kmg) sabiti tayin edilmiştir. PVF-LyOx ve Naf-PVF-LyOx biyosensörlerinde tutuklanmış enzim için Kmg değerleri sırası ile 0,078 mM ve 1,11 mM lisin değeri bulunmuştur. PVF-LyOx biyosensöründe tutunlanmış enzimin Kmg değerinin daha düşük olması substratına (lisine) ilgisinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Lineweaver-Burk grafikleri kullanılarak biyosensörlerin duyarlıkları da hesaplanmış ve PVF-LyOx biyosensörü için

2,55 µA mM^{-1} cm^{-2}, Naf-PVF-LyOx biyosensörü için 2,23 µA mM^{-1} cm^{-2} olarak belirlenmiştir. Ayrıca biyosensörlerin tekrarlabilirlikleri 0,1 mM lisinin çözelti ortamına eklenmesi ile beşer kez yapılan deneyler sonucu akım-zaman eğrilerinden elde edilen cevap akımlarınının bağıl standart sapma (BSS) değerleri hesaplanarak belirlendi. PVF-LyOx ve Naf-PVF-LyOx biyosensörlerinin tekrarlanabilirlikleri sırasıyla % 6,25 (BSS) ve % 6,85 (BSS) olarak bulunmuştur.



a **b**

Şekil 7.12. a) PVF-LyOx, b)Naf-PVF-LyOx biyosensörleri için Lineweaver-Burk grafikleri (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

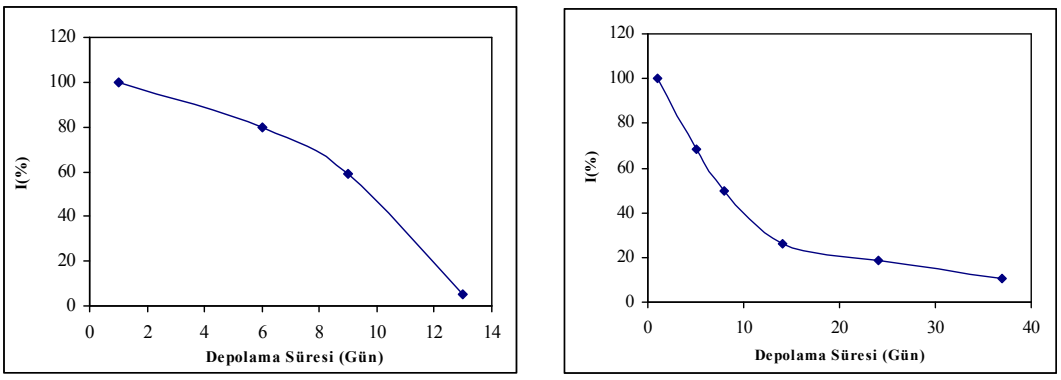
7.1.9. PVF-LyOx biyosensörünün kullanım kararlılığı

Tekrar kullanım sayısı biyosensörler için önemli bir parametredir. Serbest enzimler bir kez kullanılırken, immobilize enzimler birçok kez kullanılabilmektedir. Fakat immobilize enzimlerde kullanım sayısının artmasıyla birlikte aktivitesinde azalma gözlenir. Bu, enzimlerin önce tersiyer yapısının daha sonra da sekonder (alfa sarmal) yapısının bozulmasından ileri gelir. Dolayısıyla biyosensörlerin tekrar kullanım sayısının artmasıyla enzimler aktivitelerinin bir kısmını ya da tümünü kaybedebilirler.

Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması için daha önce belirlenen çalışma şartlarında hazırlanan elektrotla aynı gün içinde bir dizi ölçüm alınmıştır. PVF-LyOx biyosensörle her bir kullanımda 4 ölçüm yapılmıştır ve 3 kez kullanımdan sonra aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir.

7.1.10. PVF-LyOx biyosensörünün depolama kararlılığı

Enzimler, ortam koşullarına bağlı olarak çok kolay denatüre olduğundan depolanmaları oldukça zordur. Daha önce bulunan optimum şartlarda hazırlanan biyosensörün depolama kararlılığının belirlenmesi için 35 gün boyunca aktiviteleri incelenmiştir. Biyosensörün aktivitesi belirlenen optimum koşullarda belirli aralıklarla ölçülmüş ve biyosensör kullanılmadığı zamanlarda + 4 ^{o}C'de buzdolabında pH 7,4 fosfat tamponu içinde muhafaza edilmiştir. PVF-LyOx ve Naf-PVF-LyOx biyosensörlerinin aktivitelerinin depolama süresi ile değişimi incelenmiş ve depolama süresine karşı cevap akımındaki değişim grafiğe geçirilmiştir (Şekil 7.13). PVF-LyOx biyosensörü 13 gün sonunda aktivitesini yitirirken, Naf-PVF-LyOx biyosensörü için 8 gün sonunda aktivite kaybının %50 oranında olduğu ve bundan sonraki günlerde aktivitede çok fazla değişiklik olmadığı ve 35 güne kadar yapılan ölçümlerde %20 oranında aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. Nafyon modifiye biyosensörün depolama sürelerinin daha uzun olduğu bulunmuştur.

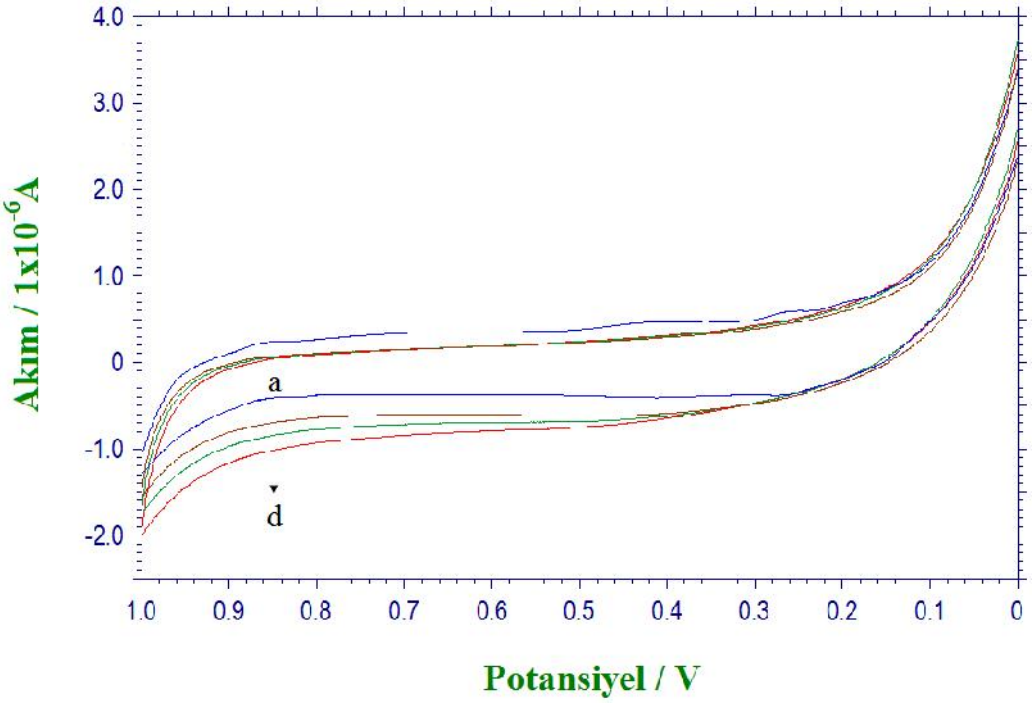


a **b**

Şekil 7.13. a) PVF-LyOx b)Naf-PVF-LyOx biyosensör aktivitelerinin depolama süresi ile değişimi (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

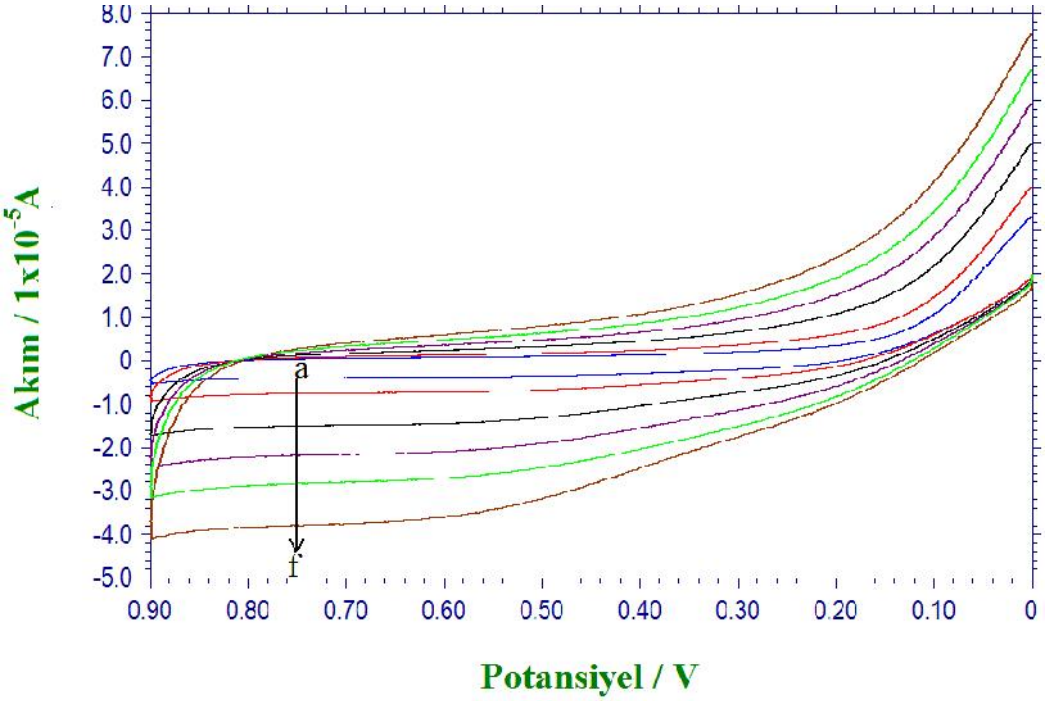
7.1.11. PVF-LyOx biyosensörünün aktivitesinin voltametrik yöntemle incelenmesi

Biyosensörün hazırlanma ve çalışma koşulları üzerine etkili olabilecek optimum şartlar amperometrik yöntemle belirlendikten sonra biyosensörün voltametrik yöntemle aktivitesi incelenmiştir. Dönüşümlü voltametri yöntemi ile 0,0-1,0 V arasında potansiyel taraması yapılarak kararlı akım eğrisi elde edildikten sonra giderek artan derişimlerde lisin eklenmiş ve her eklemeden sonra voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 7.14). Lisin eklenmesi ile orantılı olarak akım değerlerinin arttığı gözlenmektedir.



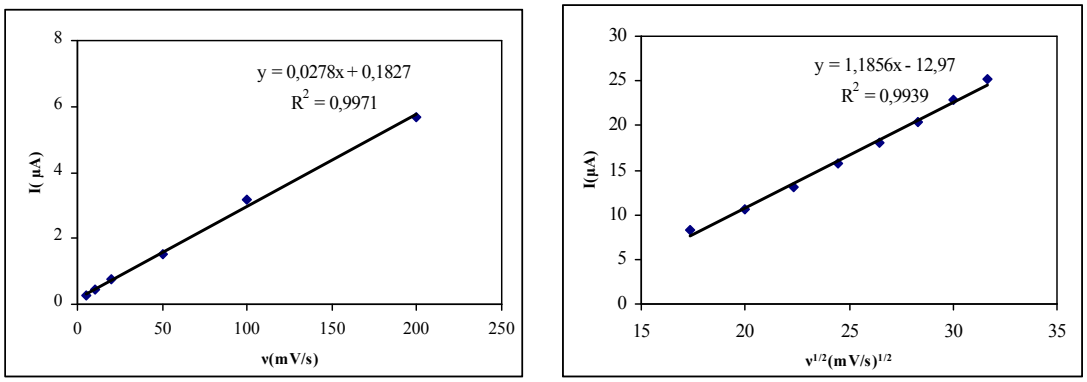
Şekil 7.14. PVF-LyOx biyosensörü için a) 0 b) 0,1 c) 0,3 d) 1,5 mM Lisin eklenmesi ile elde edilen dönüşümlü voltamogramlar (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 50 mV/s)

Enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan hidrojen peroksitin yükseltgenmesine gerilim tarama hızının (ν) etkisini incelemek için pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde PVF-LyOx biyosensörü için farklı tarama hızlarında (10-1000 mV/s) dönüşümlü voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 7.15). Gerilim tarama hızının artması ile hidrojen peroksitin yükseltgenmesine ait pik akımlarının arttığı gözlenmiştir.



Şekil 7.15. PVF-LyOx biyosensörü için a) 100, b) 200, c) 400, d) 600,e) 800, f) 1000 mV/s gerilim tarama hızları ile elde edilen dönüşümlü voltamogramlar
(1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 1,5 mM Lisin, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

Gerilim tarama hızına (ν) ve tarama hızının karekökü ($\nu^{1/2}$) karşı cevap akımı değerlerinin grafikleri çizilerek (Şekil 7.16) cevap akımının gerilim tarama hızı ile değişimi incelenmiştir. Düşük gerilim tarama hızlarında (5-200 mV/s) artan tarama hızı ile cevap akımının doğrusal olarak arttığından gerçekleşen enzimatik reaksiyonun yüzey kontrollü bir proses olduğu düşünülmektedir. 200 mV/s üstündeki tarama hızlarında ise cevap akımı değerlerinin tarama hızının karekökü ile doğrusal olarak değiştiği gözlendiğinden yüksek tarama hızlarında (200-1000 mV/s) elektron aktarım prosesinin difüzyon kontrollü olduğu düşünülmektedir.



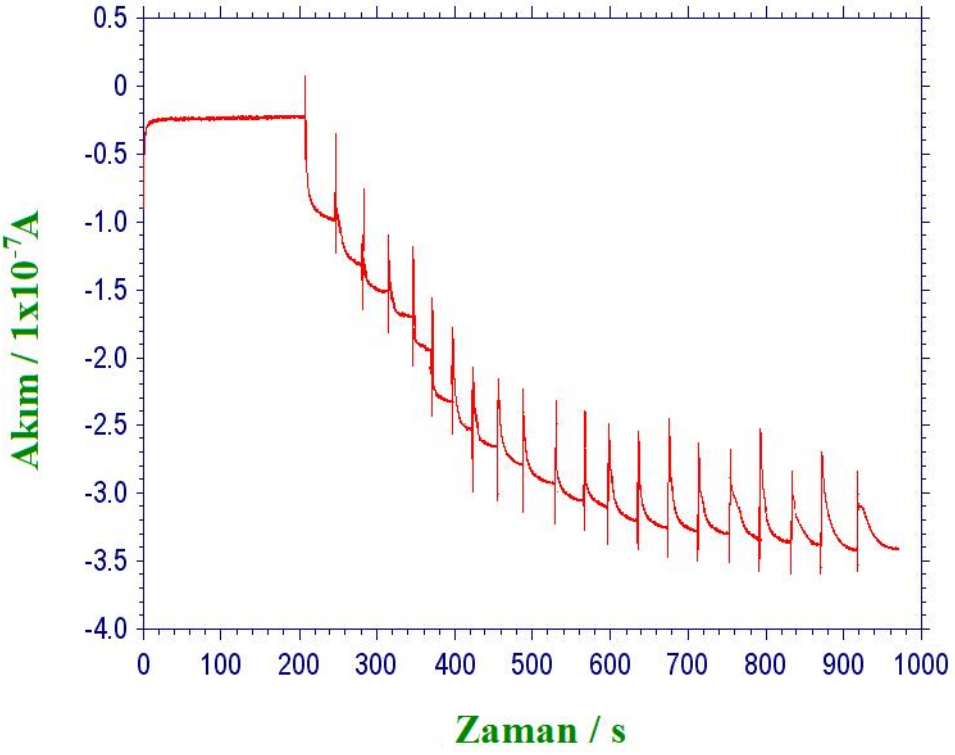
a **b**

Şekil 7.16. PVF-LyOx biyosensörü için **a)** gerilim tarama hızına, **b)** gerilim tarama hızının karekökü karşı cevap akımı grafiği (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 1,5 mM Lisin, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

7.2. PVF-Au-LyOx Biyosensörünün Optimizasyonu

Pt elektrot üzerine kaplanmış PVF yapısında altın biriktirilip, LyOx enziminin tutuklanmasıyla hazırlanan PVF-Au-LyOx biyosensörünün aktivitesine çalışma potansiyeli, $KAuCl_4$ derişimi, $KAuCl_4$ çözeltisinde bekletme süresi, ortam pH'ı, sıcaklık ve girişim etkileri araştırılmıştır. PVF-Au-LyOx biyosensörü ile yapılan çalışmalarda diğer parametreler için PVF-LyOx biyosensörü ile bulunan optimum değerler kullanılmıştır. Bu çalışmalar sabit bir çalışma voltajında farklı lisin derişimleri için elde edilen kararlı hal akımlarının ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir.

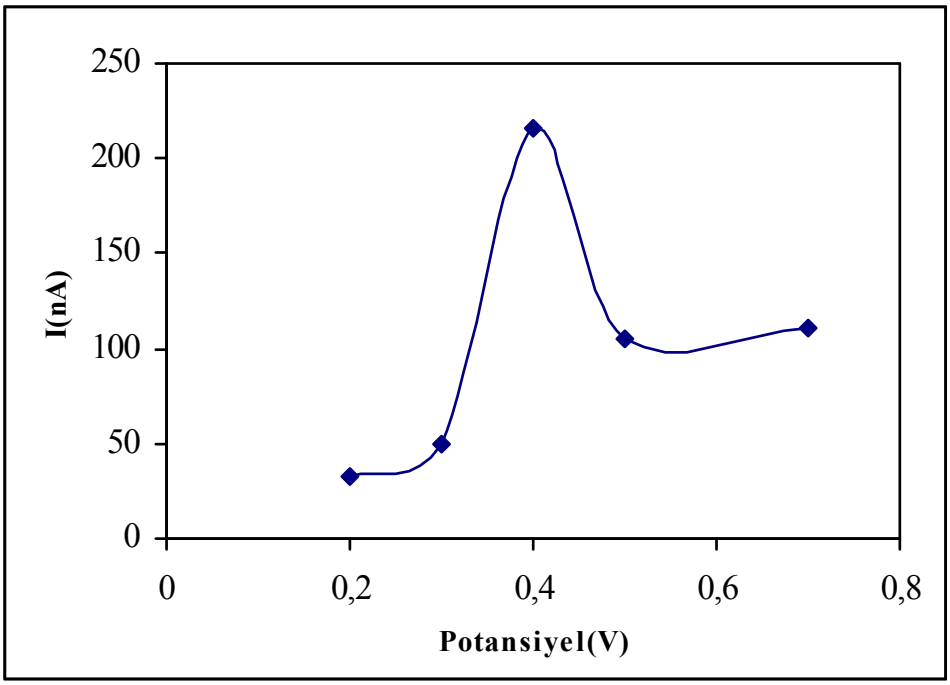
Şekil 7.17 görülen cevap eğrileri O_2 atmosferinde elektrokimyasal hücreye her defasında 0,05 mM lisin eklenerek zamana karşı akım değişimi izlenerek elde edilen cevaplardır. PVF-Au-LyOx biyosensörünün aktivitesi de enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan H_2O_2'in yükseltgenme akımının ölçülmesiyle belirlenmektedir. Cevap eğrilerinden görüldüğü gibi akımın sabitlenmesi için gereken süre yani biyosensörün cevap süresi 25-30 s arasındadır.



Şekil 7.17. PVF-Au-LyOx biyosensörüne ait akım-zaman eğrisi
(1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

7.2.1. Uygulanan gerilimin etkisi

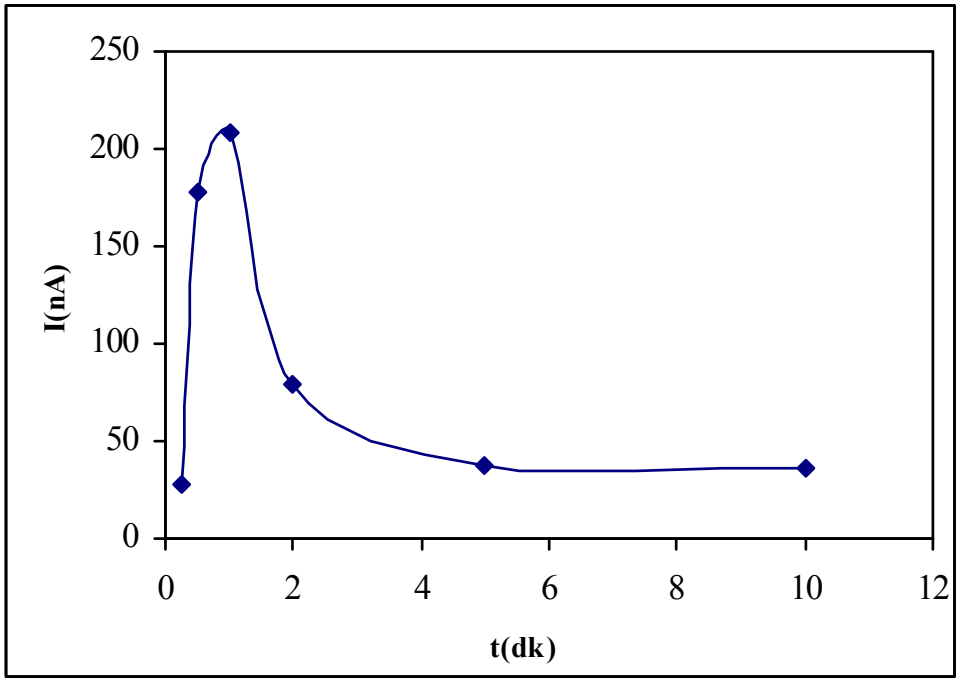
PVF-Au-LyOx biyosensörünün hazırlanmasında cevap akımını etkileyen faktörlerden ilki uygulanan potansiyeldir. Bu çalışmada, 1,25 mg/mL PVF'de 1 dakika ve 1 mg LyOx/mL enzim çözeltisinde 1 dakika bekletme süresi sabit tutulmuştur. Biyosensöre uygulanan gerilimin elde edilen cevap akımına etkisini belirleyebilmek amacıyla çalışma gerilimi, 0,20-0,70 V aralığında değiştirilmiştir. Lisin ilavesinden sonra elde edilen sonuçlar kullanılarak uygulanan gerilime karşı maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiş, 0,4 V'a kadar artan akım değerlerinin daha yüksek potansiyellerde azaldığı gözlenmiş ve en yüksek akım değerinin elde edildiği potansiyel 0,4 V olarak belirlenmiştir (Şekil 7.18). PVF-LyOx biyosensörü ile karşılaştırıldığında polimer yapıda biriktirlen altın parçacıkların potansiyelde herhangi bir kaymaya neden olmadığı gözlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda PVF-Au-LyOx biyosensörünü için çalışma potansiyeli olarak 0,4 V kullanılmıştır.



Şekil 7.18. PVF-Au-LyOx biyosensörünün aktivitesinin uygulanan gerilim ile değişimi (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

7.2.2. $KAuCl_4$ çözeltisinde bekletme süresinin etkisi

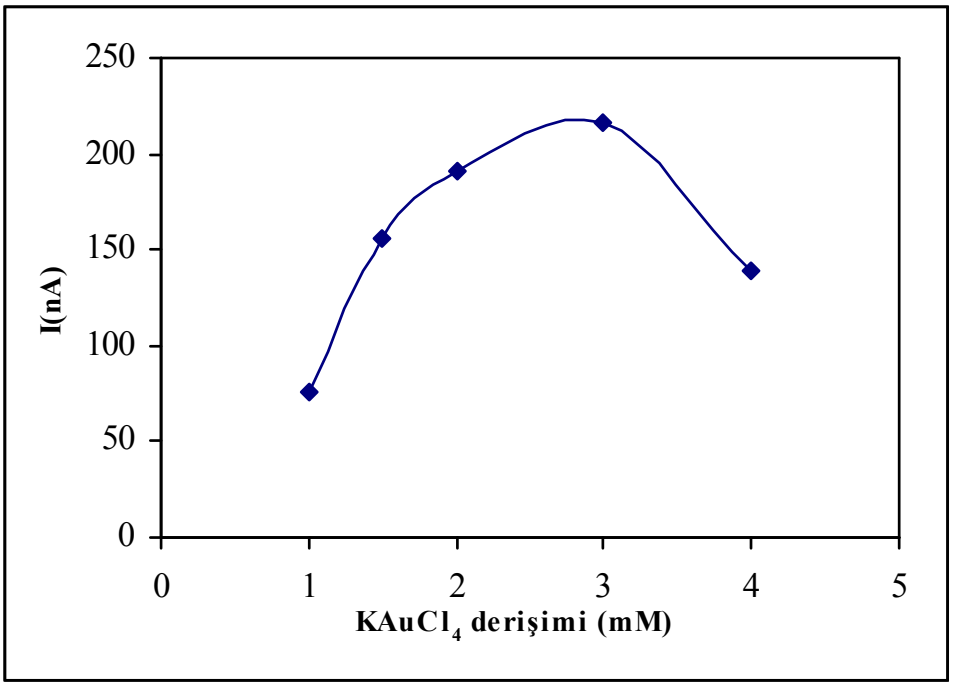
Hazırlanan PVF-Au-LyOx biyosensörünün cevap akımını etkileyen paremetrelerden biri $KAuCl_4$ çözeltisinde bekletme süresidir. $KAuCl_4$ çözeltisinde bekletme süresi etkisini belirlemek için 2,0 mM $KAuCl_4$ çözeltisinde bekletme süresi 25 saniye ile 10 dakika arasında değiştirilmiştir. Kullanılan her bir bekletme süresinde elektrot aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışmalar sırasında 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu kullanılmıştır. Farklı bekletme sürelerine karşı lisin ilavesinden sonraki maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir. Şekil 7.19'da görüldüğü gibi $KAuCl_4$ çözeltisinde bekletme süresinin artmasıyla gözlenen akım değeri 1 dakikaya kadar artmakta ve daha yüksek bekletme sürelerinde akım azalmaktadır. Maksimum aktivite $KAuCl_4$'de 1 dakika bekletme süresi kullanılarak hazırlanan biyosensör için elde edildiğinden bundan sonra yapılan çalışmalarda 1 dakikalık bekletme süresi kullanılmıştır.



Şekil 7.19. PVF-Au-LyOx biyosensörü için $KAuCl_4$ çözeltisinde bekletme süresine karşı elde edilen maksimum akım değerleri (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

7.2.3. $KAuCl_4$ derişiminin etkisi

Hazırlanan PVF-Au-LyOx biyosensörüne $KAuCl_4$ derişiminin etkisini belirlemek için $KAuCl_4$ derişimi 1mM ile 4mM arasında değiştirilmiştir. Farklı derişimde $KAuCl_4$ çözeltilerinin kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörlerin aktivitesi incelenmiştir. 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-LyOx biyosensörü ile yapılan çalışmalarda saptanan optimum değerler kullanılmıştır. $KAuCl_4$ çözeltisinde bekletme süresi 1 dakika olarak sabit tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar kullanılarak farklı $KAuCl_4$ derişimine karşı lisin ilavesinden sonraki maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir. Şekil 7.20'de görüldüğü gibi $KAuCl_4$ çözelti derişiminin artmasıyla gözlenen akım değeri artmakta ve belirli bir derişimden sonra akım azalmaktadır. Maksimum akım 3 mM $KAuCl_4$ çözeltisi için elde edilmiştir.



Şekil 7.20. PVF-Au-LyOx biyosensör aktivitesinin $KAuCl_4$ derişimi ile değişimi (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

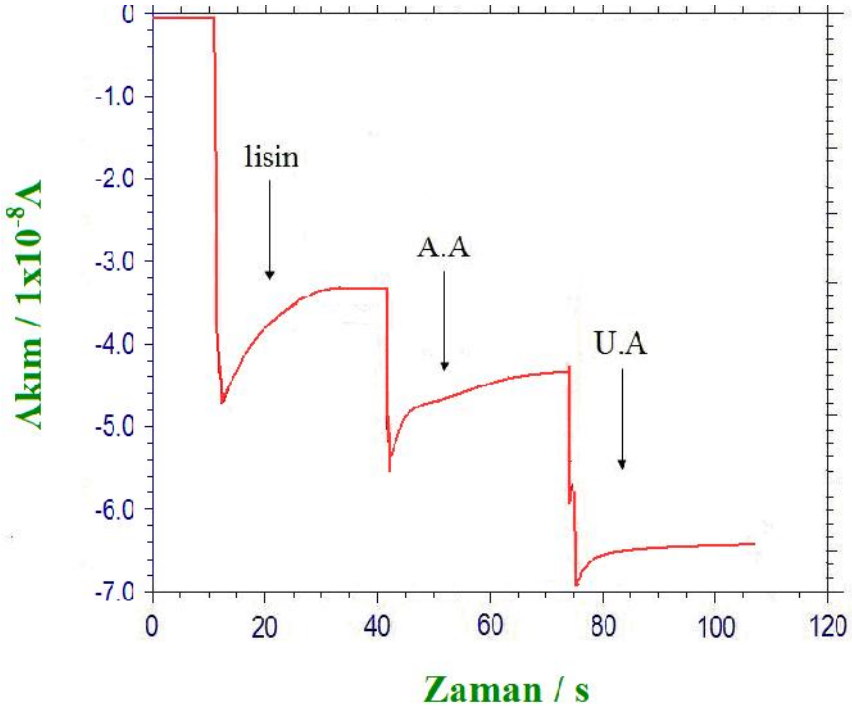
7.2.4. PVF-Au-LyOx biyosensöründe girişim

PVF-Au-LyOx biyosensörünün arginin, histidin, ornitin, fenilalanin, tirosin ve sistin gibi amino asitlere karşı girişim etkisinin incelenmesi için cevap akımlarındaki değişimler incelenerek amperometrik seçicilik katsayıları hesaplandı. Çalışma sırasında amino asitlerin derişimi 0,1 mM'da sabit tutularak girişim yapabilecek amino asitlerin cevap akımının lisinin cevap akımına oranı çizelge 7.2'de görülmektedir. PVF-Au-LyOx biyosensörle elde edilen amperometrik seçicilik katsayıları PVF-LyOx biyosensörle karşılaştırıldığında belirgin bir düşüş olduğu özelikle sistinin girişim etkisinin yaklaşık iki buçuk kat azaldığı gözlenmiştir.

Çizelge 7.2. PVF-Au-LyOx biyosensörü için çeşitli amino asitlerin amperometrik seçicilik katsayıları

Biyosensör	**Amperometrik Seçicilik Katsayısı k_{ij}**					
	Ornitin	Tirosin	Arginin	Histidin	Fenilalanin	Sistin
PVF-Au-LyOx	-	0,005	0,006	0,006	0,005	1,052

Ölçüm ortamında bulunabilecek bazı türlerin hazırlanan biyosensörde cevapları incelenmiştir. Bu çalışma sırasında lisin derişimi ve girişim yapabilecek maddelerin derişimleri 0,05 mM'da sabit tutulmuştur. Bu amaçla 0,05 mM lisin için kararlı hal akım eğrisi elde edildikten sonra hücreye girişim yapabilecek maddeler eklenmiş ve PVF-Au-LyOx biyosensörle akımdaki değişim ölçülmüştür. Askorbik asit ve ürik asidin aynı derişimde lisin eklenmesi ile elde edilen cevap akımının yaklaşık yarısı kadar akım değerleri verdiği gözlenmiştir (Şekil 7.21). Girişimleri engellemek için elektrot nafyon ile modifiye edilmiştir. Fakat bu elektrotda LyOx enzimi tutuklanamadığından girişim etkisi engellenememiştir.

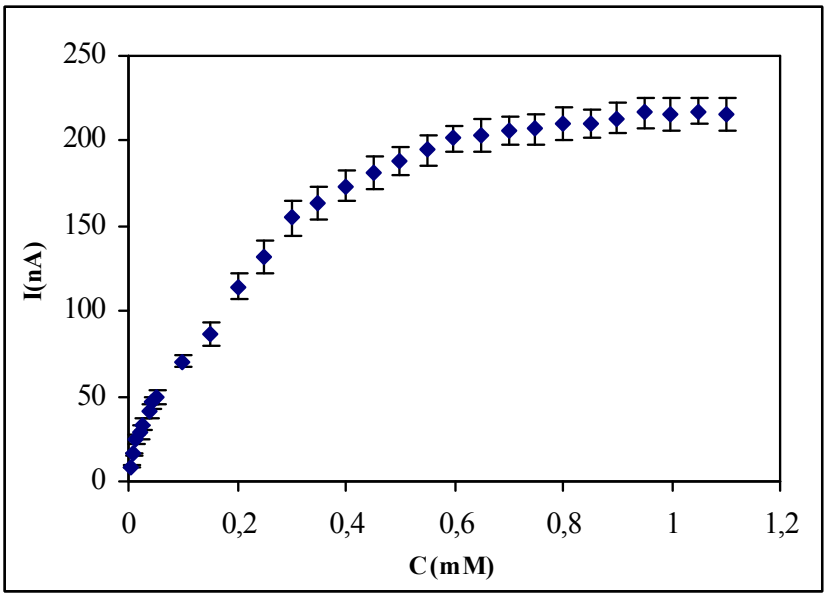


Şekil 7.21. PVF-Au-LyOx biyosensörünün 0,05 mM Lisin, 0,05 mM Askorbik Asit ve 0,05 mM Ürik Asit eklenmesi ile elde edilen cevap akımları (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

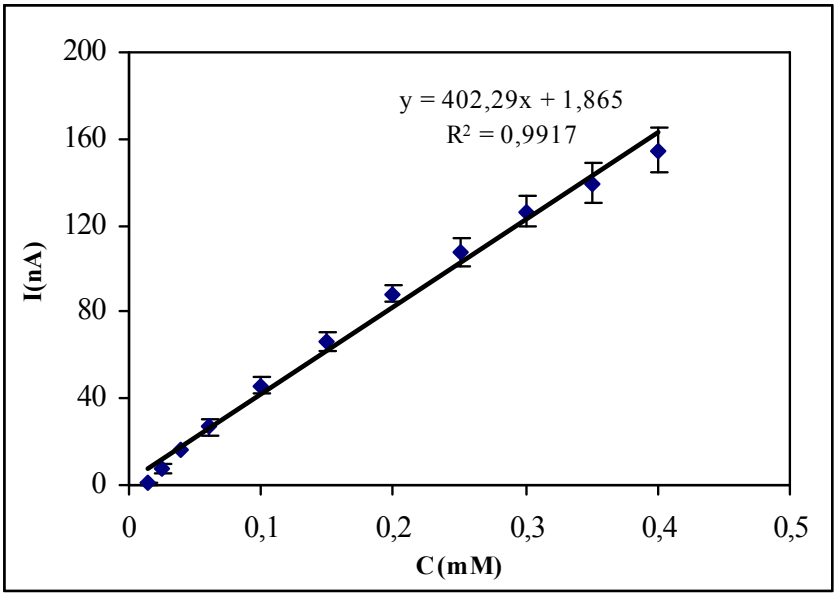
7.2.5. PVF-Au-Lyox biyosensörüne substrat derişimin etkisi

PVF-Au-LyOx biyosensörünün doğrusal çalışma sınırının saptanması için ölçülen akım değerlerine substrat derişimi etkisi üçer kez tekrar edilen deneylerin standart sapmaları hesaplanarak, daha önce belirlenen çalışma şartlarında incelenmiştir. PVF-Au-LyOx biyosensörü için elde edilen cevap akımlarının lisin derişimi ile değişimine ait kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 7.22). PVF-Au-LyOx biyosensörünün 0,40 mM'a kadar lisin derişimi ile orantılı akım değerleri verdiği gözlenmiştir (Şekil 7.23). Bu biyosensör için ölçülebilir akımı üreten minimum lisin derişiminin ise $8{,}5x10^{-3}$ mM olduğu bulunmuştur. Ayrıca derişimin tersine (1/C) karşı akımın tersi (1/I) değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 7.24) çizilerek, görünür Michaelis-Menten (Kmg) sabiti ve duyarlık hesaplanmıştır. PVF-Au-LyOx biyosensöründe tutuklanmış enzim için Kmg, 0,625 mM lisin derişimi ve biyosensörün duyarlığı ise 31,85 µA mM^{-1} cm^{-2} bulunmuştur. Ayrıca geliştirilen biyosensörün tekrarlanabilirliği 0,25 mM lisinin çözelti ortamına eklenmesi ile beşer kez yapılan deneyler sonucu akım-zaman eğrilerinden elde edilen cevap akımlarınının bağıl standart sapma (BSS) değeri hesaplanarak belirlendi. PVF-Au-LyOx biyosensörünün tekrarlanabilirliği %4,15 (BSS) olarak bulunmuştur. PVF-LyOx biyosensöre göre cevap

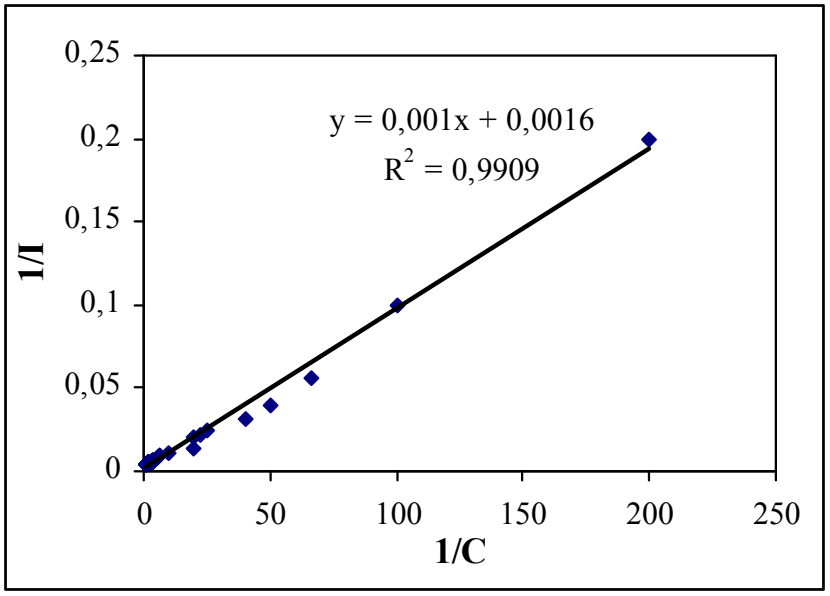
akımının daha büyük, doğrusal çalışma sınırının geniş ve duyarlığın daha yüksek olması polimer yapıda biriktirilen altın parçacıklarının elektrokatalitik aktiviteyi artırmasındandır.



Şekil 7.22. PVF-Au-LyOx biyosensör aktivitesinin lisin derişimi ile değişimi (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)



Şekil 7.23. PVF-Au-LyOx biyosensör aktivitesinin lisin derişimi ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)



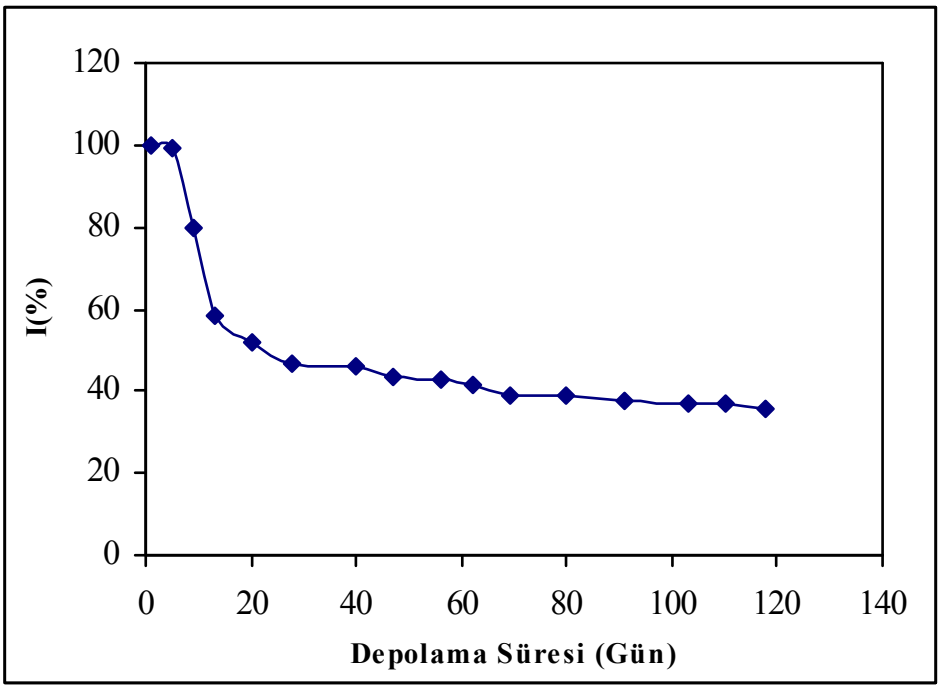
Şekil 7.24. PVF-Au-LyOx biyosensörü için Lineweaver-Burk grafiği
(1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

7.2.6. PVF-Au-LyOx biyosensörünün kullanım kararlılığı

Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması için optimum deney şartlarında hazırlanan elektrotla aynı gün içinde bir dizi ölçüm alınmıştır. PVF-Au-LyOx biyosensörünün, her bir kullanımda 4 ölçüm yapılarak 15 kullanım sonunda aktivitesini %40 oranında koruduğu gözlenmiştir.

7.2.7. PVF-Au-LyOx biyosensörünün depolama kararlılığı

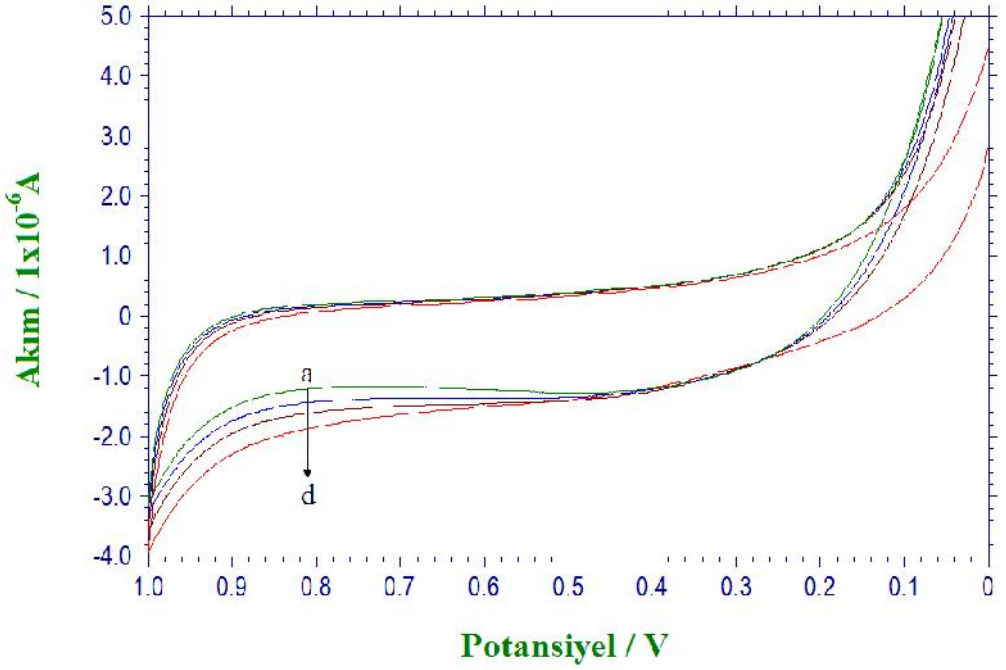
Optimum deney koşullarında hazırlanan PVF-Au-LyOx biyosensörünün; pH 7,4 fosfat tamponu içinde 4 ^{o}C' de muhafaza edilerek depolama kararlılığı araştırılmıştır. 20 gün sonunda aktivite kaybının %50 oranında olduğu ve bundan sonraki günlerde aktivitede çok fazla değişiklik olmadığı ve 118 güne kadar yapılan ölçümlerde %40 oranında aktivitesini koruduğu gözlenmiştir (Şekil 7.25).



Şekil 7.25. PVF-Au-LyOx biyosensör aktivitesinin depolama süresi ile değişimi (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 0,4 V)

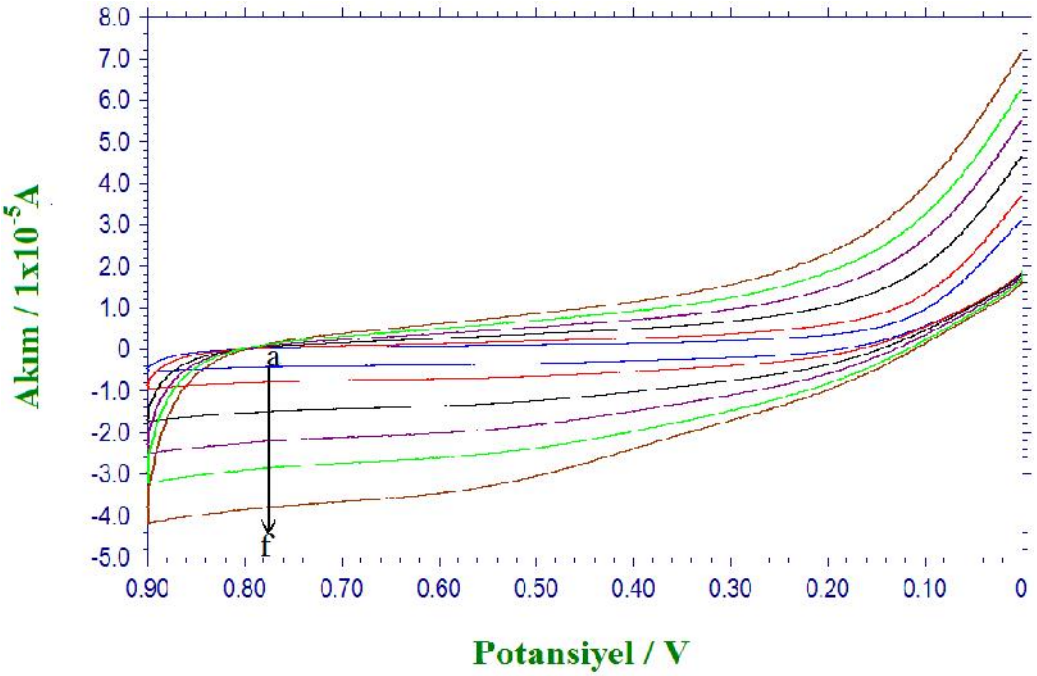
7.2.8. PVF-Au-LyOx biyosensörünün aktivitesinin voltametrik yöntemle incelenmesi

Amperometrik yöntemle optimum çalışma koşulları belirlenen biyosensörün voltametrik yöntemle aktivitesi incelenmiştir. Dönüşümlü voltametri yöntemi ile 0,0-1,0 V arasında potansiyel taraması yapılarak kararlı akım eğrisi elde edildikten sonra giderek artan derişimlerde lisin eklenmiş ve her eklemeden sonra voltamogramlar kaydedilmiştir. Lisin eklenmesi ile orantılı olarak akım değerlerinin arttığı gözlenmektedir (Şekil 7.26).



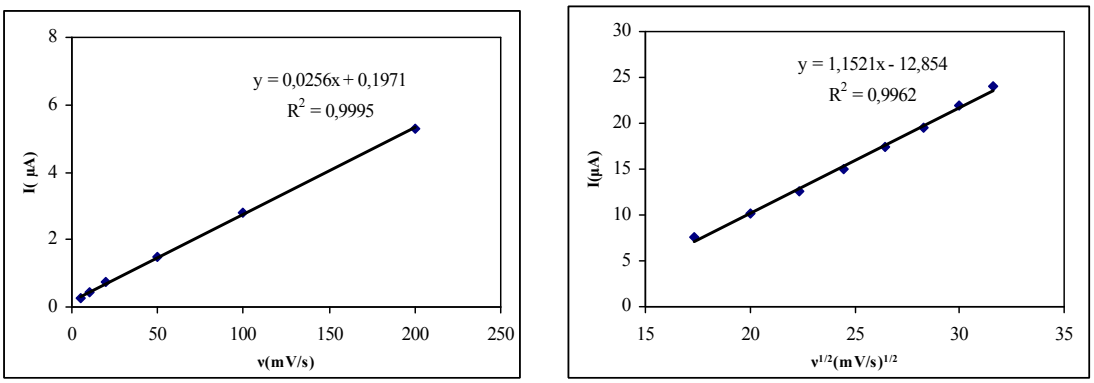
Şekil 7.26. PVF-Au-LyOx biyosensörü için a)0 b) 0,1 c) 0,3 d) 1,5 mM Lisin eklenmesi ile elde edilen dönüşümlü voltamogramlar
(1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 50 mV/s)

Enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan hidrojen peroksitin yükseltgenmesine gerilim tarama hızının etkisini incelemek için pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde PVF-Au-LyOx biyosensörü için farklı tarama hızlarında (10-1000 mV/s) dönüşümlü voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 7.27).



Şekil 7.27. PVF-Au-LyOx biyosensörü için a) 100, b) 200, c) 400, d) 600,e) 800, f) 1000 mV/s gerilim tarama hızları ile elde edilen dönüşümlü voltamogramlar
(1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 1,5 mM Lisin, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

Gerilim tarama hızına (ν) ve tarama hızının karekköküne ($\nu^{1/2}$) karşı cevap akımı değerlerinin grafikleri çizilerek (Şekil 7.28) cevap akımının gerilim tarama hızı ile değişimi incelenmiştir. Düşük gerilim tarama hızlarında (5-200 mV/s) artan tarama hızı ile cevap akımının doğrusal olarak arttığından gerçekleşen enzimatik reaksiyonun yüzey kontrollü bir proses olduğu düşünülmektedir. 200 mV/s üstündeki tarama hızlarında ise cevap akımı değerlerinin tarama hızının karekökü ile doğrusal olarak değiştiği gözlendiğinden yüksek tarama hızlarında (200-1000 mV/s) elektron aktarım prosesinin difüzyon kontrollü olduğu düşünülmektedir.



a **b**

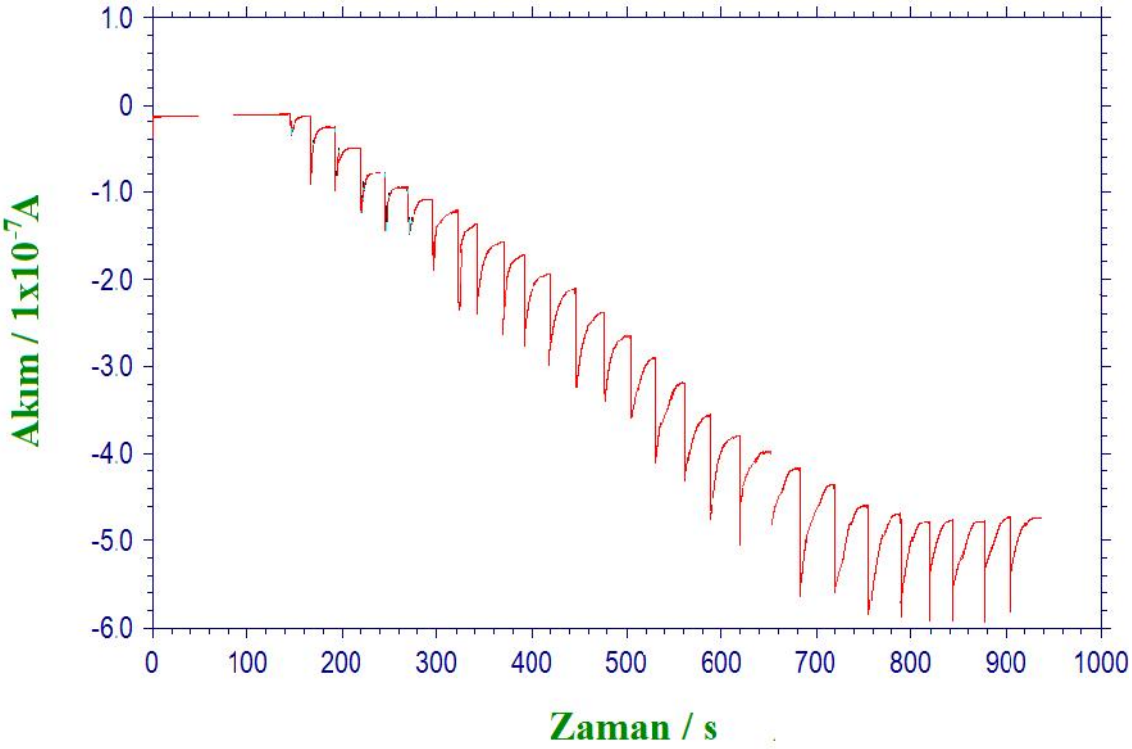
Şekil 7.28. PVF-Au-LyOx biyosensörü için **a)** gerilim tarama hızına, **b)** gerilim tarama hızının karekköküne karşı cevap akımı grafiği (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 1,5 mM Lisin, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

7.3. PVF-Pt-LyOx Biyosensörünün Optimizasyonu

Pt elektrot üzerine kaplanmış PVF yapısında platin biriktirilip, LyOx enziminin tutuklanmasıyla hazırlanan PVF-Pt-LyOx biyosensörünün aktivitesine çalışma potansiyeli, $PtBr_2$ derişimi, $PtBr_2$ çözeltisinde bekletme süresi, ortam pH'ı ve sıcaklık etkileri araştırılmıştır. PVF-Pt-LyOx biyosensörü ile yapılan çalışmalarda diğer parametreler için PVF-LyOx biyosensörü ile bulunan optimum değerler kullanılmıştır. Bu çalışmalar sabit bir çalışma voltajında farklı lisin derişimleri için elde edilen kararlı hal akımlarının ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Şekil 7.29'da görülen cevap eğrileri O_2 atmosferinde elektrokimyasal hücreye her defasında 0,05 mM lisin eklenerek zamana karşı akım değişimi izlenerek elde edilen cevaplardır. PVF-Pt-LyOx biyosensörünün aktivitesi de enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan H_2O_2'in yükseltgenme akımının ölçülmesiyle belirlenmektedir. Cevap

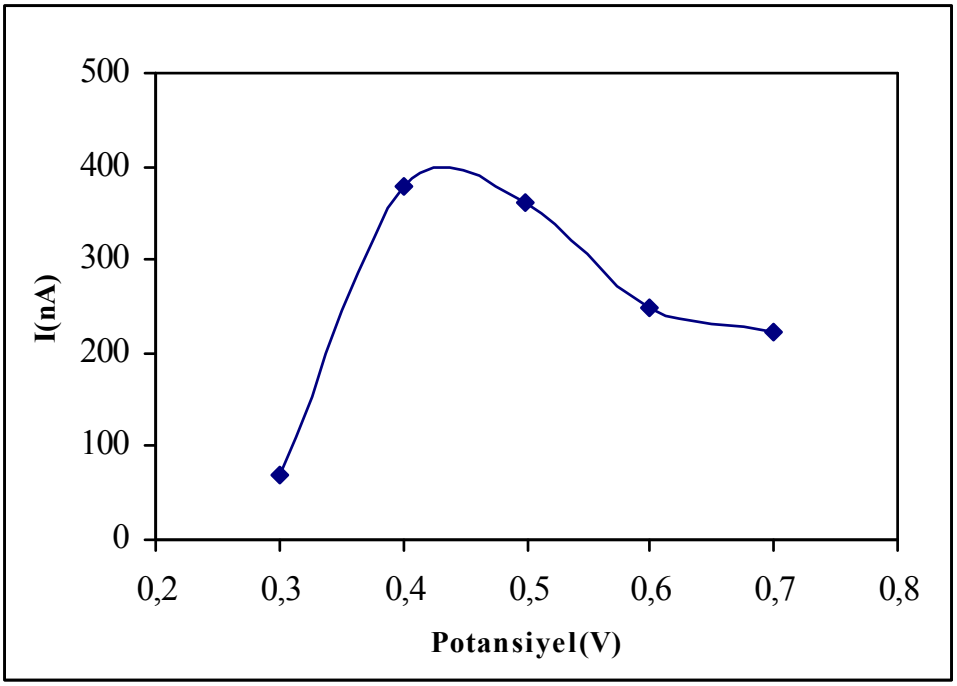
eğrilerinden görüldüğü gibi akımın sabitlenmesi için gereken süre yani biyosensörün cevap süresi 25-30 s arasındadır.



Şekil 7.29. PVF-Pt-LyOx biyosensörüne ait akım-zaman eğrisi
(1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

7.3.1. Uygulanan gerilimin etkisi

PVF-Pt-LyOx biyosensörünün hazırlanmasında cevap akımını etkileyen faktörlerden ilki uygulanan potansiyeldir. 1,25 mg/mL PVF'de 1 dakika ve 1 mg LyOx/mL enzim çözeltisinde 1 dakika bekletme süresi sabit tutularak hazırlanan biyosensör 0,10 M pH 7,40 fosfat tamponu ortamında çalışma potansiyeli değiştirilerek biyosensörün aktivitesi incelenmiştir. Biyosensöre uygulanan gerilimin cevap akımına etkisini belirleyebilmek amacıyla çalışma gerilimi, 0,30-0,70 V aralığında değiştirilmiş ve lisin ilavesinden sonra akımdaki değişim ölçülerek, çalışma potansiyeli-akım grafiği çizilmiştir (Şekil 7.30). 0,4 V'a kadar artan akım değerinin potansiyeldeki artışla birlikte bir miktar azaldığı gözlenmiş ve bundan sonraki yapılan çalışmalarda 0,4 V sabit çalışma potansiyeli uygulanmıştır.

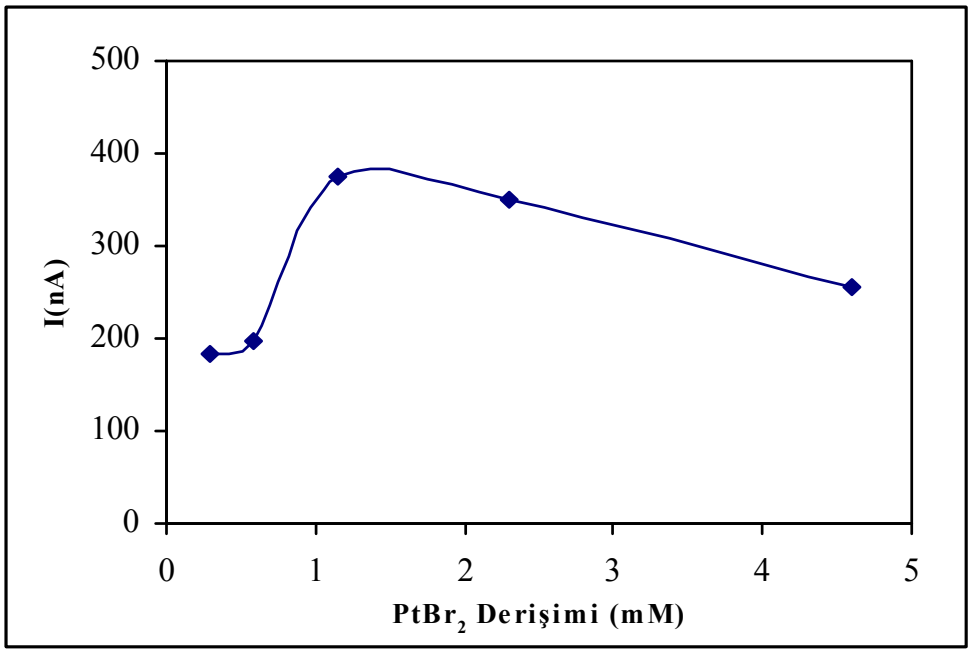


Şekil 7.30. PVF-Pt-LyOx biyosensörünün aktivitesinin uygulanan gerilim ile değişimi (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

7.3.2. $PtBr_2$ derişimi etkisi

PVF-Pt-LyOx biyosensörüne $PtBr_2$ derişiminin etkisini belirlemek için çözelti derişimi 0,2875 mM-4,6 mM arasında değiştirilmiştir. Kullanılan her bir derişimde elektrot aktivitesi incelenmiştir. 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-LyOx biyosensörü ile yapılan çalışmalarda saptanan optimum değerler kullanılmıştır.

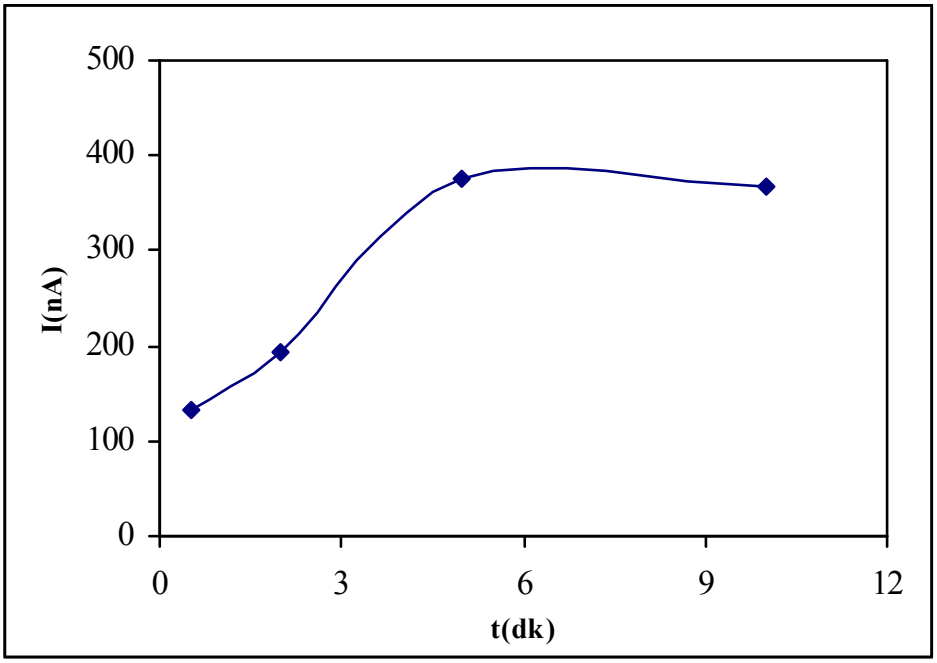
$PtBr_2$ çözeltisinde bekletme süresi 5 dakika olarak sabit tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar kullanılarak farklı $PtBr_2$ derişimine karşı lisin ilavesinden sonraki maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir. Şekil 7.31'de görüldüğü gibi $PtBr_2$ çözelti derişiminin artmasıyla gözlenen akım değeri 1,15 mM $PtBr_2$ derişimine kadar artmakta ve daha yüksek platin derişimiyle hazırlanan elektrotlarda ise akım azalmaktadır. Bu nedenle, çalışmanın bundan sonraki bölümlerinde 1,15 mM $PtBr_2$ çözeltisi ile hazırlanan PVF-Pt-LyOx biyosensörleri kullanılmıştır.



Şekil 7.31. PVF-Pt-LyOx biyosensör aktivitesinin $PtBr_2$ derişimi ile değişimi (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

7.3.3. $PtBr_2$'de bekletme süresi etkisi

Hazırlanan PVF-Pt-LyOx biyosensörünün cevap akımını etkileyen parametrelerden biri $PtBr_2$ çözeltisinde bekletme süresidir. 1,15 mM $PtBr_2$ çözeltisinde bekletme süresi 0,5 dakika ile 10 dakika arasında değiştirilerek 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 lisin ilavesinden sonraki maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir. Şekil 7.32'de görüldüğü gibi $PtBr_2$ çözeltisinde bekletme süresinin artmasıyla gözlenen akım değeri 5 dakikaya kadar artmakta ve daha yüksek bekletme sürelerinde ise akımda çok fazla bir değişim gözlenmemektedir. Polimer yapıda biriken platin miktarının artmasıyla katalitik yüzey alanının artmasından dolayı cevap akımı yükselmekte ve belirli bir süreden sonra yapıda biriken platin miktarı değişmediğinden akım da sabit kalmaktadır. Bundan sonra yapılan çalışmalarda platin biriktirilmesi için 5 dakikalık bekletme süresi kullanılmıştır.



Şekil 7.32 PVF-Pt-LyOx biyosensörü için $PtBr_2$ çözeltisinde bekletme süresine karşı elde edilen maksimum akım değerleri (1,25 mg PVF/mL, 1,15 mM $PtBr_2$, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

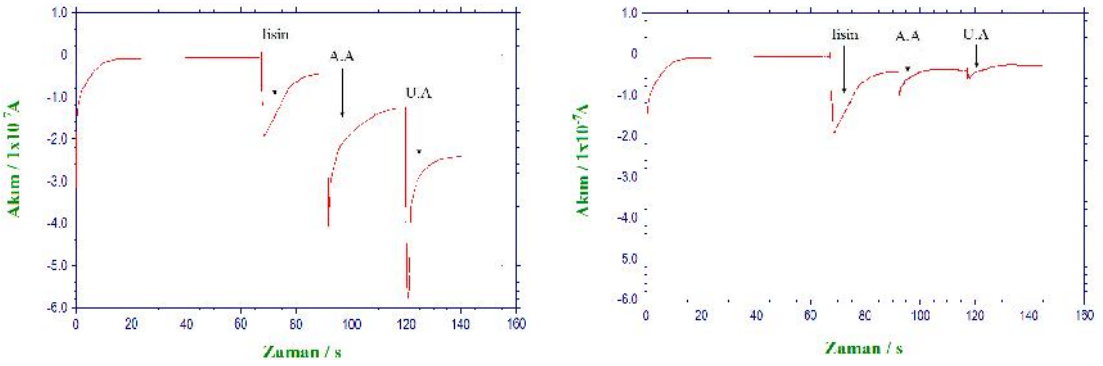
7.3.4. PVF-Pt-LyOx biyosensöründe girişim

PVF-Pt-LyOx biyosensörü ile girişim etkisinin gözlenebileceği arginin, histidin, ornitin, fenilalanin, tirosin ve sistin gibi amino asitlerle amperometrik çalışmalar yapılarak cevap akımlarındaki değişimler incelendi. Çalışma sırasında amino asitlerin derişimi 0,1 mM'da sabit tutularak elde edilen cevap akımlarının lisinin cevap akımına oranı hesaplandı (Çizelge 7.3). PVF-Pt-LyOx biyosensörle elde edilen amperometrik seçicilik katsayıları, daha önce hazırlanan biyosensörle karşılaştırıldığında belirgin bir düşüş olduğu özellikle sistinin girişim etkisinin PVF-LyOx biyosensöre göre yaklaşık 3,2, PVF-Au-LyOx biyosensöre göre ise 1,35 katı kadar azaldığı gözlenmiştir.

Çizelge 7.3. PVF-Pt-LyOx biyosensörü için çeşitli amino asitlerin amperometrik seçicilik katsayıları

Biyosensör	**Amperometrik Seçicilik Katsayısı k_{ij}**					
	Ornitin	Tirosin	Arginin	Histidin	Fenilalanin	Sistin
PVF-Pt-LyOx	0,009	-	-	0,006	0,003	0,745

Ölçüm ortamında bulunabilecek bazı türlerin hazırlanan biyosensörde cevapları incelenmiştir. Bu çalışma sırasında lisin derişimi ve girişim yapabilecek maddelerin derişimleri 0,1 mM'da sabit tutulmuştur. Bu amaçla 0,1 mM lisin için kararlı hal akım eğrisi elde edildikten sonra hücreye girişim yapabilecek maddeler eklenmiş ve akımdaki değişim ölçülmüştür. Askorbik asidin ve ürik asidin aynı derişimde lisin eklenmesi ile elde edilen cevap akımının yaklaşık iki katı kadar olduğu gözlenmiştir (Şekil 7.33a). Bu girişim etkisinin engellenmesi için elektrot nafyon ile modifiye edilmiş ve girişim yapan türlerin cevap akımları incelenmiştir. Nafyonla modifiye edilen Naf-PVF-Pt-LyOx biyosensörde askorbik asit ve ürik asit girişiminin PVF-Pt-LyOx biyosensöre göre %97 azaldığı ve böylelikle nafyonun girişim yapan türleri engellendiği gözlenmiştir (Şekil 7.33b). Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde askorbik asit ve ürik asit girişiminin nafyon film kullanılarak giderildiği gözlenmiştir (Kim, 1996, Xu, 2002, Yuan, 2005).

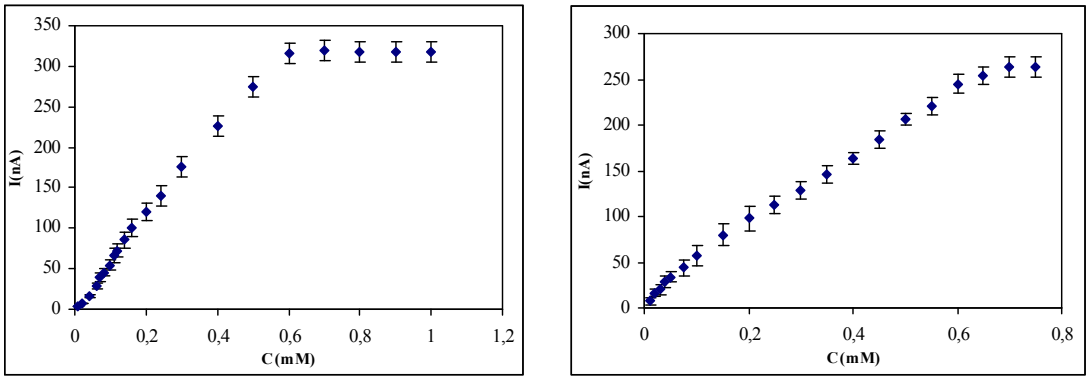


Şekil 7.33. a) PVF-Pt-LyOx, b)Naf-PVF-Pt-LyOx biyosensörlerinin 0,1 mM Lisin, 0,1 mM Askorbik Asit ve 0,1 mM Ürik Asit eklenmesi ile elde edilen cevap akımları (1,25 mg PVF/mL, 1,15 mM $PtBr_2$, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

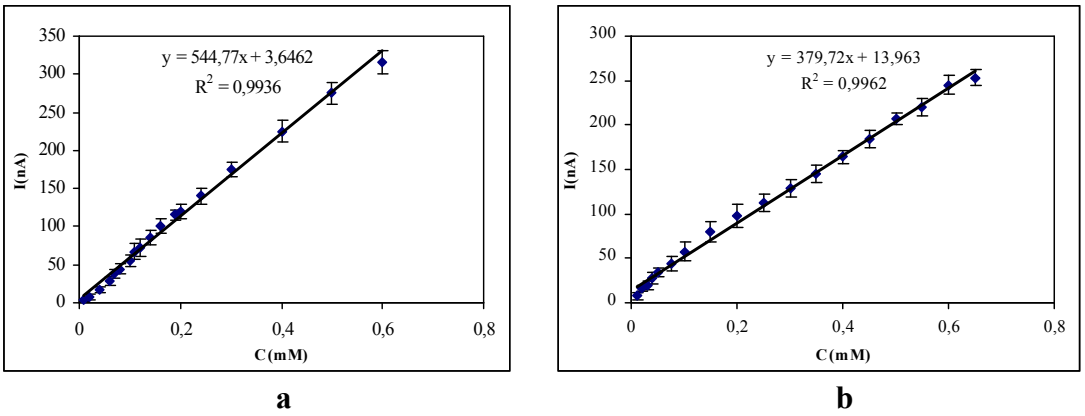
7.3.5. PVF-Pt-LyOx biyosensörüne substrat derişimin etkisi

PVF-Pt-LyOx ve Naf-PVF-Pt-LyOx elektrodunun maksimum aktivitesinin ve doğrusal çalışma aralığının saptanması için ölçülen akım değerlerine substrat derişimi etkisi incelenmiştir. Hazırlanan biyosensörlerin daha önce saptanan optimum koşullarda 0,1 M pH 7,40 fosfat tamponunda ve 30 °C sıcaklıkta farklı lisin derişimlerinde verdiği akım değerleri belirlenmiştir ve derişime karşı cevap akımı grafikleri çizilmiştir (Şekil 7.34).

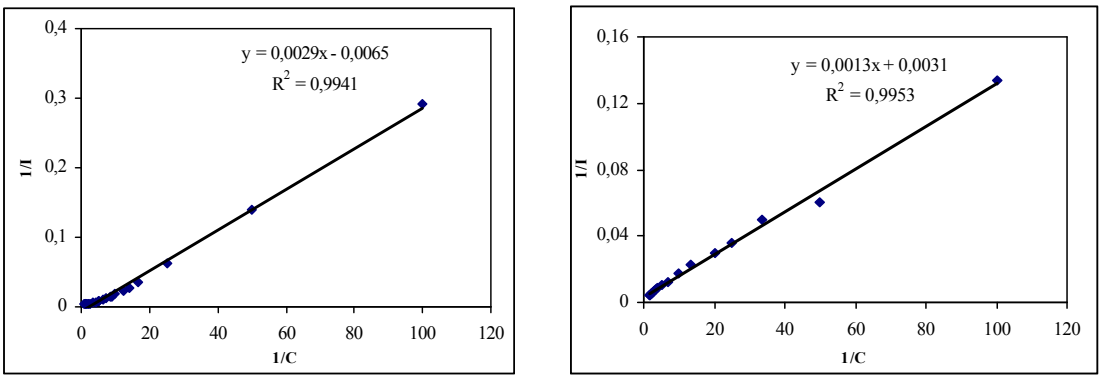
PVF-Pt-LyOx ve Naf-PVF-Pt-LyOx biyosensörleri 0,6 mM ve 0,65 mM'a kadar lisin derişimi orantılı akım değerleri vermektedir (Şekil 7.35). Ölçülebilir akımı üreten minimum lisin derişimleri ise PVF-Pt-LyOx ve Naf-PVF-Pt-LyOx biyosensörleri için sırasıyla $6{,}0x10^{-3}$ mM ve $4{,}5x10^{-3}$ mM olarak bulunmuştur.



7.34. a) PVF- Pt-LyOx, **b)** Naf-PVF- Pt-LyOx biyosensör aktivitelerinin lisin derişimi ile değişimi (1,25 mg PVF/mL, 1,15 mM $PtBr_2$, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)



Şekil 7.35. a) PVF-Pt-LyOx, **b)** Naf- PVF-Pt-LyOx biyosensör aktivitelerinin lisin derişimi ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı (1,25 mg PVF/mL, 1,15 mM $PtBr_2$, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)



a **b**

Şekil 7.36. PVF-Pt-LyOx biyosensörü için Lineweaver-Burk grafikleri (1,25 mg PVF/mL, 1,15 mM $PtBr_2$, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

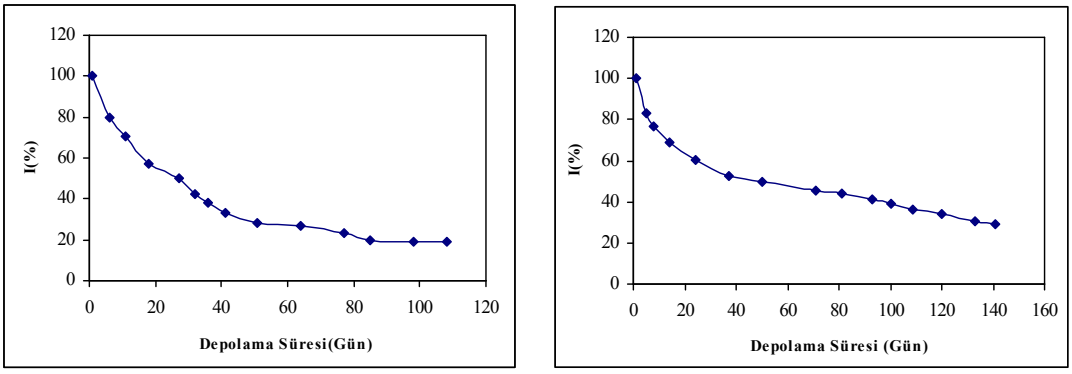
Hazırlanan biyosensörler için lisin derişiminin tersine (1/C) karşı cevap akımlarının tersi (1/I) değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 7.36) çizilerek görünür Michaelis-Menten (Kmg) sabitleri tayin edilmiştir. PVF-Pt-LyOx biyosensörü için 0,45 mM, Naf-PVF-Pt-LyOx biyosensörü için 0,42 mM lisin değeri bulunmuştur. Biyosensörlerin duyarlıkları da Lineweaver-Burk grafikleri kullanılarak hesaplanmış ve PVF-Pt-LyOx biyosensörü için 10,83 μA mM^{-1} cm^{-2}, Naf-PVF-Pt-LyOx biyosensörü için 24,52 μA mM^{-1} cm^{-2} olarak belirlenmiştir. Ayrıca biyosensörlerin tekrarlanabilirlikleri 0,25 mM lisinin çözelti ortamına eklenmesi ile beşer kez yapılan deneyler sonucu akım-zaman eğrilerinden elde edilen cevap akımlarınının bağıl standart sapma (BSS) değerleri hesaplanarak belirlendi. PVF-Pt-LyOx ve Naf-PVF-Pt-LyOx biyosensörlerinin tekrarlanabilirlikleri sırasıyla %4,57 (BSS) ve %4,98 (BSS) olarak bulunmuştur.

7.3.6. PVF-Pt-LyOx biyosensörünün kullanım kararlılığı

Biyosensörün aynı gün içinde kaç kez kullanılabileceğinin araştırılması için optimum deney şartlarında hazırlanan PVF-Pt-LyOx biyosensörü ile bir dizi ölçüm alınmış ve her kullanımda biyosensörle 4 ölçüm yapılmış ve 15 ölçüm sonunda aktivitesini %78 oranında koruduğu gözlenmiştir.

7.3.7. PVF-Pt-LyOx biyosensörünün depolama kararlılığı

PVF-Pt-LyOx ve Naf-PVF-Pt-LyOx biyosensörlerinin; 0,01 M pH 7,4 fosfat tamponu içinde 4 ^{o}C de muhafaza edilerek depolama kararlılığı araştırılmıştır. Biyosensör aktivitelerinin depolama süresi ile değişimi incelenmiş ve depolama süresine karşı cevap akımındaki değişim grafiğe geçirilmiştir. PVF-Pt-LyOx biyosensöründe 25 gün sonunda aktivite kaybının %50 oranında olduğu ve bundan sonraki günlerde aktivite de cok fazla değişiklik olmadığı ve 108 güne kadar yapılan ölçümlerde %18 oranında aktivitesini koruduğu gözlenmiştir (Şekil 7.37a). Naf-PVF-Pt-LyOx biyosensöründe ise 50 gün sonunda aktivite kaybının %50 oranında olduğu ve bundan sonraki günlerde aktivite de çok fazla değişiklik olmadığı ve 100 güne kadar yapılan ölçümlerde %40 oranında aktivitesini koruduğu gözlenmiştir (Şekil 7.37b). Sonuçlar incelendiğinde nafyon modifiye edilmiş biyosensörün aktivitesini daha uzun süre koruduğu görülmektedir.

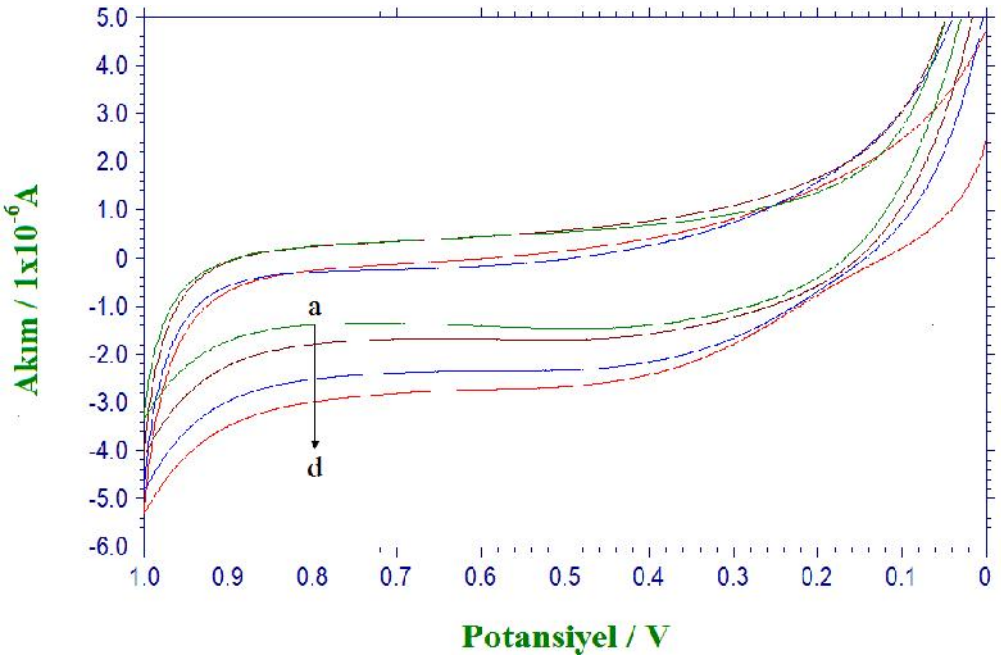


a **b**

Şekil 7.37. a) PVF-Pt-LyOx, **b)**Naf-PVF-Pt-LyOx biyosensör aktivitelerinin depolama süresi ile değişimi (1,25 mg PVF/mL, 1,15 mM $PtBr_2$, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,4 V)

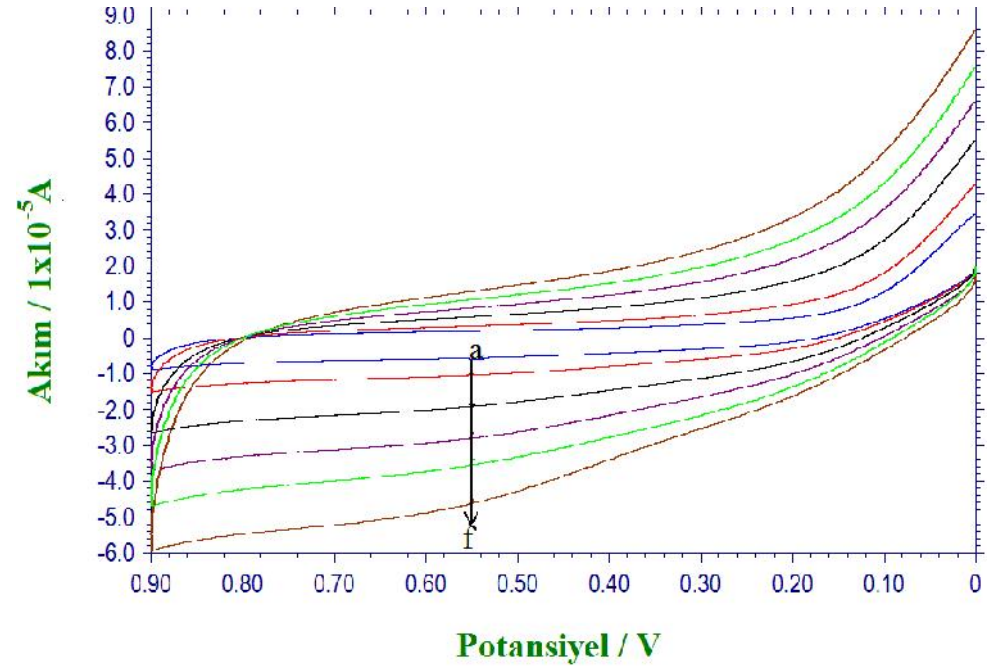
7.3.8. PVF-Pt-LyOx biyosensörünün aktivitesinin voltametrik yöntemle incelenmesi

PVF-Pt-LyOx biyosensörünün amperometrik yöntemle optimum çalışma şartları belirlendikten sonra voltametrik davranışı incelenmiştir. Dönüşümlü voltametri yöntemi ile 0,0-1,0 V arasında potansiyel taraması yapılarak kararlı akım eğrisi elde edildikten sonra giderek artan derişimlerde lisin eklenmiş ve her eklemeden sonra voltamogramlar kaydedilmiştir. Lisin eklenmesi ile orantılı olarak akım değerlerinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 7.38).



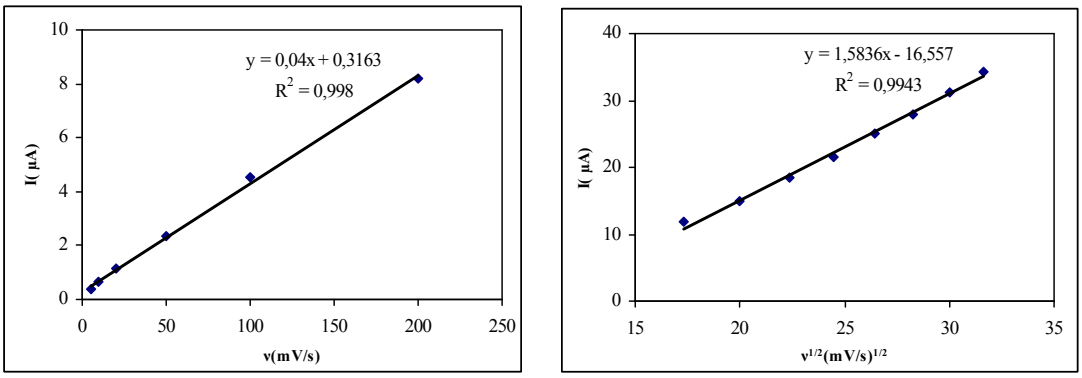
Şekil 7.38. PVF-Pt-LyOx biyosensörü için a) 0 b) 0,1 c) 0,3 d) 1,5 mM Lisin eklenmesi İle elde edilen dönüşümlü voltamogramlar (1,25 mg PVF/mL, 1,15 mM $PtBr_2$, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 50 mV/s)

Enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan hidrojen peroksitin yükseltgenmesine gerilim tarama hızının etkisini incelemek için pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde PVF-Pt-LyOx biyosensörü için farklı tarama hızlarında (10-1000 mV/s) dönüşümlü voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 7.39).



Şekil 7.39. PVF-Pt-LyOx biyosensörü için a) 100, b) 200, c) 400, d) 600,e) 800, f) 1000 mV/s gerilim tarama hızları ile elde edilen dönüşümlü voltamogramlar (1,25 mg PVF/mL, 1,15 mM $PtBr_2$, 1,00 mg LyOx/ mL, 1,5 mM Lisin, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

Gerilim tarama hızına (ν) ve tarama hızının karekköküne ($\nu^{1/2}$) karşı cevap akımı değerlerinin grafikleri çizilerek (Şekil 7.40) cevap akımının gerilim tarama hızı ile değişimi incelenmiştir. Düşük gerilim tarama hızlarında (5-200 mV/s) artan tarama hızı ile cevap akımı doğrusal olarak arttığından gerçekleşen enzimatik reaksiyonun yüzey kontrollü bir proses olduğu düşünülmektedir. 200 mV/s üstündeki tarama hızlarında ise cevap akımı değerlerinin tarama hızının karekökü ile doğrusal olarak değiştiği gözlendiğinden yüksek tarama hızlarında (200-1000 mV/s) elektron aktarım prosesinin difüzyon kontrollü olduğu düşünülmektedir.



a **b**

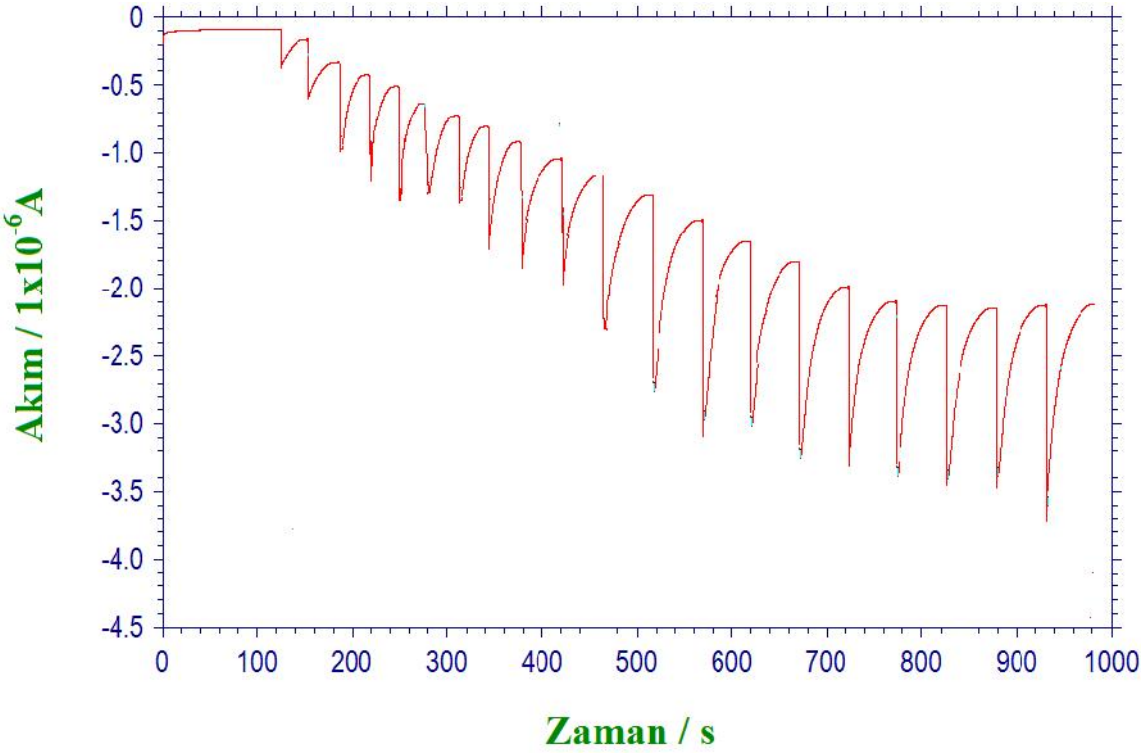
Şekil 7.40. PVF-Pt-LyOx biyosensörü için a) gerilim tarama hızına, b) gerilim tarama hızının karekköküne karşı cevap akımı grafiği (1,25 mg PVF/mL, 1,15 mM $PtBr_2$, 1,00 mg LyOx/ mL, 1,5 mM Lisin, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

7.4. $PVF^{+}LyOx^{-}$ Biyosensörünün Optimizasyonu

Sabit gerilimli elektroliz işlemi ile polimerin yükseltgenmiş formu olan $PVF^{+}ClO_4^{-}$'ın Pt elektrot yüzeyine elektroçöktürülmesi sağlanmıştır. Gerilim kontrollü elektrolizle elektrodun modifiye edilmesi 0,1 M TBAP içeren metilen klorürde, 1 mg/mL PVF çözeltisinin + 0,7 V'daki elektrolizi ile yapılmıştır.

Hazırlanan biyosensörün aktivitesine etkili olabilecek faktörler çalışma elektrodunun modifiye edilmesi sırasında kullanılan PVF film kalınlığı, enzimin tutuklanmasında kullanılan çözeltideki enzim derişimi, enzim çözeltisinde bekletme süresidir. Ortam pH'ı, sıcaklık, substrat derişimi ve girişim ise elektrot aktivitesinde etkili olabilecek ortam koşulları olarak belirlenmiştir. Bu çalışmalar sabit bir çalışma voltajında farklı lisin derişimleri için elde edilen kararlı hal akımlarının ölçülmesi ile

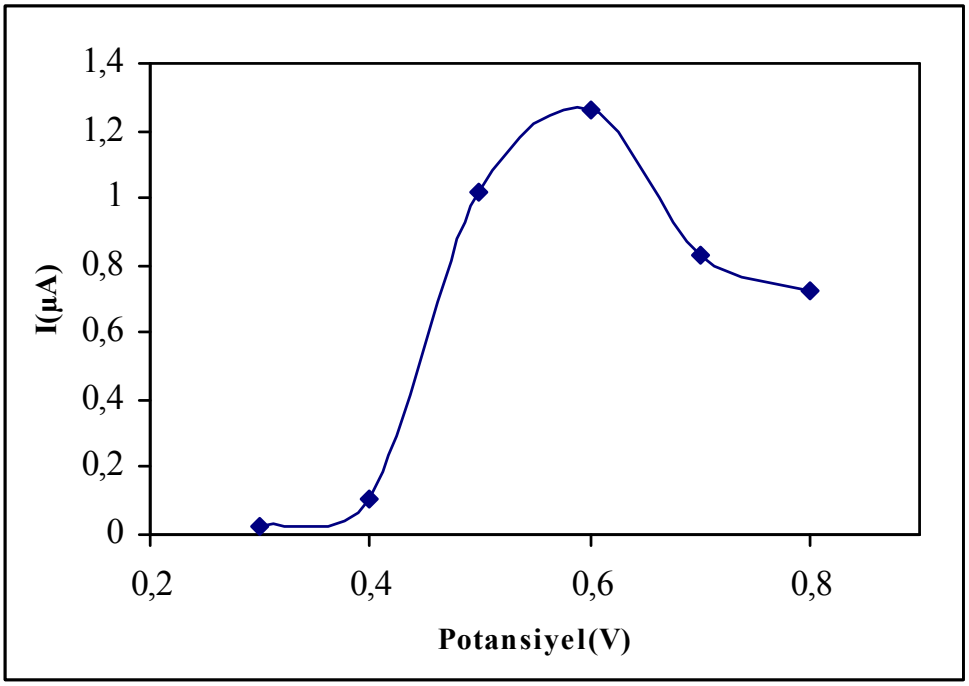
gerçekleştirilmiştir(Şekil 7.41). Cevap eğrilerinden görüldüğü gibi akımın sabitlenmesi için gereken süre yani biyosensörün cevap süresi 35-40 s arasındadır.



Şekil 7.41. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörüne ait akım-zaman eğrisi (1,485x10^{-6} mol PVF^{+} cm^{-2}, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)

7.4.1. Uygulanan gerilimin etkisi

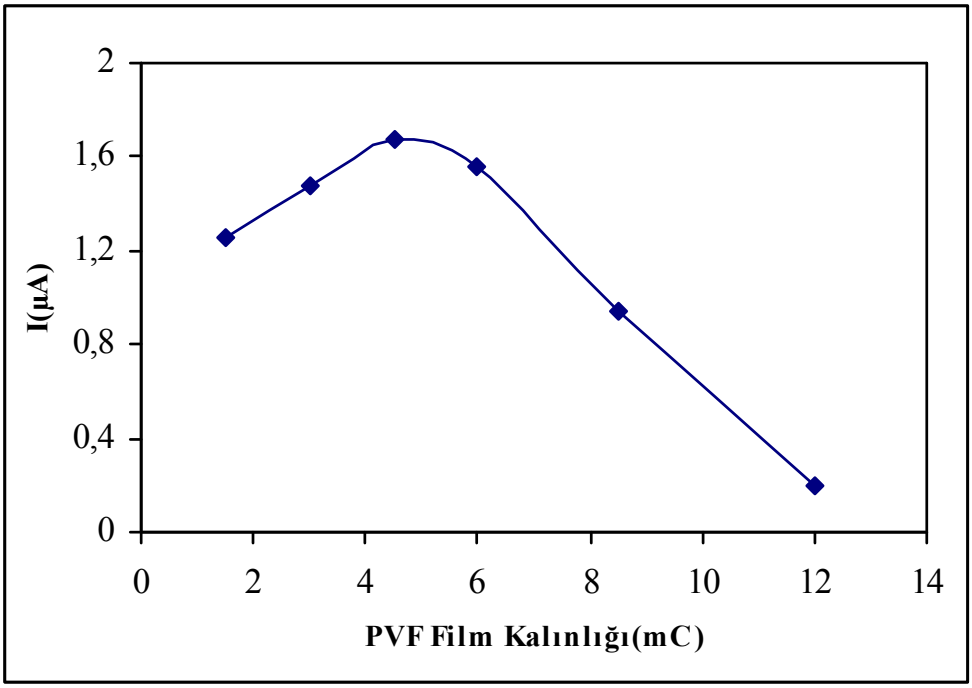
$PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün hazırlanmasında cevap akımını etkileyen faktörlerden ilki uygulanan potansiyeldir. 4,57x10^{-7} mol PVF^{+} cm^{-2} (1,5mC) polimer film ile kaplanan çalışma elektrodu derişimi 1 mg LyOx /mL olan enzim çözeltisinde 30 dk bekletilerek $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü hazırlanmıştır. Bu biyosensörünün aktivitesine, uygulanan gerilimin etkisini incelemek amacıyla çalışma potansiyeli, 0,3-0,8 V aralığında değiştirilmiştir. Lisin ilavesinden sonra elde edilen sonuçlar kullanılarak uygulanan gerilime karşı maksimum akım değerlerinde en yüksek akım değeri 0,6 V'da elde edilmiştir (Şekil 7.42). Bundan sonraki çalışmalarda 0,6 V gerilim değeri kullanılmıştır.



Şekil 7.42. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün aktivitesinin uygulanan gerilim ile değişimi ($4{,}57x10^{-7}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 1,0 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

7.4.2. $PVF^{+}ClO_4^{-}$ film kalınlığı

Elektrot yüzeyine kaplanan polimer filmin kalınlığı biyosensör aktivitesini etkileyen parametrelerden biridir. Hazırlanan biyosensörün aktivitesine kaplama kalınlığının etkisini incelemek amacıyla immobilizasyon işlemi sırasında elektrot yüzeyine $PVF^{+}ClO_4^{-}$'ın kaplanması sırasında geçirilen yük miktarı kontrol edilmiştir. Yük miktarı 1,5 mC ($4{,}95x10^{-7}$ mol PVF^{+} cm^{-2}) ile 12,0 mC ($3{,}96x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}) aralığında değiştirilmiştir. Her bir polimer film kalınlığı için biyosensör aktivitesi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar kullanılarak kaplama kalınlığına karşı maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 7.43). 4,5 mC PVF^{+}'a kadar artan akım değeri daha yüksek film kalınlıklarında azalmıştır. Belli bir film kalınlığına ulaşana kadar polimerik yapıya giren lisin oksidaz enzim miktarı film kalınlığı ile orantılıdır. Bu kritik kalınlıktan sonra difüzyon kısıtlaması nedeniyle yapıya giren enzim miktarı değişmemesine rağmen film kalınlığının daha da arttırılması akımda düşmeye neden olmuştur. Bu nedenle yapılan çalışmalarda 4,5 mC ($1{,}485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2})'luk yük aktarımıyla oluşturulan polimer filmleri kullanılmıştır.



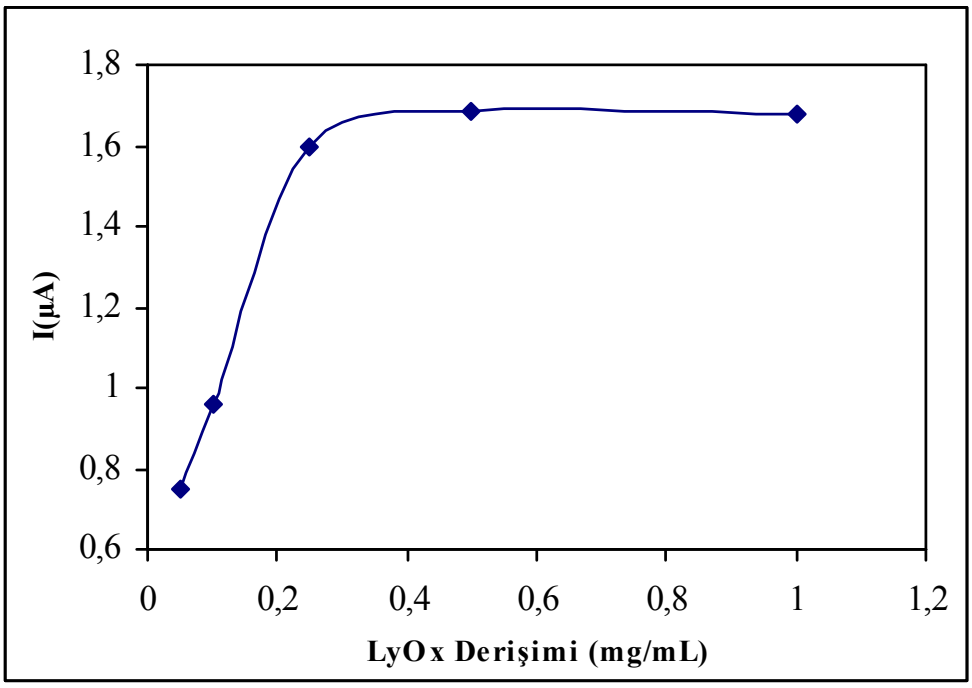
Şekil 7.43. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün aktivitesinin PVF^{+} film kalınlığı ile değişimi (1,0 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)

7.4.3. LyOx derişimi etkisi

Polimerik yapı içerisinde tutuklanan LyOx miktarı, biyosensörün hazırlanması sırasında kullanılan çözeltideki enzim derişimine bağlıdır. Hazırlanan biyosensörün aktivitesine enzim derişiminin etkisini incelemek amacıyla polimer film kalınlığı sabit tutularak, tutuklama işlemi sırasında kullanılan çözeltideki enzim miktarı 0,05 mg LyOx/mL ile 2 mg LyOx/mL enzim derişimleri arasında değiştirilmiştir. Enzimde bekletme süresi 30 dakika olarak sabit tutulmuştur. Kullanılan her bir enzim derişiminde elektrot aktivitesi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar kullanılarak enzim derişimine karşı lisin ilavesinden sonraki maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 7.44). Farklı derişimdeki LyOx çözeltileri kullanılarak hazırlanan biyosensörler için akım cevapları incelendiğinde, tutuklama işlemi sırasında kullanılan LyOx çözeltisinin derişiminin artmasıyla artan akım değerinin 0,5 mg/mL LyOx derişiminden sonra sabit kaldığı gözlenmiş ve çalışmanın daha sonraki aşamalarında biyosensörler hazırlanırken bu enzim derişimi kullanılmıştır.

Enzim derişiminin azalması ile cevap akımı değerindeki düşüşün polimerik yapı içerisinde daha az miktarda enzim tutuklanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Belli bir enzim derişiminden sonra ise polimer yapı içerisinde maksimum miktarda

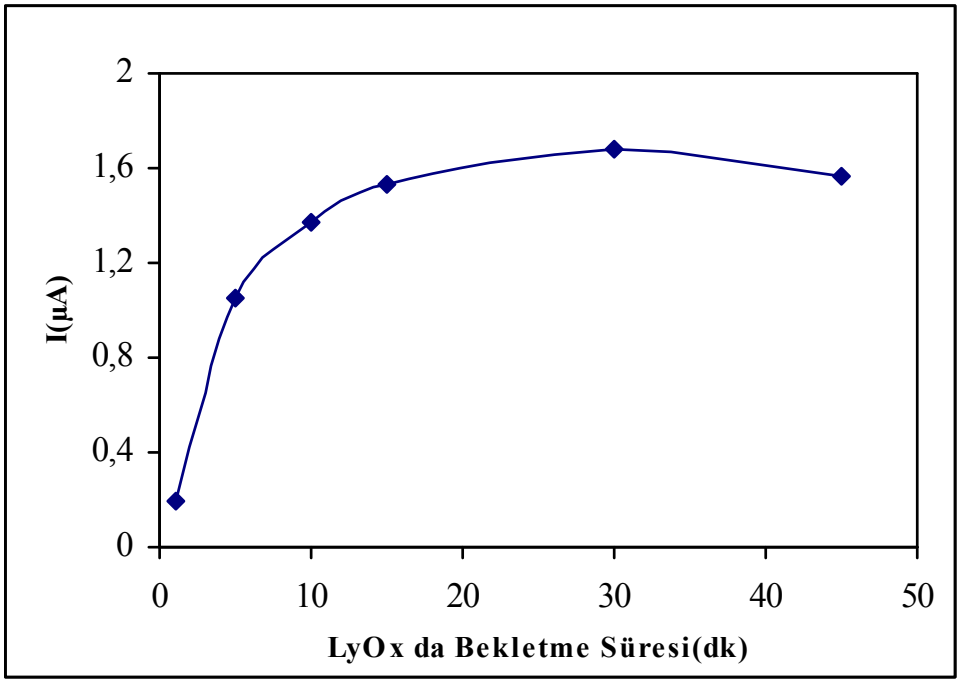
enzim tutuklanmakta ve çözeltideki enzim miktarının artmasıyla polimer yapıda tutuklanan enzim miktarı değişmemektedir.



Şekil 7.44. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü için LyOx derişimine karşı elde edilen maksimum akım değerleri ($1,485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)

7.4.4. LyOx'da bekletme süresinin etkisi

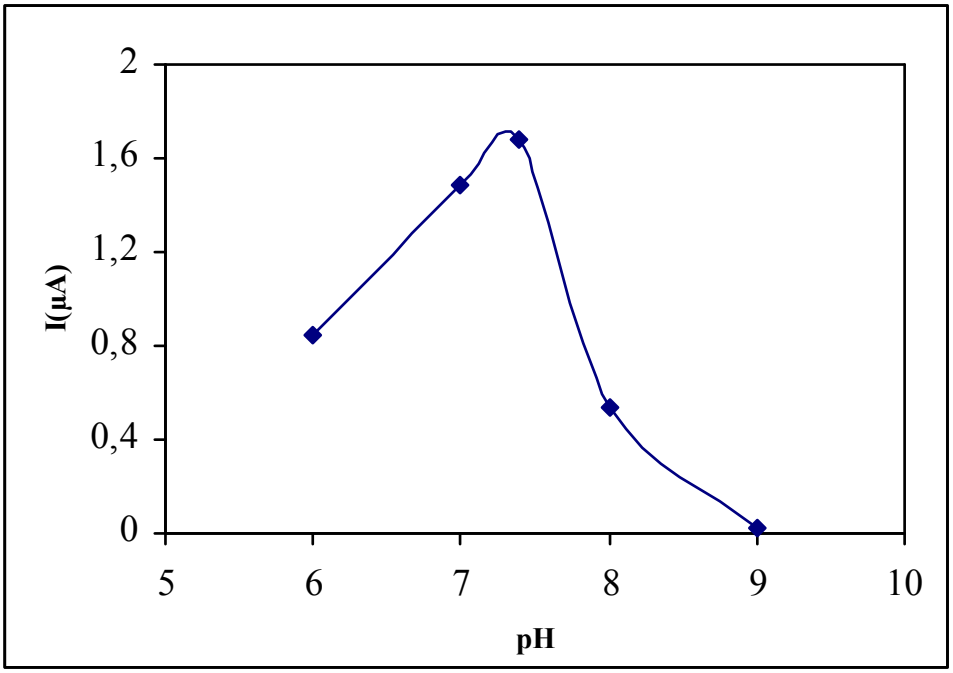
Hazırlanan $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün aktivitesine enzim çözeltisinde bekletme süresinin etkisinin incelenmesi amacıyla enzimde bekletme süresi 1 dakika ile 45 dakika arasında değiştirilmiştir. Kullanılan her bir bekletme süresinde elektrot aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışmalar sırasında 0,10 M pH 7,40 fosfat tamponu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar kullanılarak enzim çözeltisinde bekletme süresine karşı lisin ilavesinden sonraki maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir, Şekil 7.45'de görüldüğü gibi enzimde bekletme süresinin artmasıyla gözlenen akım değeri artmakta ve belirli bir bekletme süresinden sonra akım değerinde bir miktar azalmayla birlikte akım sabit kalmaktadır. Maksimum aktivitenin gözlendiği bekletme süresinin 30 dakika olduğu bulunmuş ve bundan sonraki yapılan çalışmalarda enzim çözeltisinde bekletme süresi 30 dakika olarak kullanılmıştır.



Şekil 7.45. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü için LyOx çözeltisinde bekletme süresine karşı elde edilen maksimum akım değerleri ($1,485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)

7.4.5. pH etkisi

Biyosensörlerin aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri de çalışma ortamının pH'sıdır. Tampon çözeltinin pH'sı enzimin izoelektrik noktasının altında ise, enzim pozitif yüklenmekte ve polimer yapıda tutuklanamamaktadır. Enzimin polimer yapıda kalması için izoelektrik noktasının üstündeki pH değerleri kullanılmalıdır. Böylece enzimin negatif yüklenmesi sağlanmalıdır. LyOx enziminin izoelektrik noktası olan pH 4,35 üzerindeki pH' larda yani pH 6,0 ile 10,0 arasında değişen 0,1 M fosfat tampon çözeltilerinde $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün aktivitesine ortam pH'sının etkisini incelenmiştir. Farklı pH'lardaki tampon çözeltilerde lisin ilavesinden sonra maksimum akım değerleri ölçülmüş ve şekil 7.46'da verilmiştir. Biyosensörün maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 7,4 olarak belirlenmiştir.



Şekil 7.46. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü için kullanılan tampon çözelti pH'sına bağlı olarak elde edilen maksimum akım değerleri ($1,485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)

7.4.6. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensöründe girişim

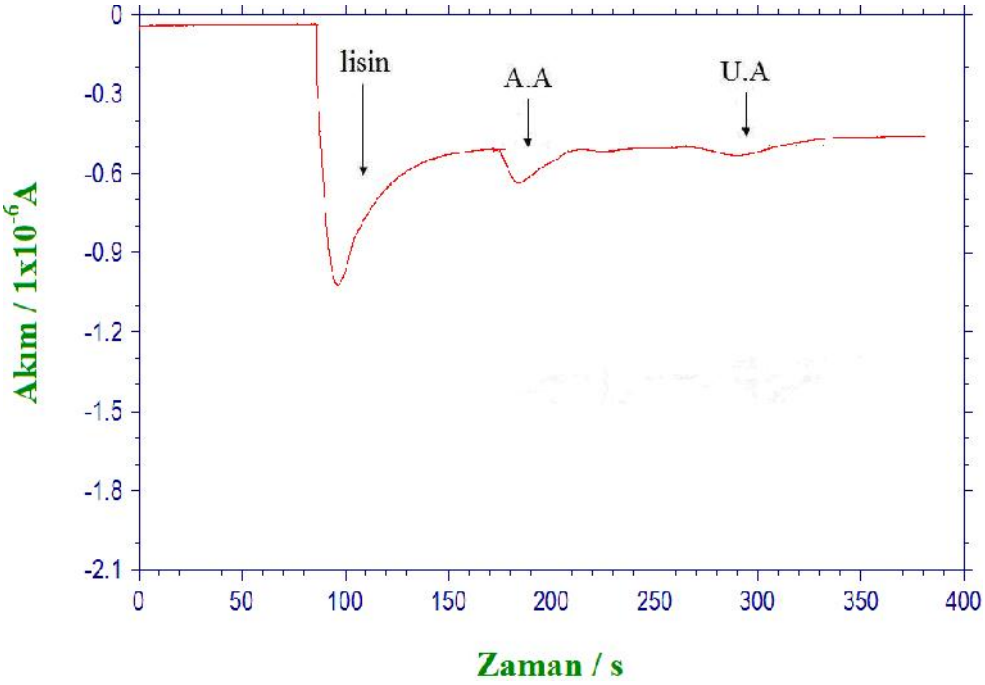
$PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün arginin, histidin, ornitin, fenilalanin, tirosin ve sistin gibi amino asitlere karşı girişim etkisinin incelenmesi için 1 mM sabit derişiminde amino asitler çalışma ortamına eklenerek cevap akımlarındaki değişimler izlendi. Her bir amino asit için amperometrik seçicilik katsayıları amino asitlerin cevap akımının lisinin cevap akımına oranı alınarak hesaplandı. Çizelge 7.4'de görüldüğü gibi ornitin, sistin ve arginin haricindeki diğer amino asitlerin belirgin bir girişim etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 7.4. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü için çeşitli amino asitlerin amperometrik seçicilik katsayıları

Biyosensör	**Amperometrik Seçicilik Katsayısı k_{ij}**					
	Ornitin	Tirosin	Arginin	Histidin	Fenilalanin	Sistin
$PVF^{+}LyOx^{-}$	0,314	0,021	0,358	0,016	0,035	0,467

Ölçüm ortamında bulunabilecek ürik asit ve askorbik asit gibi girişim yapan türlerin hazırlanan biyosensörde cevapları incelenmiştir. Bu çalışma sırasında lisin ve

girişim yapabilecek maddelerin derişimleri 0,25 mM'da sabit tutulmuştur. Bu amaçla lisin için kararlı hal akım eğrisi elde edildikten sonra hücreye girişim yapabilecek maddeler eklenmiş ve akımdaki değişim ölçülmüştür. Askorbik asidin ve ürik asidin herhangi bir girişime neden olmadığı gözlenmiştir (Şekil 7.47).

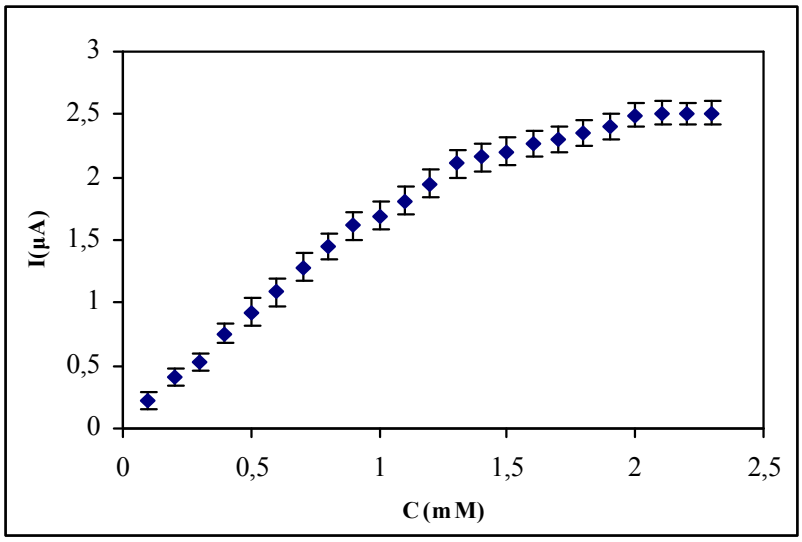


Şekil 7.47. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü için 0,25 mM Lisin, 0,25 mM Askorbik Asit ve 0,25 mM Ürik Asit eklenmesi ile elde edilen ile elde edilen cevap akımları ($1,485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2},0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)

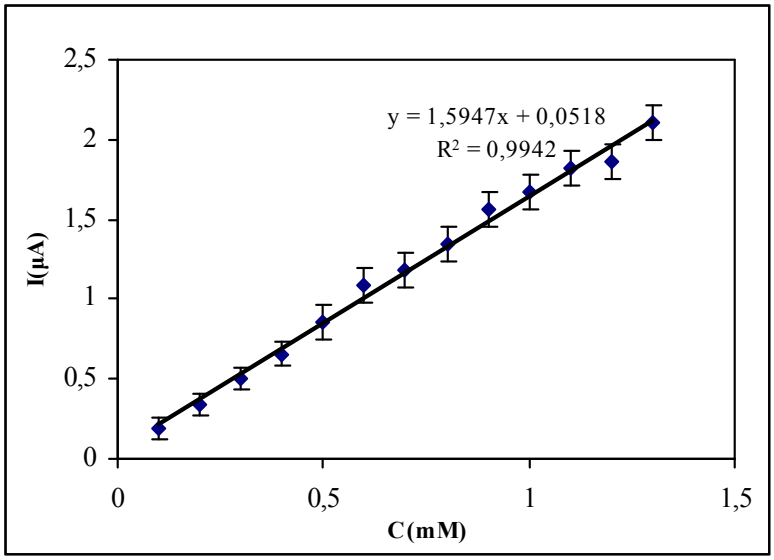
7.4.7. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörüne substrat derişiminin etkisi

Belirli derişimlerde lisin çözeltisi eklenmesi ile akım-zaman eğrisindeki gözlenen akım değişimleri, lisin derişimine karşı grafiğe geçirilerek $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü için şekil 7.48'de görülen kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bu kalibrasyon eğrisi optimum şartlarda hazırlanan elektrotlarla 3 kez tekrarlanmıştır. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü 1,3 mM'a kadar lisin derişimi ile orantılı akım değerleri vermektedir (Şekil 7.49). Lisin derişiminin artırılması ile cevap akımı bir miktar daha artmakta ve 2,0 mM lisin derişiminde sabit değere ulaşmakta ve daha yüksek derişimlerde akım değerinde bir artış olmamaktadır. Akım değerinde bir değişim olmamasının sebebi 2,0 mM lisin derişiminde, polimer film içerisindeki enzimin artık substrata karşı doygunluğa ulaşmasındandır. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü için ölçülebilir akımı üreten minimum lisin derişiminin ise $5,0x10^{-3}$ mM olduğu bulunmuştur. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü için lisin

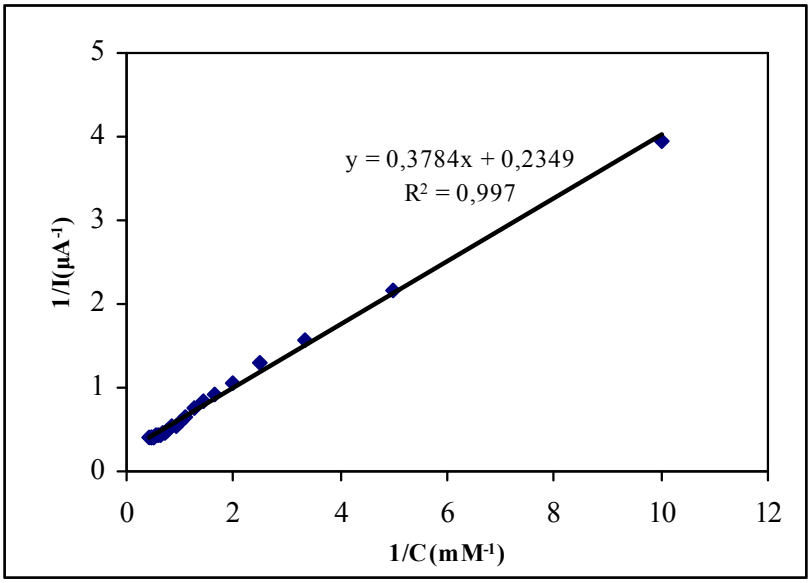
derişimlerinde gözlenen akım değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 7.50) çizilmesi ile görünür Michaelis-Menten (Kmg) sabiti ve duyarlık hesaplanmış sırasıyla 1,63 mM lisin ve 84,07 μA mM^{-1} cm^{-2} olarak bulunmuştur. Ayrıca $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün tekrarlanabilirliği 0,8 mM lisinin çözelti ortamına eklenmesi ile beşer kez yapılan deneyler sonucu akım-zaman eğrilerinden elde edilen cevap akımlarınının bağıl standart sapma (BSS) değerinin hesaplanması ile %3,65 (BSS) olarak bulunmuştur.



Şekil 7.48. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensör aktivitesinin lisin derişimi ile değişimi (1,485x10^{-6} mol PVF^{+} cm^{-2}, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)



Şekil 7.49. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensör aktivitesinin lisin derişimi ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı (1,485x10^{-6} mol PVF^{+} cm^{-2}, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)



Şekil 7.50. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü için Lineweaver-Burk grafiği
($1{,}485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)

7.4.8. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün kullanım kararlılığı

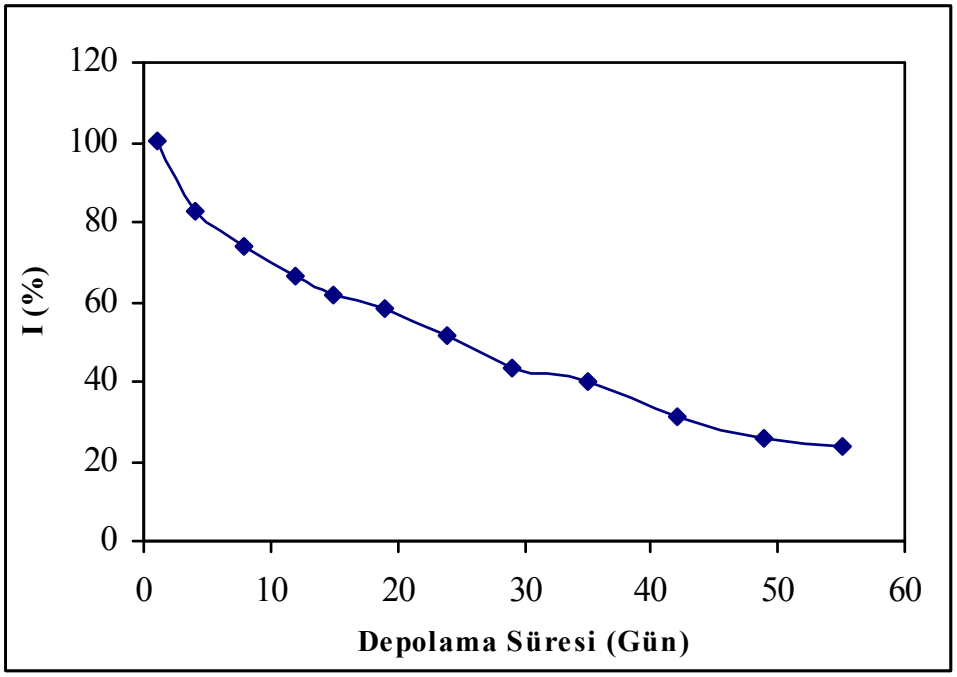
Biyosensörler için önemli bir diğer parametre ise hazırlanan bir biyosensörle aynı gün içerisinde kaç kez ölçüm yapılabileceği yani gün içindeki kullanım sayısıdır. Biyosensörlerin kullanım sayısının artmasıyla birlikte enzimlerin aktivitesinde azalma gözlenebilir. Bu azalış yüzeye tam olarak tutuklanamamış enzim moleküllerinin her bir kullanımda yüzeyden ayrılmasından kaynaklanmaktadır. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması için optimum deney şartlarında hazırlanan elektrotla aynı gün içinde bir dizi ölçüm alınmıştır. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün 15 ölçüm sonunda aktivitesini %75 oranında koruduğu gözlenmiştir.

7.4.9. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün depolama kararlılığı

Enzimler çözelti içinde saklandıkları zaman sıcaklık, iyonik şiddet ya da pH gibi ortam şartlarından etkilendikleri için yapısal değişime uğrayabilir ve aktivitelerinde azalma gözlenebilir.

Optimum şartlar kullanılarak hazırlanan $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü 0,01 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 4 ^{o}C de muhafaza edilerek ve belirli aralıklarla ölçümler alınarak depolama süresinin biyosensör aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Farklı günlerde elde edilen cevap akımları grafiğe geçirilmiştir. Şekil 7.51'de görüldüğü gibi biyosensörün 25 gün sonunda aktivite kaybının %50 oranında olduğu ve bundan sonraki

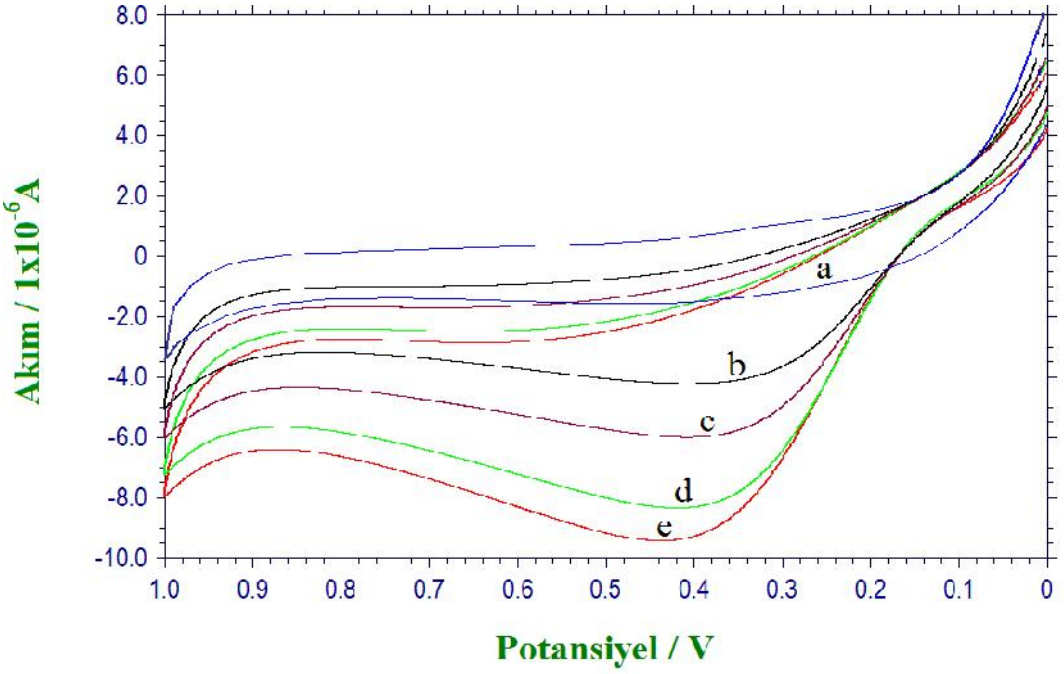
günlerde aktivide de çok fazla değişiklik olmadığı ve 50 güne kadar yapılan ölçümlerde %25 oranında aktivitesini koruduğu gözlenmiştir.



Şekil 7.51. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensör aktivitesinin depolama süresi ile değişimi ($1{,}485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)

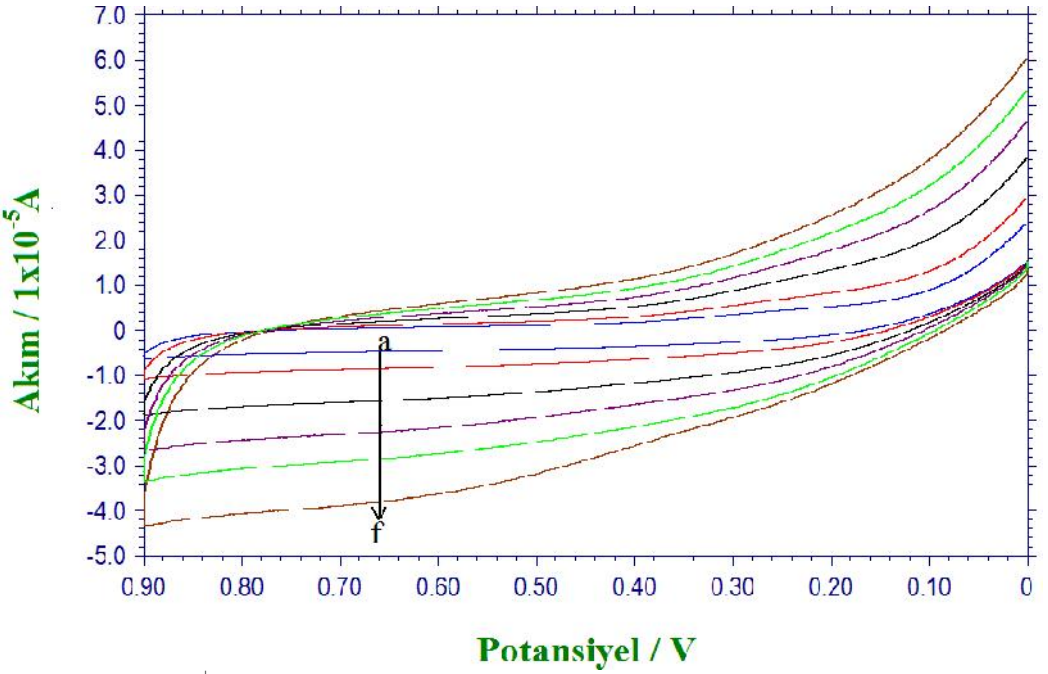
7.4.10. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün aktivitesinin voltametrik yöntemle incelenmesi

$PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün optimum çalışma koşulları amperometrik yöntemle belirlendikten sonra biyosensörün voltametrik yöntemle aktivitesi incelenmiştir. Dönüşümlü voltametri yöntemi ile 0,0-1,0 V arasında potansiyel taraması yapılarak kararlı akım eğrisi elde edildikten sonra giderek artan derişimlerde lisin eklenmiş ve her eklemeden sonra voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 7.52). Lisin eklenmesi ile orantılı olarak akım değerlerinin arttığı gözlenmektedir.



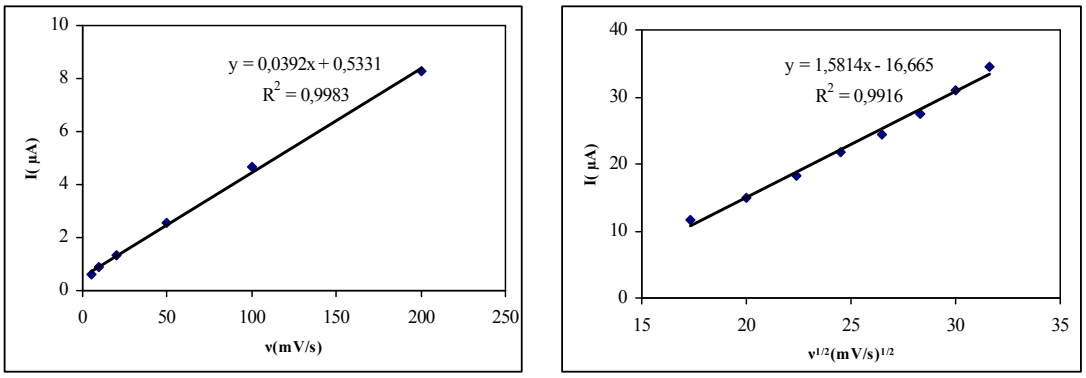
Şekil 7.52. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü için a) 0 b) 0,5 c) 0,8 d) 1,4 e) 2,0 mM Lisin eklenmesi ile elde edilen dönüşümlü voltamogramlar ($1,485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 50 mV/s)

Enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan hidrojen peroksitin yükseltgenmesine gerilim tarama hızının etkisini incelemek için pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü için farklı tarama hızlarında (10-1000 mV/s) dönüşümlü voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 7.53).



Şekil 7.53. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü için a) 100, b) 200, c) 400, d) 600,e) 800, f) 1000 mV/s gerilim tarama hızları ile elde edilen dönüşümlü voltamogramlar ($1,485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 0,5 mg LyOx /mL, 0,8 mM Lisin, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

Gerilim tarama hızına (ν) ve tarama hızının karekköküne ($\nu^{1/2}$) karşı cevap akımı değerlerinin grafikleri çizilerek (Şekil 7.54) cevap akımının gerilim tarama hızı ile değişimi incelenmiştir. Düşük gerilim tarama hızlarında (5-200 mV/s) artan tarama hızı ile cevap akımı doğrusal olarak arttığından gerçekleşen enzimatik reaksiyonun yüzey kontrollü bir proses olduğu düşünülmektedir. 200 mV/s üstündeki tarama hızlarında ise cevap akımı değerlerinin tarama hızının karekökü ile doğrusal olarak değiştiği gözlendiğinden yüksek tarama hızlarında (200-1000 mV/s) elektron aktarım prosesinin difüzyon kontrollü olduğu düşünülmektedir.

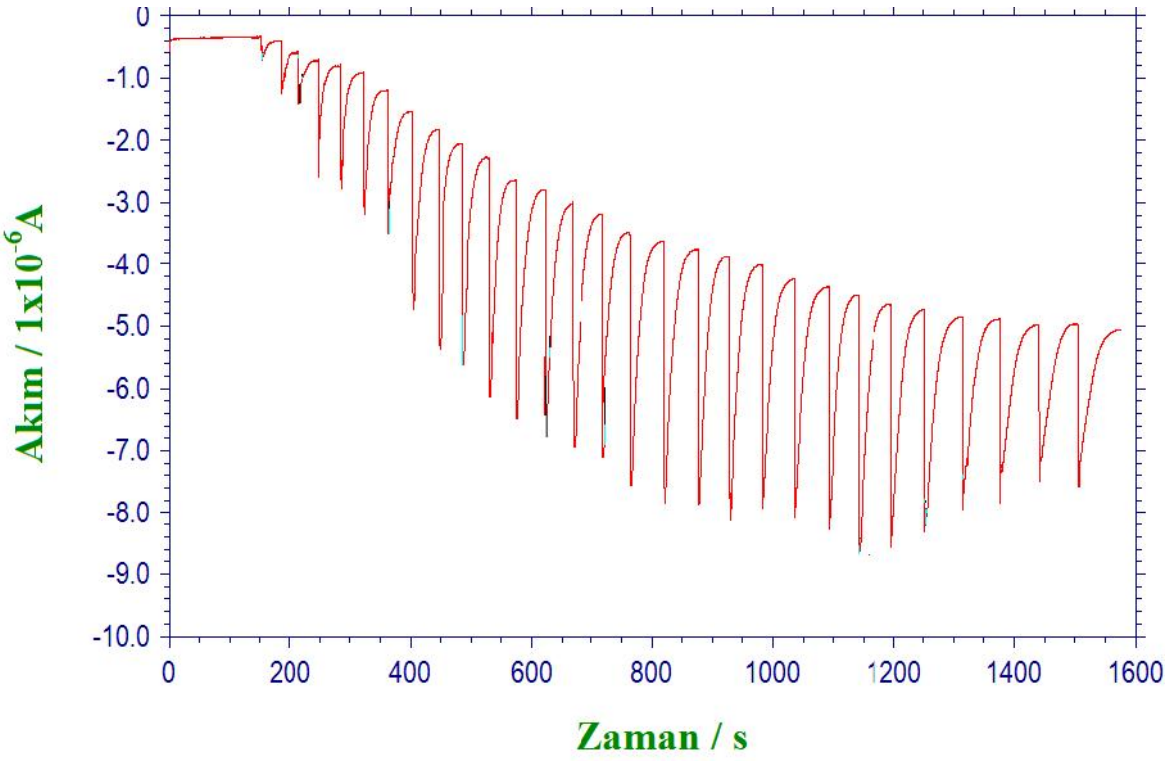


Şekil 7.54. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü için **a)** gerilim tarama hızına, **b)** gerilim tarama hızının karekköküne karşı cevap akımı grafiği ($1{,}485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

7.5. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt Biyosensörünün Optimizasyonu

Platin kaplama, platin elektrotların yüzey alanında artışa neden olduğundan, sensörün H_2O_2'e duyarlığını artırmak için kullanılmaktadır. Bu amaçla $PVF^{+}ClO_4^{-}$ yüzeyinde platin biriktirilerek $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü hazırlanmıştır. Bu biyosensör, polimerin yükseltgenmiş hali olan $PVF^{+}ClO_4^{-}$'ın elektrot yüzeyine elektrokimyasal çöktürme yöntemi ile kaplanıp H_2PtCl_6 çözeltisinde sabit gerilimli elektroliz işlemi ile platin nanoparçacıklarının biriktirilip LyOx enziminin tutuklanmasıyla hazırlanmaktadır. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün aktivitesine platin biriktirme potansiyeli, H_2PtCl_6 film kalınlığı, H_2PtCl_6 derişimi, sıcaklık etkisi ve substrat derişimi araştırılmıştır. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü ile yapılan çalışmalarda diğer parametreler için $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü ile bulunan optimum değerler kullanılmıştır. Bu çalışmalar sabit bir çalışma voltajında farklı lisin derişimleri için elde edilen kararlı hal akımlarının ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Şekil 7.55'da görülen cevap eğrileri O_2 atmosferinde elektrokimyasal hücreye her defasında 0,05 mM lisin eklenerek zamana karşı akım değişimi izlenerek elde edilen cevaplardır. PVF^+-$LyOx^-$-Pt biyosensörünün aktivitesi de enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan H_2O_2'ın yükseltgenme akımının ölçülmesiyle belirlenmektedir. Cevap eğrilerinden görüldüğü gibi akımın sabitlenmesi için gereken süre yani biyosensörün cevap süresi 35-40 s arasındadır.

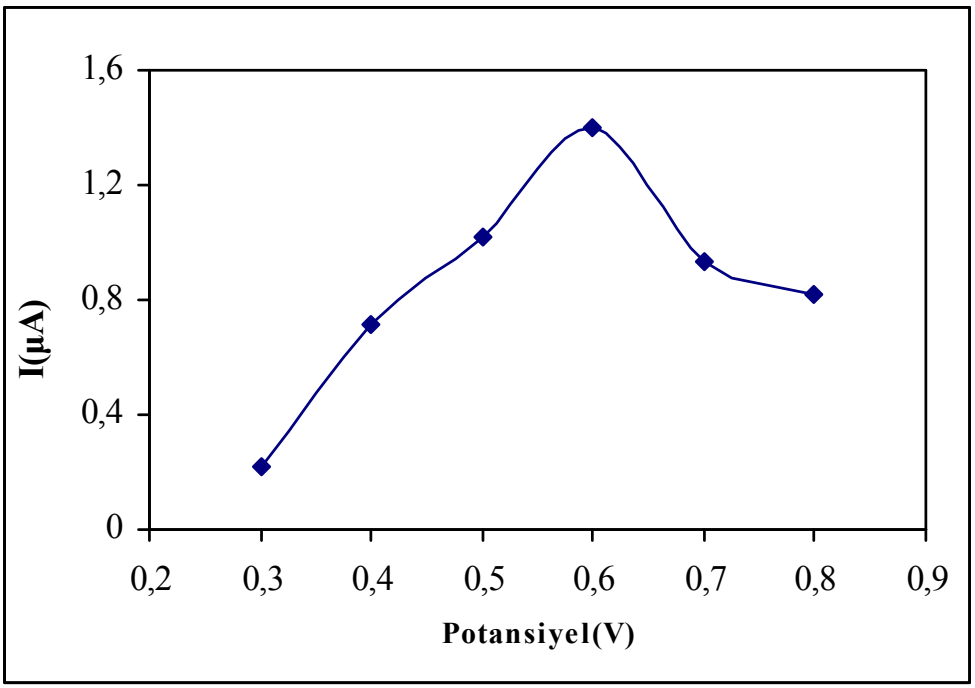


Şekil 7.55. PVF^+LyOx^--Pt biyosensörüne ait akım-zaman eğrisi ($1,485x10^{-6}$ mol PVF^+ cm^{-2}, 60 mC Pt film kalınlığı, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)

7.5.1. Uygulanan gerilimin etkisi

PVF^+LyOx^--Pt biyosensörünün hazırlanmasında cevap akımını etkileyen faktörlerden ilki uygulanan potansiyeldir. 0,7 V'da $1,485x10^{-6}$ mol PVF^+ cm^{-2} kalınlığındaki PVF film ile kaplanmış, daha sonra 4 mM H_2PtCl_6 çözeltisinde - 0,35 V sabit potansiyelde 20 mC yük geçirilerek platin biriktirilen çalışma elektrodu 0,5 mg LyOx /mL enzim çözeltisinde 30 dk bekletilerek $PVF^+ClO_4^-$-LyOx-Pt biyosensörü hazırlanmıştır. Bu biyosensörünün aktivitesine, uygulanan gerilimin etkisini incelemek amacıyla çalışma potansiyeli, 0,3-0,8 V aralığında değiştirilmiştir. Lisin ilavesinden sonra elde edilen sonuçlar kullanılarak uygulanan gerilime karşı maksimum akım

değerlerinin grafiği çizilmiş ve en yüksek akım değeri 0,6 V'da elde edilmiştir (Şekil 7.56). Bundan sonraki çalışmalarda 0,6 V gerilim değeri kullanılmıştır.



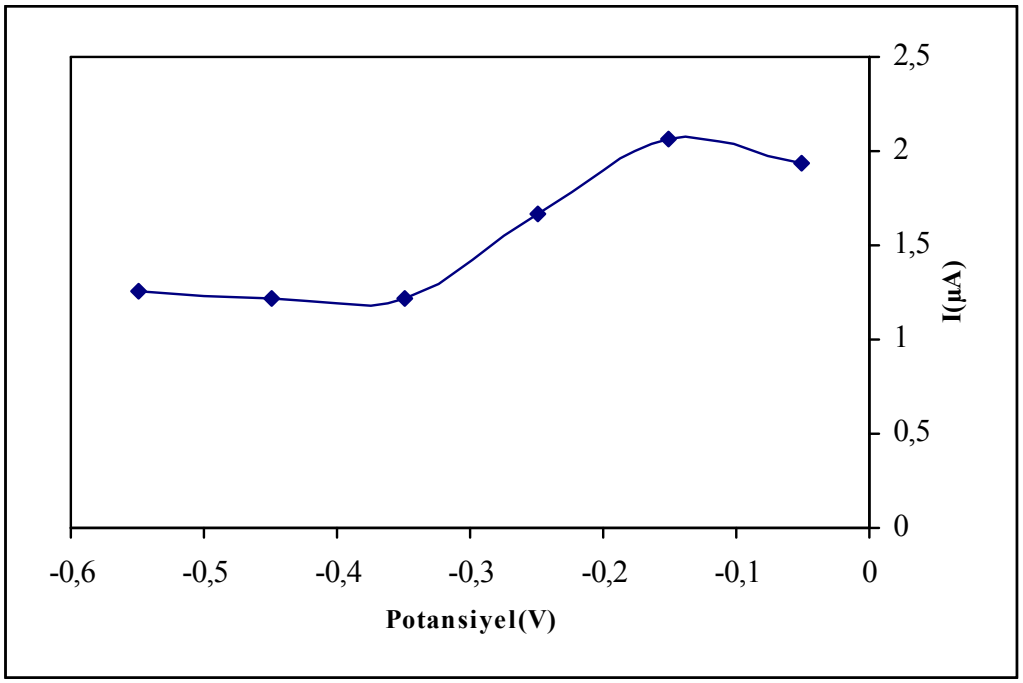
Şekil 7.56. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensör aktivitesinin uygulanan gerilim ile değişimi ($1{,}485x10^{-6}$ mol $PVF^{+}.cm^{-2}$, 20 mC Pt film kalınlığı, 4,0 mM H_2PtCl_6, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)

7.5.2. Platin biriktirme potansiyeli etkisi

Elektrot yüzeyine kaplanan platinin biriktirme potansiyeli biyosensör aktivitesini etkileyen parametrelerden biridir. Hazırlanan biyosensörün aktivitesine platin biriktirme potansiyeli etkisini incelemek amacıyla immobilizasyon işlemi sırasında elektrot yüzeyine platin kaplanması sırasında geçirilen yük miktarı kontrol edilmiştir.

Elektrodun platinle kaplama potansiyeli -0,55 ile -0,05 V arasında değiştirilerek ve 20 mC yük geçirilerek hazırlanan $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün cevap akımlarındaki değişim incelenmiştir. Platinle kaplama hızının daha negatif potansiyellere gittikçe arttığı ve ayrıca elektrodun etkin yüzey alanında da artışa neden olduğu bilinmektedir (Kim, 1996). Negatif potansiyellerde biriktirilen platinin daha kırılgan olduğu ve elektrot yüzeyinden kolayca ayrıldığı gözlenmiştir. -0,25 ile -0,05 V arasındaki potansiyellerde siyah platin birikimi gerçekleşmiş ve bu kaplamanın oldukça dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Platin kaplama sırasında geçirilen yük miktarı sabit tutularak, farklı kaplama potansiyellerinde hazırlanan $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü için

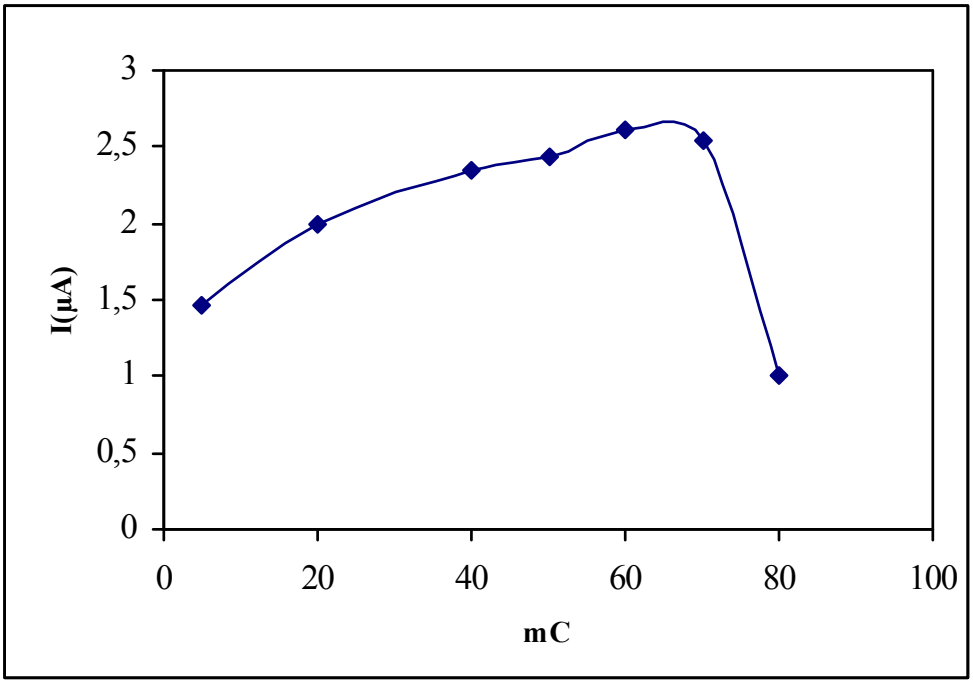
elde edilen maksimum akımlar şekil 7.57'de görülmektedir. Biyosensörün maksimum aktivite gösterdiği platin biriktirme potansiyeli -0,15 V olarak belirlendiğinden çalışmanın bundan sonraki aşamalarında platin kaplama sırasında bu sabit potansiyel uygulanmıştır.



Şekil 7.57. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensör aktivitesinin platin biriktirme potansiyeli ile değişimi ($1,485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 20 mC Pt film kalınlığı, 4,0 mM H_2PtCl_6, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)

7.5.3. Biriktirilen platin miktarının etkisi

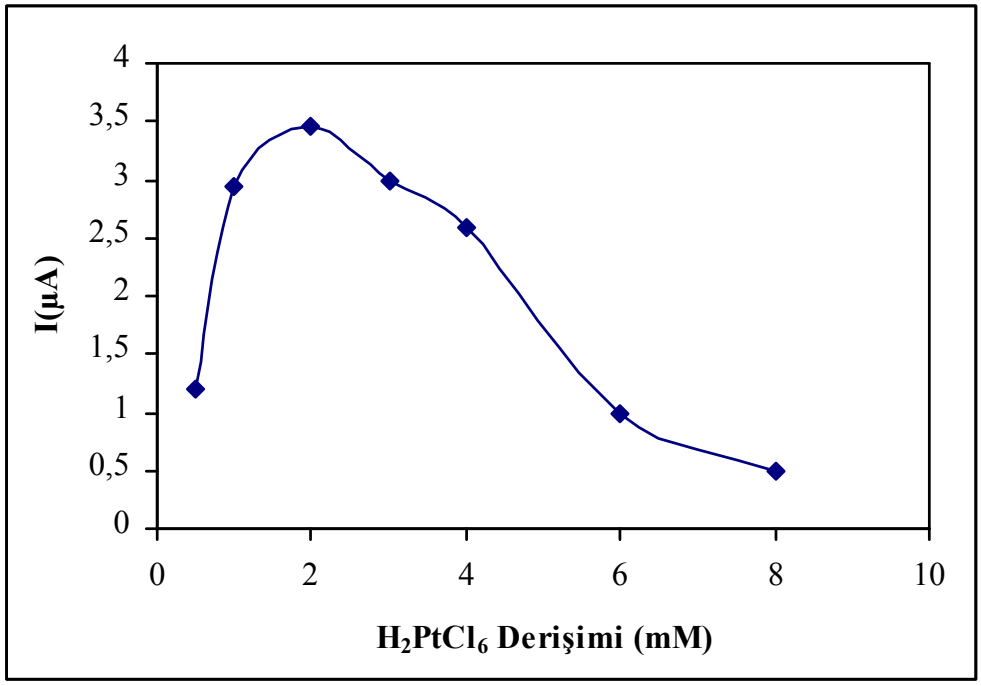
Elektrot yüzeyine kaplanan polimer üzerine biriktirilen platin filmin kalınlığı biyosensör aktivitesini etkileyen parametrelerden biridir. Hazırlanan biyosensörün aktivitesine kaplama kalınlığının etkisini incelemek amacıyla elektrot yüzeyine platinin elektrobiriktirilmesi sırasında 4 mM H_2PtCl_6 çözeltisinde -0,15 V'da geçirilen yük miktarı 5-80 mC aralığında değiştirilmiştir. Her bir kaplama için biyosensör aktivitesi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar kullanılarak kaplama kalınlığına karşı maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 7.58). 60 mC platin film kalınlığına kadar artan akım değeri daha yüksek film kalınlıklarında azalmıştır. Optimum film kalınlığı 60 mC olarak belirlenmiştir.



Şekil 7.58. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün aktivitesinin H_2PtCl_6 film kalınlığı ile değişimi ($1{,}485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 4,0 mM H_2PtCl_6, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)

7.5.4. Platin biriktirmede kullanılan H_2PtCl_6 çözeltisinin derişiminin etkisi

Elektrot yüzeyine kaplanan polimer üzerine platin film biriktirmede kullanılan H_2PtCl_6 çözeltisinin derişimi biyosensör aktivitesini etkileyen parametrelerden biridir. Hazırlanan biyosensörün aktivitesine H_2PtCl_6 çözelti derişiminin etkisini incelemek amacıyla elektrot yüzeyine -0,15 V'da 60 mC yük geçirilerek platin biriktirilmesi için farklı derişimlerde H_2PtCl_6 çözeltileri kullanılmıştır. Çözelti derişimleri 1,0-8,0 mM aralığında değiştirilmiş, her bir çözelti derişimi için biyosensör aktivitesi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar kullanılarak çözelti derişimine karşı maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir. H_2PtCl_6 çözelti derişiminin artmasıyla polimer yapıda biriktirilen platin parçacık büyüklükleri artığından 2 mM derişime kadar artan akımın daha yüksek derişimlerde azaldığı şekil 7.59'da görülmektedir. Maksimum aktivitenin gözlendiği H_2PtCl_6 derişimi 2 mM olarak belirlendiğinden çalışmanın bundan sonraki aşamalarında biyosensörün hazırlanmasında 2 mM H_2PtCl_6 çözeltisi kullanılmıştır.



Şekil 7.59. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensör aktivitesinin platin biriktirme kullanılan H_2PtCl_6 derişimi ile değişimi ($1{,}485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 60 mC Pt film kalınlığı, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)

7.5.5. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensöründe girişim

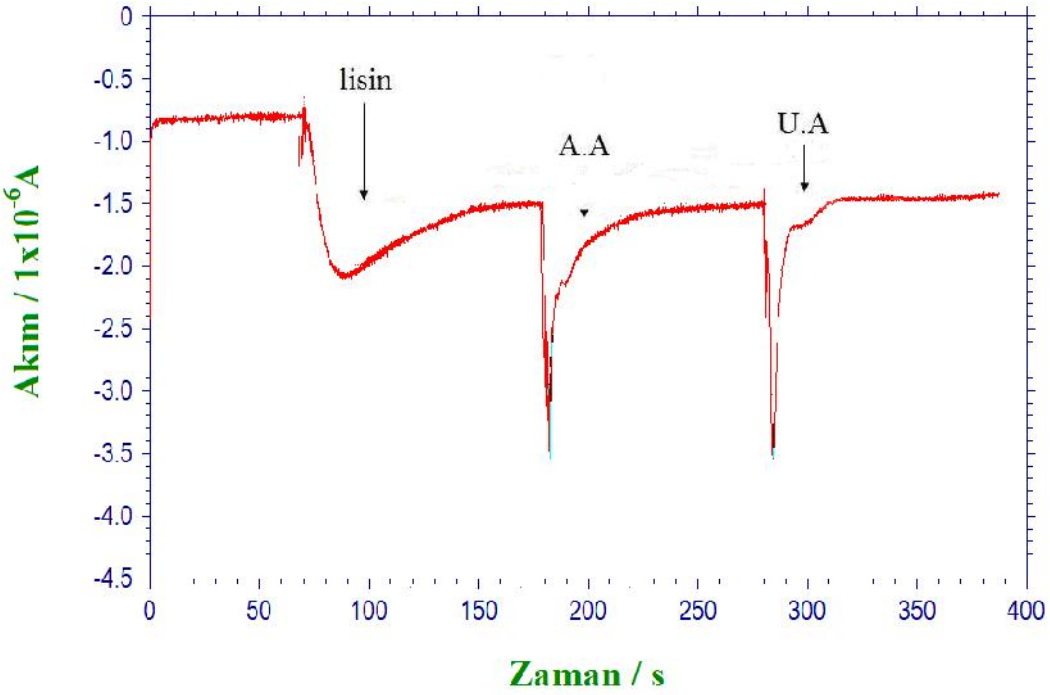
$PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün arginin, histidin, ornitin, fenilalanin, tirosin ve sistin gibi amino asitlere karşı cevap akımı incelemek amacı ile bu amino asitler 1,0 mM derişimde olacak şekilde çalışma ortamına eklendi. Her bir amino asit için elde edilen cevap akımlarının aynı derişimde lisin eklenmesi ile elde edilen cevap akımına oranı hesaplanarak amperometrik seçicilik katsayıları elde edilmiştir (Çizelge 7.5). Sistinin girişim etkisinin nötral polimerle hazırlanan biyosensörlere göre oldukça düşük olduğu, ornitin ve arginin girişiminin ise $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensöre göre belirgin olarak azaldığı gözlenmiştir.

Çizelge 7.5. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü için çeşitli amino asitlerin amperometrik seçicilik katsayıları

Biyosensör	**Amperometrik Seçicilik Katsayısı k_{ij}**					
	Ornitin	Tirosin	Arginin	Histidin	Fenilalanin	Sistin
$PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt	0,044	0,038	0,008	0,013	0,037	0,445

Ölçüm ortamında bulunabilecek ürik asit ve askorbik asit gibi girişim yapan türlerin hazırlanan biyosensörde cevapları incelenmiştir. Bu çalışma sırasında lisin ve

girişim yapabilecek maddelerin derişimleri 0,25 mM'da sabit tutulmuştur. Bu amaçla lisin için kararlı hal akım eğrisi elde edildikten sonra hücreye girişim yapabilecek maddeler eklenmiş ve akımdaki değişim ölçülmüştür (Şekil 7.60). Askorbik asidin ve ürik asidin girişime neden olmadığı gözlenmiştir.

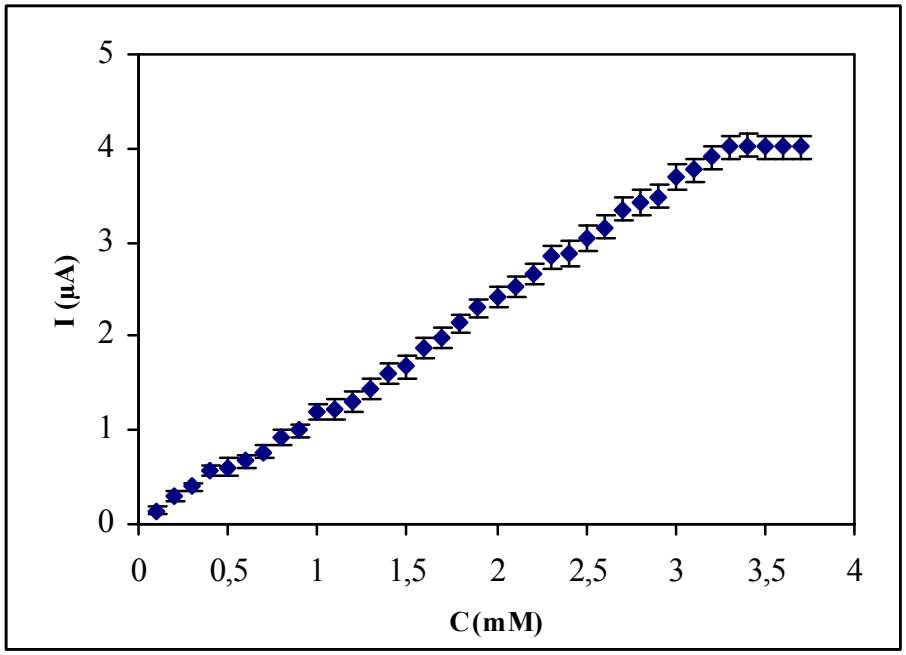


Şekil 7.60. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün 0,25 mM Lisin, 0,25 mM Askorbik Asit ve 0,25 mM Ürik Asit eklenmesi ile elde edilen cevap akımları ($1,485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 60 mC Pt film kalınlığı, 2,0 mM H_2PtCl_6, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)

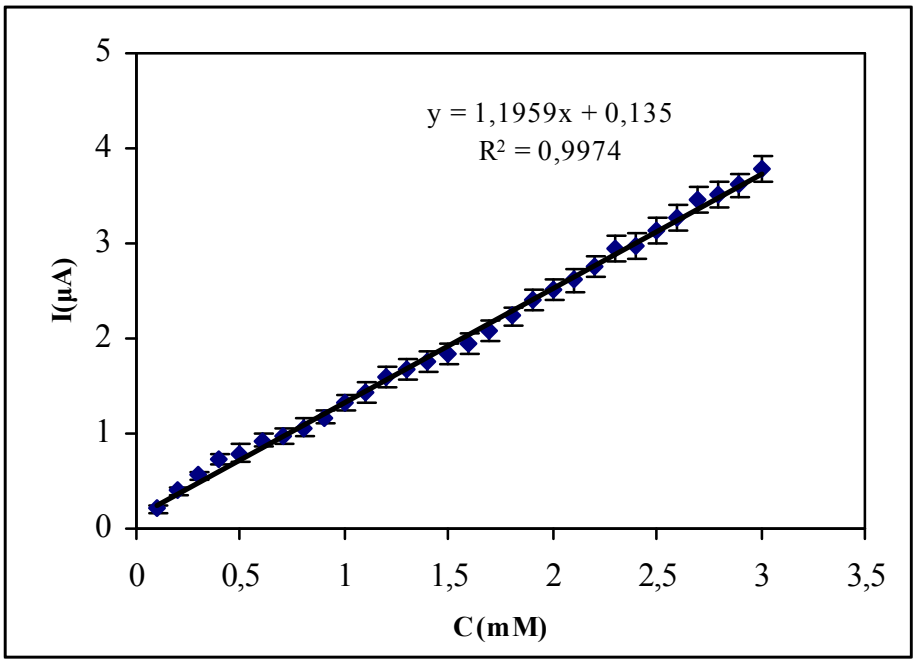
7.5.6. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörüne substrat derişiminin etkisi

Daha önce saptanan optimum koşullarda, yani $1,485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2} polimerle kaplanıp – 0,15 V'da 60 mC yük geçirilmesi ile platin biriktirilerek ve 0,5 mg LyOx/mL enzimde 30 dakika bekletilerek hazırlanan $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda, 30 °C sıcaklıkta 0,6 V sabit potansiyel uygulanarak farklı lisin derişimlerine verdiği akım değerleri saptanmıştır. Belirli derişimde lisin çözeltisi eklenmesi ile akım-zaman eğrisindeki gözlenen akım değişimleri, lisin derişimine karşı grafiğe geçirilerek $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü için şekil 7.61'de görülen kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bu kalibrasyon eğrisi optimum şartlarda hazırlanan elektrotlarla 3 kez tekrarlanmıştır. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü 3,0 mM'a kadar lisin derişimi ile orantılı akım değerleri vermektedir (Şekil 7.62). Lisin

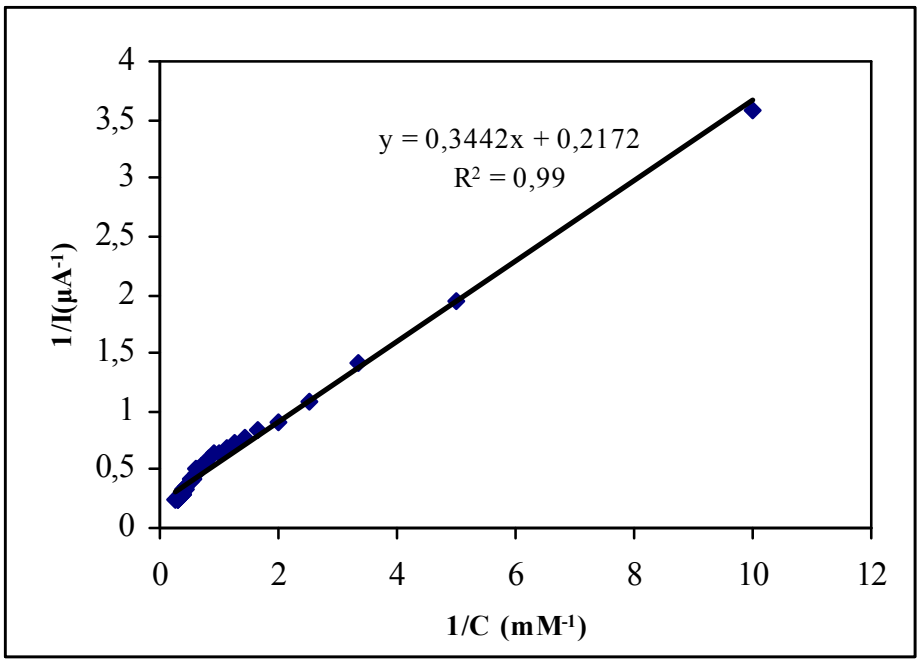
derişiminin artırılması ile cevap akımı bir miktar daha artmakta ve 3,4 mM lisin derişiminde sabit değere ulaşmakta ve daha yüksek derişimlerde polimer film içerisindeki enzim substrata karşı doygunluğa ulaştığından akım değerinde bir artış olmamaktadır. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü için ölçülebilir akımı üreten minimum lisin derişiminin ise $3{,}0x10^{-3}$ mM olduğu bulunmuştur. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü için lisin derişimlerinde gözlenen akım değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği (Şekil 7.63) çizilerek görünür Michaelis-Menten (Kmg) sabiti 1,58 mM lisin olarak hesaplanmıştır. Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün duyarlığı da hesaplanmış ve 92,68 μA mM^{-1} cm^{-2} olarak belirlenmiştir. Ayrıca $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün tekrarlanabilirliği 0,8 mM lisinin çözelti ortamına eklenmesi ile beşer kez yapılan deneyler sonucu akım-zaman eğrilerinden elde edilen cevap akımlarınının bağıl standart sapma (BSS) değerinin hesaplanması ile %3,12 (BSS) olarak bulunmuştur.



Şekil 7.61. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensör aktivitesinin lisin derişimi ile değişimi ($1{,}485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 60 mC Pt film kalınlığı, 2,0 mM H_2PtCl_6, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)



Şekil 7.62. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensör aktivitesinin lisin derişimi ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı ($1,485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 60 mC Pt film kalınlığı, 2,0 mM H_2PtCl_6, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)



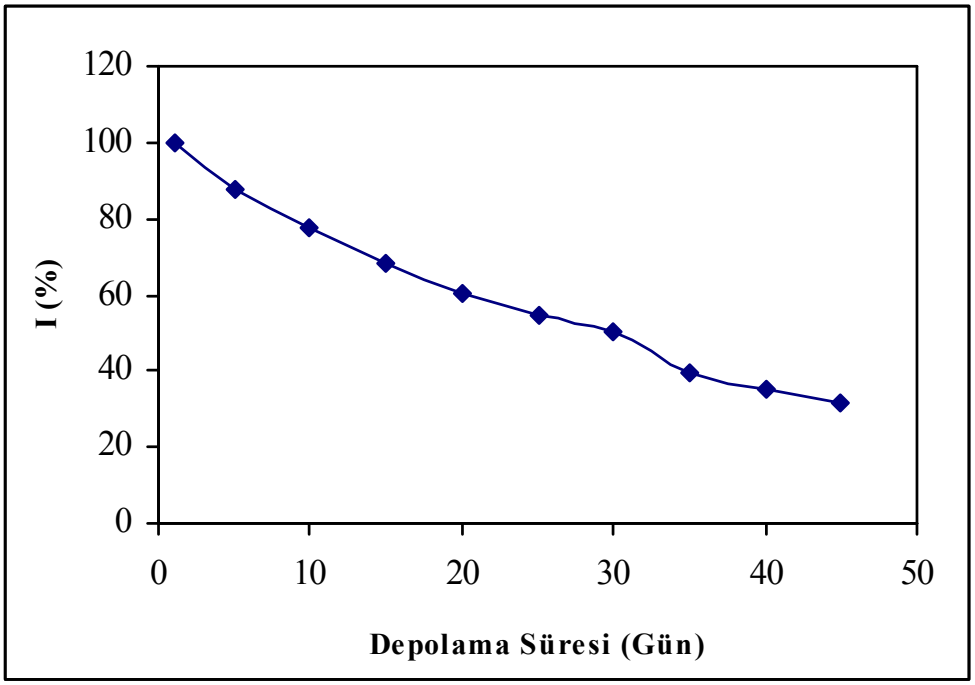
Şekil 7.63. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü için Lineweaver-Burk grafiği ($1,485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 60 mC Pt film kalınlığı, 2,0 mM H_2PtCl_6, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V)

7.5.7. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün kullanım kararlılığı

Tekrar kullanım sayısı arttıkça enzimler aktivitelerinin bir kısmını ya da tümünü kaybederler. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin araştırılması için optimum deney şartlarında hazırlanan elektrotla aynı gün içinde bir dizi ölçüm alınmıştır. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün 15 ölçüm sonunda aktivitesini %75 oranında koruduğu gözlenmiştir.

7.5.8. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün depolama kararlılığı

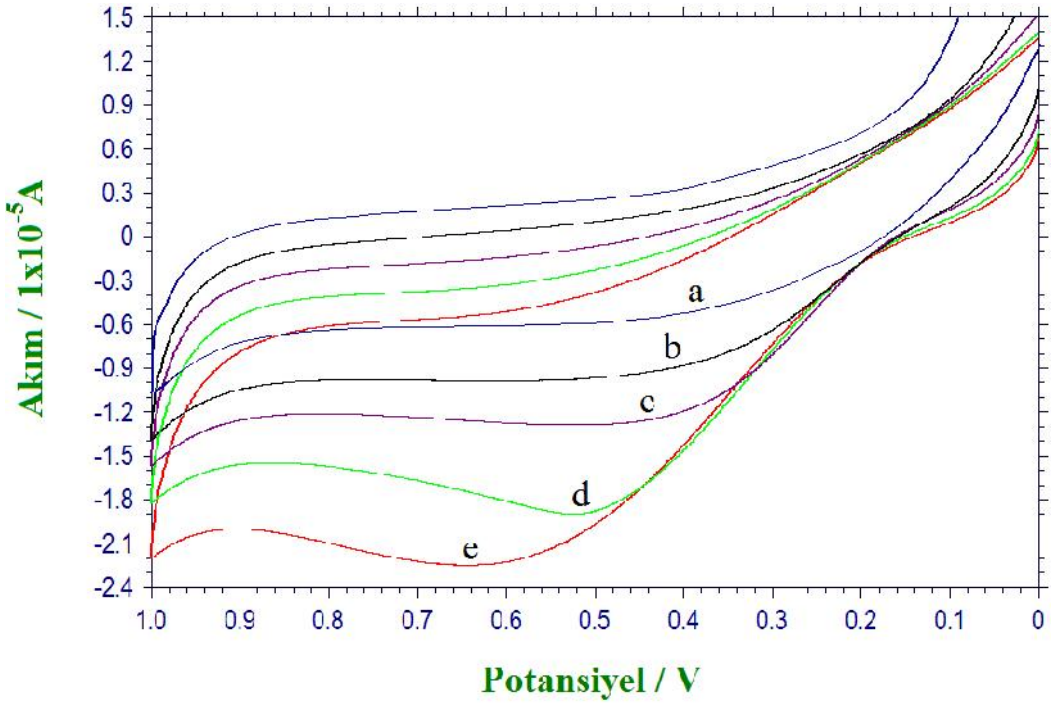
Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü 0,01 M pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde 4 °C'de muhafaza edilerek ve belirli aralıklarla ölçümler alınarak depolama süresinin biyosensör aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Farklı günlerde elde edilen cevap akımları grafiğe geçirilmiştir (Şekil 7.64). Biyosensörün 30 gün sonunda aktivite kaybının %50 oranında olduğu ve bundan sonraki günlerde aktivide de cok fazla değişiklik olmadığı ve 40 güne kadar yapılan ölçümlerde %30 oranında aktivitesini koruduğu gözlenmiştir.



Şekil 7.64. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensör aktivitesinin depolama süresi ile değişimi ($1{,}485 \times 10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 60 mC Pt film kalınlığı, 2,0 mM H_2PtCl_6, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 0,6 V).

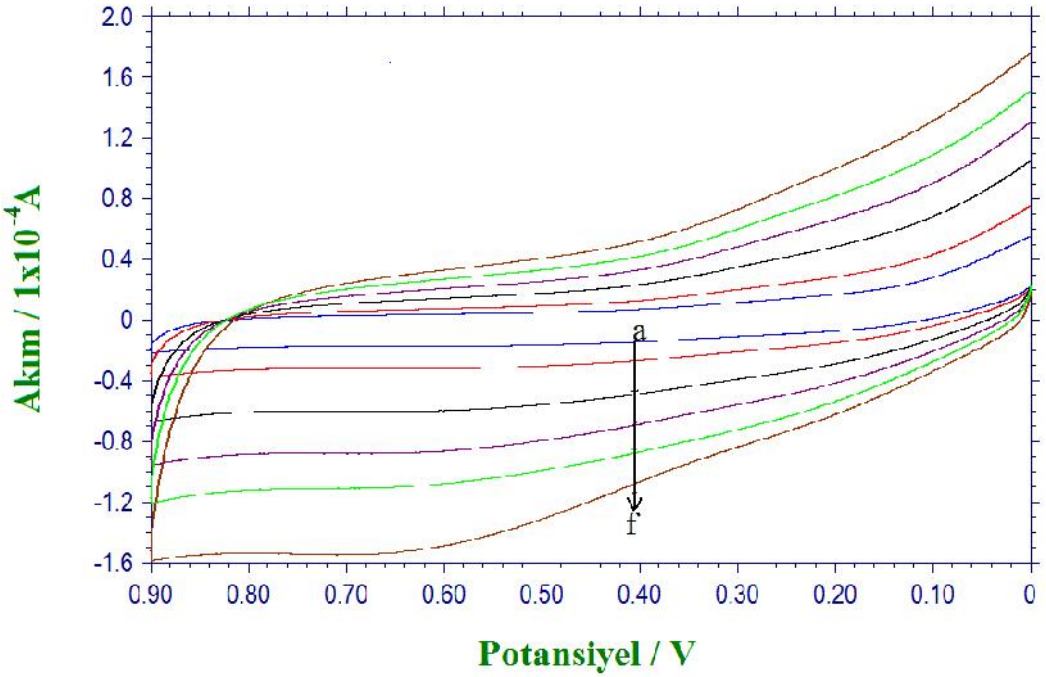
7.5.9. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün aktivitesinin voltametrik yöntemle incelenmesi

Biyosensörün hazırlanma ve çalışma koşulları üzerine etkili olabilecek optimum şartlar amperometrik yöntemle belirlendikten sonra biyosensörün voltametrik yöntemle aktivitesi incelenmiştir. Dönüşümlü voltametri yöntemi ile 0,0-1,0 V arasında potansiyel taraması yapılarak kararlı akım eğrisi elde edildikten sonra giderek artan derişimlerde lisin eklenmiş ve her eklemeden sonra voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 7.65). Lisin eklenmesi ile orantılı olarak akım değerlerinin arttığı gözlenmektedir.



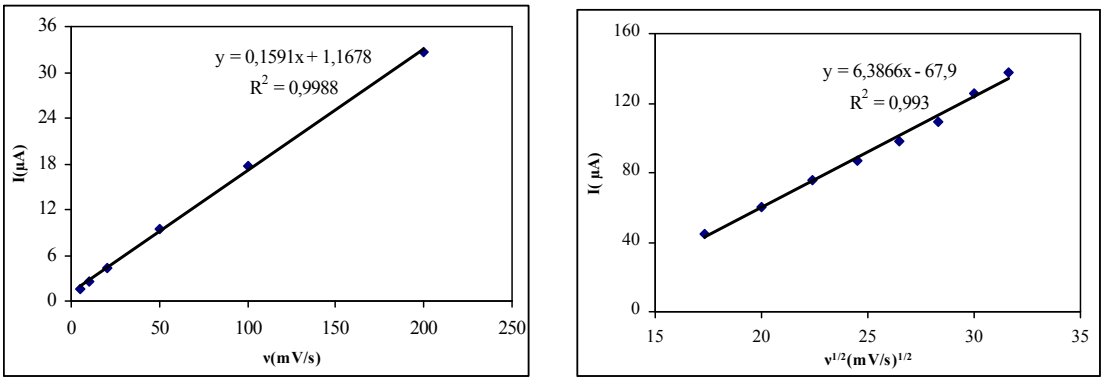
Şekil 7.65. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü için a) 0 b) 0,8 c) 1,4 d) 2,0 e) 2,5 mM Lisin eklenmesi ile elde edilen dönüşümlü voltamogramlar ($1,485x10^{-6}$ mol $PVF^{+}.cm^{-2}$, 60 mC Pt film kalınlığı, 2,0 mM H_2PtCl_6, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C, 50 mV/s).

Enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan hidrojen peroksitin yükseltgenmesine gerilim tarama hızının etkisini incelemek için pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde ($PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü için farklı tarama hızlarında (10-1000 mV/s)) dönüşümlü voltamogramlar kaydedilmiştir (Şekil 7.66).



Şekil 7.66. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü için a) 100, b) 200, c) 400, d) 600,e) 800, f) 1000 mV/s gerilim tarama hızları ile elde edilen dönüşümlü voltamogramlar ($1,485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 60 mC Pt film kalınlığı, 2,0 mM H_2PtCl_6, 0,5 mg LyOx /mL, 1,4 mM Lisin, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

Gerilim tarama hızına (ν) ve tarama hızının kareköküne ($\nu^{1/2}$) karşı cevap akımı değerlerinin grafikleri çizilerek (Şekil 7.67) cevap akımının gerilim tarama hızı ile değişimi incelenmiştir. Düşük gerilim tarama hızlarında (5-200 mV/s) artan tarama hızı ile cevap akımı doğrusal olarak arttığından gerçekleşen enzimatik reaksiyonun yüzey kontrollü bir proses olduğu düşünülmektedir. 200 mV/s üstündeki tarama hızlarında ise cevap akımı değerlerinin tarama hızının karekökü ile doğrusal olarak değiştiği gözlendiğinden yüksek tarama hızlarında (200-1000 mV/s) elektron aktarım prosesinin difüzyon kontrollü olduğu düşünülmektedir.



a **b**

Şekil 7.67. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü için **a)** gerilim tarama hızına, **b)** gerilim tarama hızının karekökü ile karşı cevap akımı grafiği ($1,485x10^{-6}$ mol PVF^{+} cm^{-2}, 60 mC Pt film kalınlığı, 2,0 mM H_2PtCl_6, 0,5 mg LyOx /mL, 1,4 mM Lisin, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 30 °C)

7.6. Biyosensörlerin Aktivitelerine Sıcaklık 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 reaksiyon hızı düşmektedir. Yüksek sıcaklıklar, protein karakterinde olan enzimleri koagule ederek çalışmaz hale getirmesine karşın, düşük sıcaklıklar enzim aktivitesini azaltır.

Bu çalışma kapsamında hazırlanan PVF-LyOx, PVF-Au-LyOx, PVF-Pt-LyOx, $PVF^{+}LyOx^{-}$, $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörlerinin termal kararlılığının incelenmesi için çalışma ortamı sıcaklığı 20-60 °C arasında değiştirilerek cevap akımları incelenmiştir. Farklı sıcaklık değerlerinde lisin ilavesinden sonra ölçülen maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiş (Şekil 7.68-7.72) ve her bir biyosensör için aktivitenin maksimum olduğu sıcaklık değerleri bulunmuştur. Çizelge 7.6'da görüldüğü gibi PVF-LyOx ve $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörleri için maksimum aktivitenin gözlendiği sıcaklık 40 °C iken, polimer yapıda metal iyonlarının biriktirilmesi ile hazırlanan PVF-Au-LyOx, PVF-Pt-LyOx, $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörlerde 50 °C olarak bulunmuştur.

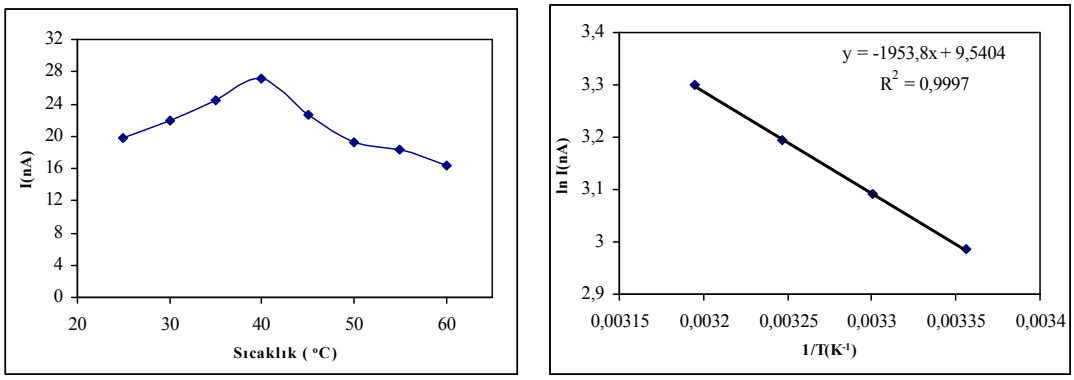
Ayrıca reaksiyon hızının sıcaklıkla artış gösterdiği aralıktaki deneysel veriler kullanılarak tutuklanmış LyOx ile yürütülen reaksiyonların aktivasyon enerjileri hesaplanmıştır. Bu amaçla 1/T'ye karşı ln I değerleri grafiğe geçirilmiş (Şekil 7.68b-7.72b) ve Arrhenius denkleminden yararlanılarak grafiğin eğiminden her bir biyosensörde gerçekleşen enzimatik reaksiyonun aktivasyon enerjisi hesaplanarak çizelge 7.6' da verilmiştir.

Çizelge 7.6. Biyosensörler için maksimum aktivitenin gözlendiği sıcaklık ve aktivasyon enerji değerleri

Biyosensörler	PVF-LyOx	PVF-Au-LyOx	PVF-Pt-LyOx	$PVF^{+}LyOx^{-}$	$PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt
Sıcaklık (°C)	40	50	50	40	50
Ea (kJ/mol)	16,243	31,40	25,35	29,41	22,38

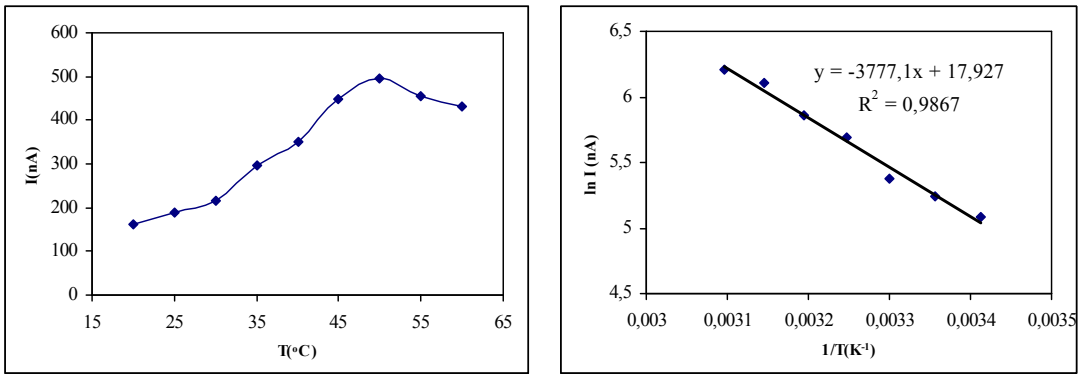
Sonuçlar incelendiğinde genel olarak metal biriktirilmesi ile termal kararlılığın arttığı görülmektedir. Bu da yüzeyde tutuklanan enzim ile metal parçacıkları arasında bir etkileşimin olduğunu göstermektedir. Ayrıca PVF biyosensörlerinde metal biriktirilmesi ile Ea değerlerinin arttığı görülmektedir. Bu durum enzim-metal parçacığı etkileşmesinin bir sonucu olabilir. PVF^{+} ile hazırlanan biyosensörde ise Pt metal

parçacıklarının biriktirilmesi Ea değerinin düşmesine neden olmuştur. PVF filminin ince ve kompakt bir yapıda olduğu, PVF^+ filminin ise daha kalın ve gözenekli bir yapıda olduğu bilinmektedir. Bunun sonucu olarak Pt parçacıkları film içinde daha iyi bir dağılım göstermiş ve enzim-Pt parçacıkları etkileşimleri azalmıştır (bu durum SEM görüntülerinde de görülmektedir (Bölüm 7.8). Polimer yapıda bulunan ferrosen merkezlerinin H_2O_2'in yükseltgenmesindeki katalitik etkisi ile biyosensör aktivitesi artmaktadır.



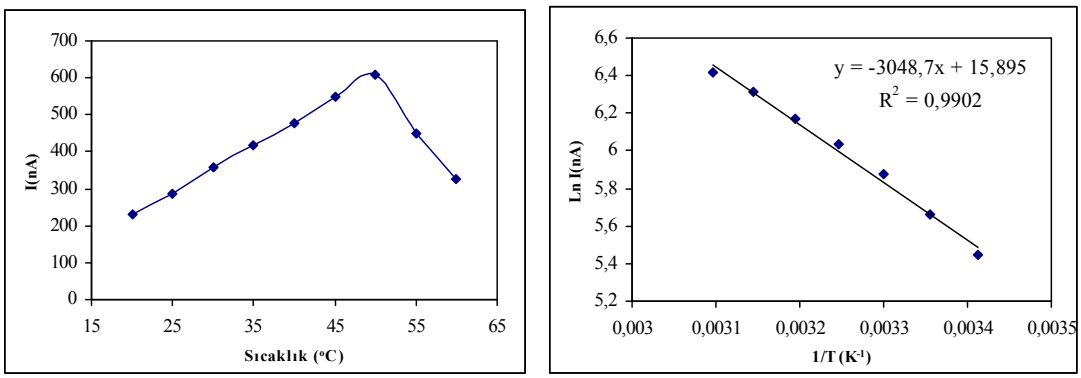
a **b**

Şekil 7.68. a) PVF-LyOx biyosensörü için **a)** sıcaklığa karşı elde edilen maksimum akım değerleri, **b)** Arrhenius grafiği (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 0,4 V)



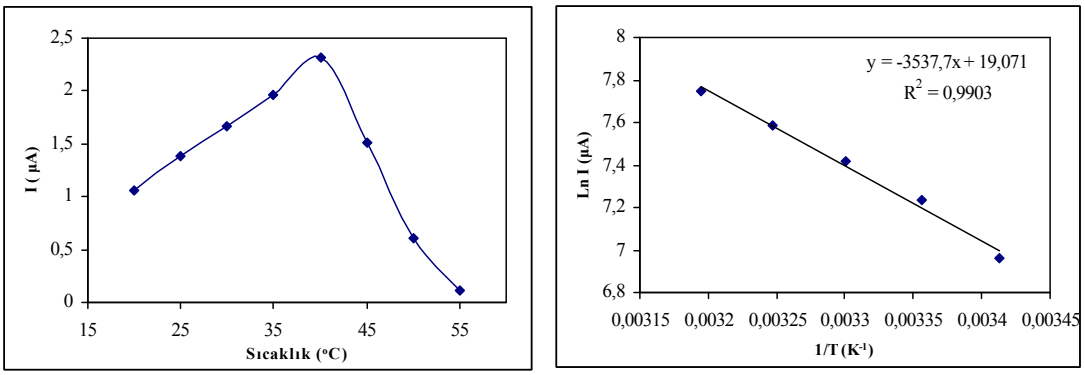
a **b**

Şekil 7.69. PVF-Au-LyOx biyosensörü için **a)** sıcaklığa karşı elde edilen maksimum akım değerleri, **b)** Arrhenius grafiği (1,25 mg PVF/mL, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 0,4 V)



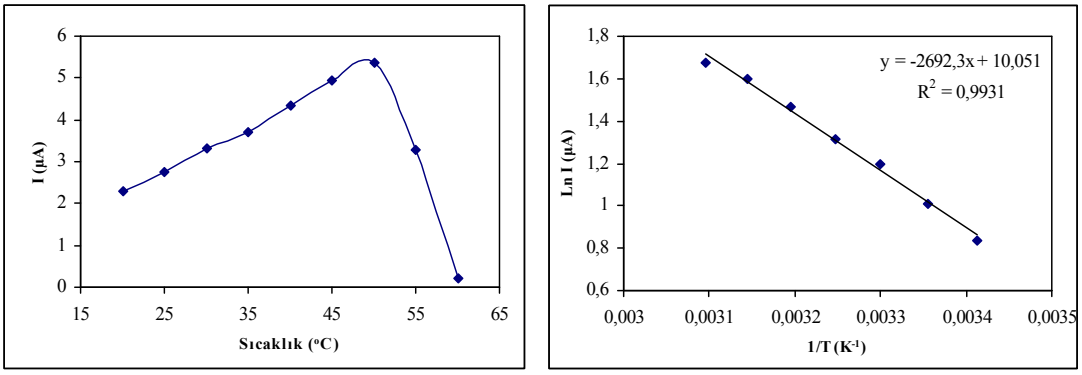
a **b**

Şekil 7.70.PVF-Pt-LyOx biyosensörü için a) sıcaklığa karşı elde edilen maksimum akım değerleri,b)Arrhenius grafiği (1,25 mg PVF/mL, 1,15 mM $PtBr_2$, 1,00 mg LyOx/ mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 0,4 V)



a **b**

Şekil 7.71. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü için a) sıcaklığa karşı elde edilen maksimum akım değerleri, b)Arrhenius grafiği (1,485x10^{-6} mol PVF^{+} cm^{-2}, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 0,6 V)

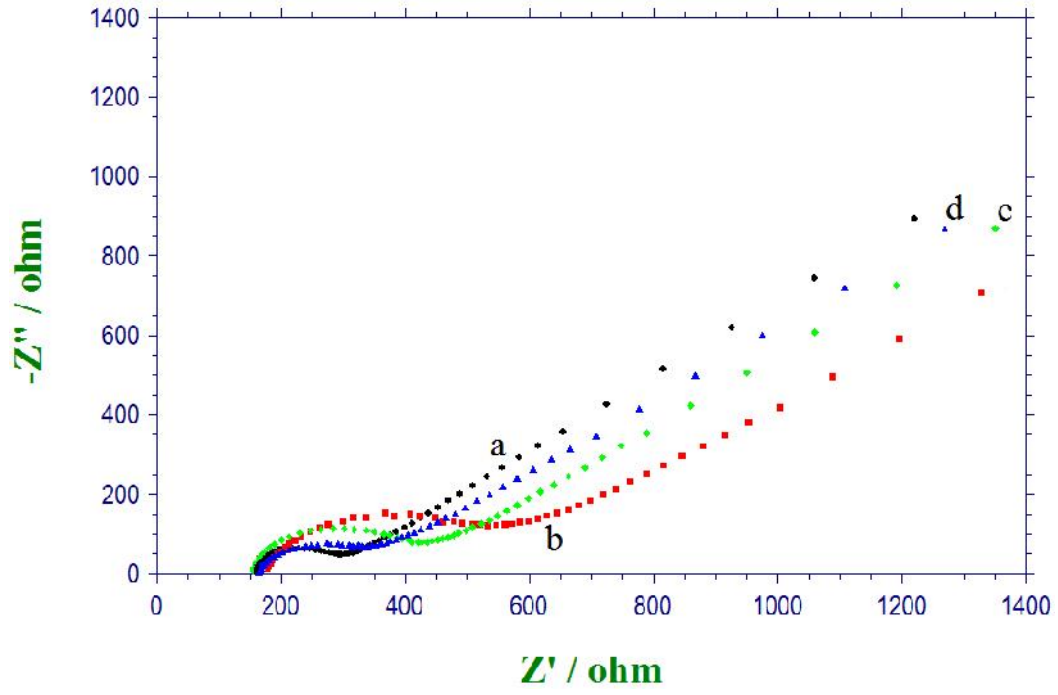


a **b**

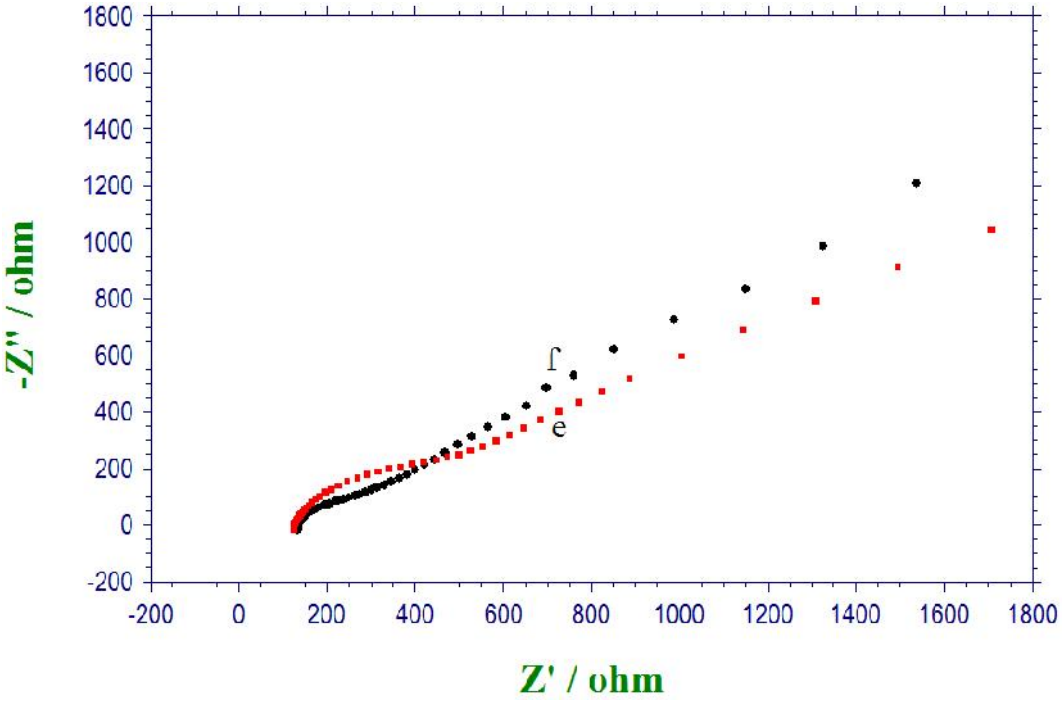
Şekil 7.72. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü için a) sıcaklığa karşı elde edilen maksimum akım değerleri, b) Arrhenius grafiği (1,485x10^{-6} mol PVF^{+} cm^{-2}, 60 mC Pt film kalınlığı, 2,0 mM H_2PtCl_6, 0,5 mg LyOx /mL, 0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 0,6 V)

7.7. Biyosensörlerin Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi ile İncelenmesi

Biyosensörün aktivitesi amperometrik ve voltametrik yöntemlerle incelendikten sonra elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile biyosensörlerin yüzey karakterizasyonları incelenmiştir. 0,2 Hz -100 kHz frekans aralığında 5 mV genlikte ve 0,2 V potansiyelde 0,1 M fosfat tamponu, 0,25 mM lisin ve 5 mM ferri/ferrosiyanür ($K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$) redoks prob çözeltisi kullanılarak impedans değerleri ölçülmüştür. Şekil 7.73'de görüldüğü gibi impedans diagramlarında iki frekans bölgesi görülmektedir. İmpedans diagramının yüksek frekans bölgesinde kapasitif döngü göstermesi prob molekülünün redoks elektron transfer reaksiyonunun çift katman kapasitansla (Cdi) paralel olduğunu gösterir. Düşük frekans bölgesinde difüzyonla kütle aktarımın basamağında lineer bir ilişki görülmektedir. Modifiye platin elektrotların temiz platin elektroda göre kapasitif döngüsünün daha büyük olması yüzeyde polimer filmin ve metal parçacıklarının biriktirildiğini göstermektedir. Ayrıca elektrot yüzeylerindeki kaplamanın değişmesiyle hazırlanan biyosensörlerin kompleks düzlem impedans grafiklerinin (Nyquist grafikleri) de değiştiği gözlenmiştir (Şekil 7.73). Şekilden görüldüğü gibi kaplanmamış Pt elektrotta Ret değeri 140 Ω (Şekil 7.73a) iken yüzeye PVF polimerinin kaplanması ile 500 Ω (Şekil 7.73b)'a yükselmiştir. Dirençteki bu artış elektrot yüzeyine kaplanan PVF tabakasının redoks probun elektrot yüzeyine difüzyonunu azaltmasından kaynaklanmaktadır. PVF polimeri üzerinde altın parçacıkları biriktirilerek hazırlanan PVF-Au-LyOx biyosensörünün direnci 250 Ω (Şekil 7.73c) ve platin biriktirilerek hazırlanan PVF-Pt-LyOx biyosensörünün direnci ise 190 Ω (Şekil 7.73d)'dur. Nyquist grafiklerinden görülebileceği gibi yarım dairenin çapı, PVF polimer yapıda altın ve platin parçacıklarının biriktirilmesi ile azalmaktadır. Yüzeyde PVF polimerinin yükseltgenmiş formu olan $PVF^+ClO_4^-$'ın elektro çöktürülmesiyle hazırlanan biyosensörün direnç çapının diğer biyosensörlere göre çok küçük hatta doğrusal olduğu gözlenmiştir (Şekil 7.74e). Bu polimer matriksinde platin biriktirilmesiyle hazırlanan biyosensöre ait impedans ölçümü sonunda ise lineer bir davranış gözlenmiştir (Şekil 7.74f). Bu sonuç elektrot ile elektrolit arasındaki elektron iletim yolunun artması olarak yorumlanabilir. Polimer yüzeyinde biriktirilen metal parçacıklarının yüzey alanını ve iletkenliği artırdığı ve böylelikle elektrokatalitik aktiviteyi artırarak gözlenen cevap akımı değerlerinde de yükselmeye neden olduğu düşünülmektedir.



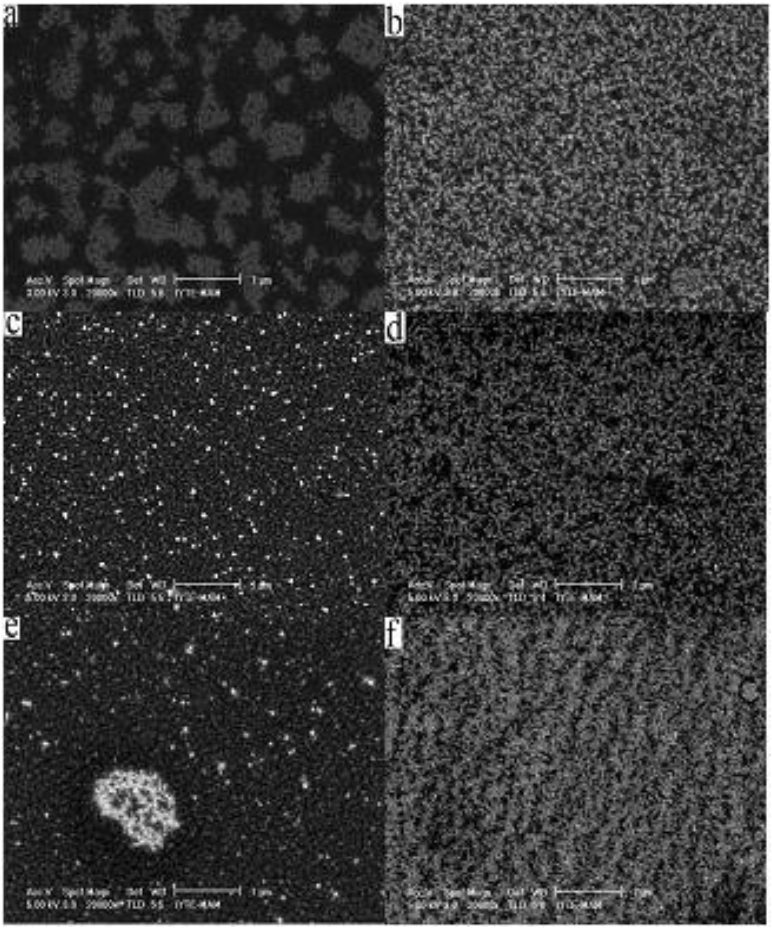
Şekil 7.73. a) Kaplanmamış Pt, b) PVF-LyOx, c) PVF-Au-LyOx, d) PVF-Pt-LyOx elektrotlar için 0,1 M KCl içerisinde hazırlanmış 5 mM ferrisiyanür/ferrosiyanür (1:1) karışımı ile yapılan impedans ölçümü sonucu elde edilen Nyquist eğriler



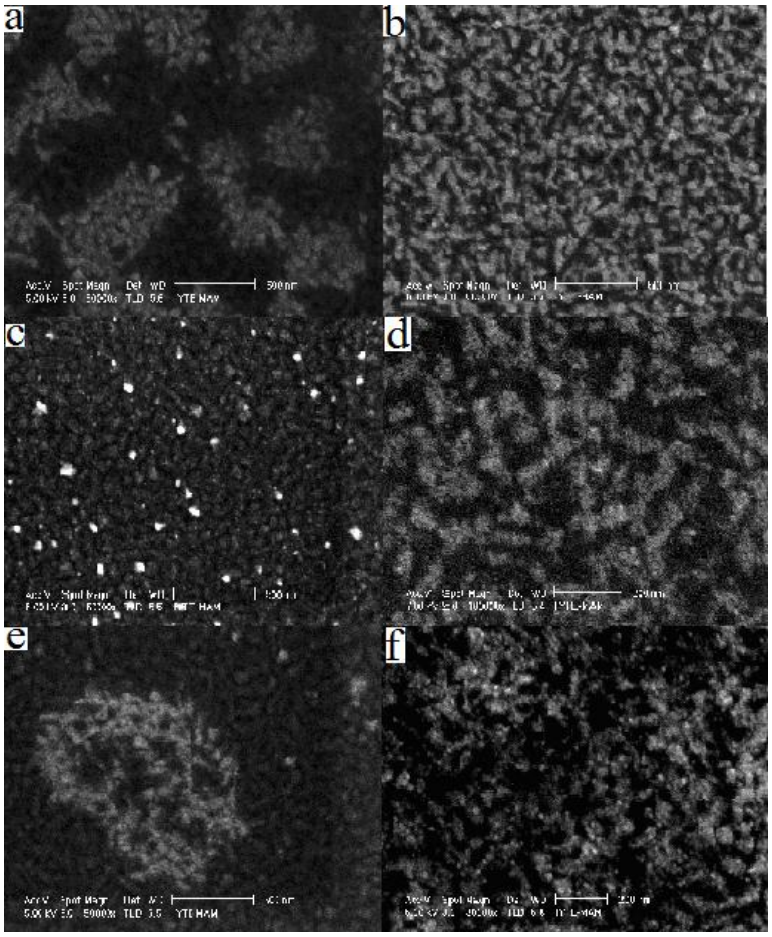
Şekil 7.74. e) $PVF^{+}LyOx^{-}$, f) $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt elektrotlar için 0,1 M KCl içerisinde hazırlanmış 5 mM ferrisiyanür/ferrosiyanür (1:1) karışımı ile yapılan impedans ölçümü sonucu elde edilen Nyquist eğriler

7.8. Biyosensörlerin Morfolojik İncelenmesi

Hazırlanan biyosensörlerin morfolojik yapılarının belirlenmesi için polimer kaplı, polimer kaplı altın veya platin biriktirilmiş, lisin oksidaz immobilize edilmiş modifiye yüzeylerin taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile 20000 (Şekil 7.75) ve 50000 (Şekil 7.76) büyütme oranıyla SEM görüntüleri alınmıştır. Yüzeye kaplanan PVF filminin heterojen olarak kısmi yığınlar oluşturduğu gözlenirken (Şekil 7.75a, 7.76a) enzim biriktirilmesi ile yüzeyin homojen bir yapı gösterdiği (Şekil 7.75b, 7.76b) gözlenmiştir. Polimer yüzeyde altın (Şekil 7.75c, 7.76c) ve platin (Şekil 7.75e, 7.76e) parçacıklarının biriktiği ve elektrot yüzey alanında artış olduğu SEM görüntülerinde gözükmektedir. Polimer kaplı metal biriktirilmiş modifiye yüzeylerde enzim immobilizasyonu sonrası alınan görüntüler şekil 7.75c, 7.75e, 7.76c, 7.76e'de verilmiştir. Enzim immobilizasyonu sonucu yüzeyde meydana gelen değişim ile polimer yapıda enzim biriktirildiği gözlenmektedir.

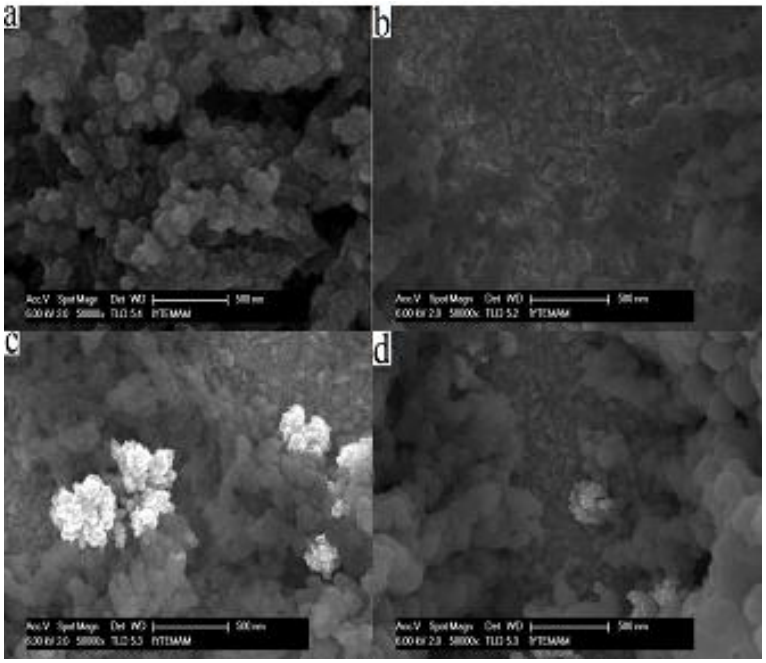


Şekil 7.75. (a), PVF, (b) PVF-LyOx, (c) PVF-Au, (d) PVF-Au-LyOx, (e) PVF-Pt, (f) PVF-Pt-LyOx modifiye elektrotlara ait SEM görüntüleri (x20000 büyütme)

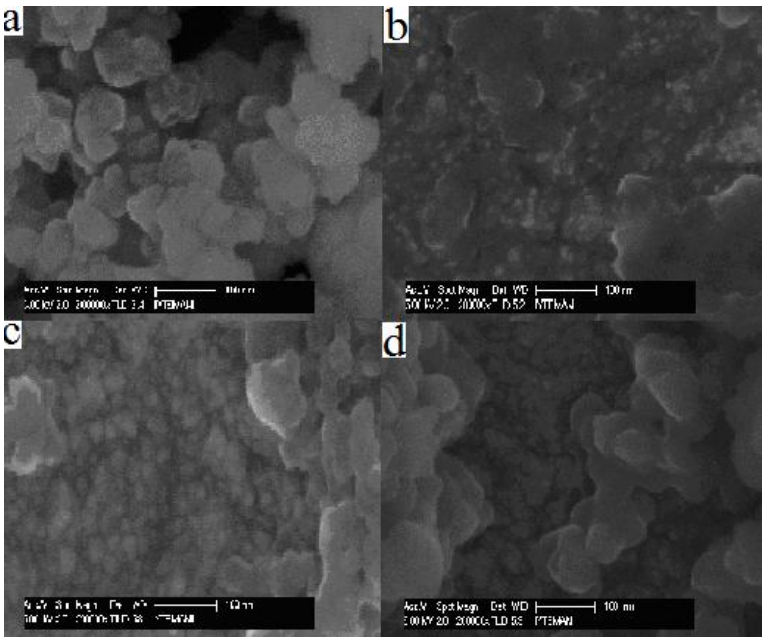


Şekil 7.76. (a), PVF, (b) PVF-LyOx, (c) PVF-Au, (d) PVF-Au-LyOx, (e) PVF-Pt, (f) PVF-Pt-LyOx modifiye elektrotlara ait SEM görüntüleri (x50000 büyütme)

$PVF^{+}ClO_4^{-}$ filminin + 0,7 V'luk sabit gerilimde Pt elektrot yüzeyine kaplandığını ve polimer film üzerinde platin nanoparçacıklarının ve lisin oksidaz enziminin biriktirildiğini kanıtlamak için yüzeylerin taramalı elektron mikroskopu ile 50000 (Şekil 7.77) ve 200000 (Şekil 7.78) büyütme oranı ile çekilen SEM görüntüleri alınmıştır. SEM görüntülerinden yüzeyin homojen bir şekilde polimer filmle kaplandığı görülmüştür. $PVF^{+}ClO_4^{-}$ filminin SEM görüntülerine (Şekil 7.77a, Şekil 7.78a) bakıldığında 60 nm çapında düzenli polimer grupları görülmektedir. - 0,15 V sabit gerilimde $PVF^{+}ClO_4^{-}$ polimer film üzerinde platin biriktirilen modifiye yüzeylerin SEM görüntüleri (Şekil 7.77c, Şekil 7.78c) incelendiğinde 20 nm çapında düzenli platin nanoparçacıklarının biriktiği gözlenmektedir. Şekil 7.77b, 7.78b ve Şekil 7.77d, 7.78d deki görüntüler incelendiğinde enzimin polimer yapıda biriktiği gözlenmektedir.



Şekil 7.77. (a), $PVF^{+}ClO_4^{-}$,(b) $PVF^{+}LyOx^{-}$, (c) $PVF^{+}ClO_4^{-}$-Pt,
(d) $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt modifiye elektrotlara ait SEM görüntüleri (x50000 büyütme)

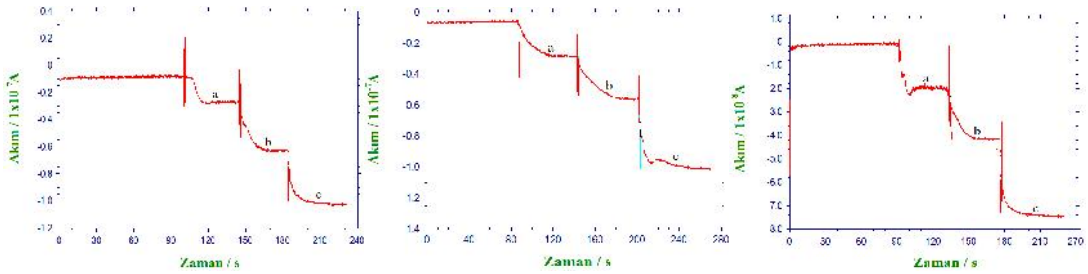


Şekil 7.78. (a), $PVF^{+}ClO_4^{-}$,(b) $PVF^{+}LyOx^{-}$, (c) $PVF^{+}ClO_4^{-}$-Pt,
(d) $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt modifiye elektrotlara ait SEM görüntüleri (x200000 büyütme)

7.9. Biyosensörlerde Gerçek Numunelerin Analizi

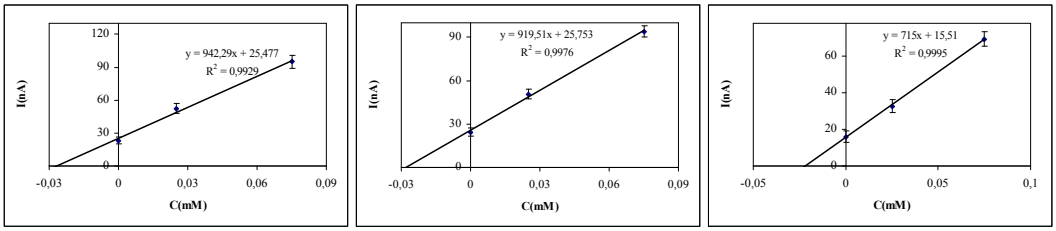
Hazırlanan biyosensörlerin aktivitesini gerçek numulerde incelemek amacı ile farmasötik ilaçlarda lisin tayini yapılmıştır. Aminess ve Ketosteril tabletler toz haline getirilerek ultra saf suda çözülerek 25 mL'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. NephrAmine ise solüsyon halinde bulunduğu için direk olarak kullanılmıştır. Biyosensörler için bulunan optimum çalışma şartlarında standart ekleme yöntemi kullanılarak, stok çözeltileri hazırlanan ilaç numunelerinden belirli miktarlarda elektrokimyasal hücreye eklenerek lisin tayini yapılmıştır. Lisin derişimine karşı akım grafikleri çizilmiş ve bu standart ekleme grafiklerinin oldukça doğrusal olduğu gözlenmiştir. Bu grafiklerin yardımı ile ilaç numunelerindeki lisin miktarları hesaplanmıştır.

Stok çözeltileri hazırlanan ilaç numulerinin derişimleri yaklaşık olarak NephrAmine 0,0438 M, Aminess 0,0178 M, Ketosteril 0,0204 M'dır. Gerçek numunelerdeki lisin derişimlerinin biyosensör ile bulunması için kararlı hal akım eğrisi elde edildikten sonra derişimi bulunacak olan ilaç numunesi ve ardından ise belirli miktarlarda lisin çözeltisinin 20 mL tampon çözelti içeren hücreye eklenerek cevap akımındaki değişim hazırlanan biyosensörlerle (PVF-LyOx, PVF-Au-LyOx, PVF-Pt-LyOx, $PVF^{+}ClO_4^{-}$-LyOx, $PVF^{+}ClO_4^{-}$-Pt-LyOx) her üç ilaç numunesi (NephrAmine, Aminess, Ketosteril) için kaydedildi (Şekil 7.77, 7.79, 7.81, 7.83, 7.85). Lisin derişimine karşı cevap akımı değerleri kullanılarak standart ekleme grafikleri çizildi (Şekil 7.78, 7.80, 7.82, 7.84, 7.86) ve ilaç numunelerindeki lisin miktarı böylelikle hesaplanarak çizelge 7.7-7.11'de gerçek numune derişimleri ile birlikte verildi.



A **B** **C**

Şekil 7.77. PVF-LyOx biyosensöründe A) NephrAmine (12 µL), B) Aminess(25 µL), C) Ketosteril (22 µL), a) 0, b)0,025, c) 0,075 mM Lisin çözeltisi eklenmesi ile elde edilen amperomogramlar

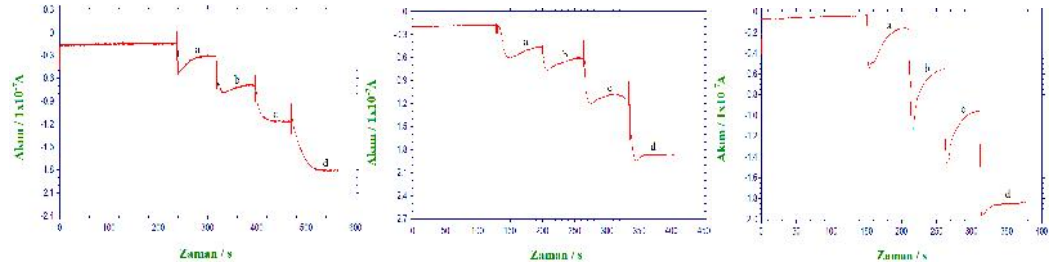


A **B** **C**

Şekil 7.78. PVF-LyOx biyosensöründe A) NephrAmine, B) Aminess, C) Ketosteril numunelerindeki lisin derişiminin hesaplanması için standart ekleme grafikleri

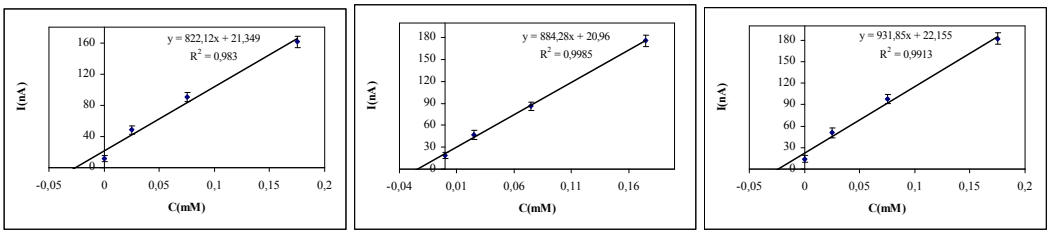
Çizelge 7.7. PVF-LyOx biyosensörü ile ilaç numunelerinde miktar tayini

Numune	Lisin miktarı (M)		
	Numunenin Gerçek Derişimi	Biyosensörün Ölçtüğü Derişim	% hata
NephrAmine	0,0438	0,0465 ± 0,0027	6,1644
Aminess	0,0178	0,0198 ± 0,0039	11,2921
Ketosteril	0,0204	0,0234 ± 0,0021	14,7059



A **B** **C**

Şekil 7.79. PVF-Au-LyOx biyosensöründe A) NephrAmine (12 µL), B) Aminess(25 µL), C) Ketosteril (22 µL), a) 0, b)0,025, c) 0,075 d) 0,175 mM Lisin çözeltisi eklenmesi ile elde edilen amperomogramlar

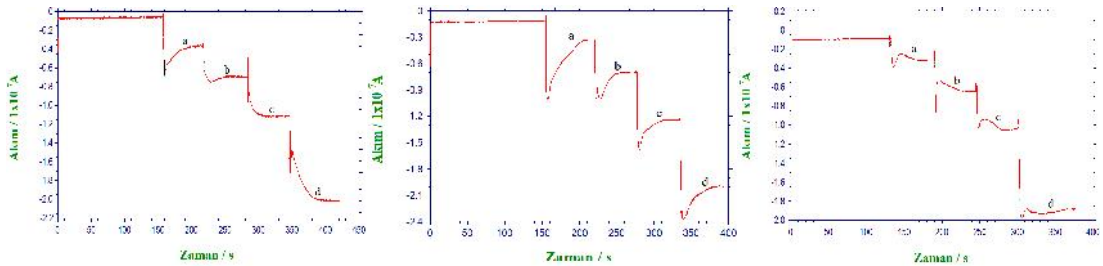


A **B** **C**

Şekil 7.80. PVF-Au-LyOx biyosensöründe A) NephrAmine, B) Aminess, C) Ketosteril numunelerindeki lisin derişiminin hesaplanması için standart ekleme grafikleri

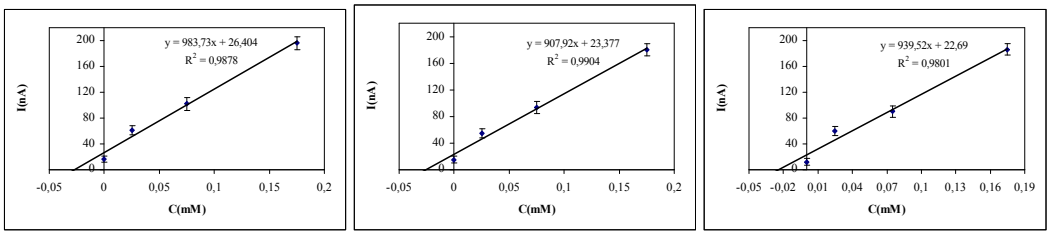
Çizelge 7.8. PVF-Au-LyOx biyosensörü ile ilaç numunelerinde miktar tayini

Numune	Lisin miktarı (M)		% hata
	Numunenin Gerçek Derişimi	Biyosensörün Ölçtüğü Derişim	
NephrAmine	0,0438	0,0462 ±0,0029	5,4795
Aminess	0,0178	0,0199 ±0,0031	11,7978
Ketosteril	0,0204	0,0225 ±0,0015	10,2941



A B C

Şekil 7.81. PVF-Pt-LyOx biyosensöründe A) NephrAmine (12 µL), B) Aminess(25 µL), C) Ketosteril (22 µL), a) 0, b)0,025, c) 0,075 d) 0,175 mM Lisin çözeltisi eklenmesi ile elde edilen amperomogramlar

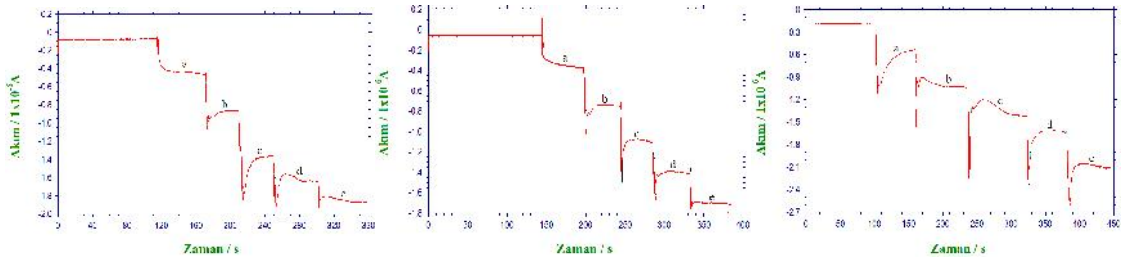


A B C

Şekil 7.82. PVF-Pt-LyOx biyosensöründe A) NephrAmine, B) Aminess, C) Ketosteril numunelerindeki lisin derişiminin hesaplanması için standart ekleme grafikleri

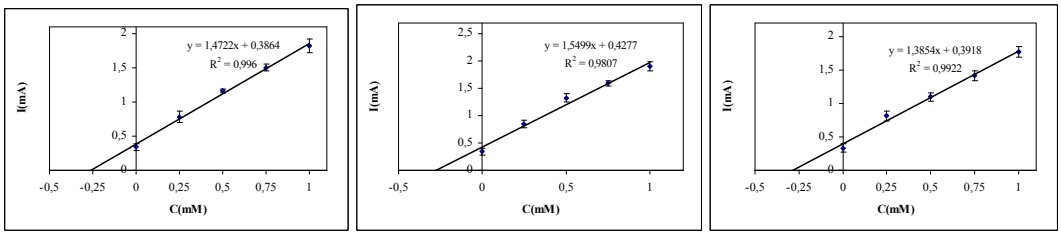
Çizelge 7.9. PVF-Pt-LyOx biyosensörü ile ilaç numunelerinde miktar tayini

Numune	Lisin miktarı (M)		% hata
	Numunenin Gerçek Derişimi	Biyosensörün Ölçtüğü Derişim	
NephrAmine	0,0438	0,04673 ±0,0028	6,6895
Aminess	0,0178	0,01959 ±0,0024	10,0562
Ketosteril	0,0204	0,02299 ±0,0017	12,6961



A **B** **C**

Şekil 7.83. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensöründe A) NephrAmine (120 µL), B) Aminess(275 µL), C) Ketosteril (250 µL),a) 0, b)0,25, c) 0,5, d) 0,75, e) 1 mM Lisin çözeltisi eklenmesi ile elde edilenamperomogramlar

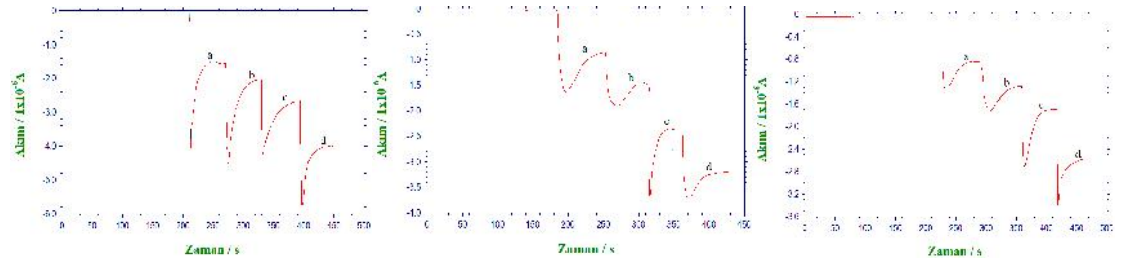


A **B** **C**

Şekil 7.84. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensöründe A) NephrAmine, B) Aminess, C) Ketosteril numunelerindeki lisin derişiminin hesaplanması için standart ekleme grafikleri

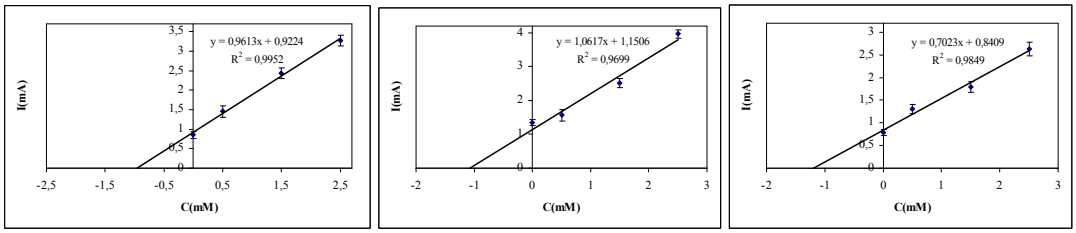
Çizelge 7.10. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörü ile ilaç numunelerinde miktar tayini

Numune	Lisin miktarı (M)		% hata
	Numunenin Gerçek Derişimi	Biyosensörün Ölçtüğü Derişim	
NephrAmine	0,0438	0,04686 ±0,0013	6,9863
Aminess	0,0178	0,01956 ±0,0025	9,8876
Ketosteril	0,0204	0,02222 ±0,0032	8,9216



A **B** **C**

Şekil 7.85. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensöründe A) NephrAmine (120 µL),B) Aminess (275 µL), C)Ketosteril (250 µL), a) 0, b)0,5, c) 1,5 , d) 2,5 mM Lisin çözeltisi eklenmesi ile elde edilen amperomogramlar



A **B** **C**

Şekil 7.86. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensöründe A) NephrAmine, B) Aminess, C) Ketosteril numunelerindeki lisin derişiminin hesaplanması için standart ekleme grafikleri

Çizelge 7.11. $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü ile ilaç numunelerinde miktar tayini.

Numune	Lisin miktarı (M)		
	Numunenin Gerçek Derişimi	Biyosensörün Ölçtüğü Derişim	% hata
NephrAmine	0,0438	0,04633 ±0,0036	5,7763
Aminess	0,0178	0,01929 ±0,0029	8,3708
Ketosteril	0,0204	0,02195 ±0,0032	7,5980

8. SONUÇLAR

Bu çalışma kapsamında poli(vinil ferrosen) (PVF) ve poli(vinil ferrosenyum) (PVF^+) temelli modifiye elektrotlar kullanılarak, polimer yüzeyde altın veya platin parçacıklar biriktirilerek ve lisin oksidaz enzimi immobilize edilerek lisin tayininde kullanılmak üzere biyosensörler geliştirildi (PVF-LyOx, PVF-Au-LyOx, PVF-Pt-LyOx, PVF^+LyOx^-, PVF^+LyOx^--Pt). Hazırlanan biyosensörler için optimum şartları belirlemek amacıyla polimer film kalınlığı, enzim çözeltisinin derişimi, çalışma potansiyeli, pH, sıcaklık, doğrusal çalışma aralığı gibi parametreler amperometrik olarak çalışıldı. Optimum hazırlama ve çalışma şartları belirlenen biyosensörlerin aktivitesi daha sonra voltametri ve impedans spektroskopisi yöntemleriyle de incelendi. Ayrıca elektrot yüzeyleri Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) yöntemiyle karakterize edildi. Elde edilen sonuçlar literatürle karşılaştırmalı olarak aşağıda verilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında nötral polimer PVF ile hazırlanan biyosensörler (PVF-LyOx, PVF-Au-LyOx, PVF-Pt-LyOx) için hazırlama koşulları çizelge 7.12'de verilmiştir.

Çizelge 7.12. PVF-LyOx, PVF-Au-LyOx ve PVF-Pt-LyOx biyosensörleri için hazırlama koşulları

Biyosensör Hazırlama Koşulları	**Biyosensör**		
	PVF- LyOx	**PVF-Au- LyOx**	**PVF-Pt- LyOx**
PVF derişimi (mg/ mL)	1,25	1,25	1,25
PVF'de bekletme süresi (dk)	1	1	1
$KAuCl_4$ derişimi (mM)	-	3,0	-
$KAuCl_4$'da bekletme süresi (dk)	-	1	-
$PtBr_2$ derişimi (mM)	-	-	1,15
$PtBr_2$'de bekletme süresi (dk)	-	-	5
LyOx derişimi (mg LyOx/mL)	1,0	1,0	1,0
LyOx'da bekletme süresi (dk)	1	1	1

PVF-Au-LyOx ve PVF-Pt-LyOx biyosensörleri hazırlanmasında kullanılan $KAuCl_4$ ve $PtBr_2$ çözeltilerin derişimleri ve bu çözeltilerdeki metal biriktirme sürelerinin biyosensörlerin cevap akımına etkisi araştırılmıştır. Belirli bir çözelti derişimine ve bekletme süresine kadar artan akım değerlerinin daha sonra azaldığı gözlenmiş, maksimum akımın elde edildiği çözelti derişimi ve bekletme süreleri

bulunmuştur (Çizelge 7.12). Zou ve grubu karbon nanotüpler üzerinde platin biriktirerek hazırladıkları glukoz biyosensöründe platin biriktirme süresiyle cevap akımının 5 dakikaya kadar arttığını ve daha sonra azalmaya başladığını gözlemişlerdir. Biriktirme süresinin artmasıyla yüzeyde biriken yüksek miktardaki platin nanopartiküllerinin gerçek yüzey alanını azalttığını ve cevap akımında düşüşe neden olduğunu bildirmişlerdir (Zou, 2008). Altın biriktirilmiş glukoz biyosensörü tasarlayan Dondapatil ve Matsumoto yaptıkları çalışmalarda benzer sonuçlar bulmuşlardır (Dondapatil, 2008, Matsumoto, 2002).

Çalışmanın ikinci aşamasında polimerin yükseltgenmiş formu PVF^{+} ile hazırlanan biyosensörler ($PVF^{+}LyOx^{-}$, $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt) için hazırlama koşulları; çizelge 7.13'de verilmiştir.

Çizelge 7.13. $PVF^{+}LyOx^{-}$ ve $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörleri için hazırlama koşulları

Biyosensör Hazırlama Koşulları	**Biyosensör**	
	$PVF^{+}LyOx^{-}$	$PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt
$PVF^{+}ClO_4^{-}$ film kalınlığı (mol PVF/cm^2)	$1{,}485x10^{-6}$	$1{,}485x10^{-6}$
LyOx derişimi (mg LyOx/mL)	0,5	0,5
LyOx'da bekletme süresi (dk)	30	30
Pt biriktirme potansiyeli (V)	-	-0,15
Pt film kalınlığı (mC)	-	60
H_2PtCl_6 derişimi (mM)	-	2,0

$PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörü, $PVF^{+}ClO_4^{-}$ polimer film yüzeyinde sabit potansiyelde platin biriktilmesiyle hazırlanmış ve farklı potansiyellerde platin biriktirme işlemi gerçekleştirilip, LyOx immobilizasyonundan sonra biyosensörlerin cevap akımları incelenmiştir. Maksimum akımın elde edildiği platin biriktirme potansiyeli -0,15 V olarak belirlenmiştir. Negatif potansiyellerde (-0,55 V ile -0,30 V arası) biriktirilen platinin daha kırılgan olduğu ve elektrot yüzeyinden kolayca ayrıldığı gözlenirken daha düşük negatif potansiyellerde (-0,25 ile -0,05 V arası) platin biriktirme süresinin daha uzun olmasına rağmen kaplamanın daha dayanıklı olduğu bulunmuştur. Kim ve grubu yaptıkları çalışmalarda benzer sonuçları bulmuşlar ve daha düşük negatif potansiyellere gittikçe elektrodun etkin yüzey alanında artış olduğunu gözlemişlerdir (Kim,1996).

Hazırlama koşulları yukarıda belirtilen biyosensörler için maksimum aktivitenin gözlendiği çalışma ortamı koşulları çizelge 7.14'de verilmiştir.

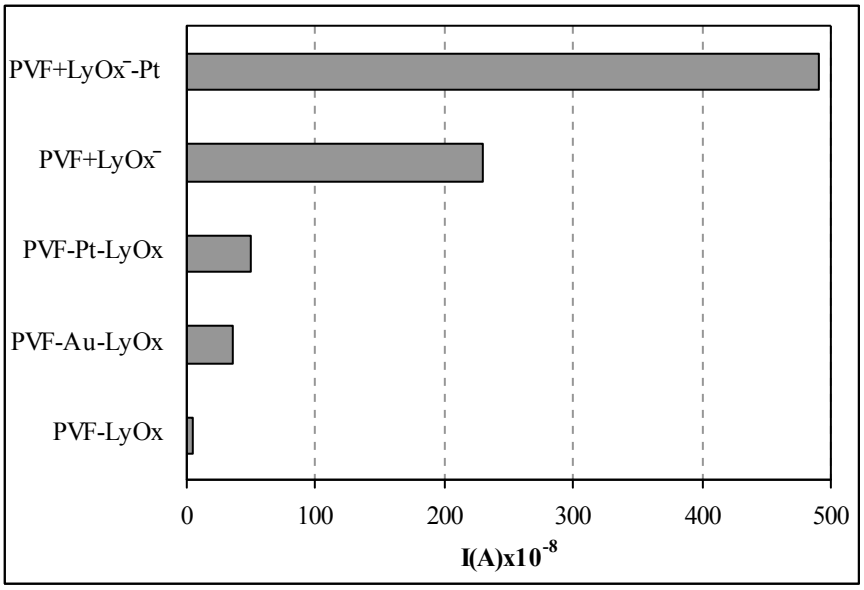
Çizelge 7.14. Biyosensörler için maksimum aktivitenin gözlendiği çalışma ortamı koşulları

Biyosensör	**PVF-LyOx**	**PVF-Au-LyOx**	**PVF-Pt-LyOx**	**$PVF^{+}LyOx^{-}$**	**$PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt**
Uygulanan gerilim (V)	0,4	0,4	0,4	0,6	0,6
Sıcaklık (^{o}C)	40	50	50	40	50
Ea (kj/mol)	16,243	31,40	25,35	29,41	22,38
pH	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4
Doğrusal çalışma üst sınırı (mM)	0,25	0,4	0,6	1,3	3,0
Ölçülebilen minimum derişim (mM)	$3,75x10^{-2}$	$8,5x10^{-3}$	$6,0x10^{-3}$	$5,0x10^{-3}$	$3,0x10^{-3}$
Kmg	0,07826	0,625	0,45	1,63	1,58
Duyarlık ($\mu A\ mM^{-1}\ cm^{-2}$)	2,55	31,85	10,83	84,07	92,68
Tekrarlanabilirlik (%BSS)	6,25	4,15	4,57	3,65	3,12
Cevap süresi (s)	15-20	25-30	25-30	35-40	35-40

Çalışma kapsamında hazırlanan biyosensörler için maksimum cevap akımının elde edildiği çalışma potansiyeli değerleri (Çizelge 7.14) incelendiğinde polimerin nötral formu PVF ile hazırlanan biyosensörler (PVF-LyOx, PVF-Au-LyOx, PVF-Pt-LyOx) için 0,4 V, yükseltgenmiş formu PVF^{+} ile hazırlanan biyosensörlerde ($PVF^{+}LyOx^{-}$, $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt) ise 0,6 V sabit çalışma potansiyeli uygulanmıştır. Literatürde lisin oksidaz enzimi kullanılarak hazırlanan amperometrik lisin biyosensörleri ile yapılan çalışmalarda 0,7 V (Guerrieri, 2007), 0,6 V (Curulli, 1998), 0,65 V (Karalemas, 2000) çalışma potansiyelleri uygulanmıştır. Bu çalışma kapsamında hazırlanan biyosensörler literatür ile karşılaştırıldığında daha düşük çalışma potansiyelleri kullanarak lisin tayini yapılabildiği gözlenmiştir.

Enzim aktivitesi üzerine çalışma ortamı sıcaklığı ve pH etkisinin incelenmesi sonucunda PVF-LyOx ve $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörleri için maksimum aktivitenin gözlendiği sıcaklık 40 ^{o}C iken, PVF-Au-LyOx, PVF-Pt-LyOx, $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörleri için 50 ^{o}C ve çalışma ortamı pH'sı ise 7,4 olarak bulunmuştur. Polimer yüzeyde biriktirilen altın ve platin parçacıkların termal kararlılığı artırdığı gözlenmiştir.

Polimerin nötral formunun elektrot yüzeyine kaplanmasıyla hazırlanan üç farklı biyosensörün (PVF-LyOx, PVF-Au-LyOx, PVF-Pt-LyOx) cevap akımları incelendiğinde, polimer film yüzeyde biriktirilen altın ve platin partiküllerinin elektrokatalitik aktiviteyi artırarak cevap akımında artışa neden olduğu gözlenmektedir (Şekil 7.87). Polimer film yüzeyde altın biriktirilmesi ile hazırlanan PVF-Au-LyOx biyosensörde yaklaşık olarak 15 kat, platin biriktirilmesi ile hazırlanan PVF-Pt-LyOx biyosensörde ise yaklaşık olarak 25 kat cevap akımında artış olduğu gözlenmiştir. Polimerin yükseltgenmiş formu olan PVF^+ ile hazırlanan biyosensörlerde (PVF^+LyOx^- ve PVF^+LyOx^--Pt) ise nötral polimerle hazırlanan PVF-LyOx'a göre 100 kat, PVF-Au-LyOx ve PVF-Pt-LyOx biyosensörlere göre ise cevap akımında 10 kat artış olduğu gözlenmiştir. Polimerin yükselgenmiş formu PVF^+ ile hazırlanan platin biriktirilen PVF^+LyOx^--Pt biyosensörünün ise PVF^+LyOx^- biyosensörüne göre cevap akımında yaklaşık 2,5 kat artış olmuştur. Elektrot yüzeyinde biriktirilen metal parçacıklarının elektrokatalik aktiviteyi artırdığı ve geliştirilen biyosensörlerin cevap akımında artışa neden olduğu birçok çalışmada belirtilmiştir (Zou, 2008, Chu, 2007).



Şekil 7.87. Biyosensörlerin maksimum cevap akımlarının karşılaştırılması

Hazırlanan biyosensörlerin çalışma ortamında bulunabilecek amino asitlere (arginin, histidin, ornitin, fenilalanin, tirosin ve sistin) karşı girişim etkisi incelenmiş ve çizelge 7.15'de verilmiştir. PVF^+LyOx^--Pt biyosensörün ortamdaki amino asitlere karşı girişim etkisinin hazırlanan diğer biyosensörlere göre daha düşük ve özellikle sistinin amperometrik seçicilik katsayısının küçük olduğu bulunmuştur. Karalemas ve grubu

yaptıkları çalışmada hazırladıkları lisin biyosensörünün çalışma ortamında bulunan diğer amino asitlere cevap verdiğini gözlemiş ve elektropolimerizasyonda kullanılan monomer derişimini değiştirerek girişim etkisini azaltmışlardır (Karalemas, 2000). Saurina ve grubu ise hazırladıkları lisin biyosensörün çalışma ortamında bulunabilecek diğer amino asitlerle girişim yaptığını bulmuş ve çalışma potansiyelini düşürerek girişim etkisini azaltmaya çalışmışlardır (Saurina,1999).

Çizelge 7.15. Biyosensörler için çeşitli amino asitlerin amperometrik seçicilik katsayıları

Biyosensör	**Amperometrik Seçicilik Katsayısı k_{ij}**					
	Ornitin	Tirosin	Arginin	Histidin	Fenilalanin	Sistin
PVF-LyOx	0,061	0,015	0,022	0,024	0,005	2,487
PVF-Au-LyOx	-	0,005	0,006	0,006	0,005	1,052
PVF-Pt-LyOx	0,009	-	-	0,006	0,003	0,745
$PVF^{+}LyOx^{-}$	0,314	0,021	0,358	0,016	0,035	0,467
$PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt	0,044	0,038	0,008	0,013	0,037	0,445

PVF ile hazırlanan biyosensörlerin (PVF-LyOx, PVF-Au-LyOx, PVF-Pt-LyOx) ürik asite ve askorbik asite karşı girişimi ise nafyon film kullanılarak büyük ölçüde engellenirken, PVF^{+} ile hazırlanan biyosensörlerde ($PVF^{+}LyOx^{-}$, $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt) ise herhangi bir girişim etkisi gözlenmemiştir. Yapısında negatif yüklü gruplar bulunduran nafyonla modifiye edilmiş biyosensörler hidrojen peroksitin geçişine izin verirken askorbik asit ve ürik asiti uzaklaştırdığı için girişimi engellemektedir. Literatürde, girişim etkisini ortadan kaldırmak için nafyon film kullanılarak tasarlanan biyosensörlerle çalışmalar yapılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir (Choi, 2007, Kim, 1996, Xu, 2002, Yuan, 2005).

Hazırlanan biyosensörler için doğrusal çalışma üst sınırları (0,25 mM (PVF-LyOx), 0,4 mM (PVF-Au-LyOx), 0,6 mM (PVF-Pt-LyOx), 1,3 mM ($PVF^{+}LyOx^{-}$), 3,0 mM ($PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt) lisin) çizelge 7.14'de verilmiştir. Literatürde amperometrik lisin biyosensörlerinin (0.67 mM (Vrbova, 1992), 0,01 mM (Karalemas, 2000), 0,125 mM (Kelly, 2000), 1,0 mM (Divritsioti, 2003), 0,16 mM (Saurina, 1999) ve 0,60 mM (Guerrieri, 2007) lisin derişimine kadar doğrusal olarak değişen cevap akımları verdikleri gözlenmiştir. Çalışma kapsamında hazırlanan biyosensörlerin doğrusal

çalışma sınırları literatür ile karşılaştırıldığında daha geniş bir aralıkta doğrusal olarak değişen cevap akımları verdiği gözlenmiştir. Biyosensörlerde tutuklanan enzimlerin Kmg sabitleri 0,078 mM (PVF-LyOx), 0,625 mM (PVF-Au-LyOx), 0,45 mM (PVF-Pt-LyOx), 1,63 mM (PVF^+LyOx^-), 1,58 mM (PVF^+LyOx^--Pt) lisin olarak hesaplanmıştır (Çizelge 7.14). Kusakabe ve grubu tarafından yapılan çalışmada serbest enzimin Kmg sabiti 0,04 mM, Guerrieri ve arkadaşlarının geliştirdikleri lisin biyosensöründe immobilize enzim için Kmg değerini 1,7 mM olarak bulmuşlardır. Kmg değerlerinin hazırlanan biyosensörler için literatürden daha düşük olduğu gözlenmiş ve bu biyosensörlerde immobilize edilen enzimlerin lisine ilgisinin daha fazla olduğu görülmüştür.

PVF-LyOx, PVF-Au-LyOx, PVF-Pt-LyOx, PVF^+LyOx^-, PVF^+LyOx^--Pt biyosensörleri için optimum hazırlama ve çalışma şartlarında voltametrik davranışı incelenmiş ve artan lisin derişimiyle cevap akımının arttığı gözlenmiştir. Gerilim tarama hızı ile cevap akımı değişimi ise yüksek tarama hızlarında (200-1000 mV/s) doğrusallık gösterirken, daha düşük gerilim tarama hızlarında (5-200 mV/s) cevap akımı değerleri gerilim tarama hızının kareköküyle doğrusal olarak değişitiği gözlenmiştir. Düşük tarama hızlarında elektrotda gerçekleşen enzimatik reaksiyonun yüzey kontrollü, daha yüksek tarama hızlarında difüzyon kontrollü olduğu düşünülmektedir. Hazırlanan biyosensörlerin çalışması sırasında yürüyen reaksiyon mekanizması şu şekildedir;

Lisin, elektrot yüzeyinde tutuklanmış olan Lisin oksidaz enzimi varlığında hidrojen peroksiti oluşturmaktadır.

$$\text{L-lisin} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{L-lisin } \alpha\text{-oksidaz}} \alpha\text{-keto-}\varepsilon\text{-aminokaproat} + NH_3 + H_2O_2$$

Oluşan H_2O_2 ya doğrudan Pt elektrot yüzeyinde,

$$H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^-$$

Ya da polimer yapısındaki PVF^+ merkezlerinin aracılık etmesiyle,

$$H_2O_2 + PVF^+ \longrightarrow O_2 + PVF + 2H^+$$

şeklinde yükseltgenmektedir. PVF'nin uygulanan gerilimle tekrar PVF^+' ya dönüşmesi katalitik akımı oluşturmaktadır (Gülce, 1995-a);

$$PVF \longrightarrow PVF^+ + e^-$$

Hazırlanan biyosensörler için impedans spektroskopisi çalışmaları yapılmış ve PVF polimer yüzeyinde biriktirilen altın ve platin parçacıkların yük transfer direncini azalttığı hatta yükseltgenmiş polimerle hazırlanan elektrotda ve polimer üzerinde elektrokaplama ile biriktirilen metal parçacıklarına sahip elektrotda direncin belirgin miktarda düştüğü gözlenmiştir.

Modifiye yüzeylerin yüzey morfolojisinin incelenmesi için her bir kaplamaya ait taramalı elektron mikroskop görüntüleri alınmıştır. Bu görüntülerin incelenmesi ile PVF, PVF^{+}, LyOx, altın ve platinin başarılı olarak yüzeyde biriktirebildiği gözlenmiştir.

Biyosensörlerin tekrar kullanılabilirliği incelendiğinde PVF-LyOx biyosensörü gün içinde 3 kez kullanımdan sonra aktivitesini tamamen kaybettiği gözlenmiştir. Gün içinde 15 kez kullanımdan sonra başlangıç aktivitesini PVF-Au-LyOx biyosensörü %40, PVF-Pt-LyOx, $PVF^{+}LyOx^{-}$, $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörleri ise %75 oranında koruduğu gözlenmiştir.

Biyosensörlerin depolama kararlılığı incelendiğinde PVF-LyOx biyosensörü 13 gün sonunda aktivitesini tamamen kaybetmektedir. Naf-PVF-LyOx biyosensörünün 35 gün sonunda aktivitesinin %20'sini koruduğu gözlenmiştir. $PVF^{+}LyOx^{-}$ biyosensörünün ise 50 gün sonunda aktivitesini %25, $PVF^{+}LyOx^{-}$-Pt biyosensörünün ise %30 oranında koruduğu gözlenmiştir. 100 güne kadar yapılan ölçümler sonucunda ise PVF-Au-LyOx %45, PVF-Pt-LyOx %20, Naf-PVF-Pt-LyOx biyosensörlerinin %40 oranında aktiteye sahip olduğu bulunmuştur. Literatürde lisin biyosensörünün depolama karalılığı 30 gün olarak belirtilmiştir (Saurina, 1999). Çalışma kapsamında hazırlanan biyosensörlerin literatürde belirtilen biyosensörlere göre depolama sürelerinin daha iyi olduğu ve nafyon modifiye elektrotların ise sadece girişimi engellemediği aynı zamanda daha uzun süre aktivitelerini koruyarak depolama süresini artırdığı gözlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında geliştirilen biyosensörlerin literatürde verilen çalışmalarla karşılaştırıldığında hazırlanmasının daha basit ve ucuz olduğu bulunmuştur. Doğrusal çalışma aralığının geniş olması, cevap akımının yüksek olması, girişim etkisinin olmaması ve kararlılığının yüksek olması gibi avantajlara sahip olduğundan gıda ve ilaç endüstrisinde lisin analizlerinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abruna H.D., Denisevich, P., Umana, M., Meyer, T.J., Murray, R.W., 1981, "Rectifying interfaces using 2-layer films of electrochemically polymerized vinylpyridine and vinylbipyridine complexes of ruthenium and iron on electrodes", J. Am. Chem. Soc., 103, 1.

Abruna, H.D., 1991, "Electroresponsive molecular and polymeric systems", Vol. 1, chap. 3., Marcel Dekker, Skotheim TA (ed), New York.

Anh, D.T.V., Olthvis, W., Bergveld, P., 2003, "Hydrogen peroxide detection with improved selectivity and sensitivity using constant current potentiometry",Sens. Actuators B, 91, 1.

Arnold, M.A., Meyerhoff, M.E., 1988, "Recent advances in the development and analytical applications of biosensing probes", Crit. Rev. Anal. Chem. 20, 149-196.

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.

Baldwin, M.G. and Johnson, K.E., 1967, "Free-radical polymerization of vinyl ferrocene", J. Polym. Sci., 5, 2091-2098.

Bardea, A., Katz, E., Willner, I., 2000, "Probing antigen-antibody interactions on electrode supports by the biocatalyzed precipitation of an insoluble product", Electroanalysis 12, 1097-1106.

Belluzo, M.S., Ribone, M.É. and Lagier, C.M., 2008, "Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics", Sensors, 8, 1367.

Bettelheim, A., Chan, R., Kuwana, T., 1980, "Electroanalysis of oxygen reduction. 3. selective reduction to hydrogen-peroxide or water using polymeric attachment of metalloporphyrins", J. Electroanal. Chem.,139, 93.

Bjerke, A.E., Griffiths, P.R. and Theiss, W., 1999, "Surface-enhanced infrared absorption of CO on platinized platinum", Anal. Chem., 71, 1967-1974.

Blum, L.J., 1997, "Bio-and chemi-luminescent sensors", World Scientific Publishing, Singapore, 5-20.

Boz, B.G., 2001,"Üreaz enziminin polianilin'e immobilizayonu ile üreye duyarlı enzim mikroelektrotunun hazırlanması", Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 28-55.

Buchholz, M., Siegler, K., Weber, E., Klingner, E., and Riechert, F., 1994, "Process-control with the aid of an enzyme electrode in lysine fermentation", Chem. Ing. Tech., 66, 523.

Buck, R.P. and Lindner, E., 1994, "Recomendations for Nomenclature of Ion-selective Electrodes", Pure Appl. Chem., 66, 2527.

Calvert J.M., Meyer T.J., 1981, "Poly(Pyridyl)Ruthenium(II) complexes of poly(4-vinylpyridine) - synthesis, characterization, and investigation of optical and electrochemical properties", Inorg. Chem., 20, 27.

Canh, T.M., "Biosensors", 1993, Chapman&Hall, London.

Castner, J.F. and Wingard, L.B., 1984, "Alterations in potentiometric response of glucose oxidase platinum electrodes resulting from electrochemical or thermal pretreatments of a metal surface", Anal. Chem., 56, 2891-2896.

Chao, S., Robbins, J. L., and Wrighton, M. S., 1983, "A new ferrocenophane surface derivatizing reagent for the preparation of nearly reversible electrodes for horse heart ferricytochrome-c ferrocytochrome-c-2,3,4,5-tetramethyl-1-((dichlorosilyl)methyl)[2]-ferrocenophane", J. Am. Chem. Soc., 105, 181.

Choi, H.N., Han, J.H., Park, J.A., Lee, J.M., Lee, W.Y., 2007, "Amperometric Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase Encapsulated in Carbon Nanotube–Titania–Nafion Composite Film on Platinized Glassy Carbon Electrode" Electroanalysis, 19, 1757.

Chu, X., Duan, D., Shen, G., Yu, R., 2007, "Amperometric glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto covalently immobilized carbon nanotube electrode", Talanta, 71, 5, 2040-2047.

Cicitelli, R., Villareal, D. T., Agnusdei, D., Nardi, P. and Avioli, L. V., 1992, "Dietary l-lysine and calcium-metabolism ın humans", Nutrition, 8, 400.

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

Copeland, R.A., 2000, "Enzymes: a Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis", Wiley-VCH, New York.

Coulet, P.R., 1991, "What is a biosensor?", Biosensor Principles and Applications", Marcel Dekker (ed), 1-6, New York.

Crumbliss, A.L., Stonehuerner, J.G., Henkens, R.W., Zhao, J., O'Daly, J. P., 1993, "A carrageenan hydrogel stabilized colloidal gold multi-enzyme biosensor electrode utilizing immobilized horseradish peroxidase and cholesterol oxidase/cholesterol esterase to detect cholesterol in serum and whole blood", Biosens.& Bioelectron., 8, Iss. 6, 331-337.

Curulli, A., Kelly, S., Sullivan, C.O., Guilbault, G.G., Palleschi, G., 1998, "A new interference-free lysine biosensor using a non-conducting polymer film, Biosensors&Bioelectronics, 13, 1245.

Curulli, A., Valentini, F., Orlanduci, S., Terranova, M.L., Palleschi, G., 2004, "Pt based enzyme electrode probes assembled with prussian blue and conducting polymer nanostructures", Biosensors&Bioelectronics, 20, 1223-1232.

Daum P., Murray RW., 1979, "Chemically modified electrodes. XXII. Solvent effects on the electrochemistry of thin films of plasma-polymerized vinylferrocene", J. Electroanal. Chem., 103, 289.

Dautartas, M.F. and Evans, J.F., 1980, "Ec catalysis of ascorbic-acid oxidation using plasma polymerized vinylferrocene film electrodes", J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.,109, 301.

Denisevich, P., Abruna, H.D., Leidner, C.R., Meyer, T.J., Murray, R.W., 1982, "Electropolymerization of vinylpyridine and vinylbipyridine complexes of iron and ruthenium - homopolymers, copolymers, reactive polymers", Inorg. Chem., 21, 2153.

Despande S.S., Rocco R.M., 1994, "Biosensors and Their Potential Use in Food Quality Control", Food Technol., 48, 6,146-150.

Do, J. S., Chang, W.B., 2004, "Amperometric nitrogen dioxide gas sensor based on PAn/Au/Nafion® prepared by constant current and cyclic voltammetry methods", Sens. Actuators B, 101, 97.

Dominguez, R., Sera, B., Reviejo, J., Pingarron, J.M., 2001, "Chiral anaysis of amino acids using electrochemical composite bienzyme biosensors", Analytical Biochemistry, 298, 275-282.

Dondapatil, S.K., Lozano-Sanchez, P., Katakis, I., 2008, "Controlled electrophoretic deposition of multifunctional nanomodules for bioelectrochemical applications", Biosensors and Bioelectronics, 24, 55–59.

Dong, S.Y., Luo, G., Feng, J., Li, Q.W., ve Gao, H., 2001, "Immunoassay of Staphylococcal Enterotoxin C1 by FTIR Spectroscopy and Electrochemical Gold Electrode", Electroanalysis, 13,1, 30–33.

Eggins, B., 1996, "Biosensors An Introduction" (1st ed.), John Wiley & Sons Ltd., Chichester.

Endo, H., Kamata, A., Hoshi, M., Hayashi, T., Watanabe, E., 1995, "Microbial biosensor system for rapid determination of vitamin B-6", J. Food Sci. 60, 554–557.

Evans, S.A.G., Elliott, J.M., Andrews, L.M., Bartlett, P.N., Doyle, P.J. and Denault, G., 2002, "Detection of hydrogen peroxide at mesoporous platinum microelectrodes", Anal. Chem., 74, 1322-1326.

Fang, X., Lin, W., Mengnan, G., Litong, J., Jiye, J., 2002, "Amperometric sensor for glucose and hypoxanthine based on a PdIrO(2) modified electrode by a co-crosslinking bienzymic system", Talanta, 57, 365.

Feng, C.L., Xu, Y.H. and Song, L.M., 2000, "Study on highly sensitive potentiometric IgG immunosensor" Sens. Actuators B,66, 190–192.

Feltham, A.M., Spiro, M., 1971**,** "Platinized platinum electrodes", Chem. Rev.*,* 71*,* 177.

Fernandes, J. A., Lutz, P. L. and Tannenbaum, A., 1997, "Electroencephalogram activity in the anoxic turtle brain",Am. J. Physiol., Vol 273, 3 , R911.

Gerard, M., Ramanathan, K., Chaubey, A., Malhotra, B.D., 1999, "Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polyaniline films", Electroanalysis 12, 450–452.

Gogol, E.V., Evtugyn, G.A., Marty, J.L., Budnikov, H.C., Winter, V.G., 2000, "Amperometric biosensors based on nafion coated screen-printed electrodes for the determination of cholinesterase inhibitors", Talanta, 53, 379.

Goldstein, G.I., Newbury, D.E., Echlin, P., Joy, D.C., Fiori, C., Lifshin, E., 1981, "Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis", New York, Plenum Press.

Gopidas, K.R., Whitesecl, J.K., and Fox, M.A., 2003, "Synthesis, characterization, and catalytic applications of a palladium-nanoparticle-cored dendrimer", Nano Lett., 3, 1757.

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), J. Electroanalytical Chemistry, 394, 63.

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

Gülce, H., Özyürük, H.,Yıldız, A., 1995-c, " Electrochemical response of poly(vinylferrocenium)-coated Pt electrodes to some anions in aqueous media", Electroanalysis, 7, 181.

Gülce, H., Gülce, A., Yıldız, A., 2002-a, "A novel two-enzyme amperometric electrode for lactose determination", Analytical Sciences 18, 147.

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

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

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

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

Haas, O., Kriens, M., Vos J.G., 1981, "An electrochemical investigation of photosubstitution processes at glassy-carbon electrodes coated with polymer-bound ruthenium complexes",J Am Chem Soc,103,1318.

Haas, O., Vos J.G., 1980, "Preparation, characterizatıon and electrochemistry of electrodes coated with poly(4-vınylpyridine) bound ruthenium complexes", J. Electroanal Chem, 113,139.

Haes, A.J. and Van Duyne, R.P., 2002, "A nanoscale optical biosensor: sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles", J. Am. Chem. Soc. 124,10596.

Heftman, E., 1992, “Chromatography. Fundamentals and Applications of Chromatography and Related Differential Migration Methods., Part B: Applications, 5th ed. Elsevier, Amsterdam.

Heinze, J., 1984, “Cyclic Voltammetry-"Electrochemical Spectroscopy”, New Analytical Methods, **23**, 12, 831–847.

Hillman, A.R., 1987, “Electrochemical Science and Technology of Polymers”, Linford, R.G., (ed.), chap. 5, 103. Elsevier,London.

Hock, B., Dankwardt, A., Kramer, K. and Marx, A., 1995, “Immunochemical techniques: antibody production for pesticide analysis”, Analytica Chimica Acta, 311, 393-405.

Huang, M., Shao, Y., Sun, X., Chen, H., Liu, B., and Dong, S., 2005, “Alternate assemblies of platinum nanoparticles and metalloporphyrins as tunable electrocatalysts for dioxygen reduction”, Langmuir, 21, 323.

Ikariyama, Y., Yamauchi, S., Yukiashi, T. and Ushioda, H., 1989, “Electrochemical Fabrication of amperometrıc microenzyme sensor”, J. Electrochem. Soc., 136, 702.

Johnson, W.K., Bryan-Poole, N., Mastrototaro, J.J., 1994, **“**Reduction of electrooxidizable interferent effects: Optimization of the applied potential for amperometric glucose sensors”, Electroanalysis, 6, 321-326.

Karalemas, I.D., Georgiou, C.A., Papastathopoulos, D.S., 2000, “Construction of a L-lysine biosensor by immobilising lysine oxidase on a gold-poly(o-phenylenediamine)electrode”, Talanta, 53, 391-402.

Karube, I., Matsunaga, T., Mitsuda, S., Suzuki, S., 1977, “Microbialelectrode BOD sensors”, Biotechnol. Bioengng 19, 1535–1545.

Karyakin, A.A., Vuki, M., Lukachova, L.V., Karyakina, E.E., Orlov, A.V., Karpachova, G.P., Wang, J., 1999, “Processable polyaniline as an advanced potentiometric pH transducers”, Anal. Chem. 71, 2534–2540.

Kaufman FB, Schroeder AH, Engler EM, Kramer SR, Chambers JQ, 1980**,** “Ion and electron-transport in stable, electroactive tetrathiafulvalene polymer coated electrodes”, J Am Chem Soc., 102, 483.

Kaul, R., D’souza, S.F., Nadkarni, G. B., 1984, “Hydrolysis of milk lactose by immobilized β-galactosidase-hen egg white powder”, Biotechnology& Bioengineering, 26,8, 901-904.

Kavanoz, M., Gülce, H., Gülce, A., Yıldız, A., 2004, "Anodic Stripping Voltammetric Determination of Gold on a Polyvinylferrocene Coated Glassy Carbon Electrode", Turk. J. Chem., 28, 287-298.

Kell, D.B. and Davey, C.L., 1990, "Conductimetric and impedometric devices". Cass, A.E.G., (Ed.), 137, IRL Press, Oxford.

Kelly, D.M., Vos J.G., 1996, "Electroactive polymer electrochemistry", vol. 2, Chapter 8. Plenum Press, New York.

Kelly, S.C., O'Connell, P.J., O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G., 2000, "Development of interferent free amperometric biosensor for determination of L-lysine in food", Analytica Chimica Acta, 412, 111-119.

Khan G. F., Wernet W., 1996, "Platinization of Shapable Electroconductive Polymer Film for an Improved Glucose Sensor", J. Electrochem. Soc. 143, 10, 3336.

Kim, C.S. and Oh, S.M., 1996, "Enzyme sensors prepared by electrodeposition on platinized platinum electrodes", Electrochim. Acta, 41, 2433-2439.

Kojima, K., Yamauchi, T., Shiomura, M., Miyauchi, S., 1998, "Covalent immobilization of glucose oxidase on poly[1-(2-carboxyethyl)pyrrole] film for glucose sensing" Polymer, 39, 11,2079.

Kumar, R.V., Fray, D.J., 1988, "Development of solid-state hydrogen sensors", Sens. Actuators B, 15, 185.

Kuralay, F., Özyörük, H., Yıldız, A., "Amperometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film", Sensors and Actuators B, 114, 500–506.

Kusakabe, H., Kodama, K., Kuninaka, A., Yoshiro, H., Misono, H., Soda, K., 1980, "A new antitumor enzyme, L-lysine alpha-oxidase from Trichoderma viride.Purification and enzymological properties", J. Biol. Chem., 255, 976.

Leidner, C.R., 1992,. 'Molecular design of electrode Surfaces', Murray, R.W.(ed), Chapter 7, Wiley, New York.

Li, S. F. Y., 1992, "Capillary Electrophoresis, Principles, Practice and Applications", Elsevier, Amsterdam.

Li, Z.F., Kang, E.T., Neoh, K.G; Tan, K.L., 1998**,** "Covalent immobilization of glucose oxidase on the surface of polyaniline films graft copolymerized with acrylic acid", Biomaterials, 19, 45.

Liu, J., and Lu, Y., 2003, "A Colorimetric Lead Biosensor using DNAzyme-directed assembly of gold nanoparticles", J. Am. Chem. Soc. 125, 6642.

Liu, S., Yu, J., Ju, H., 2003, “Renewable phenol biosensor based on a tyrosinase-colloidal gold modified carbon paste electrode”, J.Electroanal. Chem., 540, 61-67.

Lolic, M.M., Fiskum, G. and Rosenthal, R. E., 1997,"Neuroprotective effects of Acetyl-L-Carnitine after stroke in rats." Ann. Emerg. Med., 29, 758.

Lunte, S. M., 1997, “Amino acids-analysis of mixture”, Encyclopaedia of Analytical Science, Townshend, A.(ed), Vol. 1, Academic Press Limited, London.

Mallouk, T.E., Cammarata V., Craston, J.A, Wrighton, M.S., 1986, “Voltammetry at polymer-modified stationary and rotating microelectrodes - application to determination of electron-transfer rates at polymer-solution ınterfaces”,J. Phys Chem, 90,10, 2150.

Manz, A., Pamme N., Iossifidis, D., 2004, “Bioanalytical chemistry” Imperial College Press.

Marrese, C. A., 1987, “Preparation of strongly adherent platinum black coatings”, Anal. Chem., 59 ,217.

Matsumoto, N., Chen, X., Wilson, G.S., 2002, “Fundamental studies of glucose oxidase deposition on a Pt electrode”, Anal. Chem., 74, 362.

Merz, A., Bard A.J., 1978, “A stable surface modified platinum-electrode prepared by coating with electroactive polymer”, , J Am Chem Soc., 100, 3222.

Mizutani, F., Sato, Y., Sawaguchi, T., Yabuki, S., Iijima, S., 1998, “Rapid measurement of transaminase activities using an amperometric L-glutamate-sensing electrode based on a glutamate oxidase–polyion complex-bilayer membrane”, Sens. Actuators B, 52, 23.

Mooe, S., Spackmann D.H. and Stein, W.H., 1958, “Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins”, Anal. Chem., 30, 1185.

Mori, T., Sato, T., Tosa, T., Chibata I., 1972, “Studies on immobilized enzymes. X. Preparation and properties of aminoacylase entrapped into acrylamide gel-lattice”, Enzymologia, 43, 4, 213-26.

Mosbach, K., Danielsson, B., 1974, “An enzyme thermistor”, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology, 364,140-145.

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

Murray, R.W., 1984, “Chemically modified electrodes”, J. Electroanal. Chem., 13, 192.

Oxlund, H., Backerman, M., Ortoft, G. and Andreassen, T.T., 1995, "Reduced concentrations of collagen cross-links are associated with reduced strength of bone", Bone, 17, 365.

Park, S., Chung, T.D. and Kim, H.C., 2003, "Nonenzymatic glucose detection using mesoporous platinum", Anal. Chem., 75, 3046-3049.

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.

Ramkumar, J. and Maiti, B., 2004, "Transport of molybdenum across a bulk liquid membrane using 8-hydroxy quinoline as a carrier", Sep. Sci. Technol. 39, 449.

Robinson, K.L. and Lawrence, N.S., 2006, "A vinylanthracene and vinylferrocene containing copolymer: A new dual pH/sulfide sensor, Electroanalysis, 18, 677.

Roullier, L., Waldner, E., Laviron, E., 1982, "Electrochemical-behavior of a cobaltocene polymer modified electrode", J. Electroanal. Chem. 139, 199.

Samms, S.R., Wasmus, S., Savinell, R.F., 1996, "Thermal Stability of Proton Conducting Acid Doped Polybenzimidazole in Simulated Fuel Cell Environments", J. Electrochem. Soc., 143, 4, 1225.

Sarkar, P.,2000, "One-step separation-free amperometric biosensor for the detection of protein", Microchemical Journal, 64, 283-290.

Saurina, J., Hrenandez-Cassou, S., Alegret S. And Fabregas, E., 1991, "Amperometric determination of lysine using a lysine oxidase biosensor based on rigid-conducting composites", Biosens. Bioelectron., 14, 211.

Saurina, J., Cassou, S.H., Fabregas E., Alegret, S., 1998, "Potentiometric biosensor for lysine analysis based on a chemically immobilized lysine oxidase membrane", Analytica Chimica Acta, 371, 49-56.

Saurina, J., Cassou, S.H., Alegret, S., Fabregas, E., 1999, "Amperometric determination of lysine using a lysine oxidase biosensor based on rigid-conducting composites", Biosensors&Bioelectronics, 14, 211-220.

Saurina, J., Cassou, S.H., Alegret, S., Fabregas, E., 1999, "Determination of lysine in pharmaceutical samples containing endogenous ammonium ions by using a lysine oxidase biosensor based on an all-solid-state potentiometric ammonium electrode", Biosensors&Bioelectronics, 14, 67-75.

Schlindwein, W.S., Kavvada, A., Linford, R.G., Latham, R.J., Grossmann, J.G., 2002, "Combined XAS/SAXS/Electrochemical studies on the conformation of poly(vinylferrocene) under redox conditions", Ionics, 8, 85-91.

Schuhmann, W., 1998, "Enzyme biosensors based on conducting polymers", Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols" Vol. 6 , Mulchandani, A. and Rogers, K., (Eds.), 143-156, Humana Press, Totwa NJ.

Schulze, H., Muench, S.B., Villatte, F., Schmid, R.D., Bachmann, T.T., 2005, "Insecticide detection through protein engineering of nippostrongylus brasiliensis acetylcholinesterase B", Anal. Chem., 77, 5823–5830.

Simonian, A. L., Khachatrian, G. E., Tatikian, S.S., Avakian, T.S. and BadalianI. E., 1991, "A Flow-Through Enzyme Analyzer for Determination of L-Lysine Concentration", Biosens. & Bioelectron., 6, 93.

Skoog, D., Holler, F., Nieman, T., 1998, Principles of Instrumental Analysis.

Skompska M, Peter L.M., 1995, "Electrodeposition and electrochemical properties of poly(n-vinylcarbazole) films on platinum-electrodes", J. Electroanal. Chem., 383, 43.

Sotiropoulou, S., Chaniotakis, N.A., 2005, "Lowering the detection limit of the acetylcholinesterase biosensor using a nanoporous carbon matrix", Anal. Chim. Acta, 530, 199–204.

Sotiropoulou, S., Fournier, D., Chaniotakis, N.A., 2005, "Genetically engineered acetylcholinesterase-based biosensor for attomolar detection of dichlorvos", Biosensors & Bioelectronics, 20, 2347–2352.

Suda, T., Ueno, S., 1999, "Control of the orientation of human erythrocyetes by magnetic and electric fields", J. Appl Phys, 85, 5711.

Suzuki, S., Karube, I., 1987, "An amperometric sensor for carbondioxide based on immobilised bacteria utilising carbondioxide", Anal. Chim. Acta 199, 85–91.

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.

Taylor, R.F., 1996, "Immobilization methods. In: Taylor, R. and Schultz, J.S., (Eds.) Handbook of Chemical and Biological Sensors, pp. 203-219. Bristol: Institute of Physics Publishing.

Telefoncu A., 1986, "İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri",Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu, İzmir, 1-16, 193-249.

Thevenot, D. R., Toth, K., Durst, R.A., Wılson, G.S., 1999, "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification", Pure Appl. Chem., 71, 12, 2333-2348.

Tothill, I.E., 2001, "Biosensors development and potential applications in the agricultural diagnosis sector", Computers and Electronics in Agriculture, 30, 205-218.

Turner, A. P. F., 2000, "Biosensors- sense and sensitivity", Science, 290, 1315-1317.

Turner, A. P. F., Karube I., Wilson G. S., 1987, "Biosensors: fundamentals and applications", Oxford University Press, Oxford.

Wan, G.X., Shigehara K., Tsuchida, E., Anson, F.C., 1984, "Virtues of a copolymer containing pyrrolidone and ıron porphyrin groups in the catalysis of the reduction of dioxygen at graphite-electrodes", J. Electroanal. Chem., 179, 239.

Wang, J., 1994, "Selectivity coefficients for amperometric sensors", Talanta, 41, 857.

Wang, L. and Wang, E., 2004, "A novel hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized on colloidal Au modified ITO electrode", Electrochem. Commun., 6, 225.

White, B.A., Murray, R.W., 1985, "Electroactive porphyrin films from electropolymerizedmetallotetra(ortho-aminophenyl)porphyrins", J.Electroanal. Chem., 189, 345.

Wittman C., Riedel, K., 1997, "Microbial and Enzyme Sensors for Environmental Monitoring", Handbook of Biosensors and Electronic Noses. Medicine, Food and the Environment, Kress-Rogers E. CRC Press, New York, 305–306.

Xu, S., and Han, X., 2004, "A novel method to construct a third-generation biosensor: self-assembling gold nanoparticles on thiol-functionalized poly (styrene-co-acrylic acid) nanospheres", Biosens.& Bioelectron., 19, 1117.

Xu, J.J., Yu., Z.H., Chen, H.Y., 2002, "Glucose biosensors prepared by electropolymerization of *p*-chlorophenylamine with and without Nafion", Anal. Chim. Acta, 463, 239–247.

Yuan, C.J, Hsu, C.L, Wang, S.C, Chang, K.S., 2005, "Eliminating the interference of ascorbic acid and uric acid to the amperometric glucose biosensor by cation exchangers membrane and size exclusion membrane", Electroanalysis, 17,24,2239-2245.

Yung-Feng, C. and Xue-Min, G., 1995, "L-lysine is a barbiturate-like anticonvulsant and modulator of the benzodiazepine receptor", Neurochem. Res., 20, 931.

Zaborsky, O., 1997, “In biomedical application of immobilized enzymes proteins”, Chang T.M.S., Plenum, New York.

Zhang, Z., Liu, H., Deng, J., 1996, “A glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized o-aminophenol film on platinized glassy carbon electrode”, Anal. Chem. 68, 1632-1638.

Zhao J., O'Daly, J. P., Henkens, R. W., Stonehuerner, J., Crumbliss, A. L., 1996, “A xanthine oxidase/colloidal gold enzyme electrode for amperometric biosensor applications”, Biosens.& Bioelectron., 11, Iss. 5, 493-502.

Zou, Y., Xiang, C., Suna, L., Xua, F., 2008, “Glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles ontocarbon nanotubes and immobilizing enzyme with chitosan-SiO_2 sol–gel”, Biosensors and Bioelectronics 23, 1010–1016.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Özlem GÖKDOĞAN
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri ve Tarihi : Eskişehir 24.12.1976
Telefon : 0 332 2232082
e-mail : ozlem@selcuk.edu.tr

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	Konya Meram Anadolu Lisesi	1994
Üniversite	:	O.D.T.Ü Kimya Mühendisliği Bölümü	2000
Yüksek Lisans	:	Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Bölümü	2004
Doktora	:	Selçuk Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü	2011

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2001-2005	Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Bilimleri Enstitüsü	Arastırma Görevlisi
2005-….	Selçuk Üniversitesi Fen-Bilimleri Enstitüsü	Arastırma Görevlisi