



**FENOL TAYİNİ İÇİN YENİ BİR BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI**

**Derya ŞENARSLAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NİSAN 2017**

Derya ŞENARSLAN tarafından hazırlanan “FENOL TAYİNİ İÇİN YENİ BİR BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof.Dr. Fatma ARSLAN

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

**Başkan:** Prof.Dr. Ahmet YAŞAR

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

**Üye:** Doç.Dr. Ayça DEMİREL ÖZEL

Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

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

Tez Savunma Tarihi: 05/04/2017

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

.....

Prof. Dr. Hadi GÖKÇEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

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

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Derya ŞENARSLAN

05/04/2017



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

Derya ŞENARSLAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nisan 2017

ÖZET

Bu çalışmada, fenol tayini için yeni bir biyosensör hazırlandı. Bu amaçla, ilk olarak polianilin-aktif karbon kompoziti ve tirozinaz (polifenol oksidaz) enzimi ile modifiye karbon pasta elektrodu hazırlandı. Tirozinaz enzimi modifiye karbon pasta elektrodun yüzeyine glutaraldehit ile çapraz bağlanarak immobilize edildi. Fenol bileşikleri oksijenli ortamda tirozinaz enzimi katalizörlüğünde kinon bileşiklerini oluştururlar. Fenol tayini, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan kinon bileşiğinin  $-0,15$  V'da elektrokimyasal indirgenmesine dayanılarak yapıldı. Daha sonra, hazırlanan fenol biyosensörünün uygun çalışma koşulları araştırıldı. Bu amaçla enzim elektrodun doğrusal çalışma aralığı belirlendi. Biyosensörün amperometrik cevabına pH'nın ve sıcaklığın etkisi araştırıldı. Ayrıca tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü tayin edildi. Fenol tayinine bazı katyon, anyon ve moleküllerin girişim etkileri incelendi. Hazırlanan biyosensör atık sularda fenol tayininde kullanıldı.

Bilim Kodu : 20104  
Anahtar Kelimeler : Tirozinaz, polianilin-aktif karbon, karbon pasta elektrot, fenol  
Sayfa Adedi : 55  
Danışman : Prof.Dr. Fatma ARSLAN

# PREPARATION OF A NEW BIOSENSOR FOR PHENOLE DETERMINATION

(M. Sc. Thesis)

Derya ŞENARSLAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

April 2017

## ABSTRACT

In this study, a novel biosensor was prepared for phenol determination. For this purpose firstly, a carbon paste electrode modified with polyaniline-active carbon composite and tyrosinase enzyme (polyphenol oxidase) were prepared. Tyrosinase enzyme was immobilized onto the modified carbon paste electrode surface by cross-linking with glutaraldehyde. Phenol compounds form quinone compounds in oxygenated environment were catalyzed by tyrosinase enzyme. Phenol determination was made on the basis of the reduction of the reaction product quinone on the modified carbon paste electrode surface at -0.15 V. Then, appropriate working conditions of the prepared phenol biosensor were investigated. For this purpose, the linear working range of the enzyme electrode was determined. The effect of pH and temperature on the amperometric response of the biosensor were investigated. In addition, reusability and shelf life were determined. The interference effects of some cations, anions and molecules in phenol determination were investigated. The prepared biosensor was used in phenol determination in waste water.

Science Code : 20104

Key Words : Tyrosinase, polyaniline -active carbon, carbon paste electrode, Phenole

Page Number : 55

Supervisor : Prof. Dr. Fatma ARSLAN

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince benden bilimsel ve manevi desteğini hiç esirgemeyen, her türlü imkânı bana sağlayan, saygıdeğer danışmanım Prof.Dr. Fatma ARSLAN 'a gösterdiği sabır ve iyi niyet için teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca bilgisi ve tecrübesi ile desteğini esirgemeyen çok değerli hocam sayın Doç.Dr. Halit ARSLAN' a; hiçbir yardımı benden esirgemeyen sadece tez değil her konuda çok büyük destek gördüğüm sayın hocam Dr.Demet UZUN'a; bana her konuda yardımcı olan, aynı zamanda manevi açıdan hep destekleyen sayın hocam Dr. Özlem ÇOLAK 'a sonsuz teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni maddi manevi destekleyen ve sürekli arkamda güçlerini hissettiğim, benim bu noktaya gelmemde büyük pay sahibi olan annem Ayşe YÜCEL'e ve babam Mustafa YÜCEL'e çok teşekkür ederim. Ve desteğini eksik etmeyen eşim Tahsin ŞENARSLAN'a teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. Fenol ve Özellikleri.....	5
2.2. Enzimler Hakkında Genel Bilgi .....	7
2.3. Polifenol Oksidaz Enzimi .....	10
2.4. Biyosensörler.....	11
2.4.1. Biyobileşenler .....	13
2.4.2. Biyosensörlerin çalışma mekanizması .....	13
2.4.3. Çeviriciler (Transduserler).....	14
2.4.4. Biyosensör tasarımında dikkat edilmesi gereken hususlar.....	15
2.4.5. Biyosensörlerde immobilizasyon yöntemleri.....	15
2.5. Enzim İmmobilizasyon Metotları .....	15
2.5.1. Taşıyıcıya bağlama yöntemleri .....	16
2.5.2. Kovalent bağlama.....	16
2.5.3. Adsorpsiyon .....	17
2.5.4. İyonik etkileşim.....	19

	Sayfa
2.5.5. Şelat bağlama .....	19
2.5.6. Biyospesifik bağlama .....	19
2.5.7. Çapraz bağlama yöntemleri.....	20
2.5.8. Kopolimerizasyon yöntemleri.....	21
2.5.9. Tutuklama yöntemleri .....	21
2.5.10. Polimer matrikste tutuklama .....	21
2.5.11. Mikrokapsülleme.....	23
2.6. Enzim Sensörleri .....	23
2.6.1. Amperometrik esaslı enzim sensörleri.....	24
2.6.2. Potansiyometrik esaslı enzim sensörleri .....	25
2.6.3. Yarı iletken esaslı enzim sensörleri.....	25
2.6.4. Optik esaslı enzim sensörleri .....	25
2.6.5. Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri.....	25
2.6.6. Piezoelektrik esaslı enzim sensörleri .....	26
2.7. İdeal Biyosensörün Özellikleri.....	26
2.8. Karbon Pasta Elektrotlar .....	28
2.9. Karbon Pasta Elektrotların Tarihçesi .....	28
2.10. Modifiye Edilmemiş Karbon Pastalar .....	29
2.11. Modifiye Karbon Pastalar .....	29
2.12. Karbon Pasta Elektrotların Yapısı.....	30
2.13. Kaynak Araştırması.....	31
<b>3.DENEYSEL KISIM.....</b>	<b>33</b>
3.1. Cihazlar ve Malzemeler .....	33
3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı .....	33

3.1.2. Hücre ve elektrotlar .....	33
3.1.3. pH metre .....	33
3.1.4. Su banyosu .....	33
3.1.5. Saf su .....	34
3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri .....	34
3.2.1. Enzim çözeltisi .....	35
3.2.2. Fenol çözeltisi .....	35
3.2.3. Sodyum hidroksit çözeltisi .....	35
3.2.4. Sodyum perklorat çözeltisi .....	35
3.3. Fosfat Tamponunun Hazırlanması .....	35
3.4. Biyosensörün Hazırlanması .....	36
3.5. Biyosensörün Fenole Duyarlılığının ve Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi ...	36
3.6. Biyosensörün En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi .....	37
3.7. pH' nın Etkisi .....	37
3.8. Sıcaklığın Etkisi .....	37
3.9. Fenol Derişiminin Etkisi .....	38
3.10. Tekrar Kullanılabilirliğin Belirlenmesi .....	38
3.11. Raf Ömrünün Belirlenmesi .....	38
3.12. Fenol Tayinine Bazı Maddelerin Girişim Etkilerinin İncelenmesi .....	39
3.13. Fenol İçeren Atık Sularda Fenol Tayini .....	39
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	41
4.1. Biyosensörün En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi .....	41
4.1.1. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi .....	41
4.1.2. pH etkisi .....	42

	Sayfa
4.1.3. Sıcaklık etkisi.....	43
4.1.4. Fenol derişiminin etkisi.....	44
4.1.5. Çalışma aralığının belirlenmesi.....	46
4.1.6. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi .....	46
4.1.7. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi .....	46
4.1.8. Atık su numunesinde fenol tayini .....	47
4.2. Sonuç.....	48
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ .....	55

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.1. Fenolün fiziksel özellikleri.....	6
Çizelge 2.2. Enzim bağlanmasını sağlayan fonksiyonel gruplar .....	17
Çizelge 2.3. Enzim bazlı sensörlerin sınıflandırılması .....	24
Çizelge 3.1. Kullanılan reaktifler ve özellikleri .....	34





## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Fenolün üç boyutlu kimyasal yapısı .....	5
Şekil 2.2. Michaelis-Menten grafiği .....	9
Şekil 2.3. Lineweaver-Burk grafiği .....	10
Şekil 2.4. Biyosensörlerin bileşenleri .....	13
Şekil 2.5. Biyosensörlerin çalışma mekanizması.....	14
Şekil 2.6. Kovalent bağlama .....	17
Şekil 2.7. Adsorpsiyon.....	18
Şekil 2.8. İyonik bağlama .....	19
Şekil 2.9. Çapraz bağlama .....	20
Şekil 2.10. Polimer matrikste tutuklama.....	22
Şekil 2.11. Mikroapsülleme .....	23
Şekil 3.1. Biyosensör için yaptırılmış özel düzenek .....	33
Şekil 4.1. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi.....	42
Şekil 4.2. Biyosensörün fenole duyarlılığına pH'nın etkisi ( 25°C, $1,0 \times 10^{-5}$ M Fenol derişimi .....	43
Şekil 4.3. Biyosensörün fenole duyarlılığına sıcaklık etkisi(0,1 M pH 8,0 olan fosfat tamponu, $1,0 \times 10^{-5}$ M fenol derişimi.....	44
Şekil 4.4. Biyosensörün amperometrik cevabına fenol derişiminin etkisi.....	45
Şekil 4.5. Polifenol oksidaz için Lineweaver – Burk grafiği.....	45
Şekil 4.6. Kalibrasyon grafiği (0,1M pH 8,0 fosfat tamponu, 25°C) .....	46
Şekil 4.7. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi (0,1M pH 8,0 fosfat tamponu, 25°C) .....	47
Şekil 4.8. Biyosensörün raf ömrünün incelenmesi(0,1M pH 8,0 fosfat tamponu 25°C.....	47

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

### Simgeler

### Açıklamalar

°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
g	Gram
L	Litre
µA	Mikro amper
µL	Mikro litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
M	Molarite

### Kısaltmalar

### Açıklamalar

<b>BAS</b>	Bioanalitik sistem
<b>CPE</b>	Karbon pasta elektrot
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>ENFET</b>	Enzim alan etkili transistor
<b>GC</b>	Gaz kromatografisi
<b>HPLC</b>	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
<b>ISFET</b>	İyon duyarlı alan etkili transistor
<b>MOSFET</b>	Metal oksit yarı iletken alan etkili transistor
<b>PPO</b>	Polifenol oksidaz
<b>PVC</b>	Poli(vinil klorür)

## 1. GİRİŞ

Fenol, benzenin sülfolanması ve bunun hidrolizi ile ilk defa 1834'de sentetik olarak elde edilmiştir ve bu tarihlerde fenol eldesi için tek kaynak olarak kömür katranı kullanılmıştır. Kömür katranı içerisinde doğal olarak bulunan fenol, organik materyallerin doğal ayırma sürecinde oluşmaktadır [1].

Fenol insan ve hayvanda metabolizma ürünü olarak oluşan, doğal bazı gıdaların içinde, petrol rafinerisi, kimya ve plastik endüstriler, evsel atık ve sularda bulunan kimyasal bir maddedir. Bunlar patlayıcı madde, plastik, kâğıt, boya, ilaç, pestisit ve antioksidanların üretimi gibi birçok endüstriyel uygulamalarda kullanılırlar. Fenol, toprakta, havada ve suda uzun süre kalabilen, organik kirleticilerin büyük bir grubu olup zehirli kimyasalların ilk sıralarında yer alır.

İnsanlar sağlık için son derece zararlı fenole; sigara dumanı, içme suyu ve tükettiği bazı ürünlerde solunum, ağız ve deri yolu ile maruz kalır. Yüksek dozlarda maruz kalındığı takdirde, toksik etkilere neden olduğundan ölümcül etki gösterebilir.

Fenolik bileşikler; deri, boya, kâğıt, ilaç sanayileri gibi birçok endüstri tarafından kullanılan ve bu endüstrilerin atık sularıyla çevreye salınması sonucunda kirliliğe yol açan zehirli kimyasallardır. Kirli ortamla temas halinde olan canlı derisinden kolayca emilerek karaciğer, akciğer, böbrek gibi organ ve dokularda toksik etki yapmaktadır. Bundan dolayı, bazı fenolik bileşiklerin sularda bulunması canlılar için tehlike oluşturmaktadır. Fenol içeren içme suları klorlandığında zehirli poliklorlu fenollere dönüşürler. Dolayısıyla atık sularda, yeraltı sularında fenolik bileşiklerin miktarlarının belirlenmesi insan ve çevre sağlığı açısından önemlidir.

Fenolik bileşiklerin süt endüstrisinde de kullanıldığı görülmüştür. Süt içerdiği proteinler, vitaminler, minerallerle insan sağlığı için çok önemli besin kaynaklarımızdan olmasına rağmen, süt ve süt ürünleri çeşitli mikroorganizmalar için de uygun üreme ve büyüme ortamı sağlamaktadır. Bu yüzden herhangi bir sterilizasyon uygulamasına maruz bırakılmadan içilen çiğ sütler insan sağlığı açısından tehlike taşımaktadır. Bu yüzden pratikte sütler ya kaynatılarak kullanılmakta ya da pastörize edilmektedir. Pastörizasyon işlemi faydalı ancak yüksek sıcaklıklara kadar ısıtılan sütün besin değerlerini azalmaktadır. Oysa fenolik bileşik içeren sütlerin ısı kararlılığının arttığı besin değerini koruduğu yapılan araştırmalarla

gösterilmiştir. Bu nedenle sütte belirli derişimde fenolik bileşiklerin bulunması istenmektedir. Fenolik bileşiklerin buldukları ortamlarda miktarlarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır [2].

Gıda kalitesinin ve güvenliğinin kontrolü ve çevre kirliliği nedeniyle fenolik bileşiklerin miktarlarının belirlenmesi için kromatografik yöntemler (HPLC, GC) [3-6], spektrofotometrik yöntemler [7-10] ve elektrokimyasal yöntemler [11,12] kullanılmaktadır.

Bu metotlar ile fenolik bileşik miktarlarının kolay ve sürekli izlenmesi zordur. Çünkü bu metotlar pahalı, yavaş ve bazı durumlarda analizin süresini uzatan ön işlemler gerektirmektedirler.

Son yıllarda geliştirilen biyosensörler diğer tekniklere göre daha fazla avantaj sağlamaktadırlar. Biyosensörlerde kullanılan biyolojik algılayıcı sistemin seçiciliği, yüksek hassasiyeti, ölçüm hızı, basit kullanıma sahip ve çoğaltılabilir analitik cihaz olması, aynı zamanda örneğin analizi için ön hazırlığa ihtiyaç olmaması ve çok az madde miktarıyla mikro analizler yapabilmesinden dolayı son yıllarda biyosensörler tercih edilmeye başlanmıştır. Fenol tayinine dayalı birçok biyosensör hazırlanmıştır [13-17].

Karbon pasta elektrotlar ilk olarak Adams (1958) tarafından ortaya atılmıştır. Bu elektrotlar kolayca yenilenebilen ve modifiye edilen bir yüzey oluşturur. Düşük maliyetlidir. Karbon pasta elektrotlar enzimler gibi biyokimyasal maddelerle modifiye edilerek birçok maddenin direkt tayinine olanak sağlamıştır. Karbon pasta elektrotlar bu avantajlarından dolayı çok tercih edilmektedir. Literatürlerde modifiye karbon pasta elektrotlar hazırlanarak fenol tayininin yapılabildiği elektrotlar bulunmaktadır. [13-17]. Fakat polianilin-aktif karbon kompoziti kullanılarak polifenol oksidaz enzimi içeren modifiye karbon pasta elektrot ile fenol tayininin yapıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle yapılan tez çalışması orjinaldir.

Çalışmada, fenol tayini için enzim esaslı yeni bir sensör hazırlandı. Bunun için, ilk olarak polianilin-aktif karbon kompoziti ve tirozinaz (polifenol oksidaz) enzimi ile modifiye karbon pasta elektrodu hazırlandı. Tirozinaz enzimi modifiye karbon pasta elektrodun yüzeyine glutaraldehit ile çapraz bağlanarak immobilize edildi. Fenol bileşikleri oksijenli ortamda

tirosinaz enzimi katalizörlüğünde kinon bileşiklerini oluşturur. Fenol tayini reaksiyon sonucu oluşan kinon bileşiğinin  $-0,15$  V'da modifiye karbon pasta elektrot yüzeyinde indirgenmesine dayanılarak yapıldı. Hazırlanan fenol biyosensörünün uygun çalışma koşulları araştırıldı. Bu amaçla enzim elektrodun doğrusal çalışma aralığı belirlendi. Biyosensörün amperometrik cevabına pH'nın ve sıcaklığın etkisi araştırıldı. Ayrıca tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü tayin edildi. Fenol tayinine bazı kation, anyon ve moleküllerin girişimlerin etkileri incelendi. Hazırlanan biyosensör atık sularda fenol tayininde kullanıldı.





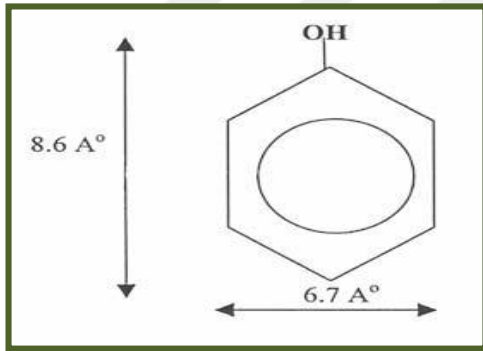
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Fenol ve Özellikleri

Fenol, 1834 yılında ilk defa taş kömüründen elde edilen katranda bulunduğu için, karbon asidi olarak isimlendirilmiştir. Fenoller ( $C_6H_5OH$ ), benzenin hidroksil türevleri olarak isimlendirilen, benzen gibi halkalı bileşikler arasında en önemli organik madde olarak bilinir

Fenoller aromatik halkaya direk olarak bağlı  $-OH$  grubuna sahip alkollerden farklıdır [18]. Fenollerin kimyasal özelliklerini ve reaksiyonlarını  $-OH$  grubu yönlendirmektedir. Fenoller alkollerden daha asidik davranırlar, böylece fenoller alkollerin reaksiyon vermediği buzlarla bile reaksiyon verirler. Birçok alkolün pKa değeri 18 dolaylarında iken fenollerin pKa değerleri 11'den daha küçüktür [19].

Fenol kendine özgü kokusu olan renksiz ya da beyaz toz halinde bulunan, suda oldukça iyi çözünen ve ticari formları sıvı halde olup tutuşabilme özelliğine sahip kristal yapıdadır [20].



Şekil 2.1. Fenolün üç boyutlu kimyasal yapısı (Molva, 2004)

Fenol moleküllerinde bulunan hidroksil grupları fenollerin de alkoller gibi güçlü moleküller arası hidrojen bağları yapabilmelerini sağlamaktadır. Bu hidrojen bağları fenollerin kaynama noktalarının, aynı molekül kütlesine sahip hidrokarbonların kaynama noktalarından daha yüksek olmasına yol açar. Fenolün erime noktası  $43\text{ }^{\circ}C$  olmasına rağmen su içerdiği zaman erime noktası düşmekte ve oda sıcaklığında sıvı halde bulunmaktadır [21].

Fenolün dünyadaki yıllık üretimi 3 milyon tondan fazladır. Fenol pek çok endüstriyel ürün ve kimyasalın ham maddesi olup, 1-7000 mg/L arasındaki derişimlerde petrokimya, kâğıt,

tekstil, plastik, kimya, dezenfektan, antioksidan endüstrileri, yağ rafinerileri, kimyasal tesisler, kok fırınları, patlayıcı ve fotoğrafçılıkta kullanılan bazı kimyasalların üretimi, kâğıt hamuru ve kâğıt ağartma tesisleri, reçine, pestisit, insektisid, çözücü endüstrileri, uçak bakım ve dökümhane işletmeleri, azot çalışmaları, cam elyafi fabrikaları, demir-çelik, polimerik reçine ve eczacılık alanında kullanılmaktadır [22].

Çizelge 2.1. Fenolün fiziksel özellikleri

Özellikler	Değerler
Ticari adı	Karbolik asit, fenik asit, fenik alkol
Molekül kütlesi (g/mol)	94,144
Molar hacim (cm <sup>3</sup> /mol)	90
Kaynama noktası (°C)	182
Erime noktası (°C)	43
Yanma noktası (°C)	85
Sıvı yoğunluğu (g/cm <sup>3</sup> )	1,058 (20°C)
Sulu çözelti pH'ı	6
Buhar basıncı (mmHg)	0,41 (25°C)
Doygun hava içindeki hacim yüzdesi	% 0,046 (25°C)
Doygun havanın yoğunluğu	1,00104 (air=1)
Ayrışma sabiti	1,3×10 <sup>-10</sup>
Dipol moment	1,450007
Kırılma oranı	1,54 (45°C)
Sıvı yüzey gerilimi (dynes/cm)	36,5 (55°C)
Aşırı entalpi (kJ/mol) [S/D]*	1/8
Aşırı entropi (J/mol K) [S/D]*	9 / -2
Asidite sabiti, pKa(25°C'da, H <sub>2</sub> O içerisinde)	10,02

Fenoller ilaç, boya ve pestisitlerde de ham madde olarak kullanılır [23]. Boya ve ilaç endüstrilerinde kullanılan klorofenoller, reçine, antioksidan, plastikleştiriciler ve deterjan imalatında kullanılan alkil fenoller, yüzey aktif maddeler de yine fenolden elde edilirler [24,25].

Fenoller; atık sularda, doğal ve içme suyu temini amacıyla kullanılan sularda mevcut olabilir. İçme suları ve diğer suların klorlanması kötü kokulu ve tatları çok kötü olan

klorofenollerin oluşumuna sebep olur [26]. Fenol ve türevlerinin en çok içeren işletmelerin başında kömür işletmeleri gelir, Kömür destilasyonu ve kömürden elde edilen organik sentezlerin atıkları, bol miktarda fenol ve türevlerini içerir

Fenoller zehirli olduklarından tüm canlı hücre türlerine zarar verirler. Fenol varlığı (0,001-0,1 mg/L) suda tat ve koku olarak anlaşılabilir [26]. Fenol içeren atık sular çok zehirlidir ve fenol derişimi 2 mg/L' nin üzerinde balıklar için zehirleyici etki oluşturur.

Fenol içeren suların içilmesi insanlar ve hayvanlar için de şiddetli böbrek bozukluklarına, hatta ölümlere neden olabilir. Fenollerin deri ve göze teması tahriş edici olabilir. Bu nedenle kullanılırken deriye temas ettirilmemeli ve buharlarını solunmaktan kaçınılmalıdır.

## **2.2. Enzimler Hakkında Genel Bilgi**

Enzimler organizmalardaki reaksiyonları hızlandıran ve yan ürün oluşmadan % 100'lük bir ürün verimi alınmasını sağlayan, genellikle protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler [27,28]. Enzimlerin katalizör olarak, diğer kimyasal katalizörlere çok fazla üstünlükleri bulunmaktadır.

Enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan ürüne substrat denir. Enzimler, etki ettiği substrat adının sonuna -az eki getirilerek (üre, üre-**az**) veya genel olarak pepsin, kimotripsin gibi isimlendirilir. IUB olarak kısaltılan Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından yapılan adlandırmada ise enzimler, E.C. olarak kısaltılan dört rakamlı bir kod numarası ile tanımlanarak isimlendirilir. [27-30].

Bazı enzimler katalizleme reaksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirirken bazıları da protein yapısında olmayan gruplara ihtiyaç duyarlar. "Kofaktör" adı verilen bu gruplar "koenzim" adı verilen çok karmaşık bir organik bileşik olabileceği gibi, bir metal iyonu da olabilir. Bazı durumlarda ise ikisi de gerekebilir. Koenzimle birlikte enzim molekülüne "haloenzim", kofaktörsüz olan protein kısmına ise "apoenzim" denir. Apoenzimlerin protein yapısındaki aminoasit türleri ve dizilişleri her enzimde farklılık göstermektedir. Bu nedenle enzimin özelliğini ve özgüllüğünü belirleyen kısım apoenzimdir. Apoenzimler tek başlarına aktivite göstermezler, ancak koenzimle birlikteyken katalitik aktivite kazanırlar [31].

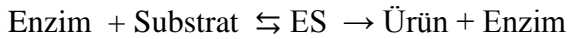
Enzimlerin katalizleme güçleri turnover sayısı adı verilen bir değerle ifade edilir ve turnover sayısı birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısına eşittir. Turnover sayısı en yüksek olan enzim karbonik anhidraz enzimidir.

Enzim miktarı, aktivite esas alınarak belirlenir ve enzim ünitesi (E.Ü) olarak verilir. 25 °C' de ve en uygun koşullarda 1 mikromol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir. 1 mg protein başına düşen enzim ünitesi olarak spesifik aktivite tanımlanır ve bu da enzimin saflığının bir ölçüsüdür [29,30].

Tüm canlı hücrelerde meydana gelen reaksiyonların hepsi, uzak veya yakın enzimlerle ilgilidir. Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenirler ve hücre canlılığını yitirdikten sonra bile bir süre etkisini sürdürürler. Enzimlerin katalitik etkileri hücreye bağlı değildir.

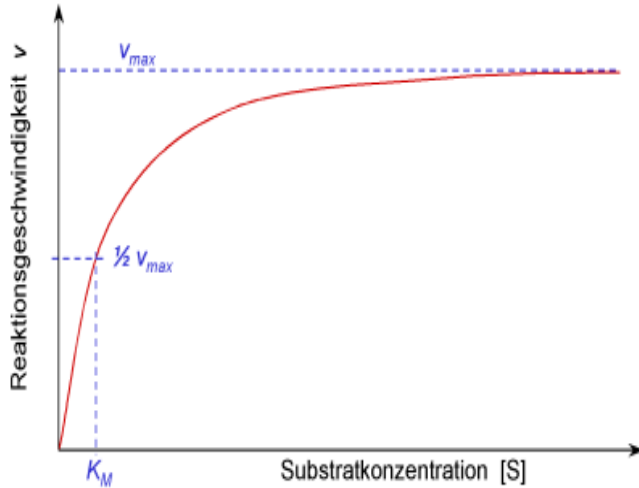
Enzimler de protein yapısında olduklarından proteinlerin tüm özelliklerini gösterirler. Onlar gibi makromoleküller olması itibarıyla sellofan ve kolodyum zarlarından geçemezler ve bu özelliklerden dolayı ısı ile kolaylıkla denatüre olurlar ayrıca ortamın alkali veya asit oluşuna karşıda oldukça hassastırlar. Enzimlerin hızları ortalama olarak 30-50 °C arasında artar. Fakat bu sıcaklıkların üzerindeki sıcaklıklarda denatürasyona uğrarlar [32].

Enzim, substratı ürüne dönüştürürken önce onunla bir "Enzim-Substrat kompleksi" oluşturur, daha sonra da bu kompleks ürün ve enzime dönüşür.



Burada ES kompleksi, E ve S' dan  $k_1$  hızı ile oluşur; ES'nin ayrışması ise  $k_2$  hızındaki geri reaksiyonla ve  $k_3$  hızı ile ürün ve enzime ayrışması ile olur. Reaksiyon kararlı duruma ulaştınca "Kararlı Durum İlkesi"ne göre ES'nin oluşması ayrışmasına eşit olur, yani derişimi değişmez.

Michaelis-Menten 1913 yılında enzim reaksiyonları üzerinde ilk kinetik çalışmaları detaylı bir şekilde yapmıştır. Michaelis-Menten kinetiğine göre reaksiyon hızının substrat derişimine bağlılığı, başlangıç enzim derişimi sabit alınıp incelendiğinde, hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 2.2). Bu eğri Michaelis-Menten bağıntısı ile formülize edilir.



Şekil 2.2. Michaelis – Menten grafiği

$$V = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Michaelis-Menten bağıntısı})$$

$V_{max}$ : hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir. Maksimum hızın yarısına ( $V_{max}/2$ ) karşılık gelen substrat derişimi  $K_m$  (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir.  $V_{max}$  ve  $K_m$  bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir.

Michaelis-Menten grafiği doğrusal, logaritmik ve sabit olmak üzere 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat derişimi  $K_m$  den çok az olacağından grafik bu bölgede doğrusaldır. Logaritmik olan ikinci bölgede ise oldukça büyük substrat derişiminde herhangi bir ihmal yapılamaz, reaksiyon karışık mertebeden ilerler. Reaksiyon hızının değişmediği üçüncü bölgede ise; substrat derişimi,  $K_m$  'den çok büyüktür.  $V = V_{max}$  olur ve reaksiyon sabit bir hızla devam eder.

Michaelis-Menten grafiği incelendiğinde hiperbolik bir eğri olduğu görülür. Hiperbolik eğriden yapılacak hesaplamaların zorluğu açıktır. Uygulamalarda bu zorluğu kolaylaştırmak amacı ile bu hiperbolik eğrinin bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla Michaelis-Menten grafiği aşağıda verilen Lineweaver-Burk denkleminin uygun şekilde değiştirilerek, şekil 2.3. de görülen eğri elde edilir. [33].

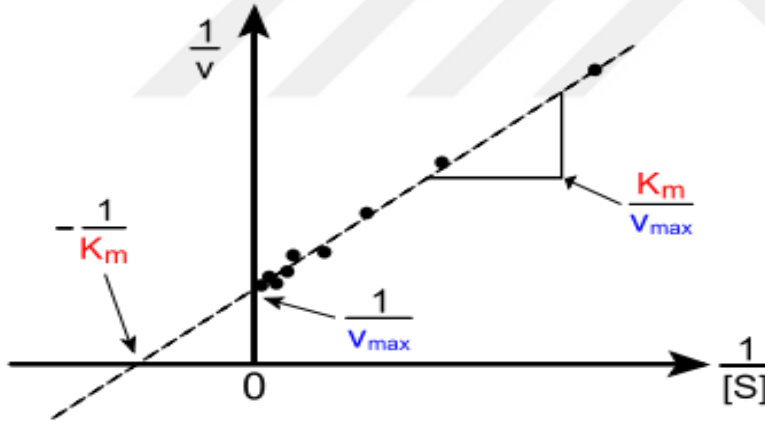
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (\text{Lineweaver-Burk denklemi})$$

Bu denkleme göre Y ekseninde  $1/V_{\max}$ , X ekseninde ise  $1/[S]$  değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise  $K_m/V_{\max}$ ' tır (Şekil 2.3).

Enzimatik reaksiyonların kinetiği bazı faktörler tarafından etkilenmektedir. Bu etkenler sırasıyla:

- 1) Substrat derişimi
- 2) Enzim derişimi
- 3) pH
- 4) Sıcaklık
- 5) İyon şiddet
- 6) Kofaktör derişimi
- 7) aktivatör ve İnhibitör derişimi

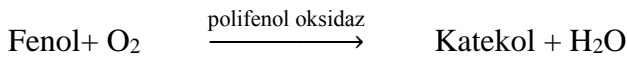
Bu etkenler enzim üzerine değişik oranlarda etki etmektedir.

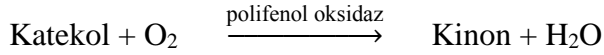


Şekil 2.3. Lineweaver – Burk grafiği

### 2.3. Polifenol Oksidaz Enzimi

Polifenol oksidaz (tirozinaz) (PPO- E.C. 1.14.18.1) enzimi bakır içeren bir monofenol monooksijenaz enzimidir. Oksidoredüktazlar sınıfına girer. Moleküler oksijen varlığında monofenollerin *o*-difenollere hidrosilasyonunu ve katekolün de kinonlara yükseltgenmesini katalizler ve reaksiyon sonucunda su oluşur.





Enzim, bakteri, mantar, bitki ve hayvanlarda bulunur. *Agaricus bisporus* türünden elde edilen enzim hidrofiliktir ve izoelektrik noktası yaklaşık 5,0'dır. Ayrıca bu enzim yaklaşık 120 kD moleküler kütlesine sahip bir tetramerdir. Enzim, fenollerin ve süstitüye fenollerin elektrokatalitik kinon indirgenmesi üzerine temellenmiş tayarlerinde en çok kullanılan enzimdir. Özellikle mantar tirozinazı en çok izole edilen ve kullanılan türdür [34].

Polifenol oksidaz enzimi birçok meyve ve sebze de bulunan ve bitkinin hastalıklara karşı direncinin artmasına neden olan bir metaloenzimdir. Gıda endüstrisinde önemli bir enzimdir.

PPO enzimi gıdalarda enzimatik kararmaya neden olur. Kararmadan sorumlu tutulan polifenol oksidaz enzimi, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek, onları *o*-kinonlara yükseltger ve bunların polimerizasyonu sonucu esmerleşmeyi yapan kahverengi melanin pigmentlerinin oluşumuna yol açmaktadır.

#### 2.4. Biyosensörler

Biyosensörler (biyoalgılayıcılar), biyokimyasal bir bileşenin fizikokimyasal çeviriciyle birleştirilmesiyle oluşan cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensörün amacı, bir analitin (analiz edilecek madde) miktarıyla orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir [35]. Bir sensör fiziksel boyuttaki değişimleri elektriksel boyuttaki değişimler olarak ölçer. Bu değişimler akım, gerilim, sıcaklık vb. olabilir.

Biyosensörler, biyoajanları immobilize halde kullanan, çeşitli gaz, iyon ve biyolojik maddelerin teşhisi, kantitatif tayini ve orijinal sistemlerde izlenmesi amacıyla geliştirilmiş cihazlardır [20]. Biyosensörler klinik tıpta teşhis ve tayin amacıyla, fermantasyon analizi ve kontrolünde kimya, gıda endüstrisi, tarım ve veterinerlikteki çeşitli analizlerde, endüstriyel gaz ve sıvıların analizinde, çevre kirlenmesinin izlenmesinde, patlayıcılar ve diğer askeri alanda kullanılmaktadır. Biyosensörler canlılardaki çeşitli maddelerin algılanmasını mümkün kılan biyokimyasal maddelerin birleştirilmesiyle ortaya çıkmıştır. Bu sistemler bir yandan biyolojik sistemin yüksek seçiciliğini diğer yandan sensörlerin tayin duyarlılığını birleştirmiş ve çok geniş uygulama alanı bulmuştur. Düşük maliyet ve hızlı cevap süresiyle sürekli sinyalleri algılamaları biyosensörlerin avantajları arasındadır [36].

Yüksek seçicilik, uzun süreli raf ömrü, otomasyon kolaylığı gibi özellikler biyosensörlerin kullanım alanlarında artışa neden olur [ 20,36].

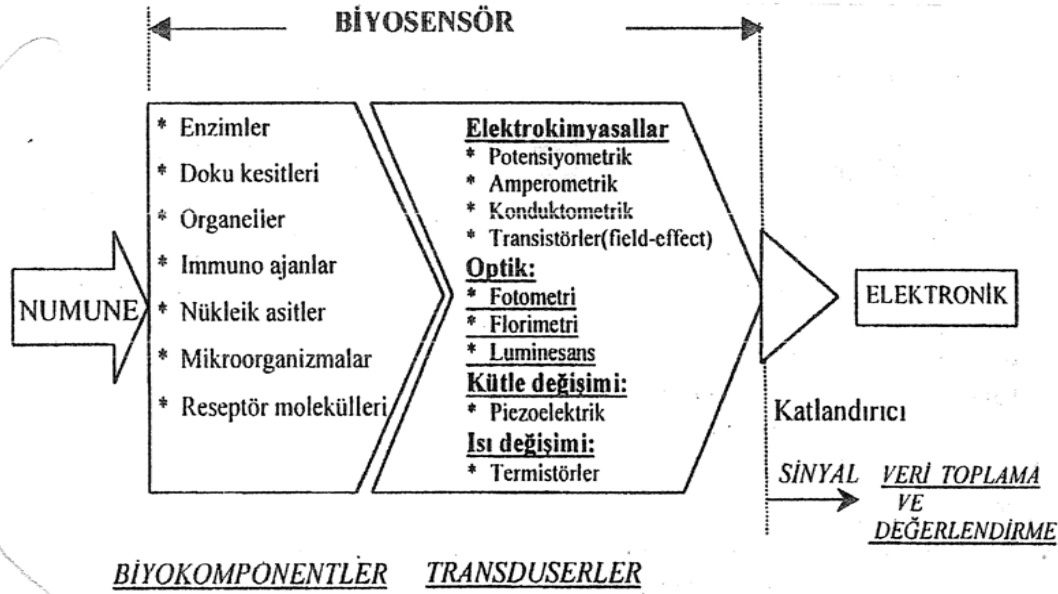
Biyosensör sistemleri biyomolekül, algılayıcı ve elektronik kısım olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır.

Bu bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeyle seçimli ve tersinir olarak etkileşen, biyokimyasal ajandır. Biyoajanlar, biyoyumlu ajanlar ve biyokatalitik ajanlar olarak iki şekilde bulunur. Antikorlar, hormonlar, DNA, lektin gibi moleküller biyoafinite ajanlarıdır. Bunlar antijenlerin, hormonların, DNA parçacıklarının ve glikoproteinlerin tanınmasında kullanılırlar. Etkileşim sonrasında, tabaka kalınlığı, kırınım indisi, ışık absorpsiyonu ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal parametrelerin değişimi meydana gelir. Biyokatalitik ajanlar ise, analit de moleküler değişime sebep olmakta ve bu değişim sonucu ortamda madde miktarındaki değişiklik ölçülmektedir. Bu sebeple, biyokatalitik ajan olarak enzim, mikroorganizma ve bitkisel ya da hayvansal doku parçaları kullanılmaktadır.

Bir biyosensörde bulunan algılayıcılar, biyokatalizör ile tayin edilecek maddenin teması sonucu ortaya çıkan biyokimyasal sinyali uygun bir sistemle nicel olarak elektrik sinyaline dönüştürülür [37].

Biyosensörün elektronik bileşeni ise algılayıcıdan elde edilen elektronik sinyalleri büyüklüğünü bir ekran veya yazıcı yardımı ile bize gösterir.

Biyosensörlerin tarihi 1950 yıllarına dayanmaktadır. L. C. Clark isimli araştırmacılar Amerika birleşik devletlerinin Ohio eyaletinde ki Cincinnati Hastanesi'nde bir cerrahi operasyonda kandaki oksijenin derişimini bir oksijen elektrotu ile ölçtüler. Daha sonra ise 1962 yılında Clark ve Lyons, O<sub>2</sub> elektrodunu glukoz oksidaz enzimi ile kombine ederek, kanda glukoz derişimini ölçtüler. Clark ve Lyons bu çalışmalarlarıyla bir yandan enzim sistemin yüksek seçiciliğini, diğer taraftan ise elektrodun duyarlılığını kullanarak yeni bir uygulama olanağı buldular.



Şekil.2.4. Biyosensörlerin bileşenleri

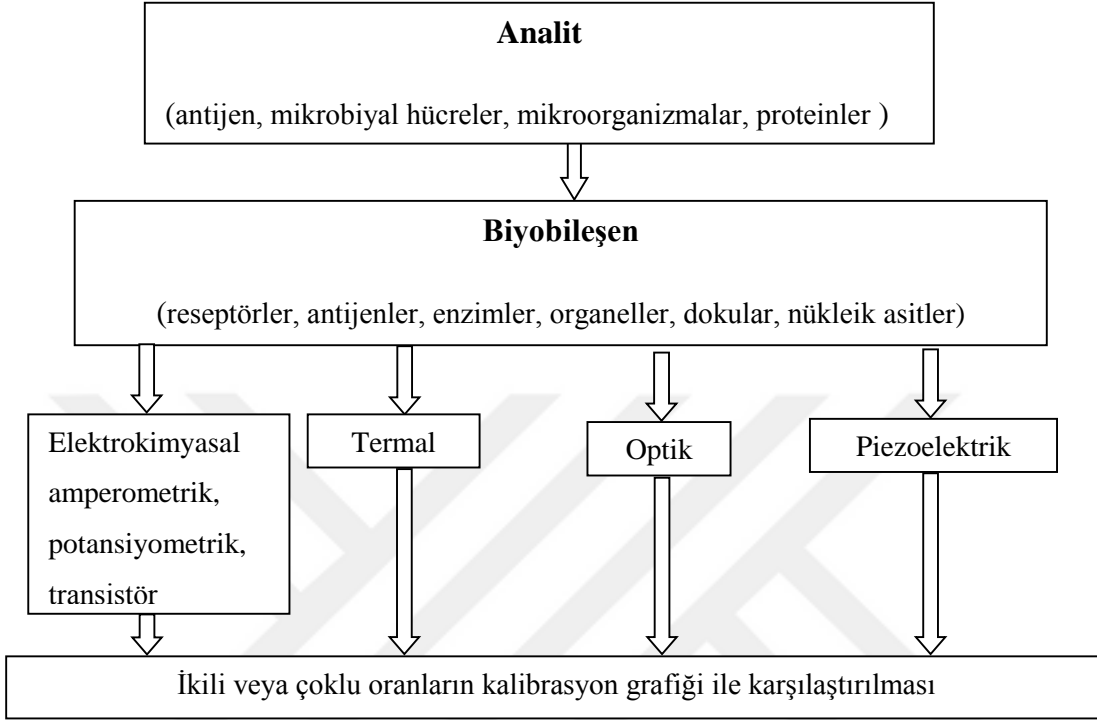
#### 2.4.1. Biyobileşenler

Enzim, mikroorganizma, organel, doku kesiti, antikor, nükleik asit biyobileşen olarak kullanılırlar [38]. Biyobileşen analiti ürüne dönüştürür. Oluşan ürün dönüştürücü tarafından algılanır. Yüksek seçiciliklerinden dolayı enzimler en çok kullanılan biyokimyasal maddelerdir.

#### 2.4.2. Biyosensörlerin çalışma mekanizması

Biyosensörlerin çalışmasında ilk olarak substrat çözeltiden biyosensör yüzeyine taşınır. Substrat biyokomponentin aktif kısmına difüzyonla ulaşır. Biyobileşen, gözenekli bir polimer membrana (selüloz ve diyaliz membranı gibi) emdirilmiş olabilir. Ya da algılayıcı ile polimerik membran (selüloz, asetat/nitrat, polivinil alkol, poliüretan vb. ) arasına sandviç gibi sıkıştırılmış veya polimer bir jel içine hapsedilmiş olabilir. Bu hapsedme işleminde akrilamid, jelatin, agaroz gibi doğal veya sentetik polimerler kullanılır. Biyokomponent ve substrat arasında tepkime meydana gelir. Bu tepkime sonucu gaz molekülleri ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$ , vb. ) veya seçimli iyonlar oluşabilir ( $H^+$ ,  $NH_4^+$ , diğer tek değerlikli iyonlar). Isı değişimi olabilir, optik dansite değişebilir, elektron alışverişi olabilir [39]. Biyobileşen ve substrat arasındaki tepkime sonucu oluşan ürün algılayıcı yüzeyine taşınır. Algılayıcı yüzeyinde

meydana gelen değişiklikler algılanarak transduserde ölçülebilecek bir değere dönüştürülür. Ölçülen sinyal analit konsantrasyonuyla orantılıdır [37].



Şekil 2.5. Biyosensörlerin çalışma mekanizması

### 2.4.3. Çeviriciler (Transduserler)

Çevirici biyokimyasal sinyali elektronik sinyale dönüştürür. Ölçülen elektriksel sinyal analit derişimiyle orantılıdır. İlgili türlerin biyokimyasal etkileşimine uygun bir çevirici sistem seçilmelidir. Fiziksel çeviriciler elektrokimyasal, spektroskopik, termal, piezoelektronik ve yüzey akustik dalga teknolojisi olarak çeşitlendirilebilir.

Çeviriciler dört grupta toplanabilir;

#### 1) Elektrokimyasal çeviriciler

- Amperometrik esaslı
- Potansiyometrik esaslı
- Konduktometrik esaslı

#### 2) Optik çeviriciler

- Absorbans ölçümünü temel alanlar
- Floresans veya fosforesans ölçümünü temel alanlar

- Kırılma indisini temel alanlar
- 3) Kütle değişimini temel alan çeviriciler
- 4) Isı değişimini temel alan çeviriciler
- Termistörler

#### **2.4.4. Biyosensör tasarımında dikkat edilmesi gereken hususlar**

Biyosensör tasarımlarında, ilk olarak biyosensörün tanıyacağı analit belirlenmelidir. Daha sonra aşağıdaki maddeler dikkate alınarak biyosensörler tasarlanmalıdır. Bunlar sırasıyla;

- Analiti tanıyacak biyobileşenin belirlenmesi,
- Biyobileşenin dönüştürücüye immobilizasyonu için uygun ve verimli immobilizasyon metodunun seçimi,
- Biyobileşen ile analit arasındaki tepkime sonucu oluşan ürünün oluşturduğu sinyallerin ölçülebileceği dönüştürücünün seçimi ve dizaynı [40] olarak sıralanabilir.

#### **2.4.5. Biyosensörlerde immobilizasyon yöntemleri**

Biyoaktif bileşen ile iletici unsurun birleştirilmesinde oldukça farklı immobilizasyon yöntemlerinden yararlanılabilir. Biyoaktif bileşen sensör olarak da adlandırabileceğimiz temel unsur üzerinde fiziksel olarak, jel içinde veya polimer matrikste tutuklanabilir, elektrot yüzeyinde biriktirilebilir, kovalent veya çapraz bağlanarak immobilize edilebilir [22].

#### **2.5. Enzim İmmobilizasyon Metotları**

Enzimin elektrot yüzeyine yüksek aktivite ile ince tabaka içerisine fiziksel olarak yerleştirilmesi kovalent ve kovalent olmayan metotlarla gerçekleştirilir. Basitçe immobilizasyon, serbest haldeki enzimi elektrot yüzeyinde yarı geçirgen bir membran kullanarak tutmak suretiyle gerçekleştirilir. İmmobilizasyon, kelime anlamı hareketini kısıtlama olarak bilinir. Enzimler immobilize edildikten sonra bazı özel nitelikler kazanırlar.

Bu nitelikler aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

İmmobilize enzimin serbest enzimlere üstünlükleri;

- 1) Tepkime sonucunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme vb.). Böylece, ürünler enzim tarafından kirletilmemiş olur.
- 2) İmmobilize enzim, pH, sıcaklık gibi çevre koşullarına karşı daha dayanıklıdır.
- 3) İmmobilize enzimin, kullanım sayısı ve süresi artar.
- 4) Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- 5) İmmobilize enzim serbest enzime göre daha kararlıdır.
- 6) İmmobilize enzim ile ürün oluşumu kontrollü bir şekilde ayarlanabilir.
- 7) İmmobilize enzim ardışık reaksiyonlar da kullanımını uygundur.
- 8) Bazı durumlarda, serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- 9) Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.
- 10) Mekanik çalışmalar için uygundur.

İmmobilizasyon metotları aşağıdaki gibidir:

### **2.5.1. Taşıyıcıya bağlama yöntemleri**

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

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktivite edilmeleri gerekir. İmmobilizasyon, çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik olarak kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde, enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında, taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilir.

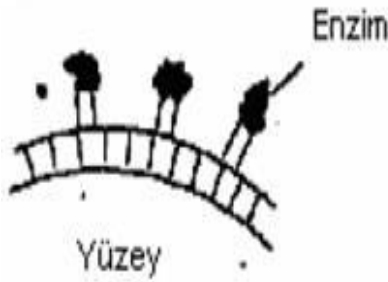
### **2.5.2. Kovalent bağlama**

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

Çizelge 2.2. Enzimin bağlanmasını sağlayan fonksiyonel gruplar

Reaktif Gruplar	
Taşıyıcı	Enzim
OH	NH <sub>2</sub>
COOH	NH <sub>2</sub>
NH <sub>2</sub>	COOH, NH <sub>2</sub>
CH <sub>2</sub> COOH	CH <sub>2</sub> CON <sub>3</sub>
CHO	NH <sub>2</sub>

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



Şekil 2.6. Kovalent bağlama

### 2.5.3. Adsorpsiyon

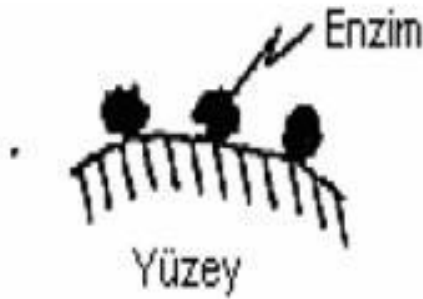
Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Proteinler ve özellikle enzimlerin katı yüzeylerde adsorpsiyonu detaylıca araştırılmıştır. Suda çözünmeyen taşıyıcılarda adsorpsiyon yönteminin enzim immobilizasyonunda oldukça sık kullanıldığını görmekteyiz.

Yöntem, yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Taşıyıcıya bağlanmada etkin olan Van der Waals kuvvetleridir [41]. Adsorbanlar çok değişik türde olmakla birlikte iyi bir adsorpsiyon sağlayabilmek için genellikle adsorbanın bir ön işleminden geçirilmesi gerekir.

Enzim immobilizasyonunda en sık kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, gözenekli cam,  $\text{CaCO}_3$ , kül, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır.

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

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



Şekil 2.7. Adsorpsiyon

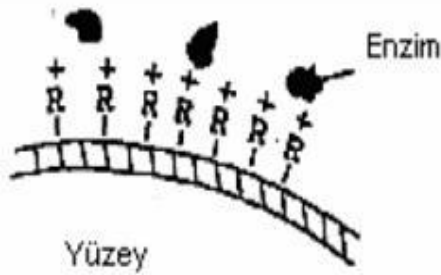
Bazı adsorbanlar bir enzimin farklı biçimlerini, aktif veya inaktif biçimlerinden birini adsorbe ederken, diğerini desorbe etmektedir. Eğer enzimin aktif şekli desorbe edilirse bazı durumlarda immobilize enzimin bağlı aktivitesi yüzde 100'den büyük değerler alır, tersi durumda bağlı aktivite sıfır olur, yani immobilizasyon ürünü hiç aktivite göstermemektedir. Yöntemin yararları; enzimin immobilizasyon işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve bir yandan immobilizasyonu gerçekleştirirken diğer yandan enzim saflaştırılmasına olanak sağlamasıdır. Yöntemin sakıncaları; her ne kadar immobilizasyon işlemi kolaysa da optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzimle

taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçer ve ürünlerin kirlenmesine neden olur.

#### 2.5.4. İyonik etkileşim

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

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



Şekil 2.8. İyonik bağlama

#### 2.5.5. Şelat bağlama

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

#### 2.5.6. Biyospesifik bağlama

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

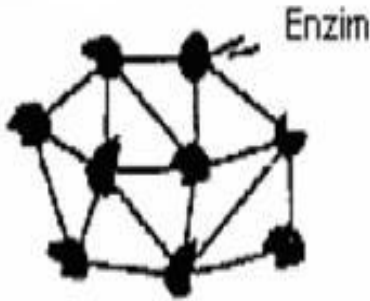
### 2.5.7. Çapraz bağlama yöntemleri

Küçük molekül, bi veya multi fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında kovalent bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH ya da immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır. İntermoleküler bağlanmalar yanında, intramoleküler bağlanmalar da söz konusudur.

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu 4 farklı şekilde gerçekleşir:

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

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; gluteraldehit, kloroformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksisiranlar, divinilsülfolar, p-benzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir.



Şekil 2.9. Çapraz bağlama

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

### 2.5.8. Kopolimerizasyon yöntemleri

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

### 2.5.9. Tutuklama yöntemleri

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

### 2.5.10. Polimer matrikste tutuklama

Polimerizasyon ve çapraz bağlamanın olduğu ortamda enzim de bulunduğu takdirde enzim, çapraz bağlanma sonucu oluşan odacıklarda (kafes) tutuklanmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer; N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir. Yöntem, yüksek derece çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiliye geçmeleri engellenmektedir.

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

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

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

Polimer zincirleri arasındaki çapraz bağlama değişik bifonksiyonel veya multi-fonksiyonel reaktiflerle sağlanmaktadır. Örneğin, bu yöntemle enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan taşıyıcı olan poliakrilamidin çapraşık bağlanması N,N'-metilenbisakrilamid ile gerçekleştirilir. Çapraz bağlı taşıyıcıların hazırlanmasında, monomer ve çapraz bağlayıcı reaktiflerin mol oranları çok önemlidir. Bu durum bir yandan enzim moleküllerinin tutuklanacağı hücrelerin çapına etki ederken, diğer yandan taşıyıcının fiziksel özelliklerinde önemli değişimlere de neden olacaktır.

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

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



Şekil 2.10. Polimer matrikste tutuklama

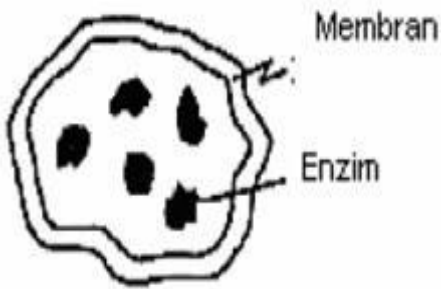
Yöntemin sakıncaları ise; immobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun deney koşullarına çok sıkı bağımlı oluşu ve immobilize enzimin ancak küçük moleküllü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir.

### 2.5.11. Mikrokapsülleme

Bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasından ibarettir. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100  $\mu\text{m}$  arasında değişir.

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

Sürekli mikrokapsüllerde çerçeve membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde lipozomlar ise bir sıvı tabakadır. İmmobilizasyonda kullanılan çerçeve maddesinin (membran) yarı geçirgen olması zorunludur. Ayrıca bu yarı geçirgen membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntemle immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır [39].



Şekil 2.11. Mikrokapsülleme

### 2.6. Enzim Sensörleri

En genel anlamda bakıldığında bir biyosensör biyobileşen, dönüştürücü ve ölçüm sisteminden ibarettir. Enzim sensörlerini diğer biyosensörlerden ayıran tek fark biyoaktif tabakada biyobileşen olarak enzimlerin yer almasıdır [42,43].

Çizelge 2.3. Enzim bazlı sensörlerin sınıflandırılması

1.	Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensörleri
a)	Amperometrik esaslı enzim sensörleri
	Birinci nesil amperometrik enzim elektrotları
	İkinci nesil amperometrik enzim elektrotları
	Üçüncü nesil amperometrik enzim elektrotları
b)	Potansiyometrik esaslı enzim sensörleri
	Proton duyarlı potansiyometrik enzim elektrotları
	Amonyum duyarlı potansiyometrik enzim elektrotları
	Karbondiyoksit duyarlı potansiyometrik enzim elektrotları
c)	Yarı iletkenleri esas alan enzim sensörler
	Enzim alan etki transistörleri
2)	Optik esaslı enzim sensörleri
	Absorpsiyon esaslı optik enzim sensörleri
	Flouresans esaslı optik enzim sensörleri
	Biyoluminesans esaslı optik enzim sensörleri
3)	Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri
	Piezoelektrik esaslı enzim sensörleri

Enzim sensörlerinin sınıflandırılması en yaygın şekilde, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sinyalin belirlenme ilkesine göre yapılmaktadır (Çizelge 2.3) [29,44]

### 2.6.1. Amperometrik esaslı enzim sensörleri

Amperometri en genel anlamıyla belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Sistem; çalışma, referans ve yardımcı elektrot olmak üzere üç elektrottan oluşur. Çalışma elektrodu immobilize biyoaktif tabaka içermektedir. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektro aktif türlerin derişiminin bir fonksiyonu olarak tanımlanır. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin derişimlerinin belirlenmesinde yararlanır [44,45].

Elektrokimyasal biyosensörlerin büyük bir kısmı katalitik reaksiyon sırasında elektronlar kullanan ya da üreten oksidoredüktaz sınıfı enzimleri içerir. Bu elektrokimyasal reaksiyonlar elektrot yüzeyinde gerçekleşir ve akım oluşturmak için kullanılır. Enzimatik oksidasyon

sonucu açığa çıkan elektronlar anoda transfer edilir. Burada, oksijen gibi yüksek bir elektron alıcısına taşınır [45,46].

### **2.6.2. Potansiyometrik esaslı enzim sensörleri**

Potansiyometri en genel anlamda çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrot potansiyeli doğrudan analit derişimini tanımlar. Elde edilen sinyal Nerst Kanunu uyarınca derişimin negatif logaritması ile orantılıdır. Potansiyometrik enzim elektrotlarında kullanılan temel sensörler pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyon ya da katyonlara duyarlı iyon - seçici elektrotlar ve karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz duyarlı elektrotlardır [45,46].

### **2.6.3. Yarı iletken esaslı enzim sensörleri**

Temel sensör olarak metal oksit yarı iletken duyarlı alan etkili transistörleri (MOSFET) ya da iyon duyarlı alan etkin transistörleri (ISFET) esas alan bu tür enzim sensörleri, enzim ile alan etkin transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etkili transistörü (ENFET) olarak adlandırılır [42,47].

### **2.6.4. Optik esaslı enzim sensörleri**

Optik enzim sensörleri iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle enzim immobilize edilerek hazırlanan ölçüm cihazlarıdır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü temel alır. Sinyal ışık yansımaları, saçılması ya da yayımı sonucu meydana geldiği için, optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile hazırlanan optik esaslı enzim sensörleri absorpsiyon, flouresans, biyoluminesans gibi ilkeler çerçevesinde işlev görürler [45,46]

### **2.6.5. Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri**

Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri; termal enzim sensörleri, enzim termistörleri ya da entalpik enzim sensörleri gibi değişik isimlerle tanımlanırlar. Çalışma ilkeleri bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanılarak substrat derişimini belirlemektir. Genel olarak ekzotermik enzimatik reaksiyonlardan yararlanılır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat derişimi arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca

ulaşılır ve oldukça küçük sıcaklık değişimleri termal olarak yalıtılmış ortamlarda termistör veya termofiller yardımıyla izlenir [45,46].

### **2.6.6. Piezoelektrik esaslı enzim sensörleri**

Piezoelektrik sensörler genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki değişimi belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütesinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensör seçiciliği kristal yüzeyindeki madde ile çok özel bir etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Bir piezoelektrik sensörün üzerinde enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen piezoelektrik enzim sensörlerinde, enzim moleküllerine substratların bağlanmasından dolayı meydana gelen kütle değişimlerinin, piezoelektrik kuartz diskin vibrasyonunda sebep oldukları farklanmadan yararlanılarak madde miktarına ulaşılır [45,46].

### **2.7. İdeal Biyosensörün Özellikleri**

İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken bazı özellikler aşağıda verilmektedir: Kalibrasyon özellikleri, doğrusal çalışma aralığı, duyarlık ve gözlenebilme sınırı ideal bir biyosensör analitin stok çözeltisinin çalışma ortamına ilave edilmesi yoluyla kolaylıkla kalibre edilebilmelidir. Kalibrasyon grafiğinde substrat derişimi ile biyosensör cevabı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu derişim aralığına doğrusal çalışma aralığı adı verilir.

Duyarlık, genellikle analitin derişimindeki değişikliğe karşı biyosensörün cevabındaki değişikliğin izlenmesi ile belirlenir. Duyarlık, kalibrasyon grafiğinin, doğrusal çalışma aralığından yararlanılarak belirlenen  $I/C$  ya da  $I/\log C/C_0$  oranından yani grafiğin eğiminden hesaplanır[48,49].

Gözlenebilme sınırı, en uygun çalışma koşullarında sensör ile tayin edilebilen en düşük derişim değeridir [50].

Seçicilik ve Güvenilirlik, bir biyosensörün seçiciliği hem enzimin özgüllüğüne hem de örnekte bulunan elektroaktif türlerin varlığına bağlıdır. İdeal bir biyosensör sadece hedef analitin derişimindeki değişikliklere cevap vermeli ve ortamda bulunan diğer türlerden etkilenmemelidir. Bir biyosensör seçiciliği iki şekilde belirlenebilir: Birincisi girişim yapan türün ortama eklenmesi ve biyosensörün cevabının ölçülmesini içerir. Her tür için

kalibrasyon eğrisi çizilir ve aynı koşullarda analit için çizilen kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılır. Bu durumda seçicilik, analitin tek başına ve girişim yapan türün tek başına olduğunda elde edilen sinyal oranı olarak ifade edilir. İkinci durumda ise, girişim yapan tür, belli derişimde analit içeren elektrokimyasal hücreye ilave edilir ve seçicilik, biyosensör cevabının varyasyon yüzdesi olarak ifade edilir.

Güvenilir bir biyosensörün cevabı analit derişimi ile doğrudan ilişkili olmalı ve örnek matriksi içinde bulunan girişim yapan türlerin derişimlerinden etkilenmemelidir. Bu sebepten, biyosensörler için muhtemel girişim yapabilen türler belirlenmeli ve etkilerinin nasıl olduğu tespit edilmelidir [49,51].

Cevap süresi, ideal bir biyosensörün cevap süresinin kısa olması istenir. Cevap süresi çalışma ortamına analit eklemeleriyle kolaylıkla belirlenebilir. Cevap süresi, kararlı hal cevabının % 90'ına veya % 95'ine ulaşılması için geçen süre olarak tanımlanabilir [49]. Cevap süresi analit, kosubstrat ve ürünlerin farklı tabaka ve membranlar boyunca taşınma hızına bağlıdır. Ayrıca, bu tabakaların kalınlığına ve geçirgenliğine de bağlıdır.

Tekrarlanabilirlik, bir zaman periyodu boyunca yapılan ölçüm sonuçlarının bir serisinin saçılması ya da yayılmasının ölçüsüdür. Bu genellikle doğrusal çalışma aralığındaki analit derişimleri için belirlenir [49]. Bir biyosensörün tekrarlanabilir cevaba sahip olması doğru ve güvenilir analiz için gereklidir.

Kararlılık, çalışma periyodu boyunca biyosensörün performansının korunması yeteneğidir. İdeal olarak bir biyosensörün uzun süre kararlılığını koruması istenir.

Ömür, biyosensörlerde kullanılan biyolojik elementler genellikle en az kararlı bileşendir. Bir biyosensörün en önemli özelliklerinden biri normal çalışma koşullarında ne kadar süre duyarlılığını koruduğudur. Ömür, yapılan ölçüm sayısına ya da ölçülen analit derişimine bağlı olarak değişebilir. Yüksek derişimler duyarlılığın daha çabuk yitirilmesine yol açabilir. Ayrıca, örnekte bulunan bazı türlerin varlığı da deaktivasyon sürecini, hedef analitin derişiminden bağımsız olarak, hızlandırabilir. Uzun biyosensör ömrü için gerekli saklama koşulları da önemlidir. Biyosensörün buzdolabında saklanması, biyolojik elementin özelliklerini korunmasını sağlayabilir [48].

## 2.8. Karbon Pasta Elektrotlar

Karbon pasta elektrotlar, karbon temelli elektrotlar içinde en yaygın olarak kullanılan elektrotlardır. Adams ve ekibi tarafından karbon damla elektrot oluşturmaya çalışırken geliştirilen karbon pasta elektrotlar, grafit tozu ile elektrolitik özellik göstermeyen organik bir sıvının belli oranlarda karıştırılması ile elde edilirler [52]. Karbon temelli elektrotların üstünlüklerinin yanında karbon pasta elektrotlar, inorganik ve organik materyaller ile modifiye edilmek suretiyle çok çeşitli alan ve şekillerde kullanılabilir [53].

## 2.9. Karbon Pasta Elektrotların Tarihçesi

Karbon pasta elektrotlar (CPE) ilk olarak Adams (1958) tarafından ortaya atılmıştır. Bu elektrotlar kolayca yenilenebilen ve modifiye edilen bir yüzey oluşturur. Düşük maliyetlidir. Karbon pasta elektrotlar grafit tozunun mineral yağı (Nujol) gibi uygun bir macunlaştırıcı sıvı ile karıştırılmasıyla hazırlanır. Daha sonra bu karbon pasta, bir teflon ya da cam tüp içine yerleştirilir. Pastalama sıvısı olarak birçok seçenek vardır, fakat düşük uçuculuk, saflık ve maliyet bu seçenekleri azaltmaktadır. Nujol (mineral yağı), parafin yağı, silikon, gres ve bromonaftalin bu seçenekler arasındadır. Nujol en iyi performansı gösterendir. Bu elektrotlardaki elektrokimyasal mekanizmanın bir kısmının, pastalama sıvısının geçirgenliğine bağlı olduğu düşünülmektedir. Karbon pasta aynı zamanda modifiye edilmesi için uygun bir matriks sağlamaktadır. Modifiye edici malzeme grafit ile karıştırılır. Karbon pastaların bir dezavantajı organik bağlayıcının yüksek oranda organik çözücü içeren ortamlarda çözünme eğilimidir. Metalik elektrotlardan daha iyi olarak karbon pasta elektrotlar, geniş bir anodik potansiyel limit ve düşük artık akım gösterirler. Katodik potansiyel limiti elektrot matriksinde çözünmüş oksijenin indirgenmesine bağlı olarak değişir. Karbon pasta elektrotların diğer bir genel problemi yüzeyinin akışkan ortamlarda mekanik olarak dayanıklı olmamasıdır.

Bazı araştırmacılar karbon pasta elektrotların gelişimini yıllara göre aşağıdaki bölümlere ayırmışlardır [54].

- 1959 - 1963 karbon pastanın başlangıcı ve ilk uygulamaları,
- 1964 -1965 karbon pastanın ilk modifikasyonları,
- 1974 elektrolitik bağlayıcılı karbon pastaların ortaya çıkışı,
- 1981 - 1990 kimyasal olarak modifiye karbon pastaların devri,

- 1988 biyolojik olarak modifiye karbon pasta elektrotlar,
- 1991 karbon pasta ile yarışan sağlam karbon kompozitler.

## 2.10. Modifiye Edilmemiş Karbon Pastalar

Klasik olarak, bütün karbon pastalar toz karbondan veya elektrolitik olmayan organik sıvının oluşturduğu iki maddeden oluşan karışımlardır. Bu tür karışımlar modifiye edilmemiş karbon pasta sınıfına girerler [55].

Karbon pasta elektrotların temel bileşenleri bütün elektrotlarda aynıdır. Parafin yağından oluşan pasta karışımlarının yapısı genel uygulamaların çoğunda tatmin edicidir.

Karbon pastadaki uygun elektroaktif madde yüksek saflıktaki grafit tozudur. Elektrolitik olmayan bağlayıcı olarak, spektroskopik parafin yağlarının marka olan iki ürünü daha çok kullanılmaktadır. Nujol (Aldrich) ve Uvasol (Merck) son yayınlanan makalelerin deneysel bölümlerinde belirtilmektedir [55,56]. Bu polar olmayan pasta sıvıları tüm önemli özelliklerini ihtiva etmektedir. Her ikisi de kimyasal olarak inerttir, izole edicidir, uçucu değildir, suyu geçirgendir, uygun kıvamda pasta karışımları oluştururlar. Fakat ortamdaki organik çözücülerde dayanımı azdır [57,58]. Silikon yağı temelli karbon pastalar daha iyi sonuç vermesine rağmen çok sıklıkta kullanılan bir elektrot malzemesi değildir [55].

Günümüzde bu pastaların bazı ilginç uygulamaları vardır [58]. Bunların en ilgi çekici özelliği yüksek iyon çifti oluşturma özelliğidir. Bunların düşük kararlılığı ve sinyal /gürültü oranı özellikleri bazı ön işlemler yapılmasını gerektirir.

Ticari olarak kullanıma hazır pastalar bulunmasına rağmen, modifiye edilmiş karbon pastalar da çalışmalarda tercih edilir. Karbon pastaların laboratuvar ortamında karıştırılarak hazırlanması avantajdır çünkü bileşikleri ve oranlarını araştırmacı kendi seçebilir. Modifiye karbon pastaların hazırlanması için bu kısmen uygundur.

## 2.11. Modifiye Karbon Pastalar

Modifiye karbon pastaların temeli genellikle grafit toz ve elektrolitik olmayan bir bağlayıcıdan oluşan karışımdır [45,44]. Karışım içinde ayrıca modifiye edici bulunur.

Modifiye ajan genellikle tek maddeden oluşur, fakat bu pastalar bazen iki ya da daha fazla elektrodu modifiye etmenin temel sebebi istenen ve daha önceden tanımlanan özelliklere sahip kalitatif yeni sensör elde etmektir. Karbon pasta elektrotlar şüphesiz modifiye elektrot hazırlamada bu amaçla kullanılan en uygun materyallerden biridir [45].madde ile modifiye edilebilir. Uygun bir aracı ile hazırlanan karbon pasta temelli enzim içeren biyosensörler, bu elektrotlara örnek verilebilir. Pasta içindeki modifiye edicinin miktarı % 10 ile % 30 (w/w) arasında modifiye ajanın özelliğine bağlı olarak ve modifiye pasta içindeki yeterli aktif sitenin oluşum kapasitesine bağlı olarak değişim gösterir [59].

Bir elektrodu modifiye etmenin temel sebebi istenen ve daha önceden tanımlanan özelliklere sahip kalitatif yeni sensör elde etmektir.Karbon pasta elektrotlar şüphesiz modifiye elektrot hazırlamada bu amaçla kullanılan en uygun meteryallerden biridir.[45]

Modifiye edici doğrudan bağlayıcı içinde çözülür ya da homojenasyonu sırasında pastaya karıştırılır [60]. Modifiye ediciden oluşan çözelti ile grafit parçacıkları ıslatılabilir ve çözücü buharlaştırıldıktan sonra karbon tozu kullanılabilir. Sonuç olarak daha önceden hazırlanmış pastalar yeniden modifiye edilebilir. Fakat direkt modifikasyonlar tek amaçlı kullanımlar için özel sensörler yapılmasını sağlarken bazı uygulamalar aynı karbon pastayı tekrarlanabilir modifikasyonlar için farklı ajanlarla kullanma fırsatı verir. Klacher [45] modifiye edicilerin mümkün olan dört görevinin sınıflandırmasını yapmış ve şu şekilde özetlemiştir:

- İstenilen ürünlerin tercihli tutuklanması (sıyırma analizinde ön deriştirme)
- İmmobilize moleküllerin veya bunların bazı kısımlarının elektrot reaksiyonlarında aracılık etmesi
- Katalitik olaylarda rol alması (katalitik elektrokimyasal cevaplar)
- Karbon pasta elektrotların yüzey özelliklerinin değiştirilmesi.
- Karbon pasta elektrotların, hazırlanmasındaki bu kolaylıklardan dolayı avantajlı olmuştur.

## **2.12. Karbon Pasta Elektrotların Yapısı**

Bilinen yumuşak karbon pastalar uygun elektrot gövdelerine sarılır. Yapılışı tabiki ölçümün özelliğine, kullanılacak olan hücreye, elektrodun çeşidine (makro ya da mikro olması)

bağlıdır. Karbon pasta elektrot gövdesi çeşitli cam, PVC ve teflondan yapılan silindir şeklinde ve bir uçları karbonu doldurmak için açık cisimlerdir. Metrohm' un ticari olarak bulunan ürünlerinde pastayı itmek için basit bir piston düzeneği vardır. CPE' nin çapı 2-1 mm arasındadır ve elektrokimyasal işlemler için uygundur. CPE' lerin yukarı da belirtilen hazırlama kolaylıklarının yanı sıra kolay ve çabuk yüzey yenilemesine, ya da gerektiğinde pasta değiştirilmesine izin vermektedir.

Bu yöntem yeni bir yüzey elde etmede mekanik temizlemeye göre daha az vakit gerektirdiğinden daha uygundur. CPE' lerin daha farklı tasarımlarının, karbon pasta temelli hücrelerde, amperometrik ve potansiyometrik sensörlerde, ya da eş zamanlı özel ölçüm yapan duyarlı cihazlarda kullanıldığı bilinmektedir. Karbon pasta elektrotlar yeni yüzey eldesinde başarılı olduğu için organik ve biyolojik maddelerin analizinde çok etkilidir. Bu tür ortamlarda elektrot yüzeyi matriks bileşenleri ya da elektrot reaksiyon ürünleri ile zehirlenebilir [54].

Karbon temelli elektrotların en belirgin özelliği hidrofobik olmasıdır. CPE'lerin lipoflik özelliği organik redoks sistemindeki birçok elektrot reaksiyonunun özel reaksiyon kinetiğinden kaynaklanır. Katı karbon elektrotlarda olduğu gibi, reaksiyon kinetiği grafitin niteliğinden etkilenir. Karbonun sıvı pasta oranı bu konuda önemli rol oynar.

Karbon pasta karışımlar zamanla önemli değişikliklere uğrayabilir (CPE'lerin yıpranması). Bu tür istenmeyen davranışlar mantıklı kabulleri doğrular ve karbon elektrotların yıpranması bağlayıcının yapısından kaynaklanır.

### **2.13. Kaynak Araştırması**

Kıralp ve diğerleri(2003), iletken polimerlere polifenol oksidaz enziminin immobilize edilmesiyle şaraptaki fenolik bileşiklerin tayinini yapmışlardır. İletken polimer olarak politiyofen ve polipirol kullanılmıştır. Hazırlanan enzim elektrodun Michaelis-Menten sabitleri, en uygun sıcaklığı ve pH'sı, kararlılığı ve raf ömrü tespit edilmiştir. Bu elektrot ile kırmızı şaraptaki fenolik bileşiklerin miktarı belirlenmiştir [61].

Xue ve Shen(2002), polianilin-poliakrilonitril kompoziti üzerine polifenol oksidaz enziminin immobilize edilmesiyle fenol biyosensörü hazırlamışlardır. Polifenol oksidaz

enzimi varlığında önce poliakrilonitril sonra polianilin platin yüzeye kaplanmıştır. Hazırlanan enzim elektrodun kararlılığı 8 ay boyunca ölçülmüş ve bu süre içinde aktivitenin korunduğu gözlenmiştir [62].

Pedano ve Rivas(2000), polifenol oksidaz enzimiyle modifiye edilmiş karbon pasta kullanılarak bir fenol bileşiği olan gentisik aside duyarlı amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Polifenol oksidazın aktivitesi hem elektrokimyasal hem de spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Biyosensörün tayin sınırı  $5,0 \times 10^{-5} \text{M}$ , enzimin  $K_m$  ve  $I_{\text{maks}}$ 'ları sırasıyla  $6,7 \times 10^{-4} \text{mM}$  olarak belirlenmiştir [17].

Rajesh ve Takashima(2004), *p*-toluensülfonat ile dop edilmiş polipirol filme polifenol oksidaz enziminin hapsedilmesiyle fenolik bileşiklere duyarlı amperometrik biyosensör hazırlamışlardır. Camsı karbon elektrot yüzeyine *p*-toluensülfonatlı ortamda pirolün elektropolimerizasyonu ile polipirol-*p*-toluensülfonat film elde edilmiştir. Enzim elektropolimerizasyon sırasında ilave edilerek hapsedilmiştir. Fenol tayini enzimatik reaksiyon sonucu oluşan kinon bileşiğinin 0,05 V'da indirgenmesine dayanarak yapılmıştır. Hazırlanan enzim elektrodun cevap süresi 75 s, doğrusal çalışma aralığı ise 0,8-2,4  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir [63].

### 3. DENEYSEL KISIM

#### 3.1. Cihazlar ve Malzemeler

##### 3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

Elektrokimyasal analiz cihazı olarak, sabit potansiyelde akım ölçümlerinin yapıldığı bilgisayar bağlantılı CH-Instruments firmasına ait CHI 660B model elektrokimyasal analiz cihazı kullanıldı.

##### 3.1.2. Hücre ve elektrotlar

Amperometrik ölçümler, BAS (Bioanalytical system) firmasına ait C3 katı elektrot çalışma standında yapıldı. Çalışmalarda üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Referans elektrot olarak BAS RE-5B no' lu Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak MW -1032 no' lu platin tel ve çalışma elektrodu olarak Şekil 3.1 'de görülen özel olarak teflondan yaptırdığımız 1 cm<sup>2</sup> yüzey alanlı içerisi karbon pasta ile doldurulan özel yaptırılmış malzeme kullanıldı.



Şekil 3.1. Biyosensör için yaptırılmış özel düzenek

##### 3.1.3. pH metre

Tampon çözeltilerinin pH' ları ORION Model 5 star iyon analizleyici ile ölçüldü.

##### 3.1.4. Su banyosu

Isıtma, soğutma ve sabit sıcaklık çalışmalarının gerektiği durumlarda termostatlı su sirkülasyonlu sistem kullanıldı.

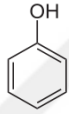
### 3.1.5. Saf su

Çözeltilerin hazırlanmasında Human Power System firmasının deiyonize 24 mohm dirence sahip su kullanıldı.

### 3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları ve bazı özellikleri Çizelge 3.1’de verildi

Çizelge 3.1. Kullanılan reaktifler ve özellikleri

Kimyasal Formülü	Özellikleri	Kimyasal Formülü
Fenol	 $C_6H_5OH$	Molekül kütlesi : 94,144 g/mol Yoğunluk :1,0581 g/cm <sup>3</sup> Erime noktası :43°C Kaynama noktası :184 °C
Sodyum hidroksit	NaOH	Molekül kütlesi :39,9971 g/mol Yoğunluk :2,1 g/cm <sup>3</sup> Erime noktası :318 °C Kaynama noktası :1,390 °C
Potasyum nitrat	KNO <sub>3</sub>	Molekül kütlesi :101,1032 gr/mol Yoğunluk :2,109 gr/cm <sup>3</sup> (16 C) Erime noktası :334 C Kaynama noktası :400 °C’de bozunur
Sodyumdihidrojen-fosfat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Molekül kütlesi: 119,98 g / mol Yoğunluk: 2,36 g / cm <sup>3</sup> Sudaki çözünürlük: 59,90 g / 100 mL (0 °C)
Sodyummono-hidrojenfosfat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Molekül kütlesi: 141,96 g / mol Yoğunluk: 1,7 g / cm <sup>3</sup> Sudaki çözünürlük: 7,7g / 100 mL (20 °C)
Polifenol oksidaz		Molekül kütlesi: 128 kDalton Saklama koşulu :-20°C

Çizelge 3.1. (devam) Kullanılan reaktifler ve özellikleri

Sodyum Perklorat	NaClO <sub>4</sub>	Molekül kütlesi: 122.44 gr/mol Yoğunluk: 2.499 gr/cm <sup>3</sup> (16°C) Erime noktası: 130 C Kaynama noktası: 482°C
------------------	--------------------	---

### 3.2.1. Enzim çözeltisi

1,2 mg/mL olan polifenol oksidaz enzimi saf suda çözüldükten sonra hacim ölçülü balonda 10 mL' ye tamamlandı (0,12 ünite/mL). Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında 4 °C'de bekletildi, ancak uzun süre kullanılmadığı durumlarda çözelti derin dondurucuda saklandı.

### 3.2.2. Fenol çözeltisi

Fenolden belli bir miktar tartılarak çözüldükten sonra derişimi 0,1M pH 8,0 olan fosfat tamponu ile 25,0 mL'lik stok çözelti hazırlandı. Stok çözeltiden derişimi  $1,0 \times 10^{-2}M$  ve  $1,0 \times 10^{-3}M$   $1,0 \times 10^{-4}M$  olan günlük kullanım için 25 mL fenol çözeltileri hazırlandı.

### 3.2.3. Sodyum hidroksit çözeltisi

Belli bir miktar sodyum hidroksit alındı ve saf suda çözüldükten sonra derişimi 0,1M olacak şekilde 10 mL çözeltisi hazırlandı.

### 3.2.4. Sodyum perklorat çözeltisi

Belirli bir miktar sodyum perklorat alındı ve saf suda çözüldükten sonra derişimi 0,1M olacak şekilde 10 mL çözeltisi hazırlandı.

## 3.3. Fosfat Tamponunun Hazırlanması

Monosodyum hidrojen fosfat ve disodyum hidrojen fosfattan sırasıyla 5,20g ve 24,11g tartılarak önce saf suda çözüldü, sonra saf su ile 500 mL' ye tamamlanarak, derişimi 0,1M

olan pH 8,0 tampon çözeltisi hazırlandı. Farklı pH ve derişimlerdeki tampon çözeltileri hazırlamak için aynı yol izlendi. Tampon çözelti buzdolabında +4 °C’de saklandı.

### 3.4. Biyosensörün Hazırlanması

0,15g aktif karbon ve 100 µL nujol karıştırılarak pasta haline getirildi ve 1,0cm çapında 0,3cm derinliğinde karbon pasta kalıbının (Şekil 3.1) içine dolduruldu. Temiz bir cam yüzey üzerine bastırılarak sıkılaştırıldı. Polimer homojen bir şekilde temiz bir cam yüzeye yayıldıktan sonra, daha önce hazırlanan karbon pasta elektrot polimer üzerine bastırılmak suretiyle homojen ve pürüzsüz olarak yapıştırıldı. Daha sonra üstüne üçüncü tabaka olarak, ayrı bir tüpte 1mg sıgır serum albümini (BSA), 50 µL fosfat (pH 8,0) tamponu, 75 µL enzim (0,12 mg/mL), 30µL gluteraldehit çözeltileri eklenerek elde edilen karışım, mikropipet yardımı ile karbon pasta elektrodun üzerine kabarcık oluşmayacak şekilde ilave edildi. Oda sıcaklığında kurutuldu. Biyosensör fosfat tamponuyla birkaç kez yıkanarak yüzeye zayıf olarak tutunmuş kimyasallar uzaklaştırıldı. Hazırlanan biyosensör kullanılmadığı zamanlarda fosfat tamponunda +4°C’de bekletildi.

### 3.5. Biyosensörün Fenole Duyarlılığının ve Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi

Bölüm 3.4’ deki gibi hazırlanan biyosensörün fenole duyarlılığının ve enzimatik reaksiyon sonucu oluşan kinonun indirgenebilmesi için uygun potansiyelin belirlenmesi amacıyla, çeşitli potansiyelerde (-0,19V, -0,17V, -0,15 V, -0,13 V, -0,11 V, -0,09 V, -0,07V) fenol derişimlerine karşı okunan difüzyon akımları grafiğe geçirildi. Bu grafikten en iyi çalışma potansiyeli belirlendi. Bu amaçla, elektrokimyasal hücreye pH’ sı 8,0 olan 9 mL’ lik fosfat tampon çözeltisi ve 0,1M 1 mL destek elektrolit olarak kullanılan sodyum perklorat ilave edildi. Modifiye karbon pasta elektrot belirtilen potansiyelerde dengeye getirildikten sonra  $1,0 \times 10^{-2}M$  stok fenol çözeltilisinden mikro pipet yardımıyla elektrokimyasal hücreye artan derişimlerde fenol ilave edildi. Her ilaveden sonra çözelti 1200 saniye karıştırıldı ve 200 saniye sonra belirtilen potansiyelerde akımlar okundu. Okunan akım değerlerinden denge akımı çıkarılarak akım farkları ( $\Delta i$ ) hesaplandı. Fenol derişimine karşı  $\Delta i$  grafiğe geçirildi.

### 3.6. Biyosensörün En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Biyosensörün en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi için, pH'nın etkisi, sıcaklığın etkisi, fenol derişiminin etkisi, elektrodunun tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrünün belirlenmesi çalışmaları yapıldı.

### 3.7. pH' nın Etkisi

Bölüm 3.5'de açıklandığı gibi hazırlanan elektrodun amperometrik cevap akımı üzerine pH'nın etkisini incelemek için pH'sı 6,0; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0; 10,0 olan 0,1M fosfat tamponları hazırlandı.

Bir hücre içerisine pH değeri 6,0 olan tampon çözeltisinden ve hücre içi derişimi 0,1M olacak şekilde 1M sodyum perklorat çözeltisinden ilave edildi. Modifiye elektrot bu çözeltide - 0,15 V' da dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra pH değeri 6,0 olan tampon çözeltisiyle hazırlanan fenol çözeltisinden hücre içi derişimi  $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde hücreye ilave edildi. Çözelti 1200 s karıştırıldı ve 200 s sonra okunan akım kaydedildi.

Aynı işlemler pH değeri 7,0; 7,5; 8,0; 9,0; 10,0 olan fosfat tamponları için tekrarlandı. Her bir pH'ya karşı  $\Delta i$  değeri hesaplandı ve grafiğe geçirildi. Garafikten en uygun çalışma pH' sı belirlendi.

### 3.8. Sıcaklığın Etkisi

Hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla altı farklı sıcaklık değerinde çalışıldı.

Hücre içine pH'sı 8,0 olan fosfat tamponu ve hücre içi derişimi 0,1M olacak şekilde 1M sodyum perklorat çözeltisi ilave edildi. Termostatlı dolaşım su banyosu kullanılarak hücre içindeki çözeltinin sıcaklığı 20 °C olacak şekilde ayarlandı. Modifiye karbon pasta elektrot - 0,15 V' da sabit potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücre içi derişimi  $1,0 \times 10^{-5}$  M olacak şekilde fenol çözeltisi ilave edildi. Çözelti 1200 s karıştırıldı. 200 s sonra akım değerleri okunup, denge akımı ile farkı alınarak 20 °C için bir  $\Delta i$  değeri hesaplandı. Aynı işlemler 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C ve 70 °C sıcaklıkları için

tekrarlanarak her bir sıcaklık için  $\Delta i$  değeri hesaplandı ve sıcaklığa karşı  $\Delta i$  grafiği çizilerek modifiye elektrodun en uygun çalışma sıcaklığı belirlendi.

### 3.9. Fenol Derişiminin Etkisi

Bölüm 3.4' deki gibi hazırlanan biyosensör pH'sı 8,0 olan fosfat tamponu ve hücre içi derişimi 0,1M olacak şekilde 1M sodyum perklorat çözeltisi bulunan hücreye daldırıldı. - 0,15 V' da sabit potansiyelde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Daha sonra  $1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-3}$ M derişim aralığında fenol ilaveleri yapıldı. Her ilavede çözelti 1200 s karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki farklar alınarak her bir fenol derişimi için  $\Delta i$  değerleri belirlendi. Fenol derişimlerine karşı  $\Delta i$  grafiği çizildi (Michaelis-Menten eğrisi). Çizilen bu grafikten yararlanılarak modifiye elektrodun çalışma aralığı ve tayin sınırı belirlendi. Ayrıca elde edilen verilerden Lineweaver-burk grafiği çizildi ve bu grafikten yararlanarak polifenol oksidaz enzimine özgü olan  $K_M(\text{gözlenen})$  ve  $I_{\text{maks}(\text{gözlenen})}$  değerleri belirlendi.

### 3.10. Tekrar Kullanılabilirliğin Belirlenmesi

Bölüm 3.4.'de belirtildiği gibi hazırlanan ve her ölçümde - 0,15 V potansiyelde dengeye getirilen biyosensörün optimum şartlarda tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için  $1,0 \times 10^{-5}$  M derişiminde fenol çözeltileri ile arka arkaya ölçümler yapıldı. Her ölçüm için denge akımı ile ölçülen akım arasındaki farktan  $\Delta i$  değeri belirlendi. Ölçüm sayısına karşı  $\Delta i$  değerleri grafiğe geçirildi ve elektrodun tekrarlanabilir sonuçlar verdiği belirlendi.

### 3.11. Raf Ömrünün Belirlenmesi

Bölüm 3,4'deki gibi hazırlanan biyosensörün raf ömrünün tespit edilebilmesi için 35 gün boyunca değişik zaman aralıklarında ölçümler alındı ve elektrodun ilk gün verdiği cevap ile son gün verdiği cevap kıyaslandı. Bu amaçla tampon çözelti ve destek elektrolit içeren hücre sistemine daldırılan elektrot - 0,15 V potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Ardından hücre içi derişimi  $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde fenol ilave edildi ve 1200 s karıştırılıp 200 s sonundaki difüzyon akımı okundu. Ölçüm işlemi tamamlanan elektrot, bir sonraki ölçüm işlemine kadar tampon çözelti içerisinde + 4 °C' de buzdolabında bekletildi. Aynı işlemler her ölçüm için tekrarlandı. Elde edilen  $\Delta i$  değerleri grafiğe geçirildi.

### 3.12. Fenol Tayinine Bazı Maddelerin Girişim Etkilerinin İncelenmesi

Ölçüm ortamında bulunabilecek bazı katyon, anyon ve moleküllerin hazırlanan enzim elektrodun cevabına etkileri incelendi.

Bölüm 3.4' e göre hazırlanan biyosensörün, içerisinde pH' sı 8,0 olan 9 mL' lik fosfat tamponu ve 0,1M 1 mL sodyum perklorat bulunan çalışma hücresine daldırıldı. -0,15 V da dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücreye derişimi  $1,0 \times 10^{-5}$  M olacak şekilde fenol ilavesi yapıldı. Çözelti 1200 s karıştırıldı, 200 s sonra akım değerleri okunup, denge akımı ile farkı alınarak fenol için bir  $\Delta i$  değeri hesaplandı. Üzerine girişim çalışılan iyon ya da molekülün ilavesi yapıldıktan sonra yeniden 1200 s karıştırıldı ve 200s sonunda akım okundu. Bu işlem her iyon ve molekül için tekrarlandı. Daha sonra aynı işlem fenol üzerine girişim yapmayan bütün iyon ve moleküllerin ilavesi ile tekrarlandı. Buna göre kullanılan metoda; askorbik asit,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{AsO}_2^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , nin girişim yapmadıkları görüldü.

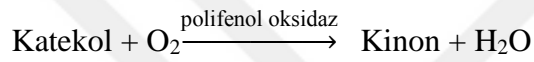
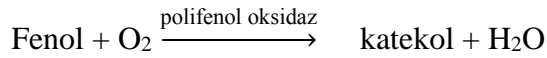
### 3.13. Fenol İçeren Atık Sularda Fenol Tayini

Tayin için standart ekleme yönteminden yararlanıldı ve Bölüm 3.4' de ki gibi hazırlanan biyosensör atık sulardaki fenol miktarının belirlemesi amacıyla, üçlü elektrot sistemli elektrokimyasal hücre kullanıldı. Bu hücrede çalışma elektrodu olarak hazırlanan karbon pasta elektrot, karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak da doymuş kalomel elektrot kullanıldı. Elektrokimyasal hücreye pH' sı 7,50 olan fosfat tampon çözelti, hücre içi derişimi  $1 \times 10^{-3}$  M fenol ve 0,1M potasyum nitrat çözeltisi ilave edildi. -0,15 V sabit potansiyelde enzim elektrodun kararlı hale gelmesinden sonra, kararlı akım değeri kaydedildi ve hücreye atık su numunesinden 1 mL ilave edildi. 1200 saniye karıştırılıp 200 saniye sonunda ölçüm alındı. Ardından hücreye sırasıyla  $1 \times 10^{-5}$ ,  $2,5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$  M fenol çözeltileri ilave edildi ve sırasıyla aynı akım okuma işlemleri uygulandı.



## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada fenol tayini için polianilin-aktif karbon kompoziti kullanılarak yeni bir biyosensör geliştirildi. Bu amaçla, polianilin-aktif karbon ve polifenol oksidaz enziminden oluşan bir biyosensör hazırlandı. Polifenol oksidaz enzimi ilk olarak fenolün oksijenli ortamda katekole yükseltgenmesi tepkimesini, daha sonra da katekolün oksijenli ortamda kinona yükseltgenmesi tepkimesini katalizler. Fenol tayini, bu enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan kinonun  $-0,15\text{ V}$ 'da indirgenmesi esasına dayanılarak yapıldı.

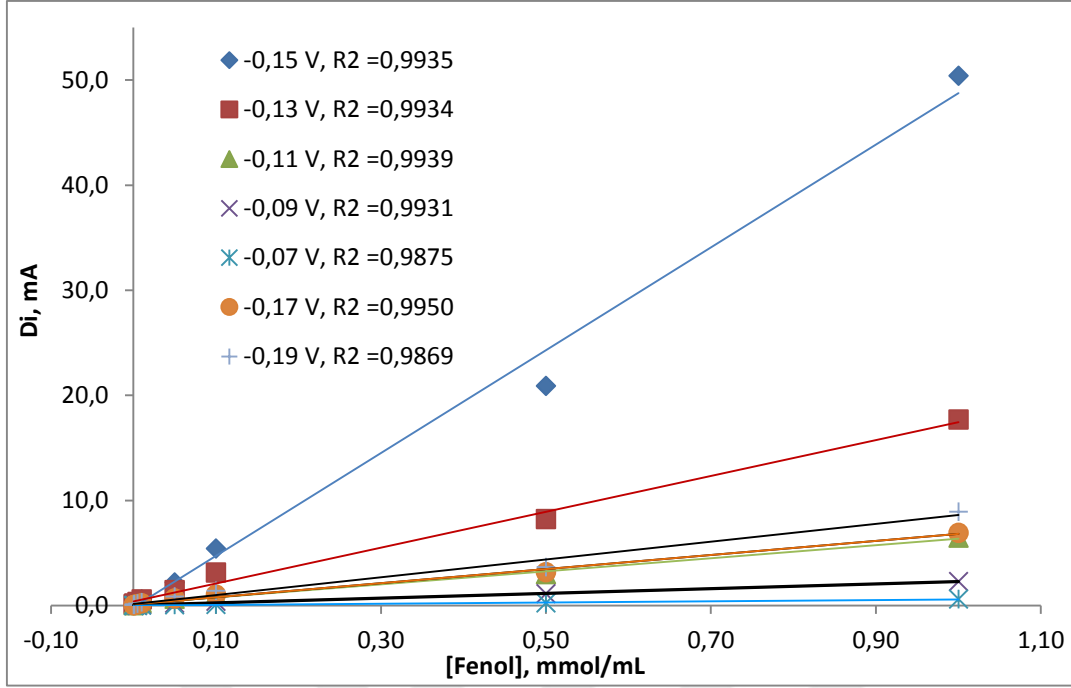


Hazırlanan biyosensörün en iyi çalışma koşulları belirlendi ve performansını etkileyen faktörler incelendi. Daha sonra Gerçek ortamlarda olabilecek girişimlerin fenol tayini üzerine etkileri incelendi ve hazırlanan modifiye elektrot atık sularda fenol tayininde kullanıldı.

### 4.1. Biyosensörün En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

#### 4.1.1. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Modifiye karbon pasta elektrot ile fenol tayini için uygun potansiyelin belirlenmesi amacıyla, çeşitli potansiyelerde ( $-0,19\text{ V}$ ,  $-0,17\text{ V}$ ,  $-0,15\text{ V}$ ,  $-0,13\text{ V}$ ,  $-0,11\text{ V}$ ,  $-0,09\text{ V}$   $-0,07\text{ V}$ ) fenol derişimlerine karşı okunan difüzyon akımlarından oluşan grafikler çizildi. (Şekil 4.1). Şekil 4.1. incelendiğinde enzimatik reaksiyon sonucu oluşan kinonun indirgenme akımlarının  $-0,15\text{ V}$ 'da en yüksek olduğu görüldü. Bu nedenle çalışma potansiyeli olarak  $-0,15\text{ V}$  kullanıldı.



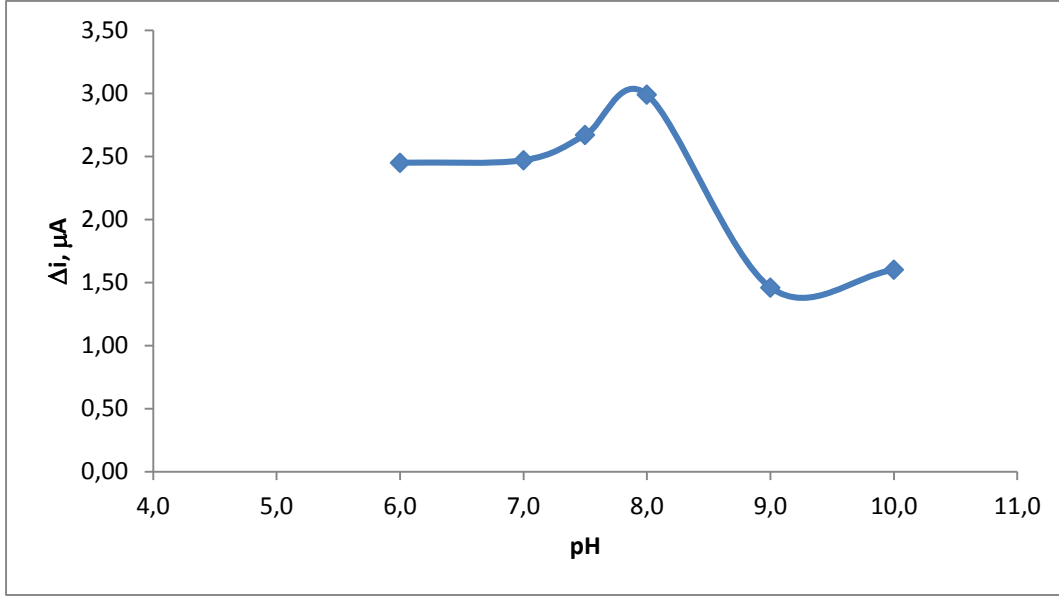
Şekil 4.1. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi (0,1 M pH'sı 8,0 olan fosfat tamponu, 25°C)

#### 4.1.2. pH etkisi

Enzimlerin aktivitelerini etkileyen en önemli faktörlerden biri pH'dır. Çünkü pH enzimin aktif bölgesindeki veya yan zincirlerdeki aminoasit kalıntılarının iyonlaşmasına sebep olarak aktivitede azalmaya veya artmaya neden olur.

Bu çalışmamızda pH etkisini araştırmak amacıyla pH 6,0 – 10,0 arasında değişen farklı pH'lardaki fosfat tamponları kullanıldı. Şekil 4.2 incelendiğinde modifiye elektrodun fenol için pH 8,0'de en iyi aktivite gösterdiği görüldü.

Literatürler incelendiğinde polifenol oksidaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH değerleri 7,4 [2], 8,5 [64], 9,0 [23], 7,0 [19], 8,0 [57] olduğu görüldü. Bu veriler değerlendirildiğinde yapmış olduğumuz çalışma sonucu elde edilen pH değerinin literatür değerlerine yakın olduğu ancak kullanılan polimerin farklı olmasından dolayı enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH değerinin farklı olduğu görüldü.



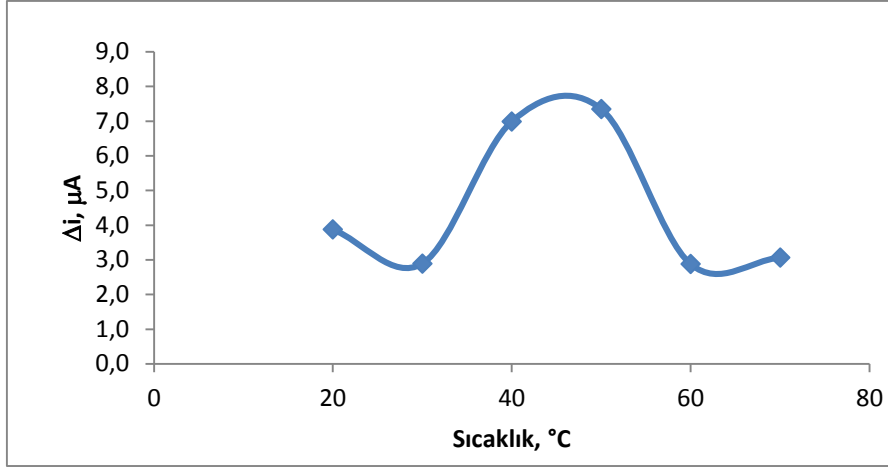
Şekil 4.2. Biyosensörün fenole duyarlılığına pH'nın etkisi (25°C,  $1,0 \times 10^{-5}$ M fenol derişimi)

#### 4.1.3. Sıcaklık etkisi

Enzimlerin aktivitesini etkileyen faktörlerden biri de sıcaklıktır. Belirli bir değere kadar sıcaklık artışları genellikle enzimlerde artan aktiviteye karşılık gelir. Ancak o değerden sonra enzimin aktivitesinde azalma meydana gelir. Azalmanın sebebi protein yapısının bozulmasıdır.

Enzimin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek amacıyla fenol tayini için pH'sı 8,0, olan fosfat tamponu kullanıldı. Hücre içi derişimi  $1,0 \times 10^{-5}$  M olan fenolün sıcaklığın 20 °C - 70 °C arasında arttırılmasıyla elde edilen akım farkları grafiğe geçirildi. Şekil 4.3 incelendiğinde, akım farklarının 45 °C ye kadar arttığı ve daha sonra azalmaya başladığı ve en yüksek akım farkının 45 °C' de elde edildiği görülmektedir. Bu sıcaklığın üstünde enzimin termal denatürasyona uğradığını söyleyebiliriz. 45 °C 'nin enzimler için yüksek bir sıcaklık olduğu düşüncesiyle bu sıcaklık çalışma sıcaklığı olarak seçilmedi. Daha çok sayıda çalışmada kullanılabilmesi ve çalışma koşullarının kolay olması nedenlerinden dolayı bundan sonraki çalışmalar 25 °C de yapıldı.

Literatürler incelendiğinde polifenol oksidaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık 20 °C [57] ve 37 °C [65] olduğu görüldü. Polimerin enzimi koruması nedeniyle daha yüksek sıcaklıklarda da enzim aktif olabilmektedir.



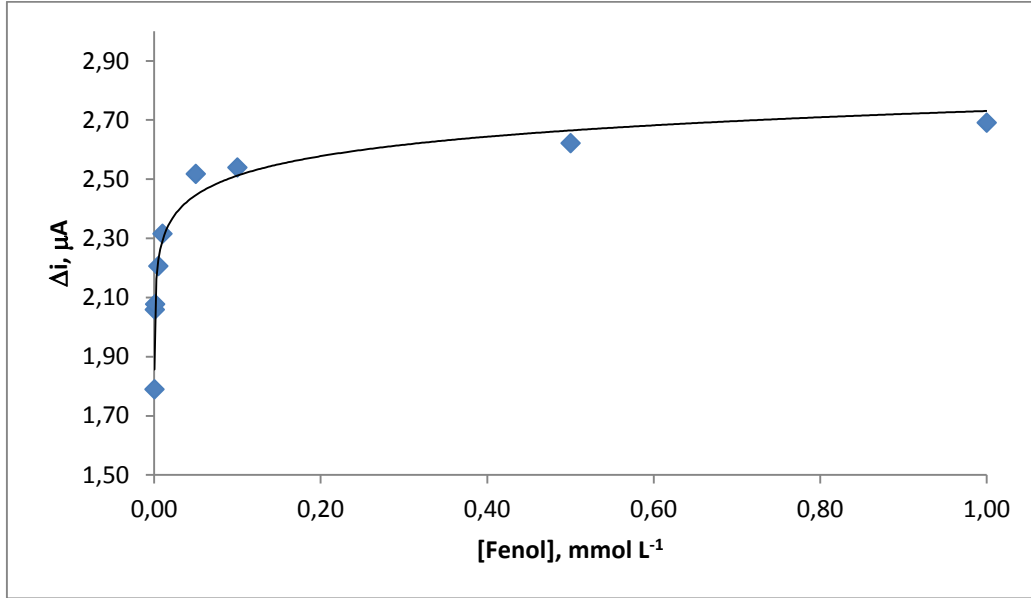
Şekil 4.3. Biyosensörün fenole duyarlılığına sıcaklık etkisi (0,1 M pH'sı 8,0 olan fosfat tamponu,  $1,0 \times 10^{-5}$  M fenol derişimi)

#### 4.1.4. Fenol derişiminin etkisi

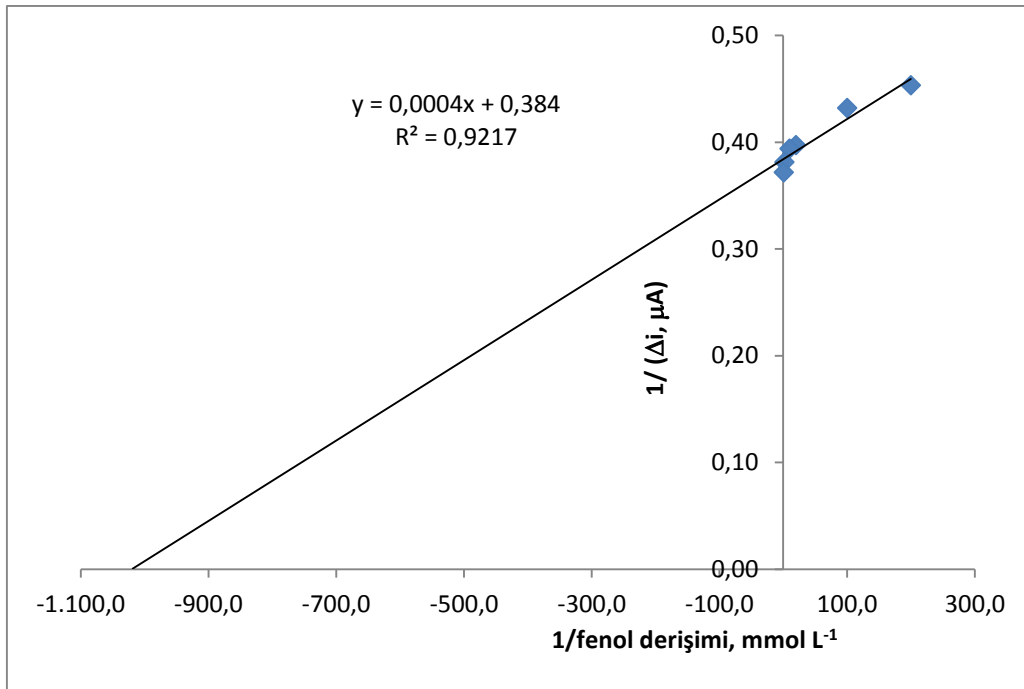
Biyosensörün fenole duyarlılığına fenol derişiminin etkisi araştırıldı. Bu amaçla  $-0,15$  V'da artan fenol derişimlerine ( $1,0 \times 10^{-7}$ – $1,0 \times 10^{-3}$  M) karşı modifiye elektrodun amperometrik cavabı ölçüldü. Elde edilen veriler ile fenol derişimine karşı akım farkları grafiğe geçirildi (Michaelis–Menten eğrisi) (Şekil 4.4). Bu grafik biyokimyasal kinetik de Michaelis–Menten eğrisi olarak bilinir. Grafik incelendiğinde fenol derişimi arttıkça akım farklarının önce doğrusal daha sonra da doğrusallıktan saparak hiperbolik bir şekilde arttığı gözlemlendi. Fenol derişimi  $1,0 \times 10^{-4}$  M'dan itibaren akım farklarında artış görülmedi. Belirtilen derişimden itibaren polifenol oksidaz enzimi fenole doymuş ve bundan dolayı da akım farklarında değişme olmamıştır. Michaelis – Menten eğrisi hiperbolik bir eğri olduğundan dolayı enzimler için spesifik veriler olan  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri bu grafikten doğru bir şekilde bulunamaz. Bu sebeple Michaelis – Menten eşitliğinin her iki tarafının da tersi alınarak yeni bir eşitlik ve doğrusal olan bir grafik (Lineweaver Burk grafiği) elde edilir (Şekil 4.5). Doğrusal olan bu grafikten ekstrapolasyonla daha doğru  $I_{max}$  ve/veya  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri elde edilir.  $K_m$  enzimin substrata karşı ilgisinin bir ölçüsüdür, eğer  $K_M$  değeri büyükse enzimin substrata karşı ilgisi az,  $K_m$  değeri küçükse enzimin substrata karşı ilgisi fazladır.  $V_{max}/K_m$  oranı büyük olan enzimin aktifliği yüksektir.

Çizilen Lineweaver Burk grafiğinden  $K_{m(göz)}$  ve  $I_{max(göz)}$  değerleri sırasıyla  $1,04 \times 10^{-3}$  mM ve  $2,60$   $\mu$ A olarak hesaplandı.

Bulunan  $K_m(\text{göz})$  değerleri literatür değerleri ile karşılaştırıldığında, 0,4mM [66], 1,80mM [67], 1,86mM [2] ve  $0,0083 \times 10^{-3}$  M [18], polianilin – aktif karbon enzimin substratına olan ilgisini arttırdığı görülür.



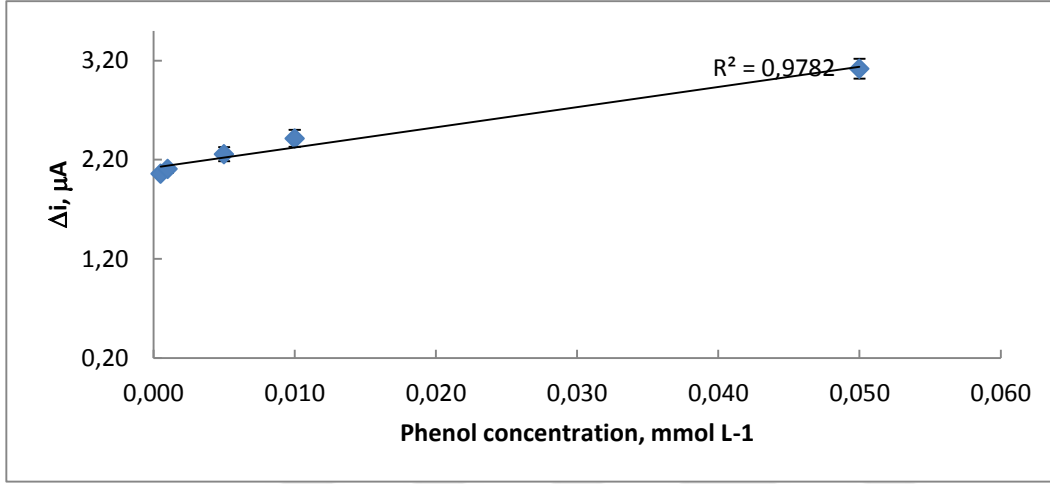
Şekil 4.4. Biyosensörün amperometrik cevabına fenol derişiminin etkisi (0,1M pH 8,0 fosfat tamponu, 25°C, N:3 )



Şekil 4.5. Polifenol oksidaz için Lineweaver – Burk grafiği, (0,1M pH 8,0 fosfat tamponu, 25°C, N:3 )

#### 4.1.5. Çalışma aralığının belirlenmesi

Şekil 4.5’den elektrodun doğrusal çalışma aralığı  $5,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M olarak bulundu (Şekil 4.6). Elektrodunun en düşük tayin sınırı  $1,0 \times 10^{-7}$ M olarak belirlendi. Cevap süresi ise 60 s olarak belirlendi.



Şekil 4.6. Kalibrasyon grafiği (0,1M pH 8,0 fosfat tamponu, 25 °C, N:3 )

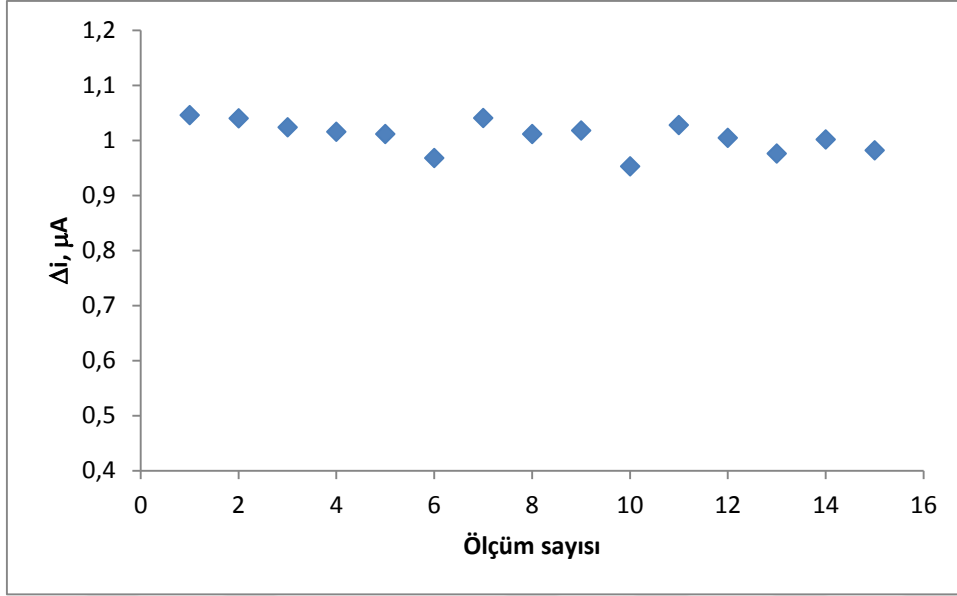
#### 4.1.6. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

Bölüm 3.4’teki gibi hazırlanan biyosensör için tekrar kullanılabilirlik ölçüldü. Bu amaçla hücre içi  $1,0 \times 10^{-5}$ M fenol ilaveleri yapılarak arka arkaya 15 ölçüm alındı. Ölçüm sayısına karşı akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.6). 15 ölçümün bağıl standart sapması % 2,75 olarak bulunmuştur.

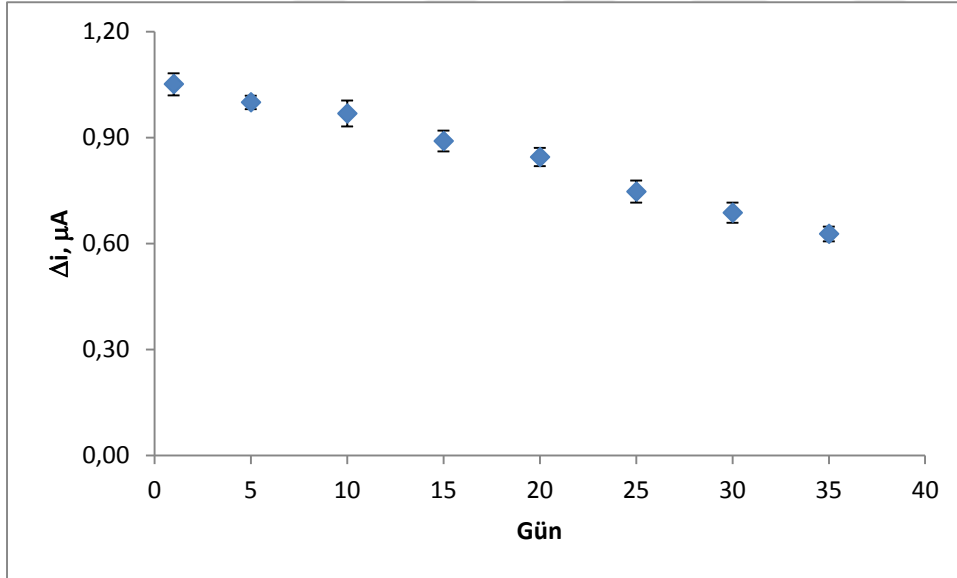
#### 4.1.7. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Bölüm 3.4’ deki gibi hazırlanan biyosensör kullanılarak hücre içi fenol derişimi  $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak 35 gün boyunca belirli aralıklarda ölçümler alındı. Elde edilen akım farkları zamana karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.7). Şekil incelendiğinde elektrodun % 53,0 oranında işlevini kaybettiği, % 47,0 oranında da koruduğu görülmektedir.

Enzimler mikrobiyal üreme vb. sebeplerden dolayı zamanla aktivitesini kaybeder. Bu sebeple polifenol oksidaz çözeltisi kullanılmadığı durumlarda dondurucuda saklanmalıdır.



Şekil 4.7. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi (0,1M pH 8,0 fosfat tamponu, 25 °C)



Şekil 4.8. Biyosensörün raf ömrünün incelenmesi (0,1M pH 8,0 fosfat tamponu, 25 °C,  $1,0 \times 10^{-5}$ M fenol, N:3 )

#### 4.1.8. Atık su numunesinde fenol tayini

Tayin için hazırlanan biyosensör atık sularındaki fenol miktarının belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Elektrokimyasal hücreye pH' sı 7,50 olan fosfat tampon çözelti, hücre içi derişimi  $1 \times 10^{-3}$ M fenol ve 0,1M potasyum nitrat çözeltisi ilave edildi. -0,15 V sabit potansiyelde enzim elektrodun kararlı hale gelmesinden sonra hücreye atık su numunesinden 1 mL ilave

edildi. 1200 saniye karıştırılıp 200 saniye sonunda ölçüm alındı. Atık sudaki fenol miktarı  $2,7 \pm 0,5 \times 10^{-6} \text{M}$  olarak ölçüldü.

#### 4.2. Sonuç

Polianilin-aktif karbon kompoziti kullanılarak hazırlanan fenole duyarlı yeni biyosensörün;

- Tayin sınırı  $1,0 \times 10^{-7} \text{M}$  olarak belirlendi. Bu değer kaynak çalışmalarıyla kıyaslandığında biyosensörün oldukça düşük bir tayin sınırına sahip olduğunu söyleyebiliriz.
- Elektrodun doğrusal çalışma aralığı  $5,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5} \text{M}$  olarak tespit edildi. Ayrıca biyosensörün cevap süresinin 60s olduğu belirlendi. Biyosensörün geniş ve düşük derişimlere duyarlı bir doğrusal çalışma aralığına sahip olduğunu söyleyebiliriz.
- 15 ölçüm sonunda bağıl standart sapmanın % 2,75 ve başlangıçtaki amperometrik cevabının % 98,70' ini koruduğu görüldü. Bu verilere göre modifiye elektrodumuzun yüksek bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu söyleyebiliriz.
- Biyosensörün 35 günün sonunda başlangıçtaki amperometrik cevabının % 47,0' ını koruduğu görüldü.

Polianilin-aktif karbon kompoziti içeren karbon pasta elektroda immobilize edilen polifenol oksidaz enziminin fenole duyarlılığının bir ölçüsü olan  $K_{m(\text{göz})}$  değeri  $1,04 \times 10^{-3} \text{mM}$  olarak tesbit edilmiştir. Literatürler ile kıyaslandığında biyosensördeki enzimin oldukça düşük bir  $K_m$  değerine sahip olduğu görüldü. Sonuç olarak, polimerin enzimi koruduğunu ve bundan dolayı da enzimin iyi bir aktivite gösterdiğini söyleyebiliriz.

- Hazırlanan biyosensör için en uygun pH değeri 8,0 olarak bulundu.
- Optimum sıcaklık değeri  $45^\circ \text{C}$  olarak tespit edildi. Fakat elektrodun kullanımının pratik olması açısından çalışmalar  $25^\circ \text{C}$ 'de yapıldı. Polimerin enzimi koruması nedeniyle daha yüksek sıcaklıklarda da enzim aktivitesini korumuştur.
- Sonuç olarak hazırlanan fenole duyarlı biyosensör düşük tayin sınırına, düşük cevap süresine, geniş çalışma aralığına, iyi bir tekrarlanabilirliğe ve uzun bir raf ömrüne sahiptir.

## KAYNAKLAR

1. Environmental Protection Agency. (2000). Toxicological Review Phenol. (CAS No. 108-95-2). *In Support of Summary Information on Integrated Risk Information System (IRIS)*, 96
2. O'Connell, J. E. and Fox, P. F. (1999). Effects of Phenolic Compounds on the Heat Stability of Milk and Concentrated Milk. *Journal of Dairy Research*, 66, 399-407.
3. Mußmann, P. Levsen, K. and Radeck, W. (1994). Gas-chromatographic determination of phenols in aqueous samples after solid phase extraction. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 48(10), 654-659.
4. Tiana, S., Nakamur, K., Cuic, T and Kayahar, H. (2005). High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. *Journal of Chromatography A*, 1063(1-2), 121-128.
5. Sun, A, Li, J. and Liu, R. (2006). High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in natural water coupled with on-line flow injection membrane extraction-preconcentration. *Journal of Separation Science*, 29(7), 995-1000.
6. Zhang, W. and Danielson, N. D. (2003). Determination of phenols by flow injection and liquid chromatography with on-line quinine-sensitized photo-oxidation and quenched luminol chemiluminescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 493(2), 167-177.
7. Kang, U. C., Wang, Y., Li, R., Du, Y., Li, J., Zhang, B., Zhou, L. and Du, Y. (2000). A modified spectrophotometric method for the determination of trace amounts of phenol in water. *Microchemical Journal*, 64(2), 161 - 171.
8. Amlathe, S., Upadhyay, S. and Kumar Gupta, V. (1987). Spectrophotometric determination of trace amounts of phenol in waste water and biological fluids. *Analyst*, 112(10), 1463-1465.
9. Fiamegos, Y., Stalikas, C. and Pilidis, G. (2002). 4-Aminoantipyrine spectrophotometric method of phenol analysis: Study of the reaction products via liquid chromatography with diode-array and mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 467(1-2), 105- 114.
10. Ma, Y. T. and Cheung, P. C. K. (2007). Spectrophotometric Determination of Phenolic Compounds by Enzymatic and Chemical Methods - Comparison of Structure-Activity Relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4222-4228.
11. Balcı, M. (2010). *Developing of the electrochemical method for phenol determination*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Ankara
12. Jorge, C. M. Abate, G., Lima, E. C., Hahn, L. C., Nakamura, M. S., Lichtig J. and Nagatomy, H. R. (1998). Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids. *Analytica Chimica Acta*, 364(1-3), 223-233.

13. Arslan, H. and Arslan, F. (2011). Preparation of a Polypyrrole-Polyvinylsulphonate Composite Film Biosensor for Determination of Phenol Based on Entrapment of Polyphenol Oxidase. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology*, 39(5), 341-345.
14. Ortega, F., Domínguez E., Jönsson-Pettersson G. and Gorton L. (1993), Amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds using a tyrosinase graphite electrode in a flow injection system. *Journal of Biotechnology*, 31(3), 289–300.
15. Yildiz, H. B., Castillo, J., Guschin, D. A., Toppare, L. and Schuhmann, W. (2007). Phenol biosensor based on electrochemically controlled integration of tyrosinase in a redox polymer, *Microchim Acta* 159, 27–34.
16. Kochana, J., Nowak P., Jarosz-Wilkolazka, A. and Bieroń, M. (2008). Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds, *Microchemical Journal*, 89(2), 171–174.
17. Pedano, M.L. and Rivas, G.A. (2000) Amperometric biosensor for the quantification of gentisic acid using polyphenol oxidase modified carbon paste electrode. *Talanta* 53(3), 489–495.
18. Morrison, R. T. and Boyd, R. N. (1987). *Organic Chemistry*. In. Chapter 5, United States, Allyn and Bacon, 997-1016.
19. Solomons, T. W. G. And Fryhle, C. B., (2002). *Organik Kimya*. 7. Basımdan Çeviri, Güral Okay, Yılmaz Yıldırım (Editörler). İstanbul: Literatür Yayınları 1258, 84.
20. Hart, H., Hart, D. J. and Craine, L. E. (1998). *Organik Kimya*. T. Uyar (Editör), 9. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 208-227-129
21. Ün, R. 1984. *Organik Kimya*. T.C. İstanbul Üniversitesi Yayınları Sayı: 3220, İstanbul: Fatih Yayınevi Matbaası, 759-762s.
22. Jianlong, W., Yi, Q., Horan, N. and Stentiford, E. (2000). Bioadsorption of pentachlorophenol (PCP) from aqueous solution by activated sludge biomass. *Bioresource Technology*, 75(2), 157-161.
23. Patterson, J.W.( 1977). *Wastewater Treatment Technology*, Ann Arbor Science pub. Inc. USA, 532.
24. Yener, J. and AKSU, Z. (1999). The Usage of Dried Activated Sludge and Fly Ash Wastes in Phenol Biosorption/Adsorption: Comparison with Granular Activated Carbon, *J. of Environmental Science and Health Part A Toxic/ Hazardous Engineering. Substance & Environmental Engineering*, 34(9), 1777-1796.
25. Çokay, E. ve Şengül, F. (2006). Toksik kirleticilerin ileri oksidasyon prosesleri ile arıtımı. *DEÜ Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi* 8 (2), 1-9.
26. Göçmen, A. (1983). *Haliç Sularında Fenoller, Eser Elementler, Sülfür Asidi ve Oksitlenebilirlik Değerlerinin incelenmesi*, Doktora Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 101.

27. Keha, E.ve E. Küfrevioğlu, Ö. İ. (1997). *Biyokimya, Muhtelif kısımlar*. Erzurum: Şafak Yayınevi
28. Keha, E. ve E. Küfrevioğlu, Ö. İ. (2005). *Biyokimya, Muhtelif kısımlar*. Erzurum: Şafak Yayınevi
29. Lehninger, A. L. (1982). *Principles of Biochemistry*. Worth publisher, New York: Acedemic Press, 587-665.
30. Bingöl, G. (1983). *Biyokimya*. Ankara: Güven Matbaası. 169-174.
31. Zıyan, E. (1998). *Polifenol Oksidaz Enziminin Ankara Armudu (Pyrus Communis) 'ndan İzole Edilmesi, Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara.
32. Champe, P. C. and Harvey, R. A. (1997). *Biyokimya*. İkinci baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri Ltd. Şti. 442
33. Lineweaver, H. and Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constant. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658-666
34. Bartlett, P. (editor), (2008). *Phenolic Biosensors, In: Bioelectrochemistry: fundamentals, experimental techniques and applications*. England: John Wiley & Sons, 219-248,
35. Habibe, A. (2007). *Karbon Pasta Kullanılarak 2-Aminoanthraquinon 'nin Voltametrik Analizi*. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
36. Yanbin. L, (2006). *CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI, Chapter 2. USA: American Society of Agricultural Engineers 52-93*
37. Irwin, J.W. and Hedges, N. (2004). *Measuring Lipid Oxidation*. Understanding and Measuring The Shelf Life of Food, Chapter 13. England: CRC Press Woodhead Publishing LTD. Cambridge,
38. İkizler, A. (1993). *Organik Kimyaya Giriş*. 3. Baskı, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Genel Yayın No: 15, Fakülte Yayın No:4, Trabzon. 398.
39. İşleme Teknolojisi, 1. Meyve ve Sebzelerin Bileşimi, Soğukta Depolanmaları. *Gıda Teknolojisi Dergisi Yayınları*, 24, 328.
40. Stetter, J. and Penrose, W. (2002). Understanding Chemical Sensors and Chemical Sensors Arrays; Past, Present and Future. *Sensors Update*, 10, 189-229.
41. Joseph R., and Stetter, Z., William, R., Penrose, and Sheng, Y. (2003). Sensors, Chemical Sensors, Electrochemical Sensors, and ECS. *Journal of The Electrochemical Society*, 150 (2), 11-16.
42. Canbaş, A. (1983). Şaraplarda Fenol Bileşikleri ve Bunların Analiz Yöntemleri. *Tekel Enstitüleri, Yayın No: 279, EM / 003*

43. Cemeroglu, B. ,Yemenicioğlu, A. ve Özkan, M. (2001). Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, 1. Meyve ve Sebzelerin Bileşimi, Soğukta Depolanmaları. *Gıda Teknolojisi Dergisi Yayınları*, 24, 328
44. Kalcher, K. Schachl, K. Svancara, I. Vytras, K. and Alemu, H. (1997). Testing of inmodified carbon paste electrodes. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Serie A*, 3, 57.
45. Kalcher, K. (1990). Chemically modified carbon paste electrodes in voltammetric analysis. *Electroanalysis*, 2(6), 419.
46. Karadeniz, F. ve Ekşi, A. (2001). Elma Suyunda Fenolik Madde Dağılımı Üzerine Araştırma. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 7 (3), 135 – 141.
47. Chimi, H. Cillard, J. Cillard, P. and Rahmani, M. (1991). Peroxyl and Hydroxyl Radical Scavenging Activity of some Natural Phenolic Antioxidants. *Jaocs*, 68(5): 307–312
48. Buerk, D.G. (1993). *Biosensors: Theory and Applications*. USA: Technomic Publishing Company, 221.
49. Thevenot, D.R, Toth, K. Durst, R.A. and Winson, G.S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosensor & Bioelectronics*, 16(1-2), 121-131.
50. Gründler, P. (2007). *Chemical sensors an introduction for scientists and engineers*. Germany: Springer, 273.
51. Coulet, P.R. (2000). Enzyme biosensors, In: Biosensors for food analysis. *Scott A.O. (ed)*, UK: *The Royal Society of Chemistry*, 28-36.
52. Adams, R. N. (1958). Carbon Paste Electrodes. *Analytical Chemistry*, 30 (9), 1576.
53. Karakoç, Ö. (2010). *Bazı Etilen Bis(Ditiyokarbamat) Pestisitlerinin Voltammetrik Tayini*. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Balıkesir.
54. Svancara, I.,Vytras, K., Barek, J. and Zima, J. (2001). Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 31(4), 311-345.
55. Kalcher, K., Kauffmann, JM., Wang, J., Svancara, I., Vytras, K. ,Neuhold, C. and Yang, Z. (1995). Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: A review with particular emphasis on the period 1990–1993. *Electroanalysis*,7(1), 5- 22.
56. Gordon, M.H. (2004). *Understanding and Measuring The Shelf Life of Food*. Chapter 7. CRC Press Woodhead Publishing LTD. University of Reading, UK, 128-140
57. Marcoux, L.S. , Prater, K.G., Prater, B.G. and Adams, R.N. (1965). A Nonaqueous Carbon Paste Electrode. *Analytical Chemistry* 37(11), 1446- 1447).
58. Svancara, I. ,Vytras, K. ,Renger, F. and Smyth, M. R. (1992/93). Voltammetric determination of silver at ultratrace levels using a carbon paste electrode with improved surface characteristics. *Pardubice. Sb. Ved. Pr. Vys. Sk. Chemickotechnol* 56, 21.

59. Svancara, I. , Zima, J. and Schachl, K. (1998). Voltammetric determination of silver at ultratrace levels using a carbon paste electrode with improved surface characteristics. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A. 4, 49
60. Ravichandran, K. and Baldwin, R. P. (1981). Chemically modified carbon paste electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 126(1-3), 293-300.
61. Kırıp A,S. , Toppare A, L. and Yağcı B, Y. (2003). Immobilization of polyphenol oxidase in conducting copolymers and determination of phenolic compounds in wines with enzyme electrodes. *International Journal of Biological Macromolecules* 33(1-3), 37-41.
62. Huaiguo, X. and Zhiquan, S. (2002). A highly stable biosensor for phenols prepared by immobilizing polyphenol oxidase into polyaniline-polyacrylonitrile composite matrix. *Talanta*, 57(2), 289-295.
63. Rajesh, W. , Takashima, K. and Kaneto (2004). Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized PTS-doped polypyrrole film as an entrapment support. *Reactive & Functional Polymers*, 59(2), 163-169.
64. Nergiz, C. ve Ünal, K. (1989). Naturel Zeytinyağında Bulunan Fenolik Bileşikler Ve Stabiliteye Olan Etkileri. *E.Ü. Mühendislik Fakültesi Dergisi*, Gıda Mühendisliği Bölümü, 7, 2.
65. McDonald, S., Prenzler, P.D., Antalovich, M. and Robards, K. (2001). Phenolic Content and Antioxidant Activity of Olive Extracts. *Food Chemistry*, 73(2), 73-84.
66. Elveren, H. (2003). *Preparation and characterization of carbon paste electrode manifold with wool*. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir.
67. Del Rio, J.A., Báidez, A.G. , Botía, J.M. and Ortuño, A. (2003). Phenolic Compounds in Olive Plants (*Olea europaea*, L.) and Their Influence on Resistance Against *Phytophthora* Sp. *Food Chemistry*, 83(1), 75-78.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ŞENARSLAN, Derya  
 Uyruğu : T.C.  
 Doğum tarihi ve yeri : 05.09.1986, Samsun  
 Medeni hali : Evli  
 Telefon : 0 544 914 5500  
 e-mail : deryayucel-55@hotmail.com



### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Bölümü	2017
Lisans	Ondokuzmayıs Üniversitesi / Kimya Bölümü	2008
Lise	Ondokuzmayıs Anadolu Lisesi	2003

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2015-Halen	İMKB Anadolu lisesi /İğdır	Öğretmen

### Yabancı Dil

İngilizce

### Yayımlar

-

### Hobiler

Yüzme, Gitar, Dans





*GAZİ GELECEKTİR..*