

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FENBİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LACCASE ENZİMİNİ TEMEL ALAN
AMPEROMETRİK FENOL
BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

MERAL TOPCU SULAK
DOKTORA TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE

2009

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FENBİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LACCASE ENZİMİNİ TEMEL ALAN
AMPEROMETRİK FENOL
BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

MERAL TOPCU SULAK
DOKTORA TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. BÜLENT KESKİNLER

GEBZE
2009



**GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ
ENSTİTÜSÜ**

**MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
JÜRİ ONAY FORMU**

JÜRİ

ÜYE (BAŞKAN) :

ÜYE :

ÜYE :

ÜYE :

ÜYE :

Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı ile yukarıdaki öğretim elemanlarından oluşmuş jüri tarafından düzenlenen/...../..... tarihli Tez Savunma Tutanağı neticesinde Yüksek Lisans / Doktora öğrencisi'ın çalışması GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Yönetim Kurulu/...../..... tarih ve/..../..... sayılı kararıylaAnabilim Dalında Yüksek Lisans / Doktora tezi olarak onaylanmıştır.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: Laccase Enzimini Temel Alan Amperometrik Fenol Biyosensörünün Geliştirilmesi

YAZAR ADI: Meral TOPCU SULAK

Bu çalışma kapsamında poli (*GMA-co-MTM*) kopolimerleri, AIBN başlatıcısı varlığında farklı kimyasal kompozisyonlarda, beslemedeki farklı GMA/MTM monomer oranlarının değiştirilmesiyle radikal polimerizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Poli(*GMA-co-MTM*) kopolimerleri FT-IR, ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektroskopik teknikleri ile karakterize edilmiştir.

İlk aşamada horseradish peroksidaz (HRP) ve lakkaz enzimi kullanılarak elektrpolimerizasyon yöntemi ile iki farklı enzim elektrodu hazırlanmıştır. Hazırlanan bu iki elektrotla fenol ölçümü yapılarak sonuçlar kıyaslanmıştır. Daha sonra hazırlanan (*MTM-co-GMA*) kopolimeri kullanılarak glassy karbon elektrot modifiye edilmiştir. Lakkaz (TvLac) enzimi kopolimer ile modifiye edilen elektrot üzerine fiziksel yöntemle tutuklanmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında üç farklı (*MTM-co-GMA*) kopolimeri hazırlanmıştır ve elektrodun kaplanması bu kopolimerlerin metilen klorürdeki çözeltisi kullanılmıştır. Çalışma elektrodunun kopolimerle kaplanması kopolimer çözeltisinin elektrot yüzeyine damlatılıp çözücüsünün açık havada buharlaştırılması ile yapılmıştır. Daha sonra (*MTM-co-GMA*) kopolimeri ile modifiye edilmiş elektrot elektrokimyasal hücreye alınarak belli bir potansiyelde aktive edilmiştir. Aktive edilmiş elektrot belirli konsantrasyona sahip enzim (TvLac) çözeltisinde bekletilerek enzimin fiziksel olarak tutuklanması sağlanmıştır. (*MTM₇₀-co-GMA₃₀*) kopolimeri kullanılarak hazırlanan enzim elektrodu ile potansiyel, pH, enzim miktarı gibi optimum çalışma şartları tespit edilmiştir. Optimum çalışma şartları tespit edildikten sonra elektrot 10 farklı fenolik türün (*fenol*, *katekol*, *hidrokinon*, *2-kloro fenol*, *3-*

kloro fenol, 4- kloro fenol, 2-4 diklorofenol, 4 metoksi fenol, 2-6 dimetoksi fenol) tayini için kullanılmıştır. Her bir fenolik tür için akım zaman eğrileri, kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır.

Yine aynı optimum koşullar kullanılarak diğer iki kopolimer [(*MTM*₅₆-*co-GMA*₄₄) ve (*MTM*₈₅-*co-GMA*₁₅)] ile yeni enzim elektrotları hazırlanmış ve bu elektrotlarda da 10 farklı fenolik tür için substrat olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre enzim elektrodu hazırlamak için en uygun kopolimer %56 MTM- % 44 GMA kopolimeridir.

Çalışmanın üçüncü aşamasında (*MTM*₅₆-*co-GMA*₄₄) kopolimeri kullanılarak hazırlanan elektrodun akım cevabı üzerine karbon nanotüp parçacıklarının (CNT) etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlardan elektrot yapısında bulunan CNT parçacıklarının akım cevabını ve hassasiyeti oldukça fazla artırdığı gözlenmiştir.

Fenolik türlerin tayini için *GC/(MTM-co-GMA)₂/TvLac* ve *GC/(MTM-co-GMA)₂/CNT/TvLac* enzim elektrodu ilk kez bu çalışmada geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör ile gerçek atıksu, arıtma çamuru ve deniz suyunda ölçüm yapılmıştır. Biyosensörle elde edilen fenol tayini sonuçları standart metotla elde edilen sonuçlarla kıyaslanmıştır. Geliştirdiğimiz biyosensörlerle elde edilen fenol tayin sonuçlarının fotometrik (STM 5530-D yöntemi) yöntemle elde edilen fenol sonuçları ile uyum içinde olduğu görülmüştür. Hazırladığımız kopolimer ile modifiye edildikten sonra lakkaz enzimi tutuklanmış elektrotla, fenol ve fenol türevlerinin tayininin basit bir şekilde yapmak mümkündür.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: Development of an Amperometric Phenol Biosensor Based on Laccase Enzyme

AUTHOR: Meral TOPCU SULAK

In this thesis, poly (*GMA-co-MTM*) copolymers were prepared by free radical polymerization in dimethyl formaldehyde (DMF) solution at 60 °C using α , α' -Azobisisobutyronitrile (AIBN) as an initiator. The copolymers, poly(*GMA-co-MTM*), were characterized by FT-IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectroscopic techniques. Glassy carbon electrode was modified using the prepared poly (*GMA-co-MTM*) copolymers. Laccase enzyme (TvLac) was immobilized on the copolymer modified GC electrode with the physical techniques.

At the first step two different enzyme electrode was prepared by using horseradish peroxidase (HRP) and laccase (TvLac) enzyme according to the electropolymerization method. Using these two enzyme electrodes, several phenol analysis were carried out and the results of the analysis were compared.

Secondly, three different (*MTM-co-GMA*) copolymers were prepared and electrodes were coated by using these copolymers solution in methylene chloride. The coating process of working electrode with copolymers was performed by “casting method”. And then, the modified working electrode with the (*MTM-co-GMA*) copolymer was activated in the electrochemical cell under the preselected potential. Activated working electrode was treated in various enzyme concentrations (TvLac) for an hour and the enzyme was immobilized on the electrode surface. The optimum working conditions such as potential, pH, enzyme concentration were optimized the modified electrode. After that, the working electrodes were used to detect the ten different phenol derivatives (*3-chlorophenol*, *2-chlorophenol*, *2-6 dimethoxyphenol*, *catechol*, *4 methoxyphenol*, *4-chlorophenol*, *phenol*, *hydroquinone*,

2-4 dichlorophenol, *p*-benzoquinone). Current-time response, calibration curve and were obtained for ten different phenolic derivatives. Using the same working conditions, the new enzyme electrodes were prepared with the other two copolymers $[(MTM_{56}\text{-co-GMA}_{44})]$ and $[(MTM_{85}\text{-co-GMA}_{15})]$ and used for ten different phenolic derivatives as a substrate.

In the third step of this study, the effect of carbon nano tube (CNT) on the current response of enzyme electrode with prepared $(MTM_{56}\text{-co-GMA}_{44})$ copolymer was investigated. As results of this study, CNT was enhanced highly the current response and sensitivity of the electrode very much.

Two novel enzyme electrode $[GC/(MTM\text{-co-GMA})_2/TvLac]$ and $GC/(MTM\text{-co-GMA})_2/CNT/TvLac]$ were developed in this study. It is possible to detect the phenol and phenol derivatives with the development biosensor easily. The phenol detection in the real sample (waste water, sludge and sea water) were obtained with the development biosensor.

Phenol concentrations obtained by biosensor were compared with concentrations obtained by using standard method (STN 5530-D). The results show that the development biosensor well matched the standard method results.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmaları sırasında gerekli tüm olanakları sağlayan, bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen, sayın hocam Prof. Dr. Bülent KESKİNLER'e, Her türlü katkı ve desteğinden dolayı bölüm başkanımız Prof. Dr. Mehmet KARPUZCU'ya, deneysel çalışmanın yönlendirilmesi ve değerlendirilmesi aşamasında her zaman destek olan değerli hocam Doç. Dr. Elif ERHAN'a, yaptığımız çalışmanın yayına hazırlanması aşamasında değerli fikir ve desteklerinden dolayı Doç. Dr. Erhan DEMİRBAŞ'a

Tezin yazım ve yayına hazırlık, şekil ve tabloların düzenlenmesi aşamasındaki yardımlarından dolayı Ercan GÜRBULAK'a, laboratuvar çalışmalarım süresince yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Mühendis İnci TÜRK ve tüm çalışma arkadaşlarıma içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tüm zorlu şartlara rağmen beni bugünlere getiren, aldığım tüm kararlarda beni destekleyen anne ve babama sonsuz teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan eşim Süleyman SULAK ve biricik kızım İsra Evla'ya yürekten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
SUMMARY	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Biyosensörler	6
2.1.1. Biyosensörlerde Kullanılan Biyolojik Materyaller	8
2.1.1.1. Enzimler	9
2.1.1.2. Bakteri ve Hücreler	9
2.1.1.3. Dokular	10
2.1.2. Algılayıcı (Transducer)	10
2.1.3. Biyolojik Materyallerin Algılayıcı Üzerine İmmobilizasyonu (Tutuklanması)	11
2.1.3.1. Taşıyıcıya Bağlama	11
2.1.3.2. Çapraz Bağlama	13
2.1.3.3. Tutuklama	13
2.2. Biyosensörlerin Çalışma Mekanizması	14
2.2. Biyosensörlerin Çalışma Mekanizması	14
2.3. Biyosensör Çeşitleri	15
2.3.1. Elektrokimyasal Biyosensörler	15
2.3.2. Optik Biyosensörler	17
2.3.3. Kalorimetrik Biyosensörler	18
2.3.4. Piezoelektrik Biyosensörler	18
2.4. Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler	18
2.4.1. Seçicilik	18
2.4.2. Kullanım Ömrü	19
2.4.3. Kalibrasyon Gereksinimi	19

2.4.4. Tekrarlanabilirlik	19
2.4.5. Stabilité	19
2.4.6. Yüksek Duyarlılık	19
2.4.7. Yeterli Düzeyde Tayin Sınırı	20
2.4.8. Çalışma Aralığı	20
2.4.9. Hızlı Cevap Süresi	20
2.4.10. Hızlı Geriye Dönme Zamanı	20
2.4.11. Basitlik ve Ucuzluk	20
2.4.12. Küçültülebilirlik	21
2.5. Amperometrik Biyosensörler	21
2.5.1. Amperometrik Biyosensörlerin Hazırlanması	21
2.5.2. Amperometrik Biyosensörlerin Çalışma Prensibi	22
2.6. İletken Polimerler Kullanılarak Hazırlanan Biyosensörler	23
2.6.1. Polimerler	24
2.6.2. İletken Polimerler	24
2.6.3. İletken Polimerlerin Biyosensörlerde Kullanımı	26
2.7. Karbon Nano Tüplerin Biyosensörlerde Kullanımı	29
2.8. Lakkaz Enziminin Özellikleri Ve Kullanım Alanları	32
2.8.1. Fenol Biyosensörlerine Örnekler	36
3. MATERYAL ve METOT	43
3.1. Deneysel Ekipmanlar	43
3.1.1. Kullanılan Elektrotlar	43
3.1.2. Kullanılan Aletler	43
3.1.3. Elektrokimyasal Hücre	43
3.2. Kullanılan Deneysel Teknikler	44
3.2.1. Enzim Çözeltilerinin (TvLac ve HRP) Hazırlanması	44
3.2.2. Fenol çözeltisinin hazırlanması	44
3.2.3. Karbon nanotüp çözeltisinin hazırlanması	46
3.2.4. Poly(GMA-co-MTM) sentezi	46
3.3. Lakkaz Biyosensörünün Hazırlanması	47
3.3.1. Glassy karbon elektrodu / poli (glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate) / Lakkaz enzimi (GC / (GMA-co-MTM) ₁ / TvLac) Elektrodunun Hazırlanması (A Elektrodu)	49
3.3.2. Glassy karbon elektrodu / poli	

(glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate) / Lakkaz enzimi	
(GC / (GMA-co-MTM) ₂ / TvLac) Elektrodunun Hazırlanması (B Elektrodu)	49
3.3.3.Glassy karbon elektrodu /	
poli (glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate) / Lakkaz enzimi	
(GC / (GMA-co-MTM) ₃ / TvLac) Elektrodunun Hazırlanması (C Elektrodu)	49
3.3.4.Glassy karbon elektrodu / poli	
(glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate) / Karbon Nanotüp /	
Lakkaz enzimi (GC/(GMA-co-MTM) ₂ /CNT/TvLac) Elektrodunun	
Hazırlanması (D Elektrodu)	49
3.4.Elektrot Aktivitesinin Belirlenmesi	50
3.5.Atıksu Numunelerinde Fenol Tayini	50
3.5.1.Standart Metot 5530-D Yöntemi Kullanılarak Fenol Tayini Yapılması	50
3.5.2.Amperometrik Fenol Biyosensörü Kullanılarak Fenol Tayini Yapılması	53
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	54
4.1. poli (Glisin Metakrilat-co-3-Thienylmethacrylate)	
(MTM-co-GMA) Kopolimerinin Karakterizasyonu	55
4.2. Hazırlanan Elektrotların Karakterizasyonu	56
4.3. Lakkaz Enzimini Temel Alan Fenol Biyosensörünün Geliştirilmesi	57
4.3.1.GC/(GMA-co-MTM) ₁ /TvLac (A elektrodu) Enzim Elektrot	
Aktivitesine Deneysel Parametrelerin Etkisinin İncelenmesi	58
4.3.1.1. poly(GMA-co-MTM) ₁ Miktarının Etkisi	59
4.3.1.2. Uygulanan Potansiyelin Etkisi	60
4.3.1.3. Ortam pH'ının Etkisi	61
4.3.1.4. Lakkaz (TvLac) Derişiminin Etkisi	62
4.3.2.Hazırlanan Enzim Elektrotlarının Aktivitesine Substrat	
Konsantrasyonunun Etkisi	64
4.3.2.1. GC/(GMA-co-MTM) ₁ /TvLac (A elektrodu) Enzim	
Elektrot Aktivitesine Fenolik Türlerin Etkisinin İncelenmesi	64
4.3.2.2. GC/(GMA-co-MTM) ₂ /TvLac (B elektrodu) Enzim	
Elektrot Aktivitesine Fenolik Türlerin Etkisinin İncelenmesi	78
4.3.2.3. GC/(GMA-co-MTM) ₃ /TvLac (C elektrodu) Enzim	
Elektrot Aktivitesine Fenolik Türlerin Etkisinin İncelenmesi	90
4.3.2.4. GC/(GMA-co-MTM)/CNT/TvLac (D elektrodu) Enzim	
Elektrot Aktivitesine Fenolik Türlerin Etkisinin İncelenmesi	101

4.4. Geliştirilen GC/(GMA-co-MTM) ₂ /TvLac (B) ve GC/(GMA-co-MTM) ₂ /CNT/TvLac (D) Elektrotlarının Kararlılığı	113
4.5. Geliştirilen Biyosensörün Gerçek Numunelerde Kullanımı	115
5. SONUÇLAR	117
KAYNAKLAR	123
ÖZGEÇMİŞ	134

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Bir biyosensörün şematik gösterimi	8
2.2. Optik biyosensörün şematik gösterimi	17
2.3. Amperometrik biyosensör yapımında kullanılan yöntemler	22
2.4. Amperometrik biyosensörün çalışma prensibi	23
2.5. Biyosensör çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bazı iletken polimerlerin yapısı	27
2.6. Karbon nano tüp yapıları	30
2.7. Lakkaz enziminin kristal yapısı (Trametes Versicolor)	33
2.8. Lakkaz enziminde bulunan bakır merkezleri	34
2.9. Lakkaz enziminin muhtemel katalitik döngüsünün kimyasal mekanizması	35
3.1. Elektrokimyasal çalışmaların yapıldığı hücre.	44
3.2. (GMA-co-MTM) kopolimerinin sentezi	47
4.1. Poli(GMA_{30} -co-MTM ₇₀) kopolimerinin ¹ H NMR spektrumu	55
4.2 GC/(MTM ₇₀ -co-GMA ₃₀) elektrodunun taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü	56
4.3 GC/(MTM ₇₀ -co-GMA ₃₀)/TvLac elektrodunun taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü	57
4.4. Hazırlanan enzim elektrodunda meydana gelen reaksiyonların şematik gösterimi	58
4.5. GC/(GMA-co-MTM) ₁ /TvLac enzim elektrot aktivitesinin poli (MTM-co-GMA) ₁ derişimi ile değişimi	60
4.6. Uygulanan potansiyelin GC/(GMA-co-MTM) ₁ /TvLac elektrot akım cevabına etkisi	61
4.7. Ortam pH nın GC/(GMA-co-MTM) ₁ /TvLac elektrot akım cevabına etkisi	62
4.8. Enzim konsantrasyonunun GC/(GMA-co-MTM) ₁ /TvLac elektrot akım cevabına etkisi	63
4.9. GC/(GMA-co-MTM) ₁ /TvLac (A elektrodu) enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini gösteren akım zaman eğrisi	65
4.10 (a). A enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimi	66
4.10 (b). A enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini	66

veren doğrusal çalışma aralığı.

- 4.11 (a). A enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile değişimi 68
- 4.11 (b). A enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile değişimini 68
veren doğrusal çalışma aralığı.
- 4.12 (a). A enzim elektrot aktivitesinin hidrokinon konsantrasyonu ile değişimi 69
- 4.12 (b). A enzim elektrot aktivitesinin hidrokinon konsantrasyonu ile 69
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.
- 4.13 (a). A enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinon konsantrasyonu ile 70
değişimi
- 4.13 (b). A enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinon konsantrasyonu ile 70
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.
- 4.14 (a). A enzim elektrot aktivitesinin 2-kloro fenol konsantrasyonu ile 71
değişimi
- 4.14 (b). A enzim elektrot aktivitesinin 2-kloro fenol konsantrasyonu ile 71
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı
- 4.15 (a). A enzim elektrot aktivitesinin 3-kloro fenol konsantrasyonu ile 72
değişimi
- 4.15 (b). A enzim elektrot aktivitesinin 3-kloro fenol konsantrasyonu ile 72
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.
- 4.16 (a). A enzim elektrot aktivitesinin 4-kloro fenol konsantrasyonu ile 73
değişimi
- 4.16 (b). A enzim elektrot aktivitesinin 4-kloro fenol konsantrasyonu ile 73
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı
- 4.17 (a) A enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol konsantrasyonu ile 74
değişimi
- 4.17 (b). A enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol konsantrasyonu ile 74
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı
- 4.18 (a). A enzim elektrot aktivitesinin 4 metoksi fenol konsantrasyonu ile 75
değişimi
- 4.18 (b). A enzim elektrot aktivitesinin 4 metoksi fenol konsantrasyonu ile 75
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı
- 4.19 (a). A enzim elektrot aktivitesinin 2-6 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile 76
değişimi

4.19 (b). A enzim elektrot aktivitesinin 2-6 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile	76
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.	
4.20. $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ (B elektrodu) enzim elektrot aktivitesinin	78
fenol konsantrasyonu ile değişimini gösteren akım zaman eğrisi	
4.21 (a). B enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimi	79
4.21 (b). $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ (B elektrodu) enzim elektrot	79
aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini gösteren akım zaman eğrisi	
4.22 (a). B enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile değişimi	80
4.22 (b). B enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile değişimini	80
veren doğrusal çalışma aralığı	
4.23 (a). B enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinon konsantrasyonu ile	81
değişimi	
4.23 (b). B enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinon konsantrasyonu ile	81
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.	
4.24 (a). B enzim elektrot aktivitesinin hidrokinon konsantrasyonu ile değişimi	82
4.24 (b). B enzim elektrot aktivitesinin hidrokinon konsantrasyonu ile	82
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.	
4.25 (a). B enzim elektrot aktivitesinin 2-kloro fenol konsantrasyonu ile	83
değişimi	
4.25 (b): B enzim elektrot aktivitesinin 2-kloro fenol konsantrasyonu ile	83
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.	
4.26 (a). B enzim elektrot aktivitesinin 3-kloro fenol konsantrasyonu ile	84
değişimi	
4.26 (b). B enzim elektrot aktivitesinin 3-kloro fenol konsantrasyonu ile	84
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.	
4.27 (a). B enzim elektrot aktivitesinin 4-kloro fenol konsantrasyonu ile	85
değişimi	
4.27 (b). B enzim elektrot aktivitesinin 4-kloro fenol konsantrasyonu ile	85
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı	
4.28 (a). B enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol konsantrasyonu ile	86
değişimi	
4.28 (b). B enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol fenol konsantrasyonu	86
ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı	

4.29 (a). B enzim elektrot aktivitesinin 4-metoksi fenol konsantrasyonu ile	87
değişimi	
4.29 (b). B enzim elektrot aktivitesinin 4-metoksi fenol konsantrasyonu ile	87
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı	
4.30 (a). B enzim elektrot aktivitesinin 2-6 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile	88
değişimi	
4.30 (b). B enzim elektrot aktivitesinin 2-6 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile	88
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı	
4.31. $GC/(GMA-co-MTM)_3/TvLac$ (C elektrodu) enzim elektrot aktivitesinin	90
fenol konsantrasyonu ile değişimini gösteren akım zaman eğrisi	
4.32 (a). C enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimi	91
4.32 (b). C enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini	91
veren doğrusal çalışma aralığı.	
4.33 (a). C enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile değişimi	92
4.33 (b). C enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile değişimini	92
veren doğrusal çalışma aralığı.	
4.34 (a). C enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinon konsantrasyonu ile	93
değişimi	
4.34 (b). C enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinon konsantrasyonu ile	93
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.	
4.35 (a). C enzim elektrot aktivitesinin 2-kloro fenol konsantrasyonu ile	94
değişimi	
4.35 (b). C enzim elektrot aktivitesinin 2-kloro fenol konsantrasyonu ile	94
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı	
4.36 (a). C enzim elektrot aktivitesinin 3-kloro fenol konsantrasyonu ile	95
değişimi	
4.36 (b). C enzim elektrot aktivitesinin 3-kloro fenol konsantrasyonu ile	95
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı	
4.37 (a). C enzim elektrot aktivitesinin 4-kloro fenol konsantrasyonu ile	96
değişimi	
4.37 (b). C enzim elektrot aktivitesinin 4-kloro fenol konsantrasyonu ile	96
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı	
4.38 (a). C enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol konsantrasyonu ile	97

değişimi

- 4.38 (b). C enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol konsantrasyonu ile 97
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı
- 4.39 (a). C enzim elektrot aktivitesinin 4 metoksi fenol konsantrasyonu ile 98
değişimi
- 4.39 (b). C enzim elektrot aktivitesinin 4 metoksi fenol konsantrasyonu ile 98
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı
- 4.40 (a). C enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile 99
değişimi
- 4.40 (b). C enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile 99
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı
- 4.41. $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ (D elektrodu) enzim elektrot 101
aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini gösteren akım zaman eğrisi
- 4.42 (a). D enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimi 102
- 4.42 (b). D enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini 102
veren doğrusal çalışma aralığı.
- 4.43 (a). D enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile değişimi 103
- Şekil 4.43 (b). D enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile 103
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.
- 4.44 (a). D enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinon konsantrasyonu ile 104
değişimi
- 4.44 (b). D enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinon konsantrasyonu ile 104
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.
- 4.45 (a). D enzim elektrot aktivitesinin hidrokinon fenol konsantrasyonu ile 105
değişimi
- 4.45 (b). D enzim elektrot aktivitesinin hidrokinon fenol konsantrasyonu ile 105
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı
- 4.46 (a). D enzim elektrot aktivitesinin 2-kloro fenol konsantrasyonu ile 106
değişimi
- 4.46 (b). D enzim elektrot aktivitesinin 2-kloro fenol konsantrasyonu ile 106
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı
- 4.47 (a). D enzim elektrot aktivitesinin 3-kloro fenol konsantrasyonu ile 107
değişimi

4.47 (b). D enzim elektrot aktivitesinin 3-kloro fenol konsantrasyonu ile	107
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı	
4.48 (a). D enzim elektrot aktivitesinin 4-kloro fenol konsantrasyonu ile	108
değişimi	
4.48 (b). D enzim elektrot aktivitesinin 4-kloro fenol konsantrasyonu ile	108
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı	
4.49 (a). D enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol konsantrasyonu ile	109
değişimi	
4.49 (b). D enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol konsantrasyonu ile	109
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı	
4.50 (a). D enzim elektrot aktivitesinin 4 metoksi fenol konsantrasyonu ile	110
değişimi	
4.50 (b). D enzim elektrot aktivitesinin 4 metoksi fenol konsantrasyonu ile	110
değişimini veren doğrusal çalışma aralığı	
4.51 (a). D enzim elektrot aktivitesinin 2-6 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile	111
değişimi	
4.51 (b). D enzim elektrot aktivitesinin 2-6 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile	111
doğrusal değişimi	
4.52 GC/(GMA-co-MTM) ₂ /TvLac enzim elektrodu ile farklı günlerde alınan	114
maksimum akım değerleri	
4.53 GC/(GMA-co-MTM) ₂ /CNT/TvLac enzim elektrodu ile farklı günlerde	114
alınan maksimum akım değerleri	

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Bazı iletken polimerler ve özellikleri	26
2.2. Biyosensörlerde kullanılan iletken polimerler	28
2.3. Farklı kaynaklardan elde edilen lakkaz enzimi için temel biyokimyasal özellikler	32
3.1. Kullanılan fenol türevleri ve kimyasal yapıları	45
4.1 GC/PPy-HRP ve GC/PPy-TvLac enzim elektrotları ile elde edilen analitik parametreler	
4.2 GC/(GMA-co-MTM) ₁ /TvLac (A elektrodu) enzim elektrodu ile elde edilen analitik parametreler	77
4.3. GC/(GMA-co-MTM) ₂ /TvLac (B elektrodu) enzim elektrodu ile elde edilen analitik parametreler	89
4.4. GC/(GMA-co-MTM) ₃ /TvLac (C elektrodu) enzim elektrodu ile elde edilen analitik parametreler	100
4.5. GC/(GMA-co-MTM) ₂ /CNT/TvLac (D elektrodu) enzim elektrodu ile elde edilen analitik parametreler	112
4.6. GC/(GMA-co-MTM) ₂ /CNT/TvLac enzim elektrodu ve standart metot 5530-D ile yapılan fenol tayin sonuçları	116
5.1. Geliştirilen dört farklı biyosensörün için elde edilen analitik parametreler	119
5.2. Lakkaz enzimini temel alan biosensörlerle ilgili literatürde yer alan çalışmalar	121

1. GİRİŞ

Çevre mühendisliğinin en önemli çalışma alanları su, hava, toprak ve katı atıklarla ilgili konulardır. Hayatın temeli olan çevre insanoğlunun vazgeçemeyeceği bir değerdir. Çünkü sürdürülebilir kalkınma ancak sürdürülebilir çevre ile mümkündür. Çevrenin korunması ve geliştirilmesi konusunda çabaların hedefi, insanların daha sağlıklı ve güvenli bir çevrede yaşamasını sağlamaktır. Ülkemizde geçmişten günümüze ekolojik dengenin bozulmasına sebep olan faktörlerin başında kirlilik, aşırı kullanım, sanayileşme ve şehirleşme gelmektedir. Genişleyen ekonomi, sanayi, enerji, tarım ve turizmle birlikte kirlilikte artmaktadır. Kirlilik türlerinin başlıcaları hava, su, toprak ve gürültü kirliliği olarak sayılabilir.

Günümüzde çevre konularını bütünüyle ele alabilmek için, yeni teknolojiler, araçlar ve hizmetler geliştirerek ve biyosfer, ekosistemler ve insan etkisi hakkındaki bilgi birikimini artırarak, doğal çevrenin ve kaynaklarının sürdürülebilir yönetimi büyük önem taşımaktadır. Deniz, su ve hava kirliliği izleme, ölçme değerlendirme sistemleri sürdürülebilir bir çevre açısından büyük önem taşımaktadır. Çevresel izleme numune alma, gözlem ve analiz yöntemi ile bilgi toplanması, değerlendirilmesi ve raporlanması olarak tanımlanabilir. Küresel ısınma, ozon tabakasının incilmesi, hayvan ve bitki tür çeşitliliğinin azalması, hava, su ve toprak kirliliğinin yaygınlaşmasının olumsuz sonuçlarının gözlemlenmesi çevresel izlemenin ne kadar önemli olduğu gerçeğini gözler önüne sermektedir.

Bu sebeple iklim, ekoloji, toprak ve sudaki değişikliklerin öngörülmesi; ve sağlıkla ilgili tehlikeleri de içeren çevresel baskı ve risklerin izlenmesi, önlenmesi, azaltılması ve doğal veya insan yapımı çevrenin sürdürülebilirliği için geliştirilen araç ve teknolojiler üzerinde durulması gerekir. Buda ancak çevresel izleme ile mümkündür. Çevresel izleme numune alma, gözlem ve analiz yöntemi ile bilgi toplanması, değerlendirilmesi ve raporlanmasıdır. Genel anlamda çevresel izleme pek çok amaca yönelik yararlar sağlamaktadır:

1. Politikaların ve eylemlerin uzun vadede istenmeyen etkiler doğurmaması için sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılır.

2. Çevre üzerindeki baskı ve bozulmaların tersine çevrilmesi amacıyla uygulanan stratejiler ve eylemler için bir değerlendirme arastır.
3. İnsan sağlığını akut kirlenme tehlikelerine ve doğal afetlere karşı korumak için uyarı sistemlerinin bir parçası olarak görev yapar.
4. Emisyon standartlarına, çevresel kalite standartlarına ve diğer çevresel mevzuata uyumun kontrol edilmesinde yararlanılır.
5. Çevresel Etki Değerlendirmesi süreçlerinin bir parçası olarak kullanılabilir.

Modern yaşam ve teknolojiye gelişmeler çevresel sorunları beraberinde getirmiştir. Bu sorunlar; atık su, canlı atıkları ve gübreler, endüstriyel atıklar, elektronik atıklar ve piller, nükleer atıklar, tıbbi atıklar, fenoller ve pestisidlerdir. Bu atıklardan en önemlisi ise fenol ve fenolün türevleridir. Fenol ve türevleri bilinen en toksik ve tehlikeli organik kirleticilerdendir. Fenol ve türevleri toksik özellikleri nedeniyle atıksularda bu bileşiklerin miktarlarına sınırlandırmalar getirilmiştir. Fenollü atık suların oluşmasına yol açan birçok endüstriyel faaliyet arasında,

- Yağ rafinerileri,
- Kimyasal tesisler,
- Patlayıcı üreticileri,
- Reçine üretimi
- Kok fırınları

önemli yer tutmaktadır. Endüstriyel atık sularda sıkça fenol ve fenol türevlerine rastlanmaktadır. Özellikle kömür işletmelerinin kömür destilasyonu, petrokimyasallar petrol arıtım ve organik sentezlerin atık suları bol miktarda fenol kirliliği içerir. Fenol içeren atıksuların diğer kaynakları arasında kâğıt hamuru ve kâğıt ağartma tesisleri, reçine, pestisid endüstrileri, orlon üretimi, kâğıt üretim tesislerinde kostik havalı temizleyiciler, azot işleme, tekstil fabrikaları, fiberglas üretimi, dökümhaneler ve kullanılmış kauçukların geri kazanıldığı tesisler gösterilebilir. Demir çelik fabrikaları, kok ve havagazı üretim tesislerinde kullanılan karbonizasyon prosesi sırasında suya önemli miktarda fenol karışmaktadır.

Fenoller protoplazmik zehir olduklarından tüm canlı hücre türlerine zarar verirler. Fenollerin öldürücü dozları deri tarafından adsorplanabilir. Fenol varlığı suda tat ve koku olarak anlaşılabilir (0.01-0.1 mg/L). Fenol içeren suların içilmesi şiddetli böbrek bozukluklarına, ağır sarsıntılara ve hatta ölümlere neden olabilir. Klor

içeren fenollerin zehirleyici etkisi ise izomere bağlı olarak değişim gösterir. Türk içme suyu standartlarında suda bulunabilecek fenol miktarının max değeri 0,002 mg/L olarak verilmiştir. Klorlu fenollerin çoğu deride ve gözde oldukça yıpratıcı özelliğe sahiptir ve yine zehirleyici miktarlar deriden adsorplanabilir. Fenol ve fenol türevleri doğada ve insan vücudunda çok uzun süre kalabilir ve birçok hastalığın riskini arttırabilirler. Bu bağlamda toprak, su ve havada fenollerin tespiti ve izlenmesi büyük önem taşımaktadır. Fenolik bileşiklerin canlı türler için ne kadar zararlı oldukları gayet iyi bilinmektedir. Fenoller doğal membran yapısına kolaylıkla nüfuz ederek genotoksik, mutajenik ve hepatoksik etkiler göstermekte, respirasyon ve fotosentezin kataliz mekanizmasını olumsuz yönde etkilemektedir. Tüm bu nedenlerle fenollerin çevre açısından bulundukları ortamda miktarlarının ve yerine göre türünün belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Fenollerin kantitatif analizi için yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC), elektrokimyasal kapiler elektroforez (CE), spektrofotometrik, kağıt elektroforezi, ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi (GC) (ECD, FID ile), gaz kromatografisi kütle spektrometri metodu (MS), UV ölçümlü ince tabaka kromatografisi ve mikrodalga indüklenmiş plazma emisyon spektroskopisi (MIP-ES) gibi birçok teknik kullanılmaktadır. Fenol ölçümünde kullanılan bu yöntemler oldukça pahalı ve zaman alıcıdır. Bunun yanı sıra bazı yöntemlerde önderiştirme ve ekstraksiyon gibi aşamaları içermektedir. Ayrıca bu yöntemler kirleticilerin yerinde izlenmesi için yetersiz kalmaktadır. Bu sebeplerden dolayı çoğunlukla fenollerin tespiti ve izlenmesi için elektrokimyasal biyosensörler kullanılmaktadır. Diğer metotlarla kıyaslandığı zaman elektrokimyasal biyosensörler daha ucuz olmaları, kolay hazırlanmaları, yerinde izlemeler için kullanılabilirlikleri, iyi seçicilik ve kararlılık göstermeleri bakımından oldukça üstündür. Bunun yanı sıra;

- Duyarlı, seçici, uzun ömürlü ve ekonomik özelliklere sahip,
- Çoklu-sensör dizilerinin tasarım ve üretimine uygun,
- Bilgisayar kontrollü ölçüm sistemleri ile birlikte in-vivo, in-vitro, in-situ, in-time, on-site kullanıma izin veren,
- Hareketli ortamlarda (FIA, HPLC, CE gibi) kullanılan, çok düşük tespit hacmine sahip flow-through akış hücrelerinin geliştirilmesi ve hazırlanmasına imkan tanıyan,
- Farklı örnek numunelerinde (biyolojik sıvılarda, çevre sularında, toprakta ve havada, klinik vakalarda) ölçmeye elverişli gibi birçok avantaja sahiptirler.

Genel anlamda biyosensörler, kimya, biyokimya, biyoloji, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden yararlanılarak, kimyasal ve biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen analitik/biyoanalitik aygıtlar olarak tanımlanabilir. Günümüzdeki bilimsel ve teknik ilerlemeler, elektrokimyasal biyosensör teknolojisinde önemli gelişmelere yol açarak bu sensörlerin birçok alanda yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur. Amonyak, laktat, glikoz, DNA, üre ve kreatinin gibi biyosensörler çevre ve biyolojik örneklerde rutin olarak kullanılan sensörlere örnek olarak verilebilir.

Bu çalışmanın amacı en önemli çevresel kirleticilerden biri olan fenollerin tayini için bir biyosensör geliştirmektir. Çalışmada öncelikle elektropolimerizasyon yöntemi ile horseradish peroksidaz (HRP) ve lakkaz (TvLac) enzimi kullanılarak iki farklı enzim elektrot hazırlanmıştır. İki farklı enzimle hazırlanan enzim elektrodu ile fenol ölçümü yapılarak sonuçlar kıyaslanmıştır. Daha sonra poli (*GMA-co-MTM*) kopolimerleri, AIBN başlatıcısı varlığında farklı kimyasal kompozisyonlarda, beslemedeki farklı GMA/MTM monomer oranlarının değiştirilmesiyle radikal polimerizasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Hazırlanan (*MTM-co-GMA*) kopolimeri kullanılarak glassy karbon elektrot modifiye edilmiştir. Modifiye edilen elektroda lakkaz (TvLac) enzimi fiziksel yöntemle tutuklanmıştır. Kopolimer ile modifiye edildikten sonra laccase enzimi tutuklanmış elektrotla fenol ve fenol türevlerinin tayininin basit ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilmesi için elektrokimyasal fenol biyosensörü geliştirilmiştir.

İlk aşamada horseradish peroksidaz (HRP) ve lakkaz enzimi (TvLac) kullanılarak elektropolimerizasyon yöntemi ile iki farklı enzim elektrodu hazırlanmıştır. Hazırlanan bu iki elektrotla fenol ölçümü yapılarak sonuçlar kıyaslanmıştır. Daha sonra üç farklı (*MTM-co-GMA*) kopolimeri hazırlanmıştır ve elektrodun kaplanması bu kopolimerlerin metilen klorürdeki çözeltisi kullanılmıştır. Çalışma elektrodunun kopolimerle kaplanması çözeltinin elektrot yüzeyine damlatılıp çözücüsünün açık havada buharlaştırılması ile yapılmıştır. Daha sonra (*MTM-co-GMA*) kopolimeri ile modifiye edilmiş elektrot elektrokimyasal hücreye alınarak belli bir potansiyelde aktive edilmiştir. Aktive edilmiş elektrot belli konsantrasyona sahip enzim (TvLac) çözeltisinde bekletilerek enzimin fiziksel olarak

tutuklanması sağlanmıştır. Hazırlanan biyosensöre potansiyel, ortam pH, (*MTM-co-GMA*) konsantrasyonu, enzim miktarı gibi çeşitli deneysel parametrelerin etkileri araştırılarak optimum koşullar saptanmıştır. Optimum parametreler elde edildikten sonra hazırlanan kopolimerlerden en iyi akım cevabının elde edildiği kopolimer seçilmiştir. Seçilen kopolimerle birlikte karbon nanotüp parçacıkları kullanılarak yeni bir biyosensör hazırlanmış ve bu biyosensörün akım cevabı üzerine karbon nanotüp parçacıklarının etkisi araştırılmıştır. Fenolik türlerin tayini için (*MTM-co-GMA*) kopolimerini esas alan enzim elektrodu ilk kez bu çalışmada geliştirilmiştir. Hazırlanan elektrotların aktivitesine belirlenen optimum koşullarda bir ay süreyle bakılmış ve elektrotların bu süre içinde aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. Geliştirilen biyosensör ile gerçek atıksu, arıtma çamuru ve deniz suyu numunelerinde ölçüm yapılmıştır. Biyosensörle elde edilen fenol tayini sonuçları standart metotla elde edilen sonuçlarla kıyaslanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Tüm canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin kullanımı için temel oluşturmuştur. Örneğin bazı köpeklerin koku almaları insanlardan 100.000 kat daha duyarlıdır. Yılan balıkları tonlarca su içerisine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi derhal algırlar. Kelebekler eşlerinin yaydığı birkaç molekül bile hissederler. Algiler ise zehirli maddelere karşı çok duyarlıdırlar. Canlılara bu uyarıları algılamayı mümkün kılan biyolojik maddelerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensörleri doğurmuştur.

2.1. Biyosensörler

Biyosensörler canlılardaki çeşitli maddelerin algılanmasını mümkün kılan biyolojik maddelerin birleştirilmesini esas alır. İlk biyosensör fikri doğadaki canlıların izlenip, gözlenmesinden sonra ortaya atılmıştır. Örneğin yılan balıklarının su içine atılan çok az miktarda zehri bile algılayabilmeleri buna çok güzel bir örnektir.

Biyosensörlerin tarihi 1950 li yılların ortalarında L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O_2 miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons glukozoksidaz (GOD) enzimini O_2 elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır. Böylece yeni bir analitik sistem oluşmuştur. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek seçiciliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini mümkündür.

Clark ve Lyons'un geliştirdiği ilk biyosensörde membran diyalizatör, reaksiyon bölgesi ve çeviriciden oluşmaktadır. İkinci jenerasyon biyosensörlerde O_2 yerine elektronları enzimin redoks merkezinden elektrodun yüzeyine taşıyabilen bir redoks mediyatörü kullanılmıştır. Üçüncü jenerasyon biyosensörlerde enzimin redoks

merkezi ile elektrot yüzeyi arasında direkt elektriksel iletişim sağlanmış ve redoks mediyatörlerine gereksinim kalmamıştır.

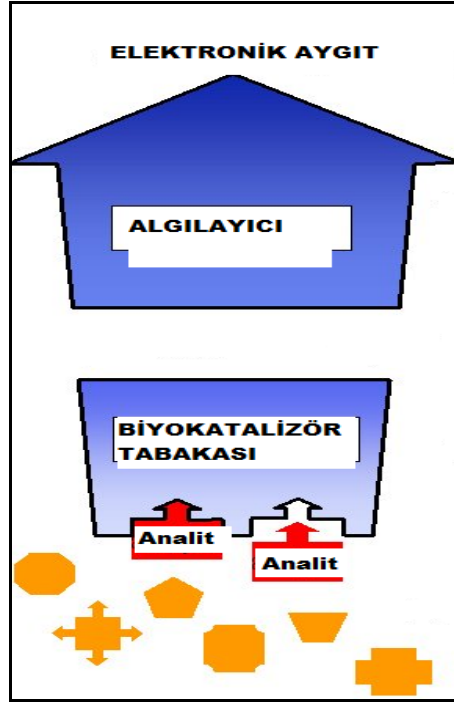
Bir biyosensör, diğer adıyla biyospesifik elektrot, biyoajanları immobilize halde kullanan, çeşitli gaz, iyon ve biyolojik maddelerin teşhisi, kantitatif tayini ve orjinal sistemlerde izlenmesi sağlayan probdur. Biyosensör teknolojisinin ürünleri günümüzde çok değişik alanlarda çok sayıda maddenin tayin ve izlenmesinde yaygın olarak kullanılır hale gelmiştir.

Bir biyosensör algılayıcı ile bütünleşmiş veya tamamen birleştirilmiş hassas biyolojik element içeren bir alettir. Biyosensörün görevi biyolojik bir olayın elektriksel sinyale dönüştürülmesidir. Biyosensörler esas olarak üç temel bileşenden ibarettir.

- Birinci kısım biyolojik olarak duyarlı materyal yani biyokatalizör tabakası.
- İkinci kısım biyolojik bileşenlerle temas edecek şekilde olan algılayıcıdır.

Bu kısım biyoajanın incelenen maddeyle etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürür.

- Biyosensörün üçüncü kısmı ise doğrudan biyokatalizör tabakasına bağlı elektronik aygıttır. Bu kısımda biyokatalizör ile tayin edilecek maddenin teması sonucu ortaya çıkan biyokimyasal sinyal uygun bir mekanizmayla kantitatif olarak elektrik sinyaline dönüştürülür. Şekil 2.1’de biyosensörün şematik gösterilimi verilmiştir.



Şekil 2.1. Bir biyosensörün şematik gösterimi.

2.1.1. Biyosensörlerde Kullanılan Biyolojik Materyaller

Bir biyosensörün bileşenlerinden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli fakat tersinir bir şekilde etkileşime giren, duyarlı biyolojik materyaldir. Genel olarak biyoajanlar, biyoafinite ajanları ve biyokatalitik ajanlar olarak iki alt gruba ayrılırlar. Biyoafinite ajanları olan antikorlar, hormon almaçları, DNA, lektin gibi biyolojik moleküller antijenlerin, hormonların, DNA parçacıklarının ve glikoproteinlerin moleküler tanımlanmasında kullanılır. Kompleks oluşumu sonucunda, tabaka kalınlığı, kırınım indisi, ışık emilmesi ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal parametrelerin değişimine neden olurlar. Biyokatalitik ajanlarsa, analit üzerinde moleküler değişime neden olmakta ve bu dönüşüm sonucu ortamda azalan ya da artan madde miktarı takip edilerek sonuca gidilmektedir.

Biyosensörlerde biyokatalizör olarak enzim ve enzim sistemleri, dokular (hayvansal, bitkisel), bakteriler, mayalar, antikorlar, antijenler, organeller, biyolojik membran bileşenleri kullanılabilir. Biyokatalizör seçimi ve duyarlılığı probun özellikleri yönünden en önemli noktalardan birisidir. Biyokatalizör kullanan sensörlerin diğerlerine göre önemli avantajları, seçimli ve duyarlı olmalarıdır.

Biyomolekülleri tanımayı kapsayan biyosensör mükemmel düzeyde seçiciliğe sahiptir. Fakat sıcaklık, pH, iyonik kuvvet gibi aşırı uç olan durumlarda sorun yaşanabilir. Biyosensörlerde biyomateryal olarak en yaygın kullanılanlar enzimler ve antikorlardır (Turner ve ark., 1992, Mulchandani ve Rogers, 1998, Tran, 1993). Enzim – substrat ve antikor – antigen arasındaki etkileşimin ilk adımı analitlerin protein moleküllerine bağlanmasıdır.

2.1.1.1. Enzimler

Biyokatalizörden en yaygın olarak kullanılan enzimlerdir. Enzimler canlı sistemlerdeki önemli biyolojik reaksiyonları katalizleyen protein yapısındaki makro moleküllerdir. Enzimler katalizledikleri reaksiyonlar için çok duyarlıdır. 10^{-8} M ve daha düşük konsantrasyonlarda bile katalizör görevi yapabilirler.

2.1.1.2. Bakteri ve Hücreler

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

Bu uygulamanın avantajları;

- 1) Saf halde kararsız olan enzimlerin hücrede kararlı olmaları ve hücre ile hazırlanan biyosensörlerin daha uzun ömürlü olması.
- 2) Enzimatik reaksiyonlar için gerekli olan bütün kofaktör ve kimyasal maddeler hücrede bulunduğu için, çoğu pahalı olan ve zor bulunan bu maddelerin ayrıca kullanılmalarına gerek yoktur.
- 3) Canlı hücrelerle hazırlanan biyosensörlerin saf enzimlerle hazırlananlara göre daha ucuza mal olması

Dezavantajları;

- 1) Sterilizasyon gerektirmeleri
- 2) Kullanılan hücrede istenilen enzimin dışında diğer enzimlerinde bulunması nedeniyle seçicilik azalması
- 3) Mekanik çalışma güçlükleri

2.1.1.3. Dokular

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

Enzimler, antikorlar, hücreler vb gibi çok fazla biyolojik moleküller çözelti fazında çok kısa bir ömre sahiptirler. Bu yüzden uygun bir matrikse sahip olmak zorundadırlar.

2.1.2. Algılayıcı (Transducer)

Algılayıcı reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu sonucu oluşan biyokimyasal sinyali elektronik sinyale çevirir. Ölçülen elektriksel sinyal analit derişimiyle orantılıdır. Elektronik bir alet olan algılayıcı tarafından sinyal ayrıntılı bir şekilde okunur, görüntülenir ve saklanır. İlgili türlerin biyokimyasal etkileşiminin doğasına göre uygun bir algılayıcı sistem seçilmelidir. Fiziksel algılayıcılar elektrokimyasal, spektroskopik, termal, piezoelektronik ve yüzey akustik dalga teknolojisi olarak çeşitlendirilebilir.

2.1.3. Biyolojik Materyallerin Algılayıcı Üzerine İmmobilizasyonu (Tutuklanması)

Biyosensör sisteminde en yaygın kullanılan biyokatalizörler enzimlerdir. Serbest enzim reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından uygulamalarda reaksiyonu kontrol etmek oldukça güçtür. Ortama inhibitör katılması düşünülebilir. Fakat bu da reaksiyon ürünleri için yeni bir kirlilik unsuru olacaktır. Ürünlerin arıtılması ek bir maliyet doğuracaktır. Ayrıca enzimi reaksiyon ortamında aktivitesini yitirmeden çıkarmak olanaksız olduğundan enzimin tekrar kullanılması söz konusu değildir. Bu yüzden enzimler spesifik fakat pahalı katalizörlerdir.

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

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

İmmobilizasyon enzimin aktivite kaybetmeden elektrot yüzeyine tutturulması işlemine denir. İyi bir enzim elektrodunun yapılabilmesi için en önemli adım enzim immobilizasyonudur. Biyosensör çalışmalarında enzim immobilizasyonu için genellikle dört yaygın metot kullanılır. Bunlar:

- Taşıyıcıya bağlama
- Çapraz Bağlama
- Kovalent Bağlama

2.1.3.1. Taşıyıcıya Bağlama

En eski immobilizasyon yöntemidir. Taşıyıcıya bağlama kimyasal kovalent, iyonik veya adsorptif biçimde yapılabilir. Enzime göre taşıyıcı seçimi çok önemlidir. Taşıyıcı seçiminde partikül büyüklüğü, toplam yüzey, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı, taşıyıcının kimyasal bileşimi önemlidir. Bu tip enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar doğal veya sentetik olabilir. En çok kullanılan sentetik taşıyıcılar polistren, poliakrilamit ve polimetakrilattır. Doğal taşıyıcılar ise selüloz, nişasta, aktif karbon ve camdır.

Taşıyıcıya bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyonu üç alt grupta incelenir.

a) Kovalent Bağlama

Enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması sulu ortamda gerçekleştirilir. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlama sırasında sterik engellemeler nedeniyle bu grupların rahatsız edilmemesidir. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekir. İmmobilizasyon çok yumuşak koşullarda gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli, büyük ölçüde hidrofobik karakterli olmalı, suda ıslanabilmeli ayrıca mekanik kararlı olmalıdır.

b) İyonik Bağlama

Bu yöntem iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştirildiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezinde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçıışı söz konusudur.

c) Adsorpsiyon

Enzim immobilizasyonunda kullanılan en basit yöntemdir. Adsorbsiyonun asıl amacı önceleri enzimi saflaştırmaktı. Yöntem, yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan *Wander walls* kuvvetleridir. İyi bir adsorpsiyon sağlayabilmek için genellikle adsorbanın bir ön işleminden geçirilmesi gerekir. En çok kullanılan adsorbanlar aktif karbon, gözenekli cam, CaCO_3 , kül, kolladyum, silikajel, nişasta ve kalsiyum fosfattır.

2.1.3.2. Çapraz Bağlama

Küçük moleküllü bi veya multi fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlama derecesi protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH ve immobilize edilecek enzime çok bağlıdır. Bu yöntem ile enzim immabilizasyonu dört farklı şekilde gerçekleştirilir.

- Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu.
- Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorbsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcıyla reaksiyonu

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri, glutaraldehit, izosiyanat türevleri, bisdiazobenzidin, N-N-polimetilen bisiyodasedanit, 2-5- diflora -2,4-dinitro benzen ve N,N-etilenbismaleimittir. Çapraz bağlı enzimler mekanik bakımdan çok kararsızdır. Yalnız immunolojik testlerde kullanılmışlardır. Ayrıca çapraz bağlamada önemli derecede aktivite kaybı söz konusudur.

2.1.3.3. Tutuklama

Prensip olarak tutuklama enzim molekülünü belirli bir mekanda durmaya zorlamaktadır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebildiği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ile de gerçekleştirilebilir.

Bu yöntemi diğer immobilizasyon yöntemlerinden ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

a) Polimer Kafeste Tutuklama

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

Yöntemin yararları; çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az miktar enzimle gerçekleştirilmesi, nötral, suda çözünmeyen taşıyıcılarla da immobilizasyonunun gerçekleştirilebilmesi, yüklü taşıyıcıya gerek duyulmamasıdır.

Yöntemin sakıncaları ise, immobilizasyon işlemi sırasında aktivasyonun deney koşullarına çok sıkı bağlı olması ve immobilize enzimin ancak küçük moleküllu substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir.

b) Mikrokapsülleme

Bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasından ibarettir. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 50–100 µm arasında değişmektedir. Enzimler daha çok kimyasal mikrokapsülleme ile immobilize edilmektedirler. Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu, sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen membran mikrokapsülle tutuklamak üzere iki grupta incelenebilir. Sürekli mikrokapsüllerde çerçeve membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde ise sıvı bir tabakadır. İmmobilizasyonda kullanılan çerçeve maddesinin yarı geçirgen olması zorunludur.

2.2. Biyosensörlerin Çalışma Mekanizması

Biyosensörlerin çalışması sırasında ilk önce substratın çözelti içerisinde biyosensör yüzeyine taşınması gerçekleşir. Substratın taşınması difüzyon, karıştırma vb. gibi çeşitli şekillerde olabilir. Substrat biyokatalizörün aktif bölgesine difüze edilir. Biyokatalizör polimerik gözenekli membrana (selülozik diyaliz membranı gibi)

emdirilmiş veya algılayıcı ile polimerik membran (selofan, selüloz asetat/nitrat, polivinil alkol, poliüretan vb) arasına sandviç edilmiş veya polimerik bir jel içinde hapsedilmiş olabilir. Bu hapsetme işlemi için poliakrilamid, jelâtin, kalojen, agaroz vb gibi doğal veya sentetik polimerler kullanılabilir. Biyokatalizör ve substrat arasında reaksiyon meydana gelir. Bu etkileşme sonucu gaz molekülleri (O_2 , CO_2 , NH_3 , vb) salınabilir veya kullanılabilir, seçimli iyonlar oluşabilir. (H^+ , NH_4^+ , diğer tek değerlikli anyon ve katyonlar), ısı ortaya çıkar veya kaybolur, optik yoğunluk değişebilir, elektron salınabilir veya kullanılabilir. Biyokatalizör ve substrat reaksiyonu sonucu oluşan ürün algılayıcı yüzeyine taşınır. Algılayıcı yüzeyinde yukarıda bahsedilen değişimler algılanıp elektriksel devrelerle ölçülebilecek bir boyuta dönüştürülür. Ölçülen elektriksel sinyal analit derişimiyle orantılıdır.

2.3. Biyosensör Çeşitleri

2.3.1. Elektrokimyasal Biyosensörler

Potansiyometrik Biyosensörler

Potansiyometrik ölçümler, yarı geçirgen membranla ayrılmış iki farklı elektrot arasındaki önemli bir akım akışının olmadığı potansiyel ölçümünü içerir. Potansiyometrik biyosensörler, en eski ve yaygın olarak kullanılan biyosensörlerdir. GOD'un immobilizasyonu ile polipirol (PPY) elektrot oluşumu için amperometrik yöntemin üstünde belirli avantajlara sahip olduğu kanıtlanmıştır (Trajanowicz ve Krawczyk, 1995). İletken polimerli potansiyometrik biyosensörler hassas pH'a duyarlı polimerler kullanılarak da meydana getirilebilir. NH_3 polimer polipirol (PPY) arayüzeyinde enzimlerin biyolojik görevini hafifletmek ve canlı hücrelerin elektrot yüzeyinde elektrot potansiyelinin ayarlanması gibi görevleri yerine getirir. Çogunlukla yaygın olan potansiyometrik aletler pH elektrotlarıdır. Fakat F^- , I^- , CN^- , Na^+ , K^+ , NH_4^+ veya NH_3 , CO_2 gibi gazları içeren seçici elektrotlar da kullanılabilir. Referans elektrot ve çalışma elektrodu arasındaki potansiyel değişimi, Nerst eşitliğinde tarif edilen gaz fûgasitesi veya iyon aktivitesiyle logaritmik olarak değişir.

Kandaki laktat ölçümü gibi doğal numunelerin analizleri için enzimlerin kullanılmasına izin veren, iletken polimerlerin kullanıldığı biyosensörler de geliştirilmiştir. Polimer tabakasında iyi bir tayin oluşturma avantajı elde edilebilir. Ayrıca polimer tabakası anyonu ile potansiyometrik üre biyosensörünün dizaynı için kullanılmıştır. Bu çalışmada sodyum ve potasyumun girişim yaptığı belirlenmiştir (Pandey ve Mishra, 1988). Kreatin elektrot, kreatinaz, keratinaz ve sarkosin oksidazın polipirol (PPY) matrikste immobilizasyonu ile yapılmaktadır (Yamato vd., 1995). Elektron indirgemesinin yapıldığı polimer tabakasındaki enzim immobilizasyonunu ilgilendiren güçlükler veya mekanizmadaki engeller ve biyosensör üzerindeki dinamik etkiler kapsamlı bir şekilde tartışılmış ve günümüzde halen aynı enzimlerin immobilizasyonunu anlatmak için farklı polimer matrikslerin karşılaştırılmasında kesin sonuçlar alınamamıştır.

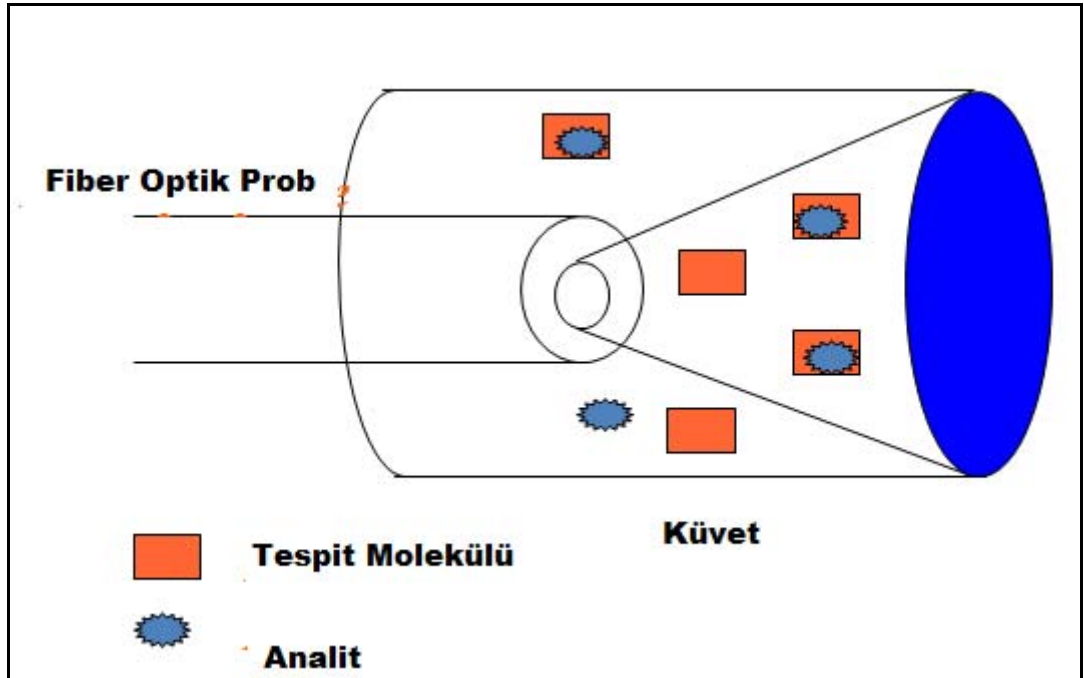
Kondüktometrik Biyosensörler

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

Ramanathan (1995) glukoz biyosensördeki gibi polianilin filmlerinin ölçümü üzerinde çalışmalar yapmıştır. Aynı zamanda polipirol (PPY) glukoz biyosensörünün dielektrik spektroskopik ölçümleri üzerinde araştırmalar yapmıştır. İletkenlik polimerleri temel alan kondüktometrik biyosensörler penisilin ve aynı zamanda glukoz, üre, lipidler ve hemoglobin için geliştirilmiştir. Mikroelektronik aletler, altın film elektrotlar üzerindeki polipirol (PPY) tabakanın içinde immobilize edilen üreazın kullanıldığı kapasitans, iletkenlik ölçümleri milimolar oranında hassaslıkla hazırlanmaktadır. Akış enjeksiyon sistemi polipirol filmler üzerinde penisilaz immobilizasyonu ve ölçüm sırasında değişen pH yüzünden meydana gelen değişken iletkenlikle gelişmiştir (Ramanathan, 1995).

2.3.2. Optik Biyosensörler

Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekülün immobilize edilmesiyle hazırlanan ölçüm aygıtlarıdır. Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alırlar. Sinyal, ışık yansıması, saçılımı ya da yayımı sonucu meydana gelir. Optik biyosensörün şematik gösterimi Şekil 2.2’de verilmiştir. Örneğin optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile hazırlanan optik esaslı enzim sensörleri temelde absorpsiyon, fluoresans, biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde işlev görürler. Bu tip biyosensörlerde ışık dalgaları fiber optik kablo yardımıyla uygun bir dedektöre iletilir. Bu biyosensörler O_2 , pH, CO_2 tespiti için kullanılmaktadır. Gerard (1999) polianilin elektrot üzerinde pürüvat konsantrasyonunu optik olarak ölçmüştür. Bu elektrotlar 15 günlük bir dayanıklılık süresine ve 90 saniye cevap süresine sahiptir. Singhal (2003) Langmuir–Blodgett (LB) tekniğiyle polihekziltiyofen üzerinde glukoz oksidaz immobilize etmiş ve UV-visible spektroskopi kullanarak optik glukoz sensörü yapmıştır.



Şekil 2.2. Optik biyosensörün şematik gösterimi.

2.3.3. Kalorimetrik Biyosensörler

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

2.3.4. Piezoelektrik Biyosensörler

Piezoelektrik sensörler karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlesinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Bu tip biyosensörler elektiriksel dipole sahip doğal anizotropile kristellerden meydana gelir. 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. Bu tip biyosensörler amonyum, hidrojen, metan, CO, nitroz oksit ve diğer organa fosfor bileşikleri ölçümünde kullanılmaktadır.

2.4. Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler

2.4.1. Seçicilik

İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden birisi seçicilik özelliğidir. Eğer yeterli seçicilik mevcut değilse bu eksiği giderecek uzun ek işlemler gerekir.

2.4.2. Kullanım Ömrü

Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca, biyosensörün kalibrasyon aralığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametrelerini de etkilemektedir.

2.4.3. Kalibrasyon Gereksinimi

İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Fakat bu özellik, teorikte planladığı gibi, pratikte gerçekleştirilememiştir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler.

2.4.4. Tekrarlanabilirlik

İdeal bir biyosensör için, elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı sonuçların okunması istenir. Pratikte pek mümkün olmayan bu durum göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa biyosensörün uygulamalarının da o denli iyi olduğundan söz edilebilir.

2.4.5. Stabilite

Elektrot stabilitesinin (kararlılığının) yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Stabilite, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca; pH, ısı, nem, ortam, O₂ derişimi gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

2.4.6. Yüksek Duyarlılık

Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması ideal biyosensörlerin özelliklerindendir.

2.4.7. Yeterli Düzeyde Tayin Sınırı

Tasarlanan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir derişim değerin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu sınır, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir.

2.4.8. Çalışma Aralığı

Biyosensör uygulamalarında çalışma aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörlerden alınan akım - derişim eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır.

2.4.9. Hızlı Cevap Süresi

Bir biyosensör elektrodunun cevap süresi elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Örneğin elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı hızlıdır.

2.4.10. Hızlı Geriye Dönme Zamanı

Geriye dönme zamanı örneğin amperometrik çalışmalarda ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Yani ilk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa ikinci örnek de aynı süre sonra ilave edilebilecektir.

2.4.11. Basitlik ve Ucuzluk

Tasarımı basit ve ucuz, kullanımı rahat biyosensörler ideal biyosensörlerdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve de pahalı olan yapılar daha sonra basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da maliyeti düşürülmüştür.

2.4.12. Küçültülebilirlik

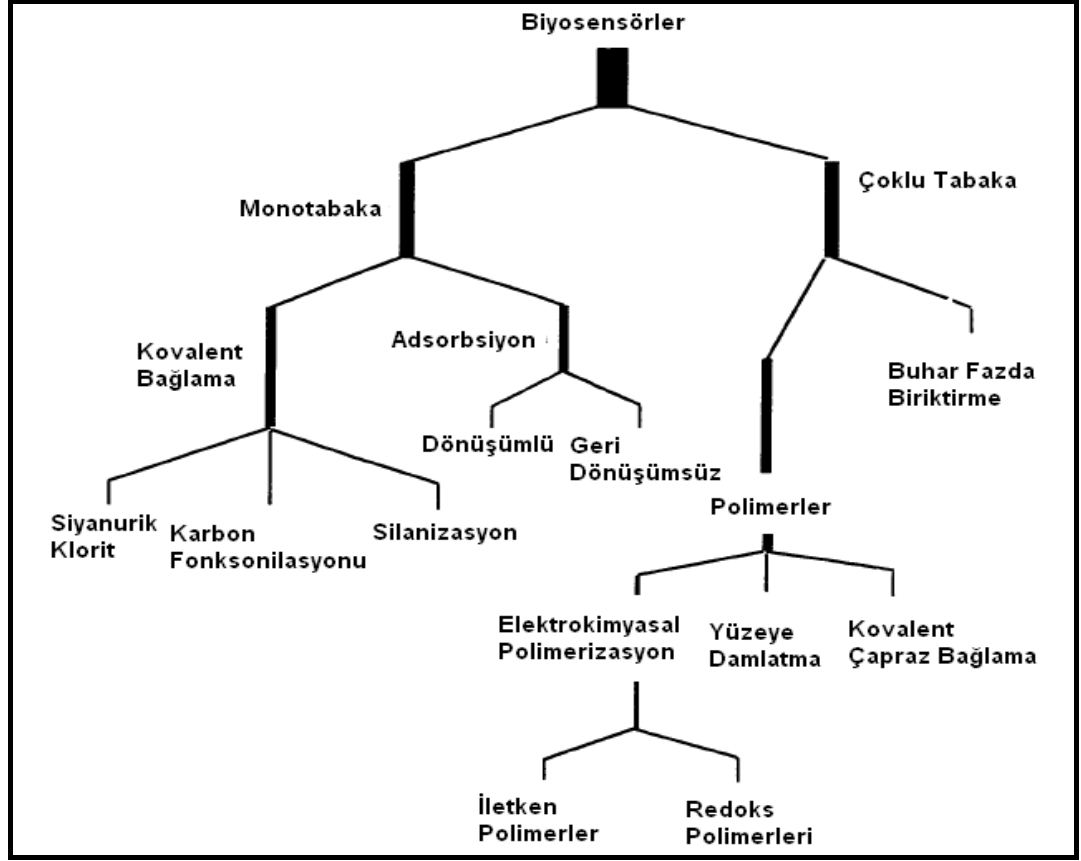
Elektrotlarının boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımı ve kullanılabilirlik açısından önemlidir.

2.5. Amperometrik Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler içinde en yaygın kullanılan biyosensör tipidir. Amperometrik biyosensörlerde ölçüm yapılacak türün belli bir potansiyel altında yükseltgenmesi ve indirgenmesi sağlanır. Biyokimyasal reaksiyon sonucu oluşan akım analit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

2.5.1. Amperometrik Biyosensörlerin Hazırlanması

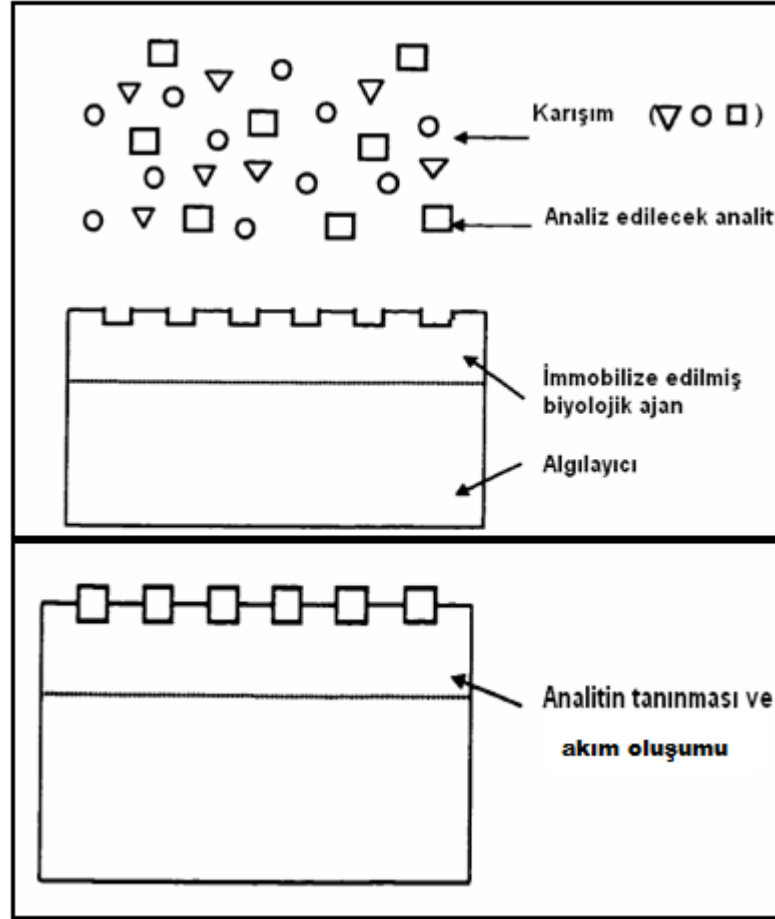
Biyosensör teknolojisindeki gelişmeler biyosensör yapımında çok farklı yaklaşımların ortaya çıkmasına sebep olmuştur (Connolly ve ark., 1995, Vadgama ve Crumpl, 1992, Griffiths ve ark., 1993, Wring ve Hart, 1992). Elektrot yüzeyinin moleküler yapısının kontrolü biyosensör yapımında büyük önem taşımaktadır. Amperometrik biyosensör çalışmalarında yüzey modifikasyonu için çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin listesi Şekil 2.3’de verilmiştir.



Şekil 2.3. Amperometrik biyosensör yapımında kullanılan yöntemler.

2.5.2. Amperometrik Biyosensörlerin Çalışma Prensibi

Amperometrik biyosensörler biyolojik bir materyal ve elektrokimyasal bir algılayıcıdan oluşur. Biyolojik materyal analit ile birleşerek onun tanınmasına olanak sağlar. Algılayıcı ise biyolojik materyal ile analit arasında belli bir potansiyel altında reaksiyon sonucu sinyali ölçer. Amperometrik biyosensörün çalışma prensibi Şekil 2.4’ de verilmiştir.



Şekil 2.4. Amperometrik biyosensörün çalışma prensibi.

Amperometrik biyosensörler gerekli olan üç temel öge şunlardır:

- Substrat ile etkileşimi sonucunda uygun bir elektrot yüzeyinde yükseltgenebilecek veya indirgenebilecek bir tür oluşturan enzim
- Enzimin aktivitesini yitirmeden elektrot yüzeyinde immobilize olmasını sağlayacak immobilizasyon metodu
- Yükseltgenme veya indirgenme sırasında oluşacak akımın ölçülmesi ve potansiyelin kontrolünü sağlayacak bir elektronik sistem

2.6. İletken Polimerler Kullanılarak Hazırlanan Biyosensörler

İletken polimerlerle modifiye edilmiş elektrot kavramının geçmişine bakıldığında, bu terimin ilk olarak 1970 lerin sonlarında kullanılmaya başlandığı

görülür. Kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrotlar üzerine en önemli gelişme 1984 yılında Murray (Murray, 1984) tarafından yapılan elektrotların hazırlanması, karakterizasyonu ve uygulanmaları ile ilgili çalışmada gözlenmiştir.

2.6.1. Polimerler

Polimer, küçük, tekrarlanabilir birimlerin oluşturduğu uzun-zincirli moleküllere denir. Tekrarlanan birimler, “mer” olarak adlandırılır. Senteze başlarken kullanılan küçük molekül ağırlıklı birimlere ise “monomer” adı verilir. Polimerizasyon sırasında, monomerler doymuş hale gelerek (zincir polimerizasyonu) veya küçük moleküllerin yapıdan ayrılmasıyla (H_2O veya HCl) değişir ve “mer” halinde zincire katılırlar. Polimerlerin özellikleri, yapı taşları olan monomerlerden büyük farklılık gösterir. Tekrarlanan birimlerden (monomerlerden) oluşan büyük moleküllerin bir araya gelmesiyle polimerik maddeler oluşur. Monomerlerden polimerik maddelerin elde edilmesini sağlayan reaksiyonlara da polimerleşme reaksiyonları denir. Geçen yüzyılın başından beri hayatımıza girmeye başlayan yapay polimerler, çeşitli amaçlar için yaygın biçimde kullanılmaktadır. “Polimerler yalıtkan malzemelerdir” fikri 70’li yıllarda son bulmaya başladı; zira daha önce sentezlenmiş olan fakat iletkenlik vasfından bahsedilmeyen bazı polimerlerin, şartlara bağlı olarak, elektrik akımını iletebildiği gözlenmiştir. Sonrasında, iletken polimerlere artan ilgiyle beraber, hakkında yapılan çalışma sayısı artmış, sağlanan gelişme neticesinde “organik metaller” adı altında çalışma sahası doğmuştur.

2.6.2. İletken Polimerler

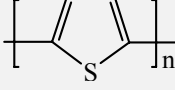
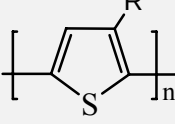
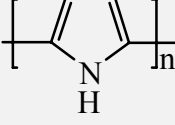
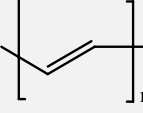
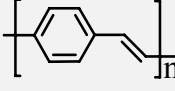
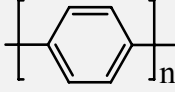
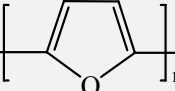
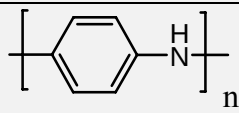
İletken polimerler yapılarında π bağları bulundurlar. Yapılarındaki bu bağdan dolayı oldukça iyi iletkenlik, düşük iyonizasyon potansiyeli ve yüksek elektron seçiciliği gibi olağan dışı özelliklere sahiptirler. Bu bağlar polimer zinciri boyunca tekli veya ikili olarak değişiklik gösterir. İletken polimerlere yüksek iletkenlik özelliklerinden dolayı “sentetik metal” de denilmektedir. Birçok araştırmacı tarafından iletken polimerler analitik kimyada ve biyosensörlerde kullanılmışlardır

(Trojanowicz ve Krawczyk, 1995, Situmorang ve ark., 1998, Schuhmann, 1995, Wring ve Hart, 1992, Guiseppi-Elie ve ark., 1997).

İletken polimerler denince akla gelen ilk hususlardan biri kuşkusuz doping olayıdır. Sentezlenen polimer, doping yardımıyla daha büyük bir iletkenliğe ulaşır. Bu iletkenlik, metallerin gösterdiği iletkenliğe yakındır.

İletken polimerler polikonjuge, poliaromatik ve poliheterosiklik moleküllerden oluşan ve doping edilmiş hallerinde yüksek elektriksel iletkenliğe sahip olan polimerlerdir. Yük taşınımının farklı olmasıyla redoks polimerlerinden ayrılırlar. Yarı iletken fiziğinde “doping” terimi, küçük miktarlardaki dopant türlerinin taşıyıcı madde içerisinde bir yer işgal ettiğinden (yani doping halinde), dopant türleri içermediği hale göre daha fazla iletken olduğu işlevini ifade eder. Konjuge polimerlerdeki (polipirol gibi) doping işlevi ise aslında polimerin kısmen yükseltgenmesiyle (nadiren indirgenmesiyle) meydana gelen bir yük değişimi reaksiyonudur. Çizelge 2.1’de bazı iletken polimerler ve özellikleri verilmiştir.

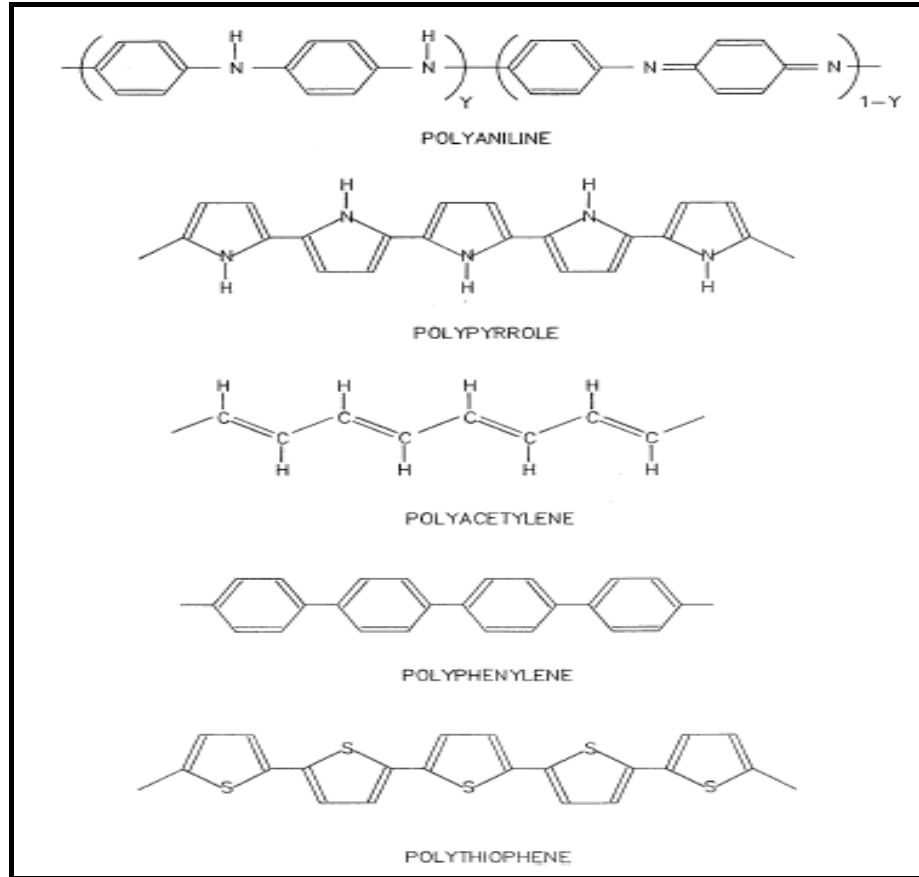
Çizelge 2.1. Bazı iletken polimerler ve özellikleri

Polimer	Yapı	Dopant madde	İletkenlik ($\Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$)
Politiyofen		BF_4^- , ClO_4^-	1000
Poli(3-alkiltiyofen)		BF_4^- , ClO_4^-	1000-10000
Poli(piröl)		BF_4^- , ClO_4^-	500-7500
Poli(asetilen)		I_2 , Br_2 , Li , Na , AsF_5	10000
Poli(fenilenvinilen)		AsF_5	10000
Poli(fenilen)		AsF_5 , Li	1000
Poli(furan)		BF_4^- , ClO_4^-	100
Poli(anilin)		HCl	200

2.6.3. İletken Polimerlerin Biyosensörlerde Kullanımı

Çevresel izleme tekniklerinde istenilen sonuca, en az işlemle, en kısa zamanda ve istenen hassasiyette ulaşmak amaçlanır. Bu çerçevede, polimerik maddeyi analiz basamağına uygulamak amacıyla pek çok çalışma yapılmış ve halen de yapılmaktadır. İletken polimerler güneş hücreleri (Audebert ve Bidan, 1985), düşük ağırlıklı bateriler, elektrokromik aletler, moleküler elektronik aletler ve sensörler gibi birçok alanda kullanılmaktadır. İletken polimerlerin en yaygın kullanıldığı alanlardan bir tanesinde de amperometrik biyosensörlerdir. Amperometrik biyosensörlerde polimerin tutuculuk ve iletkenlik özelliği ön plana çıkmaktadır. Polimerin içine

hapsedilen biyomateryal, elektrot yüzeyine ilave özellikler kazandırmakta ya da kullanım amacına göre olumsuz olan etkileri azaltmaktadır. Literatürde farklı iletken polimer kullanılarak fenol tayini için birçok amperometrik biyosensör geliştirilmiştir. İletken polimerler arasında tiyofen gruplu polimer ve oligomerlerinin elektriksel özellikleri ve çevresel kararlılıklarından dolayı birçok uygulama alanları olduğundan (Clain ve ark., 1996, Galzi ve Zerbi, 1996, Kossmehl, 1986) bunlara daha fazla ilgi duyulmaktadır. Piyrol, tiyofen, azulen ve anilin gibi polimer film kaplaması veren aromatik bileşiklerin kopolimerleri, modifiye elektrotların eldesi için uygun bir yoldur. Şekil 2.5’de biyosensör çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bazı iletken polimerlerin yapısı görülmektedir.



Şekil 2.5. Biyosensör çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bazı iletken polimerlerin yapısı.

Amperometrik biyosensörlerde, biyosensörün cevabını etkileyen en önemli unsur katalitik molekül (oksidaz veya dehidrogenaz) ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferidir. Bu yüzden elektrot yüzeylerinde çoğunlukla iletken polimer

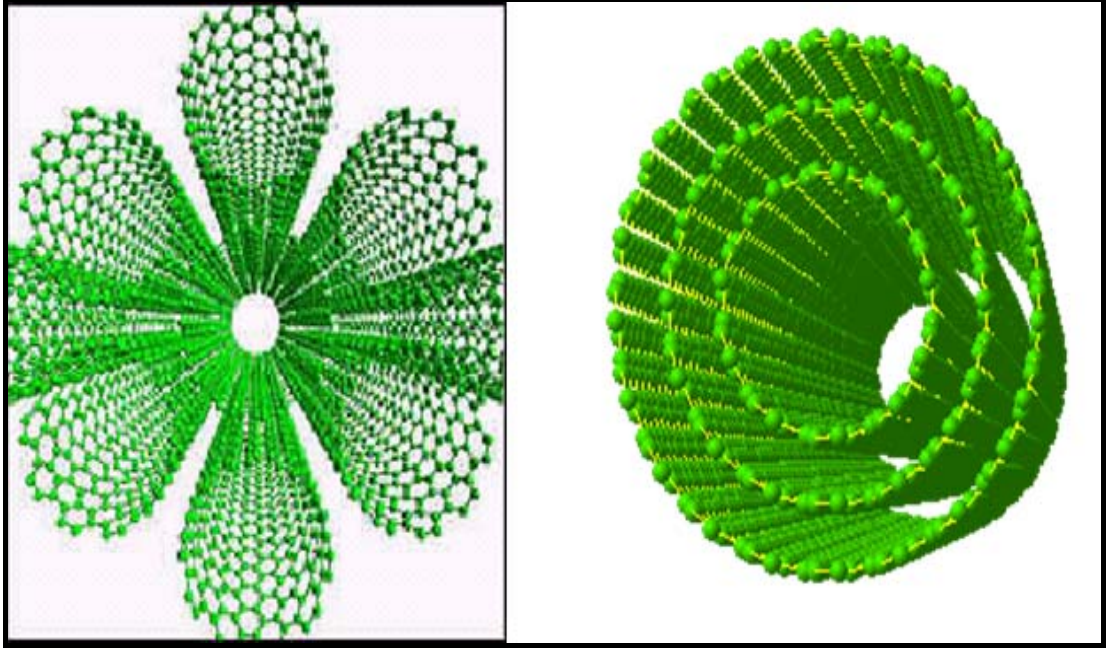
veya mediyatör kullanılır. Bu sebeple biyosensör çalışmalarında enzimin farklı şekillerde immobilizasyonu için birçok iletken polimer kullanılmaktadır (Bartlett ve Whitaker, 1987, Umana ve Waller, 1986, Fortier ve Belanger, 1991, Hammerle ve ark., 1992). Ayrıca iletken polimerler enzim tutuklama açısından uygun matrikslerdir. Hazırlanan enzimin cevap hızının, seçiciliğinin artmasını sağlar (Heller, 1990). Tüm bu avantajlarından dolayı iletken polimerleri esas alan birçok biyosensör geliştirilmiştir (Cosnier, 1999, Lewis ve ark., 1999, Kranz ve ark., 1998, Santhanam, 1998, Trojanowicz ve ark., 1997, Adeloju ve Wallace, 1996, Trojanowicz ve Krawczyk, 1995, Alva ve Phadke, 1994, Contractor ve ark., 1994, Bartlett ve Birkin, 1993, Deshpande ve Amalnerkar, 1993, Boyle ve ark., 1989, Bidan ve ark., 1988). İletken polimerlerin biyosensörlerde kullanılmasının bir diğer avantajı ise elektrokimyasal sentez yoluyla doğrudan elektrot yüzeyinde biriktirilebilmesidir. Polimerin elektrot yüzeyinde birikmesi sırasında enzim de bu yapı içinde hapsedilebilir (Gambhir ve ark., 2001a). Farklı substratların tayini için geliştirilen biyosensörlerde kullanılan iletken polimerler Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Biyosensörlerde kullanılan iletken polimerler

Substrat (Tayin edilecek tür)	Enzim	Polimer	Ölçüm yöntemi
Glukoz	Glukoz oksidaz	Polipirol Polianilin Poliindol	Amperometri
Atrazin	Tyrosinaz	Polipirol	Amperometri
Kolestrol	Kolestrol oksidaz	Polipirol	Amperometri
Lipit	Lipaz	Polianilin	Amperometri
Laktat	Laktat oksidaz	Polifenilen daimin Polivinil sülfonat/ Polipirol	Amperometri
Fenol	Tyrosinaz	Polipirol	Amperometri
Ürik asit	Üreaz	Polianilin	Amperometri

2.7. Karbon Nano Tüplerin Biyosensörlerde Kullanımı

Nano teknolojilerle üretilen malzemelerden en önemlisi de karbon nano tüplerdir. Karbon nanotüplerin bilimsel olarak 1985'te 60 ya da daha fazla karbon atomunun birleştirilmesiyle oluşan futbol topu şeklindeki moleküllerin keşfiyle başlamıştır. Bu topların diğer atom veya moleküllerle yaptığı bileşiklere “fulleren” denir. Bu keşiften sonra birçok laboratuvar sıcak karbon buharını yoğunlaştırarak futbol topu şeklindeki molekülleri elde etmeye çalışmış; bu elde etme işleminden küçük değişikliklerle çeşitli şekil ve boyutlarda küreye benzer yapılar elde edilmiştir. İlk tüp şeklindeki molekülleri 1991'de elektron mikroskobu uzmanı Sumia Iijima fullerenlerin ark-buharlaşması sentezi sırasında katodda biriken malzemeyi araştırma sırasında bulunmuştur. Kısa bir süre sonra Thomas Ebbeson ve Pulickel Ajayan çeşitli ark-buharlaşması koşulları altında büyük miktarlarda nanotüp üretilebileceğini göstermiştir. Nanotüpler, kristal grafitlerden oluşan hegzagonal örgüdeki karbon atomlarının oluşturduğu silindirik yapılardır. Karbon nano tüpler çelikten 100 kat güçlü, 6 kat daha hafiftir. Hali hazırda elektronik görüntüleme ve algılayıcı cihaz üretiminde, hafif inşaat malzemesi yapımında kullanılmaktalar. Tek duvarlı (SWCNT) ve çok duvarlı (MWCNT) olabilirler. Tek duvarlı bir karbon nanotüp, tek bir grafit tabakasının her iki kenarında fulleren uçları ile kendi etrafında döndürülmüş halidir. Tek duvarlı olanlar genellikle 0,4 - 20 nm çapında; 100 nm – 10 µm uzunluğundadır. Çok duvarlı olanlar ise 4 -30 nm çapında, en çok 1 µm uzunluğundadır. Bir kurşun kalemin yarısı kadar genişliğe sahip bir karbon nanotüp 40,000 kilogramdan fazla yük taşıyabilir. Karbon nano tüpler oldukça yüksek erime sıcaklığına sahiptirler. Şekil 2.6' da karbon nano tüp yapıları görülmektedir.



Şekil 2.6. Karbon nano tüp yapıları.

Son yıllarda karbon nano tüplerin en önemli kullanım alanlarından biride biyosensörlerdir. Farklı özellikte birçok enzim elektrodunun hazırlanmasında karbon nano tüler çok farklı şekillerde kullanılmaktadır.

Karbon nanotüp-chitosan kompozitleri iyi iletkenlikleri, yüksek kararlılıkları sebebiyle biosensor uygulamalarında oldukça uygun matrislerdir. Biyosensör uygulamaları için gerekli enzim başka hiçbir bağlayıcı ajan kullanmadan basit bir şekilde bu komposite içinde tutuklanabilir. Ayrıca bu komposite pH 6.3 üzerinde kolayca çözünmeyen formuna dönüşebilir. Bu özelliğine dayanılarak laccase enzimi kolayca bu komposite içerisinde tutuklanarak yeni bir amperometrik biyosensör hazırlanmıştır. Ph 6 komposit içerisinde tutuklanan laccase enzimi çözünmüş formundan daha iyi katalitik aktivite göstermiştir. Hazırlanan biyosensörün en büyük avantajı ABTS, katekol, ve O₂ birçok farklı substratın ölçümüne izin vermesidir. Ayrıca bu substratlar için oldukça yüksek hassasiyet ve seçicilik, uzun süreli kararlılık ve oldukça kolay hazırlama prosedürüne sahiptir. Sistemin bir başka avantajı ise bu biyoyakıt hücresi yapımına uygulatabiliyor olmasıdır. Sistemde diğer enzimler ve biyomoleküller kullanılarak yeni biyosensörler, biyoyakıt hücreleri ve diğer biyo elektrokimyasal aletler geliştirilebilir (Liu ve ark., 2006).

Xiang ve çalışma grubu dopamin tayini için glassy karbon elektrot üzerine çapraz bağlama ile lakkaz enzimini ve çok tabakalı karbon nano tüpünü esas alan elektrokimyasal bir biyosensör hazırlamışlardır. Karbon nano tüpün biyosensöre sağladığı üstün özellikler sayesinde dopamin oldukça seçici bir şekilde tayin edilmiştir (Xiang ve ark., 2007).

Bir başka çalışmada hidrofobik karbon nano tüp ve iyonik sıvılar (CNTs-IL) kullanarak oldukça kararlı hidrofobik filmle modifiye edilmiş grafit elektrot yüzeyi hazırlamışlardır. Lakkaz enzimi CNTs-IL jel ile modifiye edilmiş elektrot üzerine immobilize edilmiştir. Geliştirilen biyosensör oldukça yüksek termal kararlılık göstermiş ve yapıda kullanılan karbon nano tüp sayesinde elektrokimyasal katalitik yetenek artmıştır. Bunun dışında geliştirilen nanokompozit oldukça hızlı elektrokimyasal cevap süresine sahiptir (Liu ve ark., 2007).

Zheng ve çalışma arkadaşları karbon nano tüp ile modifiye edilmiş glassy karbon elektrot ve lakkaz arasındaki doğrudan elektron transferini dönüşümlü voltametri yöntemini kullanarak 0,1 M fosfat ortamında çalışmışlardır. Çalışmalar sonucu elde edilen formal potansiyel (+530 mV) lakkaz enziminde bulunan T1 bakır merkezinin potansiyeline oldukça yakındır. Lakkaz katalizli oksijen indirgenmesinin muhtemel uygulaması askorbat/O₂ biyoyakıt hücreleri yapılarak örneklendirilmiştir (Zheng ve ark., 2008).

Diğer bir başka çalışmada ise *Penicillium simplicissimum*'dan elde edilen lakkaz enziminin aktivite tayini için elektrokimyasal bir sensör geliştirilmiştir. Geliştirilen sensör glassy karbon elektrotun karbon nano tüp ile modifiye edilmesini esas almıştır. Sensörde kullanılan karbon nano tüp elektrokimyasal sinyali ve hassaslığı ve seçiciliği yaygın spektrometrik metotlara göre oldukça fazla artırmıştır. Geliştirilen sensör, lakkaz aktivitesi ve biyokütle arasındaki ilişkiye göre *Penicillium simplicissimum* un hızlı bir şekilde tayini için kullanılabilir (Liu ve ark. 2008).

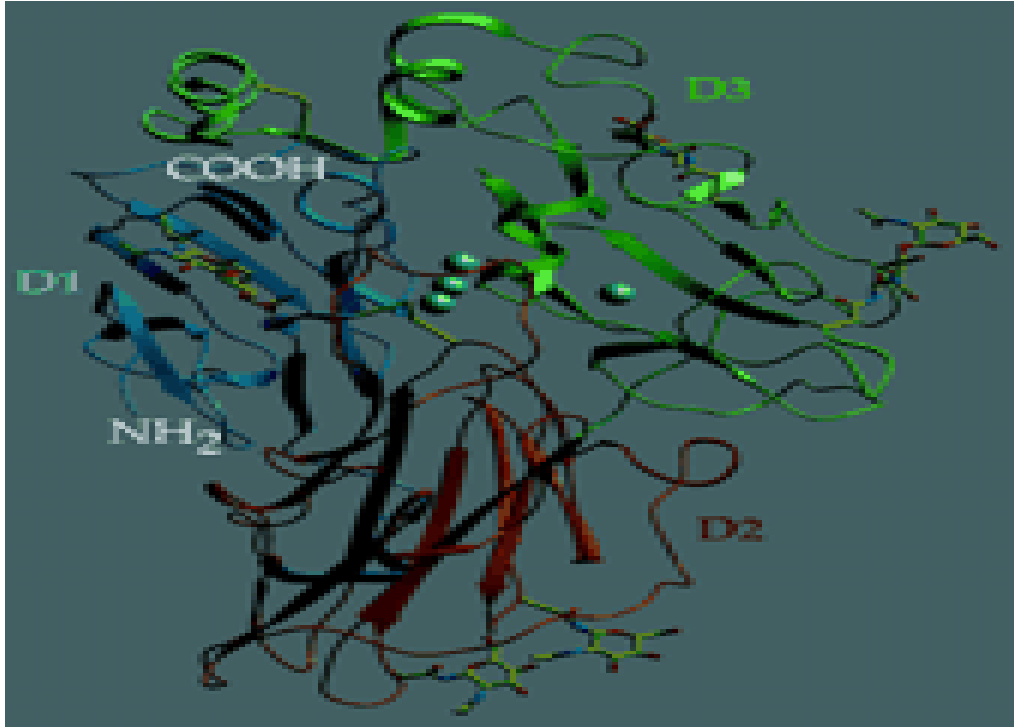
2.8. Lakkaz Enziminin Özellikleri Ve Kullanım Alanları

Lakkaz (EC 1.10.3.2) çoklu bakır proteinlerine sahip mavi oksidaz enzimleri sınıfına girmektedir. Lakkaz enzimi birçok aromatik bileşiği oksijenin suya indirgenmesi sonucunda yükseltgeyebilir. Bu enzim oldukça geniş substrat spesifikliğine sahiptir. Lakkaz enziminin yapısında bulunan bakır merkezleri bu bakırların spektroskopik özelliklerine üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar T1, T2 ve T3 olarak isimlendirilmiştir. T1, mavi bakır 605 nm de absorpsiyon bandı verir ve elektron paramagnetik rezonans (EPR) yöntemi ile ölçülebilir. T2, UV-Vis bölgede absorpsiyon bandı yoktur ve elektron paramagnetik rezonans (EPR) yöntemi ile ölçülebilir. T3 ise binükleer bakır merkezine sahip olup 330 nm de absorpsiyon bandı verir ve EPR ile ölçülemez (Solomon et al., 1996). Bu bakır merkezleri aynı zamanda enzimin aktif merkezleridir ve yüzeye yakın yerlerde bulunur. Lakkaz enziminde elde edildiği kaynağa göre moleküler ağırlık 50–140 kDa arasında değişiklik göstermektedir. Farklı kaynaklardan elde edilen lakkaz enzimi için temel biyokimyasal özellikler Çizelge 2.3’de verilmiştir. Lakkaz enziminin sınırlı sayıda türünün dörtlü yapısı aydınlatılmıştır (*Coprinus cinereus*, *Melanocarpus albomyces*, *Pycnoporus cinnabarinus*, and *Trametes versicolor*).

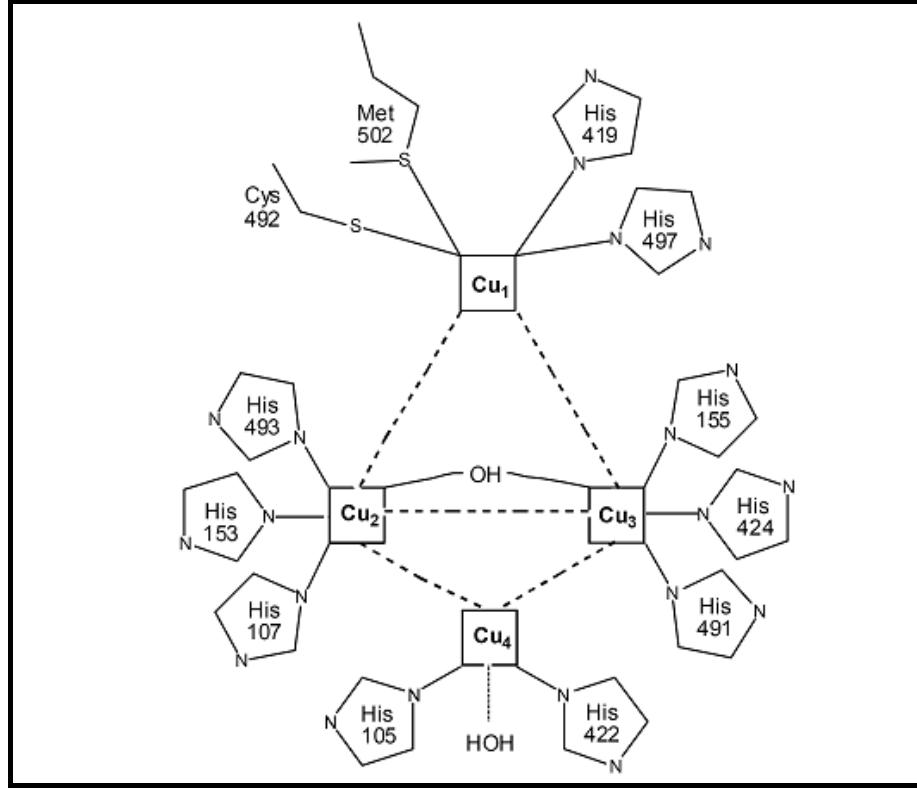
Çizelge 2.3. Farklı kaynaklardan elde edilen lakkaz enzimi için temel biyokimyasal özellikler

Lakkaz	MW, (kDa)	Aktivite, (units)	pI	pH (optimum)	Karbonhidrat İçeriği (%)
<i>Trametes ochracea</i>	60	370	4.6	4.9	10
<i>Trametes hirsuta</i>	69	350	4.05	4.5	12
<i>Cerrena maxima</i>	57	340	3.50	4.5	13
<i>Coriolisimus fulvocinerea</i>	54	350	3.50	5.2	32

Lakkazlar genellikle bir tane T1, bir tane T2 ve iki tane T3 olmak üzere dört tane bakır iyonu içerirler. Bakır molekülleri genellikle histidin, sistein kalıntıları ile koordine bağ yaparlar. T2 ve T3 bakır merkezleri oksijenin suya indirgenmesi sırasında trinükleer bakır kümesi oluştururlar. T1 bakır merkezi indirgenen substratların yükseltgenmesi reaksiyonunu içerir. Bu sırada oluşan elektronlar tekrar T2 ve T3 bakır merkezlerine transfer edilir (Call and Mücke, 1997). Lakkaz enziminin kristal yapısı Şekil 2.7’de ve enzimde bulunan bakır merkezleri Şekil 2.8’de verilmiştir.



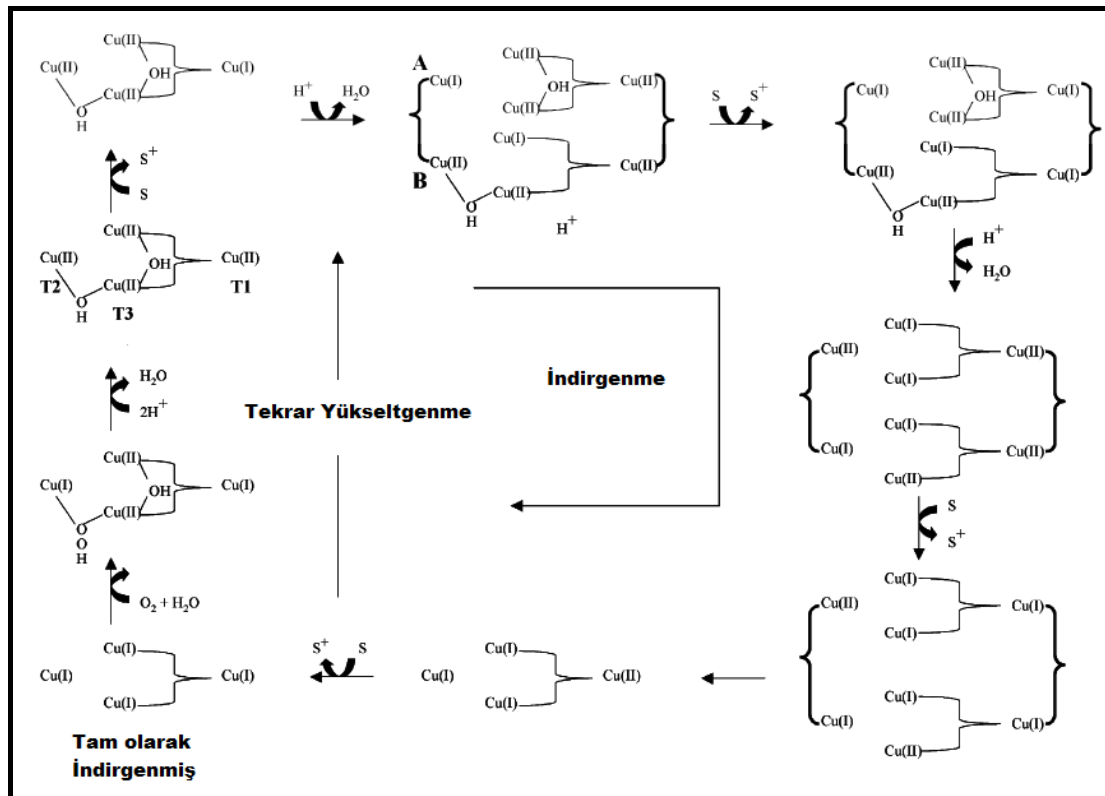
Şekil 2.7. Lakkaz enziminin kristal yapısı (*Trametes Versicolor*).



Şekil 2.8. Lakkaz enziminde bulunan bakır merkezleri.

Lakkazlar oldukça geniş substrat seçiciliğine sahiptir. Lakkazlar için K_m değerleri onların organik substratlarına nazaran oldukça geniştir. Bu aralık 1-10 mM arasında değişir. Bu sonuç yükseltgenmenin aktif merkezin dışında meydana geldiğinin işaretidir (Blingy and Douce, 1983, Xu et al., 1996, Peisach and Levine 1965).

Lakkaz enziminde basit organik substratların oksidasyonu “ping-pong” tipi mekanizma ile gerçekleşmektedir. Substrat mononükleer merkezin yakınında okside olur ve elektronlar trinükleer merkeze transfer edilir (Andreasson and Reinhammar, 1979, Reinhammar, 1981, McGuirl and Dooley, 1999, Wong and Yu, 1999). Elektron transferi sırasında moleküler oksijen suya indirgenir. Günümüzde ne electron transfer mekanizması ne de oksijenin suya indirgenme mekanizması tam olarak çözülmemiştir. Buna rağmen bilim adamları tarafından çeşitli muhtemel mekanizmalar açıklamıştır. Şekil 2.9’da lakkaz enziminin muhtemel katalitik döngüsünün mekanizmasına örnek verilmiştir.



Şekil 2.9. Lakkaz enziminin muhtemel katalitik döngüsünün kimyasal mekanizması.

Lakkaz enzimi oldukça fazla uygulama alanı olan bir enzimdir. Organik sentez (Huang ve ark., 1995, Fritz-Langhals ve Kunath, 1998, Setti ve ark., 1999, Uchida ve ark., 2001, Uyama ve Kobayashi, 2002, Akta ve Tanyolaç, 2003), renk giderimi (Reyes ve ark., 1999, Abadulla ve ark., 2000, Campos ve ark., 2001, Claus ve ark., 2002, Arias ve ark., 2003, Hou ve ark., 2004, Palmieri ve ark., 2005, Rodrigues Couto ve ark., 2006), ksenobiotiklerin yıkımı (Böhmer ve ark., 1988, Picard ve ark., 1999, Lante ve ark., 2000, Cho ve ark., 2002, Kulys ve ark., 2003, Zavarzina ve ark., 2004), atıksu arıtımı (Calvo ve ark., 1998, D'Annibale ve ark., 2000, Tsiouplus ve ark., 2002, Xiao ve ark., 2003, Durante ve ark., 2004), kağıt hamurunda (Jacop ve ark., 1999, Tamminen ve ark., 2003), yiyecek endüstrisi (Huang ve ark., 1995, Mathiasen ve ark., 1996, Kuuva ve ark., 2003, Georis ve ark., 2003) gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Lakkaz enzimi bu alanların dışında biyosensörlerde de biyolojik ajan olarak oldukça fazla kullanılmaktadır (Gardiol ve ark., 1996, Lisdat ve ark., 1997, Leech ve Daigle, 1998, Bauer ve ark., 1999, Palmore ve Kim, 1999, Kuznetsov ve ark., 2001, Freire ve ark., 2002, Haghighi ve ark., 2003, Gomes ve ark., 2004, Roy ve ark., 2005).

Lakkaz enzimi oksidoredüktaz bir enzim olarak özellikle fenoller gibi aromatik bileşiklerin oksidasyonunu moleküler oksijeni suya indirgererek katalizler (Karam ve Nicell, 1997, Gianfreda ve Bollag, 1997, Thurston, 1994).

2.8.1. Fenol Biyosensörlerine Örnekler

Amperometrik biyosensörlerde analizi yapılacak reaktantın yükseltgenme veya indirgenmesi sonucu oluşan ve genellikle sabit potansiyeldeki akım ölçülür. Amperometrik biyosensör sabit voltaj altında çalışan elektrokimyasal hücreden ibarettir. Bu biyosensör sisteminde oluşan akım miktarı moleküllerin elektrot yüzeyine difüzyon hızına dolayısıyla çözelti içindeki konsantrasyonuna bağlıdır. Amperometrik biyosensörlerin işleyişine etki eden en önemli faktör, moleküllerin indirgenme veya yükseltgenmesi sırasındaki, çoğunlukla iletken polimer veya aracı içeren elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferidir.

Kubota ve çalışma grubu klasik metotları kullanarak (adsorbsiyon, glutaraldehit, karbodiimit, glutaraldehit/karbodiimit) lakkaz enzimini karbon fiber elektrot üzerine immonilize etmişlerdir. En yüksek biyosensör cevabı glutaraldehit/karbodiimit ile yapılmış immobilizasyonda elde edilmiştir. Bu metotta glutaraldehit miktarının biyosensör hassaslığı üzerine etkisi incelenmiş ve en iyi sonuç 10 % (w/v) glutaraldehitte elde edilmiştir. Geliştirilen biyosensör için optimum pH 5.0 ve çalışma potansiyeli -100 mV tur. Ayrıca biyosensör iki ay süreyle kararlı kalabilmektedir (Kubota ve ark., 2001).

Kulys ve çalışma grubu recombinant fungal laccase Polyporus pinsitus (rPpL) ve Myceliophthora thermophila kullanarak grafit ve printed grafit elektrodu temel alan biyosensör geliştirmişlerdir. Enzim bovin serum albümini ve glutaraldehit kullanılarak pH 5,5 ve 0,1 V immobilize edilmiştir. Grafit elektrot temel alan biyosensör için pyrokateckhol substrat olarak kullanılmıştır. hazırlanan biyosensör için hassaslık 3.8 mA/M olarak bulunmuştur. Hassaslık Polyporus pinsitus (rPpL) miktarı arttığı zaman 4 A/M kadar artmaktadır. Biyosensör için hassaslık 9 gün süre zarfında çok az değişiklik göstermekte fakat süre çok arttığı zaman düşmektedir. Geliştirilen biyosensör aynı zamanda 1-naphthol, o-phenylenediamine, guaiacol,

oanizidine, benzidine içinde uygulama yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar recombinant laccases enziminin fenol ve türevleri için biyosensör uygulamalarında kullanılabileceğini göstermiştir (Kullys ve Vidziunaite., 2003).

Haghighi ve çalışma grubu spektrografik grafit elektrot üzerine *Trametes versicolor* türünden elde edilen laccase enzimi adsorbsiyon yöntemi ile tutuklamışlardır. Laccase modifiye edilmiş grafit elektrot fenolik bileşiklerin tespiti amacıyla sürekli akış hücresinde çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır. bu amaçla katekolün biyoelektrokimyasal ölçümü için deneysel şartlar optimize edilmiştir. Geliştirilen biyosensör için optimum şartlar 0,1 M pH 5 sitrat tamponunda akış hızı 0,51 mL/dakika ve -50 mV olarak bulunmuştur. Bulunan optimum koşullarda *Coriolus hirsutus* türünden elde edilen laccase kullanılarak yeni bir elektrot hazırlanmıştır. Hazırlanan bu elektrotla elde edilen sonuçlar fenolik türler *Phanerochaete chrysosporium* türünden elde edilen cellobiose dehydrogenase (CDH) ve horseradish peroxidase (HRP)enzimi kullanılarak hazırlanan biyosensör sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Bunun yanında *Trametes versicolor* türünden elde edilen laccase enzimi ile hazırlanan biyosensör, *Coriolus hirsutus* dan elde edilen laccase ile hazırlanan biyosensöre göre daha iyi sonuçlar vermiştir (Haghighi ve ark., 2003).

Gupta ve çalışma grubu *Rhus vernicifera* ve *Coriolus hirsutus* gibi iki farklı kaynaktan elde ettikleri laccase enzimini kullanarak katekol için yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir. Laccase enzimi glutaraldehit kullanılarak tiyol monotabakası oluşturulmuş altın yüzeyde immobilize edilmiştir. Farklı tiyol monotabakaları araştırılmış bunlardan cystamine kullanıldığı zaman elektrodun kararlılık, hassaslık ve tekrarlanabilirliğinin daha iyi olduğu görülmüştür. Lakkaz enziminin elektrot yüzeyine kovalent bağla bağlanması ile elde edilen enzim elektrodu katekol için 1-400 μ M arasında doğrusal çalışma aralığına sahiptir. Hazırlanan elektrot buzdolabında -20 °C saklandığı zaman aktivite kaybetmeden 1 ay oldukça iyi kararlılık göstermiştir (Gupta ve ark., 2003).

Bir başka çalışmada çeşitli kaynaklardan elde edilen laccase enzimi (*Rhus vernicifera*, *Agaricus bisporus*, *Trametes versicolor*) ile biyosensörler hazırlanmıştır. *Rigidoporus lignosus* kaynaklı laccase enziminin 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonic asit) (ABTS) ve syringaldazine en iyi akım cevabını

verdiği görülmüştür. 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonic asit) (ABTS) ve syringaldazine zeytinyağı atıksularında bulunan tipik fenol türevleridir. Rigidoporus lignosus kaynaklı laccase enzimi 3-merkaptoproponik asit ile monota baka oluşturulmuş altın yüzeye karbo diimit kullanılarak tutuklanmıştır. Aynı enzim glassy karbon elektrotla sürekli sistemde kullanılmıştır. Kullanılan 140 ng/cm^2 tutuklanmış enzim miktarına rağmen hazırlanan biyosensor 1,4-hidrokinon substratına karşı $3 \text{ nA/}\mu\text{M}$ hassaslık göstermiştir. Hazırlanan biyosensörün yarı ömrü 35 gündür. Geliştirilen bu biyosensör ile Avrupa Birliği limitleri için öngörülen mikromolar aralığında fenol ölçmek mümkündür. Ayrıca bu biyosensörle yağ atıksularını birkaç dakika sodyum bor hidrür ile inkübe etmek gibi küçük bir ön işlem uygulanarak yağ atıksularındaki düşük konsantrasyondaki fenolik bileşikler başarılı bir şekilde ölçülebilir (Vianello ve ark., 2004).

Quan ve çalışma grubu DeniLitee den elde edilen lakkaz enzimini silan modifiye edilmiş Pt elektrot yüzeyine tutuklayarak yeni bir enzim elektrodu geliştirmişlerdir. 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline- 6-sulfonik asit), diammonium tuzu (ABTS), p-fenilen diamin (PPD) ve p-aminofenol (PAP) model susbtrat olarak seçilmiştir. Ölçüm esası substratın enzimatik oksidasyonu temeline dayanmaktadır. ABST, PPD ve PAP için hassaslıklar sırasıyla 75, 330 ve 385 $\text{nA/}\mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Doğrusal çalışma aralıkları ise 0.12–22 μM arasında bulunmuştur. Tespit sınırı ise (S/N 3) PPD için 45 nM PAP için ise 40 nM olarak bulunmuştur. Hazırlanan elektrot için kararlılık 2 haftadır. Bu süre zarfında elektrot başlangıç aktivitesinin % 80 korumuştur (Quan ve ark., 2004).

Bir başka çalışmada Laccase Coriolus Versicolor immobilize edilmiş polieter sülfone membranı esas alan biyosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör caffeic asit, gallic asit, catechin, rutin, trans-resveratrol, quercetin and malvidin gibi birçok fenol türevinin tespiti için kullanılmıştır. % 12 etanol içeren ph 4,5 olan asetat tamponunda geliştirilen amperometrik ölçümler katekhin için +100 mV, kafeik asit için -50 mV'da gerçekleştirilmiştir. Ph 3,5 ve +100 mV biyosensör her iki substrat için de hassastır. Biyosensör eşit miktarda Kafeik asit ve catechin içeren çözelti ilavesi ile 1.10^{-6} M tespit sınırı, $2.0 - 14.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ arasında doğrusal çalışma aralığı, (0.0566 mA/M) hassaslık ve (R.S.D. < 10%) tekrarlanabilirliğe sahiptir. Aynı optimum koşullarda diğer polifenol türevleri içinde biyosensör test edilmiş fakat

biyosensör cevap vermemiştir. Geliştirilen biyosensörün kırmızı şarap numunelerinde denenmesi için numunede bulunan polifenollerin öncelikle katı faz ekstraksiyonu ile zenginleştirilmesi gerekmektedir. Standart ekleme metodu kullanılarak kırmızı şarapta bulunan polifenoller için yapılan uygulamada oldukça fazla girişim yapabilecek tür bulunmaktadır. Biyosensör şarap ekstraktlarında 100 mV kullanıldığı zaman indirgenme akımı $-0,33 \pm 0,03$ nA ölçülmüştür (Gomesa ve ark., 2004).

Osmium redoks polimeri ve laccase enziminin glassy karbon elektrot üzerine immobilizasyonuna dayanan enzim elektrodu ile dopamine, epinephrine ve norepinephrine nanomolar düzeyde ölçülmüştür. Hazırlanan elektrotla dopamin 4 nM kadar düşük bir seviyede tespit edilmiştir. Geliştirilen biyosensör ile $-0,2$ V çalışıldığından gürültü ve girişim etkisi azalmıştır. Ayrıca bu biyosensör katekolaminlere karşı askorbik asit varlığında bile mükemmel bir seçicilik göstermiştir. Fakat geliştirilen biyosensörle dopamine, epinephrine ve norepinephrine için akım cevabı farklılıkları tespit etmek mümkün olmamıştır. Lakkaz enzimini temel alan elektrokimyasal yöntemlerle gelecekte katekolamin tespiti ve izlemesi mümkün olabilir (Ferry ve Leech, 2005).

Grafit elektrot üzerine *Cerrena unicolor* türünden elde edilen laccase enzimi modifiye edilerek hazırlanan biyosensör 30 farklı yapıdaki fenolik türün tespiti için kullanılmıştır. Hazırlanan biyosensörün substrat yapılarına göre verdiği farklı akım cevapları için sınıflandırma yapılmıştır. Örneğin 2,6-dimethoxyphenol, coniferyl alcohol, caffeic asit, DOPAC ve hydroquinone gibi substratlara nanomolar seviyede ölçüm yapılırken, ferulic asit, syringic asit, dopamine, 3,4-dihydroxybenzoic asit ve noradrenaline mikromolar seviyede ölçülmüştür. Fenol ve 4-hydroxybenzaldehyde ise milimolar konsantrasyonda ölçüm yapılmıştır. Aynı zamanda orto ve para konumundaki fenoller için hassaslık $-H$, $-CH_3$, $-OH$, $-OCH_3$ ve $-NH_3^+$ gibi grupların varlığı ile artmıştır. Lakkaz elektrodu için hassaslık aynı zamanda para konumundaki fenoller için ilave $-OH$ grubu ilavesi ile artış göstermiştir. Seçilen fenolik türler için elde edilen sonuçlar sürekli akış hücresinde elde edilen sonuçlarla kıyaslanmıştır (Wilkolazkaa ve ark., 2005).

Mena ve çalışma grubu N-succinimidyl-3-thiopropionate (NSTP) modifiye edilmiş altın elektrot üzerine lakkaz enzimini tutuklayarak bir biyosensör geliştirmişlerdir. N-succinimidyl ile oluşturulan monotabakanın hazırlanması iki farklı yöntemle yapılmıştır. Birincisinde aktivasyon 3-mercaptopropionic asit (MPA) ın 1-(3-dimethylaminopropyl)- 3-ethylcarbodiimide (EDC) ve N-hydroxysulfosuccinimide ile reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. İkinci yöntemde ise dithiobisuccinimidyl propionate (DTSP) kullanılmıştır. N-succinimidyl-3-thiopropionate ile modifiye edilmiş elektrotlar dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi yöntemi kullanılarak karakterize edilmiştir. Biyosensörün hazırlanmasında enzimin modifiye yüzeye glutaraldehit kullanılarak kovalent bağ ile bağlanması sağlanmıştır. Çalışmalarda kafeik asit model substrat olarak kullanılmıştır. En iyi analitik performans ikinci yöntemde yapılan modifikasyon işleminde elde edilmiştir. Enzim miktarı, pH, potansiyel vb. gibi çeşitli deneysel parametrelerin amperometrik ölçüm üzerine etkileri incelenmiştir. Sekiz farklı fenolik tür için kalibrasyon eğrileri çıkarılmıştır. Tespit sınırı caffeic asit, catechol ve 3,4-dihydroxyphenylacetic asit (DOPAC) için sırasıyla 0.07 mM, 0.05 mM ve 0.09 mM olarak bulunmuştur (Mena ve ark., 2005).

Çapraz bağlı enzim kristalleri (CLEC) çokyönlü biyokatalist özellikleri yanında aynı zamanda biyosensör uygulamalarında da kullanılmaktadır. *Trametes versicolor* türünden elde edilen laccase cyclodextrin kullanılarak kristalize edilip, çapraz bağlanmış ve liyofilize edilmiştir. CLEC laccase enziminin 2-amino phenol, guaiacol, catechol, pyrogallol, catechin and ABTS (fenolik olmayan) türlere karşı oldukça aktif olduğu görülmüştür. CLEC laccase enzimi 30% polyvinylpropylidone (PVP) gel içerisine gömülerek sensör oluşturulmuştur. Hazırlanan biyosensörle fenoller 50–1000 μ M seviyesinde ölçülebilmektedir. Düşük molekül ağırlığına sahip 2-amino phenol, catechol and pyrogallol gibi fenolik türler oldukça kısa cevap süresine sahip olduğu görülmüştür. Buna karşın catechin ve ABTS gibi büyük molekül ağırlığına sahip bileşilerdeki cevap süresi diğerlerine nazaran daha uzun olduğu görülmüştür. Biyosensör ölçümleri için optimum pH katekol substrat olarak kullanıldığında 5,5–6 olarak bulunmuştur. Biyosensör 3 aydan daha fazla süre oldukça iyi aktivite göstermiştir (Jegan Roya ve ark., 2005).

Bir diğerk çalışmada laccase enzimin temel alan üç farklı grafit biyosensörünün fenolik türlerle kirlenmiş endüstriyel sulardaki davranışını çalışılmıştır. Çalışmada katekol model substrat olarak kullanılmıştır. *Trametes versicolor* türüne sahip lakkaz enziminin elektrot üzerine immobilizasyonu üç farklı şekilde yapılmıştır. Birinci tipte adsorbsiyon ile tutuklama kullanılırken diğerk iki tipte enzim yüzeyde oluşturulan karboksil grupları sayesinde kovalent bağ ile bağlanmıştır. Kovalent bağ ile yüzeye enzim tutuklamada sırasıyla hexamethylenediamine ve glutaraldehyde bağlayıcı ajan olarak kullanılmıştır. Her bir biyosensör için doğrusal çalışma aralığı hassaslık ve kararlık araştırılmıştır. Hazırlanan biyosensörler içinde tutuklama yönteminde carbodiimide ile muamele ettikten sonra hexamethylenediamine ile muamale edilip daha sonra GA çözeltisinde bekletildikten sonra enzim tutuklanan elektrodun en iyi elektrokimyasal cevabını verdiği görülmüştür (Portaccio ve ark., 2006).

Vianello ve çalışma grubu *Rigidoporus lignosus* kaynaklı laccase enzimini kullanarak bir biosensor yapmışlardır. Lakkaz enzimi karbodimit kullanılarak hidrofobik yüzeye tutuklanmış olarak kullanılmıştır. Hazırlanan biosensor fenol ve türevlerine nanomolar seviyelerde cevap vermiştir. Hazırlanan biyosensör için hassaslık 100 nA/ μ M olarak bulunmuştur. Hazırlanan biyosensör ile zeytinyağı atıksularında bulunan fenolik bileşikler herhangi bir ön işlem yapılmaksızın ölçülebilir (Vianello ve ark., 2006).

Tiyol modifiye edilmiş altın elektrot ile çıplak altın elektrot arasındaki elektron transferi farklı kaynaklardan elde edilen laccase enzimi kullanılarak araştırılmıştır. *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea* ve *Cerrena* türünden elde edilen laccase enzimi aktivitesi aerobik ve anerobik şartlarda dönüşümlü voltametri ve spektroeletrokimya yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Oksijen aminotiyo fenol ile modifiye edilmiş altın elektrot üzerine *T. hirsuta* lakkaz immobilize edilmiş elektrotta +0,625 mV indirgenmeye başlamıştır. Lakkaz immobilize edilmiş altın elektrotta oksijenin indirgenmesi sonucu oluşan ürünlerden birinin hidrojen peroksit olduğu görülmüştür (Pita ve ark., 2006).

Bryjak ve çalışma grubu bütül akrilat ve etilen glikol dimetakrilat kopolimeri üzerine kovalent bağ ile lakkaz enzimini (*Cerrena unicolor*) immobilize etmişlerdir.

Hazırlanan kopolimer : $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, ve $-\text{COOH}$ gibi üç farklı tür gruba sahiptir. Bu üç farklı grubu aktive etmek için üç farklı prosedür uygulanmıştır. Aktivasyon için sırasıyla glutaraldehit, divilsülfone ve karbodimit kullanılmıştır. Yapılan aktivasyon sonucunda lakkaz enziminin glutaraldehit ile bağlanması sonucu hazırlanması sonucunda oldukça yüksek aktivite ve kararlılık elde edilmiştir. Aynı zamanda glutaraldehit ile bağlama prosedürüne pH, iyonik kuvvet, protein konsantrasyonu gibi parametrelerin etkisi incelenmiştir (Bryjak ve ark., 2007).

Mausty ve çalışma grubu çözünmüş oksijen tespiti için yeni bir amperometrik sistem geliştirmişlerdir. Geliştirilen sistem enzim inhibitörleri olarak bilinen anyonik toksik bileşiklerin tespiti için uygulanmıştır. Hazırlanan biyosensör laccase enzimi (*Trametes versicolor*) ve $[\text{Zn}-\text{Cr}-\text{ABTS}]$ nin glassy karbon elektrot üzerine birlikte immobilizasyonu temeline dayanmaktadır. Elektrokimyasal basamak oksijenin 0,2 V ta ve 2,2 -azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic asit) (ABTS) mediator olarak kullanıldığı ortamda elektrokatalik olarak indirgenmesi ile ilgilidir. Bu tip cihazlar 6×10^{-8} ve 4×10^{-6} M arasında çözünmüş oksijen için hassas ve hızlı cevap sağlamaktadır. Bunun yanı sıra azide (5.5 nM), fluoride (6.9 nM) ve cyanide (6.2 nM) gibi oldukça düşük tespit sınırına sahiptirler (Mousty ve ark., 2007).

Zhang ve çalışma grubu ($\text{Fe}_3\text{O}_4-\text{SiO}_2$) nanopartikülleri ile yüzeyi modifiye ederek ve modifiye yüzeyde laccase enzimini kullanarak kompost ekstraktlarında bulunan hidrokinon konsantrasyonunu tespit etmek için bir hidrokinon biyosensörü geliştirmişlerdir. Laccase enzimi magnetik nanopartiküller üzerine glutaraldehit kullanılarak immobilize edilmiştir. Enzim immobilize edilmiş bu bio-nanopartikül çözeltisi karbon paste elektrot yüzeyine damlatıp kurutularak hidrokinon ölçümü için kullanıma hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan elektrotla hidrokinon için lineer çalışma aralığı 1×10^{-7} M ile 1.375×10^{-4} M arasında olup tespit sınırı 1.5×10^{-8} M olarak bulunmuştur. Hidrokinon ilavesi ile ölçülen akım 60 saniyede kararlı hal değerine ulaşmaktadır. Kompost ekstraktlarda bulunan hidrokinon ölçümü için geliştirilen biyosensörle alınan sonuçlar HPLC sonuçları ile yaklaşık aynıdır (Zhang ve ark., 2007).

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Deneysel Ekipmanlar

3.1.1. Kullanılan Elektrotlar

Elektrokimyasal deneylerde çalışma elektrodu olarak 2 mm ϕ ında glassy carbont disk elektrot (2 mm), karşılaştırma elektrodu olarak Ag/AgCl (3M NaCl) elektrot ve karşıt elektrot olarak Pt ϕ ubuk elektrot kullanıldı. Glassy karbon elektrot her elektrokimyasal çalışmadan önce 0.3 ve 0.05 mm alümina tozu düzgün bir yüzey üzerinde parlatıldı. Bu elektrot daha sonra sırasıyla destile su ve çalışılacak ϕ özücü ile yıkanıp kurutulduktan sonra kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Aletler

Çalışmalarda potansiyostat olarak bilgisayar kontrollü CHI 842 B Electrochemical Analyzer kullanılmıştır. Oksijen Tüpü Habaş (% 99,99 saflıkta) temin edilmiştir.

3.1.3. Elektrokimyasal Hücre

Elektrokimyasal çalışmalar beş girişli cam hücrede yapılmıştır. Beş girişin üç tanesine; glassy karbon çalışma elektrodu, Pt karşıt elektrodu ve karşılaştırma elektrodu yerleştirildi. Diğer iki girişten birine gaz giriş borusu, diğerine ise gaz çıkış musluğu takıldı.



Şekil 3.1. Elektrokimyasal çalışmaların yapıldığı hücre.

3.2. Kullanılan Deneysel Teknikler

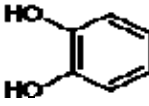
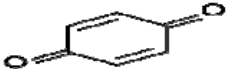
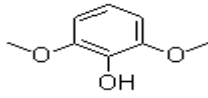
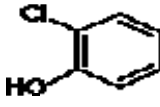
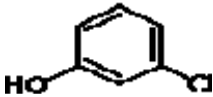
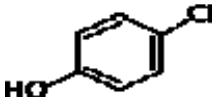
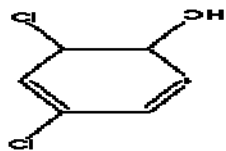
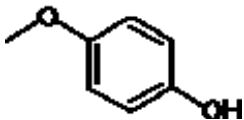
3.2.1. Enzim Çözeltilerinin (TvLac ve HRP) Hazırlanması

Gerekli miktardaki lakkaz enzimi (E.C. 1.1.302, Sigma from Trametes versicolor) ve horse radish peroksidaz (HRP) (E.C. 1.11.18.1), 1.00 mL saf su çözeltisinde çözülmüştür. Enzim çözeltisi her çalışmadan önce taze olarak hazırlanmıştır.

3.2.2. Fenol çözeltisinin hazırlanması

Fenol ve diğer fenolik türlerin (Merck) çözeltisi konsantrasyonu 0,5 mM olacak şekilde saf su ile hazırlanmış ve kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında saklanmıştır. Çalışmalarda kullanılan fenol türevleri ve kimyasal yapıları Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan fenol türevleri ve kimyasal yapıları

Kimyasalın adı	Molekül ağırlığı	Kimyasal yapı
Fenol	94,11	
Katekol	110,11	
Benzokinon	108,1	
2-6 dimetoksifenol	154,17	
2-Kloro fenol	128,6	
3- Kloro fenol	128,56	
4- Kloro fenol	128,55	
Hidrokinon	110,1	
2-4 Dikloro fenol	163	
4 Metoksi fenol	124,139	

3.2.3. Karbon nanotüp çözeltisinin hazırlanması

Çözünebilir karbon nano tüp asit yükseltgenme metodu ile yapılmıştır (Liu et al., 1998). Öncelikle 14 mg multi valled karbon nano tüp 9:1 oranında H_2SO_4/H_2O_2 (30 %) içeren 5 mL çözelti içine katılmıştır. Bu karışım karbon nanotüpün yükseltgenmesi için 30 dakika karıştırılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışıma 15 mL (9:1) oranında H_2SO_4/H_2O_2 (30 %) içeren çözelti katılmıştır. Bu karışım ultrasonik banyoya yerleştirilerek 5 dakika sonikasyon işlemine tabii tutulmuştur. Oluşan CNT karışımı 1 litre saf su ile seyreltilmiş ve 0.45 mikronluk selüloz membran kullanılarak süzölmüştür. Daha sonra elde edilen filtrat 10 mM NaOH çözeltisi kullanılarak yıkanmıştır. Yıkanan filtrat pH 7 oluncaya kadar saf su ile yıkanmıştır. Sonuçta homojen bir CNT çözeltisi elde etmek için çözelti 2 dakika sonikasyon yapılmıştır (Zhao et al., 2002).

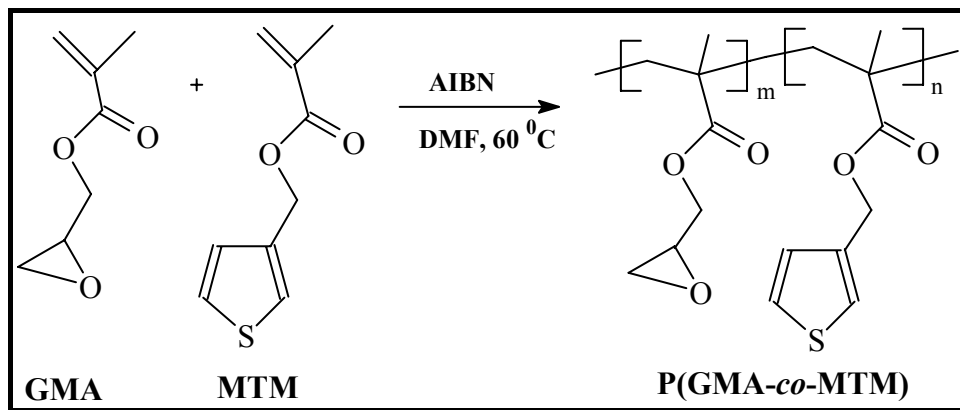
3.2.4. Poly(*GMA-co-MTM*) sentezi

3-Metiltiyenil Metakrilat'ın Sentezi: 3-Tiyofen metanol (5,7 g, 50 mmol), 7,3 g kuru trietilamin ve az miktarda CuCl 35 mL kuru dietileter'de çözüldü. Karışıma 35 mL kuru dietileter'de çözülmüş distile metakriloil klorür (5,35 g, 51 mmol) damlatma hunisi ile 0 °C 'de yavaşça ilave edildi. Karışım 2 saat boyunca karıştırıldı. Trietilamonyum klorür silika jel kolonda filtre edildi. Çözücü buharlaştırıldıktan sonra karışım diklorometan ve 2 M NaOH'ın 1:1 karışımında gece boyunca karıştırıldı. Organik tabaka damıtma hunisinde ayrıldı, suyla iki kez yıkandı ve $CaCl_2$ 'de kurutuldu. Çözücü buharlaştırıldıktan sonra ürün vakum distilasyonu ile elde edildi (Yılmaz ve ark., 2004, Yılmaz ve ark., 2005). Yan grubunda tiyofen içeren 3-thienylmethylemethacrylate (MTM) monomeri yukarıda anlatıldığı gibi sentezlenmiştir. Belirli miktardaki 3-thienylmethylemethacrylate (MTM), glycidyl methacrylate (GMA), dimetilformaldehit (DMF) ve α,α' -azobisisobutyronitrile (AIBN) (toplam monomer kütlesinin %1 olacak şekilde) pyrex tüp içine konulmuştur. Tüpteki bu karışımdan 10 dakika argon gazı geçirilerek oksijensizleştirilmiştir. Sıkıca kapatılan tüp 60 °C lik yağ banyosuna konulmuştur. Reaksiyon tamamlandıktan sonra kopolimer metanol içinde çökmesi sağlanmış ve daha sonra süzölmüştür. Birkaç kez diklormetanda çözme ve metil alkolde çöktürme

işlemleri tekrarlanmıştır. Elde edilen çökelek süzülerek ayrılmış ve vakum etüvünde 24 saat kurutulmuştur. Sentez sırasında kopolimer içindeki 3-thienylmethacrylate (MTM) oranları ve glycidyl methacrylate (GMA) oranları farklı alınarak üç farklı kopolimer hazırlanmıştır. Bunlar sırasıyla 30% MTM–70% GMA, 44% MTM–56% GMA, 85% MTM–15% GMA şeklindedir. Sentez sırasında kopolimer içindeki 3-thienylmethacrylate (MTM) oranları ve glycidyl methacrylate (GMA) oranları farklı alınarak üç farklı kopolimer hazırlanmıştır. Bunlar sırasıyla 30% MTM–70%GMA, 44% MTM–56%GMA, 85% MTM–15%GMA şeklindedir. Çalışmalarımız sırasında kolaylık olması açısından;

- 30% 3-thienylmethacrylate ve 70% glycidyl methacrylate içeren kopolimer (*GMA-co-MTM*)₁
- 44% 3-thienylmethacrylate ve 56% glycidyl methacrylate içeren kopolimer (*GMA-co-MTM*)₂
- 85% 3-thienylmethacrylate ve 15% glycidyl methacrylate içeren kopolimer (*GMA-co-MTM*)₃ olarak tanımlanmıştır.

Elde edilen kopolimerin kimyasal yapısı Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2. (*GMA-co-MTM*) kopolimerinin sentezi

3.3. Biyosensörlerin Hazırlanması

Amperometrik fenol biyosensörünün geliştirilmesi için elektrotlar öncelikle iki farklı enzim (TvLac ve HRP) kullanılarak elektropolimerizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır.

Öncelikle glassy karbon elektrot (GC) 0.3 and 0.05µm lık alünina tozu ile parlatılarak saf su ile yıkanmıştır. Çalışma elektrodunun hazırlanmasında aşağıdaki prosedür takip edilmiştir. GC elektrot, 0.01 M pirol, 3.5 mg/mL sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 0.3 mg/mL horse radish peroksidaz (HRP) içeren 5mL of 100 mM pH 4.5 asetat tamponu içine alınarak 0-1.0 V potansiyel arasında elektrokimyasal olarak enzim yüzeye immobilize edilmiştir (GC/PPy-HRP). Daha sonra GC/PPy-HRP çalışma elektrodu tampon çözelti yıkanarak 4 °C buzdolabında saklanır.

Yine elektropolimerizasyon yöntemi kullanılarak lakkaz enzimi elektrot yüzeyine immobilize edilerek GC/PPy-TvLaC enzim elektrodu hazırlanmıştır.

Horse radish peroksidaz ve lakkaz enzimi ile elektropolimerizasyon yöntemi kullanılarak yapılan tutuklamadan sonra, bu çalışma kapsamında sentezlenmiş olan tiyofen esaslı iletken polimerler ve lakkaz enzimi kullanılarak dört farklı elektrot daha hazırlanmıştır. Aşağıda bu iletken polimerle hazırlanmış olan lakkaz enzimini temel alan enzim elektrotlarının hazırlanma prosedürleri detaylı olarak anlatılmıştır.

3.3.1.Glassy karbon elektrodu / poli (glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate) / Lakkaz enzimi ($GC / (GMA-co-MTM)_1 / TvLac$) Elektrodunun Hazırlanması (A Elektrodu)

Öncelikle glassy karbon (GC) elektrot üzerine konsantrasyonu belirli olan poli(glisin metakrilat-co-3-thienylmethacrylate) ($GMA-co-MTM$)₁ çözeltisinden 10 µL damlatılarak elektrot yüzeyine yayılır ve açık havada kurutulur. Oluşan $GC/(GMA-co-MTM)_1$ elektrodu 5 mL pH 5 olan sitrat tamponunda 1.0 V potansiyel altında 3 dakika aktive edilmiştir. Daha sonra bu elektrot enzim (TvLac) çözeltisine alınarak enzimin yüzeye fiziksel yolla immobilize olması sağlanmıştır. Çalışmalarımız boyunca bu elektrot $GC/(GMA-co-MTM)_1/TvLac$ şeklinde tanımlanmış ve kısaca A elektrodu olarak bahsedilmiştir.

3.3.2 Glassy karbon elektrodu / poli (glisin metakrilat-co-3-thienylmethylemethacrylate) / Lakkaz enzimi ($GC / (GMA-co-MTM)_2 / TvLac$) Elektrodunun Hazırlanması (B Elektrodu)

Glassy karbon (GC) elektrot üzerine konsantrasyonu belirli olan kopolimer ($GMA-co-MTM$)₂ çözeltisinden 10 µL damlatılarak elektrot yüzeyine yayılır ve açık havada kurutulur. Oluşan $GC/(GMA-co-MTM)_2$ elektrodu 5 mL pH 7 olan fosfat tamponunda 1.0 V potansiyel altında 3 dakika aktive edilmiştir. Daha sonra bu elektrot enzim (TvLac) çözeltisinde 2 saat bekletilerek enzimin yüzeye fiziksel yolla immobilize olması sağlanmıştır. Çalışmalarımız boyunca bu elektrot $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ şeklinde tanımlanmış ve kısaca B elektrodu olarak bahsedilmiştir.

3.3.3. Glassy karbon elektrodu / poli (glisin metakrilat-co-3-thienylmethylemethacrylate) / Lakkaz enzimi ($GC / (GMA-co-MTM)_3 / TvLac$) Elektrodunun Hazırlanması (C Elektrodu)

Glassy karbon (GC) elektrot üzerine konsantrasyonu belirli olan kopolimer ($GMA-co-MTM$)₃ çözeltisinden 10 µL damlatılarak elektrot yüzeyine yayılır ve açık havada kurutulur. Oluşan $GC/(GMA-co-MTM)_3$ elektrodu 5 mL pH 7 olan fosfat tamponunda 1.0 V potansiyel altında 3 dakika aktive edilmiştir. Daha sonra bu elektrot 2 mg/ mL enzim (TvLac) çözeltisinde iki saat bekletilerek enzimin yüzeye fiziksel yolla immobilize olması sağlanmıştır. Çalışmalarımız boyunca bu elektrot $GC/(GMA-co-MTM)_3/TvLac$ şeklinde tanımlanmış ve kısaca C elektrodu olarak bahsedilmiştir.

3.3.4. Glassy karbon elektrodu / poli (glisin metakrilat-co-3-thienylmethylemethacrylate) / Karbon Nanotüp / Lakkaz enzimi ($GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$) Elektrodunun Hazırlanması (D Elektrodu)

Karbon nanotüp (CNT), suda çözünmeyen bir yapıya sahiptir. CNT içeren elektropolimerizasyon ortamlarında CNT mutlaka suda çözünebilir halde olmalıdır.

CNT'nin suda çözünebilmesi için literatürde farklı oksidasyon basamakları kullanılmaktadır. CNT, Zhao ve arkadaşları (2002) tarafından geliştirilmiş asit oksidatif metodu ile modifiye edilerek bölüm 3.2.3'de anlatıldığı gibi suda çözünebilir bir yapıya dönüştürülmüştür.

Glassy karbon (GC) elektrot üzerine konsantrasyonu belirli olan kopolimer $(GMA-co-MTM)_2$ çözeltisinden 10 μ L damlatılarak elektrot yüzeyine yayılır ve açık havada kurutulur. Oluşan $GC/(GMA-co-MTM)_2$ elektrodu üzerine μ L karbon nanotüp çözeltisinden damlatılarak açık havada kurumaya bırakılır. Daha sonra $GC/(GMA-co-MTM)_2 /CNT$ 5 mL pH 7 olan fosfat tamponunda 1.0 V potansiyel altında 3 dakika aktive edilmiştir. Hazırlanan bu elektrot 2 mg/ mL enzim (TvLac) çözeltisine alınarak 2 saat bekletilerek enzimin yüzeye fiziksel yolla immobilize olması sağlanmıştır. Çalışmalarımız boyunca bu elektrot $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ şeklinde tanımlanmış ve kısaca D elektrodu olarak bahsedilmiştir.

3.4. Elektrot Aktivitesinin Belirlenmesi

Deneylerde çalışma elektrodu olarak daha önce hazırlanan enzim elektrotları kullanılmıştır. Karşıt elektrot olarak Pt levha, karşılaştırma elektrodu olarak ise Ag/AgCl elektrot kullanılmıştır.

Hücreye 5.0 mL tampon konularak çözeltiye sabit akış hızında oksijen gönderilip, böylece çözeltinin oksijence doygunluk derişimine ulaşması beklenmiştir. Çalışma voltajı ayarlanarak elektrot amperometrik olarak işleme alınmıştır.

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

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

3.5. Atıksu Numunelerinde Fenol Tayini

3.5.1. Standart Metot 5530-D Yöntemi Kullanılarak Fenol Tayini Yapılması

Ön işlem

Öncelikle gerçek atıksu numunesi girişim yapabilecek türlerin uzaklaştırılması için bir ön işleme tabii tutulur. Ön işlem aşağıda anlatıldığı gibi yapılmıştır. Tüm özelti ler fenolsüz ve klorsüz distile su ile hazırlanır. Sodyum hidroksit, NaOH, 2,5 N: 41,7 mL 6 N NaOH, 100 mL su ile seyreltilir veya 10 g. NaOH peletler 100 mL suda özdürölür. Distilasyon için Graham yoğunlaştırıcı (Corning No. 3360) - 1L borosilikat cam distilasyon aparatları, pH metre kullanılır. Fenol tayini ise řu şekilde gerçekleştirilir. Beher içerisine 500 mL numune alınır. Fosforik asit (H_3PO_4) (1+9) özeltisi ile pH metrede pH değeri yaklaşık olarak 4'e ayarlanır. Numune distilasyon balonuna alınır ve gerekli bağlantılar yapılır. Distilat 500 ml dereceli erlende toplanır. 450 ml distilat toplandıktan sonra distilasyon balonuna 50 ml sıcak saf su ilave edilir ve 500 ml distilat toplanıncaya kadar işleme devam edilir. Eğer numune distilasyondan sonra bulanık kalırsa ikinci bir distilasyon yapılır. İkinci distilasyon bulanık olduğunda arıtma: 500 ml orijinal numune aşağıdaki şekilde ekstrakte edilir. Numuneye 4 damla metil oranj indikatörü damlatılır ve 1 N H_2SO_4 ile asidik yapılır. Ayırma hunisine aktarılır ve 150 g NaCl eklenir. İlk porsiyonda 40 ml kloroform ($CHCl_3$) eklenerek çalkalanır. 4 kez daha 25 ml lik porsiyonlarda çalkalama yapılır. Kloroform fazı ikinci bir ayırma hunisine alınır. İkinci ayırma hunisine ilk porsiyonda 4 ml diğer 2 porsiyonda 3 ml 2.5 N NaOH eklenerek çalkalama yapılır. Bu üç işlem bir beherde toplanır ve su banyosunda kloroform uçuncaya kadar ısıtılır.

Soğuduktan sonra 500 ml'ye saf suyla seyreltilir. a ve b maddelerindeki gibi distilasyon işlemi yapılır.

Fenol Tayini (Fotometrik Metot.)

Distile olabilen fenolik bileşikler renkli antipirin boya oluşumu için potasyum ferrisiyanid varlığında, pH $7,9 \pm 0,1$ ' de 4 - aminoantipirin ile reaksiyona girer. Bu boya sulu çözeltide saklanır ve absorbands 500 nm' de ölçülür. Gerekli çözeltiler aşağıdaki gibidir.

Stok Fenol Çözeltisi: kaynatılmış ve soğutulmuş distile suda 100 mg fenol çözdürülür ve 100 mL' ye seyreltilir.

Ara Fenol Çözeltisi: 100 mL için kaynatılmış ve soğutulmuş distile suda 1 mL stok fenol çözeltisi seyreltilir. 1 mL= 10.0 µg fenol. Günlük hazırlanır.

Standart Fenol Çözeltisi: 500 mL için kaynatılmış ve soğutulmuş distile suda 50 mL ara fenol çözeltisi seyreltilir. 1 mL=1.0 µg fenol. Kullanımın 2 saati içerisinde hazırlanır.

Bromate - Bromid çözeltisi: 2,784 g. susuz KBrO_3 suda çözülür, 10 g. KBr kristali ilave edilir, çözülür ve 100 mL' ye seyreltilir.

Hidroklorik Asit, HCl, konst.

Standart Tiyosülfat Titrantı, 0,025M: 6,205 g. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ distile suda çözülür. 1,5 mL 6N NaOH ilave edilir, 1000 mL' ye seyreltilir. Bir iyodat çözeltisiyle standardize edilir.

Nişasta Çözeltisi: Hem sulu çözelti hem de çözünen nişasta toz karışım kullanılır. Sulu çözelti hazırlamak için 2 g. laboratuvar ölçekli çözünür nişasta ve koruyucu olarak 0,2 g. salisilik asit, 100 mL sıcak distile suda çözdürülür.

Amonyum Hidroksit, NH_4OH , 0,5N: 35 mL konsantre NH_4OH 1L' ye suyla seyreltilir.

Fosfat Stok Çözeltisi: 104,5 g. K_2HPO_4 ve 72,3 g. KH_2PO_4 suda çözdürülür ve 1L' ye seyreltilir. pH 6,8 olarak ayarlanmalıdır.

4 – Aminoantipirin Çözeltisi: 2 g. 4 – Aminoantipirin suda çözülür ve 100 mL' ye seyreltilir. Günlük hazırlanır.

Potasyum Ferrisiyanid Çözeltisi: 8 g. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ suda çözülür ve 100 mL' ye seyreltilir. Gerekli olursa filtreden geçirilir. Kahverengi cam şişelerde saklanır ve haftalık olarak hazırlanır.

Kloroform, CHCl_3 ,

Sodyum Sülfat, susuz Na_2SO_4 , granül

Potasyum İyodat, KI, kristal

Yukarıda belirtilen temizleme prosedürüne göre hazırlanmış numuneler kullanılması gerekmektedir. 100 mL distile olmuş veya 0,5 mg fenolden daha fazla fenol içermeyen bir oranda numune 250 mL' lik behere alınıp, 100 mL' ye seyreltilir. Şahit olarak 100 mL distile su ve seri olarak 01, 0,2, 0,3, 0,4 ve 0,5 mg fenol içerikli 100 mL fenol standardı hazırlanır. Arıtılan numune, şahit ve standartlara sırasıyla 2,5 mL 0,5N NH_4OH çözeltisi ilave edilir ve hemen fosfat stokuyla pH $7,9 \pm 0,1$ e ayarlanır. 1 mL 4 – aminoantipirin çözeltisi ilave edilir, iyice karıştırılır. 1 mL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ çözeltisi ilave edilir ve iyice karıştırılır. 15 dakika sonra hücrelere transfer edilir. Numunenin absorbansı 500 nm' de şahide karşı okunur. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak fenol miktarı hesaplanır.

$$\text{mgfenol} / L = \frac{A}{B} \times 1000$$

A: Numunede mg / 100 ml fenol miktarı, kalibrasyon eğrisinden.

B: mL olarak orijinal numune.

3.5.2. Amperometrik Fenol Biyosensörü Kullanılarak Fenol Tayini Yapılması

Gerçek atıksu numunelerinde hazırladığımız enzim elektrot ile fenol ölçümü yapılmıştır. Bu ölçümün yapılması sırasında çalışmamız genelinde tespit edilen optimum koşullar kullanılarak enzim elektrodunun ilk önce kararlı hal akım değerine ulaşması sağlanmıştır. Kararlı hal akım değerine ulaşıldığı zaman ölçüm ortamına bilinmeyen derişimlerdeki fenol numunelerinden belli hacimde eklenerek, bu derişime karşılık gelen kararlı hal akım değeri (enzim elektrot aktivitesi) ölçülmüştür. Daha sonra derişimi bilinen fenol çözeltisi ilavesi ile, ölçüm ortamındaki fenol derişimi artırılmış ve yeni kararlı hal akım değerinin eldesi için beklenmiştir. Ölçülen akım değerleri fenol derişimine karşı grafiğe alınmıştır. Standart ekleme yöntemiyle (Harris, 1991; Bories and bories, 1995)., ölçüm sırasındaki miktarlar dikkate alınarak atıksu numunesi içindeki fenol miktarı ölçülmüştür.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmanın ilk aşamasında elektropolimerizasyon yöntemi kullanılarak horseradish peroksidaz ve lakkaz enzimi kullanılarak iki farklı enzim elektrodu hazırlanmıştır (GC/PPy-HRP ve GC/PPy-TvLac). Hazırlanan her iki enzim elektrodu için enzimin glassy karbon elektrot yüzeyine tutuklanması için dönüşümlü voltametri yöntemi ile 0-1.0 V arasında ve 100 mV/s tarama hızında çalışmalar yapılmıştır. Daha sonra her bir elektrot fenol ölçümü için kullanılmıştır. GC/PPy-HRP ve GC/PPy-TvLac enzim elektrotları için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1 de verilmiştir.

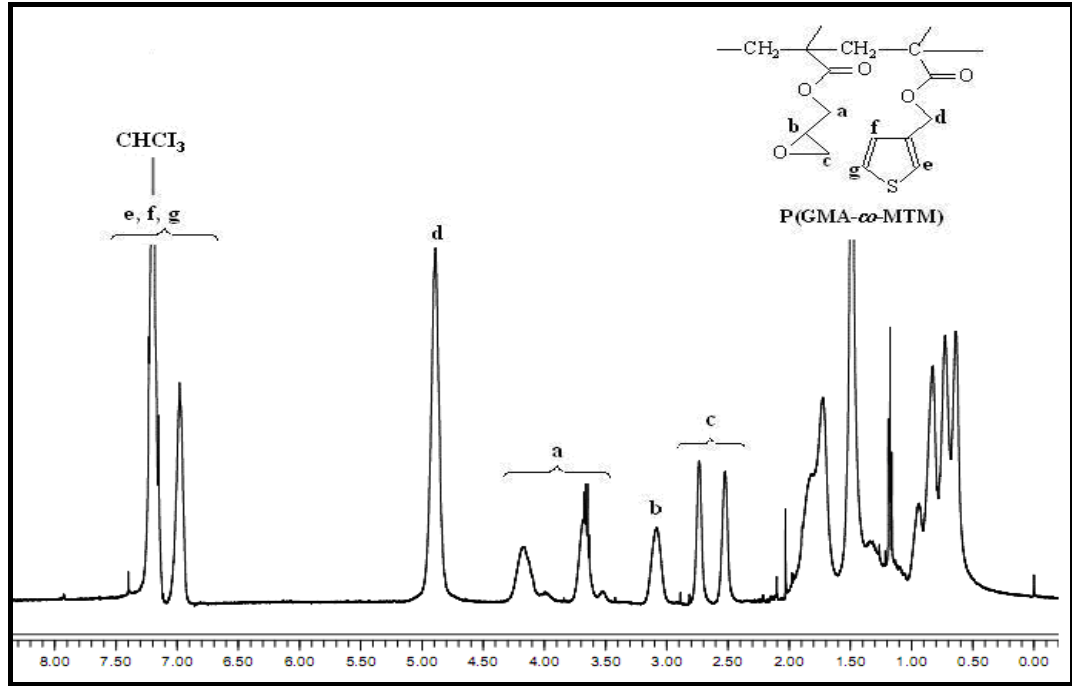
Çizelge 4.1 GC/PPy-HRP ve GC/PPy-TvLac enzim elektrotları ile elde edilen analitik parametreler

	Hazırlanan Elektrot	Hassaslık	R²	Doğrusal Çalışma Aralığı	% RDS
Fenol	GC/PPy-TvLac	34.56	0.991	0.2–1.40	1.85
	GC/PPy-HRP	25.93	0.997	0.5 -10	2.13

Hazırlanan her iki enzim elektrodu için sonuçlar incelendiğinde lakkaz enzimini temel alan elektrotla yapılan fenol ölçümünde hassaslığın daha iyi ve doğrusal çalışma aralığının da daha düşük konsantrasyonlarda olduğu görülmektedir. Elektropolimerizasyon yöntemi kullanılarak iki farklı enzimle hazırlanan çalışma elektrotları sadece bundan sonraki çalışmalarda yol gösterici olması bakımından ve enzim seçimi konusunda fikir vermesi açısından yapılmıştır. Bu sebeple bundan sonraki çalışmalarda hazırlanan enzim elektrotlarında lakkaz enzimi tercih edilmiştir.

4.1. poli (GlisinMetakrilat-co-3-Thienylmethacrylate) (*MTM-co-GMA*) Kopolimerinin Karakterizasyonu

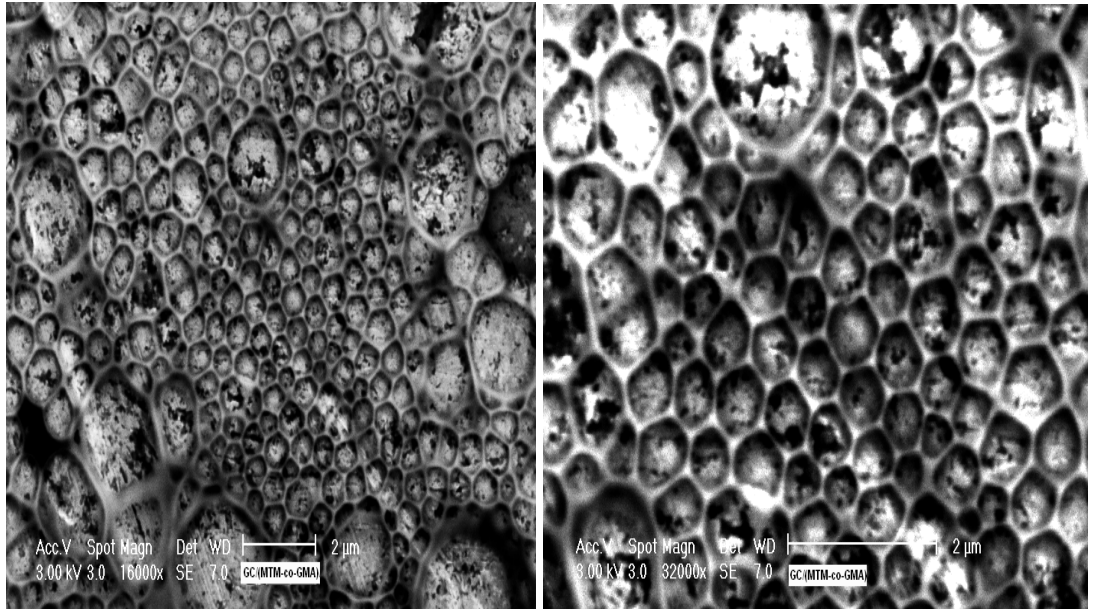
Poli (*GMA-co-MTM*) kopolimerleri, AIBN başlatıcısı varlığında farklı kimyasal kompozisyonlarda, beslemedeki farklı GMA/MTM monomer oranlarının değiştirilmesiyle radikal polimerizasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Kopolimerlerin yapısı ^1H , ^{13}C NMR ve FT-IR spektroskopisi ile karakterize edildi. Şekil 4.1’de Poli($\text{GMA}_{30}\text{-co-MTM}_{70}$) kopolimerinin ^1H NMR spektrumu görülmektedir (Yılmaz ve ark., 2004, Yılmaz ve ark., 2005, Günaydın, 2008). Hazırlanan kopolimer MTM yapısındaki tiyofen grupları sebebiyle iletken özelliğe sahiptir. Kopolimerin iletkenlik özelliğinin yanı sıra GMA içinde bulunan epoksi yapısından dolayı enzimlerin bağlanması için oldukça uygun bir yapı oluşturmaktadır (Günaydın ve Yılmaz, 2007).



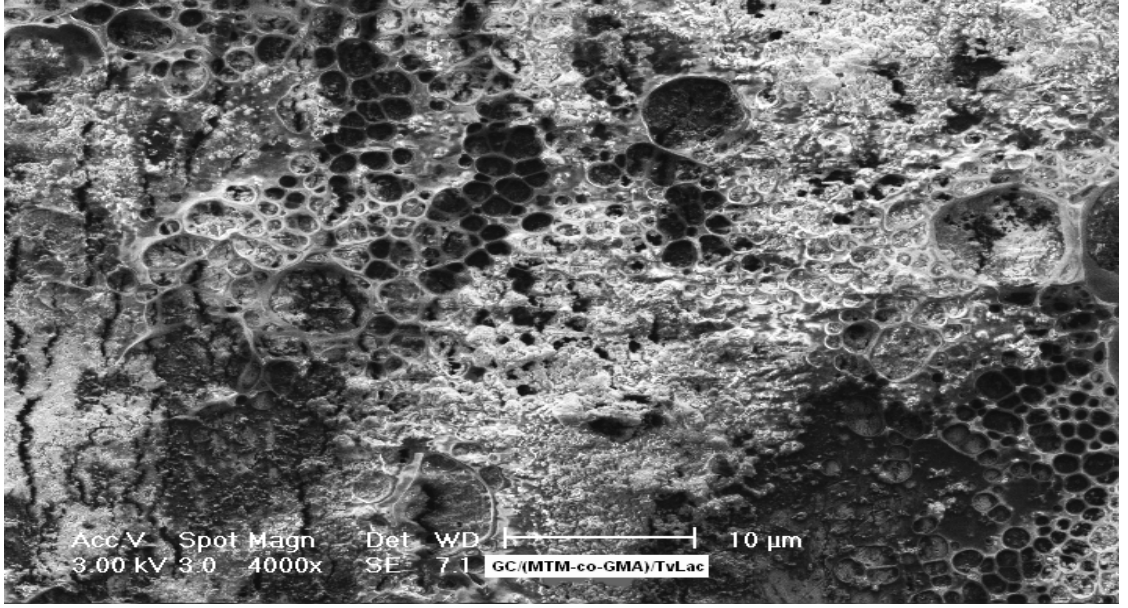
Şekil 4.1. Poli($\text{GMA}_{30}\text{-co-MTM}_{70}$) kopolimerinin ^1H NMR spektrumu

4.2. Hazırlanan Elektrotların Karakterizasyonu

Poli($GMA_{30-co-MTM_{70}}$) ile kaplanmış glassy karbon elektrot [(GC/($GMA_{30-co-MTM_{70}}$))] ve kopolimer ile kaplandıktan sonra enzim (TvLac) tutuklanmış elektrodun [(GC/($GMA_{30-co-MTM_{70}}$)/TvLac)] taramalı elektron mikroskop görüntüleri (SEM) görüntüleri Şekil 4.2. ve Şekil 4.3. 'de verilmiştir. Görüntülerden de görüldüğü gibi elektrot yüzeyinde kaplanan kopolimer oldukça homojen ve gözenekli bir yapıya sahiptir. Kopolimerin gözenekli ve homojen yapısı enzim immobilizasyonu için uygun bir yapı oluşturmaktadır.



Şekil 4.2. GC/($MTM_{70-co-GMA_{30}}$) elektrodunun taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü



Şekil 4.3. $GC/(MTM_{70-co-GMA_{30}})/TvLac$ elektrodunun taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü

4.3. Lakkaz Enzimini Temel Alan Fenol Biyosensörünün Geliştirilmesi

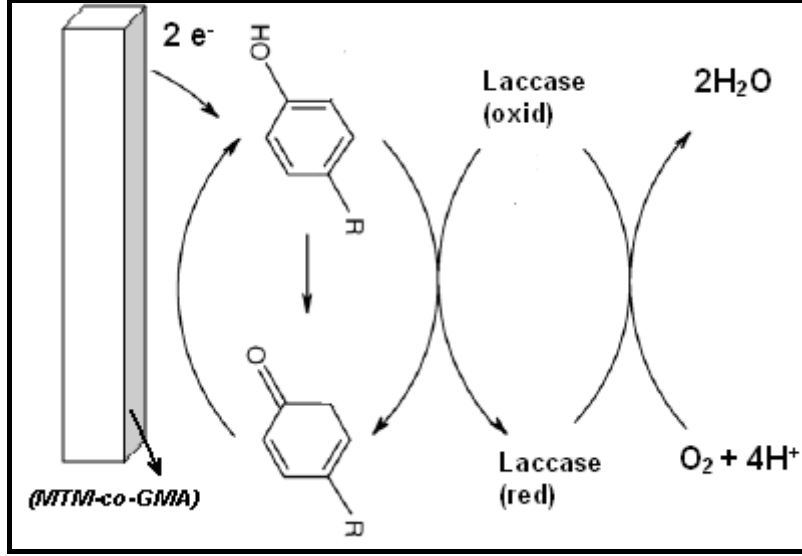
Bu çalışmada poly ($MTM-co-GMA$) kopolimerini temel alan yeni fenol enzim elektrotları geliştirilmiştir. Enzim elektrotlarının hazırlanması dört farklı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bunlardan birincisi GC elektrot yüzeyinde oluşturulan poly ($MTM-co-GMA$) filmine TvLac enziminin tutuklanmasıyla hazırlanan ve $GC/(MTM-co-GMA)/TvLac$ enzim elektrodu (A enzim elektrodu) olarak tanımlanan elektrottur. Bu enzim elektrodunun aktivitesine enzim elektrodunun hazırlanması sırasında kullanılan poly ($MTM-co-GMA$) derişimi, enzim derişimi, çalışma pH'ı gibi deneysel parametrelerin etkileri araştırılarak elektrodun maksimum aktivite gösterdiği koşullar belirlenmiştir. Bu elektrotla elde edilen optimum koşullar diğer elektrotlarla (B, C ve D elektrotları) yapılan çalışmalarda da kullanılmıştır.

D elektrodu hazırlanmasında, A enzim elektrodu için bulunan optimum koşullar kullanılarak yüzeyde karbon nano tüp biriktirmesinin etkisi araştırılmıştır.

Bu amaçla D enzim elektrodunun aktivitesine, elektrodun hazırlanması sırasında kullanılan çözeltideki CNT derişiminin etkisi araştırılmıştır. Ayrıca her enzim elektrot için substrat derişimi etkisi araştırılmıştır.

Hazırlanan enzim elektrodunda meydana gelen reaksiyonların şematik gösterimi Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.4. Hazırlanan enzim elektrodunda meydana gelen reaksiyonların şematik gösterimi

4.3.1. *GC/(GMA-co-MTM)₁/TvLac* (A elektrodu) Enzim Elektrot Aktivitesine Deneysel Parametrelerin Etkisinin İncelenmesi

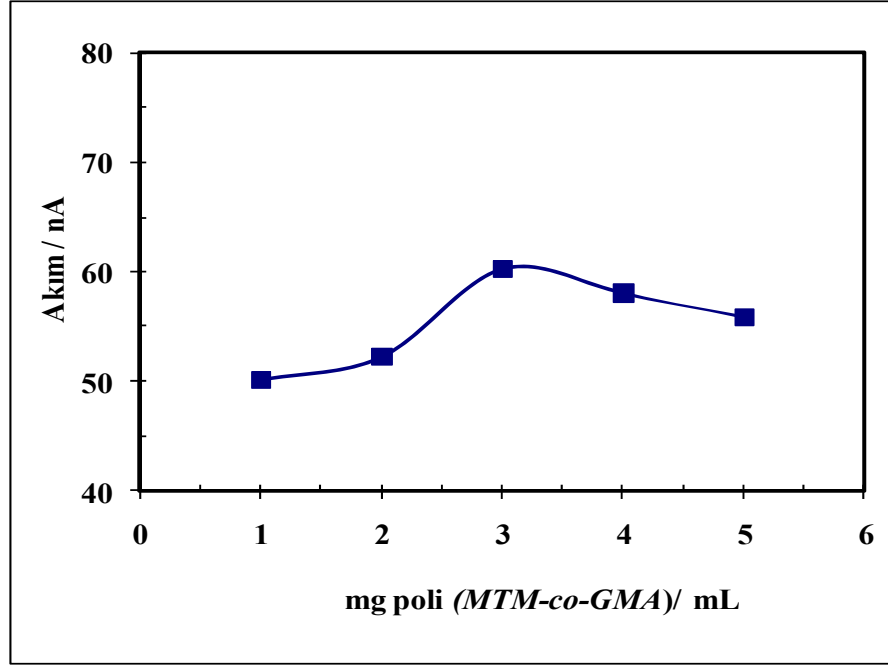
GC elektrot üzerine kaplanmış *(GMA-co-MTM)₁* yapısına TvLac enziminin tutuklanmasıyla hazırlanan *GC/(GMA-co-MTM)₁/TvLac* (A elektrodu) enzim elektrodunun aktivitesine çeşitli deneysel parametrelerin etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalar sabit bir çalışma voltajında farklı fenol derişimleri için elde edilen kararlı hal akımlarının ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Zamana karşı akım değişimi izlenerek cevap eğrileri elde edilmiştir.

Bu bölümdeki deneyler hazırlanan enzim elektrodunun aktivitesine çeşitli deneysel parametrelerin etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Substrat derişimi,

ortam pH'ı, enzim derişimi, potansiyel ve sıcaklık enzim elektrot aktivitesi üzerinde etkili olabilecek ortam şartları olarak belirlenmiş ve bu faktörlerin etkileri incelenmiştir. Ayrıca optimum koşullarda hazırlanan farklı enzim elektrotlarının (B, C ve D elektrotları) 10 farklı fenolik türe verdiği cevaplar araştırılmıştır.

4.3.1.1. poly(*GMA-co-MTM*)₁ Miktarının Etkisi

Fenol biyosensörü yapımının ilk aşamasını glassy karbon elektrodun hazırlanan kopolimerle modifiye edilmesi oluşturmaktadır. Hazırlanan biyosensöre kaplama kalınlığının etkisi oldukça önemlidir. *GC/(GMA-co-MTM)₁/TvLac* enzim elektrodunun akım cevabını etkileyen parametrelerden birisi de kullanılan (*GMA-co-MTM*)₁ kopolimerinin derişimidir. Bu çalışmada 2,00 mg TvLac/mL enzim çözeltisinde 2 saat bekletme süresi sabit tutulmuştur. Poli (*MTM-co-GMA*)₁ derişiminin etkisini belirleyebilmek için çalışma sırasında kullanılan Poli (*MTM-co-GMA*)₁ miktarı 1,00 mg/mL ile 5,0 mg/mL poly (*MTM-co-GMA*)₁ derişimleri arasında değiştirilmiştir. Çalışmalarda 0,2 M pH 5,0 sitrat tamponu kullanılmıştır. Fenol ilavesinden sonra gözlenen maksimum akım değerleri poly (*MTM-co-GMA*)₁ derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir. şekil 4.5'de görüldüğu gibi kullanılan poli (*MTM-co-GMA*)₁ derişiminin artmasıyla gözlenen akım değeri artmakta ve 3,0 mg/mL poli (*MTM-co-GMA*)₁ derişiminde en yüksek değerini almaktadır. 3,0 mg/mL poli (*MTM-co-GMA*)₁ derişiminden sonra ise akım azalmaktadır. Bundan sonraki yapılan çalışmalarda (B,C,D elektrotları) maksimum cevabın elde edildiğu bir değer olan 3,0 mg (*MTM-co-GMA*)₁ /mL konsantrasyonu kullanılmıştır.

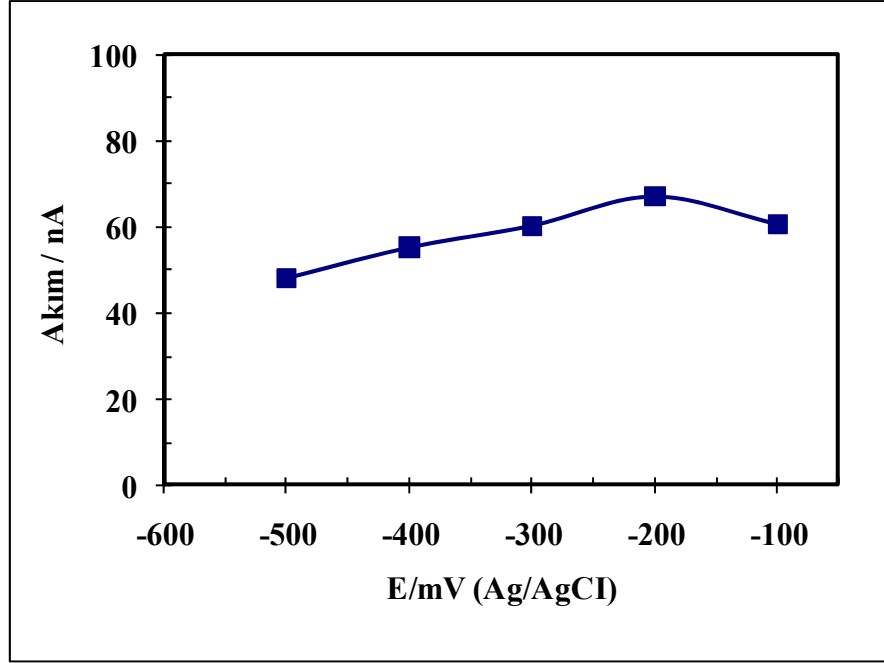


Şekil 4.5. $GC/(GMA-co-MTM)_1/TvLac$ enzim elektrot aktivitesinin poli ($MTM-co-GMA$)₁ derişimi ile değışimi (-100 mV, 0,2 M ph 5.0 sitrat tampon, 2 mg/mL TvLac, 2 μ M fenol, 23°C).

4.3.1.2. Uygulanan Potansiyelin Etkisi

$GC/(GMA-co-MTM)_1/TvLac$ enzim elektrodunun hazırlanmasında akım cevabını etkileyen faktörlerden biri uygulanan potansiyeldir. Bu çalışmada, 3 mg/mL poly ($MTM-co-GMA$)₁ ve 2 mg TvLac/mL enzim çözeltisinde 2 saat bekletme süresi sabit tutulmuştur. Elektroda uygulanan potansiyelin elektrot cevabına etkisini belirleyebilmek amacıyla çalışma voltajı, -100 mV ile - 500 mV aralığında değıştirilmiştir. Hazırlanan enzim elektrodunun aktivitesine, uygulanan gerilimin etkisini incelemek amacıyla 0,20 M pH 5.0 sitrat tamponu kullanılmıştır. 2 μ L fenol ilavesinden sonra elde edilen sonuçlar kullanılarak uygulanan gerilime karşı maksimum akım değeri grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi en

yüksek akım -200 mV potansiyel değerinde ölçülmüştür. Bundan sonra yapılan çalışmalarda -200 mV gerilim değeri kullanılmıştır.

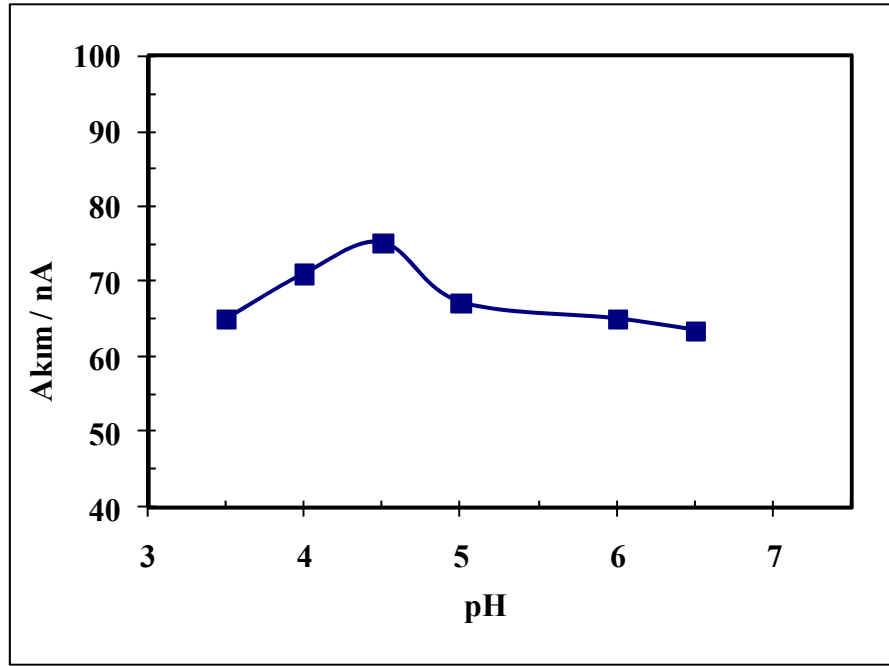


Şekil 4.6. Uygulanan potansiyelin $GC/(GMA-co-MTM)_1/TvLac$ elektrot akım cevabına etkisi (3 mg $(GMA-co-MTM)_1/mL$, 0,2 M ph 5.0 sitrat tampon, 2 mg/mL TvLac, 2 μM fenol, 23°C).

4.3.1.3. Ortam pH'ının Etkisi

Enzimler pH değişimine karşı çok duyarlıdır. Genellikle çok fazla asidik ve bazik ortamda etkisizdirler. Bazı hallerde enzimler en yüksek etkinliği belirli bir pH derecesinde gösterirler. Bu pH derecesine "Optimum pH" denir. Ortam pH'sı enzimatik reaksiyonların pek çoğunda hızı etkileyen önemli bir faktördür. Bunun nedeni, enzimlerin protein yapısında olmalarıdır. pH'a bağlı olarak protein molekülü üzerinde çeşitli elektrik yüklenmeleri ve buna bağlı olarak dış yüz şekli (üçüncül yapı) meydana gelmekte ve substratla-enzim uyuşmasını sağlamaktadır. Enzimlerin optimum pH'ları 2-10 arasında değişmektedir. Optimum pH'sı tek bir değerde olan veya çok dar bir aralıkta değişen enzimlerle çalışılırken, enzim ortamına uygun bir tamponun eklenmesi zorunlu hale gelmektedir. Enzimlerin optimum pH'sı çeşitli koşullara bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir.

$GC/(GMA-co-MTM)_1/TvLac$ enzim elektrodunun aktivitesine ortam pH'nın etkisini araştırmak amacıyla pH 3.5–6.5 arasında değişen 0,20 M sitrat tampon çözeltilinde 2 μ M fenol ilavesinden sonra elde edilen maksimum akım değerleri ölçölmüştür. 2.00 mg TvLac/mL enzim çözeltilinde 2 saat bekletme süresi sabit tutulmuştur. Farklı pH değerlerinde fenol ilavesinden sonra ölçölen maksimum akım eğrileri şekil 4.7'de görölmektedir. Enzim elektrodunun maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 4.5 olarak belirlenmiştir.

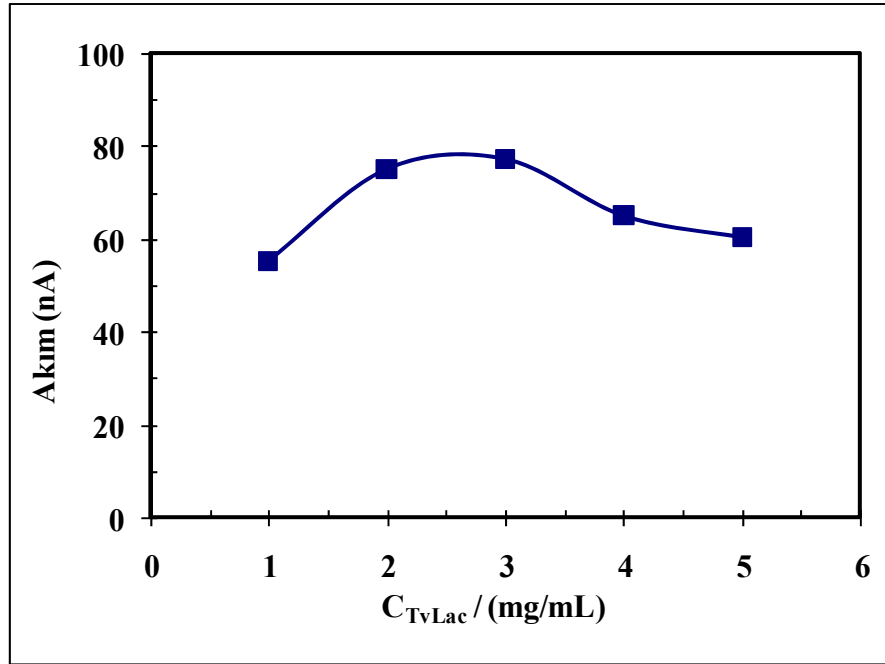


şekil 4.7. Ortam pH nın $GC/(GMA-co-MTM)_1/TvLac$ elektrot akım cevabına etkisi (3 mg $(GMA-co-MTM)_1$ /mL, 0,2 M sitrat tampon, 2 mg/mL TvLac, 2 μ M fenol, 23°C).

4.3.1.4. Lakkaz (TvLac) Derişiminin Etkisi

Hazırladığımız $GC/(GMA-co-MTM)_1/TvLac$ enzim elektrodunun akım değerini etkileyen parametrelerden biri de tutuklanan lakkaz enziminin miktarıdır. Tutuklanan lakkaz enzim miktarı ise tutuklama işlemi sırasında kullanılan çözeltilde bulunan çözünmüş enzim miktarına bağlıdır. Hazırlanan enzim elektrodunun aktivitesine lakkaz enzim derişiminin etkisini incelemek amacıyla tutuklama işlemi sırasında kullanılan çözeltildeki enzim miktarı 1.0 mg/mL ile 5.0 mg/mL lakkaz enzim derişimleri arasında değiştirilmiştir. Enzimde bekletme süresi 2 saat olarak sabit

tutulmuştur. Kullanılan her bir enzim derişiminde elektrot aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışmalar sırasında 0,20 M pH 4.5 olan sitrat tamponu kullanılmıştır. 2.00 mg TvLac/mL enzim çözeltisinde 2 saat bekletme süresi sabit tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar kullanılarak, enzim derişimine karşı 2 μ M fenol ilavesinden sonraki maksimum akım değerleri grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.8'den görüldüğü gibi tutuklama işlemi sırasında kullanılan enzim derişiminin artmasıyla gözlenen akım değeri artmakta ve belli bir enzim derişiminden sonra ise akım değerleri önemli miktarda değişmemektedir. Düşük enzim derişiminde daha düşük akım değerlerinin elde edilmesi kopolimere daha az miktarda enzim tutuklanması nedeniyleledir. Belli bir enzim derişiminden sonra ise kopolimer yapı içerisinde maksimum miktarda enzim tutuklanmakta ve çözeltideki enzim miktarının artırılmasıyla polimer yapıda tutuklanan enzim miktarı değişmemektedir. Bundan sonraki çalışmalarda 3.0 mg TvLac/mL enzim çözeltisi kullanılmıştır.



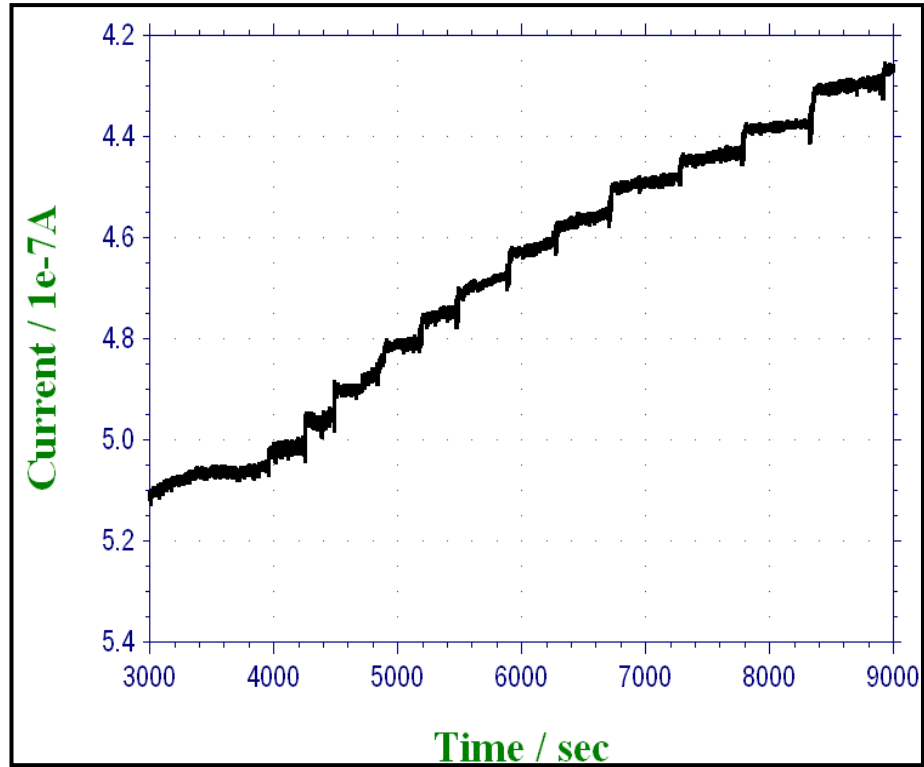
Şekil 4.8. Enzim konsantrasyonunun $GC/(GMA-co-MTM)_1/TvLac$ elektrot akım cevabına etkisi (3 mg $(GMA-co-MTM)_1$ /mL, 0,2 M pH 4.5 sitrat tampon, 2 μ M fenol, 23°C).

4.3.2. Hazırlanan Enzim Elektrotlarının Aktivitesine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

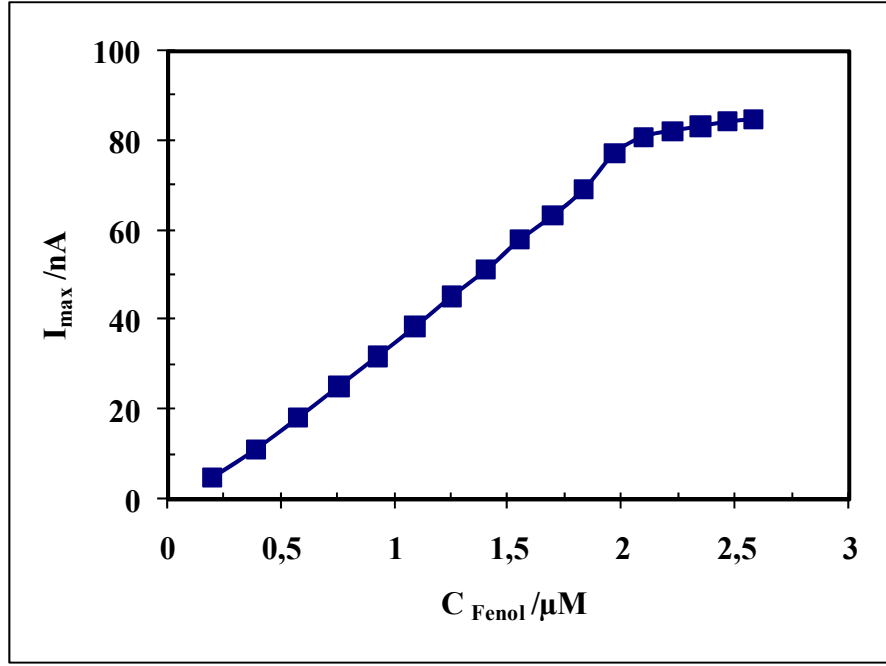
Hazırlanan enzim elektrotlarının aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi araştırılırken $GC/(GMA-co-MTM)_1/TvLac$ (A elektrodu) ile yapılan optimizasyon çalışmalarının sonuçları kullanılmıştır. Hazırlanan her bir enzim elektroduna 10 farklı substratın etkisi incelenmiştir. Hazırlanan enzim elektrotlarında fenol, katekol, hidrokinon, 2-kloro fenol, 3- kloro fenol, 4- kloro fenol, 2-4 diklorofenol, 4 metoksi fenol, 2-6 dimetoksi fenol substrat olarak kullanılmıştır. Enzim elektrotlarının fenolik türlere karşı cevabının incelenmesinde -200 mV (Ag/AgCl) potansiyelde, 0.2 M pH 4.5 sitrat tamponu kullanılmıştır.

4.3.2.1. $GC/(GMA-co-MTM)_1/TvLac$ (A elektrodu) Enzim Elektrot Aktivitesine Fenolik Türlerin Etkisinin İncelenmesi

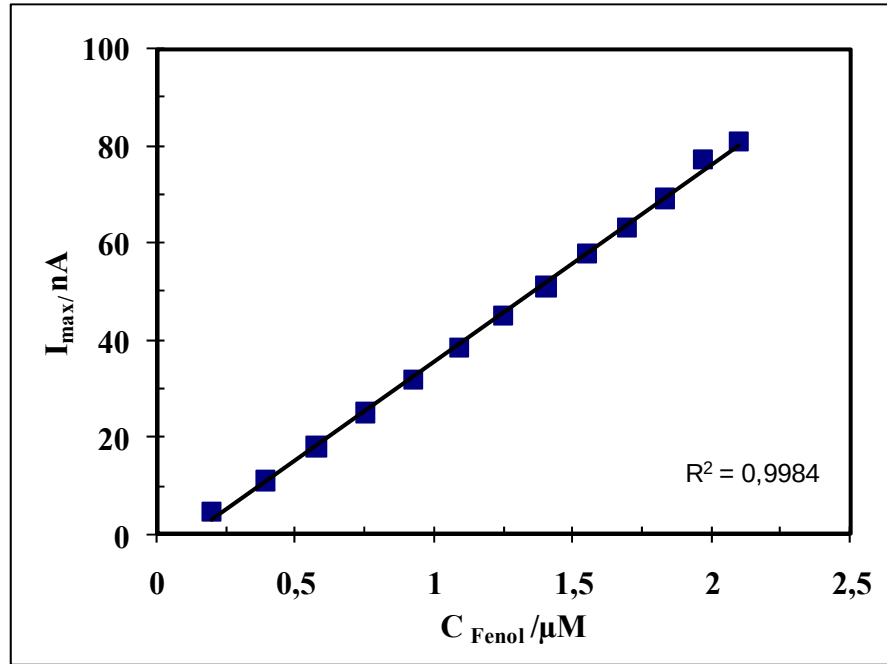
Hazırlanan enzim elektrodu ile yapılan ölçümlerin tutarlı bir şekilde yapılabilmesinin ilk koşulu çalışma ortamındaki substrat derişimi ile orantılı akım değerlerinin elde edilmesidir. Bu koşulun sağlandığı substrat derişim aralığı enzim elektrodunun doğrusal çalışma aralığı olarak tanımlanır ve bu aralığın geniş olması istenir. A enzim elektrodunun maksimum aktivitesinin ve doğrusal çalışma aralığının saptanması için ölçülen akım değerlerine substrat derişimi etkisi incelenmiştir. Daha önce saptanan optimum koşullarda hazırlanan A enzim elektrodunun 0,20 M pH 4.5 sitrat tamponunda ve 23°C sıcaklıkta farklı fenol derişimlerinde verdiği akım değerleri saptanmıştır. Ölçülen akım değerlerinin fenol derişimi ile değışimi Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. $GC/(GMA-co-MTM)_1/TvLac$ (A elektrodu) enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini gösteren akım zaman eğrisi.

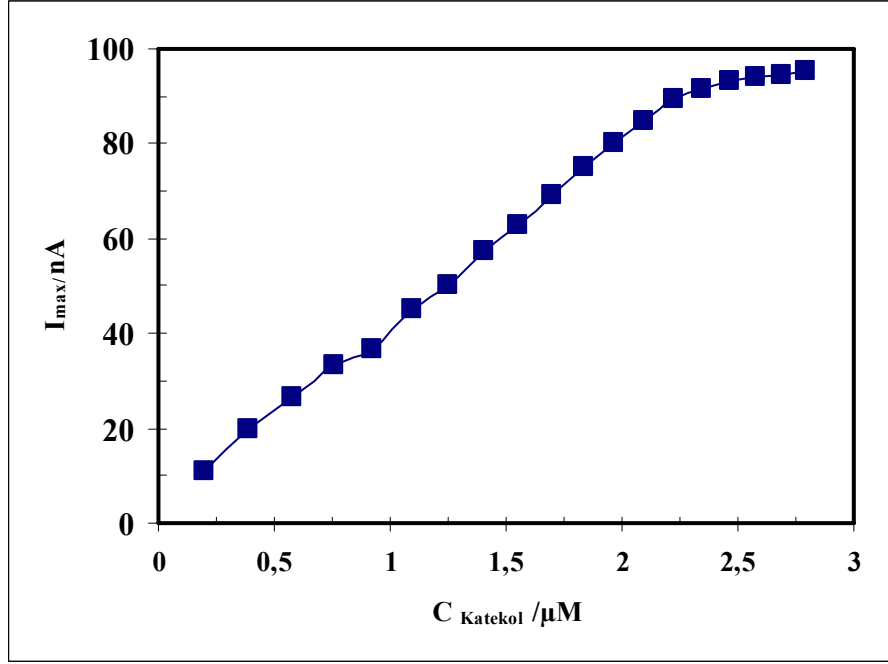


Şekil 4.10 (a). A enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₁/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).

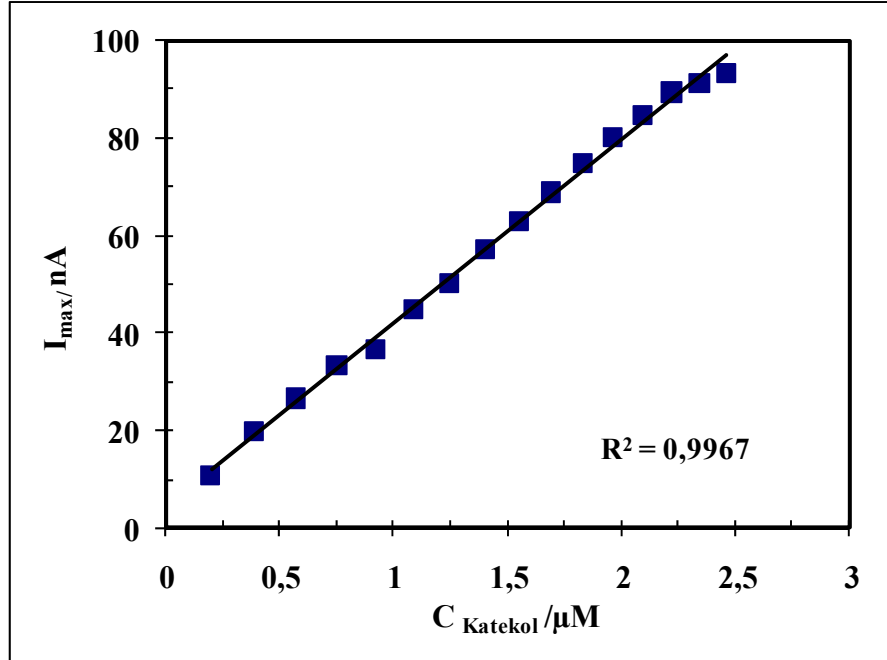


Şekil 4.10 (b). A enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.

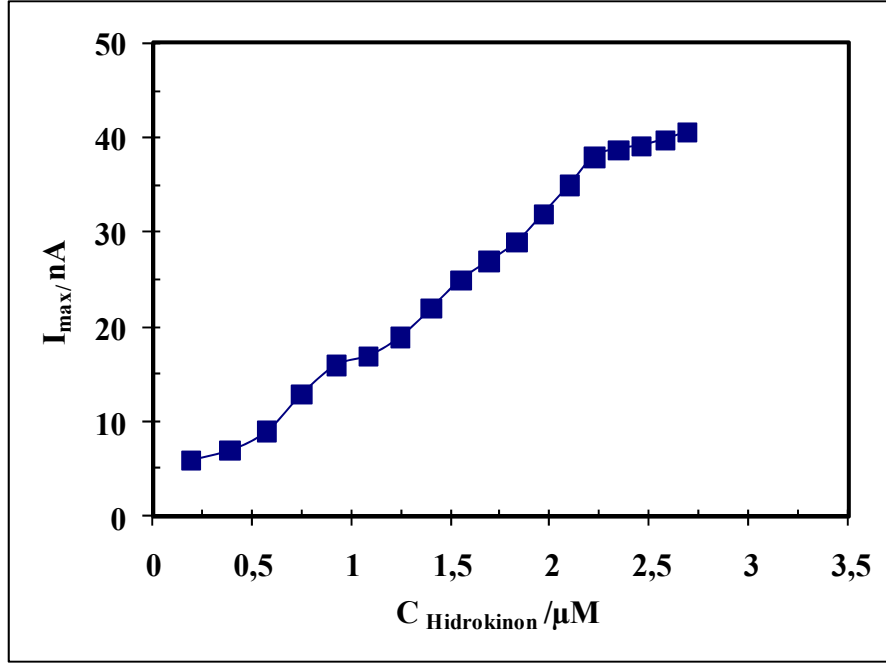
Şekil 4.10. a/b den görüldüğü gibi geliştirilen enzim elektrodu $2.096 \mu\text{M}$ 'a kadar fenol derişimi ile orantılı akım değerleri vermektedir. Bu nedenle hazırlanan A enzim elektrodunun pratik kullanım aralığı $2.096 \mu\text{M}$ 'a kadar fenol derişimi olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan fenol derişimine karşılık elektrot cevabı yaklaşık $2.22 \mu\text{M}$ civarında sabit değere ulaşmakta ve daha yüksek derişimlerde akım değerinde bir artış olmamaktadır. Bu durum hazırlanan elektrot için ölçüm ortamındaki koşullarda $2.22 \mu\text{M}$ fenol derişiminde, polimer film içerisindeki enzimin substrata karşı doygunluğa ulaştığını göstermektedir. Dolayısıyla bu koşullarda $2.22 \mu\text{M}$ ve daha yüksek fenol derişimin de elektrot aktivitesinde difüzyon kısıtlamasının önemi olmayacaktır.



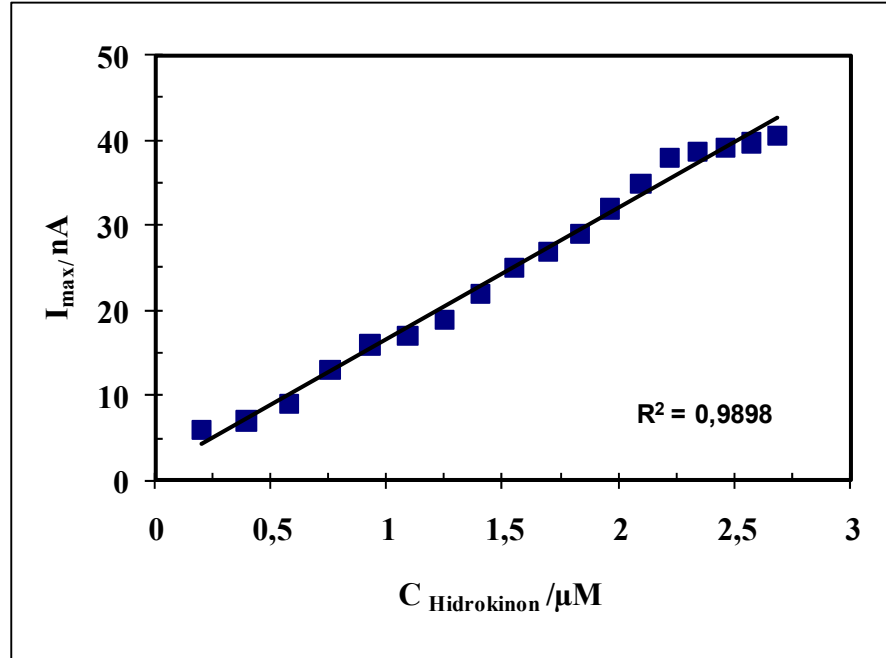
Şekil 4.11 (a). A enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₁/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



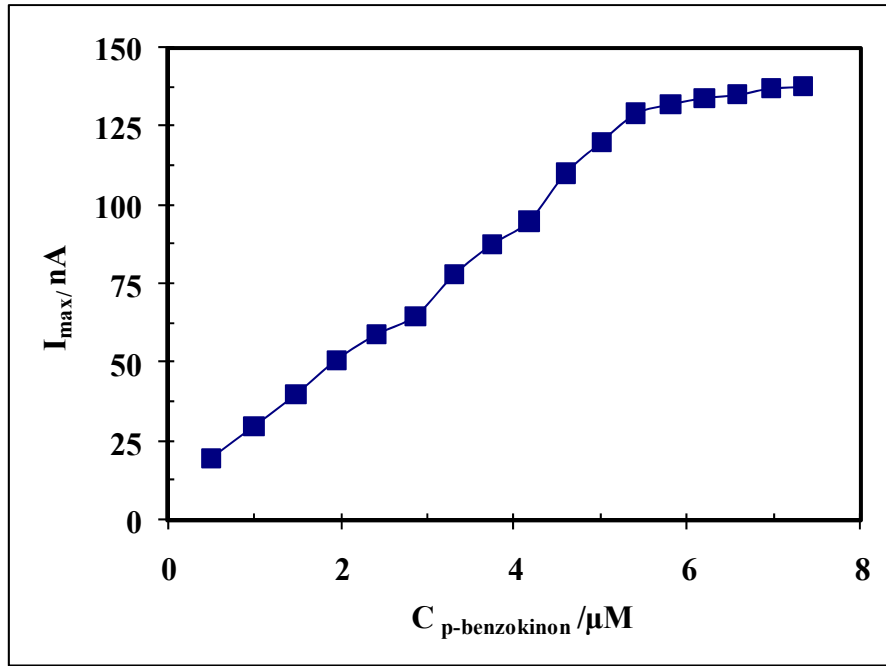
Şekil 4.11 (b). A enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



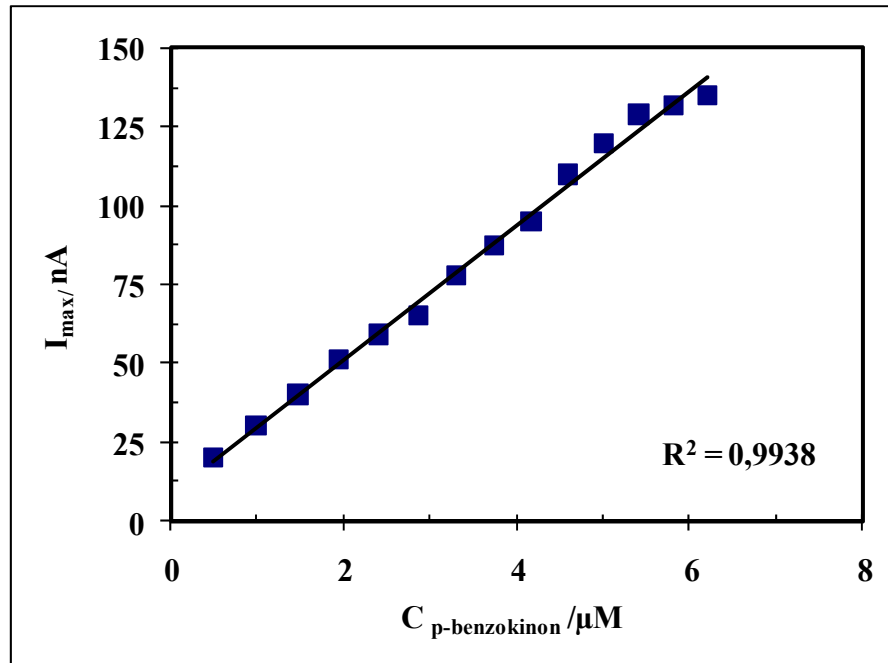
Şekil 4.12 (a). A enzim elektrot aktivitesinin hidrokinon konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₁/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



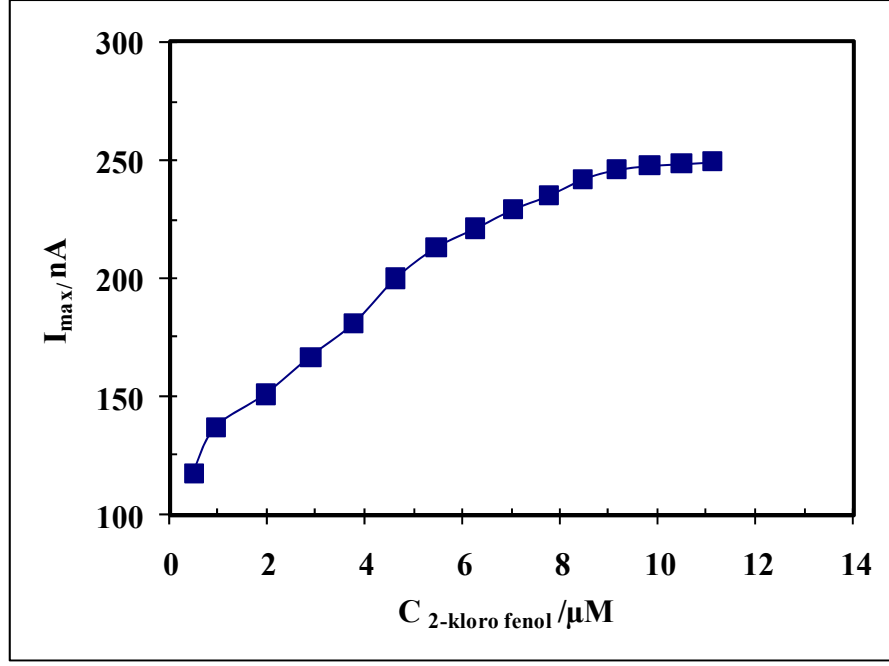
Şekil 4.12 (b). A enzim elektrot aktivitesinin hidrokinon konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



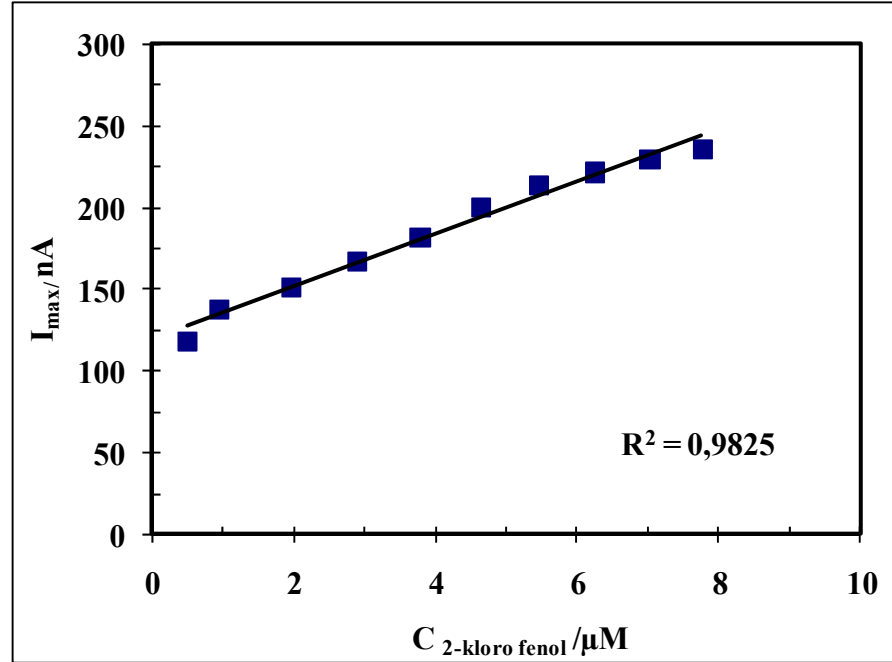
Şekil 4.13 (a). A enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinon konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₁/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



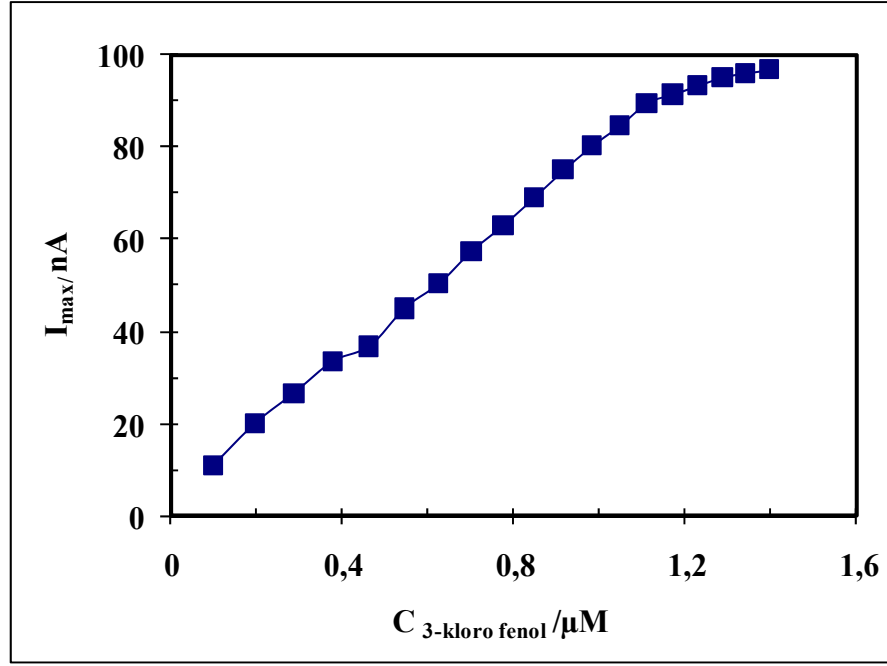
Şekil 4.13 (b). A enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinon konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



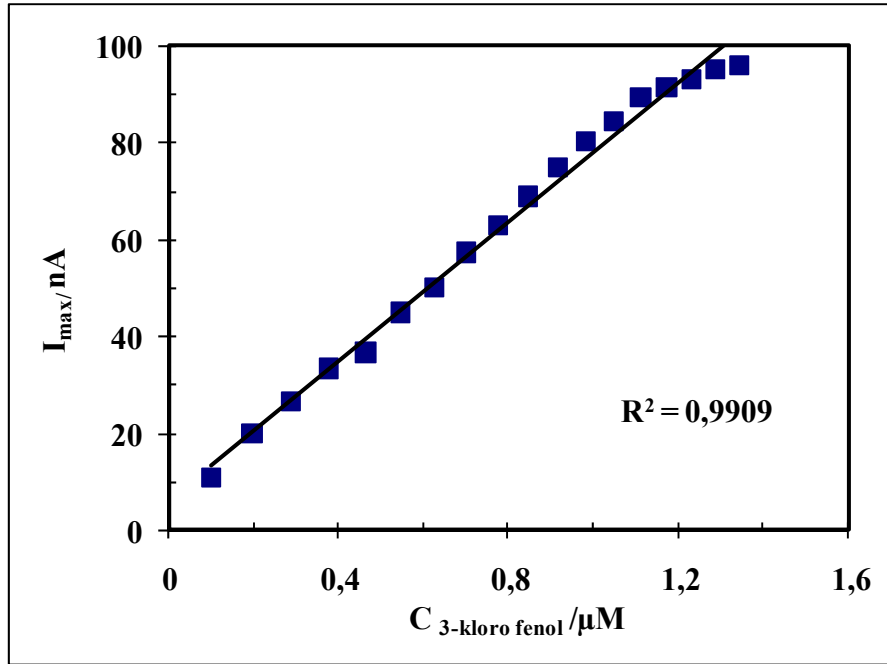
Şekil 4.14 (a). A enzim elektrot aktivitesinin 2-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₁/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



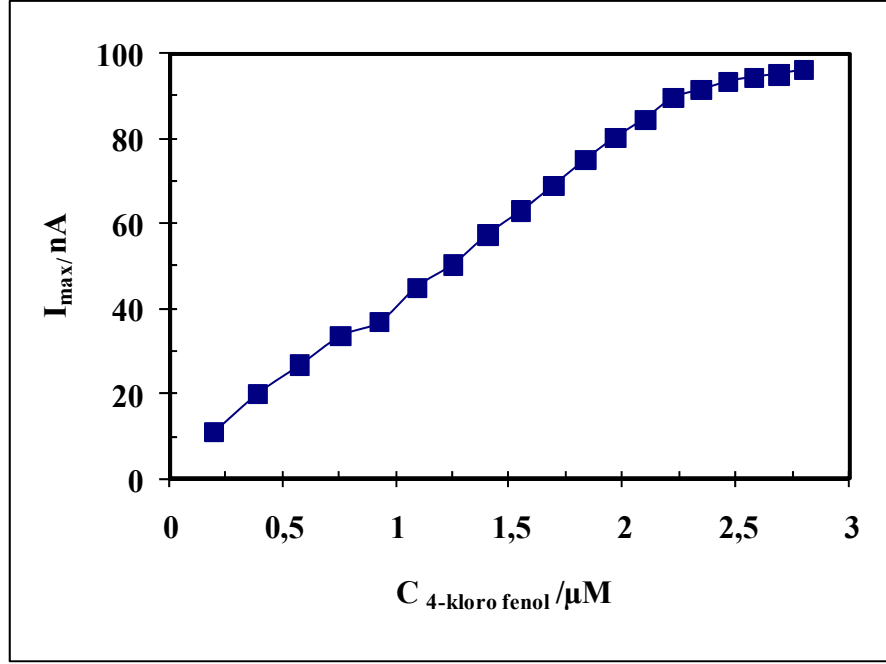
Şekil 4.14 (b). A enzim elektrot aktivitesinin 2-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



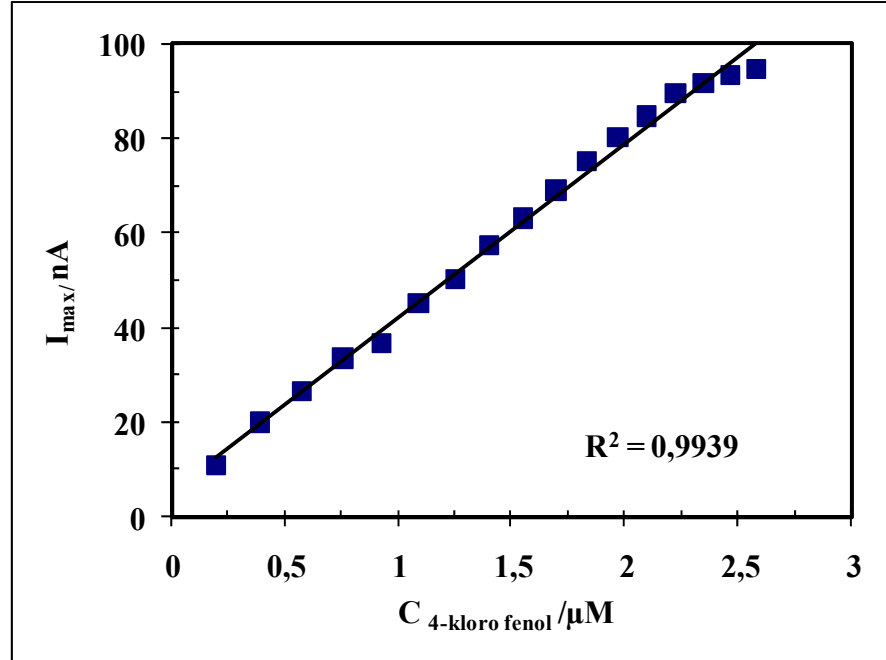
Şekil 4.15 (a). A enzim elektrot aktivitesinin 3-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₁/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



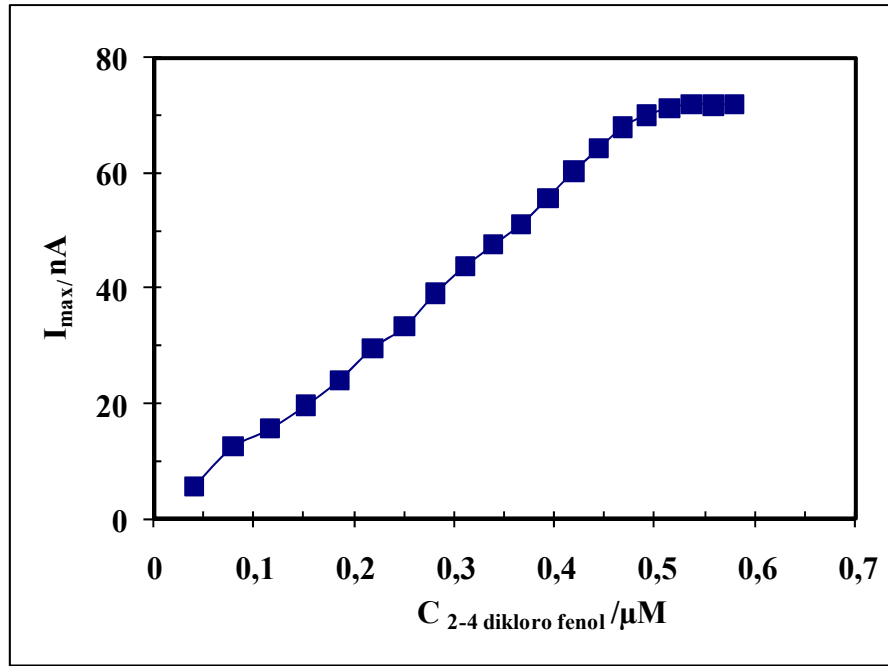
Şekil 4.15 (b). A enzim elektrot aktivitesinin 3-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



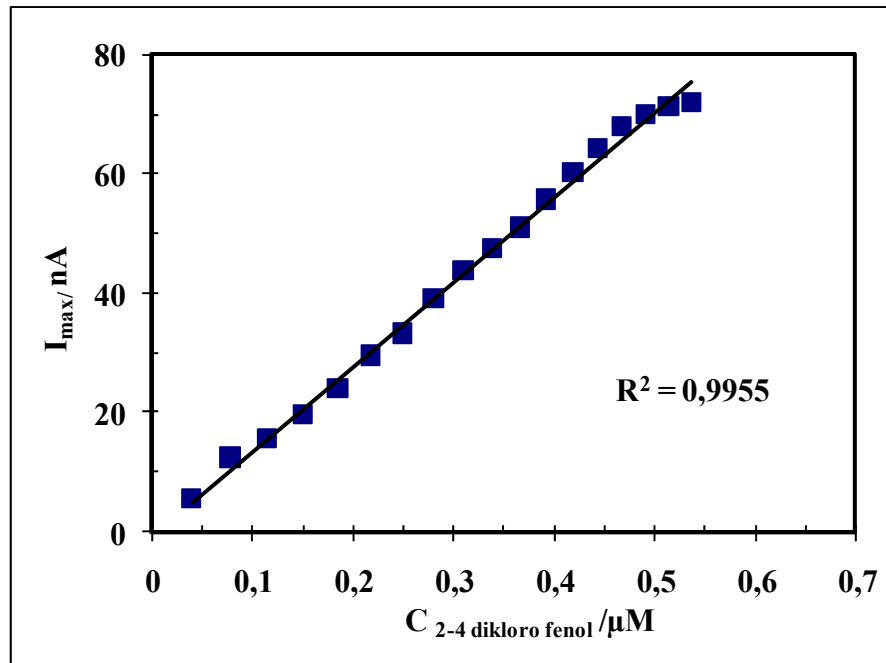
Şekil 4.16 (a). A enzim elektrot aktivitesinin 4-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₁/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



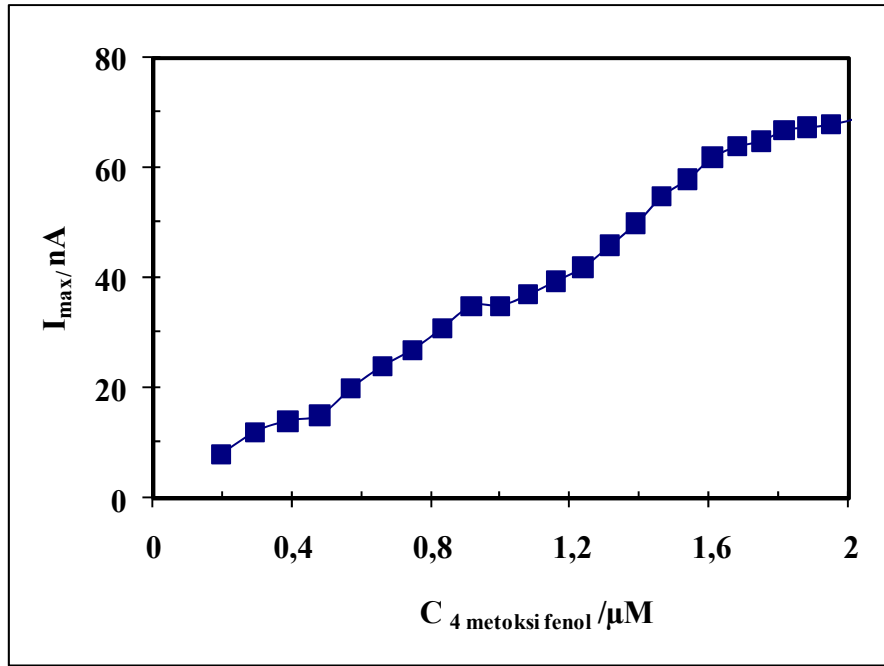
Şekil 4.16 (b). A enzim elektrot aktivitesinin 4-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



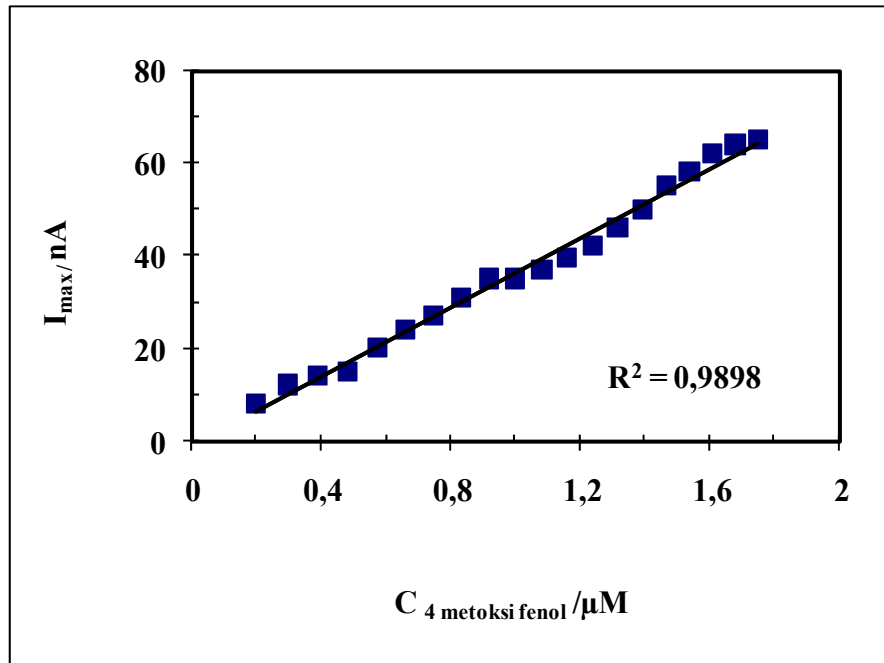
Şekil 4.17 (a) A enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₁/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



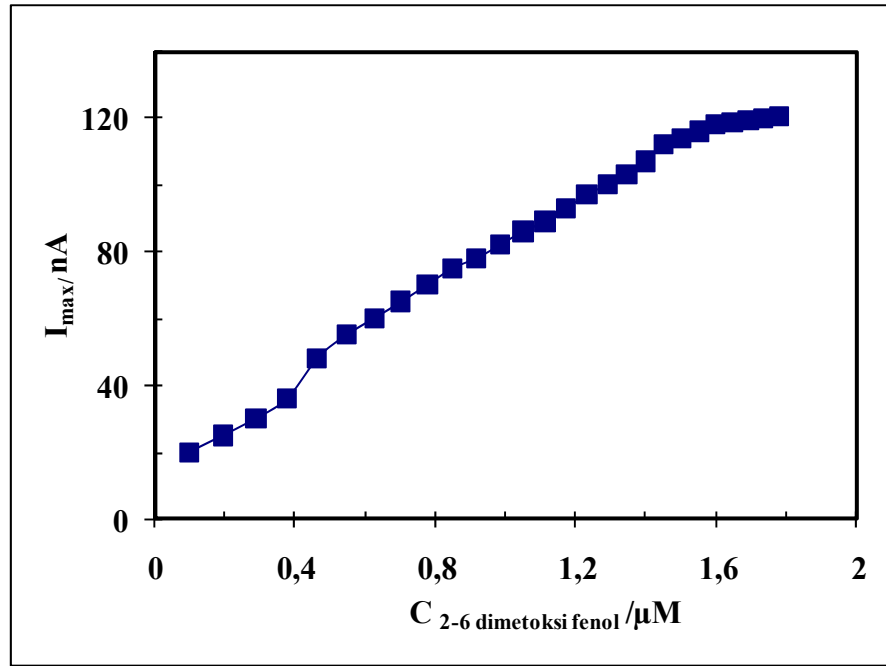
Şekil 4.17 (b). A enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



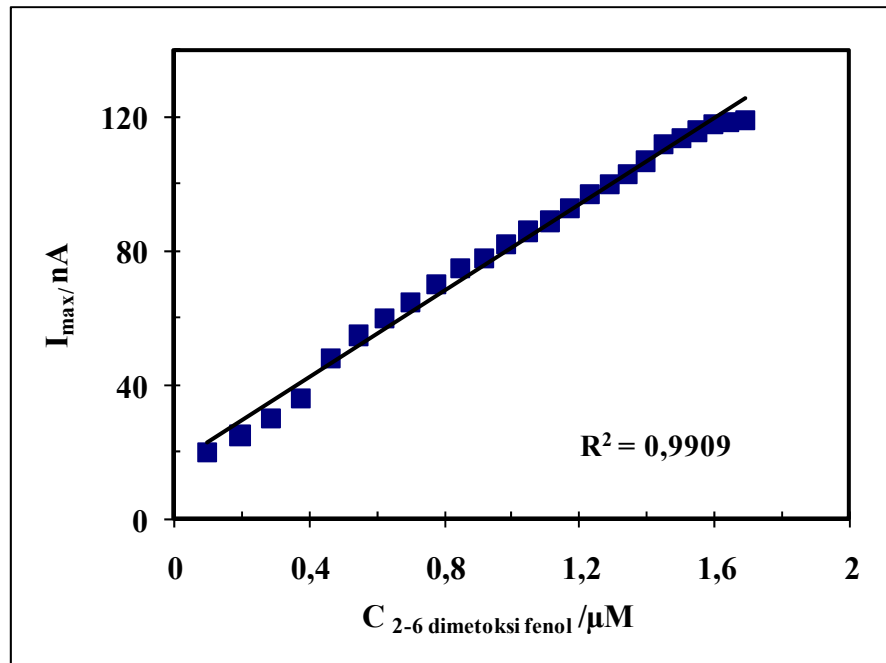
Şekil 4.18 (a). A enzim elektrot aktivitesinin 4 metoksi fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₁/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



Şekil 4.18 (b). A enzim elektrot aktivitesinin 4 metoksi fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı



Şekil 4.19 (a). A enzim elektrot aktivitesinin 2-6 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₁/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



Şekil 4.19 (b). A enzim elektrot aktivitesinin 2-6 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.

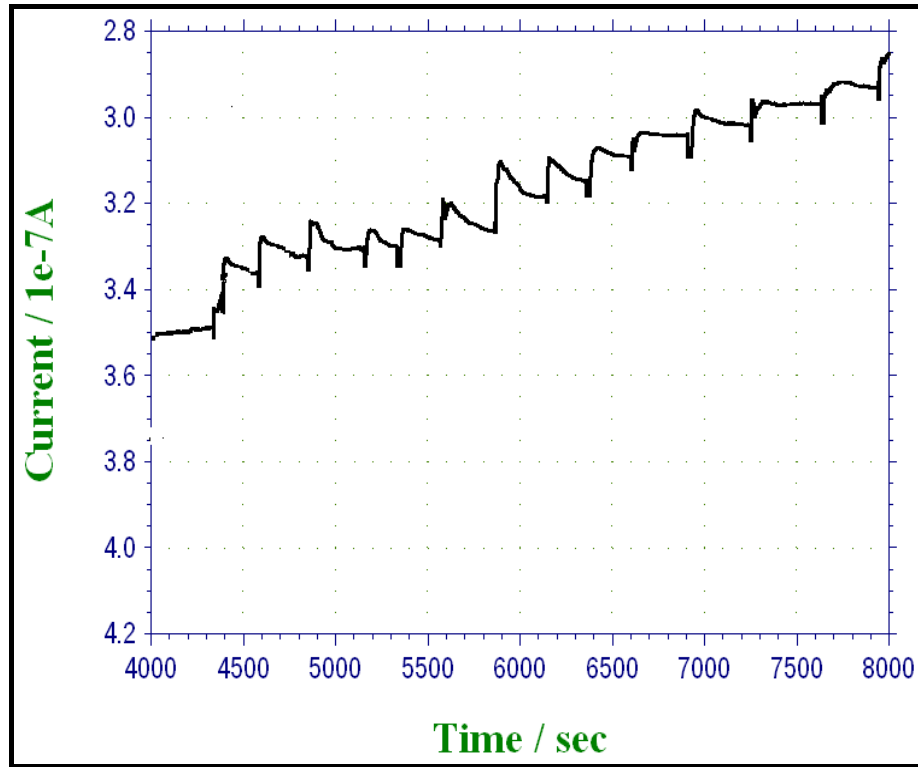
Hazırlanan $GC/(GMA-co-MTM)_1/TvLac$ enzim elektroduna farklı fenolik substratların etkisi aşağıdaki Çizelge 4.1’de özetlenmiştir. A enzim elektrodunun fenolik türlere karşı hassaslığı *2,4-dikloro fenol* > *3 kloro fenol* > *2,6-dimetoksi fenol* > *fenol* > *katekol* > *4-metoksi fenol* > *4-kloro fenol* > *benzokinon* > *2-kloro fenol* > *hidrokinon* sırasında azalmaktadır. Fenolik türler içinde en iyi hassasiyet *2-4 dikloro fenol* en düşük hassasiyet ise *hidrokinon* için gözlenmiştir. Hassasiyet farkları fenolik türlerin yapısında bulunan grupların konumundan kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.2. $GC/(GMA-co-MTM)_1/TvLac$ (A elektrodu) enzim elektrodu ile elde edilen analitik parametreler

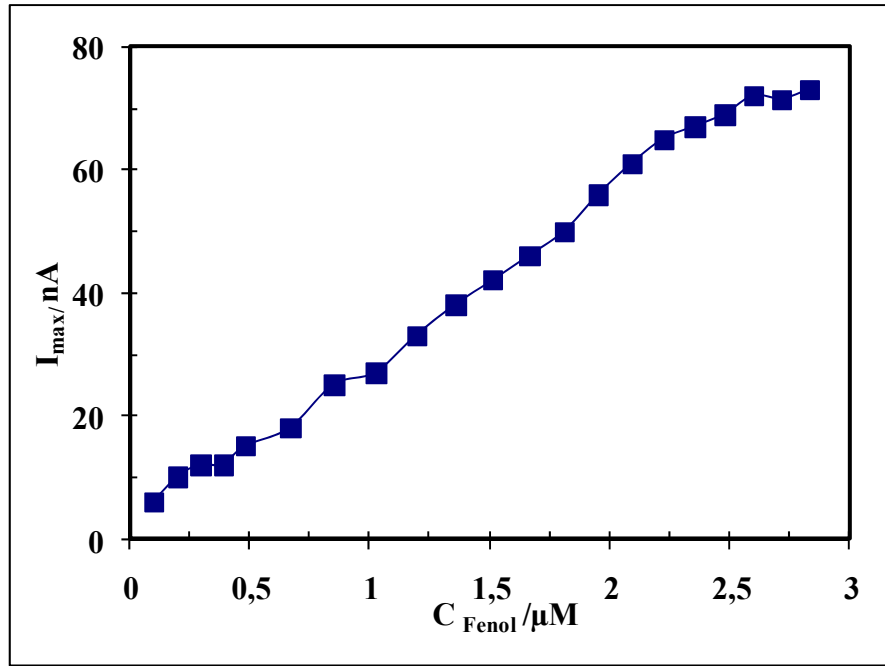
	Çalışma aralığı (μM)	R ²	Hassaslık ($\mu M/nA$)	Standart sapma (%)
Fenol	0.2-2.09	0.9984	40.69	3.94
Katekol	0.2-2.46	0.9967	37.71	3.24
Benzokinon	0.5-6.19	0.9938	21.37	1.68
Hidrokinon	0.2-2.79	0.9898	15.40	7.99
2-Kloro fenol	0.5-7.75	0.9825	15.99	1.07
3 Kloro fenol	0.1-1.34	0.9909	72.11	1.14
4 Kloro fenol	0.2-2.57	0.9845	34.87	1.68
2,4-Dikloro fenol	0.04–0.55	0.9955	141.62	1.99
4 Metoksi fenol	0.1-1.75	0.9898	36.15	5.07
2,6-Dimetoksi fenol	0.1-1.73	0.9909	64.60	2.72

4.3.2.2. $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ (B elektrodu) Enzim Elektrot Aktivitesine Fenolik Türlerin Etkisinin İncelenmesi

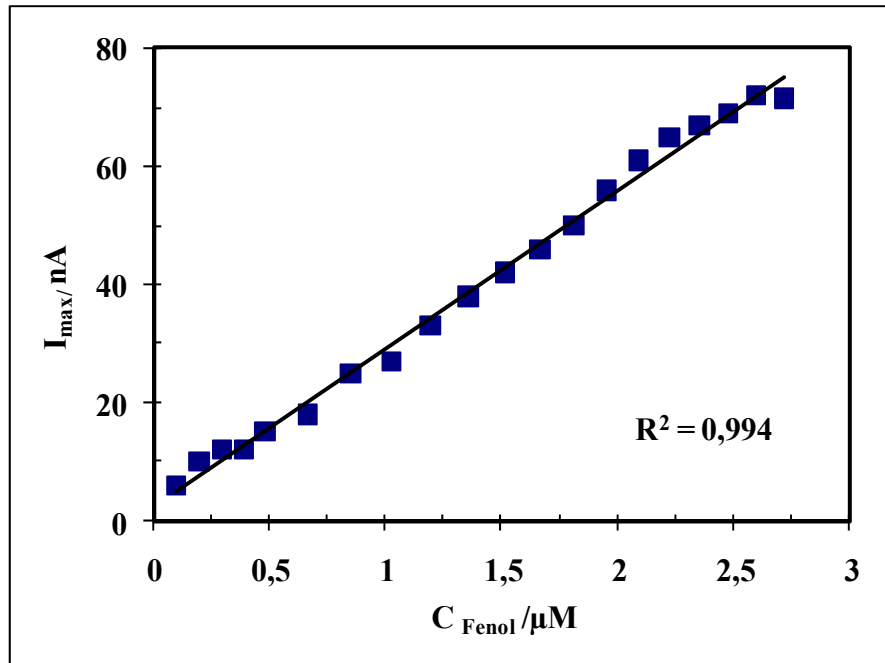
B enzim elektrodunun ($GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$) maksimum aktivitesinin ve doğrusal çalışma aralığının saptanması için ölçülen akım değerlerine substrat derişimi etkisi incelenmiştir. Daha önce A enzim elektrodu ile saptanan optimum koşullarda (0,20 M pH 4.5 sitrat tamponunda ve 23°C sıcaklıkta) B elektrodunun farklı fenol derişimlerinde verdiği akım değerleri saptanmıştır. B elektrodunda da *fenol*, *katekol*, *hidrokinon*, *2-kloro fenol*, *3- kloro fenol*, *4- kloro fenol*, *2-4 diklorofenol*, *4 metoksi fenol*, *2-6 dimetoksi fenol* gibi çeşitli fenolik türlerin konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. Ölçülen akım değerlerinin fenol derişimi ile değişimi Şekil 4.20’de verilmiştir. Aşağıda her bir fenolik tür için ölçülen akım değerlerinin fenolik türlerin konsantrasyonu ile değişimi verilmiştir.



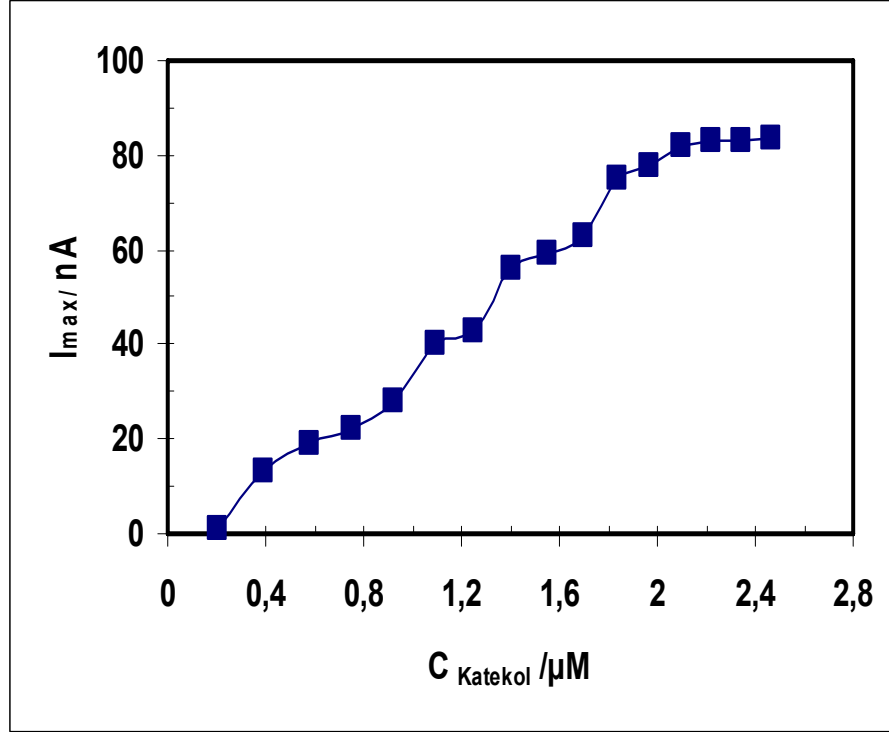
Şekil 4.20. $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ (B elektrodu) enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini gösteren akım zaman eğrisi.



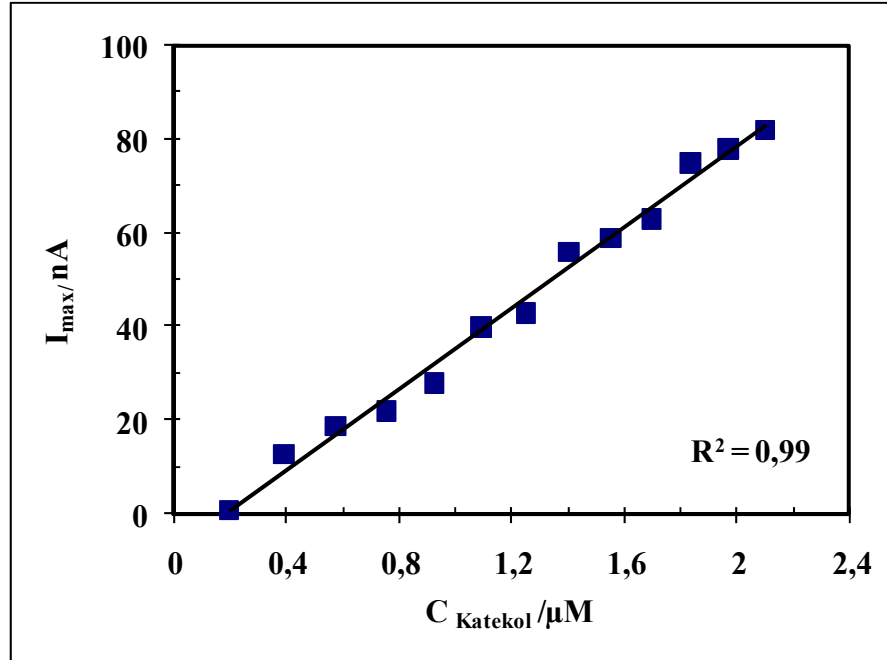
Şekil 4.21 (a). B enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₂/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



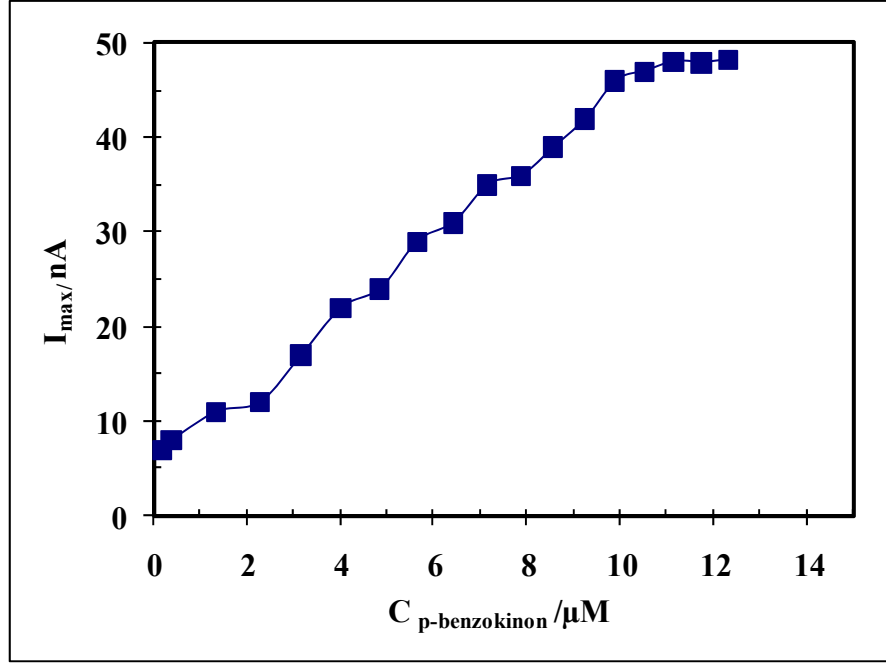
Şekil 4.21 (b). *GC/(GMA-co-MTM)*₂/TvLac (B elektrodu) enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini gösteren akım zaman eğrisi



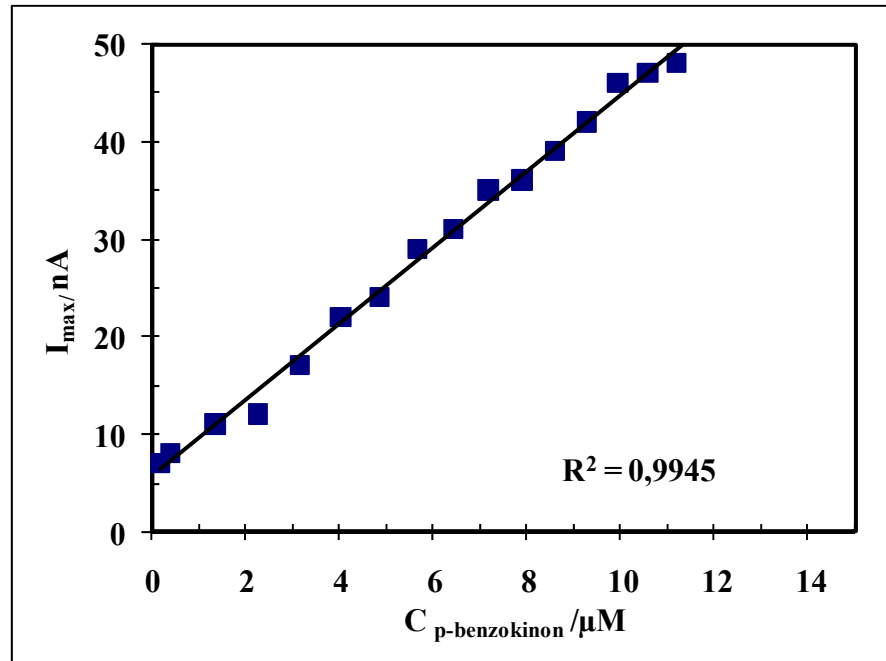
Şekil 4.22 (a). B enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₂/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



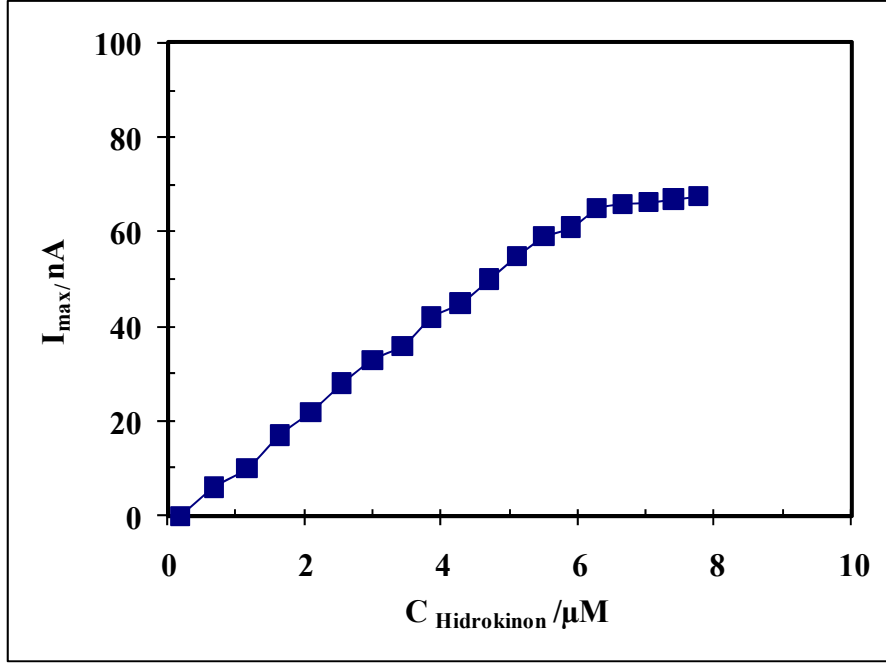
Şekil 4.22 (b). B enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



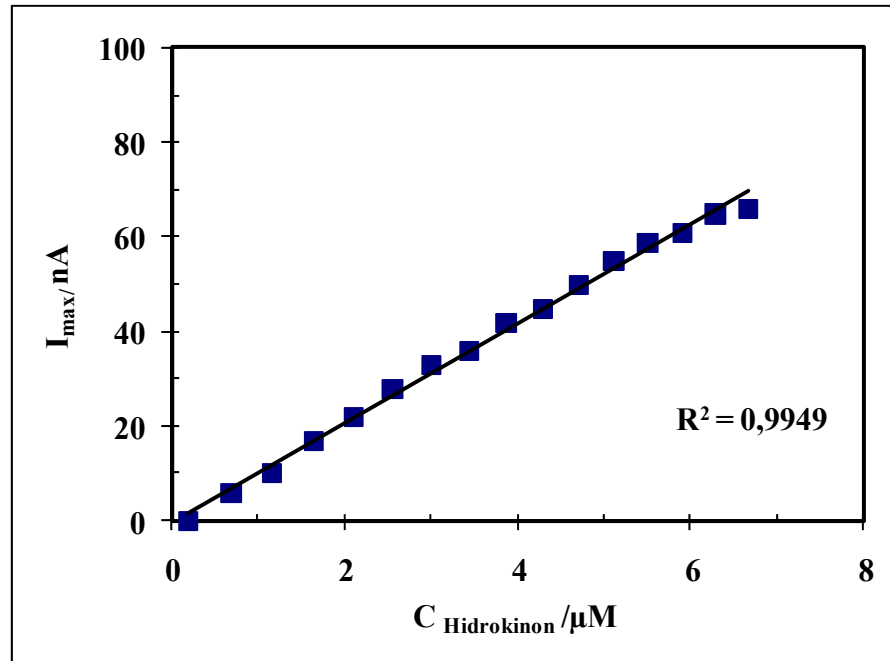
Şekil 4.23 (a). B enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinin konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg $(GMA-co-MTM)_2/\text{mL}$, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



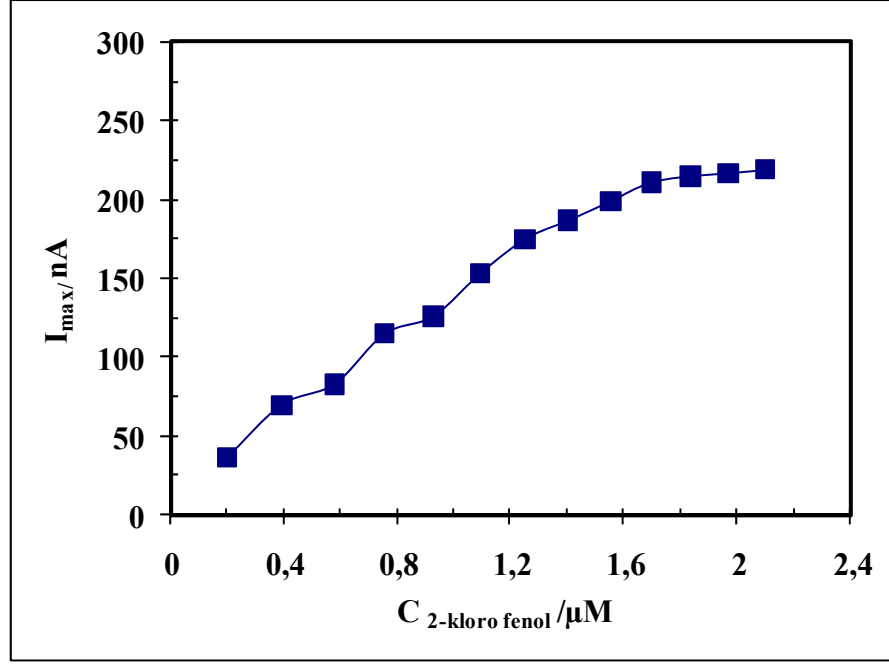
Şekil 4.23 (b). B enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinin konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



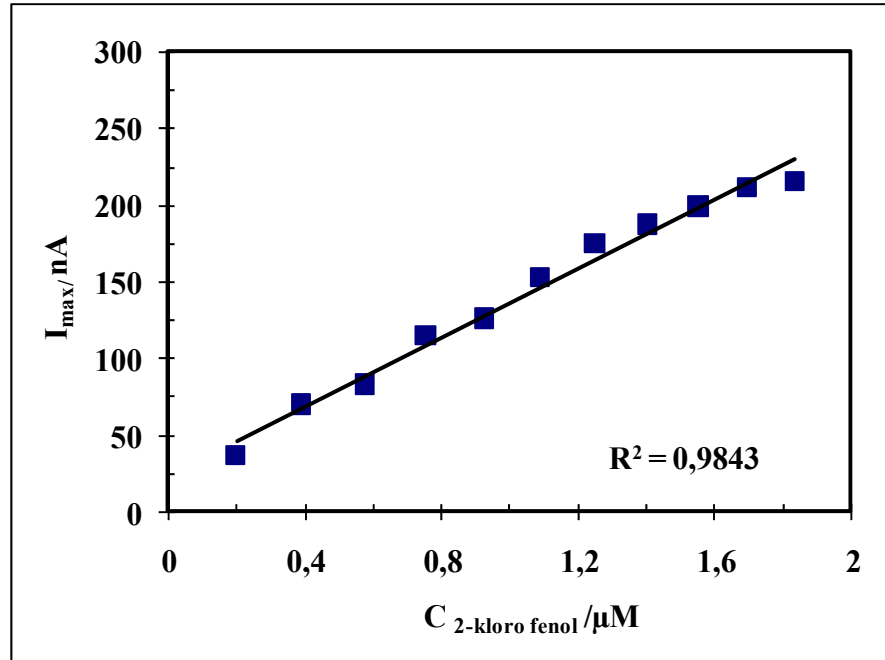
Şekil 4.24 (a). B enzim elektrot aktivitesinin hidrokinon konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg $(GMA-co-MTM)_2/\text{mL}$, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



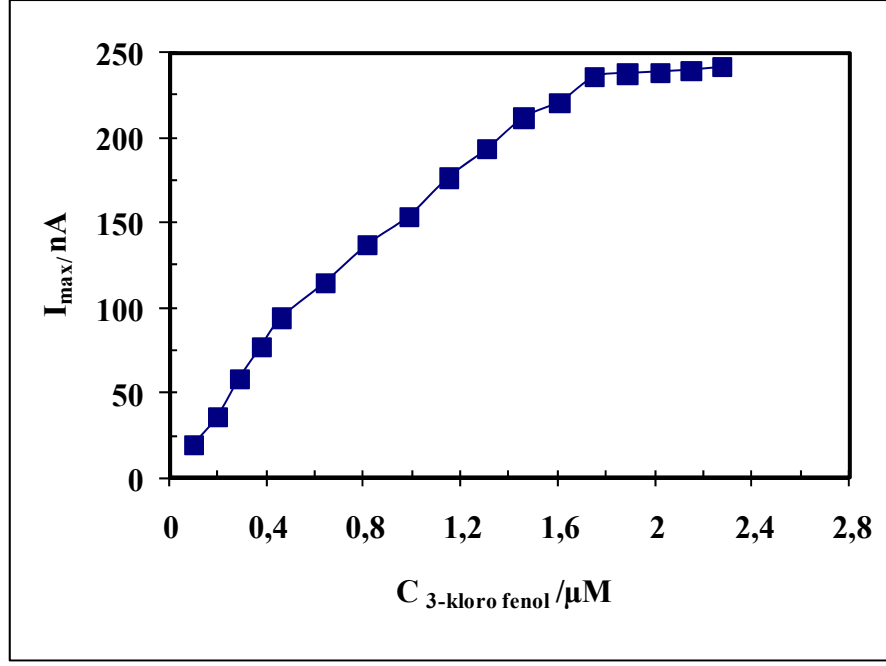
Şekil 4.24 (b). B enzim elektrot aktivitesinin hidrokinon konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



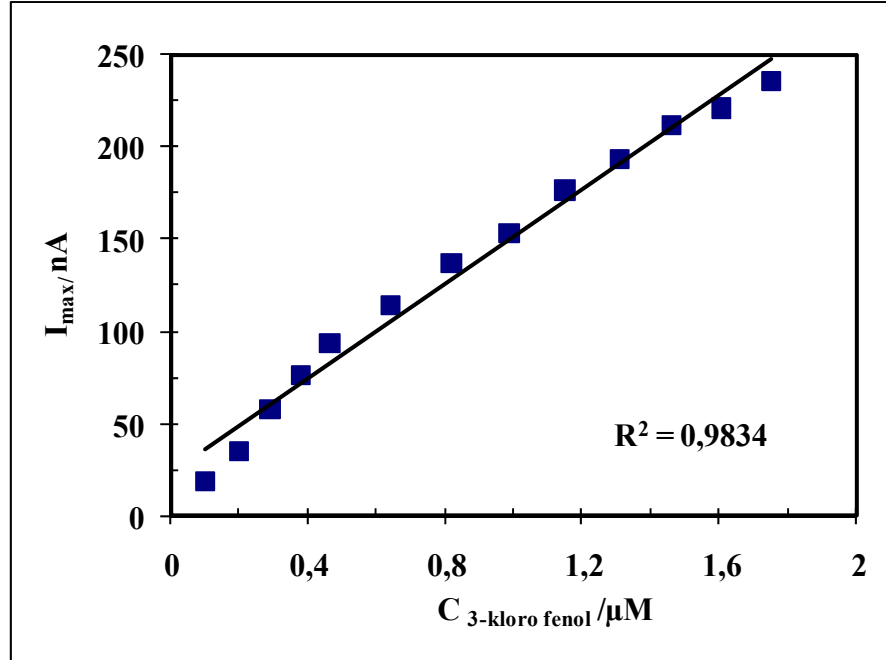
Şekil 4.25 (a). B enzim elektrot aktivitesinin 2-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg $(GMA\text{-}co\text{-}MTM)_2/\text{mL}$, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



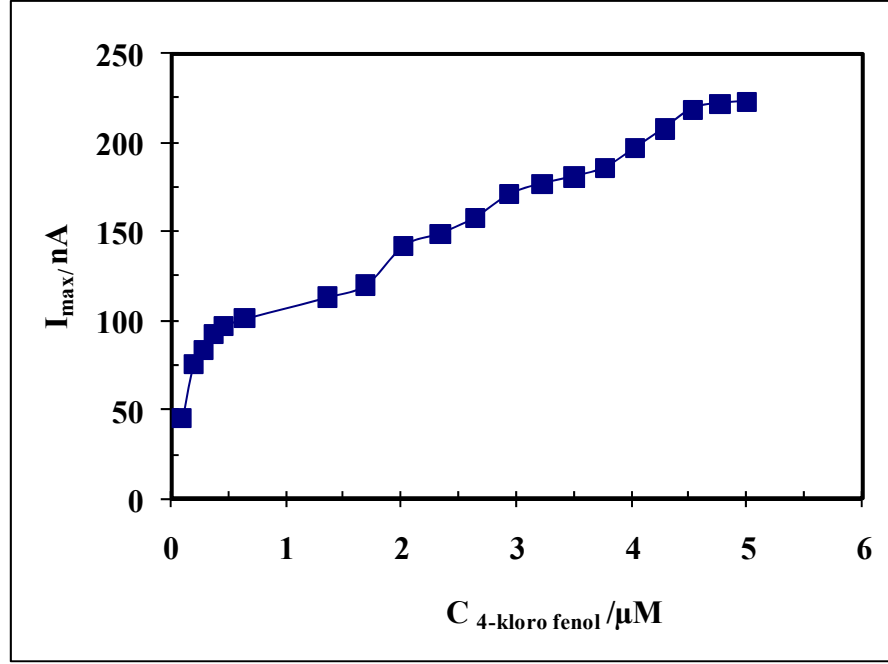
Şekil 4.25 (b). B enzim elektrot aktivitesinin 2-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



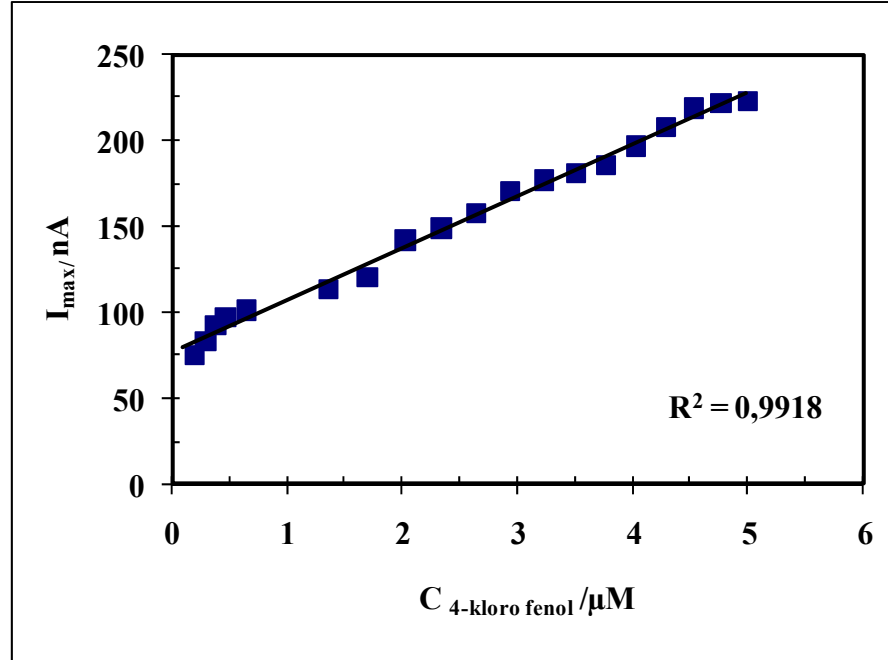
Şekil 4.26 (a). B enzim elektrot aktivitesinin 3-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg $(GMA\text{-}co\text{-}MTM)_2/\text{mL}$, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



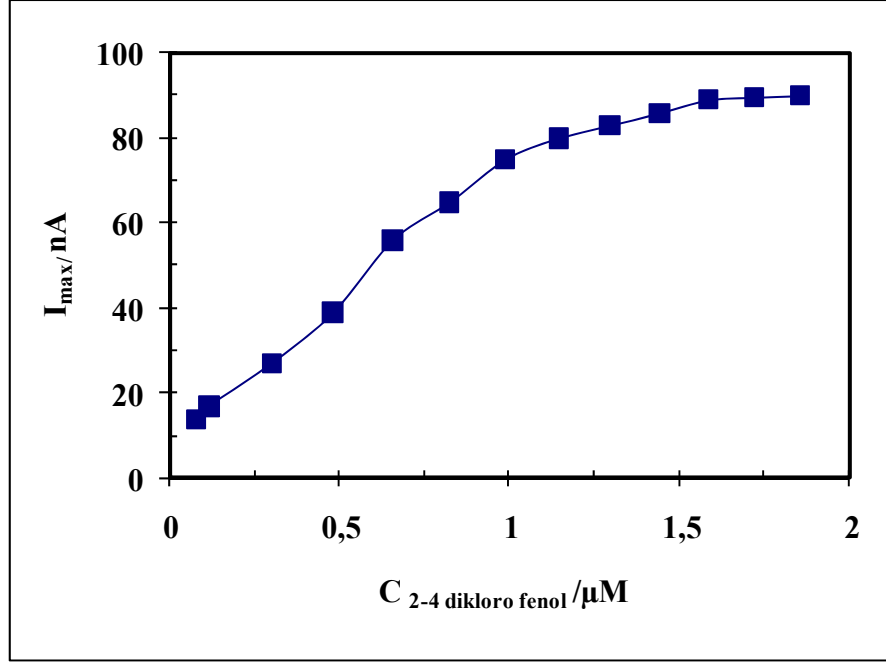
Şekil 4.26 (b). B enzim elektrot aktivitesinin 3-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



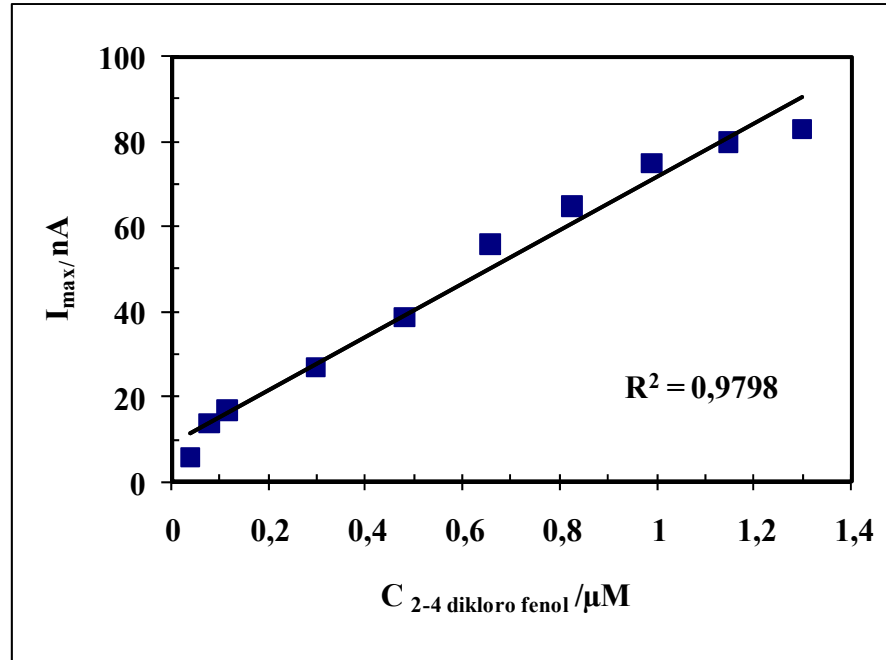
Şekil 4.27 (a). B enzim elektrot aktivitesinin 4-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₂/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



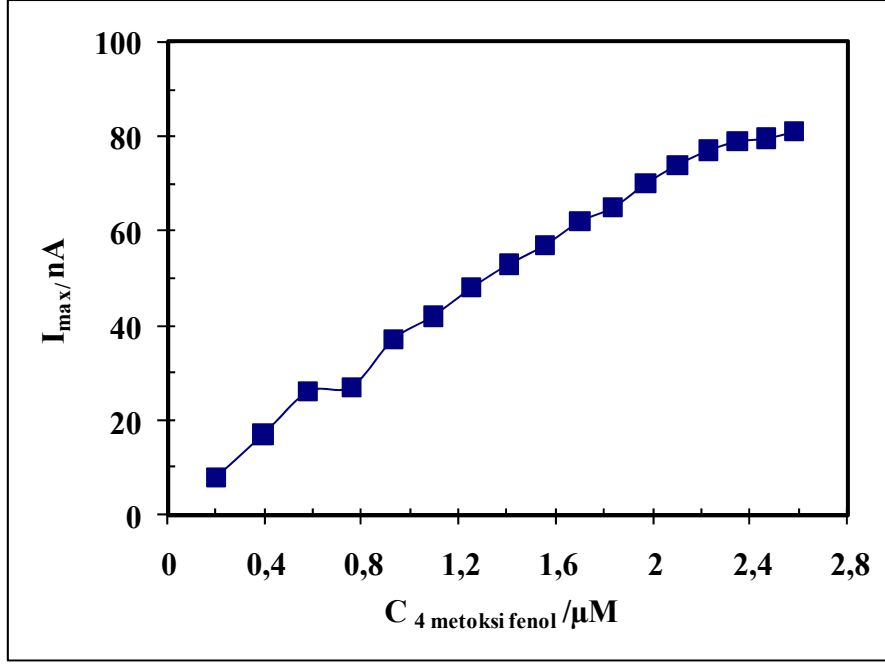
Şekil 4.27 (b). B enzim elektrot aktivitesinin 4-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



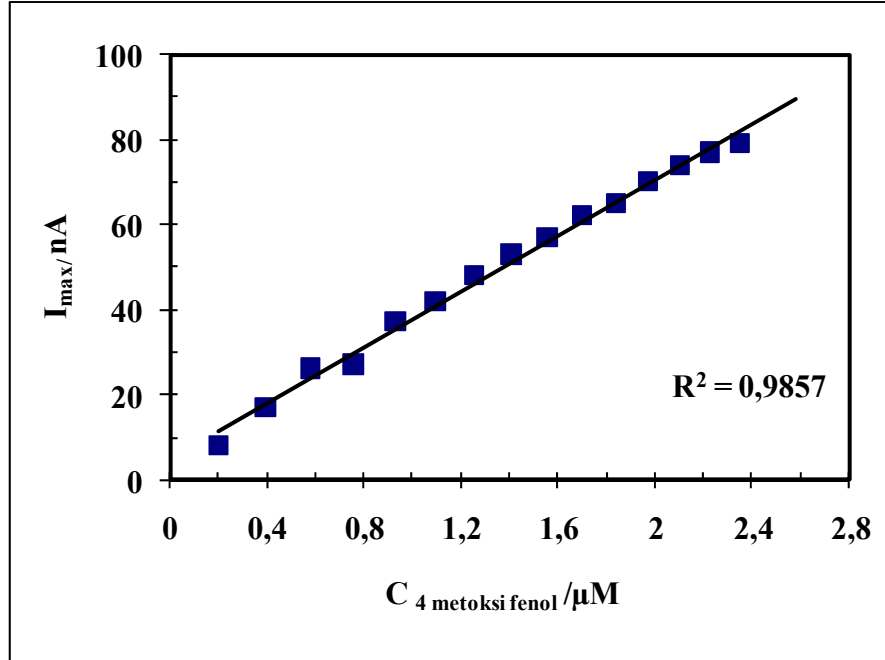
Şekil 4.28 (a). B enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₂/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



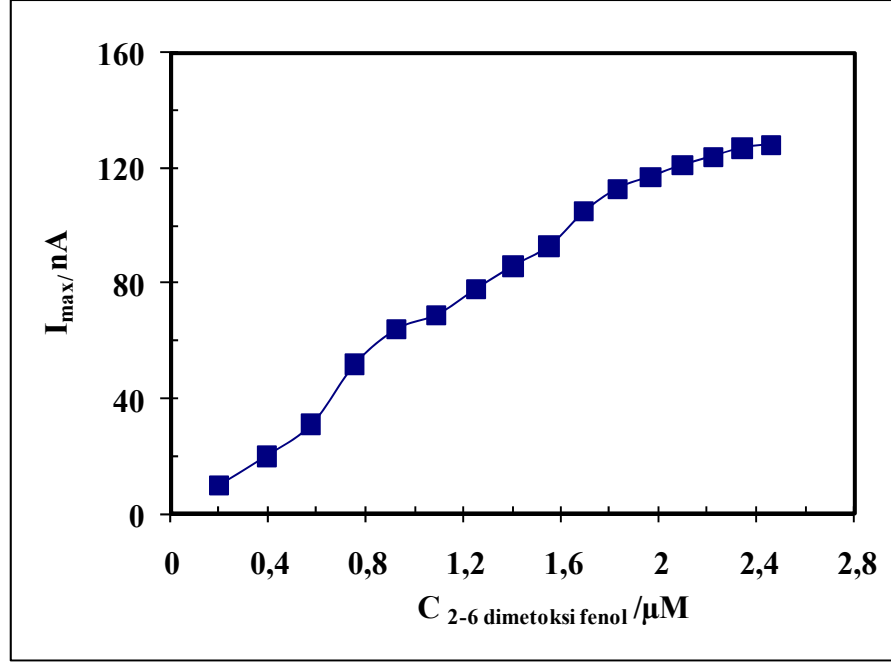
Şekil 4.28 (b). B enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı



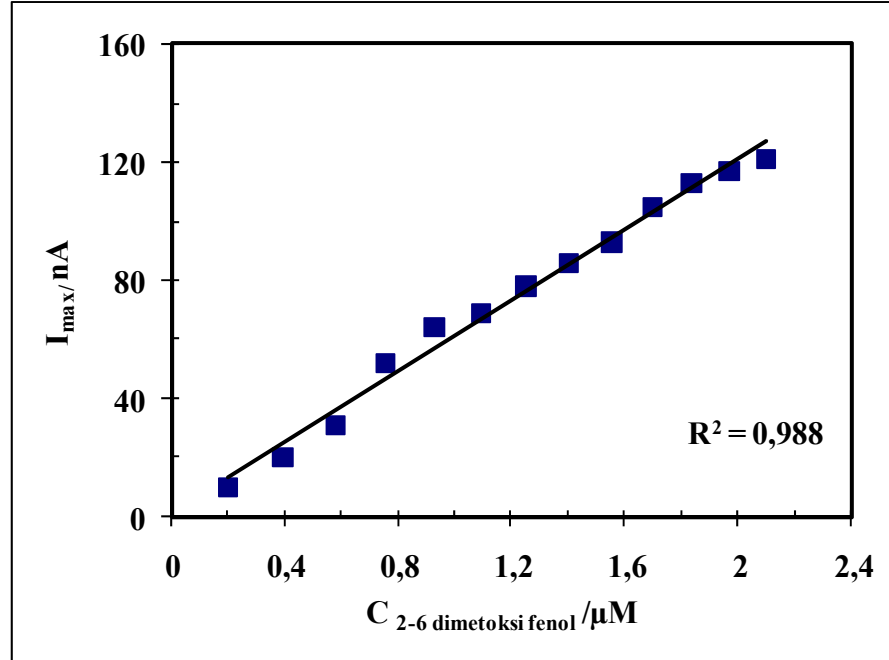
Şekil 4.29 (a). B enzim elektrot aktivitesinin 4-metoksi fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₂/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



Şekil 4.29 (b). B enzim elektrot aktivitesinin 4-metoksi fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



Şekil 4.30 (a). B enzim elektrot aktivitesinin 2-6 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₂/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



Şekil 4.30 (b). B enzim elektrot aktivitesinin 2-6 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.

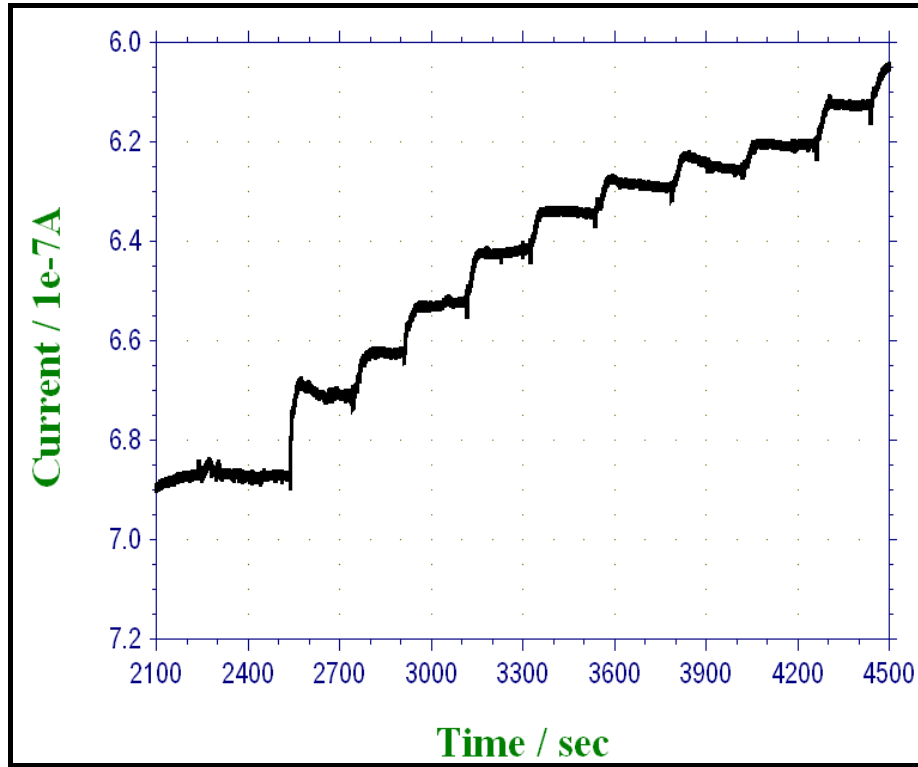
Hazırlanan $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ enzim elektroduna farklı fenolik substratların etkisi aşağıdaki Çizelge 4.2’de özetlenmiştir. $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ (B elektrodu) enzim elektrodunun fenolik türlere karşı hassaslığı 3 kloro fenol > 2-kloro fenol > 2,4-dikloro > 2,6-dimetoksi fenol > katekol > 4-metoksi fenol > 4-kloro fenol > fenol > hidrokinon > benzokinon sırasında azalmaktadır. Hazırlanan B elektrodunun klor içeren fenol türevlerine karşı oldukça hassas olduğu görülmüştür. Fenolik türler içinde en iyi hassasiyet 3 kloro fenol en düşük hassasiyet ise benzokinon için gözlenmiştir.

Çizelge 4.3. $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ (B elektrodu) enzim elektrodu ile elde edilen analitik parametreler

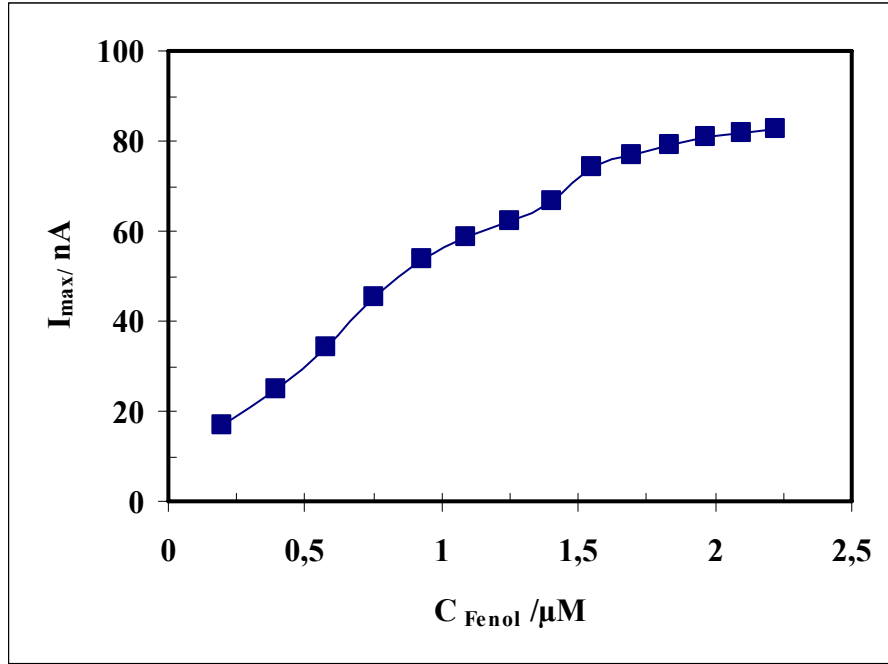
	Çalışma Aralığı (μM)	R ²	Hassaslık ($\mu M/nA$)	Standart Sapma (%)
<i>Fenol</i>	0.1–2.83	0.994	26.72	2.54
<i>Katekol</i>	0.1–2.22	0.99	43.04	1.45
<i>p-Benzokinon</i>	0.2–11.15	0.994	3.93	1.66
<i>Hidrokinon</i>	0.2–7.03	0.995	10.54	3.81
<i>2-Kloro fenol</i>	0.2–1.96	0.984	111.89	1.12
<i>3 Kloro fenol</i>	0.1–1.88	0.983	128.68	1.65
<i>4 Kloro fenol</i>	0.1–4.98	0.991	30.32	1.32
<i>2-4 Dikloro fenol</i>	0.04–1.29	0.979	62.86	2.10
<i>4 Metoksi fenol</i>	0.2–2.46	0.985	31.23	3.88
<i>2-6 Dimetoksi fenol</i>	0.2–2.22	0.988	60.03	2.42

4.3.2.3. $GC/(GMA-co-MTM)_3/TvLac$ (C elektrodu) Enzim Elektrot Aktivitesine Fenolik Türlerin Etkisinin İncelenmesi

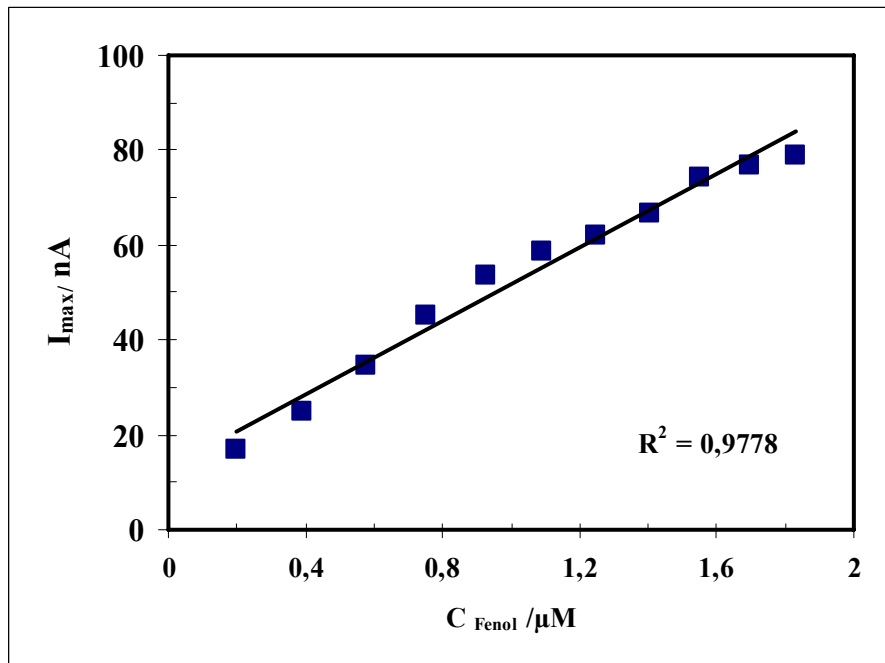
C enzim elektrodunun ($GC/(GMA-co-MTM)_3/TvLac$) maksimum aktivitesinin ve doğrusal çalışma aralığının saptanması için ölçülen akım değerlerine substrat derişimi etkisi incelenmiştir. Daha önce A enzim elektrodu ile saptanan optimum koşullarda (0,20 M pH 4.5 sitrat tamponunda ve 23°C sıcaklıkta) C elektrodunun farklı fenol derişimlerinde verdiği akım değerleri saptanmıştır. Şekil 4.31'de $GC/(GMA-co-MTM)_3/TvLac$ (C elektrodu) enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini gösteren akım zaman eğrisi verilmiştir. C elektrodunda da fenol, katekol, hidrokinon, 2-kloro fenol, 3- kloro fenol, 4- kloro fenol, 2-4 diklorofenol, 4 metoksi fenol, 2-6 dimetoksi fenol gibi çeşitli fenolik türlerin konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. Aşağıda her bir fenolik tür için ölçülen akım değerlerinin fenolik türlerin konsantrasyonu ile değişimi verilmiştir.



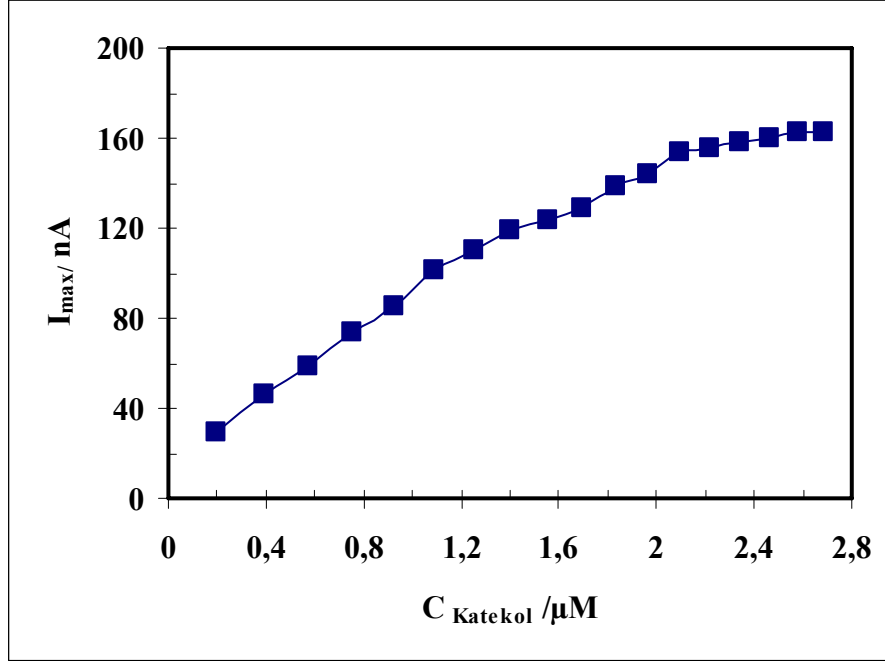
Şekil 4.31. $GC/(GMA-co-MTM)_3/TvLac$ (C elektrodu) enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini gösteren akım zaman eğrisi.



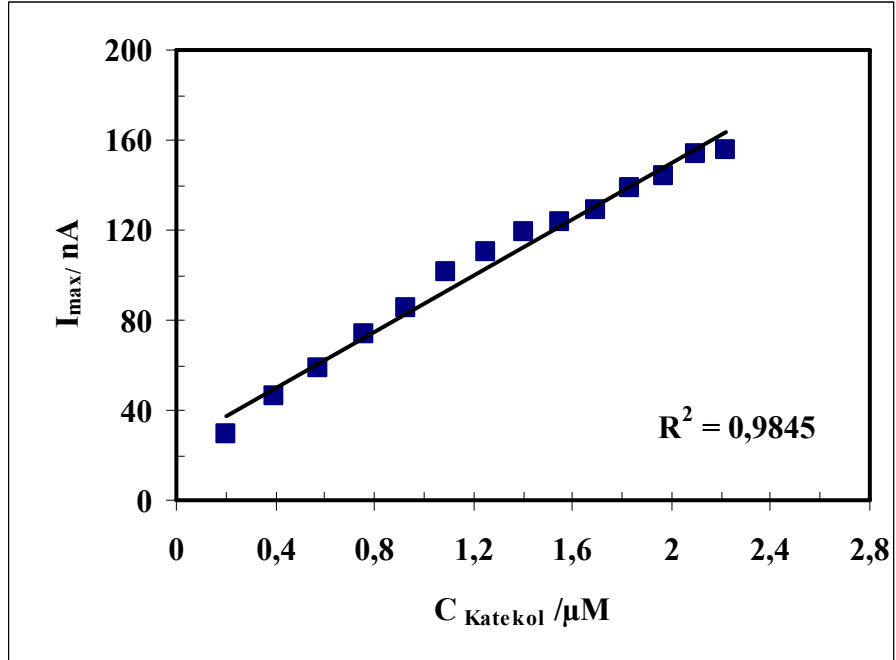
Şekil 4.32 (a). C enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg $(GMA-co-MTM)_3/\text{mL}$, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



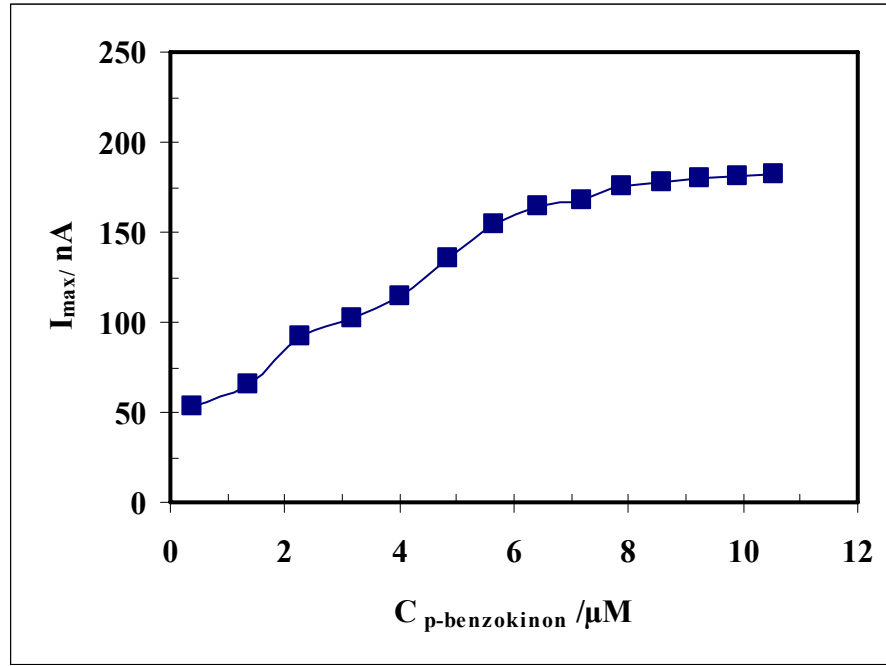
Şekil 4.32 (b). C enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



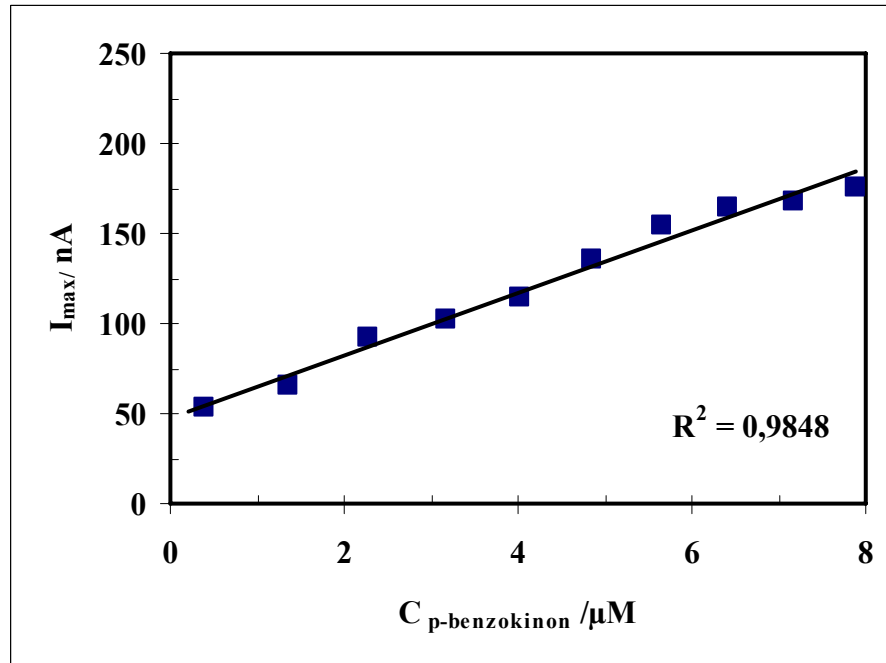
Şekil 4.33 (a). C enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₃/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



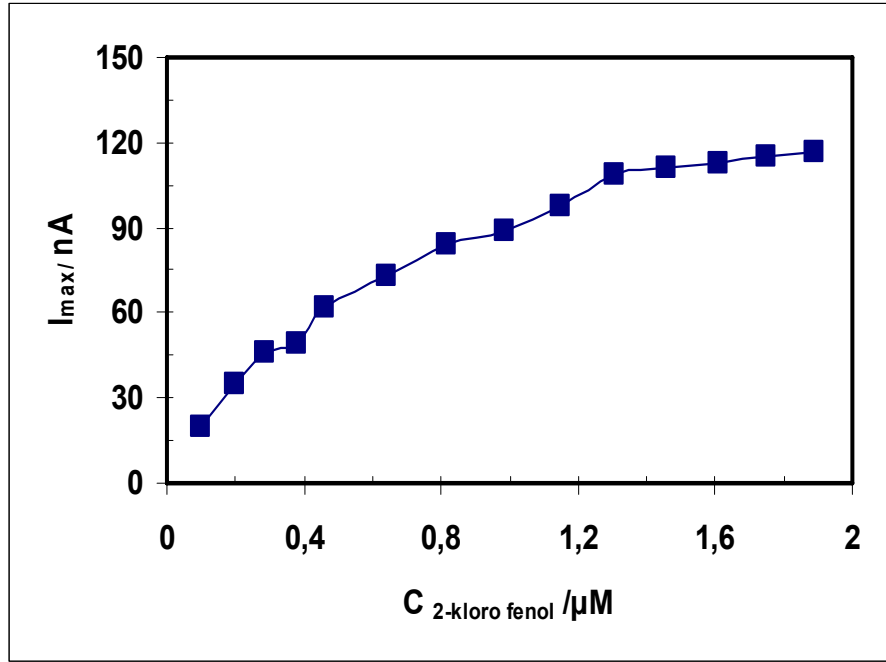
Şekil 4.33 (b). C enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



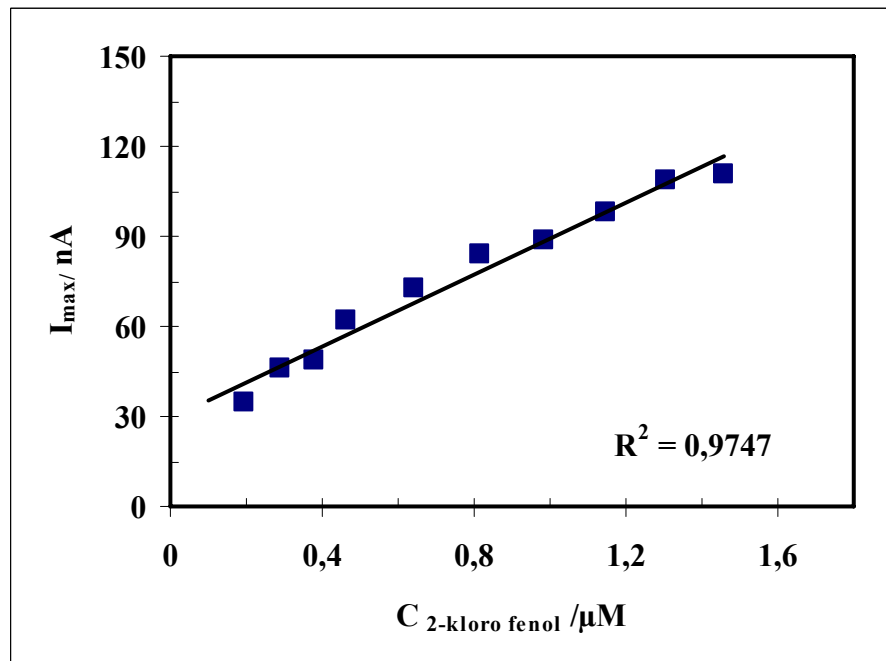
Şekil 4.34 (a). C enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinin konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₃/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



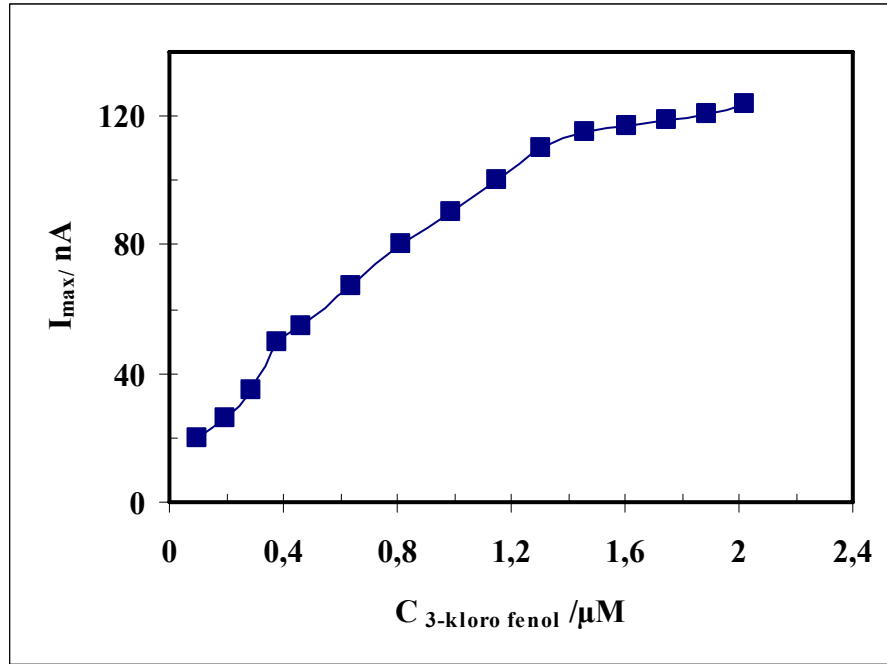
Şekil 4.34 (b). C enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinin konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



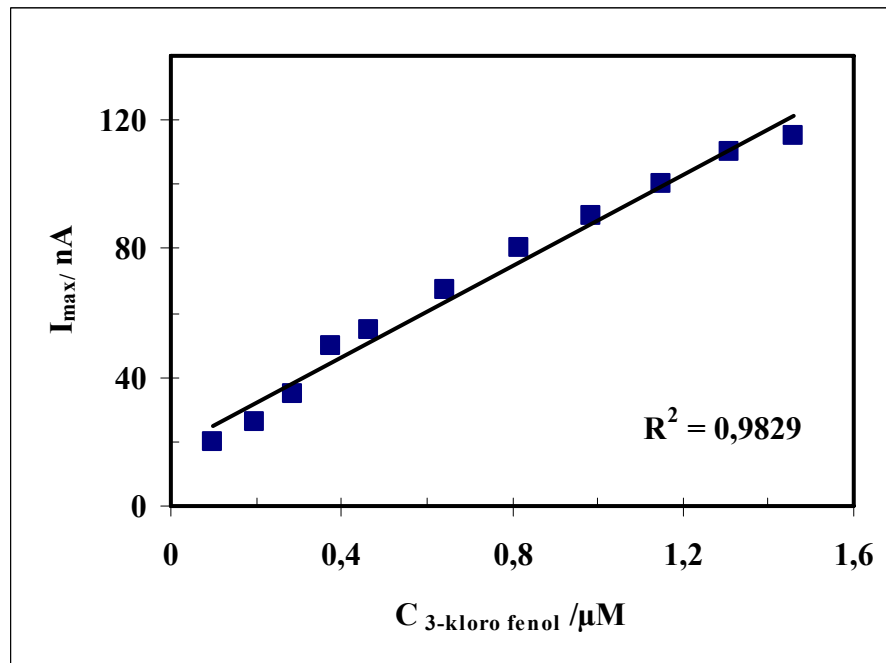
Şekil 4.35 (a). C enzim elektrot aktivitesinin 2-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₃/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



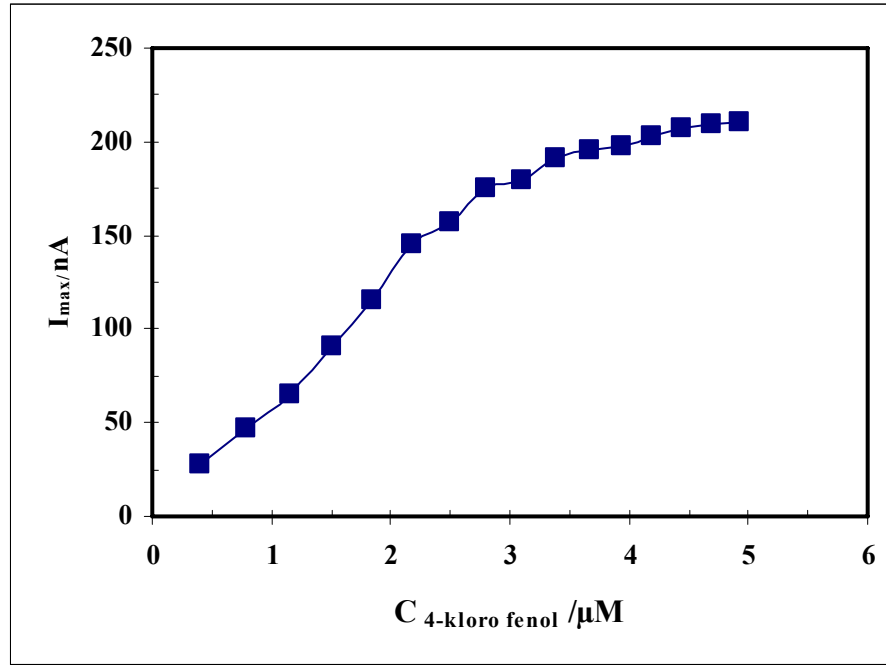
Şekil 4.35 (b). C enzim elektrot aktivitesinin 2-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



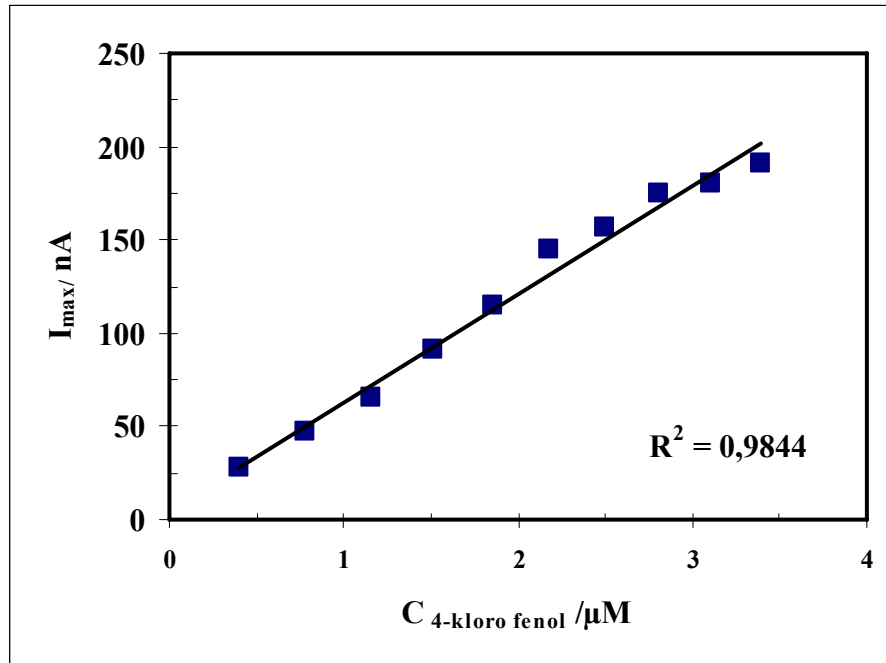
Şekil 4.36 (a). C enzim elektrot aktivitesinin 3-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₃/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



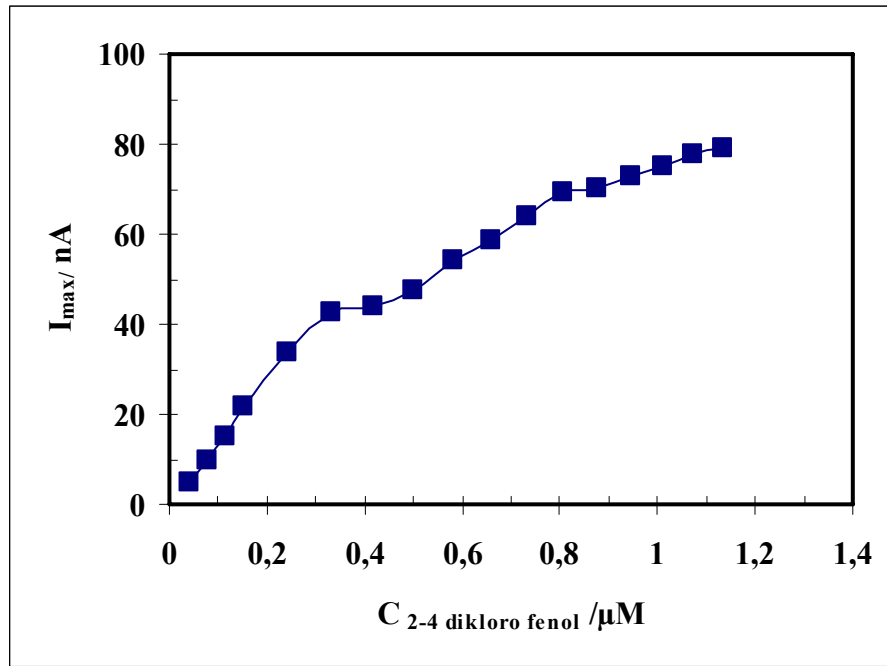
Şekil 4.36 (b). C enzim elektrot aktivitesinin 3-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



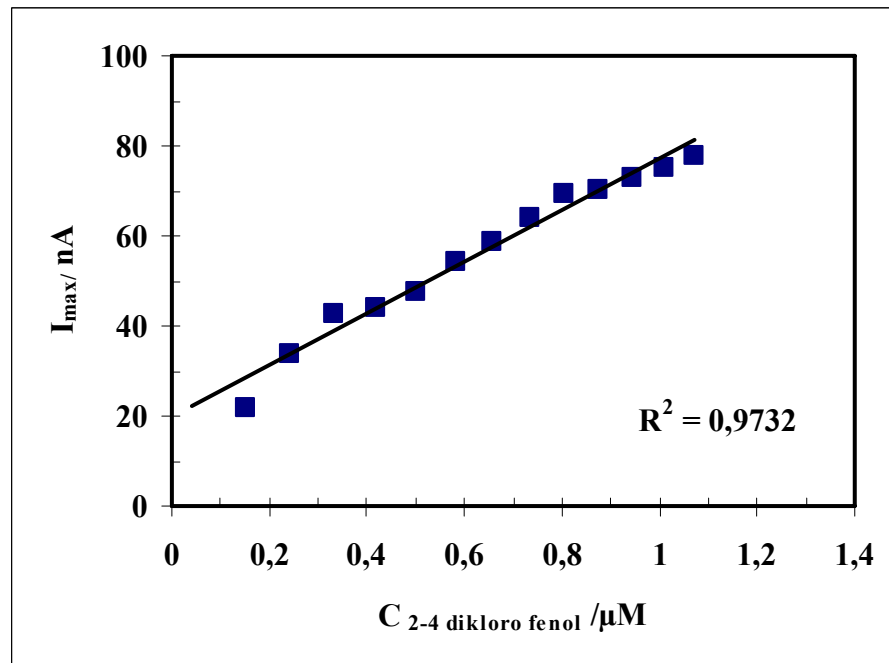
Şekil 4.37 (a). C enzim elektrot aktivitesinin 4-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₃/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



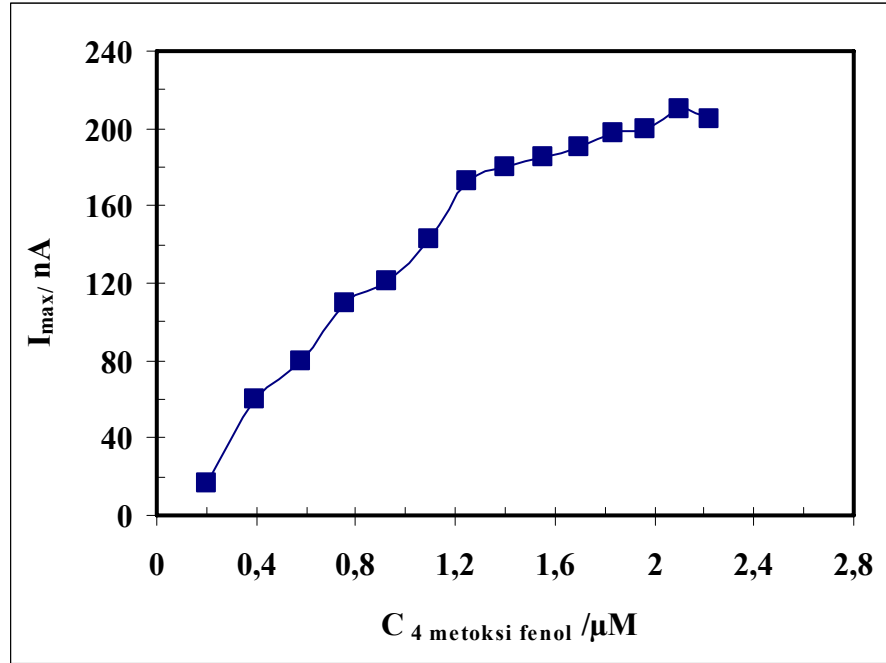
Şekil 4.37 (b). C enzim elektrot aktivitesinin 4-kloro fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



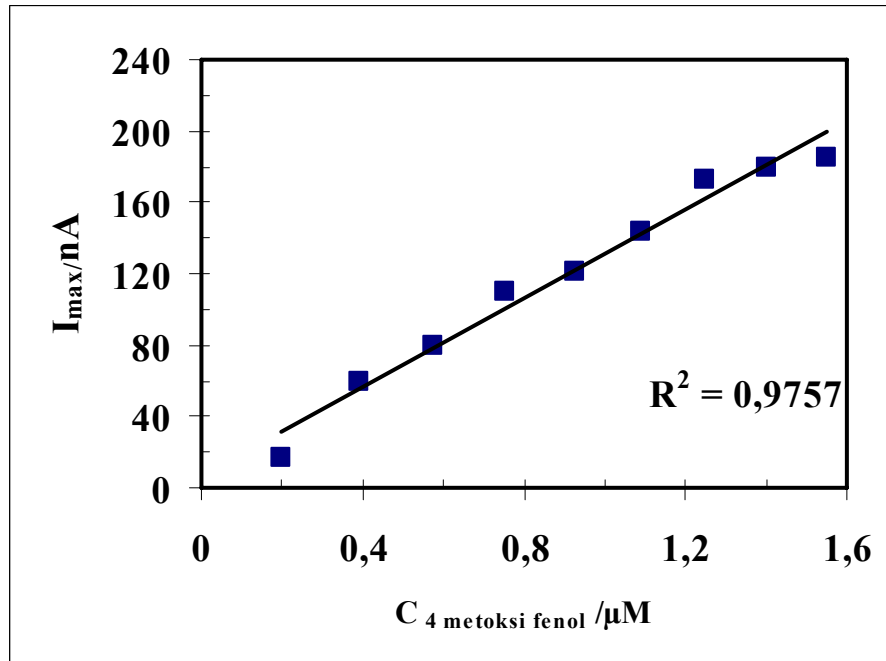
Şekil 4.38 (a). C enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4,5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₃/mL, 3,0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



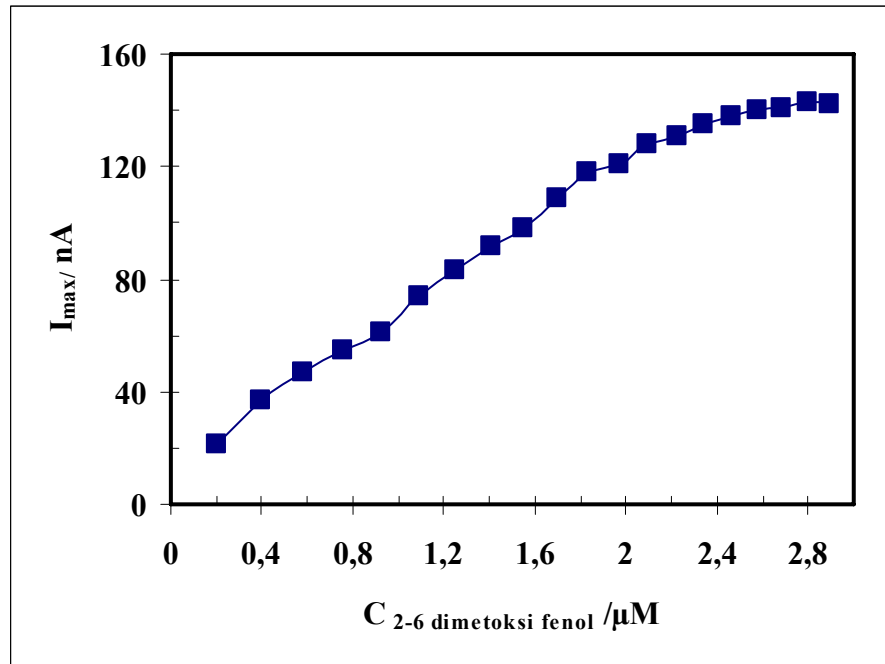
Şekil 4.38 (b). C enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



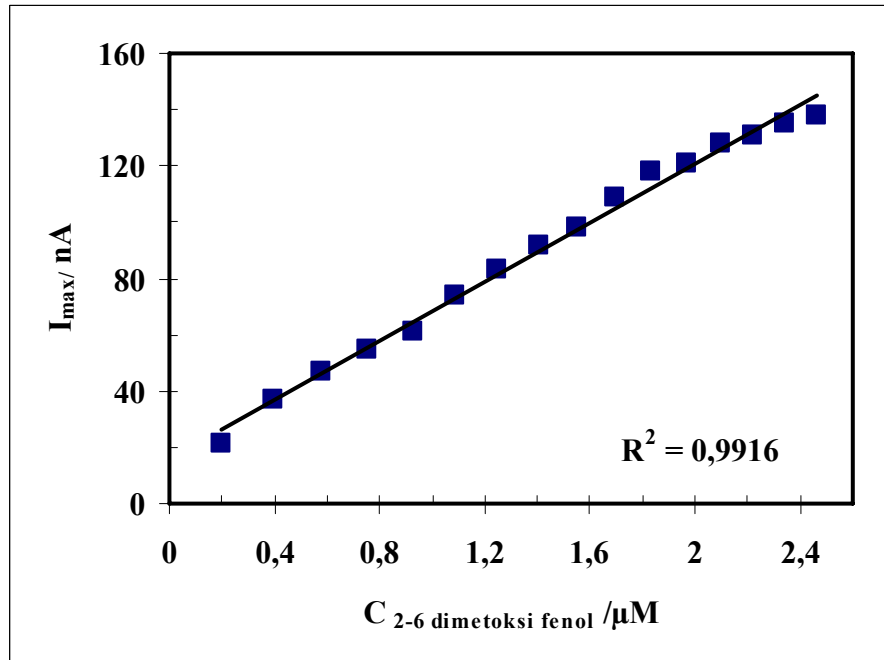
Şekil 4.39 (a). C enzim elektrot aktivitesinin 4 metoksi fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₃/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



Şekil 4.39 (b). C enzim elektrot aktivitesinin 4 metoksi fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



Şekil 4.40 (a). C enzim elektrot aktivitesinin 2–4 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₃/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



Şekil 4.40 (b). C enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.

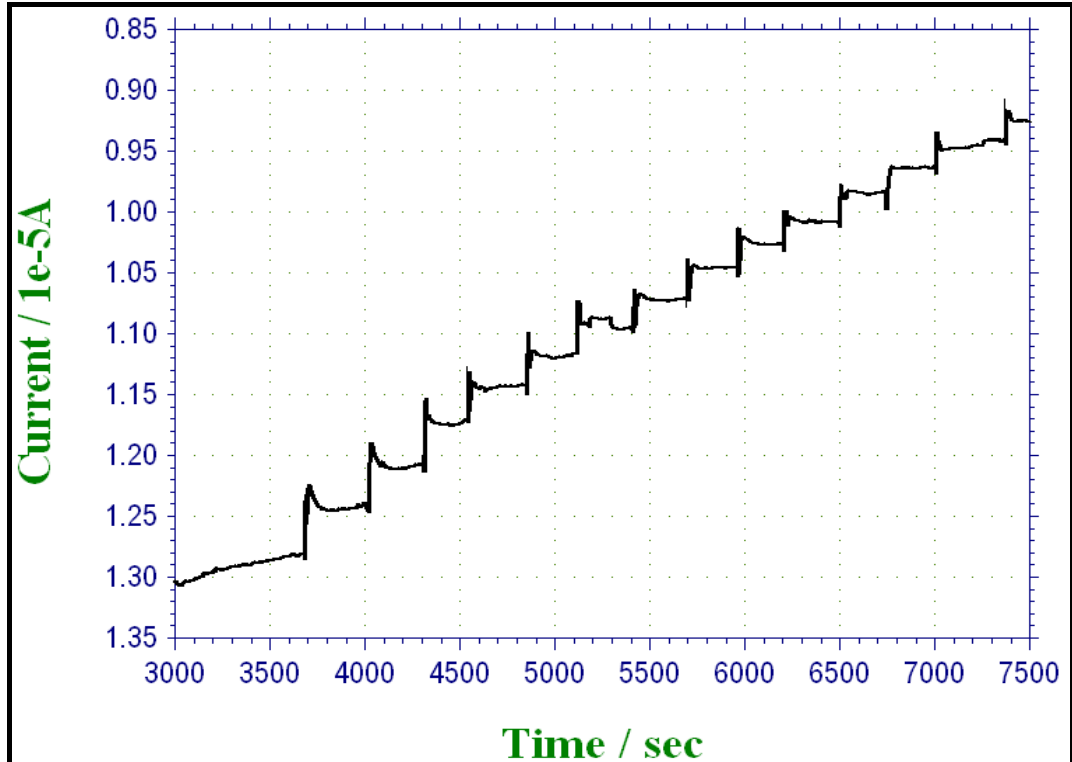
Hazırlanan $GC/(GMA-co-MTM)_3/TvLac$ enzim elektroduna farklı fenolik substratların etkisi aşağıdaki Çizelge 4.3’de özetlenmiştir. $GC/(GMA-co-MTM)_3/TvLac$ (C elektrodu) enzim elektrodunun fenolik türlere karşı hassaslığı *4-metoksi fenol* > *3 kloro fenol* > *katekol* > *2-kloro fenol* > *4 kloro fenol* > *2,4-dikloro* > *2,6-dimetoksi fenol* > *fenol* > *benzokinon* sırasında azalmaktadır. Hazırlanan C elektrodunun klor ve metoksi içeren fenol türevlerine karşı oldukça hassas olduğu görülmüştür. Fenolik türler içinde en iyi hassasiyet 4 metoksi fenol en düşük hassasiyet ise benzokinon için gözlenmiştir.

Çizelge 4.4. $GC/(GMA-co-MTM)_3/TvLac$ (C elektrodu) enzim elektrodu ile elde edilen analitik parametreler

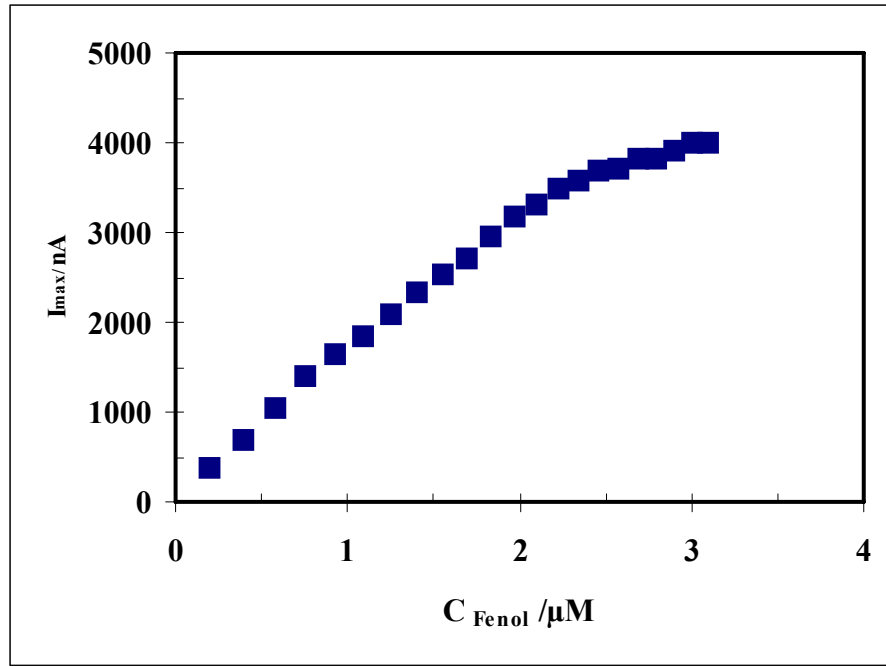
	Çalışma aralığı (μM)	R^2	Hassaslık ($\mu M/nA$)	Standart sapma (%)
<i>Fenol</i>	0.2–1.96	0.977	36.79	2.32
<i>Katekol</i>	0.1–2.34	0.984	62.26	1.53
<i>Benzokinon</i>	0.39–7.89	0.984	17.24	2.12
<i>2-kloro fenol</i>	0.19–1.60	0.974	59.79	1.78
<i>3 kloro fenol</i>	0.1–1.60	0.982	71.12	1.53
<i>4 kloro fenol</i>	0.4–3.66	0.984	58.26	1.46
<i>2,4-dikloro fenol</i>	0.15–1.13	0.973	57.31	1.15
<i>4 metoksi fenol</i>	0.2–1.69	0.975	124.22	3.04
<i>2,6-dimetoksi fenol</i>	0.2–2.57	0.991	52.57	3.11

4.3.2.4. $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ (D elektrodu) Enzim Elektrot Aktivitesine Fenolik Türlerin Etkisinin İncelenmesi

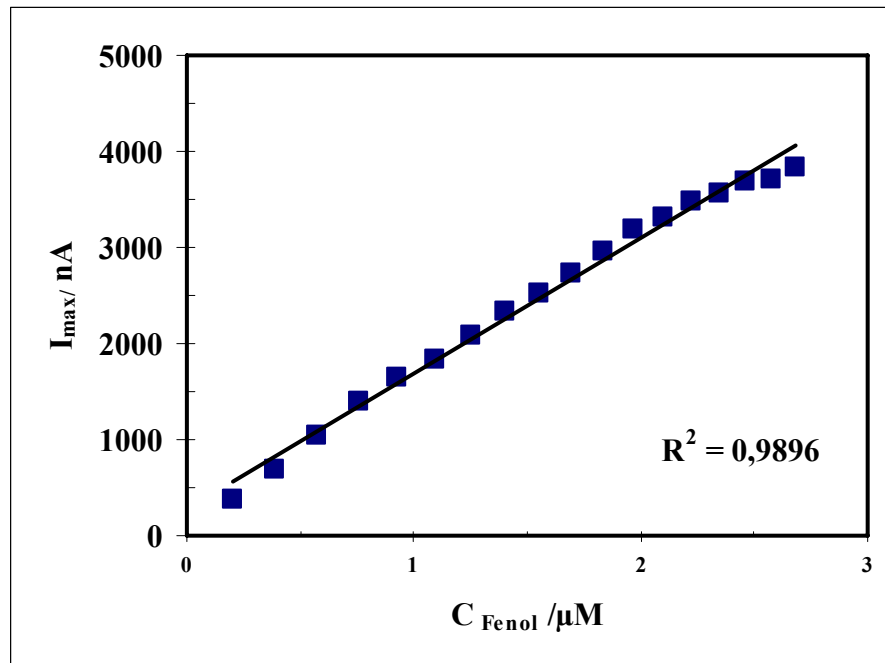
$GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ (D elektrodu) enzim elektrodunun hazırlanmasında $(GMA-co-MTM)_2$ kopolimeri kullanılmıştır. Öncelikle GC elektrot bu kopolimerle kaplanmış $(GC/(GMA-co-MTM)_2)$ daha sonra bu yüzeyde karbon nano tüp (CNT) biriktirilmiştir. Hazırlanan D elektrodu ile yapılan çalışmalarda, A elektrodu $(GC/(GMA-co-MTM)_1//TvLac)$ ile elde edilen optimum koşullar kullanılmıştır. D enzim elektrodunda da *fenol*, *katekol*, *hidrokinon*, *2-kloro fenol*, *3-kloro fenol*, *4-kloro fenol*, *2-4 diklorofenol*, *4 metoksi fenol*, *2-6 dimetoksi fenol* gibi çeşitli fenolik türlerin konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. Şekil 4.41’de $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ (D elektrodu) enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini gösteren akım zaman eğrisi verilmiştir. Aşağıda her bir fenolik tür için ölçülen akım değerlerinin fenolik türlerin konsantrasyonu ile değişimi verilmiştir.



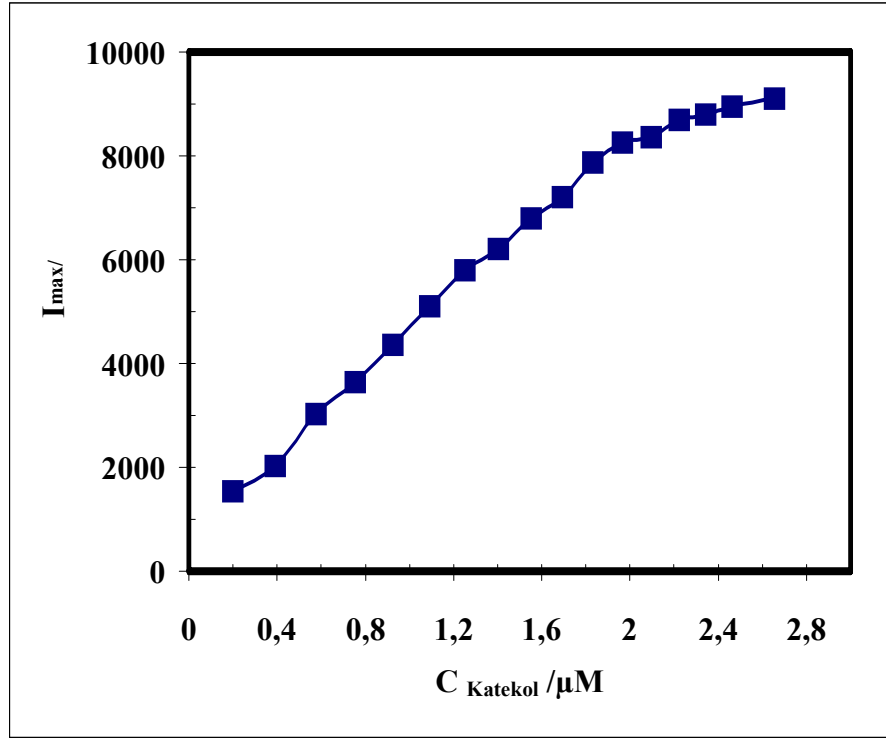
Şekil 4.41. $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ (D elektrodu) enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini gösteren akım zaman eğrisi.



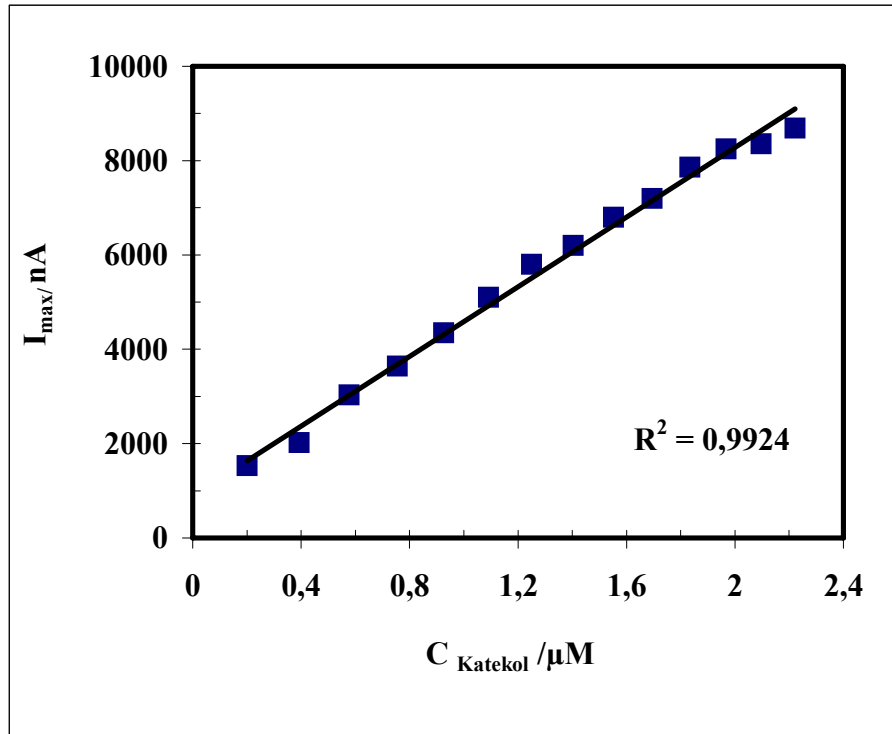
Şekil 4.42 (a). D enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₂/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



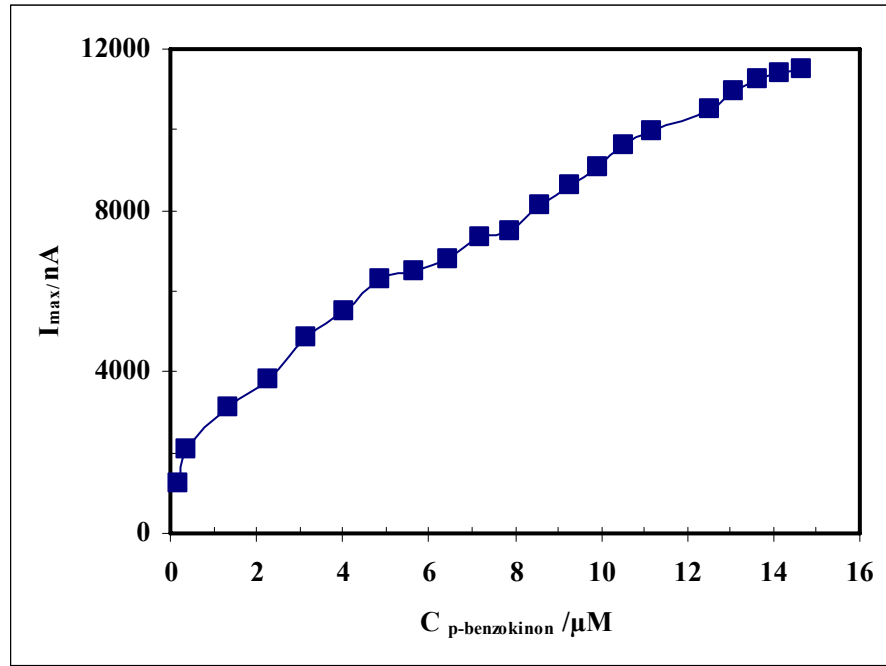
Şekil 4.42 (b). D enzim elektrot aktivitesinin fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı



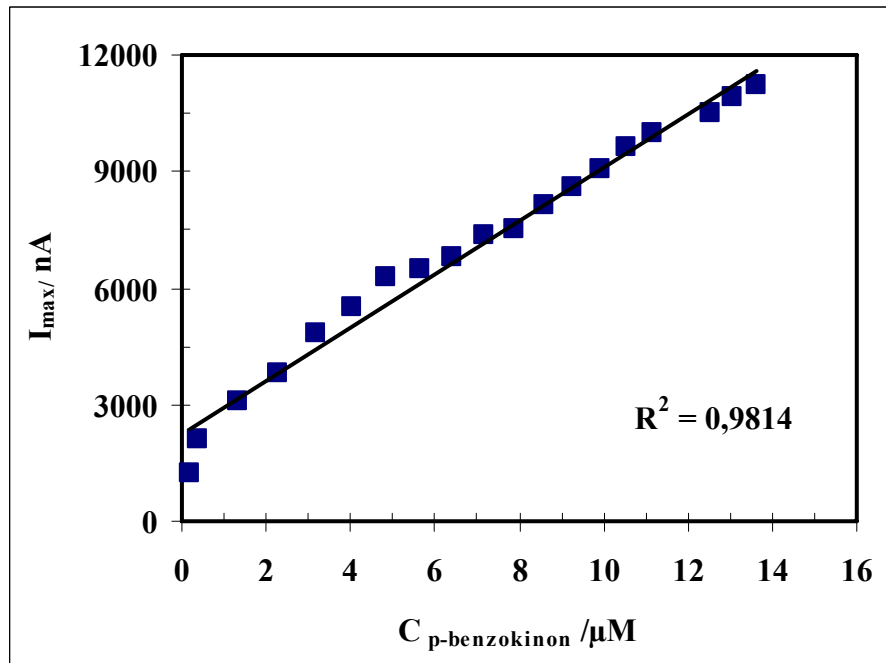
Şekil 4.43 (a). D enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₂/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



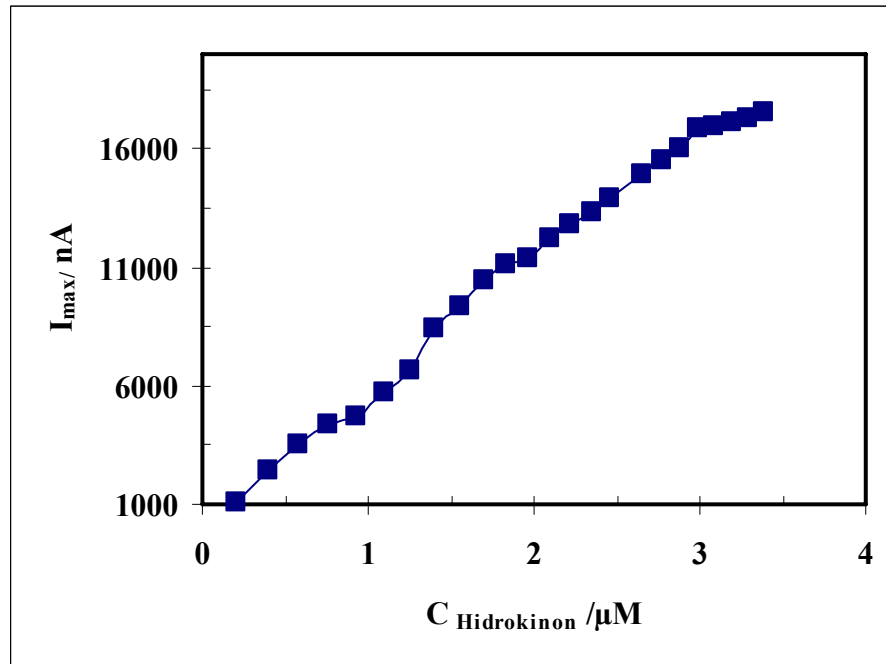
Şekil 4.43 (b). D enzim elektrot aktivitesinin katekol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



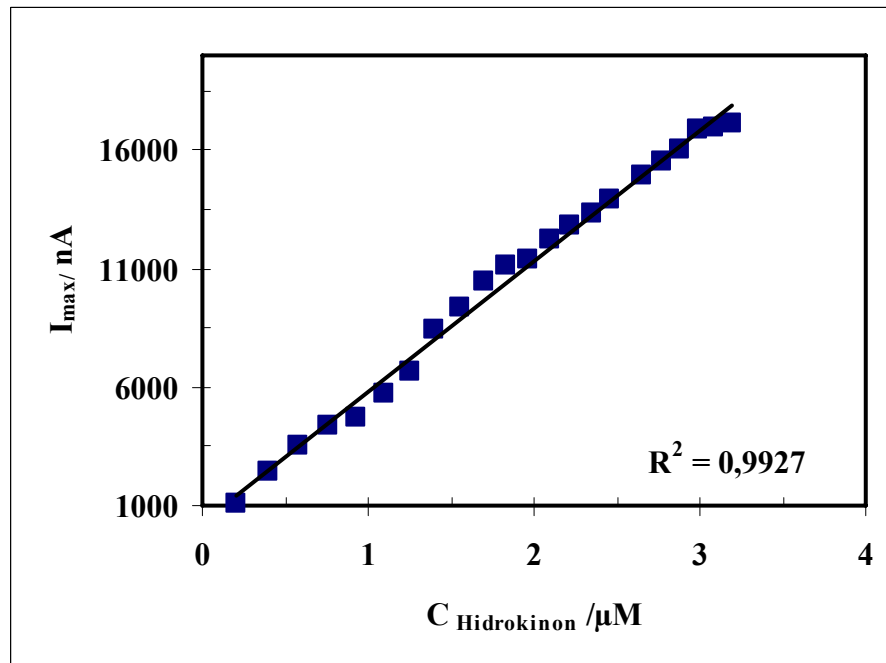
Şekil 4.44 (a). D enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinin konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg $(GMA\text{-}co\text{-}MTM)_2/\text{mL}$, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



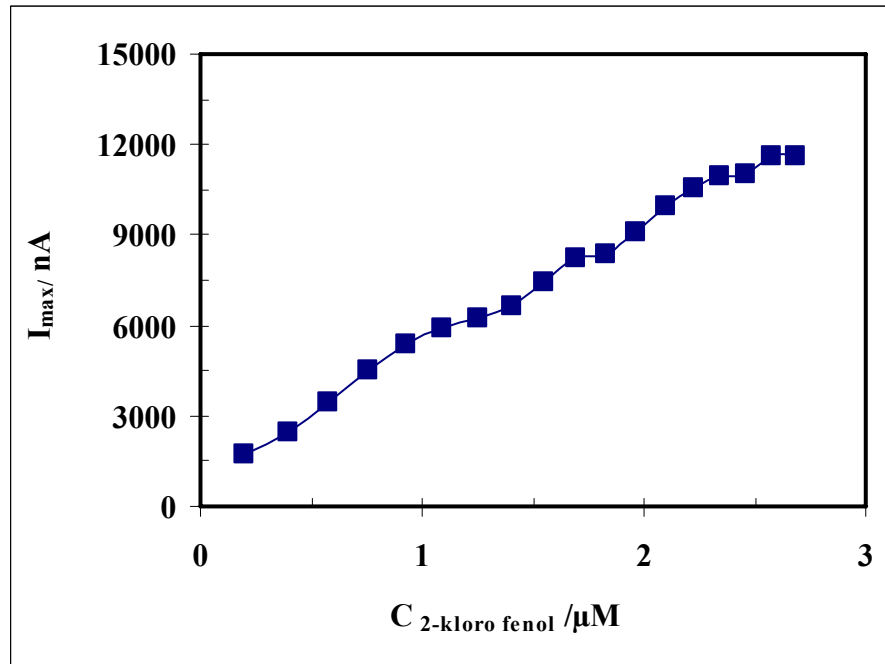
Şekil 4.44 (b). D enzim elektrot aktivitesinin p-benzokinin konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



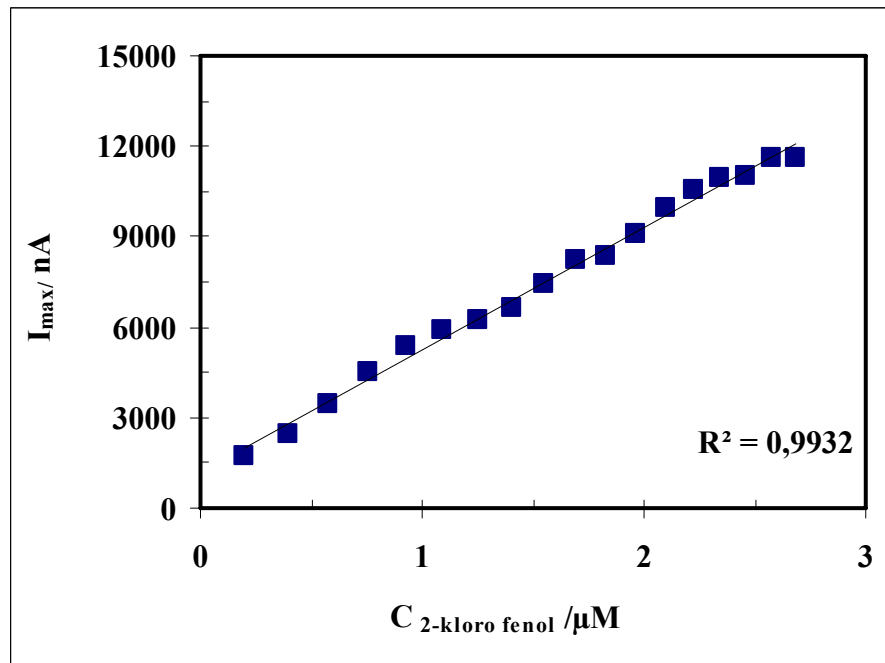
Şekil 4.45 (a). D enzim elektrot aktivitesinin hidrokinon konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg $(GMA-co-MTM)_2/\text{mL}$, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



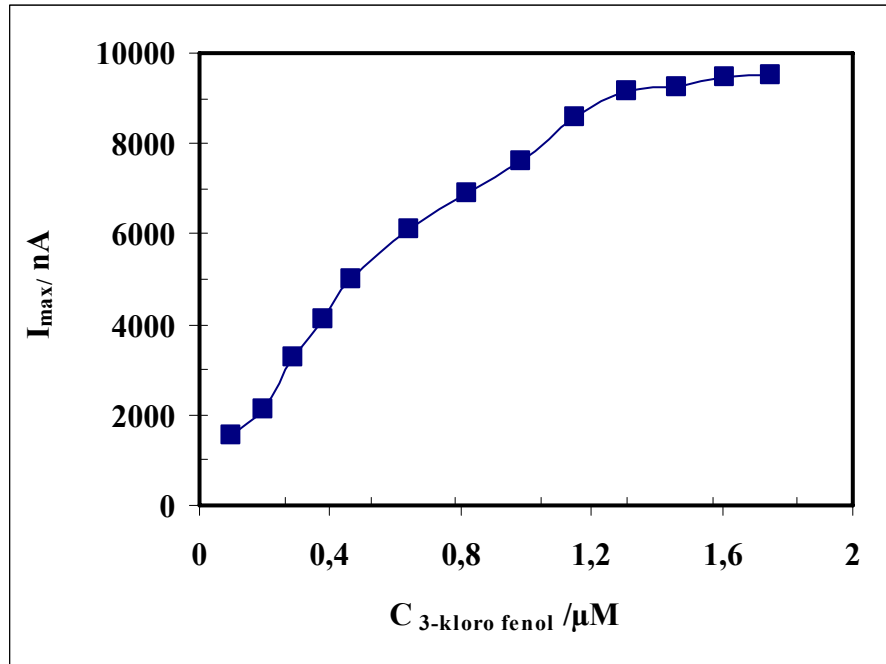
Şekil 4.45 (b). D enzim elektrot aktivitesinin hidrokinon konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı



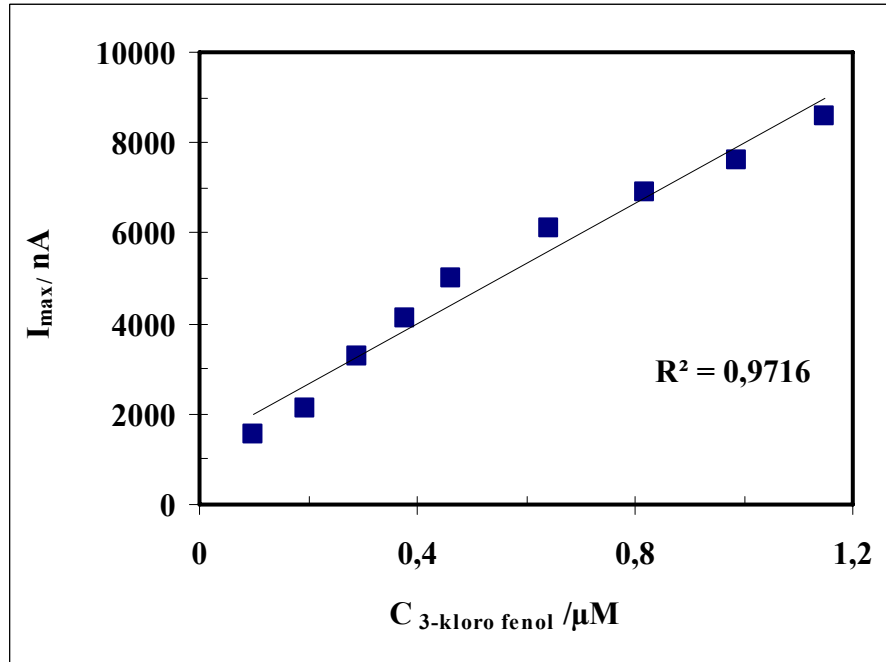
Şekil 4.46 (a). D enzim elektrot aktivitesinin 2 kloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg $(GMA\text{-}co\text{-}MTM)_2/\text{mL}$, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



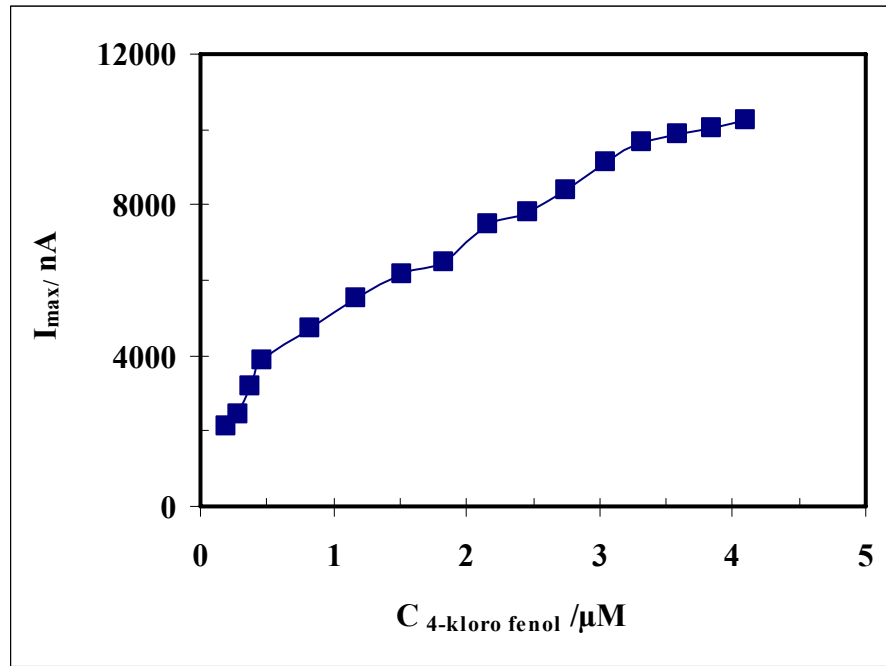
Şekil 4.46 (b). D enzim elektrot aktivitesinin 2 kloro fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



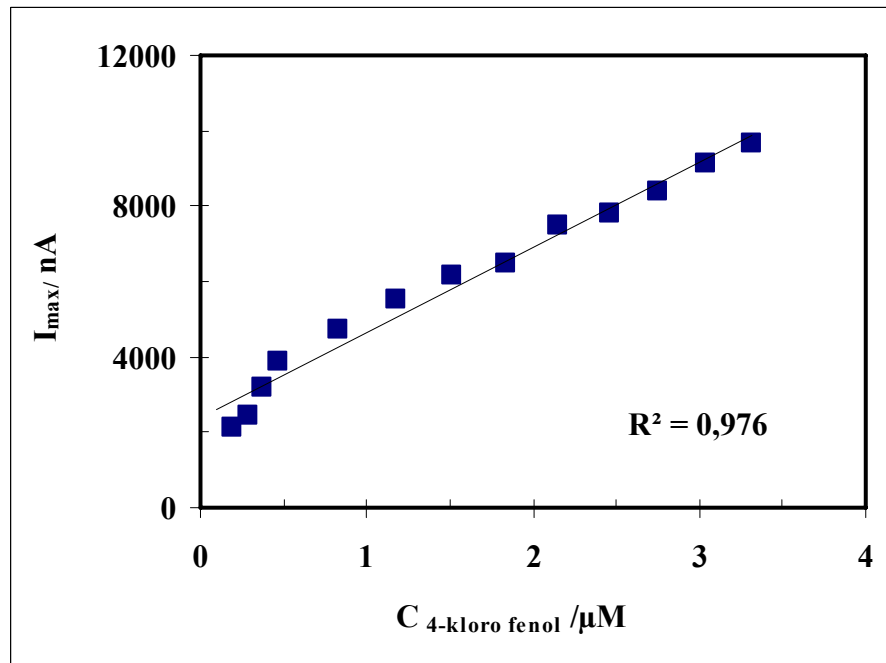
Şekil 4.47 (a). D enzim elektrot aktivitesinin 3 kloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₂/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



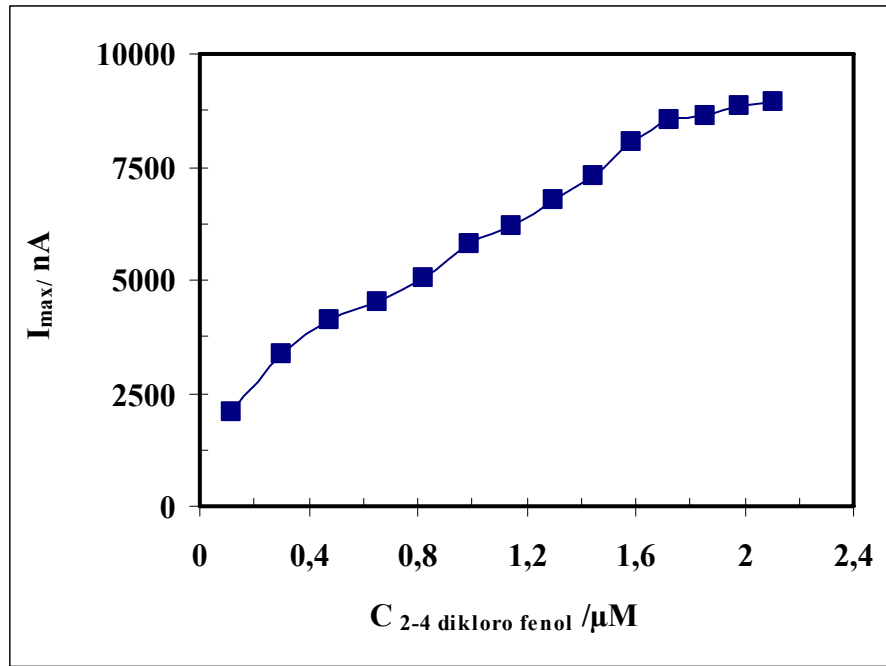
Şekil 4.47 (b). D enzim elektrot aktivitesinin 3 kloro fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



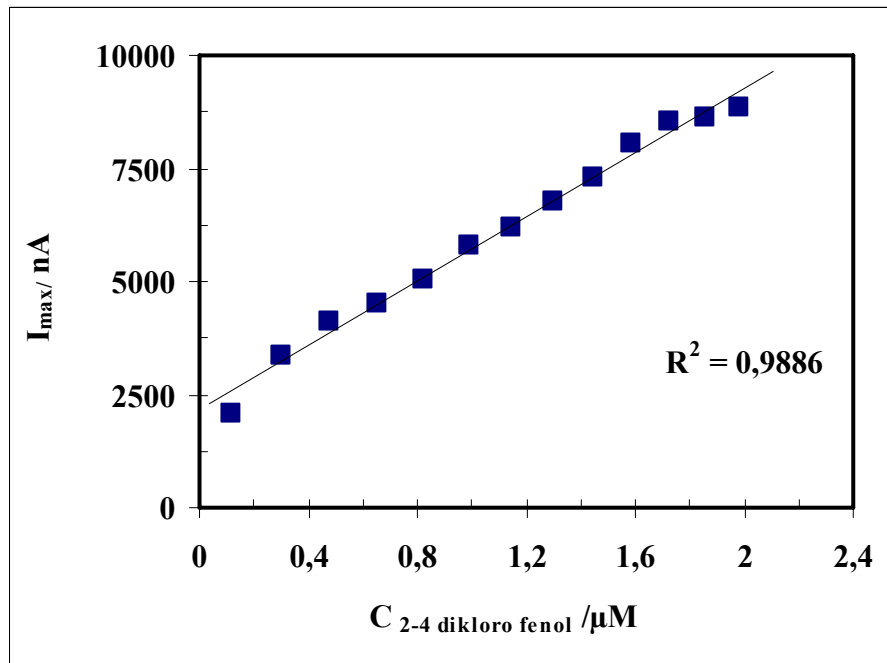
Şekil 4.48 (a). D enzim elektrot aktivitesinin 4 kloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg $(GMA\text{-}co\text{-}MTM)_2/\text{mL}$, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



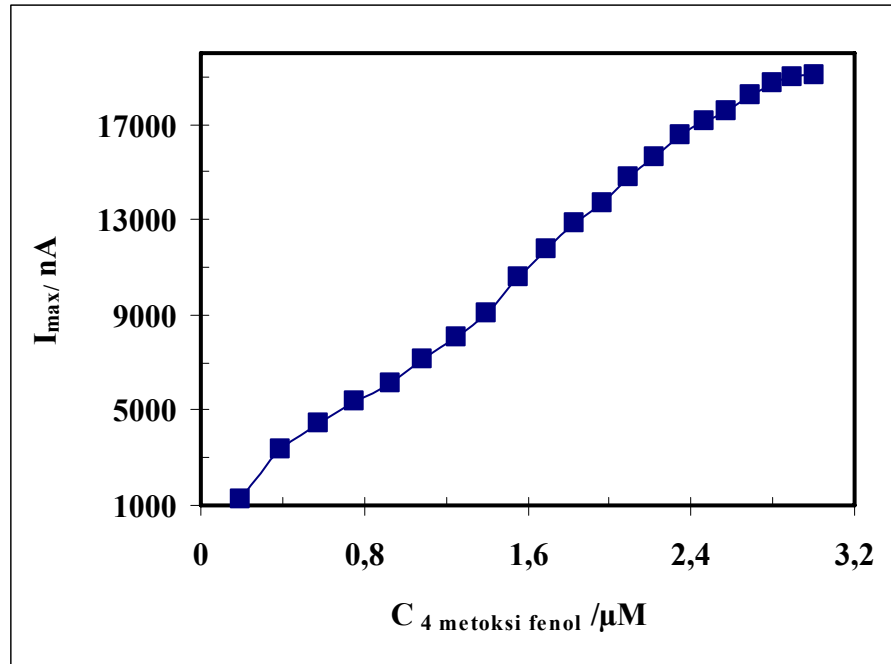
Şekil 4.48 (b). D enzim elektrot aktivitesinin 4 kloro fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



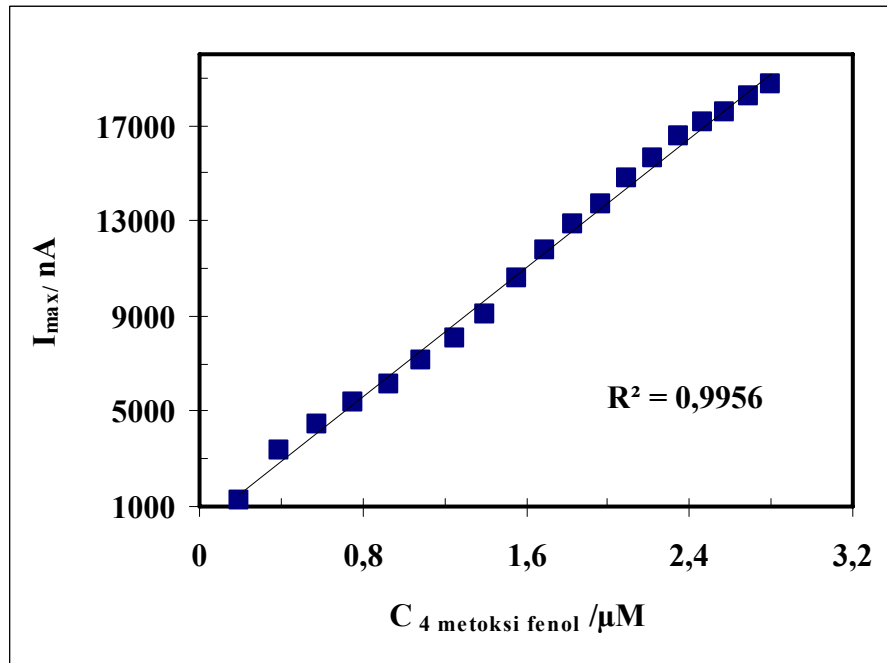
Şekil 4.49 (a). D enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg (*GMA-co-MTM*)₂/mL, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



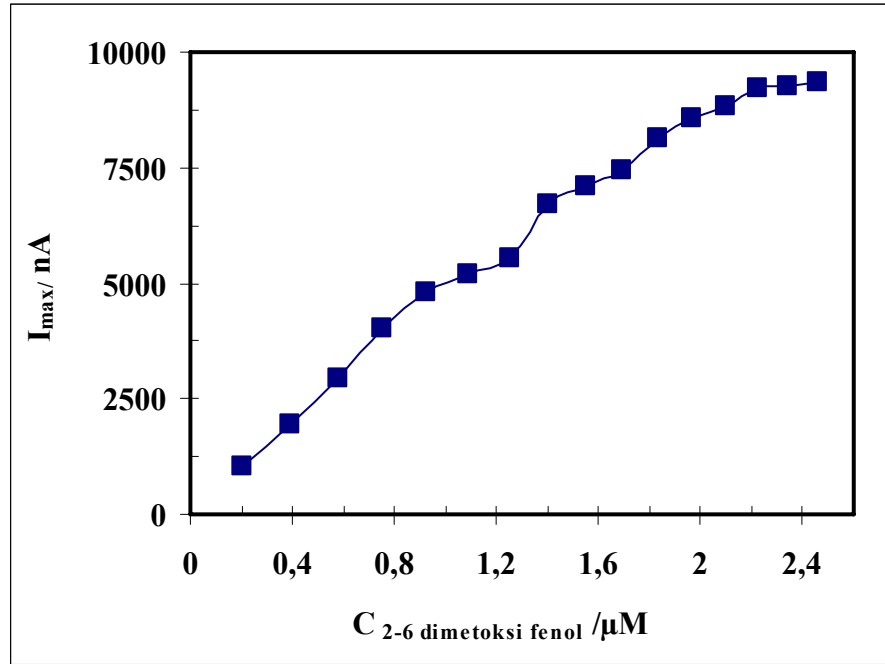
Şekil 4.49 (b). D enzim elektrot aktivitesinin 2-4 dikloro fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



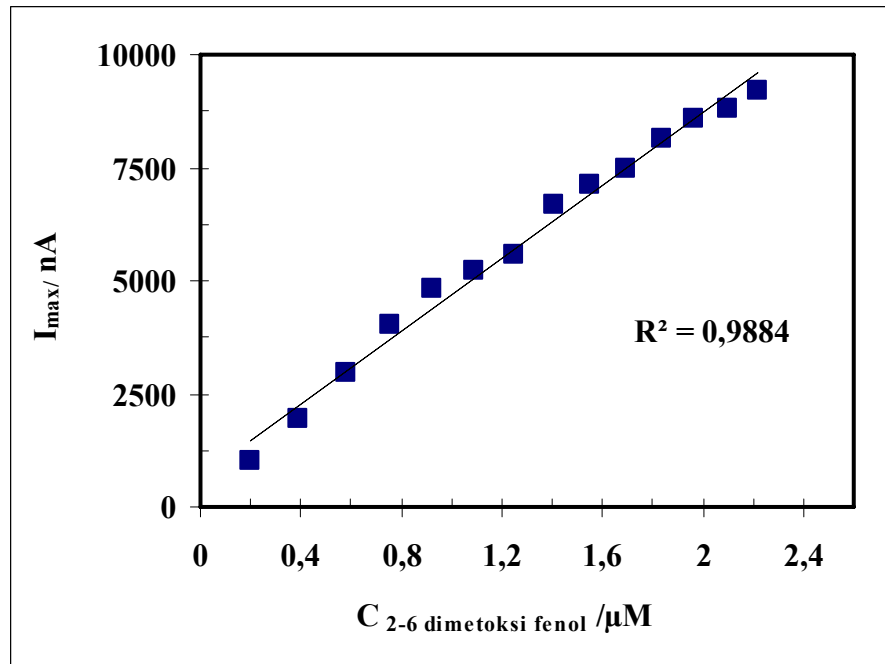
Şekil 4.50 (a). D enzim elektrot aktivitesinin 4 metoksi fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg $(GMA-co-MTM)_2/\text{mL}$, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



Şekil 4.50 (b). D enzim elektrot aktivitesinin 4 metoksi fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.



Şekil 4.51 (a). D enzim elektrot aktivitesinin 2-6 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile değişimi (0,2 M sitrat tamponu, pH 4.5, 3,0 mg $(GMA-co-MTM)_2/\text{mL}$, 3.0 mg TvLac/mL enzim, 23°C).



Şekil 4.51 (b). D enzim elektrot aktivitesinin 2-6 dimetoksi fenol konsantrasyonu ile değişimini veren doğrusal çalışma aralığı.

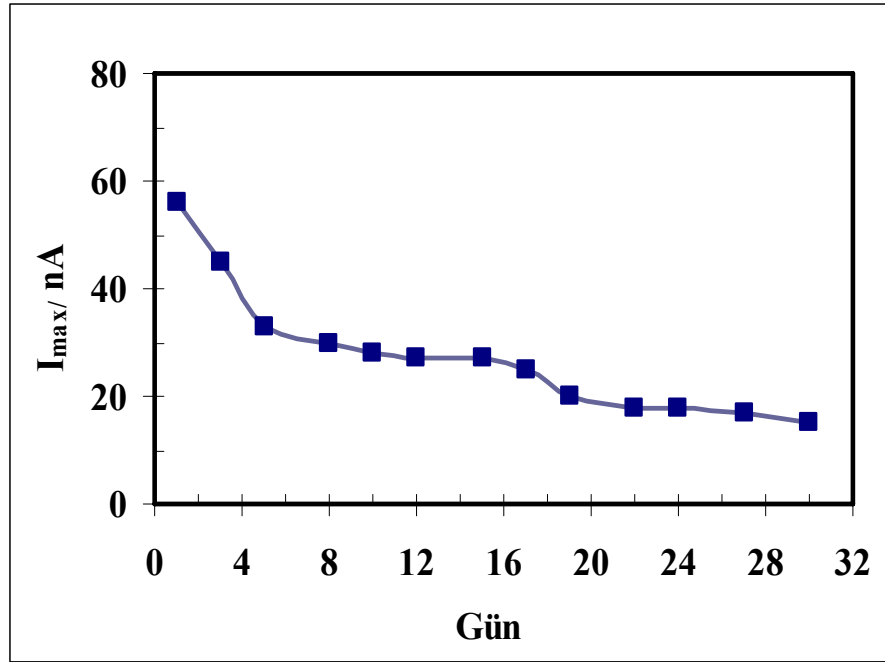
Hazırlanan $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ enzim elektroduna farklı fenolik substratların etkisi aşağıdaki Çizelge 4.4’de özetlenmiştir. $GC/(GMA-co-MTM)_3/CNT/TvLac$ (D elektrodu) enzim elektrodunun fenolik türlere karşı hassaslığı *4-metoksi fenol* > *3 kloro fenol* > *hidrokinon* > *2-kloro fenol* > *2,6-dimetoksi fenol* > *katekol* > *2,4-dikloro* > *4 kloro fenol* > *fenol* > *benzokinon* sırasında azalmaktadır. Hazırlanan D elektrodunun metoksi içeren fenol türevlerine karşı oldukça hassas olduğu görülmüştür. Fenolik türler içinde en iyi hassasiyet *4 metoksi fenol* en düşük hassasiyet ise *benzokinon* için gözlenmiştir. Bunun dışında elektrot yapısında kaplanan karbon nano tüpün elektrot aktivitesini çok önemli oranda artırdığı görülmüştür. Tüm fenolik türler için D enzim elektrodu ile elde edilen hassasiyet oldukça yüksektir.

Çizelge 4.5. $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ (D elektrodu) enzim elektrodu ile elde edilen analitik parametreler

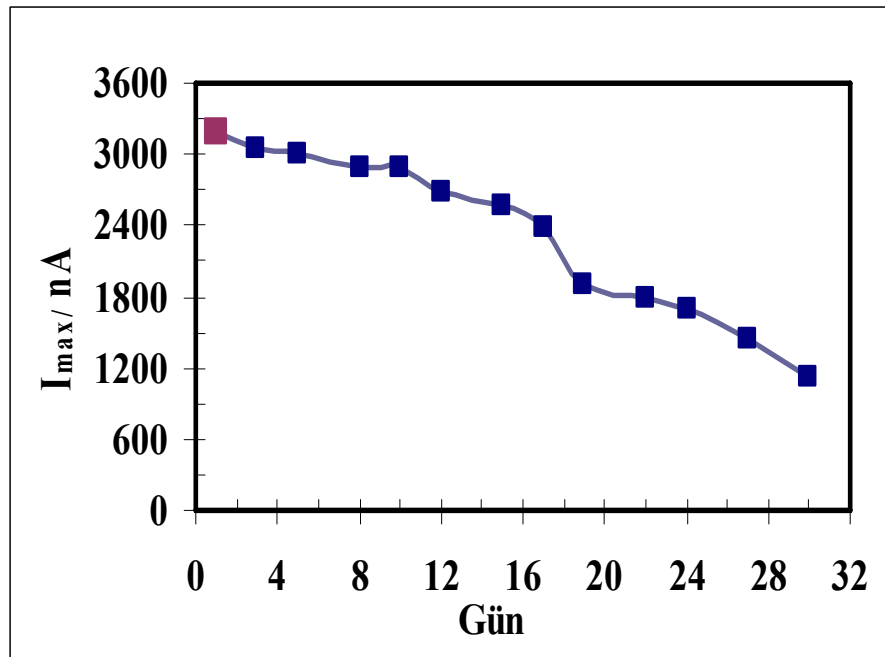
	Çalışma aralığı (μM)	R ²	Hassaslık ($\mu M/nA$)	Standart sapma (%)
<i>Fenol</i>	0.2–2.79	0.989	1407.2	1.76
<i>Katekol</i>	0.2–2.34	0.992	3692.8	1.23
<i>Benzokinon</i>	0.2–14.15	0.981	688.27	1.42
<i>Hidrokinon</i>	0.2–3.28	0.992	5552.6	3.34
<i>2-Kloro Fenol</i>	0.2–2.68	0.993	4067.5	1.06
<i>3 Kloro Fenol</i>	0.1–1.30	0.971	6648.3	1.50
<i>4 Kloro Fenol</i>	0.19–3.58	0.976	2253.2	1.25
<i>2-4 Dikloro Fenol</i>	0.115–2.11	0.988	3559.6	2.48
<i>4 Metoksi Fenol</i>	0.2–2.89	0.995	6826	2.50
<i>2-6 Dimetoksi Fenol</i>	0.2–2.34	0.988	4017.1	1.90

4.4. Geliştirilen $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ (B) ve $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ (D) Elektrotlarının Kararlılığı

Enzim elektrotlarında aranan en önemli özelliklerden biri de elektrodun uzun ömürlü olmasıdır. $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ ve $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ enzim elektrotlarının aktivitesi belirlenen optimum koşullarda ölçülmüş ve enzim elektrotları kullanılmadığı zamanlarda çalışma tamponu içinde $+4^{\circ}C$ 'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Elektrotların aktivitesine belirli süre aralıkların da 30 gün süresince bakılmıştır. Hazırlanan $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ enzim elektrodunun ilk beş gün içerisinde elektrot aktivitesinin önemli miktarda azaldığı bundan sonra günlerde ise aktivitedeki azalmanın daha az olduğu görülmüştür. $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ enzim elektrot aktivitesinde ise ilk 20 gün içerisinde önemli aktivite kaybı olmazken 20 günden sonra aktivite kaybı artmıştır. Şekil 4.53'de $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ ve Şekil 4.54'de $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ enzim elektrotlarından elde edilen sonuçlar kullanılarak zamana karşı akım değerleri verilmiştir. Bir ay sonunda $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ enzim elektrot aktivitesi başlangıçtaki aktivitesinin % 26'sı kadardır. Karbon nano tüp kullanılarak hazırlanan $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ enzim elektrodu ise bir ayın sonunda başlangıçtaki aktivitesinin % 34'nü korumuştur.



Şekil 4.52 $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ enzim elektrodu ile farklı günlerde alınan maksimum akım değerleri (2 μ M fenol ilavesi).



Şekil 4.53 $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ enzim elektrodu ile farklı günlerde alınan maksimum akım değerleri (2 μ M fenol ilavesi).

4.5. Geliştirilen Biyosensörün Gerçek Numunelerde Kullanımı

Geliştirdiğimiz amperometrik fenol biyosensörü ile optimizasyon ve kalibrasyon çalışmaları yapıldıktan sonra gerçek numunelerdeki fenol tayinleri yapılmıştır. Bu amaçla farklı özelliklere sahip gerçek numuneler kullanılmıştır. Numunelerdeki fenol tayini için 5530-D nolu standart metot esas alınarak kıyaslama yapılmıştır.

Geliştirdiğimiz $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ enzim elektrodu ile gerçek atıksu numunesi, arıtma çamuru ve deniz suyunda fenol tayini yapılmıştır. Fenol ölçümü için Bölüm 3.5.1 ve 3.5.2’de verilen prosedür uygulanmıştır. Atıksu numunesi ve arıtma çamuru ortamda bulunabilecek ve girişime sebep olacak diğer türlerin ortamdan uzaklaştırılması için bir ön işleme tabii tutulmuştur. Deniz suyu numunesine herhangi bir ön işlem uygulanmamış sadece 0.45 mikronluk süzgeç kağıdından süzme işlemi yapılmıştır. Ön işleme tabii tutulmuş atıksu ve arıtma çamuru numunesi hem geliştirdiğimiz $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ elektrot hemde standart metot 5530-D kullanılarak fotometrik olarak tayin edilerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Herhangi bir ön işlem görmemiş deniz suyunda fenol tayini ise sadece çalışmamız kapsamında geliştirilen $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ elektrot ile yapılmıştır. Ön işlem görmüş atıksu ve arıtma çamuru numunesi için farklı iki yöntemle elde edilen fenol miktarları ile deniz suyu numunesindeki fenol miktarı Çizelge 4.5’ de görülmektedir.

Çizelge 4.6. $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ enzim elektrodu ve standart metot 5530-D ile yapılan fenol tayin sonuçları

<i>Numune No</i>	<i>$GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ enzim elektrodu (Geliştirilen amperometrik laccase biyosensörü)</i>	<i>Standart metot 5530-D Fotometrik metot (SM 5530-D)</i>
Atıksu (Petrol sanayi)	91.4 ppb	85 ppb
Arıtma çamuru (Metal sanayi)	94,6 ppb	90 ppb
Deniz suyu	1.82 ppb	Ölçülemedi

Sonuçlar incelendiğinde geliştirdiğimiz enzim elektrodu ile bulunan sonuçların standart metotla (5530-D) ile uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ enzim elektrodu ile denizsuğu numunesinde de çok küçük konsantrasyonda olsa fenol bulunmuştur. Geliştirilen biyosensör deniz suğu numunelerindeki fenol miktarı tayini için oldukça uygundur. Çünkü deniz suğu numunesinde süzme işlemi dışında hiçbir işlem uygulamadan tayin yapmak mümkündür. Elde edilen sonuçlar geliştirilen enzim elektrodunun çevresel izlemeler için kullanılabileceğini göstermektedir.

SONUÇLAR

Fenol tayini yapmak amacıyla yeni bir enzim elektrodunun geliştirildiği bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiş ve diğer çalışmalarla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Çalışma kapsamında öncelikle iki farklı enzim (TvLac ve HRP) kullanılarak elektropolimerizasyon yöntemi ile enzim elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Hazırlanan iki farklı enzim elektrodu ile yapılan fenol ölçümleri sonucunda bundan sonraki aşamalarda lakkaz enzimi ile çalışılmasına karar verilmiştir. Ön deneme niteliğindeki bu çalışmalardan sonra elektrodu modifiye etmek için glisidil metakrilat (GMA) ve 3-metiltiyenil metakrilat (MTM) kopolimerleri 60°C’de, AIBN başlatıcısı kullanılarak DMF çözücüsünde serbest radikal polimerizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Kopolimer hazırlanmasında kullanılan monomer miktarları değiştirilerek üç farklı kopolimer elde edilmiştir. Elde edilen bu kopolimerlerden % 30 glisin metakrilat ve % 70 3-thienylmethacrylate içeren (*GMA-co-MTM*)₁ kopolimeri kullanılarak bir biyosensör hazırlanmıştır. Hazırlanan biyosensörde lakkaz (TvLac) enzimi tutuklanmış olarak kullanılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında GC elektrot yüzeyinde kaplanmış (*GMA-co-MTM*)₁ üzerine lakkaz (TvLac) tutuklanmıştır. GC/(*GMA-co-MTM*)₁/TvLac (A elektrodu) olarak tanımladığımız elektrotla maksimum aktivitenin gözlemlendiği (*GMA-co-MTM*)₁ derişimi (3,0 mg/mL), enzim derişimi (3,00 mg/mL) olarak saptanmıştır. Maksimum aktivitenin gözlemlendiği pH 4.5 olarak bulunmuştur. GC/(*GMA-co-MTM*)₁/TvLac (A elektrodu) ile optimum çalışma koşulları tespit edildikten 10 farklı fenolik tür için kalibrasyon eğrileri ve doğrusal çalışma aralıkları ve tespit sınırları bulunmuştur. A enzim elektrodunun fenolik türlere karşı hassaslığı 2,4-dikloro fenol > 3 kloro fenol > 2,6-dimetoksi fenol > fenol > katekol > 4-metoksi fenol > 4-kloro fenol > benzokinon > 2-kloro fenol > hidrokinon sırasında azalmaktadır. Hassasiyet farkları fenolik türlerin yapısında bulunan grupların konumundan kaynaklanmaktadır. GC/(*GMA-co-MTM*)₁/TvLac (A elektrodu) ile elde edilen optimum şartlar kullanılarak diğer iki elektrot (B ve C elektrodu) içinde 10 farklı fenolik tür için kalibrasyon eğrileri ve doğrusal çalışma aralıkları bulunmuştur. Elde

edilen sonuçlardan $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ (B elektrodu) enzim elektrodunun fenolik türlere karşı daha iyi hassaslık ve daha geniş doğrusal çalışma aralığına sahip olduğu görülmüştür.

Çalışmanın ikinci aşamasında $(GMA-co-MTM)_2$ kopolimeri ile kaplanmış GC elektrot yüzeyinde karbon nano tüp (CNT) biriktirilerek ardından lakkaz (TvLac) tutuklanmıştır. $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ (D elektrodu) enzim elektrot olarak tanımladığımız bu elektroda CNT etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalarda $GC/(GMA-co-MTM)_1/TvLac$ (A elektrodu) enzim elektrodu ile saptanan optimum koşullar kullanılmıştır. Hazırladığımız dört farklı elektrot için elde edilen analitik parametreler Çizelge 5.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 5.1. Dört farklı elektrot için elde edilen analitik parametreler

	GC/(GMA-co-MTM) ₁ /TvLac (A elektrodu)				GC/(GMA-co-MTM) ₂ /TvLac (B elektrodu)				GC/(GMA-co-MTM) ₃ /TvLac (C elektrodu)				GC/(GMA-co-MTM) ₂ /CNT ₁ /TvLac (D elektrodu)			
	Çalışma aralığı (μ M)	R ²	Hassaslık (μ M/nA)	Standart sapma (%)	Çalışma aralığı (μ M)	R ²	Hassaslık (μ M/nA)	Standart sapma (%)	Çalışma aralığı (μ M)	R ²	Hassaslık (μ M/nA)	Standart sapma (%)	Çalışma aralığı (μ M)	R ²	Hassaslık (μ M/nA)	Standart sapma (%)
<i>Fenol</i>	0.2-2.09	0.9984	40.69	3.94	0.1-2.83	0.994	26.72	2.54	0.2-1.96	0.977	36.79	2.32	0.2-2.79	0.989	1407.2	1.76
<i>Katekol</i>	0.2-2.46	0.9967	37.71	3.24	0.1-2.22	0.99	43.04	1.45	0.1-2.34	0.984	62.26	1.53	0.2-2.34	0.992	3692.8	1.23
<i>Benzokinon</i>	0.5-6.19	0.9938	21.37	1.68	0.2-11.15	0.994	3.93	1.66	0.39-7.89	0.984	17.24	2.12	0.2-14.15	0.981	688.27	1.42
<i>Hidrokinon</i>	0.2-2.79	0.9898	15.40	7.99	0.2-7.03	0.995	10.54	3.81	0.2-2.79	0.981	22.76	4.02	0.2-3.28	0.992	5552.6	3.34
<i>2-kloro fenol</i>	0.5-7.75	0.9825	15.99	1.07	0.2-1.96	0.984	111.89	1.12	0.19-1.60	0.974	59.79	1.78	0.2-2.68	0.993	4067.5	1.06
<i>3 kloro fenol</i>	0.1-1.34	0.9909	72.11	1.14	0.1-1.88	0.983	128.68	1.65	0.1-1.60	0.982	71.12	1.53	0.1-1.30	0.971	6648.3	1.50
<i>4 kloro fenol</i>	0.2-2.57	0.9845	34.87	1.68	0.1-4.98	0.991	30.32	1.32	0.4-3.66	0.984	58.26	1.46	0.19-3.58	0.976	2253.2	1.25
<i>2,4-dikloro fenol</i>	0.04-0.55	0.9955	141.62	1.99	0.04-1.29	0.979	62.86	2.10	0.15-1.13	0.973	57.31	1.15	0.115-2.11	0.988	3559.6	2.48
<i>4 metoksi fenol</i>	0.1-1.75	0.9898	36.15	5.07	0.2-2.46	0.985	31.23	3.88	0.2-1.69	0.975	124.22	3.04	0.2-2.89	0.995	6826	2.50
<i>2,6-dimetoksi fenol</i>	0.1-1.73	0.9909	64.60	2.72	0.2-2.22	0.988	60.03	2.42	0.2-2.57	0.991	52.57	3.11	0.2-2.34	0.988	4017.1	1.90

Bu çalışmada geliştirilen biyosensör için elde edilen sonuçlar literatürde verilen değerlerle karşılaştırıldığında grafit, CPE, Pt gibi elektrotlara göre geliştirilen elektrodun fenolik türlere karşı gösterdiği hassaslık oldukça yüksektir. Bunun yanı sıra $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ (D elektrodu) ile tüm fenolik türler için oldukça düşük konsantrasyon aralıklarında ölçüm yapılabilir. Bu çalışmada elde edilen çalışma aralığı literatürde lakkaz enzimini temel alan diğer çalışmalarla kıyaslandığı zaman oldukça küçük konsantrasyonlar olduğu görülmektedir. Literatürde fenolik türler için doğrusal çalışma aralığı 0.4 ile 100 μM aralığında değişirken bu çalışmada geliştirilen biyosensörle 0.1 ile maksimum 14 μM aralığında değişiklik göstermektedir. Ölçüm sınırının ve doğrusal çalışma aralığının düşük olması gerçek numunlerdeki fenolik türlerin tespiti için bir avantaj sağlamaktadır.

Biyosensörlerde diğer önemli parametrede kararlılıktır. Bu çalışmada geliştirilen $GC/(GMA-co-MTM)/TvLac$ (B elektrodu) ve $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ (D elektrodu) için elde edilen kararlılık süresi bir aydır. Bu sonuç literatürde verilen sonuçlarla uyum içerisindedir.

Geliştirilen biyosensörün cevap süreleri literatürde verilen sonuçlarla kıyaslandığı zaman oldukça uzun olduğu görülmektedir. Literatürde Horse Radish peroksidaz enzimi (HRP) esas alınarak geliştirilen biyosensörlerde daha düşük cevap süresine sahip olduğu görülmüştür. Bu sonucun biyosensörde kullanılan lakkaz enziminin dört farklı aktif merkeze sahip olması ve indirgenme mekanizmasında bu farklı aktif merkezlerin hepsinin rol almasıdır. Çizelge 5.2. de bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlarla literatürde verilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Çizelge 5.2. Lakkaz enzimini temel alan biosensörlerle ilgili literatürde yer alan çalışmalar

Elektrot	Substrat	Hassaslık (nA/ μ M)	Çalışma Aralığı (μ M)	Tespit sınırı (μ M)	Kararlılık	Tampon ve pH
GC/(GMA-co-MTM)/2/CNT/TvLac	Fenol	1407.2	0.2-2.79	-	1 ay	Asetat pH 4.5
	Katekol	3692.8	0.2-2.34			
	Benzokinon	688.7	0.2-14.15			
	Hidrokinon	5552.6	0.2-3.28			
	2-Kloro Fenol	4067.5	0.2-2.68			
	3 Kloro Fenol	6648.3	0.1-1.30			
	4 Kloro Fenol	2253.2	0.19-3.58			
	2-4 Dikloro Fenol	3559.6	0.11-2.11			
	4 Metoksi Fenol	6286	0.2-2.89			
	2-6Dimetoksi Fenol	4017.1	0.2-2.34			
CPE	Hidrokinon	0,21	10-137,5	0,015	40 gün	Fosfat 5
Karbon fiber	Katekol	16,1	1-90	-	2 ay	Asetat pH 4.5
Grafit	Katekol	68,6	1-10	-	100 gün	Asetat pH 5
Pt	Katekol	0,2	10-100	-	40 gün	Asetat pH 5
GC	Katekol	123	0.4-20.4	0.06	-	Fosfat 6.5
Grafit	Katekol	9,7	0-2	-	10 gün	Asetat pH 4.8
Grafit	Katekol	-	1-10	0.23		Sitrat pH 5.0
	Hidrokinon	-	0.5-8	0.44		

Ayrıca hazırlanan $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ ve $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ enzim elektrodu ile 1 ay içerisinde 300 ölçüm yapılmıştır. Bir ay sonunda $GC/(GMA-co-MTM)_2/TvLac$ enzim elektrot aktivitesi başlangıçtaki aktivitesinin % 26'sı kadardır. Karbon nano tüp kullanılarak hazırlanan $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ enzim elektrodu ise bir ayın sonunda başlangıçtaki aktivitesinin % 34'nü korumuştur.

Geliştirdiğimiz $GC/(GMA-co-MTM)_2/CNT/TvLac$ (D elektrodu) elektrot ile gerçek numunelerdeki fenol ölçümü yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar standart metot 5530-D ile yapılan fenol tayini ile uyum içindedir.

Sonuç olarak bu çalışmada geliştirilen fenol biyosensörü hazırlanmasının kolay, ucuz, tespit sınırının düşük olması gibi avantajlara sahip olduğu söylenebilir. Kullanılan enzim tutuklama yöntemi oldukça basittir. Ayrıca hazırlanan biyosensör su, atıksu ve deniz suyu numunelerindeki fenol ölçümü için kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Abadulla, E, Tzanov, T, Costa, S, Robra, KH, Cavaco-Paulo, A, Gübitz, G.
Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl Environ Microbiol*, 66, 3357–62, (2000).
- Adeloju, S.B., Wallace, G.G, Conducting polymers and the bioanalytical sciences. *Analyst* 121, 699–703, (1996).
- Akta, N, Tanyolaç, A. Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol. *Bioresour Technol*, 87, 209–14, (2003).
- Alva, S., Phadke, R.S., Conducting polymers in the fabrication of efficient biosensors. *Ind. J. Chem.* 33A, 561–564, (1994).
- Andreasson, L.E., Reinhammar, B., *Biochem. Biophys. Acta*, 568, 145, (1979).
- Arias, ME, Arenas, M, Rodríguez, J, Soliveri, J, Ball, AS, Hernández, M. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl Environ Microbiol*, 69, 1953–8, (2003).
- Bartlett, P.N., Whitaker, R.G., Strategies for the development of amperometric enzyme electrodes. *Biosensors* 3, 359–379, (1988).
- Bartlett, P.N., Birkin, P.R., The application of conducting polymers in biosensors. *Synth. Met.* 61, 15–21, (1993).
- Bidan, G., Ehui, B., Lapkowski, M., Conductive polymers with immobilized dopants: ionomer composites and auto-doped polymers—a review and recent advances. *J. Apys. D. Appl. Phys.* 21, 1043–1054, (1988).
- Bligny, R., Douce, R., *Biochem. J.*, Barker 1987, 209, 489, (1983).

- Boyle, A., Genies, E.M., Lapkowski, M., Application of electronic conducting polymers as sensors: polyaniline in the solid state for detection of solvent vapours and polypyrrole for detection of biological ions in solutions. *Synth. Metals* 28, C769–C774, (1989).
- Bryjak, J., Kruczkiewicz, P., Rekuć, A., Peczyńska-Czoch, W. Laccase immobilization on copolymer of butyl acrylate and ethylene glycol dimethacrylate, *Biochemical Engineering Journal*, 35, 325–332, (2007).
- Burns, RG, Dick, R, editors. *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*. New York: Marcel Dekker, in press.
- Call, H.P., Mücke, I., History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems. *J. Biotechnol.*, 53, 63, (1997).
- Calvo, AM, Copa-Patiño, JL, Alonso, O, González, AE. Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Corioloropsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. *Arch Microbiol*, 171, 31–6, (1998).
- Campos, R, Kandelbauer, A, Robra, KH, Cavaco-Paulo, A, Gübitz, GM, Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *J Biotechnol*, 89, 131–9, (2001).
- Claus, H, Faber, G, König, H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59, 672–8, (2002).
- Connolly, P., Clinical diagnostics opportunities for biosensors and bioelectronics, *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 10, pp. 1-6, (1995).
- Contractor, A.Q., Sureshkumar, T.N., Narayanan, R, Sukeerthi, S., Lal, R., Srinivasa, R.S., Conducting polymers based biosensors. *Electrochim. Acta* 39, 1321–1324, (1994).

- Deshpande, M.V., Amalnerkar, D.P., Biosensors prepared from electrochemically synthesized conducting polymers. *Prog. Polym. Sci* 18, 623–649, (1993).
- Cosnier, S., Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosens. Bioelectron* 14, 443–456, (1999).
- D'Annibale, A, Stazi, SR, Vinciguerra, V, Giovannozzi, SG. Oxiraneimmobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *J Biotechnol*, 77, 265–73, (2000).
- Dong, S., Liu, Y., Qu, X., Guo, H., Chen, H., Liu, B., Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes–chitosan composite, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 2195–2201, (2006).
- Durante, D, Casadio, R, Martelli, L, Tasco, G, Portaccio, M, De Luca, P, et al. Isothermal and non-isothermal bioreactors in the detoxification of waste waters polluted by aromatic compounds by means of immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. *J Mol Catal B Enzym*, 27, 191–206, (2004).
- Ferry, Y., Leech, D., Amperometric Detection of Catecholamine Neurotransmitters Using Electrocatalytic Substrate Recycling at a Laccase Electrode *Electroanalysis*, 17, 113–118, (2005).
- Fortier, G., Belanger, D., Characterization of the biochemical behavior of glucose oxidase entrapped in a polypyrrole film. *Biotechnol. Bioengg.* 37, 854–858, (1991).
- Freire, R.S., Dura'n, N., Kubota, L.T., Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds, *Talanta*, 54, 681–686, (2001).

- Fritz-Langhals, E, Kunath, B. Synthesis of aromatic aldehydes by laccasemediator assisted oxidation. *Tetrahedron Lett*, 39, 5955–6, (1998).
- Galzi, C., Zerbi, G., Poly(thiophenes), substituted. In *The Polymeric Materials Encyclopedia* CRC Press, Boca Raton, FL, 6923, (1996).
- Gambhir, A., Gerard, M., Jain, S.K., Malhotra, B.D., Characterization of DNA immobilized on electrochemically prepared conducting polypyrrole-polyvinyl sulphonate films. *Appl. Biochem. Biotech.* (in press), (2001).
- Georis, J, Lomascolo, A, Camarero, S, Dorgeo, V, Herpoel, I, Asther, M, et al. *Pycnoporus cinnabarinus* laccases: an interesting tool for food or non-food applications. *Meded Fac Landbouwkd Toegep Biol Wet*, 68, 263–6, (2003).
- Gianfreda, L, Bollag, JM, Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutant. *Enzymes in the environment*, 495-538, (2002).
- Gomesa, S.A.S.S., Nogueiraa, J.M.F., Rebeloa, M.J.F. An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 1211–1216, (2004).
- Griffiths, D., Hall, G., Biosensors-What real progress is being made?, *Tibtech*, Vol. 11, pp. 122-128, (1993).
- Guisseppi-Elie, A, Wallace, G.G., Matsue, T, Chemical and biological sensors based on electrically conducting polymers. *Handbook of Conducting Polymers*, 2nd ed. Marcel Dekker, New York, 963–991, (1997).
- Gupta, G., Rajendran, V., Atanassov, P. Laccase Biosensor on Monolayer-Modified Gold Electrode *Electroanalysis*, 15, 20, (2003).
- Haghighi, B., Gorton b, L., Ruzgas, T., Jönsson, L.J. Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Trametes versicolor* and their use for

bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis, *Analytica Chimica Acta*, 487, 3–14, (2003).

Hammerle, M., Schuhmann, W., Schmidt, H.L., Amperometric polypyrrole enzyme electrodes: effect of permeability and enzyme location. *Sens. Actuat. B* 6, 106–112, (1992).

Heller, A., Electrical wiring of redox and enzymes. *Acc. Chem. Res.* 23, 128–134, (1990).

Hou, H, Zhou, J, Wang, J, Du, C, Yan, B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem*, 39, 1415–9, (2004).

Huang, H, Cai, R, Du, Y, Zeng, Y. Flow-injection stopped-flow spectrofluorimetric kinetic determination of total ascorbic acid based on an enzyme-linked coupled reaction. *Anal Chim Acta*, 309, 271–5, (1995).

Huang, H, Cai, R, Du, Y, Zeng, Y. Flow-injection stopped-flow spectrofluorimetric kinetic determination of total ascorbic acid based on an enzyme-linked coupled reaction. *Anal Chim Acta*, 309, 271–5, (1995).

Jacob, H, Del Grosso, M, Kuever, A, Nimmerfroh, N, Suess, HU. Delignification of chemical pulp with laccase and mediators. A concept with a future? *Papier*, 53, 85–95, (1999).

Jarosz-Wilkolazka, A., Ruzgas, T., Gorton, L. Amperometric detection of mono- and diphenols at Cerrena unicolor laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure, *Talanta*, 66, 1219–1224, (2005).

Jegan Roy, J., Emilia Abrahama, T., Abhijith, K.S., Sujith Kumar, P.V., Thakur, M.S. Biosensor for the determination of phenols based on Cross-

- Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 206–211, (2005).
- Karam, J, Nicel, JA., Potential applications of enzymes in waste treatment. *J Chem Technol Biotechnol*, 69, 141–53, (1997).
- Kossmehl, G. A., Semi-conducting and conducting polymers with aromatic and heteroaromatic units. In *Handbook of Conducting Polymers*, ed.T.A.Skotheim, Marcel Dekker,New York, 351, (1986).
- Kranz, C., Wohlschlager, H., Schmidt, H.L., Schuhmann, W., Controlled electrochemical preparation of amperometric biosensor based on conducting polymer multilayers. *Electroanalysis* 10, 546–552, (1998).
- Kulys, J., Vidziunaite, R., Amperometric biosensors based on recombinant laccases for phenols determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 319/325, (2003).
- Kuuva, T, Lantto, R, Reinikainen, T, Buchert, J, Autio, K. Rheological properties of laccase-induced sugar beet pectin gels. *Food Hydrocoll*, 17, 679–84, (2003).
- Lewis, T.W., Wallace, G.G., Smyth, M.R., Electrofunctional polymers: their role in the development of new analytical systems. *Analyst* 124, 213–219, (1999).
- Liu, J.X., Zhou, W.J., Gong, J.L., Tang, L., Zhang, Y., Yu, H.Y., Wang, B., Xu, X.M., Zeng, G.M., An electrochemical sensor for detection of laccase activities from *Penicillium simplicissimum* in compost based on carbon nanotubes modified glassy carbon electrode, *Bioresource Technology* 99, 8748-51, (2008).
- Liu, Y., Huang, L., Dong, S., Electrochemical catalysis and thermal stability characterization of laccase–carbon nanotubes-ionic liquid nanocomposite modified graphite electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 35–41, (2007).

- Liu, Y., Qu, X., Guo, H., Chen, H., Liu, B., Dong, S. Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes–chitosan composite, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 2195–2201, (2006).
- Mathiasen, TE. Laccase for improved beer storage. *Trends Food Sci Technol*, 7, 272, (1996).
- McGuirl, M.A., Dooley, D.M., Copper-containing oxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3, 138, (1999).
- Mena, M. L., Carralero, V., Gonza'lez-Corte's, A., Ya'n'ez-Seden'õ, P., Pingarro'n, J.M. Laccase Biosensor Based on N-Succinimidyl-3-Thiopropionate-Functionalized Gold Electrodes, *Electroanalysis*, 17, 2147–2155, (2005).
- Mousty, C., Vieille, L., Cosnier, S. Laccase immobilization in redox active layered double hydroxides: A reagentless amperometric biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1733–1738, (2007).
- Mulchandani, A., Rogers, K.R., *Enzyme and Micriobial Biosensors: Techniques and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, (1998).
- Murray, R. W., *Molecular design of electrode surfaces*, *Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, vol.13, s.192-368, (1984) New York.
- Palmieri, G, Cennamo, G, Sannia, G. Remazol brilliant blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme Microb Technol*, 36, 17–24, (2005).
- Pandey, P.C., Mishra, A.P., Conducting polymer-coated enzyme microsensor for urea. *Analyst*, 113, 329–331, (1988).
- Peisach, J., Levine, W.G., *J. Biol. Chem.*, 240, 2284, (1965).

- Pita, M., Shleev, S., Ruzgas, T., Ferná'ndez, V. M., Yaropolov, A.I., Gorton, L.
Direct heterogeneous electron transfer reactions of fungal laccases at bare and
thiol-modified gold electrodes, *Electrochemistry Communications*, 8, 747–753,
(2006).
- Portaccio a, M., Di Martino a, S., Maiuri a, P., Durante a, D., De Luca a, P., Lepore
a, M., Bencivenga b, U., Rossi b, S., De Maioc, A., Mita, D.G. Biosensors for
phenolic compounds: The catechol as a substrate model *Journal of Molecular
Catalysis B: Enzymatic*, 41, 97–102, (2006).
- Quan, D., Kim, Y., Shin, W. Characterization of an amperometric laccase electrode
covalently immobilized on platinum surface, *Journal of Electroanalytical
Chemistry*, 561, 181–189, (2004).
- Reinhammar, B., *J. Inorg. Biochem.*, 15, 27, (1981).
- Reyes, P, Pickard, MA, Vazquez-Duhalt, R. Hydroxybenzotriazole increases the
range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. *Biotechnol Lett*, 21,
875–80, (1999).
- Rodríguez Couto, S, López, E, Sanromán, MA. Utilisation of grape seeds for laccase
production in solid-state fermentors. *J Food Eng*, 74, 263–7, (2006).
- Santhanam, K.S.V., *Conducting polymers for biosensors: rationale based on models.*
Pure Appl. Chem 70, 1259–1262, (1998).
- Schuhmann, W, *Conducting polymers and their application in amperometric
biosensors. Mikrochim. Acta* 121, 1–29, (1995).
- Setti, L, Giuliani, S, Spinozzi, G, Pifferi, PG. Laccase catalyzed oxidative coupling of
3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols. *Enzyme Microb
Technol*, 25, 285–9, (1999).

- Situmorang, M, Gooding, J, Hibbert, D, Barnett, D, Electrodeposited olytyramine as an immobilization matrix for enzyme biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 13, 953–962, (1998).
- Solomon, E.I., Sundaram, V.M., Machonkin, T.E., Oxygen Binding, Activation, and Reduction to Water by Copper Proteins. *Chem. Rev.*, 96, 2563, (1996).
- Tamminen, T, Kleen, M, Ohra-aho, T, Poppius-levlin, K. Chemistry of mediated-laccase delignification analyzed by pyrolysis-GC/MS. *J Pulp Pap Sci*, 29, 319–24, (2003).
- Thurston, CF, The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19–26, (1994).
- Tran, M.C., *Biosensors*, Chapman and Hall and Masson, Paris, (1993).
- Trojanowicz, M, Krawczyk, T.K., Electrochemical biosensors based on enzymes immobilized in electropolymerized films. *Mikrochim. Acta* 121, 167–181, (1995).
- Trojanowicz, M., vel Krawczyk, T.K., Alexander, P.W., Organic conductings as active materials in electrochemical chemosensors and biosensors. *Chem. Anal.* 42, 199–213, (1997).
- Trojanowicz, M., vel Krawczyk, T.K., Alexander, P.W., Organic conductings as active materials in electrochemical chemosensors and biosensors. *Chem. Anal.* 42, 199–213, (1997).
- Tsioulpas, A, Dimou, D, Iconomou, D, Aggelis, G. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. In respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresour Technol*, 84, 251–7, (2002).
- Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson G.S. (Eds.), *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Mir Publishers, Moscow, (1992).

- Uchida, H, Fukuda, T, Miyamoto, H, Kawabata, T, Suzuki, M, Uwajima T.
Polymerization of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*.
Biochem Biophys Res Commun, 287, 355–8, (2001).
- Umana, M, Waller, J, Protein modified electrodes: the glucose oxidase/polypyrrole
system. *Anal. Chem.* 58, 2979–2983, (1986).
- Uyama, H, Kobayashi, S. Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers.
J Mol Catal B Enzym, 19–20, 117–27, (2002).
- Vadgama, P., Crump, P. W., Biosensors: Recent trends. *Analyst*, Vol. 117, pp 1657,
(1992).
- Vianello, F., Cambria, A., Ragusa, S., Teresa Cambria, M., Zennaro, L., Rigo, A. A
high sensitivity amperometric biosensor using a monomolecular layer of
laccase as biorecognition element. *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 315–321,
(2004).
- Vianello, F., Ragusa, S., Teresa Cambria, M., Rigo, A. A high sensitivity
amperometric biosensor using laccase as biorecognition element. *Biosensors
and Bioelectronics*, 21, 2155–2160, (2006).
- Wong, Y., Yu, J., Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Res.*,
33, 3512, (1999).
- Wring, S. A., Hart, J. P., Chemically modified, Carbon-based electrodes and their
application as electrochemical sensors for the analysis of biologically important
compounds. *Analyst*, 117, 1215-1229, (1992).
- Xiang, L., Lin, Y., Yu, P., Su, L., Mao, L., Laccase-catalyzed oxidation and
intramolecular cyclization of dopamine: A new method for selective
determination of dopamine with laccase/carbon nanotube-based
electrochemical biosensors, *Electrochimica Acta*, 52, 4144–4152, (2007).

- Xiao, Y, Zhang, S, Hu, Q, Jiang, W, Pu, Ch, Shi, Y. Immobilization of fungal laccase on chitosan and its use in phenolic effluents treatment. *Weishengwu Xuebao*, 43, 245–50, (2003).
- Xu, F., Shin, W., Brown, S.H.M., Wahleithner, J., Sundaram, M., Solomon, E.I., *Biochem. Biophys. Acta*, 1292, 303, (1996).
- Yamato, H, Ohna, M, Wernet, W, A Polypyrrole/Three-Enzyme Electrode for Creatinine Detection. *Analytical Chemistry*. (1995).
- Zhang, Y., Zeng, G-M., Tang, L., Huang, D-L., Jiang, X-Y., Chen, Y-N. A hydroquinone biosensor using modified core–shell magnetic nanoparticles supported on carbon paste electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 2121–2126, (2007).
- Zheng, W., Zhou, H.M., Zheng, Y.F., Wangc, N., A comparative study on electrochemistry of laccase at two kinds of carbon nanotubes and its application for biofuel cell, *Chemical Physics Letters*, 457, 381–385, (2008).

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Sivas'ta doğdu. 1997 yılında Sivas Kongre Lisesi'nden mezun oldu. Aynı yıl Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Bölümü'nü kazandı ve 2001 yılında öğrenimini birincilike tamamlayarak Kimyager unvanını aldı. 2004 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Bölümü'nde Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2004 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümü'nde doktora programına başladı.