

**LAKTAT TAYİNİ İÇİN
LAKTAT OKSİDAZ TEMELLİ
AMPEROMETRİK ENZİM
ELEKTROT HAZIRLANMASI**

Ali Cihan ÇELİK

**Yüksek Lisans Tezi
KİMYA Anabilim Dalı
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK
2014**

T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LAKTAT TAYİNİ İÇİN LAKTAT OKSİDAZ TEMELLİ
AMPEROMETRİK ENZİM ELEKTROT HAZIRLANMASI**

Ali Cihan ÇELİK

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK

TEKİRDAĞ-2014

Her hakkı saklıdır

**Bu tez Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
NKÜBAP.00.10.YL.12.04 No'lu proje olarak desteklenmiştir.**

Yrd. Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK danışmanlığında, Ali Cihan ÇELİK tarafından hazırlanan ve 04.09.2014 tarihinde savunulan “Laktat tayini için laktat oksidaz temelli amperometrik enzim elektrot geliştirilmesi ” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

İmza :

Üye: Yrd. Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK

İmza :

Üye: Doç. Dr. Elife Zerrin BAĞCI

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LAKTAT TAYİNİ İÇİN LAKTAT OKSİDAZ TEMELLİ AMPEROMETRİK ENZİM ELEKTROT HAZIRLANMASI

Ali Cihan ÇELİK

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK

Laktik asidin hızlı ve güvenilir analizi, klinik analizler, gıda endüstrisi ve spor hekimliği gibi alanlarda önemli bir rol oynar. Laktik asit tayini için HPLC, iyon kromatografisi veya enzimatik kitler kullanılmaktadır ancak bu yöntemler genellikle pahalı, zaman alıcı ve zahmetlidir. Laktik asidin doğrudan hızlı, ucuz, seçici ve güvenilir tayini için biyosensör kullanımı diğer tayin yöntemlerinin iyi bir alternatifidir.. Bu çalışmada laktik asit tayini için benzo[c]sinnolin, laktat oksidaz ve çok duvarlı karbon nanotüp (ÇDKNT) ile modifiye edilmiş karbon pasta enzim elektrot geliştirildi. Elektrodun çözelti/elektrot arayüzeyindeki elektron aktarım özellikleri dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi yöntemleri kullanılarak incelendi. Daha önce yapılan elektrokimyasal çalışmalar sonucunda medyatör gibi etki gösterebileceği düşünülen benzo[c]sinnolin, bu çalışmada laktik asit tayini için yeni bir medyatör olarak araştırıldı ve laktat oksidaz için iyi bir elektron alıcısı (medyatör) olduğu ve laktik asit tayininin -0,40 V (Ag/AgCl'a karşı) gibi düşük bir potansiyelde gerçekleşmesini sağladığı görüldü. Hazırlanan enzim elektrodun optimum elektrot bileşimi ve en iyi çalışma koşulları araştırıldı. %16 benzo[c]sinnolin, %24 ÇDKNT ve %60 grafit tozu ile hazırlanan enzim elektrodun pH'sı 7,0 olan 0,05 M fosfat tamponunda laktik aside en iyi cevabı verdiği bulundu. Bu şartlar altında enzim elektrodun doğrusal çalışma aralığı, tekrar üretilebilirlik, tekrarlanabilirlik, cevap zamanı, raf ömrü gibi performans faktörleri incelendi. Çalışmada ayrıca enzim elektrodun serumda laktik asit tayinine uygulanabilirliği araştırıldı. Geliştirilen enzim elektrot ile geniş bir derişim aralığında, girişim etkisi olmadan, tekrarlanabilirliği yüksek ve hızlı laktik asit tayini gerçekleştirildi.

Anahtar kelimeler: Laktik asit, amperometri, benzo[c]sinnolin, çok duvarlı karbon nanotüp, karbon pasta

2014, 95 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

LACTATE OXIDASE BASED AMPEROMETRIC ENZYME ELECTRODE DEVELOPMENT FOR LACTATE DETERMINATION

Ali Cihan ÇELİK

Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Supervisor: Assist. Prof. Dr. Funda ÖZTÜRK

Fast and reliable analysis of lactic acid plays an important role in fields such as sports medicine, clinical analysis and food industry. HPLC, ion chromatography or enzymatic kits are used for lactic acid analysis but these methods are often expensive, time consuming and laborious. The use of biosensors for direct, rapid, cheap, reliable and selective lactic acid determination is a good alternative to other detection methods. In this study for the determination of lactic acid, benzo [c] cinnoline, lactate oxidase and multi-walled carbon nanotube (MWCNT) modified carbon paste electrode was developed for the determination of lactic acid. Electron transfer properties of the electrode at solution/electrode interface were investigated using impedance spectroscopy and cyclic voltammetry methods. According to the previous electrochemical studies benzo [c] cinnoline, was investigated as a new mediator for lactic acid determination and it was used as an useful electron acceptor (mediator) for lactate oxidase and allowed lactic acid determination to be carried out at -0.40 V (Ag / AgCl against). The optimum electrode composition and the best working conditions of the constructed enzyme electrode were investigated. Enzyme electrode prepared by 16% benzo [c] cinnoline, 24% MWCNT and 60% graphite powder was found to give the best response to lactic acid in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0. Performance factors of the enzyme electrode such as linear working range reproducibility, repeatability, response time, shelf-life were determined under optimal working conditions. The applicability of the enzyme electrode was also evaluated in this study. Rapid and high reproducible lactic acid determination was performed with the constructed enzyme electrode in a wide concentration range with no interference effects.

Keywords: Lactic acid, amperometry, benzo [c] cinnolin, multi walled carbon nanotubes, carbon paste

2014, 95 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma konusunu yüksek lisans tezi olarak öneren ve çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren ve bana büyük emeği geçen saygıdeğer hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında bana her konuda ve özellikle bilgi birikimleriyle çok destek veren Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Esmâ KILIÇ, Dr. Pınar Esra ERDEN ve Araş.Gör. Ceren KAÇAR'a teşekkür ederim.

Gerek laboratuvar çalışmalarım esnasında yardım eden gerek her konuda manevi destek olan arkadaşım Tuğçe ÇETİNKOL 'a destekleri için teşekkür ederim.

Ve son olarak beni bugünlere getiren, maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen, çok sevdiğim annem Elmas ÇELİK, babam Rıza ÇELİK ve ağabeyime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ağustos 2014

Ali Cihan ÇELİK

SİMGELER DİZİNİ

A	: Amper
BCC	: Benzo (c) sinolin
cm ²	: Santimetre kare
ÇDKNT	: Çok duvarlı karbon nanotüp
DKE	: Doymun kalomel elektrot
DV	: Dönüşümlü voltametri
E _{ind}	: İndirgenmiş enzim
E _{yük}	: Yükseltgenmiş enzim
FET	: Alan etki transistörleri
GA	: Glutaraldehit
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ISFET	: İyon seçici alan etki transistörleri
K _m	: Michaelis-Menten sabiti
KPE	: Karbon pasta elektrot
LOD	: Laktat oksidaz
M	: Molar
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
M _{ind}	: İndirgenmiş medyatör
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
mV	: Milivolt
M _{yük}	: Yükseltgenmiş medyatör
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
N ₂	: Azot
O ₂	: Oksijen
Pt	: Platin
S	: Substrat

s	: Saniye
TRIS	: Tris(hidroksimetil)aminometan
U	: Enzim ünitesi
V	: Volt
μ A	: mikroamper
μ M	: mikromolar
μ mol	: mikromol

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	iv
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2.KURAMSAL TEMELLER	4
2.1 Organik Asit.....	4
2.2 Laktik Asit	5
2.2.1 Laktik Asidin Tarihçesi	6
2.2.2 Laktik Asidin Özellikleri	6
2.2.3 Laktik Asidin İnsan Vücudu için Önemi	7
2.2.4 Laktik Asidin Kullanım Alanları	8
2.3 Biyosensörler	9
2.3.1 Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu	12
2.3.2 Biyobileşenler	13
2.3.2.1 Enzim Biyosensörleri.....	13
2.3.2.2 Doku Biyosensörleri	14
2.3.2.3 Mikrobiyal Biyosensörler	15
2.3.2.4 DNA Biyosensörleri	15
2.3.2.5 İmmünosensörler	16
2.3.3 Elektrokimyasal Biyosensörler	17
2.3.3.1 Amperometrik Biyosensörler.....	17

2.3.3.2 Potansiyometrik Biyosensörler	18
2.3.3.3 Yarı İletken Temelli Biyosensörler.....	18
2.3.3.4 Optik Temelli Biyosensörler.....	19
2.3.3.5 Piezoelektrik Temelli Biyosensörler.....	19
2.3.3.6 Kalorimetri Temelli Biyosensörler	20
2.3.3.7 Biyosensörlerde Aranılan Özellikler.....	21
2.4. Enzimler.....	23
2.4.1 Enzimlerin Tarihçesi.....	24
2.4.2 Enzimlerin Yapısı ve özellikleri	24
2.4.3 Enzimlerin Sınıflandırılması ve Numaralandırılması	26
Enzim sınıfı 1: Oksidoredüktazlar	26
Enzim sınıfı 2: Transferazlar	26
Enzim sınıfı 3: Hidrolazlar	27
Enzim sınıfı 4: Liyazlar	27
Enzim sınıfı 5: İzomerazlar.....	27
Enzim sınıfı 6: Ligazlar	27
2.4.4 Enzimlerin çalışma mekanizması	27
2.4.5 Enzimatik reaksiyon hızını etkileyen faktörler.....	28
2.4.5.1 Substrat derişimi	28
2.4.5.2 Enzim derişimi.....	28
2.4.5.3 Sıcaklık	29
2.4.5.4 Ortam pH'sı	29
2.4.5.5 Ortamdaki su miktarı	30
2.4.5.6 Aktivatörler.....	31
2.4.5.7 İnhibitörler	31
2.4.7 Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	33
2.4.7.1 Kovalent bağlama	35
2.4.7.2 Adsorbsiyon.....	35

2.4.7.3 Çapraz Bağlama (Enzimlerin Birbirine Bağlanması)	36
2.4.7.4 Tutuklama	36
2.4.8 Laktat Oksidaz Enzimlerinin Özellikleri	37
2.4.9 Amperometrik Enzim Elektrotlar	37
2.4.9.1 Birinci nesil enzim elektrotlar	38
2.4.9.2 İkinci nesil enzim elektrotlar	38
2.4.9.3 Üçüncü nesil enzim elektrotlar	39
2.5 Elektron Transfer Aracısı (Medyatör) Sisteminin Önemi	39
2.6 Karbon Pasta Elektrotlar	40
2.7 Alternatif akım (A.C.) impedansı yöntemi	41
2.7. Kaynak Özeti	46
2.7.1. Medyatörler ile ilgili çalışmalar	46
2.7.2 Enzim Elektrotlar ile İlgili Çalışmalar	47
2.7.3. L-Laktat Tayini ile İlgili Çalışmalar	49
3. MATERYAL VE METOT	53
3.1. Cihazlar ve Malzemeler	53
3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı	53
3.1.2. Hücre ve elektrotlar	53
3.1.3. pH metre	54
3.1.4. Mikro pipet	54
3.1.5. Azot gazı	54
3.1.6. Saf su	54
3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri	54
3.3 Hazırlanan Çözeltiler	55
3.3.1. Fosfat Tampon Çözeltisi	55
3.3.2. TRIS tamponu	55
3.3.3. Enzim çözeltileri	55
3.3.4. Laktik Asit Çözeltisi	56

3.3.5. Girişim çalışmalarında kullanılan çözeltiler	56
3.4. BCC ve ÇDKNT ile Modifiye Edilmiş Karbon Pasta Enzim Elektrotların Hazırlanması	56
4. DENEY SONUÇLARI VE BULGULAR	58
4.1. Biyosensörün Hazırlanma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular	58
4.1.1 Biyosensörün Elektrokimyasal Özellikleri	58
4.1.2 Empedans ölçümleri	59
4.1.3 BCC'nin Medyator Özelliğinin İncelenmesi	61
4.1.4. Biyosensör Cevabına Enzim Miktarının Etkisi	64
4.1.5 Biyosensör Cevabına Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Miktarının Etkisi	65
4.1.6 Biyosensör Cevabına Benzo [c] sinnolinin Miktarının Etkisi	66
4.2 Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular	67
4.2.1 Optimum Sıcaklık	67
4.2.2 Optimum pH	67
4.2.3 Çalışma Potansiyeli.....	68
4.2.4 Substrat Derişiminin Etkisi	69
4.3 Enzim Elektrotla Yapılan Çalışmalara İlişkin Sonuçlar	70
4.3.1 Cevap süresinin belirlenmesi	70
4.3.2 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik.....	71
4.3.3 Raf ömrü	73
4.3.4 CPE -BCC-ÇDKNT-LOD ile insan serumunda laktik asit tayini	74
4.3.5 Girişim etkisinin incelenmesi	75
5. SONUÇLAR	77
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ	95

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. 1 BCC'nin molekül yapısı.....	3
Şekil 2. 1 Karboksilli asitlerin geometrik yapısı.....	4
Şekil 2. 2 Karboksilli asitlerin asitliği	5
Şekil 2. 3 : Laktik asidin kimyasal yapısı	6
Şekil 2. 4 Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi (Yılmaz 2012)	13
Şekil 2. 5 Bir piezoelektrik sensörü (Faccio ve ark. 1995)	20
Şekil 2. 6 Substrat derişimi ile tepkime hızı arasındaki ilişki.....	28
Şekil 2. 7 Enzim derişimi ile tepkime hızı arasındaki ilişki	28
Şekil 2. 8 Sıcaklığa bağlı olarak enzimlerle gerçekleşen tepkimelerin hızına ilişkin grafik	29
Şekil 2. 9 Farklı pH larda çalışan enzimlere ait tepkime hızı pH grafiğı	30
Şekil 2. 10 Tepkime hızının ortamdaki su miktarı ile ilişkisi.....	31
Şekil 2. 11 Aktivatör miktarı ve tepkime hızı arasındaki ilişki	31
Şekil 2. 12 İnhibitör miktarı ve tepkime hızı arasındaki ilişki.....	32
Şekil 2. 13 Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	34
Şekil 2. 14 Medyatorlü ve medyatorlüsüz elektrotta elektron transferi.....	40
Şekil 2. 15 İmpedans eğrilerinin şematik yaklaşımı	43
Şekil 2. 16 Eşdeğer devre modeli	44
Şekil 2. 17 Şekil 2.16'de verilen elektrik devresinin impedansının Nyquist diyagramı	45
Şekil 3.1 Ölçümlerde kullanılan hücre sistemi.....	53
Şekil 4.1 Modifiye edilmemiş ve modifiye edilmiş elektrotların dönüşümlü voltamogramları a) Sade KPE b) KPE-BCC c) KPE-BCC-ÇDKNT (0,05 molL ⁻¹ , pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 Vs ⁻¹ tarama hızı).....	59
Şekil 4. 2 (A) Sade KPE (B) a: KPE-BCC, b: KPE-ÇDKNT, c: KPE-ÇDKNT-BCC elektrotlarının Nyquist eğrileri (5,0 mmolL ⁻¹ Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} içeren 0,10 molL ⁻¹ KCl çözeltisinde).....	61

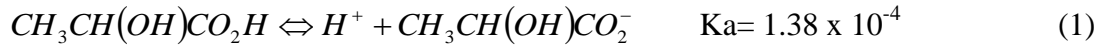
Şekil 4. 3 KPE-BCC' nin sulu ortamda kaydedilen CV'si (0,05 molL ⁻¹ , pH 7,0 fosfat tamponu, oda sıcaklığı, 0,1 Vs ⁻¹ tarama hızı).....	62
Şekil 4.4 KPE-BCC-ÇDKNT-LOD'nin laktik aside duyarlılığı (N ₂ ortam) (0,05 molL ⁻¹ , pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı).....	63
Şekil 4.5 Laktik asit tayini için hazırlanan BCC modifiye elektrotun çalışma ilkesi (E _{ind} ve E _{yük} enzimin yükseltgenmiş ve indirgenmiş halleri, BCC _{ind} ve BCC _{yük} BCC'nin indirgenmiş ve yükseltgenmiş halleri).....	64
Şekil 4.6 KPE-BCC-MWCNT-LOD cevabı üzerine enzim miktarının etkisi (0,05 molL ⁻¹ , pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı).....	65
Şekil 4.7 KPE-BCC-MWCNT-LOD cevabı üzerine ÇDKNT miktarının etkisi (0,05 molL ⁻¹ , pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı).....	66
Şekil 4.8 KPE-BCC-MWCNT-LOD cevabı üzerine BCC miktarının etkisi (0,05 molL ⁻¹ , pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı).....	67
Şekil 4.9 KPE-BCC-MWCNT-LOD cevabı üzerine pH'nın etkisi (0,05 molL ⁻¹ , pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı).....	68
Şekil 4.10 KPE-BCC-MWCNT-LOD cevabı üzerine çalışma potansiyelinin etkisi (0,05 molL ⁻¹ , pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı).....	69
Şekil 4.11 Substrat derişimine bağlı olarak farklı olan akım değerlerine ait kalibrasyon grafiği, (içinde: 1,96×10 ⁻⁴ - 1,27×10 ⁻² mmolL ⁻¹ derişim aralığına ait kalibrasyon grafiği; 0,05 molL ⁻¹ , pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı).....	70
Şekil 4.12 Enzim elektrodun cevap süresinin belirlenmesine ilişkin akım-zaman grafiği (0,05 molL ⁻¹ , pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı).....	71
Şekil 4.13 KPE-BCC-ÇDKNT-LOD'nin tekrar kullanılabilirliğine ilişkin kalibrasyon eğrileri (0,05 molL ⁻¹ , pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı).....	72
Şekil 4.14 KPE-BCC-ÇDKNT-LOD'e ait operasyonel kararlılık (0,05 molL ⁻¹ , pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı).....	72
Şekil 4.15 KPE-BCC-ÇDKNT-LOD' nin tekrar üretilebilirliğine ilişkin kalibrasyon eğrileri (0,05 molL ⁻¹ , pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı).....	73
Şekil 4.16 KPE-BCC-ÇDKNT-LOD' nin laktik aside duyarlılığının zamanla değişimi (0,05 molL ⁻¹ , pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı).....	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2. 1 Gıda maddelerindeki çeşitli bileşenler için biyosensör uygulamaları ...	10
Çizelge 2. 2 Amperometrik biyosenörlerin hazırlanmasında kullanılan bazı enzimler.....	37
Çizelge 3. 1 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar.	54
Çizelge 4. 1 BCC ile modifiye edilmiş KPE yüzeyinde 0,05 molL ⁻¹ fosfat tamponunun pH 7,0 de dönüşümlü voltamogramlarından elde edilen pik potansiyellerinin ve pik akımlarının tarama hızı ile değişimi.....	62
Çizelge 4. 2 İnsan serumundaki laktik asidin geri kazanım değerleri	75
Çizelge 4. 3 Girişim yapan maddelerin girişim yüzdesi	75
Çizelge 4. 4 CPE-BCC-ÇDKNT-LOD' nin en uygun elektrot bileşimi, çalışma koşulları ve performans faktörleri.....	76
Çizelge 4. 5 Laktik asit tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması /metal bileşikleri(medyatör)	78
Çizelge 4. 6 Laktik asit tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması/organik boyar madde(medyatör)	81
Çizelge 4. 7 Laktik asit tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması/polimer(medyatör).....	83
Çizelge 4. 8 Laktik asit tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması/medyatörsüz	84
Çizelge 4. 9 Laktik asit tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması/son yıllarda yapılan	86

1.GİRİŞ

Laktik asit (C₃H₆O₃, MA: 90,08 g/mol, Erime noktası: 53 ° C); polar, suda kolaylıkla çözünebilen, renksiz ya da sarımsı renkte olabilen bir organik asittir. İlk olarak ekşimiş süttten elde edildiği için süt asidi olarak da bilinir. Laktik asit çözelti ortamında bir protonunu kaybettiğinde laktat iyonunu oluşturur (CH₃CH(OH)COO⁻).



Laktik asit insan vücudunda çeşitli ve önemli proseslerde görev almaktadır. İnsan vücudunda, normal metabolizma hızında veya egzersiz durumunda fermantasyon prosesi ile laktat dehidrogenaz enziminin piruvata etki etmesi sonucunda L-laktat oluşur. Kandaki L-laktat derişimi genellikle 1–2 mmolL⁻¹ civarındadır (**Habermüller ve ark. 2000, Gispen ve ark. 2000**).

Laktik asit birden çok amaç için kullanılan bir kimyasaldır. Asitlendirici, tatlandırıcı ve koruyucu madde olarak gıda, tekstil, deri endüstrisinde kullanılması ve indirgenebilir polilaktik asit polimerizasyonu için hammadde niteliği taşıması bu kullanım alanlarına verilecek en basit örneklerdir (**Toptaş 2011**).

Bir amperometrik biyosensörün spesifik özellikleri; yüksek oranda immobilize edilen enzimin aktif merkezi ile uygun bir çalışma potansiyelinin uygulandığı bir elektrot yüzeyi arasındaki elektron transfer sürecinin kinetiğine bağlıdır. Yüksek duyarlılık ve hızlı cevap özelliklerine sahip bir amperometrik biyosensör geliştirmenin temel ön koşulu; biyobileşenden elektroda hızlı bir elektron transferini mümkün kılmaktır (**Habermüller ve ark. 2000, Gispen ve ark. 2000**).

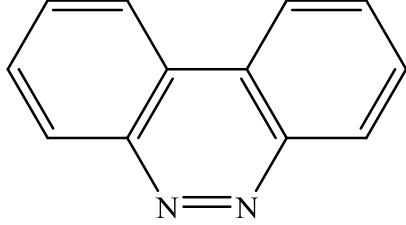
Oksidaz temelli biyosensörler, fizyolojik elektron alıcısı olarak davranan oksijene bağlı olduklarından; bu aygıtlar, oksijen miktarının çözelti içerisinde azalmasıyla artmasına bağlı olarak yanlış sonuç vermeye yatkındırlar. Bu yanlışlıklar biyosensörün cevap akımlarındaki değişiklik ve lineerliğin en üst limitinin azalmasını içermektedir. Bu durum, oksijen ile elektronları enzimin redoks

merkeziyle elektrot yüzeyi arasında taşıma kapasitesine sahip bir elektron alıcısının yer değiştirmesi sağlanarak düzeltilebilir. Bu amaçla elektron transfer araçları (medyatörler) kullanılmaktadır. Medyatörler, ortamda çözülmüş olarak bulunan oksijen ile yarışarak, elektronları enzimin aktif merkezinden elektrot yüzeyine taşırlar. Medyatör kullanmanın bir sonucu olarak, medyatörün düşük redoks potansiyeli sebebiyle endojen türlerin yükseltgenmesi de minimuma indirilebilir. Ancak bu yükseltgenmeler tamamen ortadan kaldırılamaz (özellikle askorbik asit için). Bu endojen türler yükseltgenerek cevap akımlarında hataya ayrıca kullanılan medyatörü harcayarak ek hatalara sebep olabilmektedir (**Beskan 2011**).

Literatür incelendiğinde; medyatör kullanımına, hazırlanan farklı nitelikteki amperometrik enzim elektrotlara ve laktik asit tayinine ilişkin bilgiler edinilebilir. Paz Zanini ve ark. (2012) laktik asit tayini için laktat oksidaz enziminin laponit/kitosan hidrojelleri ile modifiye edilmiş camı karbon elektroda immobilize edilmesi ile bir biyosensör hazırlamışlardır. Medyatör olarak ise ferrosen–metanol kullanılmıştır. Haccoun ve ark. (2004) L-Laktat tayini için poli (5-hidroksi-1,4-naftakinon-co-5-hidroksi 3- tiyoasetik asit-1,4-naftakinon) kopolimer filmine kovalent olarak bağlanmış laktat oksidaz enzimini kullanarak amperometrik bir biyosensör hazırlamışlardır. Wang ve ark. (2008) tarafından laktat tayini için negatif yüklü laktat oksidaz enziminin pozitif yüklü nanoboyuttaki kobalt fitalosiyenin ile elektrostatik çekiminden yararlanılarak immobilize edildiği kolloidal biyokompozite dayalı bir biyosensör geliştirilmiştir. Garjonyte ve ark. (2011) flavositokrom b2 kaynağı olarak kullanılan ekmek mayası *Saccharomyces cerevisiae* ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrotların laktik asit biyosensörü olarak kullanımını araştırmışlardır. Piano ve ark. (2010) tarafından laktik asit tayini için Meldola's Blue-Reinecke tuzu ile modifiye edilmiş perde baskılı karbon elektrot geliştirilmiştir. Perde baskılı elektrot laktat dehidrogenaz enzimi ve NAD^+ ile kaplanmış ve elektrot yüzeyine yarıgeçirgen membran olarak seluloz asetat tabakası biriktirilmiştir.

Bu çalışmada laktik asit tayini için elektron transfer aracı (medyatör) olarak benzo[c]sinnolinin (Şekil 1.1) kullanıldığı amperometrik enzim elektrot hazırlanması amaçlandı. Bu amaçla laktik asit tayini çok duvarlı karbon nanotüp, BCC ve laktat oksidazın belirlenen optimum miktarlarda karıştırılmasıyla hazırlanan karbon pasta

elektrot (KPE/BCC/ÇDKNT/LOD) yüzeyinde, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan indirgenmiş durumdaki medyatörün - 0,4 V elektrot potansiyelinde tekrar yükseltgenmesi esasına dayanılarak yapıldı. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşulları belirlendi ve elektrodun çalışmasını etkileyen faktörler incelendi.

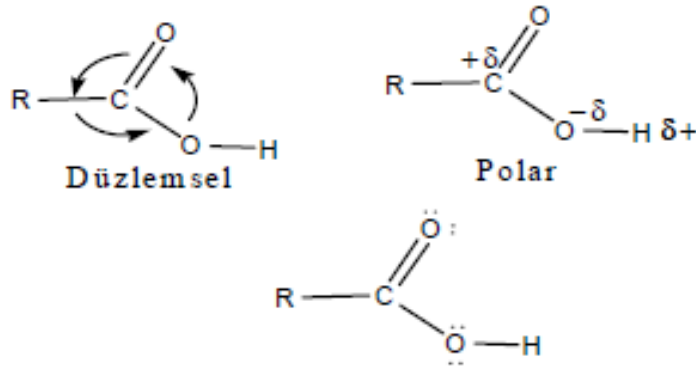


Şekil 1.1 BCC'nin molekül yapısı

2.KURAMSAL TEMELLER

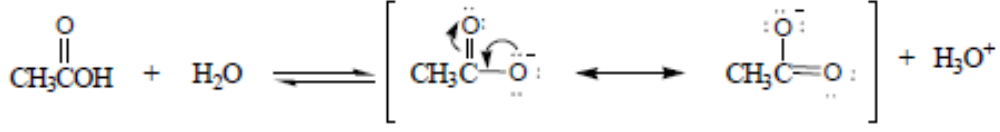
2.1 Organik Asit

Laktik asit diğer tüm organik asitler gibi karboksilli asitler grubuna giren bir zayıf asittir ($K_a 1,38 \times 10^{-4}$). Laktik asit molekülü geometrik olarak düzlemseldir ve moleküldeki açılar yaklaşık 120° dir (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1 Karboksilli asitlerin geometrik yapısı

Molekülde oksijenden kaynaklanan polarlık vardır. Yüksek enerjili p orbitallerinden ve tepkimeye açık olan sterik durumdan dolayı kimyasal etkinlik gösteren kısım polar olan karboksil grubu üzerindedir. Tepkimelerde molekülün diğer kısmı fazla etkili değildir. Laktik asit mineral asitlerine göre (HCl, HNO₃ vb.) zayıf bir asittir. Mineral asitlerde $pK_a \approx 1$ veya daha küçük, organik asitlerde ise pK_a lar yaklaşık beş dolayındadır. Laktik asit mineral asitlerden daha zayıf olmasına rağmen alkollerden ve fenollerden daha kuvvetli bir asittir çünkü karboksilat iyonları rezonansla kararlı duruma gelir (Şekil 2.2) (Asıl dağ 2006).



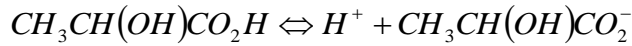
Şekil 2. 2 Karboksilli asitlerin asitliği

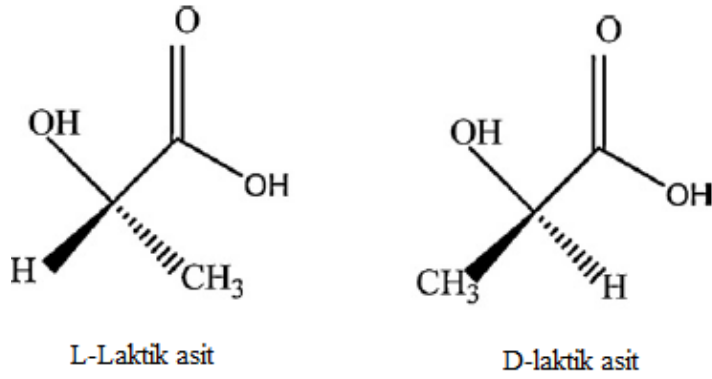
Küçük molekül ağırlıklı karboksilli asitler kokuludur. Karboksilli asitler (RCO₂H) hidrojen bağları yardımıyla dimerler oluşturabilirler (**Asıl dağ 2006**).

2.2 Laktik Asit

Laktik asit kimyasal olarak *alfa hidroksi asit* veya *2- hidroksipropiyonik asit* olarak adlandırılan bir organik asittir. Laktik asit; asit grubunun yanındaki karbon atomunda bir hidroksil grubu olan alfa hidroksi asittir. Eğer hidroksil grubu, asit grubunun ikinci karbonunda ise bu durum beta-hidroksi asit olarak adlandırılmaktadır. Merkezi karbon atomu; dört farklı gruba bağlandığından laktik asit, D (dextro) ve L (levo) olmak üzere iki tane optik izomeri oluşturmaktadır (Şekil 2.3). L (+) ve D (-) izomerleri bakteriyel sistemlerde üretilmektedir. Bu izomerlerden sadece L formu hayvansal metabolizmada yer almaktadır (**Dizdar 2012**).

Laktik asit veya *∞-hidroksi propiyonik asit*, suda çözüldüğünde laktat ve H⁺ iyonları verir. Bu bir tersinir reaksiyondur ve bu denge aşağıda gösterilmiştir.





Şekil 2. 3 : Laktik asidin kimyasal yapısı

2.2.1 Laktik Asidin Tarihçesi

Laktik asidin kimyasal bir bileşik olarak keşfi, 18. yy ın ortalarında yaşamış ünlü bir kimyager olan Carl Wilhelm Scheele tarafından gerçekleştirilmiştir. Carl Wilhelm Scheele organik kimya alanında çalışan ilk kimyager olarak bilinmektedir (**H. Benninga 1990**). Laktik asit, 1881'de ticari olarak büyük ölçüde ekşimiş süttten elde edilirdi; bu yüzden laktik aside *süt asidi* de denir. Sütte bulunan laktoz, laktik maya denilen bakteriler tarafından laktik aside dönüştürülür (**Dutta 2006; Chahal ve Starr 2006**).

2.2.2 Laktik Asidin Özellikleri

- Kimyasal adı: *2-hidroksipropanoyik asit*
- Kimyasal formülü: $C_3H_6O_3$
- Moleküler ağırlığı: 90,08 g/mol
- Erime noktası: 53 °C
- Kaynama noktası: 122 °C (12 mmHg)
- Görünüm: renksiz ya da sarımsı
- pKa: 3,86 (**Ullmann 1990**)

2.2.3 Laktik Asidin İnsan Vücudu için Önemi

Laktik asit hayvan, bitki veya mikroorganizma gibi değişik hayat formlarında bulunan bir bileşik olup, karbonhidrat ve amino asit metabolizmasının bir ara ürünü olarak kendisini göstermektedir (**Bogaert ve Naidu 2000**).

Laktik asit genel olarak hemen hemen her dokuda mevcut olup, özellikle biyolojik salgılarda miktar olarak daha fazla bulunmaktadır. Örneğin; laktik asit kanda $1,4 \mu\text{molml}^{-1}$, sperimde $4,1 \mu\text{molml}^{-1}$, ürinde $0,3 \mu\text{molml}^{-1}$ olarak tayin edilmiştir. İnsan vücudunda laktik asidin L (+) formunun daha baskın olduğu görülmekle beraber, ürinde laktik asidin D (-) formuna da rastlanmıştır. Laktik asidin D (-) formu, karaciğer tarafından metalobize edilmekte olup, laktik asidin bu yüzden hepatik yetmezlik yaşayan ve özellikle üç yaşın altı çocuklara gıda olarak verilmemesi tercih edilmektedir (**Gülseren 2012**). Biyolojik sistemlerde, laktik asidin L (+) formu, pürivik asidin indirgenmesi ile oluşmaktadır. Bu hidrojen transferi NADH bazlı enzim olan, laktat dehidrogenaz enzimi ile gerçekleşmekte ve laktik asit seviyesi piruvat derişimine göre ve NADH/NAD^+ oranına göre değişmektedir. Ayrıca, laktik asit bileşen derişimlerinin bazı özel dokulara göre değişmesinin yanında, bir istisna olarak, iskelet kaslarındaki tüm hücrelerde laktat/piruvat oranı her zaman sabit olmaktadır. Yeteri kadar oksijenin bulunduğu ortamlarda, laktat 12 mol, pürivat ise 1 mol oluşmakta ve bu oran hep sabit kalmaktadır. Laktat ve pürivat moleküllerinin hidrofobik doğası gereği, bu moleküller hücre zarına kolaylıkla girebilmektedir. Hücre zarı kandaki bu iki molekülün derişimi ve NADH/NAD^+ redoks dengesi arasında bir ilişki kurmaktadır (**Çoban 2008**). Ortamda eğer oksijen varsa, kas hücreleri için gerekli enerji, adenozin trifosfat (ATP) ya da kreatin fosfat gibi enerji bileşiklerini sentezleyen glikozun oksidatif indirgenmesiyle sağlanmaktadır. Eğer ortamda gerekli oksijen mevcut değilse veya fiziksel aktivite gibi ihtiyaç olunandan daha fazla miktarda enerji gerektiğinde, gerekli olan enerji glikoliz yolu ile sağlanmaktadır. Glikoliz reaksiyonu, kaslardaki laktik asitin artmasına sebep olmaktadır. Bununla beraber, fazla asit kan akışına diffuz ederek karaciğer ve böbrek tarafından absorbe edilir. Fazla asit, karaciğer ve böbrek tarafından emildikten sonra, burada glikoz ve

glukojen sentezi için kullanılır ve bu metabolik durum laktik asitin oksidatif indirgenmesi sonucunda açığa çıkan enerjiyi kullanır (**R. Garjonyte ve ark. 2006**).

1930 yılında, Meyerhof, kullanılan laktik asit ile okside olan laktik asit oranının beşe bir oranında olduğunu bulmuştur. Laktik asit, karaciğerde veya böbrekte yeniden bir senteze gidildiği takdirde, glikoz molekülü kan akışına sirküle olarak enerjiye veya laktik asite dönüşümün sağlandığı kas hücrelerine ulaşır. Bu döngüye, 'Cori' döngüsü adı verilmektedir. Yapılan çalışmalarda, laktik asidin yetişkin bir erkekteki günlük geri dönüşüm oranının 120-150 g arasında olduğu belirtilmiştir (**Gülseren 2012**).

Laktik asit doğal yollar ile veya sentetik olarak üretilebilir (**Paz Zanini ve ark. 2011**).

2.2.4 Laktik Asidin Kullanım Alanları

Birçok uygulama alanına sahip bir kimyasal olan laktik asidin endüstride oldukça önemli bir yeri vardır. Laktik asidin şu anki kullanımı ve uygulama alanları dört temel sınıfa ayrılır;

- Gıda
- Kozmetik
- İlaç
- Kimyasal uygulamalar

1982'den beri laktik asit pazarı, gıda ve içecek sanayisi tarafından oluşturulmaktadır ve bugün de bu durum devam etmektedir. Üretilen laktik asidin %50'den fazlası hazır gıda ürünlerinde emülsifiye edici ajan olarak kullanılmaktadır. Laktik asit bakterileri, özellikle pH'yı düşürmeleri, rekabetçi olarak davranmaları ve bakteriyosin gibi antimikrobiyal maddeler üretmeleri nedeniyle gıda muhafazasında çok fazla yararlanan mikroorganizmalardır (**Toptaş 2011**).

Teknik kalitedeki laktik asit, asitliği dzenleyici olarak sebze ve deri endüstrisinde kullanılmaktadır. Laktik asidin kullanıldığı diğer alanlar ise eczacılık ve kozmetiktir (**Toptaş 2011**).

Laktik asit kozmetik uygulamalarında doğal katkı maddesi olarak kullanılır. Öncelikli olarak nemlendirici ve pH dzenleyici olmasına rağmen, antimikrobik aktivitelerde, derinin temizlenmesinde ve derinin sulandırılmasında da kullanılır. Nemlendirici etki doğrudan laktik asidin su tutma kapasitesine bağlıdır ve laktik asidin cilt parlatici etkisi tirozinaz oluşumunu önlemesinden kaynaklanır. İnsan bedeninin doğal bileşenleri olduğundan, laktik asit ve onun tuzu olan laktat, doğal ve daha güvenli formüllerden yana olan modern eğilimlere kusursuzca uyar ve onları kozmetikte çok faydalı aktif maddeler yapan cilt parlatici ve yeniden gençleştirme gibi etkilere sahiptir (**Oban 2008**).

2.3 Biyosensörler

Biyosensörler, ölçümü istenen bileşen (analit) ile uygun bir biyoajan (biyomolekül) arasındaki fizikokimyasal etkileşimin, dönüştürücüler (transduser) yardımı ile elektrik sinyallerine dönüştürüldüğü ve bu sinyallerin elektronik yöntemlerle analit derişimi cinsinden ifade edildiği analitik cihazlardır.

Biyosensör sistemleri genel olarak üç temel bileşenden oluşur. Bunlar, seçici tanıma mekanizmasına sahip biyoajan (biyomolekül), bu biyoajanın analit ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştüren çevirici (tranduser) ve elektronik bölümler olarak sıralanabilir (**Dursun 2009**).

Biyosensör, enzim, antikor, reseptör, nükleik asit, hücre gibi bir biyobileşenin uygun iletim ve sinyal sistemi ile birleştirilmesi ile hazırlanan analitik bir sistem olarak da tanımlanabilir (**Castillo ve ark. 2004**).

Biyosensörler için uygulama alanları aşağıdaki maddeler ile özetlenebilir;

- Klinik diyagnostik
- Biyomedikal sektör
- Tarla tarımı, bağ-bahçe tarımı ve veterinerlik
- Bakteriyel ve viral diyagnostik
- İlaç analizi
- Endüstriyel atık kontrolü
- Çevre koruma ve kirlilik kontrolü
- Maden işletmelerinde toksik gaz analizleri
- Askeri uygulamalar

Biyosensörler; gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler, bazı anorganik bileşikler yanında enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar. Bunların dışında, biyolojik oksijen gereksinimi (BOD), toksisite ve mutajenite testlerinde de başarı ile kullanılmaktadırlar (Yılmaz 2011). Çizelgede gıda maddelerindeki çeşitli bileşenler için biyosensör uygulamaları özetlenmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2. 1 Gıda maddelerindeki çeşitli bileşenler için biyosensör uygulamaları (Bartlett ve P.N. 1990)

Analit	Uygulama	Biyobileşen	Dönüştürücü	Tayin Aralığı
Glikoz	Yumuşak içkiler, Meyve suları ve Süt	Glikoz oksidaz	Amperometrik	50-500 mmolL ⁻¹
Glikoz, Fruktoz,	Şarap	Glikoz oksidaz, D-fruktoz dehidrogenaz,	Amperometrik	0,03-15 mmolL ⁻¹ (Glikoz) 0,01-10 mmolL ⁻¹ (fruktoz)

Etanol, L-Laktat, L-Malat, Sulfit		Alkol dehidrogenaz, L-malat dehidrogenaz, Sulfit oksidaz, Diyaforaz		0,014-4 mmolL ⁻¹ (etanol) 0,011-1,5 mmolL ⁻¹ (L-laktat) 0,015-1,5 mmolL ⁻¹ (L-malat) 0,01-0,1 mmolL ⁻¹ (sulfit)
Fruktoz	Bal, Süt, Meyve suyu ve Şarap	D-fruktoz dehidrogenaz	Amperometrik	50 × 10 ⁻³ - 10 mmol ⁻¹
Nişasta	Buğday unu örnekleri	α- amilaz, Amiloglikosilaz ve glikoz oksidaz	Amperometrik	5 × 10 ⁻³ -5 × 10 ⁻¹ mmolL ⁻¹
Etanol	Bira	Alkol oksidaz	Amperometrik	0,12- 2,00 mmolL ⁻¹
Aset aldehit	Alkollü içecekler	Alkol dehidrogenaz	Amperometrik	500-33×10 ⁴ mmolL ⁻¹
Polifenol	Yeşil çay, üzüm ve Zeytin ekstraktları	Tyrosinaz	Amperometrik	10×10 ³ -10×10 ⁴ mmolL ⁻¹
Sitrik asit	Meyve suyu ve Sporcu içecekleri	Sitrat Liyaz	Amperometrik	0,015-0,5 mmolL ⁻¹
L-malat	Şarap, Meyve suları ve Cider	L-malat dehidrogenaz ve Salsilat hidroksilaz	Amperometrik	0,01-1,2 mmolL ⁻¹

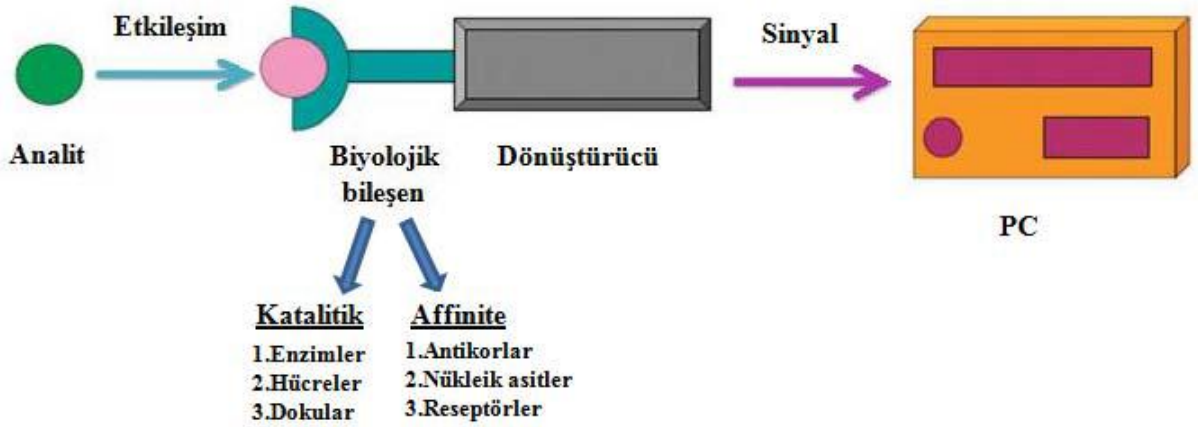
Askorbik asit	Meyve suları	Askorbat oksidaz	Amperometrik	$5,0 \times 10^{-2} - 1,2 \text{ mmolL}^{-1}$
L-amino asitler	Sentetik örnekler	L-amino asit oksidaz ve Horseradis peroksidaz	Potansiyometrik	-
L-glutamat	Gıda aromaları	L-glutomat oksidaz ve NADH oksidaz	Amperometrik	$0,05 - 1,0 \text{ mmolL}^{-1}$
Aminler	Balık	Diamin oksidaz	Amperometrik	$< 6 \text{ mmolL}^{-1}$
Biyojenik aminler	Balık	Diamin oksidaz	Amperometrik	$< 9,5 \times 10^{-4} \text{ mmolL}^{-1}$
Histamin	Deniz ürünleri	Histamin oksidaz	Amperometrik	$0,01 - 0,02 \text{ mmolL}^{-1}$
Hipoksantin	Balık	Ksantin oksidaz	Amperometrik	$0,005 - 0,03 \text{ mmolL}^{-1}$
Nitrat	Sentetik örnekler	Nitrat reduktaz	Amperometrik	$< 0,1 \text{ mmolL}^{-1}$ nitrat
Oksalat	Ispanak örnekleri	Oksalat oksidaz	Amperometrik	$0,012 - 0,1 \text{ mmolL}^{-1}$
Oksalat	Ispanak örnekleri	Oksalat oksidaz ve horseradish peroksidaz	Amperometrik	$0,1 - 2,0 \text{ mmolL}^{-1}$

2.3.1 Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu

Biyosensörler yüzeye immobilize edilmiş biyolojik sistemler ve bu sistemlerden gelen bilgiyi ölçülebilir bir sinyale dönüştüren cihazlardan oluşur (Şekil

2.4). Biyolojik bileşen sayesinde belirli bir analite veya analitlere karşı seçici cevap alınır ve böylece girişim etkisi en aza indirgenir. Biyosensörlerin içerdiği biyolojik bileşenler, seçici olarak hedef analitle reaksiyona girer ve analit derişimine bağı olarak elektriksel sinyal oluşturlar (Yılmaz 2012).

Dönüştürücünün temel görevi, analit ile biyolojik olarak aktif materyal arasındaki etkileşim nedeniyle meydana gelen fizikokimyasal değişlikleri elektrik sinyaline dönüştürmektir.



Şekil 2. 4 Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi (Yılmaz 2012)

2.3.2 Biyobileşenler

Biyosensörlerin yapısında görev alan biyobileşenler çoğu kez biyoreseptör olarak da adlandırılırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılanlar enzimler, dokular, mayalar, antibadi/antijenler ve antikorlardır. Enzim –substrat ve antikor – antijen arasındaki etkileşimin ilk adımı analitlerin protein moleküllerine bağlanmasıdır.

2.3.2.1 Enzim Biyosensörleri

Biyosensör teknolojisinin tarihsel gelişimine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleriyle başladığı görülmektedir. 1962’de Clark ve Lyons ve

1967’de Updike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik “glukoz oksidaz enzim elektrodları” bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır (Yücel 2013). Biyosensör hazırlamada enzimleri kullanmak; spesifiklik bakımından avantajlı ancak saf enzimin pahalı oluşu açısından da dezavantajlıdır. Temel bilimlerdeki ilerlemeler enzimlerin yanı sıra diğer biyolojik materyallerin fonksiyonlarının da çok daha ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmasına imkân vermiştir. Bu ilerlemelerin doğal bir sonucu olarak farklı biyolojik materyallerin ve iletim sistemlerinin kombinasyonuyla çok çeşitli biyosensörler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir.

Bugünkü sonuca bakıldığında, hangi temel iletim sistemi söz konusu olursa olsun pratik ve ticari uygulamalarda enzim elektrotlarının büyük bir üstünlüğü göze çarpmaktadır. Bilinen enzimlerin yanı sıra bilinmeyenlerin potansiyel varlığı, piyasada yüzlerce ticari enzim preparatının bulunabilirliği ve bu sayının her geçen gün yükselmesi enzim sensörlerinin tartışılmaz üstünlüğünün devam edeceğinin bir göstergesidir (Yücel 2013)

2.3.2.2 Doku Biyosensörleri

İlk defa 1981 yılında bitki dokusu temelli elektrot hazırlanmasından itibaren, birçok bitki dokusu temelli biyosensör geliştirilmiştir. Bitkisel doku materyalleri kullanılarak oluşturulan biyosensörler, izole enzimlerle oluşturulan biyosensörlere bir alternatiftir (Sidwell ve Rechnitz 1986).

Doku biyosensörlerinde enzimin saflaştırılması gerekliliği ortadan kalkar, ayrıca bu biyosensörler bazı enzimler için doğal ortamda artan kararlılık ve düşük maliyet gibi avantajlara sahiptirler.

Doku kesitleri kullanıldığında biyosensörün cevap süresi genellikle uzundur. Bu süreyi kısaltmak için direkt doku kesiti yerine, doku ezilerek veya iyice

homojenize edilerek hazırlanır. Böylece difüzyon problemi de azaltılmış olur (**Toprakkıran 2012**).

2.3.2.3 Mikrobiyal Biyosensörler

Enzimler yerine mikroorganizmalarla hazırlanan sensörlere mikrobiyal sensörler denir. Mikrobiyal sensörlerin enzim sensörlerine göre bazı avantajları vardır bunlar aşağıda yer alan maddeler ile özetlenebilir:

- Enzimler doğal ortamlarında bulunacaklarından dış etkilere karşı daha az dayanıklıdır.
- Mikrobiyal sensörler enzim elektrotlardan genelde daha uzun ömürlüdür.
- Saf enzim yerine hücre kullanılması daha ekonomiktir.

Ancak mikrobiyal sensörler enzim sensörlerine göre bazı dezavantajlara da sahiptir.

- Hücre membranı difüzyon bariyeri oluşturduğundan membrandan geçemeyen moleküller için uygun sensör hazırlanamaz.
- Mikrobiyal sensörlerin cevap süresi enzim sensörlerinden daha uzundur.
- Hücre birçok enzim içerdiğinden hedef reaksiyonunun diğer enzimlerden etkilenmesi söz konusudur (**Karadağ 2012**).

2.3.2.4 DNA Biyosensörleri

Tanıma yüzeyi olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörlere DNA biyosensörleri adı verilir (**McGown ve ark. 1995**). DNA biyosensörleri, dizisi bilinen hibridizasyon olaylarının izlenmesinde (**Mikkelsen ve S.R. 1996**) veya bu yüzey ile etkileşime giren maddelerin tayininde kullanılabilir. Bu maddeler, DNA “1” ile; elektrostatik olarak, DNA çift sarmal yapısının küçük ve büyük oluklarına bağlanarak ya da doğal yapılı DNA'nın baz çiftleri arasına birikerek etkileşebilir.

Bunun sonucunda da DNA'da bulunan elektroaktif bazların sinyallerinde düşüşe veya yükselişe neden olabilirler. Bu sonuca göre de maddenin DNA ile etkileşimi hakkında yorum yapılabilir (**Wang ve ark. 2001**).

Kullanılan klasik yöntemlere alternatif bir yöntem olarak, DNA biyosensörlerinin yüksek hassasiyetli, küçültülebilir olmaları, taşınabilir ve tek kullanımlık modellerinin tasarlanabilmesi, ucuz olmaları, düşük miktarda güç ve ürün gereksinimleri olması gibi avantajlarının olması nedeniyle günümüzde DNA biyosensörlerinin kullanımı oldukça artmıştır (**Lukasova ve ark. 1982**).

DNA biyosensörleri kullanılarak DNA-ilaç etkileşimleri başarılı bir şekilde algılanabilmektedir. Bu algılama DNA'ya ait elektroaktif bazlar olan guanin/adenin sinyali üzerinden ya da analizi yapılacak ilacın elektrokimyasal sinyali üzerinden yapılabilir. Bu sinyallerdeki değişimlere göre DNA-ilaç etkileşimleri hakkında yorumlar yapılabilir (**Erdem ve ark. 2002**).

2.3.2.5 İmmünosensörler

İmmünosensörler, biyospesifik duyar element olarak immünoaktif maddelerin kullanıldığı bir biyosensör tipidir ve uygun antijen ile antikorun kompleks oluşumu esasına dayanır. Antikor-antijen reaksiyonu son derece seçicidir (**Parkinson ve Pejcic 2005**). Çok çeşitli immünanaliz yöntemleri vardır ve bu teknikler toksikoloji ve patojen algılanması alanlarında dahil yaygın olarak kullanılmaktadır (**Yousef A.E 2008**).

İmmünosensörlerin kullanım potansiyellerinin nedeni; genel olarak kullanılabilirliği, antijen-antikor reaksiyonunun spesifik ve seçici olması ve yöntemin yüksek hassasiyetidir. Antijen-antikor kompleksi her tür algılayıcıda kullanılabilir. (**Alocilja ve Tahir 2008**).

2.3.3 Elektrokimyasal Biyosensörler

2.3.3.1 Amperometrik Biyosensörler

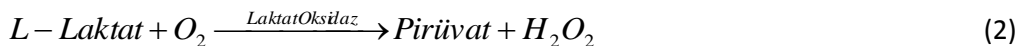
Amperometri; potansiyel uygulanmış elektrokimyasal bir hücreden geçen akım yoğunluğunun saptanmasıdır. Bu akım yoğunluğu elektrokimyasal olarak aktif taneciklerin (çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen türlerin) derişiminin bir fonksiyonu olarak tanımlanır. Çalışma elektrodunda indirgenen veya yükseltgenen madde katyon, anyon veya yüksüz bir tanecik olabilir. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür.

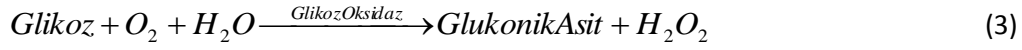
Bir elektrot tepkimesinin hızı;

- Çözeltiden elektrot yüzeyine doğru akan kütle transfer (difüzyon) hızına
- Tepkimeye girecek olan maddenin bir kimyasal tepkime ile oluştuğu durumlarda çözelti tepkimesinin hızına
- Adsorplanan türler olması durumunda, yüzeye tutunma ve yüzeyden koparak çözeltiye geçme hızına
- Elektrot yüzeyindeki madde ile elektrot arasındaki yük aktarımı yani elektron aktarım hızına bağlıdır. Bu ise tepkimeye giren madde türüne, derişimine, elektrot malzemesinin türüne ve uygulanan gerilime bağlıdır.

İletici sistem olarak bir amperometrik biyosensörün kullanılması durumunda potansiyometrik biyosensörlerde olduğu gibi enzim, elektrot sistemini saran bir membran içinde tutuklanmıştır ve bu ikisi arasındaki en büyük fark, ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir.

Amperometrik esaslı ve biyoaktif bileşen olarak enzimlerin kullanıldığı bazı biyosensörlere ilişkin örnekler aşağıda verilmiştir (**Emre 2007**);





2.3.3.2 Potansiyometrik Biyosensörler

Potansiyometrik analiz yöntemleri, elektrokimyasal hücrelerde fark edilebilir bir akım geçmezken yapılan potansiyel ölçümlerine dayanan yöntemlerdir. Potansiyometrik ölçümlerin gerektirdiği düzenekler basit ve ucuzdur ve bir referans elektrot, bir indikatör elektrot ve potansiyel ölçüm cihazını içerir (**Skoog ve D.A. 1998**).

Potansiyometrik sistem, bir voltametrik hücre (elektrolitik çözelti), buna bağlantılı olan indikatör elektrot (değişken potansiyel) ve karşılaştırma elektrotu (sabit potansiyel) ile yüksek empedanslı bir potansiyometreden oluşur.

2.3.3.3 Yarı İletken Temelli Biyosensörler

Temel sensör olarak metal oksit yarı iletken alan etki transistörlerini (MOSFET) ya da iyon duyar alan etki transistörlerini (ISFET) esas alan bu tür enzim sensörleri, enzim ile alan etki transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etki transistörleri (ENFET) olarak adlandırılırlar. MOSFET'lerin, gazların ölçümüne uygun hale getirilmesiyle oluşan gaz duyar sensörlerde (GASFET) adsorblanan gaz moleküllerinin disosiyasyonu ve oluşan yükün oksit tabakasına transferi temel ilkeyi oluşturur. Bu durum tabanın dielektrik sabitini değiştirerek ve drain akımda bir modifikasyona yol açarak ölçüme imkan verir (**Yücel 2013**).

2.3.3.4 Optik Temelli Biyosensörler

Optik enzim sensörleri iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle enzim immobilize edilerek hazırlanan ölçüm aygıtlarıdır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alır. Sinyal, ışık yansıması, saçılımı ya da yayımı sonucu meydana gelir. Dolayısıyla optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen optik esaslı enzim sensörleri temelde absorpsiyon, floresans, biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde işlev görürler.

2.3.3.5 Piezoelektrik Temelli Biyosensörler

Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensör seçiciliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki farklanmanın ölçülmesiyle sonuca ulaşılır (**Faccio ve ark. 1995**) .

Bir piezoelektrik sensörün üzerinde enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen piezoelektrik enzim sensörlerinde, enzim moleküllerine substratların bağlanmasından dolayı meydana gelen kütle değişimlerinin, piezoelektrik kuartz diskin titreşiminde sebep oldukları farklanmadan yararlanılarak madde miktarına ulaşılır. Şekil 2.5’de bir piezoelektrik sensörün şeması gösterilmiştir.



Şekil 2. 5 Bir piezoelektrik sensörü (Faccio ve ark. 1995) .

2.3.3.6 Kalorimetri Temelli Biyosensörler

Hemen hemen tüm biyokimyasal reaksiyonlar ekzotermik karakterdedir. Enzimatik reaksiyon sonucu substratın ürüne dönüşümü ısı üretimini de beraberinde getirir. Termodinamiğin birinci yasası üretilen ısı ile molar entalpi arasında oransal bir ilişkinin varlığını tanımlamaktadır.

$$Q = - n_p \sum \Delta h \quad (1)$$

Isı üretimi nedeniyle çevreleyen sistemin ısı kapasitesi olan C_s 'ye bağlı olarak yerel bir sıcaklık değişimi, ΔT , gözlenmektedir.

$$\Delta T = Q / C_s = - n_p \sum \Delta h / C_s \quad (2)$$

Enzimatik reaksiyon entalpileri -10 ile -100 kJ/mol aralığındadır ve birkaç mK civarında yerel sıcaklık değişimlerine denenebilirler. Kalorimetrik biyosensörler bu sıcaklık değişimlerinin çok hassas polikristalin yarı iletken ve metal oksit karışımı termistörler tarafından algılanarak elektriksel sinyale dönüştürülmesi prensibinden yararlanır (**Lammers ve Scheper 1999**).

2.3.3.7 Biyosensörlerde Aranılan Özellikler

İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken bazı özellikler aşağıda özetlenmiştir:

- Kalibrasyon özellikleri: Doğrusal çalışma aralığı, duyarlık ve gözlenebilme sınırı

İdeal bir biyosensör analitin stok çözeltisinin çalışma ortamına ilave edilmesi yoluyla kolaylıkla kalibre edilebilmelidir. Kalibrasyon grafiği, bir denge akımına göre düzeltilmiş kararlı hal cevaplarının (ΔI) belirlenmesi ve analit derişimine (C) veya logaritmasına ($\log C/C_0$) karşı grafiğe geçirilmesi ile çizilebilir. Kalibrasyon grafiğinde substrat derişimi ile biyosensör cevabı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu derişim aralığına doğrusal çalışma aralığı adı verilir.

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

Gözlenebilme sınırı, optimum çalışma koşullarında sensör ile tayin edilebilen en düşük derişim değeridir.

- Seçicilik ve Güvenilirlik

Bir biyosensörün seçiciliği hem enzimin özgüllüğüne hem de örnekte bulunan elektroaktif türlerin varlığına bağlıdır. İdeal bir biyosensör sadece hedef analitin derişimindeki değişikliklere cevap vermeli ve ortamda bulunan diğer türlerden etkilenmemelidir. Bir biyosensör seçiciliği iki şekilde belirlenebilir: Birincisi girişim yapan türün ortama eklenmesi ve biyosensörün cevabının ölçülmesini içerir. Her tür için kalibrasyon eğrisi çizilir ve aynı koşullarda analit için çizilen kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılır. Bu durumda seçicilik, analitin tek başına ve girişim yapan türün tek

başına olduğunda elde edilen sinyal oranı olarak ifade edilir. İkinci durumda ise, girişim yapan tür, belli derişimde analit içeren elektrokimyasal hücreye ilave edilir ve seçicilik, biyosensör cevabının varyasyon yüzdesi olarak ifade edilir.

Güvenilir bir biyosensörün cevabı analit derişimi ile doğrudan ilişkili olmalı ve örnek matriksi içinde bulunan girişim yapan türlerin derişimlerinden etkilenmemelidir. Bu sebepten, biyosensörler için muhtemel girişim yapabilen türler belirlenmeli ve etkilerinin nasıl olduğu tespit edilmelidir (**Ustabaş 2010**).

- Cevap süresi

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

- Tekrarlanabilirlik

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

- Kararlılık

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

- Biyosensör Ömrü

Biyosensörlerde kullanılan biyolojik elementler genellikle en az kararlı bileşendir. Bir biyosensörün en önemli özelliklerinden biri normal çalışma koşullarında ne kadar süre duyarlılığını koruduğudur. Ömür, yapılan ölçüm sayısına

ya da ölçülen analit derişimine bağlı olarak değişebilir. Yüksek derişimler duyarlığın daha çabuk yitirilmesine yol açabilir. Ayrıca, örnekte bulunan bazı türlerin varlığı da deaktivasyona uğrama sürecini, hedef analitin derişiminden bağımsız olarak, hızlandırabilir. Uzun biyosensör ömrü için gerekli saklama koşulları da önemlidir. Biyosensörün buzdolabında saklanması, biyolojik elementin özelliklerini korunmasını sağlayabilir (**Koyuncu Zeybek 2010**).

2.4. Enzimler

Enzimler, karbon, oksijen, hidrojen ve azottan oluşan, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden, biyokimyasal olayların vücutta yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan biyolojik sistemlerin reaksiyon katalizörleridir. Biyolojik katalizörler olarak da tanımlanan enzimler, besleyici moleküllerin yıkıldığı, kimyasal enerjinin depolandığı ve şeklinin değiştirildiği, basit öncü bileşenlerden biyolojik makromoleküllerin yapıldığı metabolik yollarda yüzlerce reaksiyon basamağını katalize ederler. Enzimler işlevlerini kendileri değişikliğe uğramadan yerine getirir (**Karademir ve ark. 2002**).

Enzimler, ileri derecede organize olmuş protein moleküllerdir. Hayat canlı hücre içerisinde zincirleme devam eden biyokimyasal reaksiyonlar dizisi sonunda ya hücre gerekli olan makro moleküllerin inşa edildiği ya da büyük moleküllerin parçalanarak enerjinin açığa çıkarıldığı bir süreçtir. Burada enzimlerin görevi gerek büyük moleküllerin yıkımında, gerekse büyük moleküllerin yapım süreci olan biyokimyasal reaksiyon olan basamaklarında substrat dediğimiz moleküllere kimyasal bir grubu eklemektir.

Bu kimyasal gruplar çok farklı ve değişik olabilir. Metilen (CH_3), amin (NH_2), hidroksit (OH), hidrojen (H), aldehit ($\text{O}=\text{C}-\text{H}$) ve karbondioksit (CO_2) bu kimyasal gruplara örnek olarak gösterilebilir (**Aydın 2012**).

2.4.1 Enzimlerin Tarihçesi

Enzim moleküllerinin varoluşları bir yüzyılı aşkın süredir bilinmektedir. Enzimlerle ilgili ilk çalışmalardan biri; 1835 yılında, İsveç asıllı kimyacı Jon Jakob Berzelius'un bazı kimyasal katalizörleri adlandırmasıdır. İlk enzim ise saf halde Cornell Üniversitesi 'nde James B. Sumner tarafından başarıyla elde edilmiştir. Sumner, üreaz enzimini erkek tavşandan izole ve kristalize etmeyi başarmıştır. Bu çalışması Sumner'e 1947'de Nobel ödülünü kazandırmıştır (**Bilen 2009**).

İlk ticari enzim 1914 yılında Alman Röhm tarafından üretilmiştir. Hayvanlardan üretilen bu tripsin enzimi proteinleri parçalayıcı etkisi sebebiyle deterjanlara katılmıştır. Gıda endüstrisinde, 1930 yılında enzimler meyve suyu sanayinde kullanılmaya başlanmış, 1960'larda nişasta sanayinde mikrobiyal enzimlerden en yüksek düzeyde yararlanılmıştır. Nişasta endüstrisi, deterjan sanayinden sonra enzimlerin kullanıldığı en büyük üçüncü sanayi dalıdır.

Endüstriyel olarak üretilen enzimlerin % 37'si deterjan, % 12'si tekstil, % 11'i nişasta, % 8'i fırıncılık ürünleri ve % 6'sı hayvan yemi sanayi dallarında kullanılmaktadır. Günümüzde enzim firmaları gelişen teknoloji sayesinde artan bir hızla çok geniş uygulama alanları için enzim ticareti yapmaktadır. Endüstriyel enzimlerin % 75' inden fazlasını hidrolazlar oluşturmaktadır. Protein parçalayan enzimler ise toplam enzim satışının yaklaşık % 40'ını oluşturmaktadır (**Altinel 2008**).

2.4.2 Enzimlerin Yapısı ve özellikleri

Bilinen enzimlerin hepsinin yapısı proteinden meydana gelmektedir. Bazı enzimlerin yapısı sadece proteinden meydana gelse de, birçok enzim proteinlere ilave olarak karbonhidrat, lipit, metal, fosfat veya diğer organik bileşenleri de içermektedir.

Enzim yapısının bütünü “haloenzim”; protein kısmı “apoenzim”; ve protein olmayan kısmı da “kofaktör” olarak adlandırılmıştır. Biyokimyasal reaksiyonlarda enzimlerin etkiledikleri veya kullandıkları moleküller ise “substrat” ismiyle anılmaktadır (**Göğüş ve Fadıoğlu 2006**).

Enzimler dört temel açıdan çok güçlü katalizörlerdir:

- Enzimler son derece etkilidirler.
- Sıradan kimyasal katalizörlere göre tepkimeleri $10^8 - 10^{11}$ kez daha hızlı gerçekleştirebilmektedirler. Enzimler gösterdikleri bu hıza ulaşırken pH, sıcaklık, basınç açısından oldukça ılımlı koşullarda çalışabilmeyi mümkün kılarlar.
- Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar fazla enerji gerektirmezler. Ayrıca en kolay bulunan, en ucuz, en emniyetli çözücü olan su içerisinde çalışmak enzimler için mümkün olmaktadır. Mesela amonyak elde etmek için kullanılan Haber prosesinde azot bağlamak için 200- 1000 atm basınç ve 500 °C sıcaklık gereklidir. Ama azot bağlayan bir bakterinin bu işlemi yaparken yüksek basınç ve sıcaklığa ihtiyacı yoktur.
- Enzimler kimyasal katalizörlere göre çok daha değişik kimyasal reaksiyonları katalizleyebilirler.
- Enzimler reaksiyonun tipine ve substrata son derece spesifiktirler. Böylece yüksek verim ve çok az sayıda yan ürün meydana gelir.
- Enzimlerin çok çeşitli doğal kontrol mekanizmaları vardır.

Enzimlerin aktivitesi, içinde buldukları şartlara göre düzenlenebilir. Ayrıca kontrol edici küçük moleküller de enzimatik aktiviteyi azaltabilir ya da arttırabilir. Enzimler tepkimenin başlaması için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürürler. Bir enzim daima bir çeşit tepkimeyi kontrol eder. Hücre içinde üretilmelerine rağmen hücre dışında da etki gösterebilirler. Enzimlerin kontrol ettiği tepkimelerin çoğu çift yönlüdür. Genellikle protein yapılı olmalarından dolayı proteinlerin etkilendiği faktörlerden etkilenirler (**Telefoncu 1986**).

Enzimlerin spesifikliği veya özgülüğü, katalize ettikleri belirli reaksiyonlar ile ilgili özellikleridir. Enzimler için çeşitli spesifiklikler (özgüllükler) tanımlanmıştır:

- **Mutlak spesifiklik:** Bir enzimin, yalnızca spesifik bir substratın spesifik bir reaksiyonunu katalize etmesi özelliğidir.
- **Grup spesifikliği:** Bir enzimin, amino, fosfat ve metil grupları gibi benzer fonksiyonel grupları içeren substrat ile reaksiyonlaşması özelliğidir.
- **Bağ spesifikliği:** Bir enzimin proteinlerin peptid bağı gibi belli bağ tipleri üzerine etkili olması özelliğidir.
- **Stereokimyasal spesifiklik:** Bir enzimin bir bileşimin sadece bir stereokimyasal şekli üzerine etkili olması özelliğidir. Örneğin; arjinaz enzimi, L-arjinini etkilerken D- arjinini etkilemez (**Sümengen 2011**).

2.4.3 Enzimlerin Sınıflandırılması ve Numaralandırılması

IUPAC' a göre enzimler 6 sınıfta incelenir.

Enzim sınıfı 1: Oksidoredüktazlar

Oksidoredüktazlar, oksidasyon (yükseltgenme) ve redüksiyon (indirgenme) reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Yükseltgenme; moleküle oksijen eklemekle veya molekülden hidrojen ayrılmakla, böylece + değerin artmasıyla olur. İndirgenme ise; molekülden oksijen ayrılmakla veya moleküle hidrojen eklemekle yani + değerin azalmasıyla olur. Bu tepkimeleri düzenleyen enzimler 2 gruba ayrılmıştır.

- **Dehidrogenaz:** Hidrojen taşıyan ve aktaran enzimlerdir.
- **Oksidazlar:** Elektron kaybeden ve aktaran enzimlerdir.

Enzim sınıfı 2: Transferazlar

Transferazlar, molekülden H⁺ dışında, başka grupların (C, N ve P taşıyan gruplar) bir molekülden diğerine transferini katalizleyen enzimlerdir.

Enzim sınıfı 3: Hidrolazlar

Hidrolazlar, su katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Enzim sınıfı 4: Liyazlar

Liyazlar, C-C, C-O, C-N ve C-S bağlarını yükseltgenme ve hidroliz dışında bir mekanizma ile kıran enzimlerdir.

Enzim sınıfı 5: İzomerazlar

İzomerazlar, optik ve geometrik izomerlerin rasemizasyonunu katalizleyen diğer bir deyişle molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişini değiştiren enzimlerdir.

Enzim sınıfı 6: Ligazlar

Ligazlar, yüksek enerjili fosfatların enerjisini kullanarak karbon ile C, O, S, N arasında bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir. (MEGEP 2007).

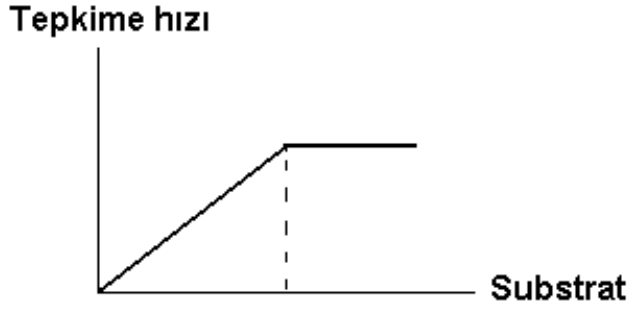
2.4.4 Enzimlerin çalışma mekanizması

Enzimin apoenzim kısmı bir ya da birkaç yerinden (aktif bölgelerden) substrat molekülüne yapışır ya da bağlanır ve bu arada koenzim kısmı substrat üzerindeki bağlarla gerçek anlamda birleşmeye veya bağlanmaya giderek onu parçalar. Enzimlerin kimyasal yapıları, özellikle üçüncül yapıları tam olarak bilinmediğinden (ilk yapısı açıklanan enzim ribonükleaz, 124 amino asitten meydana gelmiştir) çalışma mekanizmaları da halen tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır (Yavuz 2005).

2.4.5 Enzimatik reaksiyon hızını etkileyen faktörler

2.4.5.1 Substrat derişimi

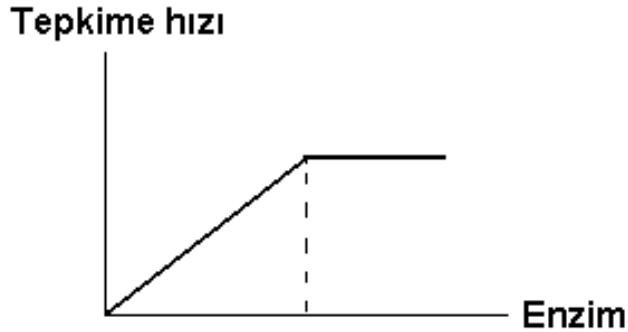
Ortamdaki substrat miktarı sürekli arttırılırsa; reaksiyon önce hızlanır, daha sonra sabit bir hızla devam eder. Burada anlatılan duruma ilişkin grafik aşağıda verilmiştir (şekil 2.6).



şekil 2. 6 Substrat derişimi ile tepkime hızı arasındaki ilişki

2.4.5.2 Enzim derişimi

Ortamdaki enzim miktarı sürekli arttırılırsa; reaksiyon önce hızlanır, daha sonra sabit bir hızla devam eder. Burada anlatılan duruma ilişkin grafik aşağıda verilmiştir (şekil 2.7).

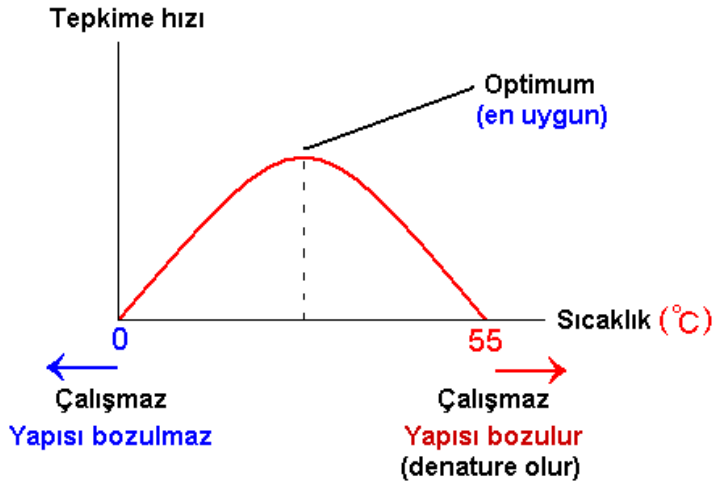


şekil 2. 7 Enzim derişimi ile tepkime hızı arasındaki ilişki

2.4.5.3 Sıcaklık

Enzimler ısıya duyarlı olup, ısı işlemler enzimlerin katalitik özelliklerinin azalmasına veya kaybolmasına sebep olabilmektedir. Sıcaklık artışı enzimlerin aktivitesini arttırmakla birlikte yüksek sıcaklıklarda enzimlerin inaktivasyon hızı da artar. Gıda proseslerinde kullanılan enzimlerin çoğu 45 ° C nin üzerinde inaktive olur. Bazı enzimler yüksek sıcaklıklara direnç gösterirler. Kūf ve maya kaynaklı proteazlara göre ısıya daha dayanıklı olan papain etin yumuşatılmasında önemli rol oynamaktadır. Benzer şekilde fungal amilaza kıyasla ısıya daha dirençli olan malt amilazı unlu mamūllerde kullanılmaktadır (**Fadıloğlu ve ark. 2004**).

Şekilde sıcaklığa bağlı olarak enzimlerle gerçekteşen tepkimelerin hızına ilişkin grafik verilmiştir (Şekil 2.8).



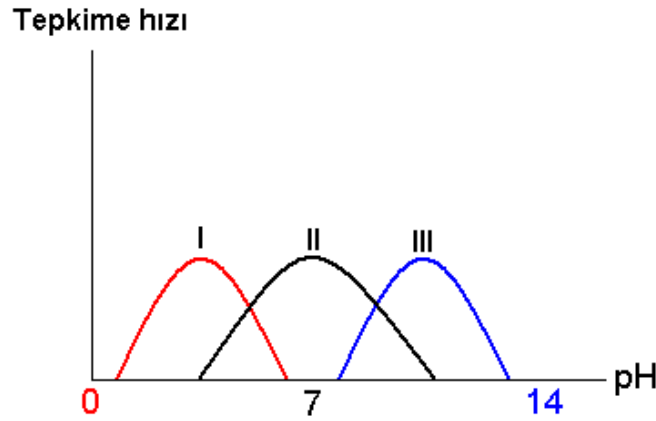
Şekil 2. 8 Sıcaklığa bağlı olarak enzimlerle gerçekteşen tepkimelerin hızına ilişkin grafik

2.4.5.4 Ortam pH'sı

Enzim, substrat ve koenzim moleküllerinde asidik veya bazik gruplar vardır. ES (enzim-substrat) kompleksinin en kararlı bir şekilde oluşması (yani hızının maksimum olması için gruplarının belli bir iyonlaşma durumunda olması) gereklidir.

Bunun dışındaki iyonlaşmalarda ES kompleksi zayıflar ve reaksiyon hızı düşer. Bu optimum bir pH'da reaksiyon hızının en yüksek olması demektir. Her enzimin 3 ila 8 arasında değişen bir optimum pH'ı vardır. Ancak pek çok enzimin pH'ı, 7 dolayındadır. Çok asidik veya çok bazik ortamlarda enzim molekülü denatüre olacağından, reaksiyon hızı tersinmez olarak sıfıra düşer.

Enzimlerle yapılan in vitro çalışmalarda reaksiyon ortamının tampon çözeltisini hazırlamak için öncelikle enzimin optimum pH'ının bilinmesi veya tayin edilmesi gereklidir. Canlı hücrelerde ortamın pH'ının nötrale yakın olduğu bilinir. Ancak, biyokimyasal reaksiyonlar sırasında her enzimin yerel pH'ını tayin etmek mümkün değildir. Bu yerel pH'larda küçük değişikliklerin meydana gelerek bu yolla da reaksiyon hızlarının ayarlandığı sanılmaktadır (**Develioglu ve ark. 1998**). Aşağıdaki şekilde (Şekil 2.9) farklı pH larda çalışan enzimlere ait tepkime hızı pH grafiği verilmiştir.

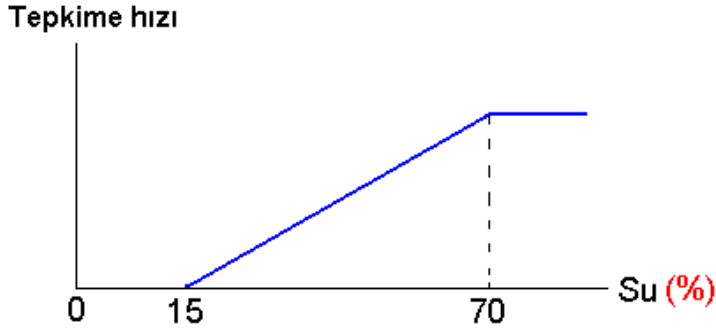


Şekil 2. 9 Farklı pH larda çalışan enzimlere ait tepkime hızı pH grafiği

2.4.5.5 Ortamdaki su miktarı

Enzimlerin çalışabilmesi için ortamda minimum %15 oranında su bulunması gereklidir. Ortamdaki su oranının %70'e kadar artması enzimin çalışmasını hızlandırır. %70'ten sonra reaksiyon sabit bir hızla devam eder.

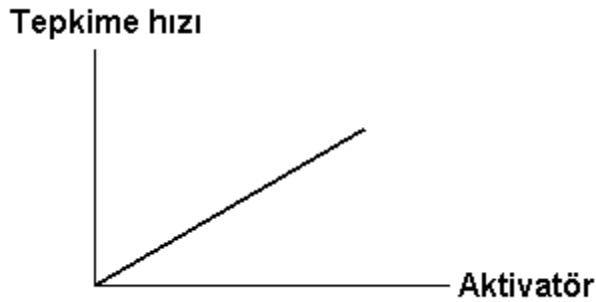
Aşağıdaki şekilde de yukarıda bahsedilen durum grafik olarak ifade edilmiştir (Şekil 2.10).



Şekil 2. 10 Tepkime hızının ortamdaki su miktarı ile ilişkisi

2.4.5.6 Aktivatörler

Enzimin çalışmasını hızlandıran maddelere aktivatör denir. Bileşik enzimlerde vitamin ve mineraller aktivatör olarak görev yapar. Ortamdaki aktivatör miktarının artması enzimin çalışmasını hızlandırır. Bu duruma ilişkin grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 2.11).

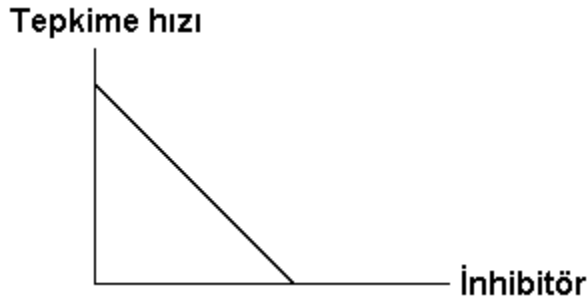


Şekil 2. 11 Aktivatör miktarı ve tepkime hızı arasındaki ilişki

2.4.5.7 İnhibitörler

Enzimin çalışmasını engelleyen maddelere inhibitör denir. İnhibitörler enzimin substrata bağlanacağı aktif bölgeye bağlanarak, enzimin çalışmasını engeller.

Siyanür, arsenik, kurşun ve civa gibi maddeler enzimler için inhibitör etki yapar. Ortamdaki inhibitör miktarı artarsa, reaksiyon durur. Bu duruma ilişkin grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 2.12).



Şekil 2. 12 İnhibitör miktarı ve tepkime hızı arasındaki ilişki

2.4.6 İmmobilize Enzimler

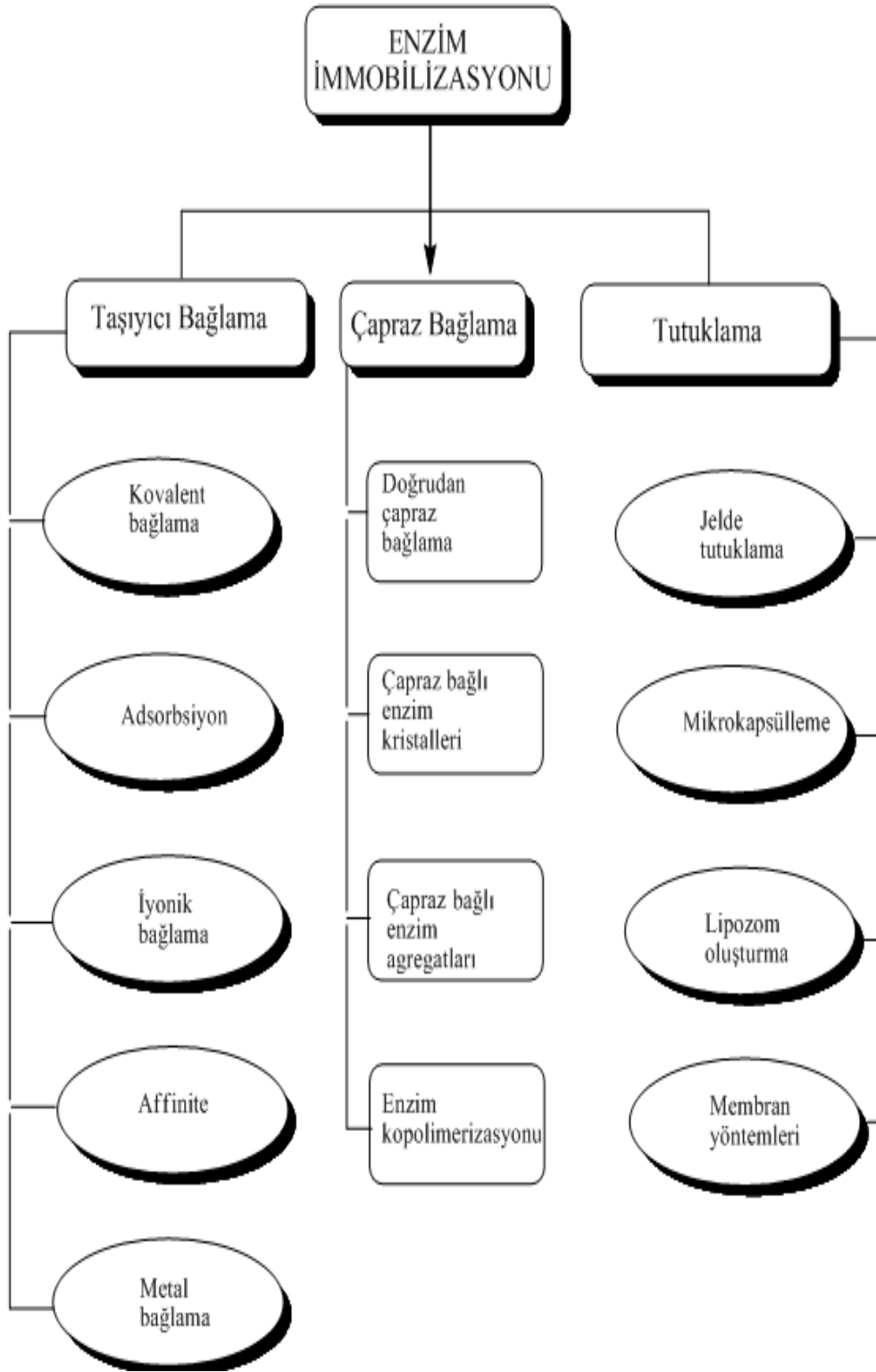
İmmobilizasyon; suda çözünen ve çözeltide serbest hareket edebilen enzim moleküllerinin suda çözünmeyen reaktif polimerik destek materyaller kullanılarak hareketlerinin sınırlandırılmasına denir.

İmmobilize olmuş enzimlerde, enzimin hareketleri sınırlandırılmış ve belli bir desteğe veya polimerik matrikste alıkonularak tekrar tekrar katalitik aktivite göstermesi amaçlanmıştır. İmmobilizasyon uygulamaları sadece enzimlere değil ayrıca hücrel organellere, mikrobiyal hücrelere, bitki hücrelerine ve hayvan hücrelerine vb. uygulanabilir.

İmmobilize enzimlerin ilk endüstriyel uygulaması 1969 yılında Chibata tarafından gerçekleştirilmiştir ve yine ilk olarak hücre immobilizasyonu Chibata ve çalışma arkadaşlarınca 1973 yılında yüksek seviyede aspartaz aktivitesine sahip E. coli 'yi poliakrilamid jelinde hapsedmişlerdir (**Bozkurt ve B.A. 2004**).

2.4.7 Enzim immobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyonu yöntemleri için çok farklı sınıflandırmalar olmakla beraber Şekil 2.13 'de olduğu gibi bir sınıflandırma yapmak mümkündür.



Şekil 2. 13 Enzim immobilizasyon yöntemleri (Yalçın 2013)

2.4.7.1 Kovalent bağlama

Kovalent bağlı enzim sistemleri ile ilgili ilk çalışmalar Gruphofer ve Schleith tarafından 1953 yılında diazoaktiflenmiş poliamino stirene; α -amilaz, pepsin ve ribonükleazın immobilizasyonu ile başlamıştır. Kovalent bağlanma genellikle enzimin yapısının ve fonksiyonel gruplarının bilindiği durumlarda kullanılır.

Kovalent bağlama ile immobilizasyon, destek yüzeylerde uygun bir yöntemle etkin bölgeler oluşturarak enzim molekülleri ile destek yüzeyler arasında kovalent bağ oluşturur.

Kovalent bağlanma yönteminin en büyük avantajı, bağların çok kuvvetli olması, böylece her türlü akış ortamında kullanılabilirliğidir. Enzim destek materyali üzerinde yer aldığından substrat ile teması kolaydır. Ayrıca enzim molekülü ve destek materyali birlikte genellikle ısı kararlılık gösterirler. Yöntemin dezavantajı, destek materyali ile enzim arasındaki sıkı etkileşimin enzimin doğal konformasyonunu bozabilmesidir (**Bal 2012**).

2.4.7.2 Adsorbsiyon

İmmobilizasyon için kullanılan en basit yöntemlerden biridir. Biyokomponentin transduser yüzeyine non-kovalent etkileşimler (hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri, elektron geçiş kompleksleri ve Van der Waals kuvvetleri) ile tutturulması prensibine dayanır. Adsorbsiyonda kullanılan başlıca adsorbanlar; selüloz, silikajel, cam, hidroksiapatit, kollajen, kil, polimerik aromatik reçinelerdir (**Şahin 2012**).

2.4.7.3 Çapraz Bağlama (Enzimlerin Birbirine Bağlanması)

Bu yöntemde küçük moleküllü bi veya multi- fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. İmmobilizasyon ve çapraz bağlanma derecesi, protein ve reaktif derişimine, pH'a ve immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutraldehit, klorformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiiranlar, divinilsulfonlar, pbenzokinon, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir.

Çapraz bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyonu dört farklı Şekilde gerçekleştirilir.

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

Çapraz bağlama reaksiyonları çok yumuşak koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur (**Acar 2009**).

2.4.7.4 Tutuklama

Yüksek molekül kütleli biyomoleküller sentetik veya doğal jel matrikslerde, yarı geçirgen membranlarda, misellerde ve mikro kapsüllerde tutuklanarak etkin bir Şekilde immobilize edilebilirler. Jel matriste tutuklamada kullanılan başlıca malzemeler akrilamit polimerleri, jeltin tabakaları, nişasta, kalsiyum aljinat jelleri, silikon lastiği, polivinil klorür, polivinil alkoldür (**Asav 2009**).

2.4.8 Laktat Oksidaz Enzimlerinin Özellikleri

- Stabilite : -20°C de yaklaşık 6 ay
- Moleküler ağırlık: 160,000
- İzoelektrik nokta: 4,3±0,2
- Michaelis sabiti: $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ (L-Laktat)
- İnhibitörler: Fe^{+++} , SDS
- Optimum pH: 7,5
- Optimum sıcaklık: 35–40°C
- pH Stabilitesi: 4,0–9,8 (25°C, 16 saat)
- Termal stabilit : 50°C altında (pH 7,0 ; 10 dakika)

2.4.9 Amperometrik Enzim Elektrotlar

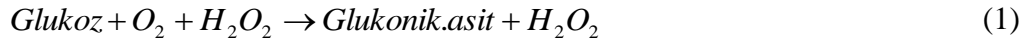
Amperometrik biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan bazı enzimler ve etki ettikleri substratlara Çizelge 2.2' de yer verilmiştir.

Çizelge 2. 2 Amperometrik biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan bazı enzimler (Yılmaz 2012)

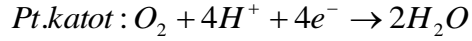
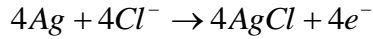
<u>Enzim</u>	<u>Substrat</u>
Glukoz oksidaz	Glukoz
Laktat oksidaz	Laktat
Peroksidaz	H_2O_2
Kolin oksidaz	Kolin
Üreaz	Etanol, metanol, formaldehit
Alkol oksidaz	Alkol
Lakkaz	Fenolik bileşikler
Glutatiyon redüktaz	İndirgenmiş glutatiyon
Tirozinaz	Fenolik bileşikler
Pironaz oksidaz	Piran halkasına sahip şekerler
Glutaminaz	Glutamin

2.4.9.1 Birinci nesil enzim elektrotlar

Birinci nesil enzim elektrotlar, sadece biyolojik tanıma elementi olan enzim ve ileticiden oluşur ve moleküler oksijeninin indirgenmesinin ya da reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksidin yükseltgenmesinin belirlenmesini esas alırlar. Sabit potansiyelde kaydedilen akım substrat derişimi ile orantılıdır. Clark ve Lyons tarafından glukoz tayinine yönelik geliştirilen enzim elektrot birinci nesil enzim elektrotlara örnek olarak gösterilebilir:



Böyle bir sistem bir platin katot ve bir Ag/AgCl referans elektrottan oluşur ve Pt katoda Ag/AgCl elektroda karşı -0,60 V'luk bir potansiyel uygulandığında, oksijen derişimi ile orantılı bir akım oluşur. Bu durumda oksijenin elektrokimyasal indirgenme hızı oksijenin ana çözültiden difüzyon hızına bağlıdır.

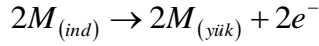
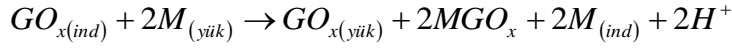


Birincil nesil enzim elektrotlarda reaksiyon ürünü olan hidrojen peroksidin +0,68 V'luk sabit potansiyelde aşağıdaki reaksiyona göre yükseltgenmesinden de yararlanılabilir (**Erden 2010**).

2.4.9.2 İkinci nesil enzim elektrotlar

İkinci nesil elektrotlarda analit ve biyolojik tanı materyali arasındaki tepkime sonucu ortaya çıkan elektroaktif türler bir medyatör aracılığı ile elektroda iletilir. Yapay veya doğal elektron transfer araçları olan medyatörler (M) iyon aktarımını kolaylaştıracağı ve hızlandıracağı için daha düşük potansiyellerde çalışma imkanı sunar ve bu sayede ortamda girişim yapabilecek türler engellenir. Medyatörlü enzim elektrodunun çalışma prensibi glukoz üzerinden aşağıdaki eşitliklerde verilmiştir:

(Erden 2012)

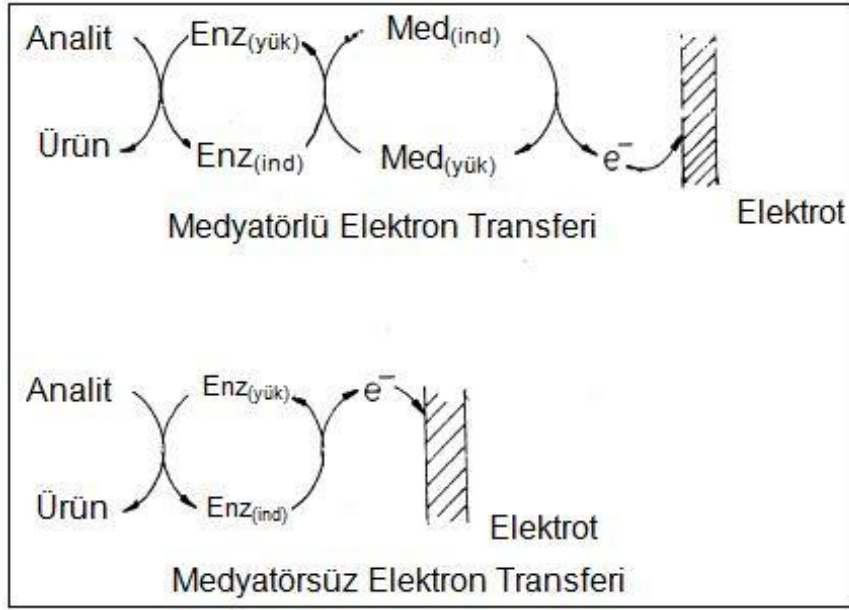


2.4.9.3 Üçüncü nesil enzim elektrotlar

Üçüncü nesil enzim elektrotlarının temelini, enzim ve elektrot arasındaki doğrudan elektron aktarımı oluşturur. N-metilfenotiyazin ve tetrasiyanoquinodimetandan hazırlanan (NMP⁺ TCNQ⁻) gibi organik iletken tuzlar bu tip elektrotlarda elektrot materyali olarak kullanılabilir (**Erden 2010**).

2.5 Elektron Transfer Aracısı (Medyatör) Sisteminin Önemi

Elektron transfer aracısının kullanıldığı enzim elektrotların, daha düşük elektrot potansiyeli sebebiyle girişim yapan maddelere karşı daha az duyarlı olduğu bilinmektedir. Medyatörler, biyobileşen ile redoks reaksiyonuna kolayca katılabilen ve böylece hızlı elektron transferine yardımcı olan yapay ajanlardır. Elektron transfercisi olan redoks araçları, elektronları enzimin redoks merkezinden elektrodun yüzeyine taşıyan, düşük molekül ağırlıklı redoks çiftidir (Şekil 2.14).



Şekil 2. 14 Medyatorlı ve medyatorsüz elektrotta elektron transferi
(Beskan 2011)

İdeal bir medyatorde aranılacak özellikler şu şekilde sıralanabilir:

- İndirgenmiş enzimle hızlı reaksiyon vermesi,
- Kararlı indirgenmiş ve yükseltgenmiş formlarının olması,
- İndirgenmiş formunun oksijenle reaksiyon vermemesi, çalışma koşullarında kararlı olması ve elektron aktarımı sırasında yan reaksiyonlara katılmaması,
- Numunedeki diğer elektroaktif türlerden daha düşük bir redoks potansiyeline sahip olması ve toksik olmaması (Chaubey ve Malhotra 2002).

2.6 Karbon Pasta Elektrotlar

Karbon pasta elektrot ilk kez 1958'de Adams ve grubu tarafından yayınlanmıştır. Rapor edilen bu sensörde kullanılan ve karbon tozu ile elektroaktif olmayan sıvı bağlayıcıdan oluşan karışım karbon pasta olarak adlandırılmıştır. (Švancara ve ark. 2001)

Modifiye karbon pasta elektrotlar ise suyla karışmayan çeşitli organik bağlayıcılarla grafit tozunun karıştırılmasıyla hazırlanırlar. Bu sayede kolayca yenilenebilir modifiye yüzeyler elde edilebilir. Modifiye edici ajan genellikle tek bir maddeden oluşurken pasta iki ya da daha fazla bileşen içerebilir.

Modifiye edici madde basitçe grafit ve pasta karışımıdır. Modifiye edicinin pasta içerisindeki bileşimi genellikle % 10 ile 30 arasında değişmektedir. Bu durum modifiye edici maddenin pasta yüzeyindeki aktif kısımlarının kapasitesine bağlıdır. Modifiye karbon pasta elektrotların hazırlanması oldukça kolaydır ve modifiye elektrodun hazırlanması için birden çok yöntem bulunmaktadır. Modifiye edicilerin fonksiyonu 4 farklı sınıfta toplanabilir.

- Arzu edilen türlerin seçimli tuzaklaması
- Bazı moleküllerin immobilizasyonu ile elektrot reaksiyonuna aracılık kazandırılması
- Katalitik reaksiyonda rol oynaması
- Karbon pasta elektrodun yüzey özelliklerinin değişimi (**Şar 2008**)

2.7 Alternatif akım (A.C.) impedansı yöntemi

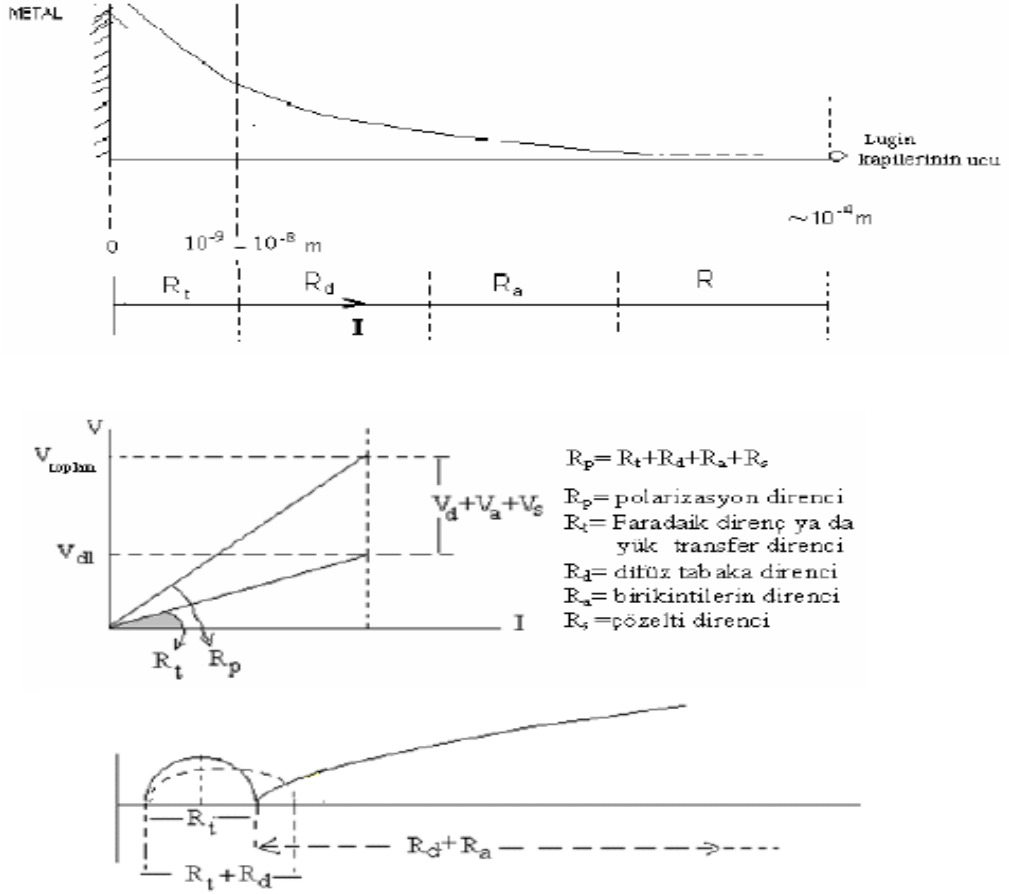
Elektrot direncini belirleme yöntemlerinden birisi de elektrodun yüzey yapısını bozmayan elektrokimyasal bir teknik olan alternatif akım (AC) impedans tekniğidir. Yüksek dirençli ortamlarda da ölçme yapılabilmesi, diğer yöntemlere göre üstünlük sağlamaktadır. Yöntemin özü, metal/çözelti ara yüzeyinde oluşan çift tabakanın uygulanan alternatif akım impedansının ölçülmesine dayanmaktadır. Elektrot yüzeyine değişik frekans aralığında küçük genlikli, düşük frekanslı alternatif akım belli sürelerde uygulanmaktadır. AC impedans tekniği ile ölçülen polarizasyon direnci (R_p) toplam dirence eşittir. Polarizasyon direnci; yük transfer direncine ($R_t = R_f$ faradik direnç de denir) ek olarak çift tabakanın kapasitif direncini (R_c), difüz tabaka boyunca oluşabilecek indüktif direnci (R_d) ve dışa doğru birikintilerin oluşturduğu birikinti direncini (R_a) vb. içermektedir (**McCafferty 2005**). AC impedans yöntemiyle değişik ortamlarda elde edilen kompleks diyagramlar incelendiğinde genel olarak yarım daireden sapan koniklerin (basık yarı-daire:

depressed semi-circle) elde edildiği görülür. Sapma daha çok düşey eksen boyunca gösterilen kompleks impedans üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Yapay elektronik bir eşdeğer devre yardımıyla elde edilen kompleks diyagramlar teoriden beklenen yarım daire biçimine tam uymakta, alüminyum ile elde edilen diyagramlar ise yarım daireye çok yaklaşmaktadır. Yapay hücrelerde gerçek kondansatörler kullanılmakta, alüminyum yüzeyinde oluşan ince oksit filmi de gerçek bir kondansatöre yakın özellik göstermektedir. Alüminyum yüzeyindeki ince oksit filmi dışında kalan poröz oksit ve difüz tabakanın toplam kapasiteye katkısı önemsiz kalmaktadır. Oysa herhangi bir basit sistemde, örneğin Fe/çözelti sisteminde difüz tabakanın etkisi önemli olmakta ve metal/çözelti ara yüzeyinin temsil ettiği kondansatör gerçek bir kondansatörden farklı davranmaktadır. Gerçek bir kondansatörün plakalarında yükler elektron hareketleri ile denetlenirken metal/çözelti ara yüzeyinde; metal tarafını elektronlar çözelti tarafını ise iyonlar denetlemektedir. Elektron ve iyonların büyüklük ve hareketlilik bakımından farklılıkları, teoriden beklenen değerlerin sapmasına neden olmaktadır. AC impedansı yönteminde küçük alternatif akım frekanslarında gözlenen indüktif lupların oluşması da aynı nedenlere dayanıyor olmalıdır (**Erbil 1987**).

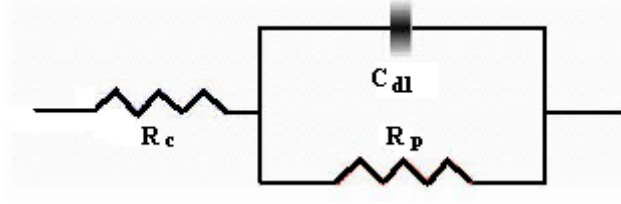
Nyquist diyagramlarında düşük ve yüksek frekanslardaki reel impedans farkı R_t çift tabakanın yapısına göre; iyonik kısımda metal yüzeyine adsorbe olan iyonlar ile metal yüzeyinden çözeltiliye doğru en az $10^{-9} - 10^{-8}$ m uzakta bir OHP (dış Helmholtz tabakası) tasarlanabilir. Lugin kapillerinin metal yüzeyinden en fazla 10^{-4} m uzakta olduğu varsayıldığında, Lugin kapileri ve OHP arasında önemli bir mesafe vardır (OHP'nin kalınlığından $10^4 - 10^5$ kat daha fazla uzağında). Difüz tabakada adsorplanmış türler (herhangi bir molekül ya da iyon varlığı) ve çözelti bölgesine karşılık gelen her bir katkı, ölçülen dirençte hesaba katılmak zorundadır (Şekil 2.15). Bu görüşe göre, direnç, metal/OHP arasında R_t 'ye eşit olmak zorundadır. Diğer bütün dirençler akım üzerinde basit (küçük) dirençler olarak düşünülmelidir. Öyle ise ölçülen R_p-R_t ilişkisi Şekil 2.15'de verildiği gibidir, burada akıma karşılık gelen toplam potansiyel düşmesi, V_{toplam} ve difüz tabakadaki potansiyel düşmesi, V_{dl} 'dir. Nyquist diyagramlarında düşük ve yüksek frekanslardaki reel impedans farkı, R_p

olarak değerlendirilmektedir ve R_p bütün dirençlerin toplamı olarak alınmaktadır (Tüken 2000 ve Özcan 2004) .



Şekil 2.15 İmpedans eğrilerinin şematik yaklaşımı

AC impedans yönteminin uygulanmasında, çift tabaka kapasitesi ve metal yüzeyi ile çözeltinin iç kısmı arasındaki dirençlerden oluşan bir “Elektronik eşdeğer devre tasarlanarak polarizasyon direnci belirlenir (Şekil 2.16).



Şekil 2. 16 Eşdeğer devre modeli

R_c : elektrolit direnci, R_p : polarizasyon direnci, C_{dl} : çift tabakanın kapasite eşdeğeri (kapasitans) dir. Şekil 2.16, bir elektrokimyasal sistemde metal/elektrolit ara yüzeyinde oluşan çift tabakayı temsil etmektedir. Çift tabaka, kapasitesi “C” olan bir kondansatöre eşdeğer kabul edilmektedir. İmpedans spektroskopinin temelini oluşturmaktadır.

Bu devrenin impedansı:

$$Z = Z_r + iZ_i = R_c + \frac{R_p}{1 + iwR_p C_{dl}}$$

$$w = 2\pi fi = \sqrt{-1} \quad (1)$$

Burada denklem (1)'in son teriminin pay ve paydası $1-iwR_p C_{dl}$ ile çarpımı

$$Z = R_c + \frac{R_p}{1 + w^2 R_p^2 C_{dl}^2} - \frac{i w R_p^2 C_{dl}}{1 + w^2 R_p^2 C_{dl}^2}$$

$$(2)$$

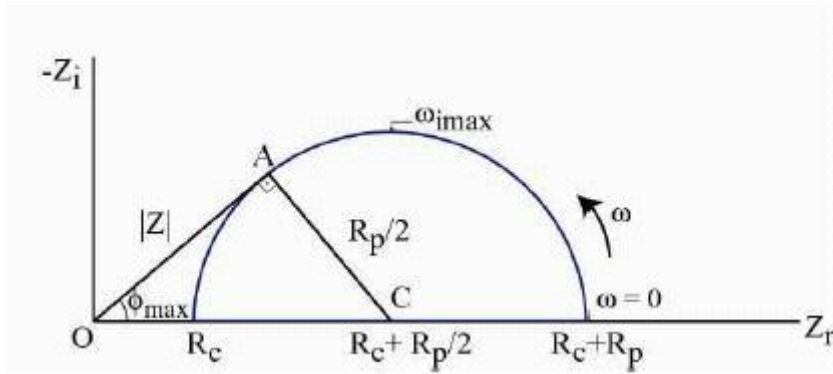
Denklem (1) ve (2) karşılaştırılırsa, Z_r ve Z_i aşağıdaki eşitliklere eşit olduğu kolayca görülür:

$$Z_r = R_c + \frac{R_p}{1 + w^2 R_p^2 C_{dl}^2}$$

$$Z_i = -\frac{w R_p^2 C_{dl}}{1 + w^2 R_p^2 C_{dl}^2}$$

$$\left[Z_r - \left[R_c + \frac{R_p}{2} \right] \right]^2 + Z_i^2 = \left(\frac{R_p}{2} \right)^2 \quad (3)$$

Denklem (3) merkezi $(R_c + R_p/2, 0)$ ve yarıçapı $R_p/2$ olan bir çember denklemdir. Bu denklemin grafiği Z_r yatay eksen ve Z_i dikey eksen üzerinde gösterilerek bir grafik çizilirse Şekil 2.17’de verilen Nyquist diyagramı elde edilir. Şekil 2.16’de görüldüğü gibi Nyquist diyagramları, iki bölümden oluşmaktadır. Yüksek frekans bölgesinde diyagram yarım daireseldir: $\frac{1}{2} R_p$, $Z_{i\max}$ ’a eşittir **(Gabrieli 1992)** Denklem (1) ve (2)’den, frekans sıfıra yaklaştıkça Z_r ’nin $R_c + R_p$ ’ye eşit olduğu, frekans sonsuza yaklaştıkça Z_i ’nin R_c ’ye eşit olduğu kolayca görülür. Nyquist diyagramında büyük çaplı yarım daireler, polarizasyon direncinin sayısal olarak dairenin çapına eşit olduğunu gösterir. Bu durumda, korozyon hızı küçük olmaktadır. Korozyon arttıkça, yük transfer direnci değerleri azalır, dolayısıyla, Nyquist diyagramlarında yarı dairelerin çapı azalır. Teorik olarak elde edilen denklem (1) ve (2)’ye göre deneysel bulgular bir yarım dairesel eğriyi vermelidir. Ancak, gerçek deneysel sonuçlarda bazı düzeltme faktörleri gerekmektedir.



Şekil 2. 17 Şekil 2.16’de verilen elektrik devresinin impedansının Nyquist diyagramı

2.7. Kaynak Özeti

2.7.1. Medyatörler ile ilgili çalışmalar

Casero ve ark. (2000) hidrojen peroksitin substrat ve 1,4-benzokinonon medyatör olarak kullanıldığı amperometrik bir nitrik oksit enzim elektrodu hazırlamışlardır. Peroksidaz enziminin aktivitesi nitrik oksit varlığında inhibe olur, bu nedenle enzim aktivitesindeki düşüş çözeltilerdeki nitrik oksit derişimi ile orantılıdır. Çalışmada dönüşümlü voltametri ile çeşitli medyatörlerin enzimden elektroda elektron transfer kabiliyeti duyarlılık ve güvenilirlik değerlendirilerek araştırılmış ve 1,4-benzokinon ve 1,4-naftakinonun metil viyolojen ve [Ru(phendion)₂bpy](PF₆)₂'den daha uygun olduğu ve daha yüksek verim için kullanılabilceği görülmüştür. Biyosensör nitrik okside $2,7 \times 10^{-6} - 1,1 \times 10^{-5}$ molL⁻¹ aralığında dogrusal cevap göstermiş ve gözlenebilme sınırı $2,0 \times 10^{-6}$ molL⁻¹ olarak rapor edilmiştir.

B. Serra ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları bir çalışmada laktat tayini için, laktat oksidaz ve peroksidaz enzimleri ve medyatör olarak ferrosenin kullanıldığı bir grafit- teflon kompozit biyosensör geliştirmişlerdir. Geliştirilen biyosensörü süt, şarap ve yoğurt gibi gıda maddelerindeki laktik asit miktarını ölçmek için kullanmışlardır. Bu bienzim biyosensör, enzimlerin ve medyatörün grafit-teflon matriks içine basit fiziksel bir bağla bağlanmasıyla elde edilmiştir. Teflon içeriği % 70,0 olan elektrot ile pH 7,4 te ve 0,00 V da çalışılmıştır. Bu biyosensör dış çevresinin parlatma yapılarak temizlenebilir olması nedeniyle yenilenebilir niteliktedir ve bu şekilde bu biyosensörün 6 ay süreyle kullanılabilceği belirtilmiştir. L- laktat için saptama limiti $1,4$ mmolL⁻¹ olarak verilmiştir.

Garjonyte ve arkadaşları flavositokrom b2 kaynağı olarak kullanılan ekmek mayası *Saccharomyces cerevisiae* ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrotların laktik asit biyosensörü olarak kullanımını araştırmışlardır. Yükseltgenmiş haldeki

flavositokrom b2 laktik asit ile reaksiyona girmiş ve laktik asit pirüvik aside dönüşürken flavositokrom b2 indirgenmiştir. İndirgenmiş flavositokrom b2 yükseltgenmiş haldeki medyatör ile reaksiyona girmiş ve flavositokrom b2 yükseltgenirken medyatör indirgenmiştir. İndirgenmiş medyatör tekrar elektrot yüzeyinde yükseltgenmiş ve laktik asit tayini bu prensibe dayanarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada fenazin metosülfat medyatör olarak kullanılmış, optimum çalışma potansiyeli 0,0 V ve çalışma pH'sı 7,2 olarak bulunmuştur. Biyosensörün glukoz, askorbik asit, asetaminofen, ve etanole karşı seçiciliği araştırılmış ve sadece askorbik asidin girişim etkisi gözlenmiştir. Biyosensör laktik aside 0,03-1 mmolL⁻¹ aralığında doğrusal cevap göstermiş, hazırlanan biyosensörün süt, yoğurt gibi gerçek numunelerde laktik asit tayininde kullanılabilirliği incelenmiştir.

2.7.2 Enzim Elektrotlar ile İlgili Çalışmalar

Gülce ve ark. (1995) sükröz tayini için glukoz oksidaz ve invertaz enzimlerini platin elektrot yüzeyine kaplanmış poli(vinilferrosenyum) matrikse birlikte immobilize ederek amperometrik enzim elektrot hazırlamışlardır. Polimerdeki PVF⁺ bölgeleri hidrojen peroksitin yükseltgenmesi için katalitik etki göstermiş ve bu da elektrodun duyarlılığının artışı ile sonuçlanmıştır. Elektrodun sükröze cevabı, DKE'a karşı +0,70 V'luk sabit potansiyel uygulandıktan bir dakika sonra ölçülmüş ve elektrodun doğrusal çalışma aralığı 0–55 mmolL⁻¹ olarak bulunmuştur. Elektrot kararlılığı 74 gün boyunca 166 ölçüm yapılarak incelenmiş elektrot cevabının ilk birkaç gün maksimum değer gösterdiği sonra azaldığı belirtilmiştir.

Junko Motonaka ve ark. (1998) osmiyum kompleksiyle birlikte L- laktat dehidrogenaz ve D- laktat dehidrogenaz enzimlerini kullanarak L-laktik asit ve D-laktik asit miktarlarını ölçmek için bir biyosensör geliştirmişlerdir. Elektrodun karakterize edilmesi için döngüsel voltamogram alınmış ve optimal koşullar belirlenmiştir. Optimal koşullar altında ölçümlerde L- laktik asit için 0,1±10 mmolL⁻¹ ve D-laktik asit için 1±20 mmolL⁻¹ lineer aralık olduğu gözlenmiştir. Hazırlanan elektrodun hassasiyetinin bir ay süreyle korunduğu da çalışmada belirtilmiştir.

Paz Zanini (2004) ve arkadaşları laktik asit tayini için laktat oksidaz enziminin laponit/kitosan hidrojellemeleri ile modifiye edilmiş camı karbon elektroda immobilize edilmesi ile bir biyosensör hazırlamışlardır. Medyatör olarak ise ferrosen–metanol kullanılmıştır. Çalışmada en iyi hidrojel bileşimi araştırılmış ve laponit/kitosan için en uygun oran 25/50 olarak bulunmuştur. Laktik asit biyosensörü için doğrusal aralık $1,0-7,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$, alt tayin sınırı $3,8 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$, cevap zamanı 4 saniye ve duyarlılık $(0,326 \pm 0,003) \text{ A cm}^{-2} \text{ M}^{-1}$ olarak rapor edilmiştir. Glukoz, metanol, etanol, sitrik asit, asetik asit, ürik asit gibi çeşitli maddelerin biyosensör cevabına etkisi araştırılmış ve sadece askorbik asidin girişim etkisi gözlenmiştir. Hazırlanan biyosensör bira, şarap ve sütte laktik asit tayininde kullanılmış ve elde edilen sonuçlar standart spektrofotometrik metotla uyumlu bulunmuştur.

Garjonyte ve arkadaşları (2011) tarafından Prusya mavisi ve nafyon film içerisine farklı kaynaktan elde edilen laktat oksidaz enzimlerinin immobilize edilmesi ile hazırlanan amperometrik laktik asit biyosensörlerinin özellikleri akış enjeksiyon analizi ile araştırılmıştır. Prusya mavisi camı karbon elektrot yüzeyine FeCl_3 , KCl , HCl ve $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ içeren çözeltiden 40 saniye boyunca 400 mV potansiyel uygulanarak biriktirilmiş, laktat oksidaz enzimi bu elektrot yüzeyine damlatılmış ve oda sıcaklığında çözücünün buharlaşmasından sonra elektrot yüzeyi nafyon film ile kaplanmıştır. Ölçümler Ag/AgCl 'e karşı -50 mV potansiyelde gerçekleştirilmiş ve hazırlanan biyosensörlerin $0,8 \text{ mmolL}^{-1}$ derişime kadar laktik aside doğrusal cevap verdiği bulunmuştur. Çalışmada farklı kaynaktan elde edilen enzim ile hazırlanan biyosensörlerin çalışma aralığı açısından farklı davranış göstermediği bulunmuştur. En düşük alt tayin sınırı ise *Enterococcus türleri* kaynaklı liyofilize enzimden 0,6 Ünite içeren biyosensörle elde edilmiştir. Bu biyosensör ile $0,02 \text{ mmolL}^{-1}$ laktik asidin 80 kez enjeksiyonu sonucunda cevap akımında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir.

Arnaldo C. Pereira ve ark. (2007) laktat dehidrogenaz (LDH) ve Meldola mavisi (MB) ile oluşturulan ve dönüştürücü, sabitleyici, immobilizasyon matriksi

olarak da çok duvarlı karbon nanotüpün kullanıldığı bir laktat biyosensörü geliştirmişlerdir. Amperometrik cevap, laktat dehidrogenazın katalizörlüğünde laktatın NAD^+ ile verdiği enzimatik reaksiyon sonucunda alınmıştır. Enzim Meldola mavisini üzerine çapraz bağlarla bağlanmış ve daha sonra da çok duvarlı karbon nanotüp üzerine adsorbe edilmiştir. Optimum koşulları elde etmek için pH , destek elektrolit, LDH ve NAD^+ miktarları ve çalışma potansiyeli optimize edilmiştir. Amperometrik sensör mükemmel bir hassasiyet ($3,46 \text{ Acm}^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$) göstermiştir. Bu biyosensör oldukça geniş bir doğrusal aralığa ($0,10\text{--}10 \text{ mmol L}^{-1}$) sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle bu biyosensör kan örneklerinde laktat tayini için son derece kullanışlıdır.

2.7.3. L-Laktat Tayini ile İlgili Çalışmalar

Haccoun ve ark. (2004) L-Laktat tayini için poli (5-hidroksi-1,4-naftakinon-co-5-hidroksi 3- tiyoasetik asit-1,4-naftakinon) kopolimer filmine kovalent olarak bağlanmış laktat oksidaz enzimini kullanarak amperometrik bir biyosensör hazırlamışlardır. Laktat ölçümleri oksijenli ortamda film kaplı platin elektrotta Ag/AgCl elektroda karşı $+0,50 \text{ V}$ 'luk bir potansiyel uygulanarak yapıldığında oksijen doğal medyatör olarak görev görmüş ve duyarlılık $350\pm 50 \mu\text{AmolL}^{-1}\text{cm}^{-2}$ olarak bulunmuştur. Oksijensiz ortamdaki ölçümlerde ise polimerdeki kinon immobilize bir medyatör görevi görmüş ve film kaplı camı karbon elektrot ile Ag/AgCl elektroda karşı $-0,10 \text{ V}$ 'luk düşük bir potansiyelde duyarlılık $110\pm 50 \mu\text{AmolL}^{-1}\text{cm}^{-2}$ olarak bulunmuştur. Çalışmada laktatın son derece düşük bir potansiyelde tayini filmdeki kinon grubunun medyatör olarak görev yapması ile açıklanmıştır ve kinon grubunun en büyük avantajı ise bu kadar düşük bir potansiyelde girişim yapan türlerin yükseltgenmesinin önlenmesi olarak belirtilmiştir.

M.M. Rahman ve ark. (2009), altın elektrot üzerine iletken polimer (poli-5,20-50,20 0-tertiyofen-30-karboksilik asit) ve çok duvarlı karbon nanotüp kaplayarak amperometrik bir laktat biyosensörü geliştirmişlerdir. Bu elektrot üzerine

ayrıca laktat dehidrogenaz ve NAD^+ nın oksidize formu immobilize edilmiştir. Polimer kaplı elektrot yüzeyine laktat dehidrogenazla birlikte amin grupları ve karboksilik asit eklenmesiyle elektrodun okuma sinyali arttırılmıştır. Kalibrasyon eğrisindeki r^2 değeri 0,9995 olarak bulunmuştur. Hassasiyet ise $0,0106 \text{ l A/l molL}^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Hazırlanan bu elektrot süt ve insan serum örneklerinde başarılı sonuçlar vermiştir.

Wang ve arkadaşları (2009) tarafından laktat tayini için negatif yüklü laktat oksidaz enziminin pozitif yüklü nanoboyuttaki kobalt fitalosiyanın ile elektrostatik çekiminden yararlanılarak immobilize edildiği kolloidal biyokompozite dayalı bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu biyokompozit camsı karbon elektrot üzerinde mükemmel film oluşturabilme ve yüksek adsorplama özelliğinden dolayı laktat biyosensörlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Çalışmada nanoboyuttaki kobalt fitalosiyanın sadece enzim immobilizasyonu amacı ile kullanılmamış, aynı zamanda hidrojen peroksitin yükseltgenmesi için elektrokatalitik aktivite de göstermiştir. MnO_2 nanopartiküller içeren kitosan film ise askorbik asitten gelebilecek girişim etkisini azaltmak amacı ile bir dış katman olarak biriktirilmiştir. Hazırlanan biyosensör $0,020\text{--}4,0 \text{ mmolL}^{-1}$ aralığında laktata doğrusal cevap göstermiş ve yüksek doğrulukla gerçek numunede laktat tayininde kullanılmıştır.

Fumio Mizutani ve arkadaşları (1995), poliyon kompleks membran içine laktat oksidaz enziminin immobilize edilmesiyle laktat tayini için bir elektrot geliştirmişlerdir. Camsı karbon elektrot polilizin ve laktat oksidaz içeren sulu çözeltiye daldırılmış ve daha sonra poli(4-stirenesülfonat) eklenerek kurumaya bırakılmıştır. Elektrodun laktik aside cevap süresi 5 s olarak belirtilmiştir. Alt tayin sınırı $0,1 \text{ pmolL}^{-1}$ olarak verilmiştir. Bu şekilde hazırlanan elektrot laktik asit, asetaminofen girişimlerini de elimine etmiştir. Elektrodun kullanım süresinin yaklaşık iki ay olduğu belirtilmiştir.

Huang ve arkadaşları 2011 yılında çok duvarlı karbon nanotüplere ve platin nanopartiküllere dayanan bir amperometrik laktik asit biyosensör geliştirmişlerdir. Çok duvarlı karbon nanotüp ve platin nanopartiküllerden oluşan kompozit film camsı

karbon elektrot üzerine yayılmıştır. Enzim modifiye elektrot üzerine adsorpsiyon yöntemi kullanılarak immobilize edilmiştir. Enzim immobilize modifiye elektrot enzim kaybının önlenmesi amacı ile tetraetil ortosilikat ve HCl ile hazırlanan ince bir sol-gel film tabakası ile kaplanmıştır. Çalışmada platin nanopartikül ve nanotüp kompozitinin sadece çok duvarlı karbon nanotüp ile hazırlanan elektroda kıyasla daha yüksek katalitik aktivite gösterdiği bulunmuştur. Biyosensör 0,50 V çalışma potansiyelinde laktik aside 0,2–2,0 mmolL⁻¹ derişim aralığında doğrusal cevap göstermiş, cevap zamanı 5 saniye, duyarlılığı 6,36 µA mmolL⁻¹ olarak rapor edilmiştir. Girişim çalışmasında biyosensörün yaygın girişimcilere iyi bir seçicilik gösterdiği bulunmuş ve gerçek numune analizlerinde referans yöntem olarak seçilen spektrofotometrik yöntemle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Piano ve arkadaşları (2010) tarafından laktik asit tayini için Meldola's Blue-Reinecke tuzu ile modifiye edilmiş perde baskılı karbon elektrot geliştirilmiştir. Perde baskılı elektrot laktat dehidrogenaz enzimi ve NAD⁺ ile kaplanmış ve elektrot yüzeyine yarıgeçirgen membran olarak selluloz asetat tabakası biriktirilmiştir. Modifiye elektrot çalışma potansiyeli olarak 0,05 V'un kullanıldığı amperometrik akış hücresine bağlanmıştır. Biyosensör laktik aside 0,55–10 mmolL⁻¹ aralığında doğrusal cevap göstermiş ve alt tayin sınırı 0,55 mmolL⁻¹ olarak rapor edilmiştir. Hazırlanan biyosensör serumda laktat tayininde başarı ile kullanılmıştır.

Romero ve arkadaşları (2011) laktat oksidaz enzimini platin elektrot üzerindeki albumin ve musinden oluşan hidrojele immobilize ederek bir biyosensör hazırlamışlardır. Enzim daha sonra glutaraldehit aracılığı ile polikarbonat temelli polimer matrikse çapraz olarak bağlanmıştır. Geliştirilen biyosensörün çalışma potansiyeli 0,65 V, doğrusal çalışma aralığı 0,7 µmolL⁻¹-1,5 mmolL⁻¹, cevap zamanı 90 saniye, alt tayin sınırı 0,7 µmolL⁻¹ ve raf ömrü 30 gün olarak rapor edilmiştir.

Kun Wang ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada negatif yüklü laktat oksidaz (LOD) ile zıt yüklü nano kobalt fitalosiyininin elektrostatik etkileşimle birbirlerine kendiliğinden bağlanarak oluşan bir biyokompozit elde etmişlerdir. Bu biyokompozitin camsı karbon elektrot üzerinde mükemmel film

tabakası oluşturma özelliğinden yararlanılarak laktat tayini için bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu çalışmada nano kobalt fitalo siyanin sadece laktat oksidazın immobilize olması için değil aynı zamanda enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan H₂O₂'nin oksidasyonu sırasında gösterdiği elektrokatalitik etkisinden de yararlanılmıştır. Bu sensöre dış katman olarak MnO₂ nanopartikülleri içeren ve bu şekilde askorbik asidin girişimini engelleyen kitosan tabakası kaplanmıştır . Optimum koşullar altında biyosensör geniş bir lineer aralığa ve yüksek hassasiyete (3,98 Acm⁻² mmolL⁻¹) sahiptir. Biyosensör aynı zamanda iyi bir tekrarlanabilirlik ve uzun bir raf ömrüne de sahiptir. Bu biyosensör gerçek örneklerde laktat tayini için kullanılmıştır.

J. Haccoun ve arkadaşları 2004 yılında laktat oksidazın elektropolimerize kopolimer film poli(5-hidroksi-1,4-naftakinon-co-5-hidroksi-3-tiyasetik asit-1,4-naftakinon) üzerine kovalent bağlarla bağlandığı bir laktik asit biyosensörü geliştirmişlerdir. Elektropolimerize film Pt elektrot üzerine kaplanmıştır. Bu biyosensörün hassasiyeti + 0,5 V da 350±50 AmolL⁻¹cm⁻² olarak verilmiştir. Biyosensör üzerine bir kinon grubunun medyatör olarak eklenmesiyle aynı çalışmalar bu kez camı karbon elektrotta yapılmış ve hassasiyet 110 ± 40 AmolL⁻¹ cm⁻² olarak bulunmuştur.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Cihazlar ve Malzemeler

3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

Amperometrik ölçme işlemleri Electrochemical Analyzer Dropsens 2.0 (İspanya) marka elektrokimyasal çalışma sistemi kullanılarak yapıldı. Bu elektrokimyasal sisteme BAS C3 (Bioanalytical Systems, Inc., A.B.D.), elektrot hücre standı bağlanarak tüm deneyler bu hücrelerde gerçekleştirildi. Empedans ölçümleri bilgisayar bağlantılı IVIUM marka (Ivium Technologies, Hollanda) elektrokimyasal analiz cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Hücre ve elektrotlar

Amperometrik ölçme işlemlerinde Şekil 3.1’de verilen üç elektrotlu ölçme sistemi kullanıldı. Referans elektrot olarak BAS MF-2052 no’lu Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak BAS MW-1034 no’lu platin tel ve çalışma elektrodu olarak 15 mg iç hacimli karbon pasta elektrot kullanıldı.



Şekil 3. 1 Ölçümlerde kullanılan hücre sistemi

3.1.3. pH metre

Tampon çözeltilerinin pH'larının ölçülmesinde Hanna Instruments HI 2211 marka pH metre cihazı kullanıldı.

3.1.4. Mikro pipet

Çözelti ilaveleri için Autolab marka $\pm 0,05 \mu\text{L}$ hassasiyeti olan mikro pipetler kullanıldı.

3.1.5. Azot gazı

Çözeltide çözülmüş halde bulunan oksijeni uzaklaştırmak için Yalız Sınai Tıbbi gazlar A.Ş. firmasından temin edilen yüksek saflıktaki (% 99,99) azot gazı kullanıldı.

3.1.6. Saf su

Çözeltinin hazırlanmasında kullanılan saf su; Purelab Option Q DV 25 marka saf su cihazından sağlandı.

3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları ve temin edildikleri firmalar Çizelge 3.1 'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar

<u>Kullanılan Kimyasal</u>	<u>Temin Edildiği Firma</u>
Laktik asit ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$)	Sigma Aldrich
BCC (Benzo[c]sinolin)	Sigma Aldrich
Laktat oksidaz (pediococcus)	Sigma Aldrich
Sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4)	Tekkim
Sodyum fosfat monobazik dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Tekkim
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma Aldrich
Sodyum hidroksit (NaOH)	Tekkim %99

3.3 Hazırlanan Çözeltiler

3.3.1. Fosfat Tampon Çözeltisi

0,05 molL⁻¹ fosfat tamponu hazırlamak için hesaplanan miktarlarda sodyum dihidrojenfosfat dihidrat ve disodyum monohidrojenfosfat tartılarak saf suda çözüldü. Hazırlanan fosfat çözeltilerini istenilen pH'lara ayarlarken 0,10 M NaOH ve 0,10 molL⁻¹ H₃PO₄ çözeltileri kullanıldı. pH çalışmalarında kullanılmak üzere sırasıyla 0,05 molL⁻¹ derişimde 5,0; 6,0; 7,0 pH' larda fosfat tamponları hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler kullanılmadıkları zaman buzdolabında +4°C'de muhafaza edildi.

3.3.2. TRIS tamponu

0,05 molL⁻¹ TRIS tamponu hazırlamak için hesaplanan miktarlarda tris (hidroksimetil) aminometan tartıldı ve 0,10 molL⁻¹ HCl çözeltisi kullanılarak istenilen pH değerine ayarlandı. pH çalışmalarında kullanılmak üzere sırasıyla 0,05 molL⁻¹ derişimde 7,5; 8; 8,5; ve 9,0 pH'larda TRIS tamponları hazırlandı. Hazırlanan çözelti buzdolabında +4°C'de saklandı.

3.3.3. Enzim çözeltileri

Laktat Oksidaz enzimi (LOD) belirli bir miktar tartılarak ultra saf suda çözüldükten sonra 10 µL'lik (10ünite/10µL)(S1) porsiyonlara ayrıldı ve buzdolabında -20°C'de muhafaza edildi. Kullanılacağı zaman S1 porsiyonlarını, S2 (1ünite/10µL), S3 (0,1ünite/10µL) ve S4 (0,01ünite/10µL) şeklinde porsiyonlara ayrıldı. Elektrodumuzu hazırlarken S4 (0,01ünite/10µL) enzim çözeltisi alınarak karbon pasta enzim elektrot karışımına ilave edildi.

3.3.4. Laktik Asit Çözeltisi

Çalışmalarda kullanılan 10^{-3} molL⁻¹ laktik asit çözeltisi, laktik asidin gerekli miktarlarda tartılıp saf suda çözülmesiyle hazırlandı. Kullanılmadığı durumlarda çözelti buzdolabında +4°C’de saklandı.

3.3.5. Girişim çalışmalarında kullanılan çözeltiler

Serumda bulunan bazı türlerin hazırlanan enzim elektrodun cevabına etkisinin araştırılması için bu türlerin stok çözeltileri hazırlanıp hücreye eklendi. Bu çözeltiler aşağıda verildiği şekilde hazırlandı:

L- askorbik asit, ürik asit ve glikoz stok çözeltileri her birinin derişimleri $1,0 \times 10^{-2}$ molL⁻¹ olacak şekilde ilgili katılarının tartılıp saf suda çözülmesi ile hazırlandı.

Ürik asit stok çözeltisi ise derişimi $1,0 \times 10^{-2}$ molL⁻¹ olacak şekilde uygun miktarda tartılıp % 0,45 (k/h)’lik Li₂CO₃ çözeltisinde çözümlenerek hazırlandı.

Girişim çalışmalarında verilen maddelerin fizyolojik derişimleri, stok çözeltilerinin belirli miktarlarının içinde tampon bulunan elektrokimyasal hücreye katılmasıyla elde edildi.

3.4. BCC ve ÇDKNT ile Modifiye Edilmiş Karbon Pasta Enzim Elektrotların Hazırlanması

BCC ve ÇDKNT ile modifiye edilmiş karbon pasta enzim elektrot aşağıda tarif edilen şekilde hazırlandı:

Sade KPE hazırlanırken 15 mg grafit tozu tartıldı ve bu karışıma 10 µL parafin yağı eklendi.

BCC ile modifiye edilmiş elektrodumuzda 12,5 mg grafit tozu ve 2,5 mg BCC tartıldı ve 10 µL parafin yağı eklendi ve elektrot hazırlandı.

ÇDKNT ile modifiye edilmiş elektrodumuzda 11,5 mg grafit tozu ve 3,5 mg ÇDKNT tartıldı ve 10 µL parafin yağı eklendi ve elektrot hazırlandı.

9,5 mg grafit tozu ve 2,5 mg BCC ve 3,5 mg ÇDKNT tartıldı. Grafit tozu, BCC ve ÇDKNT cam bir petri kabında homojen bir dağılım elde edilene kadar karıştırıldı. Bu karışıma 10 µL parafin yağı eklendi ve yaklaşık 20 dakika spatül yardımıyla karıştırılmaya devam edildi. Hazırlanan pasta karbon pasta elektrot gövdesi içine yerleştirildi ve elektrot yüzeyi pürüzsüz bir yüzeyde düzleştirildi.

4. DENEY SONUÇLARI VE BULGULAR

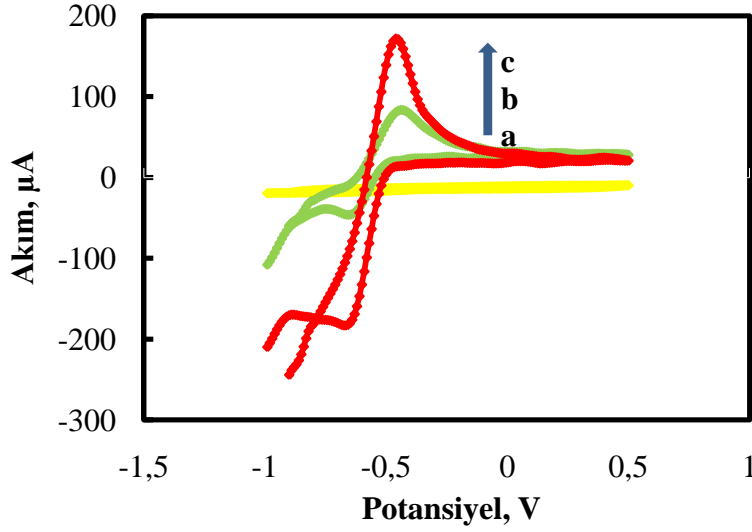
4.1. Biyosensörün Hazırlanma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular

4.1.1 Biyosensörün Elektrokimyasal Özellikleri

İletken bir maddeyi içeren durgun bir çözeltide bir çalışma elektroduna zamanla doğrusal olarak artan bir potansiyel uygulandığında akım–potansiyel eğrisinin bir pik şeklinde oluştuğu görülür. Bu uygulamada potansiyel taraması ileri yönde belli bir potansiyel değerine ulaştıktan sonra yine doğrusal olarak azalacak biçimde ters çevrilirse, bu tekniğin adı dönüşümlü voltametri (DV) olur.

Elektroda hızlı bir potansiyel taraması uygulandığı zaman potansiyel, standart indirgenme potansiyeline yaklaşır ve madde indirgenmeye başlar. Potansiyel negatif değerlere ulaştıkça elektrot yüzeyindeki maddenin indirgenme hızı ve buna bağlı olarakta daha fazla madde indirgeneceğinden akım değeri artar. İndirgenme hızı arttıkça akımı, elektrot yüzeyine difüzyonla gelen madde miktarı kontrol etmeye başlar. Difüzyon tabakası zamanla kalınlaşacağı için difüzyon hızı ve dolayısıyla akım azalır. (Tekin 2008)

Bu çalışmada kullanılan elektrotların elektrokimyasal özelliklerini incelemek amacıyla KPE, KPE-BCC ve KPE-BCC-ÇDKNT elektrotları ayrı ayrı hazırlanarak her bir elektrodun $0,05 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0 fosfat tamponunda dönüşümlü voltamogramları alındı. (Şekil 4.1). Şekil 4.1 incelendiğinde sade KPE yüzeyinde herhangi bir indirgenme veya yükseltgenme pikine rastlanmadı. BCC ile modifiye edilmiş KPE'un tampon çözeltideki dönüşümlü voltamogramı incelendiğinde sırasıyla $-0,66 \text{ V}$ ve $-0,44 \text{ V}$ potansiyellerinde BCC'ye ait indirgenme ve yükseltgenme pikleri gözlemlendi. Elektrot BCC ve ÇDKNT ile modifiye edildiğinde indirgenme yükseltgenme piklerine ait pik akımlarında artış görüldü. Bu sonuç ÇDKNT'lerin yüksek iletkenliği ve geniş yüzey/hacim oranları ile açıklanabilir. BCC ve ÇDKNT ile modifiye elektroda enzim eklendiğinde pik akımlarında azalma görüldü.

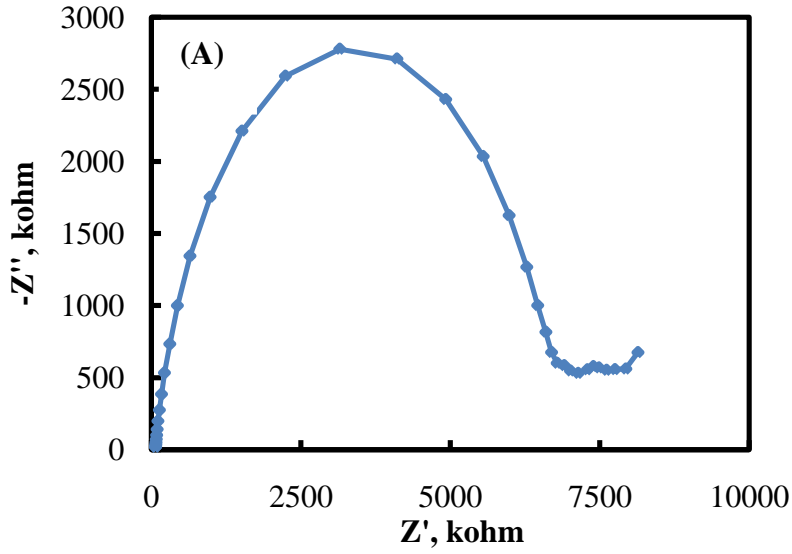


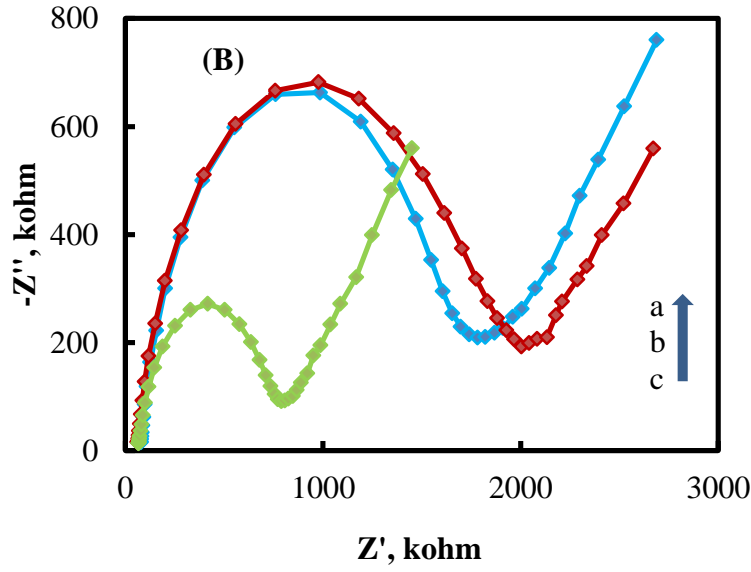
Şekil 4.1 Modifiye edilmemiş ve modifiye edilmiş elektrotların dönüşümlü voltamogramları a) Sade KPE b) KPE-BCC c) KPE-BCC-ÇDKNT (0,05 molL⁻¹, pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 Vs⁻¹ tarama hızı)

4.1.2 Empedans ölçümleri

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi elektrotların modifikasyonu sırasında elektrot yüzeyindeki empedans değişimleri gösteren bir tekniktir. Çalışmada bölüm 2.7’de anlatıldığı gibi sade KPE, KPE-BCC, KPE-ÇDKNT ve KPE-ÇDKNT-BCC elektrotlarının empedans ölçümleri alındı. Şekil 4.2 (A) ve şekil 4.2 (B)’de modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş elektrotların 5.0 mmolL⁻¹ Fe(CN)₆^{3-/4-} içeren 0.10 molL⁻¹ KCl çözeltisindeki Nyquist eğrilerini göstermektedir. Nyquist eğrilerinde sanal empedans (Z'') gerçek empedansa (Z') karşı grafiğe geçirilir. Empedans spektrumunun Nyquist eğrisi, bir doğrusal ve bir yarım halka şeklinde iki kısımdan oluşur. Yüksek frekanslardaki yarım halka elektron transferinin sınırlı olduğu duruma, düşük frekanslardaki doğrusal kısımda difüzyon prosesine karşılık gelir. Yarım dairenin çapı elektrot yüzeyindeki elektron transfer direncine eşittir (**Wang 2008**). Şekil incelendiğinde sade karbon pasta elektrot ile iyi tanımlanmış bir yarım halka elde edildiği görüldü. Sade KPE’nin oluşturduğu halkanın çapının en büyük olması

çözelti/elektrot ara yüzeyinde direncin daha yüksek olduğu dolayısıyla elektron aktarımının en düşük olduğu şeklinde yorumlandı. Sade KPE, BCC veya ÇDKNT ile modifiye edildiğinde elde edilen halkaların çapları sade KPE ile karşılaştırıldığında çok daha düşük bulundu. Bu durumda BCC ve ÇDKNT'lerin çözelti/elektrot ara yüzeyinde elektron aktarım direncini düşürdüğü düşünüldü. KPE-BCC ve KPE-ÇDKNT oluşturdukları halkaların çaplarının birbirine yakın olmasına rağmen, KPE-BCC-ÇDKNT'nin oluşturduğu halkanın çapının tüm elektrotlardan daha küçük olduğu görüldü. Bunun sebebi olarak; ÇDKNT ve BCC'nin sinerjetik etkisi ile çözelti/elektrot ara yüzeyinin direncinin daha düşük olması, bununla beraber elektron aktarım hızının daha büyük olduğu söylenebilir. Sonuç olarak KPE-BCC-ÇDKNT çapının en küçük olması elektron aktarımının hızlı olması ve çözelti/elektrot ara yüzeyinin direncinin daha da düşük olduğunu gösterdi.





Şekil 4.2 (A) Sade KPE (B) a: KPE-BCC, b: KPE-ÇDKNT, c: KPE-ÇDKNT-BCC elektrotlarının Nyquist eğrileri ($5,0 \text{ mmolL}^{-1} \text{ Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ içeren $0,10 \text{ molL}^{-1} \text{ KCl}$ çözeltisinde)

4.1.3 BCC'nin Medyatör Özelliğinin İncelenmesi

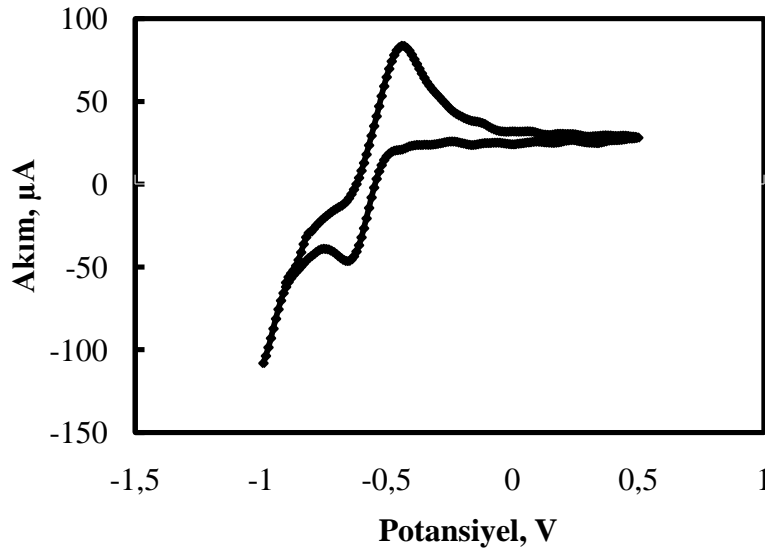
Çalışmada kullanılan Benzo [c] sinolinin (BCC) medyatör özelliği iki önemli nitelik araştırılarak tespit edildi. Bir molekülün medyatör olabilmesi için ilk koşul elektrokimyasal reaksiyon mekanizmasının tersinir olmasıdır. (Nicholson ve Shain 1964) Bu amaçla BCC'nin tersinirliği araştırıldı. BCC'nin indirgenme reaksiyonunun tersinir, yarı tersinir veya tersinmez olup olmadığına karar vermek için DV deneylerinde elde edilen voltamogramından yararlanıldı. Bu amaçla BCC ile modifiye edilmiş KPE'un $0,05 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0 tamponunda $0,1 \text{ Vs}^{-1}$ tarama hızında $0,5 \text{ V} - (-1,0) \text{ V}$ potansiyel aralığında dönüşümlü voltamogramı kaydedildi. $-0,66 \text{ V}$ ta gözlenen indirgenme pikinden sonra geri tarama yapıldığında $-0,44$ ta bir yükseltgenme piki gözlemlendi (Şekil 4.3). Bu sonuç BCC'nin indirgenme reaksiyonunun tersinir veya yarı tersinir olduğunu düşündürdü.

Bu amaçla, farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltametri deneylerinden yararlanıldı (Çizelge 4.1). Tarama hızı arttıkça pik akımlarının

artması, pik potansiyellerinin daha negatif değerlere kayması ve pik genişlemesinin görülmesi BCC nin sulu ortamda yarı tersinir bir reaksiyonla indirgenmesini destekledi (Nicholson ve Shain 1964, Greef vd. 1990, Bard ve Faulkner 2001)

Çizelge 4.1 BCC ile modifiye edilmiş KPE yüzeyinde $0,05 \text{ molL}^{-1}$ fosfat tamponunun pH 7,0 de dönüşümlü voltamogramlarından elde edilen pik potansiyellerinin ve pik akımlarının tarama hızı ile değişimi

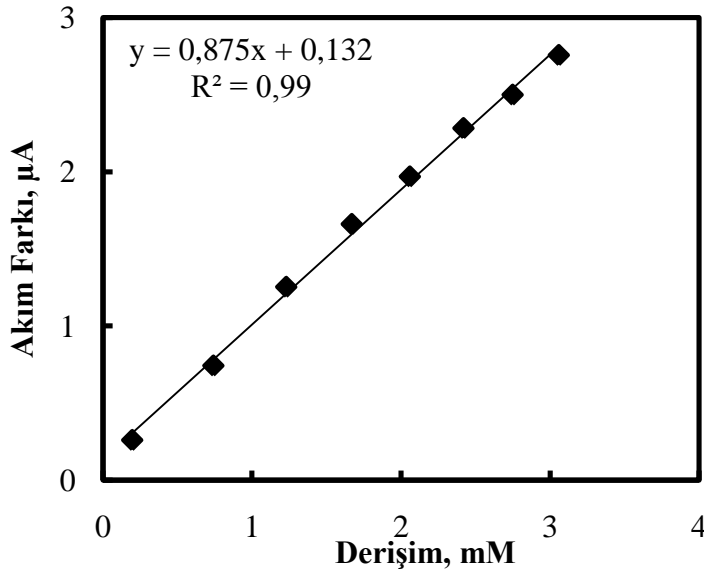
Tarama hızı (v) Vs^{-1}	E_p^k / V	$i_p^k / \mu\text{A}$	E_p^a / V	$i_p^a / \mu\text{A}$
0,1	-0,66	-29,031	-0,44	58,872
0,2	-0,69	-77,354	-0,39	100,661
0,5	-0,76	-115,918	-0,35	117,812
0,7	-0,77	-115,506	-0,32	147,397
1,0	-0,79	-101,370	-0,31	170,785



Şekil 4. 3 KPE-BCC' nin sulu ortamda kaydedilen DV'si ($0,05 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,0 fosfat tamponu, oda sıcaklığı, $0,1 \text{ Vs}^{-1}$ tarama hızı)

BCC nin elektrokimyasal reaksiyonunun yarı tersinir olduğunun belirlenmesinden sonra, BCC ile modifiye edilmiş KPE nin laktik asite duyarlılığı araştırıldı. Bu amaçla, azot ortamında sırasıyla KPE - ÇDKNT - LOD ve KPE -

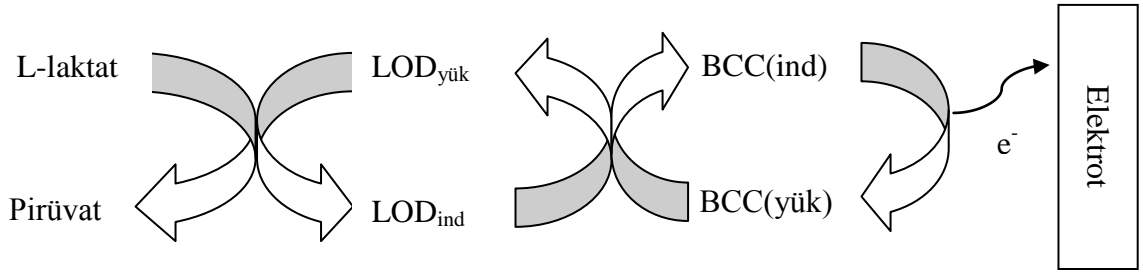
BCC – ÇDKNT - LOD elektrotları hazırlandı. Her bir elektrot $0,05 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde $-0,4 \text{ V}$ potansiyelde kararlı hal akımları elde edilene kadar bekletildi. Stok laktik asit çözeltisinden belirli hacimlerde içinde tampon çözelti bulunan hücreye eklendi ve amperometrik ölçümler alındı. Akım farkları laktik asit derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek duyarlılıkları karşılaştırıldı.



Şekil 4.4 KPE-BCC-ÇDKNT-LOD'nin laktik aside duyarlılığı (N_2 ortam) ($0,05 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,0 fosfat tamponu, $-0,4 \text{ V}$, oda sıcaklığı)

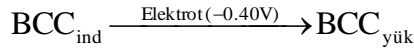
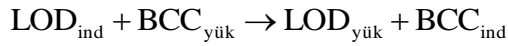
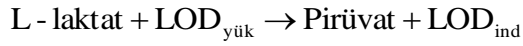
KPE-ÇDKNT-LOD elektrodu kullanılarak azotlu ortamda $-0,4 \text{ V}$ 'ta alınan ölçümlerden uygun bir kalibrasyon eğrisi elde edilemedi. Sebebinin ise ortamda medyatör özelliği gösterecek bir türün bulunmaması olduğu düşünöldü. KPE-BCC-ÇDKNT-LOD'nin kullanılarak azotlu ortamda laktik asit ilaveleri sonunda elde edilen akım farkları derişime karşı grafiğe geçirildiğinde yüksek duyarlılığa sahip bir eğri elde edildi. Duyarlılıktaki bu artışın nedeninin BCC olduğu sonucuna varıldı. Elde edilen bilgiler ışığında bu çalışmada laktik asit tayini için BCC'nin medyatör olarak kullanılmasına karar verildi.

Şekil 4.5'de laktik asit tayini için hazırlanan KPE-BCC-ÇDKNT-LOD'de gerçekleşen olaylar özetlendi.



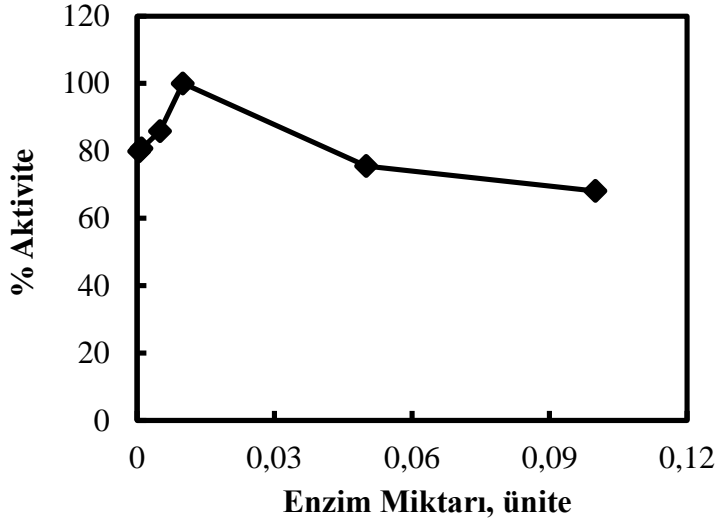
Şekil 4.5 Laktik asit tayini için hazırlanan KPE-BCC-ÇDKNT-LOD'nin çalışma ilkesi (E_{ind} ve $E_{yük}$ enzimin indirgenmiş ve yükseltgenmiş halleri, BCC_{ind} ve $BCC_{yük}$ BCC'nin indirgenmiş ve yükseltgenmiş halleri)

Çalışmada kullanılan BCC aşağıdaki reaksiyona göre LOD enziminin yükseltgenmesinde medyatör olarak rol oynadı. LOD enzimi yükseltgenirken BCC indirgendi. İndirgenen BCC -0,4 V'ta tekrar yükseltgendi.



4.1.4. Biyosensör Cevabına Enzim Miktarının Etkisi

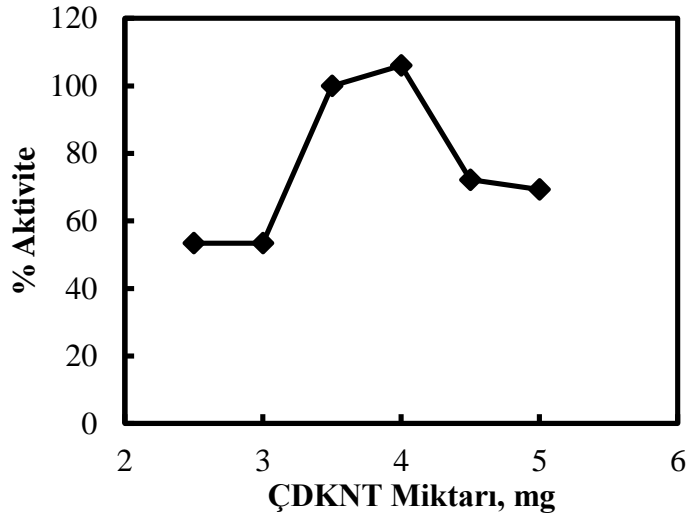
Enzim miktarının elektrot cevabına etkisini incelemek amacı ile diğer bileşenler sabit tutularak 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05 ve 0,1 U LOD içeren enzim elektrotlar hazırlandı. Her bir elektrot 0,05 molL⁻¹ pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde -0,4 V potansiyelde kararlı hal akımları elde edilene kadar bekletildi. Laktik asit çözeltisinden hesaplanan miktarlarda içinde tampon çözelti bulunan hücreye eklendi ve amperometrik ölçümler alındı. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi şekil 4.6'da verildi. En uygun enzim ünitesi 0,01 ünite olarak belirlendi. (Şekil 4.6). Şekil 4.6 incelendiğinde 0,01 ünite enzim miktarından sonra % aktivitedeki azalma, elektrota immobilize olmuş enzimin elektrot yüzeyini bloke etmesiyle açıklandı..



Şekil 4.6 KPE-BCC-MWCNT-LOD cevabı üzerine enzim miktarının etkisi (0,05 molL⁻¹, pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı)

4.1.5 Biyosensör Cevabına Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Miktarının Etkisi

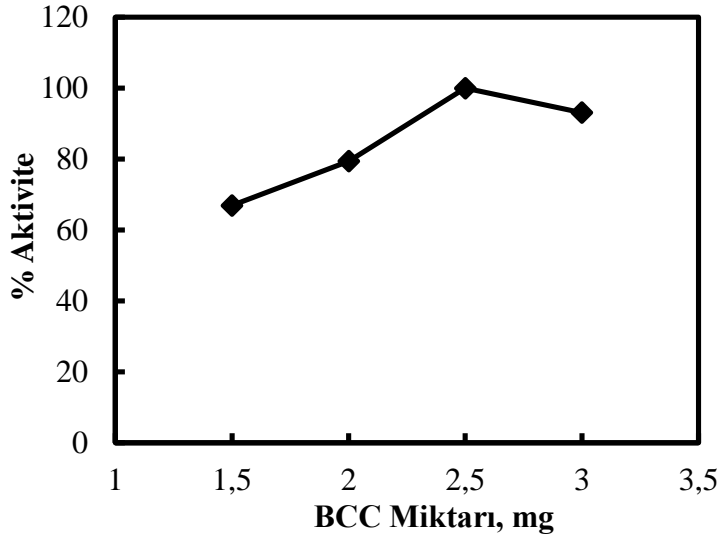
Bu çalışmada kullanılan KPE-BCC-ÇDKNT-LOD'nin hazırlanmasında kullanılacak en uygun çok duvarlı karbon nanotüp miktarının belirlenmesi için 2,5 mg; 3 mg; 3,5 mg; ve 4 mg ÇDKNT kullanılarak dört farklı enzim elektrot hazırlandı. Bu elektrotların 0,05 molL⁻¹, pH 7,0 fosfat tamponunda ve -0,4 V'ta laktik asit ilavelerine karşı cevapları belirlendi ve ÇDKNT miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi şekil 4.7'de gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre optimum ÇDKNT miktarı 4 mg olarak belirlendi. Şekil 4.7 incelendiğinde 3,5 mg ile 4 mg ÇDKNT ün kullanıldığı elektrotların duyarlılıklarının birbirine çok yakın olduğu görüldü. Karbon nanotüpün pahalı bir malzeme olması nedeni ile çalışmanın devamında 3,5 mg karbon nanotüp kullanılmasına karar verildi.



Şekil 4.7 KPE-BCC-MWCNT-LOD cevabı üzerine ÇDKNT miktarının etkisi (0,05 molL⁻¹, pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı)

4.1.6 Biyosensör Cevabına Benzo [c] sinnolinin Miktarının Etkisi

BCC miktarının enzim elektrodunun aktivitesine etkisini incelemek için diğer bileşenlerinin miktarı sabit tutulurken BCC miktarı 1,5 mg; 2 mg; 2,5 mg ve 3 mg olarak değiştirilerek dört farklı enzim elektrot hazırlandı. Enzim elektrotlar 0,05 molL⁻¹ pH 7,0 fosfat tampon içerisinde daldırıldı ve Ag/AgCl'e karşı - 0,4 V'da dengeye gelene kadar bekletildi. $1,0 \times 10^{-3}$ molL⁻¹ stok laktik asit çözeltisinden hücreye belirli hacimlerde ilaveler yapıldı ve enzim elektrodun amperometrik cevabı ölçüldü. Elde edilen en yüksek amperometrik cevap 100 kabul edilerek hesaplanan % aktivite değerleri laktik asit derişimine karşı grafiğe geçirildi. En uygun BCC miktarı 2,5 mg olarak belirlendi (Şekil 4.8). Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 incelendiğinde optimum BCC ve ÇDKNT miktarlarından sonra % aktivite değerlerinde meydana gelen azalma, BCC ve ÇDKNT'ün elektrot yüzeyini bloke ederek laktik asitin LOD enzimine ulaşmasını engellemesi ile açıklandı.



Şekil 4.8 KPE-BCC-MWCNT-LOD cevabı üzerine BCC miktarının etkisi (0,05 molL⁻¹, pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı)

4.2 Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular

4.2.1 Optimum Sıcaklık

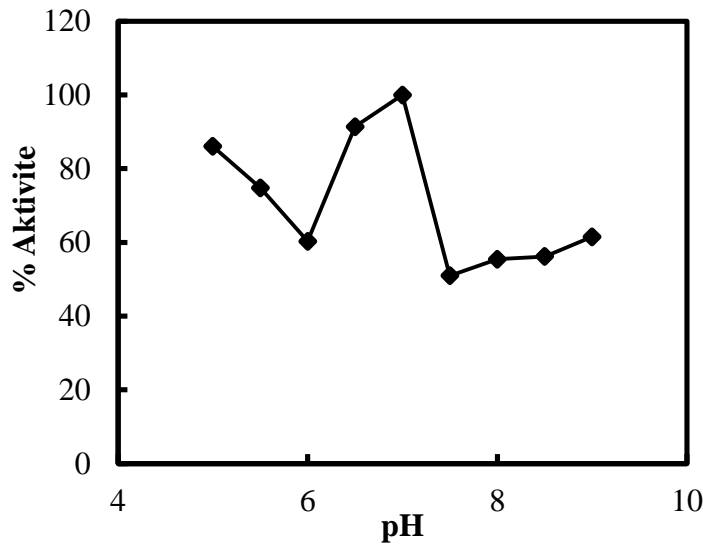
Enzim aktivitesi güçlü bir şekilde sıcaklığa bağlıdır; çünkü çok yüksek ve düşük sıcaklık değerleri enzimin inaktivasyonuna yol açabilir. Literatür incelendiğinde laktik asit tayini için geliştirilen pek çok biyosensör çalışmasında sıcaklığın amperometrik cevap üzerine etkisinin incelenmesine rağmen, çalışmaların çoğunun pratik olması nedeniyle oda sıcaklığında gerçekleştirildiği görüldü. Bu teze ait çalışmalar da oda sıcaklığında (25°C) gerçekleştirildi.

4.2.2 Optimum pH

pH'nın amperometrik cevap üzerine etkisini belirlemek amacıyla KPE-BCC-ÇDKNT-LOD, hazırlanan 0,05 molL⁻¹ farklı pH değerlerindeki fosfat tamponları içinde Ag/AgCl'e karşı - 0,4 V potansiyelde kararlı hal akımları elde edilene kadar bekletildi. Stok laktik asit çözeltisinden belirli hacimlerde ilaveler yapılarak

amperometrik cevaplar belirlendi. Elde edilen değerler pH'ya karşı grafiğe geçirildi ve optimum pH 7,0 olarak belirlendi (şekil 4.9).

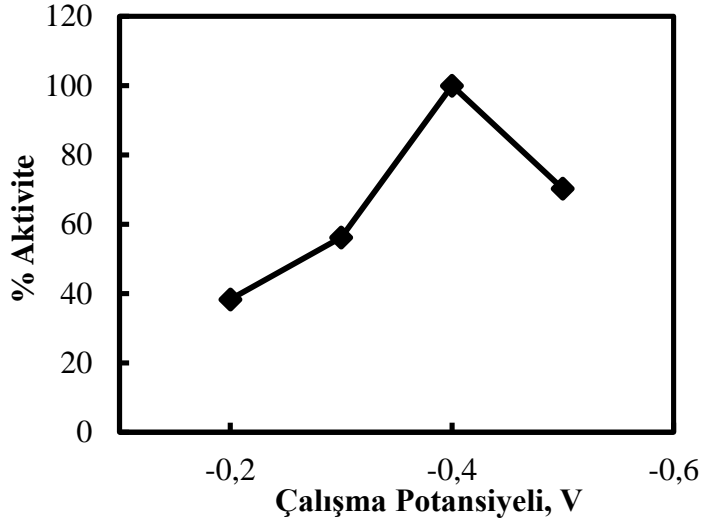
Literatür incelendiğinde serbest enzimin (LOD) pH'sının 7,5 olarak rapor edildiği görüldü. (Suman ve Pundir 2005) Bu çalışmada belirlenen optimum pH değeri literatürdeki pH değeri ile karşılaştırıldığında 0,5 birimlik kayma olduğu görüldü. Bu kaymanın, enzimin karbon pasta içinde BCC ve ÇDKNT ile hapsedilmesinden dolayı mikro çevresinin farklanması sonucu fizikokimyasal karakteristiklerinin değişmesinden kaynaklandığı düşünüldü.



şekil 4.9 KPE-BCC-MWCNT-LOD cevabı üzerine pH'nın etkisi (0,05 molL⁻¹, pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı)

4.2.3 Çalışma Potansiyeli

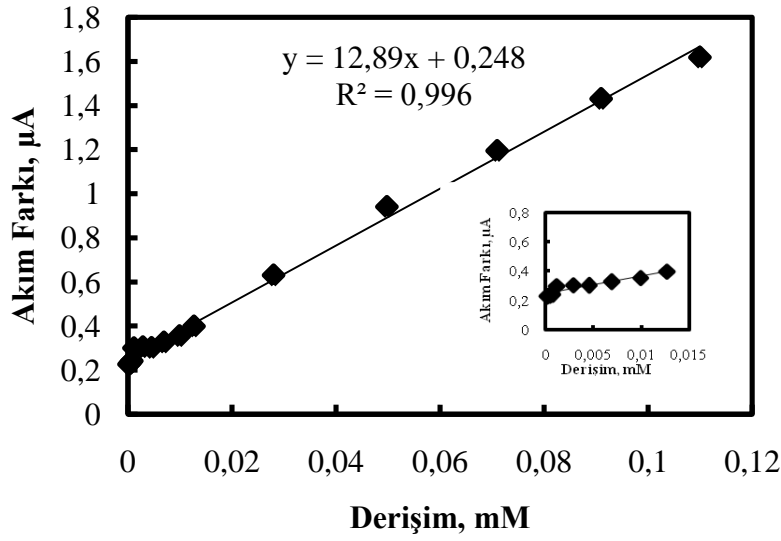
Hazırlanan enzim elektrodun (KPE-BCC-MWCNT-LOD) en uygun çalışma potansiyelinin belirlenmesi için -0,2 V, -0,3 V, -0,4 V ve -0,5 V'da kalibrasyon eğrileri çizildi. Elde edilen sonuçlara göre en uygun çalışma potansiyeli -0,4 V olarak belirlendi (şekil 4.10). Bu potansiyelin oldukça düşük bir değerde olmasının diğer türlerin girişim etkisini de önemli lde azaltacağı düşünüldü.



Şekil 4.10 KPE-BCC-MWCNT-LOD cevabı üzerine çalışma potansiyelinin etkisi (0,05 molL⁻¹, pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı)

4.2.4 Substrat Derişiminin Etkisi

0,05 molL⁻¹ pH 7,0 PBS tamponunda -0,4 V'da dengeye getirilen enzim elektrodun laktik aside cevabının, gözlenebilme sınırının ve doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi için $1,0 \times 10^{-4}$ - $1,0 \times 10^{-2}$ molL⁻¹ derişim aralığında olacak şekilde stok laktik asit çözeltisinden belirli hacimlerde tampon çözeltiye ilaveler yapıldı. Enzim elektrodun laktik aside amperometrik cevabı ölçüldü ve kalibrasyon grafiği çizildi. Kalibrasyon grafiğinden yararlanarak doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı tayin edildi. Gözlenebilme sınırı $1,96 \times 10^{-7}$ molL⁻¹ doğrusal çalışma aralığı ise $1,96 \times 10^{-7}$ - $1,1 \times 10^{-4}$ molL⁻¹ olarak bulundu (Şekil 4.11).

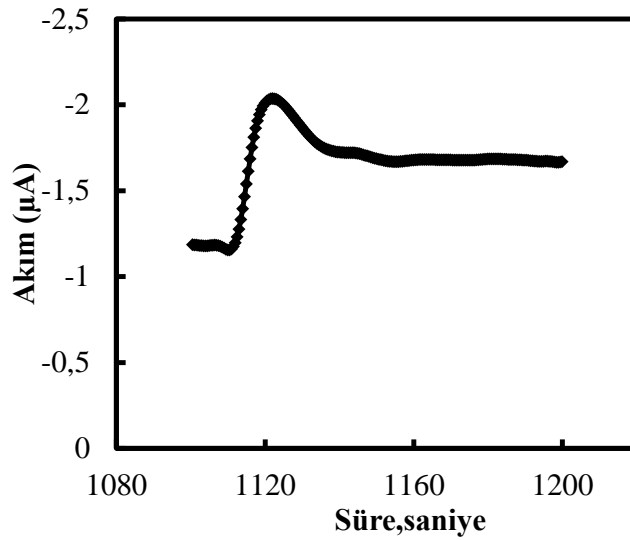


Şekil 4.11 Substrat derişimine bağı olarak farklanan akım değerlerine ait kalibrasyon grafiği, (içinde: $1,96 \times 10^{-4} - 1,27 \times 10^{-2} \text{ mmolL}^{-1}$ derişim aralığına ait kalibrasyon grafiği; $0,05 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,0 fosfat tamponu, $-0,4 \text{ V}$, oda sıcaklığı)

4.3 Enzim Elektrotla Yapılan Çalışmalara İlişkin Sonuçlar

4.3.1 Cevap süresinin belirlenmesi

KPE-BCC-ÇDKNT-LOD'nin cevap süresini belirlemek için enzim elektrot $0,05 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0 fosfat tamponuna daldırıldı ve $-0,4 \text{ V}$ potansiyelde kararlı hal akımları elde edene kadar bekletildi. Laktik asit derişimi $1,96 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ olacak şekilde elektrokimyasal hücreye stok laktik asit çözeltilisinden belirli hacimde ilave yapıldı. Belirli bir süre boyunca amperometrik cevaplar kaydedildi. Akım farkları zamana karşı grafiğe geçirildi. Akım farkının hemen hemen sabit kaldığı süre elektrodun cevap süresi olarak belirlendi. Bu sürenin KPE-BCC-ÇDKNT-LOD için 100 saniye olduğu tespit edildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Enzim elektrodun cevap süresinin belirlenmesine ilişkin akım-zaman grafiği ($0,05 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı)

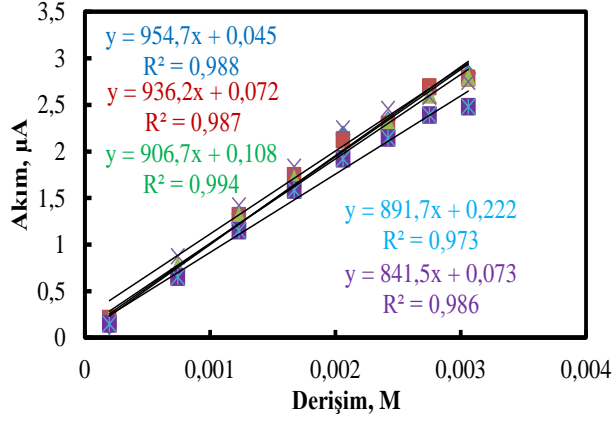
4.3.2 Tekrar kullanılabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

KPE-BCC-ÇDKNT-LOD'nin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için, hazırlanan enzim elektrodun ard arda 5 kez laktik aside cevabı ölçüldü. Ölçümler sonucunda elde edilen akım farklarına karşı laktik asit derişimine ait kalibrasyon grafikleri çizildi ve elde edilen duyarlılıkların bağıl standart sapması (BSS) hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre % BSS 4,5 olarak bulundu (Şekil 4.13). Bu sonuç hazırlanan enzim elektrodunun laktik asit tayininde tekrarlanabilirliği yüksek cevaplar verdiğini gösterdi.

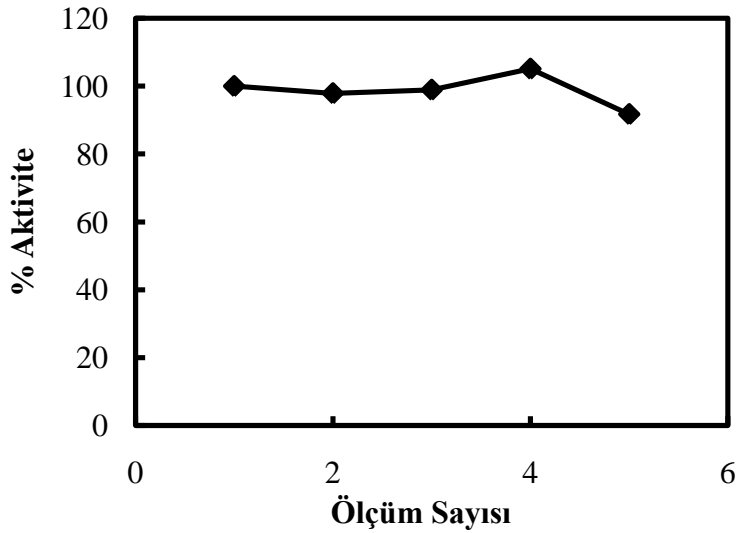
Elektrotun operasyonel kararlılığını belirlemek için Şekil 4.13'de çizilen kalibrasyon grafiklerinden yararlanıldı. $2,4 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ laktik asit çözeltisine karşılık gelen akım değerleri okundu. Alınan ilk ölçümün aktivitesi % 100 kabul edilerek ard arda alınan ölçümlerdeki aktivite kayıpları Şekil 4.14 verildi. Söz konusu şekil incelendiğinde 5 ölçüm sonunda biyosensörün aktivite kaybetmediği görüldü.

Enzim elektrodun tekrar üretilebilirliğinin belirlenmesi için optimum olarak belirlenen bileşimde 7 ayrı enzim elektrot hazırlandı. Bu elektrotlarının her birinin laktik aside karşı cevabı belirlendi. Bu amaçla her bir elektrot için elde edilen

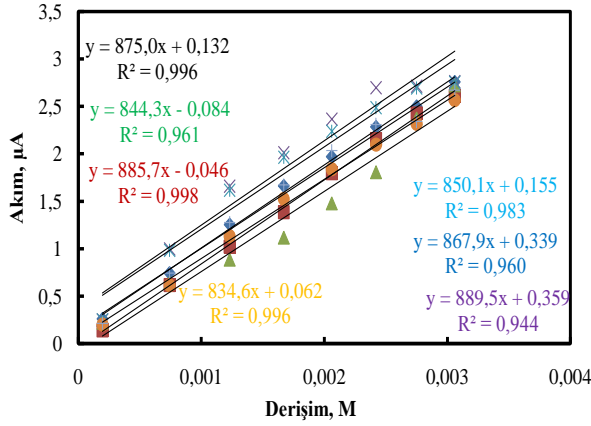
kalibrasyon eğrilerinin duyarlıklarının bağıl standart sapma değeri hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre % BSS 2,46 olarak bulundu (Şekil 4.15). Bu sonuç geliştirilen enzim elektrodun tekrar üretilebilirliğinin yüksek olduğunu gösterdi.



Şekil 4.13 KPE-BCC-ÇDKNT-LOD' nin tekrar kullanılabilirliğine ilişkin kalibrasyon eğrileri (0,05 molL⁻¹, pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı)



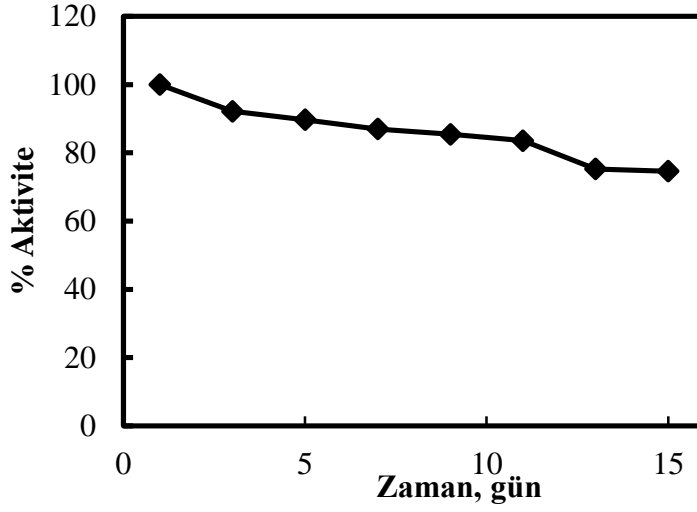
Şekil 4.14 KPE-BCC-ÇDKNT-LOD'e ait operasyonel kararlılık (0,05 molL⁻¹, pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, oda sıcaklığı)



Şekil 4.15 KPE-BCC-ÇDKNT-LOD' nin tekrar üretilebilirliğine ilişkin kalibrasyon eğrileri ($0,05 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,0 fosfat tamponu, $-0,4 \text{ V}$, oda sıcaklığı)

4.3.3 Raf ömrü

KPE-BCC-ÇDKNT-LOD' nin raf ömrünü belirlemek amacı ile hazırlanan enzim elektrot $0,05 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0 fosfat tamponu içinde $-0,4 \text{ V}$ potansiyelde denge akımına ulaşana dek bekletildi. $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ stok laktik asit çözeltisinden hesaplanan miktarlarda ortama ilaveler yapıldı ve amperometrik cevaplar kaydedildi. Akım farkları laktik asit derişimine karşı grafiğe geçirilerek duyarlık belirlendi. Aynı enzim elektrot kullanılarak 2 gün arayla aynı şekilde amperometrik ölçümler alındı. Bulunan duyarlıklar günlere karşı grafiğe geçirildi ve elektrodun duyarlığının zamanla nasıl değiştiği incelenerek elektrot ömrü belirlendi (Şekil 4.16). KPE-BCC-ÇDKNT-LOD' nin 15 gün sonunda duyarlılığında %25'lik bir azalma olduğu tespit edildi.



Şekil 4.16 KPE-BCC-ÇDKNT-LOD' nin laktik aside duyarlılığının zamanla değişimi ($0,05 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,0 fosfat tamponu, $-0,4 \text{ V}$, oda sıcaklığı)

4.3.4 CPE -BCC-ÇDKNT-LOD ile insan serumunda laktik asit tayini

KPE-BCC-ÇDKNT-LOD ile kanda laktik asit tayini yapmak için 2 farklı serum numunesinde çalışıldı. Kan örnekleri 1:50 ve 1:100 oranında fosfat tamponu ile seyreltilerek analiz için kullanıldı. KPE-BCC-ÇDKNT-LOD kan örneklerinde laktik asit tayini, standart katma yöntemi kullanılarak yapıldı. Bunun için hazırlanan enzim elektrot, 5,0 mL $0,05 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0 fosfat tamponu içerisine daldırıldı ve Ag/AgCl'e karşı $-0,4 \text{ V}$ 'da kararlı hal akımları elde edilene kadar bekletildi. Kan örneğinden 100 μL hücreye eklendi ve $-0,4 \text{ V}$ 'da amperometrik ölçüm alındı. Ardından aynı hücreye belli hacimlerde stok laktik asit çözeltisinden ilaveler yapıldı. Hesaplanan akım farkları laktik asit derişimine karşı grafiğe geçirildi. Standart katma yöntemi ile kandaki laktik asit derişimi hesaplandı. Hesaplanan laktik asit miktarı ile örnek kanda bulunan laktik asit miktarı karşılaştırılarak geri kazanımlar hesaplandı (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 İnsan serumundaki laktik asidin geri kazanım değerleri

Kan numunesi	Laktik ait derişimi (mgL ⁻¹)	
	Enzimatik kolorimetrik yöntem	Enzim elektrot*
1	0,0207	0,0221 ± 0,00568
2	0,0306	0,0312 ± 0,00718

*: sonuçlar 3 değer in ortalaması olarak verildi.

4.3.5 Girişim etkisinin incelenmesi

KPE-BCC-ÇDKNT-LOD elektrodun cevabına girişim yapan türlerin bölüm 3.3.5 anlatıldığı şekilde laktik asit derişimi 5×10^{-6} molL⁻¹ olan hücreye girişim etkisi incelenecek türün belirli derişimde eklenmesi ve -0,4 V'da önce laktik asidin cevap akımının sonra laktik asit ve girişim yapan türlerin toplam akımının ölçülmesi ve toplam akımdan laktik asidin neden olduğu akımın çıkarılarak girişim yapan türe ait cevap akımının hesaplanmasıyla belirlendi. Girişim yapan maddelerin girişim yüzdesi Çizelge 4.3 verildi. Çizelge incelendiğinde glukozun girişim etkisinin en yüksek olduğu, askorbik asit ve ürik asitin girişim etkisinin ise çok daha az olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3 Girişim yapan maddelerin girişim yüzdesi

Girişim Yapan Tür	Girişim Yapan Türün Derişimi molL ⁻¹	Toplam Cevap Akımı (µA)	Girişim Yapan Türün Cevap Akımı (µA)	Girişim Yüzdesi ^a
Glukoz	$5,0 \times 10^{-5}$	0,509735	0,036425	%7,15
	$1,5 \times 10^{-4}$	0,691709	0,191233	%27,6
Askorbik Asit	$5,0 \times 10^{-5}$	1,540461	-0,044450	- %2,89
	$1,5 \times 10^{-4}$	1,628431	0,079894	%4,90
Ürik Asit	$5,0 \times 10^{-5}$	2,259390	-0,077290	- %3,42
	$1,5 \times 10^{-4}$	2,343395	0,192939	%8,23

^a Girişim yapan türün cevap akımının toplam cevap akımına oranı

Çalışmada kullanılan enzim elektrodun yapısı, çalışma koşulları ve alınan sonuçlara ilişkin özet niteliğindeki bilgiler Çizelge 4.4' de verildi.

Çizelge 4.4 KPE-BCC-ÇDKNT-LOD' nin en uygun elektrot bileşimi, çalışma koşulları ve performans faktörleri

Elektrot Bileşimi		Çalışma Koşulları	
Grafit tozu / mg	9,5	Tampon	Fosfat tamponu
Enzim / U	0,01	Tampon derişimi / molL ⁻¹	0,05
BCC / mg	2,5	pH	7,0
Parafin yağı / µL	10	Sıcaklık / °C	25
ÇDKNT / mg	3,5	Çalışma potansiyeli / V	-0,4
Performans Faktörleri			
Doğrusal çalışma aralığı / molL ⁻¹	1,96×10 ⁻⁷ – 1,1×10 ⁻⁴		
Gözlenebilme sınırı / molL ⁻¹	1,96×10 ⁻⁷		
Tekrar üretilebilirlik / %	2,5		
Tekrarlanabilirlik / %	4,5		
Raf ömrü / gün	15		
Cevap Süresi / s	100		

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, laktik asit tayini için BCC ve ÇDKNT ile modifiye edilmiş amperometrik enzim elektrot geliştirildi. Bu amaçla, öncelikle BCC, ÇDKNT ve grafit tozu karıştırıldı ve daha sonra hazırlanan karışıma LOD enzimi immobilize edilerek karbon pasta elektrot gövdesi içine yerleştirildi. Hazırlanan enzim elektrot ile elde edilen sonuçlar aşağıda kısaca özetlendi.

- KPE-BCC-ÇDKNT-LOD'nin optimum çalışma koşullarının belirlenmesi için yapılan çalışmalar sonucunda en uygun tamponun $0,05 \text{ molL}^{-1}$ pH 7,0 fosfat tamponu olduğu görüldü.
- KPE-BCC/ÇDKNT/LOD'nin en uygun grafit tozu, BCC, ÇDKNT ve enzim miktarlarının sırasıyla 9,5 mg, 2,5 mg, 3,5 mg olduğu belirlendi.
- KPE-BCC-ÇDKNT-LOD ile yapılan çalışmaların pratik olması için çalışmalar oda sıcaklığında gerçekleştirildi.
- KPE-BCC/ÇDKNT/LOD'nin cevap süresinin yaklaşık 100 saniye olduğu görüldü.
- KPE-BCC-ÇDKNT-LOD'nin tekrarlanabilirliğini belirlemek için aynı enzim elektrotla ard arda 5 ölçüm alındı ve ölçümlerin BSS değeri % 4,5 olarak bulundu.
- Tekrar üretilebilirliğin değerlendirilmesi için ise aynı yolla hazırlanan 7 farklı enzim elektrodun laktik aside cevabı belirlendi ve elde edilen kalibrasyon eğrilerinin duyarlıklarının bağlı standart sapması % 2,46 olarak hesaplandı.
- KPE-BCC/ÇDKNT/LOD'nin doğrusal çalışma aralığının $1,96 \times 10^{-7} - 1,1 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ ve gözlenebilirme sınırının $1,96 \times 10^{-7} \text{ molL}^{-1}$ olduğu belirlendi.

Çizelge 4.5 Laktik asit tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması /metal bileşikleri(medyatör)

No	Yöntem/ Enzim	Medyatör/ Çalışma elektrodu	Potansiyel / pH / Sıcaklık	Duyarlılık	Alt tayin sınırı / Lineer aralık / Cevap Zamanı	Tekrar kullanılabilirlik Raf Ömrü	Bozucu türler	Uygulama	Ref.
1	Amperometrik/ D-LDH	Hegzasiyanoferrat NAD ⁺³ / Pt	0,1 V / pH 9 / 25 °C	37/35/25 μ A mmol ⁻¹ L	5/10/50 μ molL ⁻¹ / 0,01-1mmolL ⁻¹ ; 0,05-2mmolL ⁻¹ ; 0,1-0,5mmolL ⁻¹ / 100s-100s- 120s	-	-	-	Gros A. (2004)
2	Amperometrik/ L-LDH	hegzasiyanoferrat NAD ⁺ / -	0,8 V / - / 25 °C	1,1 μ A mmol ⁻¹ L	- / 0,002-5mmolL ⁻¹ / 30 saniye	- / 60 gün	-	-	Montagne M. (1993)
3	Amperometrik/ L-LDH	Hegzasiyanoferrat / Au / Camsı Karbon / Pt	0,08 V / pH 7,2 / 21 °C	-	- / 0,1-8 mmolL ⁻¹ / 1 dakikadan az	150 deneme / -	-	kan	Durliat H. (1999)
4	Amperometrik / LOD	Osminyum kompleksi / Camsı karbon	0 V / pH 7,3 / 37 °C	-	-	160 saatte %90'nunu korur. / -	Asetaminofen, askorbat, üre, düşük potansiyellerde meldola mavisi	-	Kenausis G. (1997)
5	Amperometrik / LOD	Ferrosen / Karbon pasta	0,7 V / pH 8,9 / 25 °C	117 μ A mmol ⁻¹ L / 133 μ A mmol ⁻¹ L	- / 0,5-5,5mmolL ⁻¹ / 20 saniye	- / 5 aydan az	-	-	Boujtita M. (1996)
6	Amperometrik / LOD	Osminyum kompleksi / Karbon pasta	0,15 V / pH 7,3 / 21,3 °C	69 μ A mmol ⁻¹ L	- / 0-0,5mmolL ⁻¹ / -	16 saatte %50 kayıp / -	Oksijen	-	Kenausis G.(1996)
7	Amperometrik / LOD	Hidroksimetil-ferrosen / Au	0,3 V / pH 7 / 20 °C	0,77±0,08 μ A mmol ⁻¹ L	0,01mmolL ⁻¹ / 0-0,3 mmolL ⁻¹ / 70 saniye	- / yaklaşık 1 ay	askorbat	Bira, şarap	Parra A.(2006)

Çizelge 4.5: Laktik asit tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması/metal bileşikleri(medyatör)(devamı)

8	Amperometrik/ LOD	Kinon / Camsı karbon	-0,1 / 6 / 25	70	50 / 0,05-1,5 / -	9 hafta boyunca birçok deneme duyar yapılmıştır / -	Asetiminofen, askorbat Glisin, O ₂ , düşük potansiyel	Yoğurt	Haccoun J. (2006)
9	Amperometrik / LOD	Osmiyum kompleksi / Karbon	0,4 V / pH 7,13 / 22 °C	20 mA mol ⁻¹ L	-/ 0-1mmolL ⁻¹ / 12 saniye	6 saat boyunca %75 duyar / 4 ay	askorbat	-	Wang D L. (1993)
10	Amperometrik / LOD	Prusya mavisi / Karbon	-0,05 V / pH 7 / -	10,4 µA mmol ⁻¹ L	1µmol ⁻¹ L / 0,01-0,5mmolL ⁻¹ / 1-2 dakika	- / 1 ayda %80 duyar ölçüm almaktadır	Ca ⁺²	Şarap, yoğurt	De Luca S.(2005)
11	Amperometrik / LOD	Ferrisiyanür / Karbon screen printed	0,4 V / pH 7,8 / -	-	1mmolL ⁻¹ / 1-50mmolL ⁻¹ / 50 saniye	-/ 10 ay	-	Laktik asit içeren içeceklerde	Sato N.(2006)
12	Amperometrik / LOD	Hegzasiyanoferrat / Au	0,2 V / pH 9 / 25 °C	2µA mmol ⁻¹ L	5µmolL ⁻¹ / 0,005- 1,5mmolL ⁻¹ / 2 dakika	-/-	- / Düşük potansiyel	-	Gue A.M. (2002)
13	Amperometrik/ D-LDH	Hegzasiyanoferrat / Au	0,2 V / pH 9 / 25 °C	2-8 µA mmol ⁻¹ L	0,01mmolL ⁻¹ / 0,005-1,5 mmol L ⁻¹ / 2-5 dakika	Ard arda 10 ölçüm alındı / 3 hafta	-/-	-	Tap H.(2000)

Çizelge 4.5: Laktik asit tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması/metal bileşikleri(medyatör)(devamı)

14	Amperometrik / D-LDH	Hegzasiyanoferrat / Pt	0,1 V / pH 9 / 30 °C	3,8µA mmol ⁻¹ L	-/ 0,02-3 mmolL ⁻¹ / 2 dakikadan daha az	10 günde %70-80 doğruluk(+4 °C saklandığında) / 1 ay (+4 °C saklandığında)	-	Alkol içeren içecekler, süt	Montagne M.(1995)
15	Amperometrik / D-LDH	Hegzasiyanoferrat / Pt	0,55 V / pH 9 / 30 °C	2,5 8µA mmol ⁻¹ L	-/ 0,04-1,5 mmolL ⁻¹ / 2 dakikadan daha az	10 günde %70-80 doğruluk(+4 °C saklandığında) / 1 ay (+4 °C saklandığında)	-	Alkol içeren içecekler,süt	Montagne M.(1995)
16	Amperometrik / D-LDH	Hegzasiyanoferrat / Pt	0,8 V / pH 9 / 30°C	500-570 nA mmol ⁻¹ L	-/ 0,01-1 mmolL ⁻¹ / 2-3 dakika	10 günde %70-80 doğruluk(+4 °C saklandığında) / 4 ay (+4 °C saklandığında)	-	Peynir,süt,yoğurt	Montagne M.(1995)
17	Amperometrik/ L-LDH	Hegzasiyanoferrat / Au	0,2 V / pH 9 / 25 °C	1,8µA mmol ⁻¹ L	10µmol ⁻¹ L / 0,002-1,7 mmol ⁻¹ L / 3 dakika	-/-	-/Düşük potansiyel	-	Gue A.M. (2002)
18	Amperometrik / LOD	Osminyum kompleks / Camsı karbon	-0,1 V / pH 7,4 / 25 °C	-/ -	-/ 0,2-1,8 mmol ⁻¹ L / -	6-30 saat arasında %50 duyarlılığı azaldığı tespit edildi	-/-	-	Ohara T J (1993)
19	Amperometrik / LOD	Ferrosen / Grafit teflon	-0,1 V / pH 7,4 / 25 °C	0,424 µA mmol ⁻¹ L	0,9µmolL ⁻¹ , 1,4 µmolL ⁻¹ / 2 dakikadan az	2 ayda %20'lik duyarlılık kaybı tespit edildi / 6 ay	Askorbat,malat, Tartar,succinate	Şarap, yoğurt	Serra b.(1999)
20	Amperometrik / LOD	Osminyum kompleks (redox polimeri) / Camsı karbon	0 V / pH 7 / -	9,16 µA mmol ⁻¹ L	-/0,025-0,5mmol ⁻¹ L / -	3 saat / -	Düşük potansiyellerdeki çok katmanlı yapılar	Süt	Corton E.(2001)

Çizelge 4.6 Laktik asit tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması/organik boyar madde(medyatör)

No	Yöntem/ Enzim	Medyatör/ Çalışma elektrodu	Potansiyel / pH / Sıcaklık	Duyarlılık	Alt tayin sınırı / Lineer aralık / Cevap Zamanı	Tekrar kullanılabilirlik / Raf Ömrü	Bozucu türler	Uygulama	Ref.
1	Amperometrik / D-LDH	Toluidin mavisi ve poli-etilenamin / Karbon pasta	-0,05 V / pH 7 / -	-	30 μ molL ⁻¹ / 0,05-5 mmolL ⁻¹ / -	230 denemede başlangıç aktivitesinin %70'ni korur / 31 gün(4°C saklandığında)	Pirüvat,DL- α - hidroksi butyric asid	Fermante et yada balık suyu	Shu H-C. (1995)
2	Amperometrik / L-LDH	Meldola mavisi / Grafit screen priting	0 V / - / 25 °C	1,02/3,0 mmolL ⁻¹	1030 μ molL ⁻¹ / 20-200 μ molL ⁻¹ / 30 saniye	Tek kullanımlık / -	-	Şarap	Avramescu A. (2002)
3	Amperometrik / L-LDH	Metilen mavisi / Camsı karbon	-0,1 V / pH 8,8 / 25 °C	2,25 mA mol ⁻¹ L	1,0 μ mol L ⁻¹ / - / 20-30 saniye	-/-	-	-	Cosnier S. (1996)
4	Amperometrik/ L-LDH	Tetrasiyonokinon dimetan / Karbon pasta	0,22 V / pH 7,5 / 25 °C	-	0,2 mmolL ⁻¹ / - / 15-30 saniye	-/ %60-80 1 hafta içinde,1 ay içindedede %55 duyar ölçümlerini korur	Sıcaklık,pH	-	Pandey P.C.(1994)
5	Amperometrik/ L-LDH	Poli-Matilen mavisi / Camsı karbon	0-0,1 V / pH 8,5 / 25 °C	-	- / - / 20-30 saniye	10 ölçümden az / -	-	-	Karyakin A.A.(1994)
6	Amperometrik/ L-LDH	Mendola mavisi / Karbon screen printing	-0,05V / pH 8 / 23 °C	24,38nA mmol ⁻¹ L	0,5-8 mmolL ⁻¹ / 1- 20 mmolL ⁻¹ / -	-/ Oda sıcaklığında 3 günden az	Askorbat,pürivat	-	Sprules S D (1995)

Çizelge 4.6: Laktik asit tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması/organik boyar madde(medyatör)

7	Amperometrik/ LOD	Meldola mavisi / Karbon pasta	0,05-0,25V /pH 7,9 / 25 °C	164µA mmol ⁻¹ L	-/ 0-2 mmolL ⁻¹ / 12 saniye	-/-	Askarbat	-	Kulys J. (1992)
8	Amperometrik/ LOD	Kinon / Camsı karbon	-0,1 V / pH 6 / 25 °C	70 µA mmol ⁻¹ L	50 µmolL ⁻¹ / 0,05-1,5 mmolL ⁻¹ / -	9 hafta boyunca birçok deneme duyar yapılmıştır / -	Asetiminofen, askorbat Glisin,O ₂ ,düşük potansiyel	Yoğurt	Haccoun J. (2006)
9	Amperometrik/ LOD	Metilen-yeşil / Karbon pasta	0,15 V / pH 7 / 25 °C	50,4 µA mmol ⁻¹ L	-/ 0-4;0-8 mmolL ⁻¹ / 30 saniye	Az müddet / 2 ay (4 °C)	Askorbat	Kan	Kulys J. (1993)
10	Amperometrik / D-LDH	Toludin / Karbon pasta	-0,05 V / pH 7 / 25 °C	-	-/ 0,25-4 mmolL ⁻¹ / -	-/-	Pürivat	-	Shu H C (2001)
11	Amperometrik / L-LDH	2-metil 1,4 naptokinon / Karbon pasta	-0,15 V / pH 8,5 / 25 °C	-	-/-	-/-	Oksijen	-	Miki K. (1989)

Çizelge 4.7 Laktik asit tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması/polimer(medyatör)

No	Yöntem/ Enzim	Medyatör/ Çalışma elektrodu	Potansiyel / pH / Sıcaklık	Duyarlılık	Alt tayin sınırı / Lineer aralık / Cevap Zamanı	Tekrar kullanılabilirlik / Raf Ömrü	Bozucu türler	Uygulama	Ref.
1	Amperometrik / D-LDH	Toludin mavisi ve poli- etilenamin / Camsı karbon	-0,05 V / pH 7 / -	-	30 μmolL^{-1} / 0,05-5 mmolL^{-1} / -	230 denemede başlangıç aktivitesinin %70'ni korur / 31 gün(4°C saklandığında)	Pirüvat,DL- α - hidroksi butyric asid	Fermante et yada balık suyu	Shu H-C. (1995)
2	Amperometrik / D-LDH	Poli etilenamin / Karbon pasta	-0,05 V / pH 7 / -	-	-/ 0,02-0,3 mmolL^{-1} / -	200 denemeden daha az / -	Asetiminofen, askorbat elektropolimerize o-fenildiamin tabakası	Fermante et yada balık suyu	Narasaiah D. (1996)
3	Amperometrik / L-LDH	Poli-o- fenildiamin / Karbon pasta	0,15 V / pH 9,5 / -	0,16 μA mmol^{-1}L	0,75 μmolL^{-1} / 1-40 μmolL^{-1} / 35 saniye	-/-	-	-	Lobo M. (1996)
4	Amperometrik / LOD	Poli-pirol / Pt	0,8 V / - / -	0,6 nA mmol^{-1}L	-/- / -	-/-	-	-	Trojanowic z.M. (1995)
5	Amperometrik / LOD	Poli-pirol / Pt	0,2V-0,5V / pH 7 / -	-/-	0,5 mmolL^{-1} / - / 5-10 saniye	-/-	Askorbat,fruktoz, glukoz,oksijen,üre	-	Ross B. (1994)
6	Amperometrik / L-LDH	Poli-o- fenildiamin / Karbon pasta	0-0,15 V / pH 9,5 / -	0,56-1,1 μA mmol^{-1}L	0,03-0,6 μmolL^{-1} / 0,5-77 μmolL^{-1} / 0,5-8,5 μmolL^{-1} / 40-80 saniye	1 günde 10 deneme yapılabilmektedir / -	Askorbat,üre,L- sistin, parasetamol	Elma şarabı	Lobo- Castanon M.J. (1997)

Çizelge 4.8 Laktik asit tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması/medyatörsüz

No	Yöntem/ Enzim	Medyatör/ Çalışma elektrodu	Potansiyel / pH / Sıcaklık	Duyarlılık	Alt tayin sınırı / Lineer aralık / Cevap Zamanı	Tekrar kullanılabilirlik / Raf Ömrü	Bozucu türler	Uygulama	Ref.
1	Amperometrik / L-LDH	-/ Camsı karbon	-0,1-0,2 V / pH 7 / -	-	-/ 0-0,3/0,5 mmolL ⁻¹ / 1-1,5 dakika	2-3 günde günde 50 ölçümü %90 duyarlılıkla ölçer	Askorbat,düşük potansiyel	Kültür hücresi	Staskeviciene S L. (1991)
2	Amperometrik / LOD	- / Pt	0,65 V / pH 7 / 25 °C	300±10 nA mmol ⁻¹ L	2 µmolL ⁻¹ / 0,002-1 mmolL ⁻¹ / 21 saniye	-/-	Asetiminifen, askorbat,üre	Süt ve yoğurt	Palmisano F. (2001)
3	Amperometrik / LOD	- /Pt	- / pH5,6-6 / 34 °C	-/-	-/1,5-18,75 mmolL ⁻¹ / -	-/-	-	-	Makovos E.B.(2002)
4	Amperometrik / LOD	-/ Karbon pasta	0,6 V / pH 7 /24 °C	21 µA mmol ⁻¹ L	10 µmolL ⁻¹ / 0,075-1 mmolL ⁻¹ / 20-60 saniye	240saatte başlangıç aktivitesinin %56 korur / 5 ay	-	-	Gavalas V.G.(2001)
5	Amperometrik / LOD	-/ platinlenmiş grafit	0,3 V / pH 7 /-	1,71 µA mmol ⁻¹ L	10 µmolL ⁻¹ / 0,02- 4 mmolL ⁻¹ / 10-45 saniye	15 günde %85 duyarlılığını korur / 3 ay (5 °C saklandığında)	Asetiminofen, askorbat,üre, nafyon tabaka,düşük potansiyel	Süt, yoğurt	Hajızadeh K(1991)
6	Amperometrik / LOD	-/Pt	-/pH 7 / 28 °C	7,2±0,1 nA mmol ⁻¹ L	-/-/-	2 günde %86 duyarlılığını korur / 130 gün	Asetiminofen, askorbat,üre,	Domates suyu	Palmisano F. (2000)
7	Amperometrik / LOD	-/Pt	-0,65 V / pH 7,4 / 21 °C	-	50 µmolL ⁻¹ / 0,2-18 mmolL ⁻¹ / 1-3 dakika	5günde %92 duyarlılığını korur / 1 ay	Askorbat,sistin,üre	Kan	Mullen W.H.(1986)
8	Amperometrik / LOD	- /Pt	-0,7 V / pH 7 / 25 °C	-	-/0,06-1,85 mmolL ⁻¹ / 14 saniye	-/3 ay	-	Ter	Mitsubayashi K.(1994)

Çizelge 4.8: Laktik asit tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması/medyatörsüz(devamı)

9	Amperometrik / LOD	- / Pt	0,6 V / pH 7 / 22 °C	-	8,6 μmolL^{-1} / 0-0,48 mmolL^{-1} / -	8 saatten fazla ölçüm alınığında %80 başlangıç aktivesini korur / 1 yıl kadar	Askorbat,sistin hidroklorit	Süt,yoğurt	Choi M.M.F. (2005)
10	Amperometrik / LOD	-/ Camısı karbon	1 V / pH 7,7 / 30 °C	-	0,1 μmolL^{-1} / 0-0,3 mmolL^{-1} / 5 saniye	60 günde,günde 10 ölçüm alındığında başlangıç aktivesinin %50 korur / -	Asetiminofen, Askorbat, üre	Süt	Mizutani F. (1995)
11	Amperometrik / LOD	-/ Pt	-0,7 V / pH 7 / 30 °C	-	5 μmolL^{-1} / 5-300 mmolL^{-1} / -	2 haftada günde 20 ölçüm alındığında baş.akt.%80 korur /-	-	Fermante balık ve et suyu	Casimiri V.(1998)
12	Amperometrik / LOD	-/Pt	0,6 V / pH 7 / 20 °C	1,7-12,5 nA mmol^{-1}L	- / 0-10 mmolL^{-1} / 42-94 saniye	-	-	-	Perdomo J. (1999)
13	Amperometrik / LOD	-/Pt	-/ pH 7,4 / 25 °C	-	-/-/-	15gün boyunca sürekli ölçüm alındığında başlangıç aktivitesini %80 korur /-	-	Kan	Clark L.C.(1984)
14	Amperometrik / LOD	-/Pt	0,65 V / pH 7,4 / -	915,94±29,0 2 nA mmol^{-1}L	0,01 mmolL^{-1} / 0,01-0,3 mmolL^{-1} / 25 saniye	-/-	Asetiminofen, askorbat	-	Badea M.(2003)
15	Amperometrik / LOD	-/Karbon pasta	-0,05 V / pH 7 / -	-	-/-/-	24 saatten tez / -	Asetiminofen, askorbat	Fermante et yada balık suyu	Chaubey A. (2000)

Çizelge 4.9 Laktik asit tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması/son yıllarda yapılan çalışmalar

No	Yöntem/ Enzim	Medyator/ Çalışma elektrodu	Potansiyel / pH / Sıcaklık	Duyarlılık	Alt tayin sınırı / Lineer aralık / Cevap Zamanı	Tekrar kullanılabilirlik Raf Ömrü	Bozucu türler	Uygulama	Ref.
1	Amperometrik / LOD	Kitosan / Ferrosiyaniid / Au elektrot	-50 mV/ PBS /-	-	-/ 1,62-1,66µM / 65 s	60 ölçüm	-	Gıda Örnekleri	Rastislav Monosik ve ark. (2011)
2	Amperometrik /LDH	Meldola Mavisi / NAD ⁺ / Screen Printed elektrot	+0,05 V/ PBS pH 10,0/-	-	-/ 0,55-10 mM /-	10 s / 17 gün	-	İnsan serumu	M. Piano ve ark. (2010)
3	Kondüktometrik / LOD	HRP / Au elektrot	10 mV / PBS pH 6,0 / -	-	0,05µM / - / -	-/ 5 Hafta	-	Yoğurt örnekleri	Thanh Thuy Nguyen (2013)
4	Amperometrik / LOD	4-vinilbenzil timin / 4-vinilbenzil trietilamonyum klorür / Camsı Karbon elektrot	180 mV / PBS pH 7,0 / -	60 gün	-/ 0,01- 1.0 mM / 5 s	-	-	Şarap, süt, bira	Veronica I. Paz Zanini ve ark. (2013)
5	Amperometrik / Saccharomyces cerevisiae	Karbon pasta elektrot	50 mV / PBS pH 7,3 / -	-	-/ 3-6 µM / -	-	-	-	R. Garjonyte ve ark.(2008)
6	Amperometrik / LOD	Prusya mavisi modifiye screen printed elektrot	0,00 V / PBS pH 7,4 / -	200 gün	10 nM / - / -	-	-	Medikal uygulamalar	Takeshi Shimomura ve ark. (2012)

Çizelge 4.9: Laktik asit tayini için hazırlanan bazı biyosensörlerin özelliklerinin karşılaştırılması/son yıllarda yapılan (devamı)

7	Amperometrik / LOD	Titanyum dioksit / İndirgenmiş Grafen / Camsı karbon elektrot	0,01 V / PBS pH 7,0 / -	-	0,6 µM	-	-	-	Elena Casero ve ark. (2014)
8	Amperometrik / LDH	Grafen / Camsı karbon elektrot	250 mV / PBS pH 7,0 / -	-	- / $1,0 \times 10^{-6}$ M / -	-	-	Yoğurt	Antonio Radoi ve ark.(2013)
9	Amperometrik / LOD /	ZnO nanotel / Au elektrot	+ 0,8 V / PBS pH 7,4 / -	-	12 µM / - / -	-	-/2 hafta	-	Yanguang Zhao (2014)
10	Amperometrik / Lactobacillus bulgaricus ve Streptococcus thermophilus kültürleri	-/O ₂ elektrot	0,7 V / PBS pH 6,8 / -	-	120 µM	-	220 s / 240 gün	Kan ve süt	Jing Chen ve Yeling Jin (2011)

KAYNAKLAR

- A.Hakan DEVELİOĞLU, İ.L.T , (1998) Myeloperoksidaz'ın özellikleri ve periodontal hastalıktaki önemi *Cumhuriyet Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi Cilt 1, Sayı 1*
- Alp YÜCEL (2013), Çoklu enzim esaslı biyosensör geliştirilmesi 66, 5-10
- Alocilja, E. and Tahir, Z. M. (2008), “Label-free microbial biosensors using molecular nanowire transducers”, *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*, 1 st ed., Mohammed Zourob, Souna Elwary, Anthony Turner, Springer Science, New York, 377-406
- A.TELEFONCU (1986), İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu, İzmir, 1-16
- Arnaldo C. Pereira, Marina R. Aguiar, Alexandre Kisner, Denise V. Macedo, Lauro T. Kubota (2007), Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and Meldola Blue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube 269–276
- Bartlett, P.N. (1990) in *Biosensors*, (Cass, A.E.G.ed.), p.42, Oxford University Press, Oxford.
- Bard, A.J. and Faulkner, L.R. 2001. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley and Sons. Inc. New York.
- Başak ŞAHİN (2012), Sisteamin-6-aminohegzanoik asit modifiye altın elektrot yüzeyinde glutamat oksidaz immobilizasyonuna dayalı yeni bir biyosensör tasarımı 56, 8
- B. Serra , A.J. Reviejo, C. Parrado, J.M. Pingarro'n (1999) Graphite-Teflon composite bienzyme electrodes for the determination of L-lactate: Application to food samples 505-513
- Burak ALTINEL (2008) , Ekmek üretiminde kullanılan enzimler ve ürün kalitesine etkilerinin belirlenmesi 316 6,7
- Bogaert, J-C. ve Naidu (2000), A.S. Natural Food Antimicrobial Systems in Chapter V: Acid Antmicobials, Ed. Naidu, A.S., CRS Press
- Chahal, S. P. & Starr, J. N. (2006), Lactic acid. In *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*.

http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a15_097.pub2/pdf
adresinden görüntüleme tarihi 21 haziran 2014

- Chaubey, A. and Malhotra B. D.. (2002), Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17 441–456.,
- CEREN ERDEM (2012), Glukoz tayini için nikel oksit modifiye karbon pasta elektrotların hazırlanması 84 22
- Castillo, J., Gáspár, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Soukharev, V., Dorneanu, S. A., Ryabov, A. D. and Csöregi, E. (2004) Biosensors for life quality design, development and applications. *Sensors and Actuators B*, 102, 179–194.
- ÇİĞDEM BİLEN (2009), Paraoksonaz enziminin glutaraldehit ile immobilizasyonu ve bazı ağır metallere karşı afinitesinin araştırılması 80, 2
- Datta, R., Henry, M., (2006), Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies-a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 1119-1129
- Dila ÖRNEK ACAR (2009), Üreaz enziminin ca-alginat üzerine immobilizasyon koşullarının incelenmesi 52 1,2
- Demet YILMAZ (2011) , Glutamatın potansiyometrik tayini için biyosensör geliştirilmesi ve karakterizasyonu 80 28
- Denise Lowinsohn, Mauro Bertotti (2007) , Flow injection analysis of blood L-lactate by using a Prussian Blue-based biosensor as amperometric detector, *Analytical Biochemistry* 365 260–265
- Derya KOYUNCU ZEYBEK (2010) , Kolesterolün ve fenolik bileşiklerin tayini için amperometrik enzim elektrotların hazırlanması 137 44-45
- Eggins, B.R.(1996) *Biosensors:an Introduction*,John Wiley and Sons LTD. and B.G.Teubner,West Sussex.
- Erdem, A., Ozsoz, M. (2002), Electrochemical DNA biosensors based on DNA-Drug interactions, *Electroanalysis*, 14, sayfa 965-974
- Erdem ŞAR (2008), 2-Aminotiyazol ile fonksiyonlandırılmış poli(glisidilmetakrilat-divinilbenzenmetilmetakrilat) mikrokürelî karbon pasta elektrot ile bazı ağır metallerin eser analizleri 115 37
- Engin ASAV (2009), Altın elektrot yüzeyinde tek tabaka oluşumuna dayalı çift enzimli biyosensör sistemi geliştirilmesi 85 8
- Erbil, M.(1987), Alternatif akım (A.C.) impedansı yöntemiyle korozyon hızı belirlenmesi, Doğa, TU Kim.D.C., 11/3, 100-111,

- Faccio, M., G., Mancini F., Di Rosa P. (1995), Resonating quart sensor, sensors for domestic applications. Eds. D'Amico A. and Sberveglieri G., WSP. Italy pp 71-86
- F. Bilge EMRE (2007), Kolesterol biyosensörü tasarımında bazı polimerik materyallerin enzim immobilizasyon ortamı olarak kullanımı 118 22-23,34
- Fuat DURSUN (2009), Medyator bağıli matrikslerin tyrosinase tabanlı fenol biyosensörüne uygulanması 112 10
- Fumio Mizutani , Soichi Yabuki, Yoshiki Hirata (1995) Amperometric L-lactate-sensing electrode based on a polyion complex layer containing lactate oxidase. Application to serum and milk samples 1815-1820
- Junko Motonaka, Yoshitaka Katamoto, Sanae Ikeda (1998) Preparation and properties of enzyme sensors for L-lactic and D-lactic acids in optical isomers 91-95
- J. Haccoun, B. Piro, L.D. Tran, L.A. Dang, M.C. Pham (2004), Reagentless amperometric detection of l-lactate on an enzyme-modified conducting copolymer poly(5-hydroxy-1,4-naphthoquinone-co-5-hydroxy-3-thioacetic acid-1,4 naphthoquinone) 1325–1329
- Gabrielli G. and Keddan M. (1992), Review of application of impedance and noise analysis to uniform and localized corrosion, Corrosion., 48, 794-810,
- Göğüş, F. Ve Fadiloğlu, S. (2006), Enzymes, 219-267, Food Chemistry, Göğüş, F. Ve Fadiloğlu, S. (Eds.), Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 344 p.
- Gözde GÜLSEREN (2012), Boza kaynaklı laktik asit bakterilerinin laktik asit miktarlarının ve staphylococcus aureus üzerine antimikrobiyal etkinin belirlenmesi 87 23-24
- H. Benninga (1990) , A History of Lactic Acid Making: A Chapter in the History of Biotechnology 479 1
- Hatice Bozkurt, B.A. , İmmobilizasyonun Probiyotik Kültürlerde Kullanımı, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi Yıl: 2004 Cilt: 02 Sayı: 07 Sayfa: 01-14 www.mikrobiyoloji.org/pdf/702040701.pdf
- Habermüller, K., Mosbach, M., Schuhmann, W. (2000), “Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors”, *Fresenius J. Anal. Chem.*,366:560-568 Gispén, W. H., Biessels, G. J., “Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus”, *Trends Neurosci*, 23(11):542-9(2000).

- Işık ÇOBAN (2008), Serbest ve immobilize rhizopus oryzae fungusu ile laktik asit üretiminin optimum koşullarının belirlenmesi 136 10
- Jiadong Huang, Jing Li, Yu Yang, Xinsheng Wang, Baoyan Wu, Jun-ichi Anzai, Tetsuo Osa, Qiang Chen (2008), Development of an amperometric L-lactate biosensor based on L-lactate oxidase immobilized through silica sol-gel film on multi-walled carbon nanotubes/platinum nanoparticle modified glassy carbon electrode, *Materials Science and Engineering C* 28 1070–1075
- KARADEMİR, A., AKGÜL, M., TUTUŞ, A. (2002), Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış: Enzimlerin Kabuk Soyma, Liflerin Modifikasyonu, Çözünebilir Kağıt Hamuru ve Selüloz Üretiminde Kullanımı (Bölüm 1). *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 5(1).
- Kun Wang, Jing-Juan Xu, Hong-Yuan Chen (2006), Biocomposite of cobalt phthalocyanine and lactate oxidase for lactate biosensing with MnO₂ nanoparticles as an eliminator of ascorbic acid interference, *Sensors and Actuators B* 114 1052–1058
- Lammers, F. and Scheper, T. (1999), *Thermal Biosensors in Biotechnology*, Scheper, T. (ed.), *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, Vol. 64 (35-69), Springer, Berlin, 233p.
- Lukasova, E., Jelen, F. and Palecek, E. (1982), Electrochemistry of Osmium-Nucleic acid complexes: A probe for single-stranded and distorted double-stranded regions in DNA, *Gen. Physiol., Biophys.*, 1, sayfa 53-70.
- Marcelo Ricardo Romero, Fernando Garay, Ana M. Baruzzi (2008), Design and optimization of a lactate amperometric biosensor based on lactate oxidase cross-linked with polymeric matrixes, *Sensors and Actuators B* 131 590–595
- McCafferty, E.(2005), Validation of corrosion rates measured by the Tafel extrapolation method, *Corros. Sci.*, 47, 3202–3215,
- Mete ASILDAĞ (2006), Laktik asitin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi 77 1
- MEGEP (2007), Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Geliştirilmesi Projesi, Gıda Teknolojisi, Enzimlerin Özellikleri.
- McGown, L.B., Joseph, M.J., Pitner, J.B., Vonk, G.P. ve Linn, C.P. (1995), The Nucleic acid ligand: A new tool for molecular recognition, *Anal. Chem.*, 67
- Melis SÜMENGİN (2011), Laktik asit bakterilerinden fitaz üretimi ve endüstriyel kullanım olanakları 145 6

- Mikkelsen, S.R. (1996), Electrochemical biosensors for DNA sequence detection- a review, *Electroanalysis*, 8 (1): 15-19.
- Mustafa Serkan YALÇIN (2013), Selülaz enziminin relizyme ve sepabeads destekler üzerine immobilizasyonu ve karakterizasyonu 75 3
- Murat KARADAĞ (2012), Bazı fonksiyonel ve biyoaktif yüzeylerin elektrokimyasal ve optik biyosensör uygulamalarında kullanım potansiyellerinin incelenmesi 103 31
- M. Piano, S. Serban, R. Pittson, G.A. Drago, J.P. Hart (2010) , Amperometric lactate biosensor for flow injection analysis based on a screen-printed carbon electrode containing Meldola's Blue-Reinecke salt, coated with lactate dehydrogenase and NAD⁺, *Talanta* 82 34–37
- M.M. Rahman , Muhammad J.A. Shiddiky, Md. Aminur Rahman, Yoon-Bo Shim (2008) A lactate biosensor based on lactate dehydrogenase/nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form) immobilized on a conducting polymer/multiwall carbon nanotube composite film 159–165
- Neslihan MERT TOPRAKKIRAN (2010), İçeceklerde kafein tayini için yeni bir biyosensör hazırlanması 83 30
- Nicholson, R.S. and Shain, I. 1964. Theory of stationary electrode polarography: Singlescan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. *Anal. Chem.*, 36(4); 706-724.
- N. Nikolaus, B. Strehlitz, *Microchim. Acta* (2008), 160,15–55
- Parkinson, G. and Pejicic, B. (2005), Using Biosensors Detect Emerging Infectious Diseases. Nanochemistry Research Institute, Curtin University of Technology Perth, Western Australia, Prepared for the Australian Biosecurity Cooperative Research Centre, Final Report.
- Pınar Esra ERDEN (2010), Ksantin ve ürik asit tayini için farklı medyatörlü modifiye karbon pasta enzim elektrotların hazırlanması 169 10, 13
- R.Garjonyte et al. (2001), Prussian blue and lactate oxidase based amperometric biosensor for lactic acid *Sensors and Actuators* 79 33-38
- R. Garjonyte, V. Melvydas, A. Malinauskas (2006), Mediated amperometric biosensors for lactic acid based on carbon paste electrodes modified with baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioelectrochemistry* 68 191 – 196
- R. Monosík, M. Stredanský, G. Greif, E. Sturdík (2012), *Food Control*, 23, 238–244

- T N.A. Hirst, L.D. Hazelwood, D.G. Jayne, P.A. Millner Sensors and Actuators (2013), B 186 674– 680
- Tüken, T.(2000), Nikotin, nikotinik asit (niasin) ve nikotinamidin demirli malzemelerin klorür (Cl-) içeren sulu ortamlardaki korozyonu üzerine etkilerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana
- Serkan OBAN (2008), Melastan fermentasyonla laktik asit üretiminin optimizasyonu 74 5
- Sibel FADILOĞLU, O.E. (2004) , Gıda sanayinde enzimlerin önemi
- Sidwell, J.S., Rechnitz, G.A. (1986), Progress and Challenges for Biosensors Using Plant Tissue Materials, Biosensors 221-233
- Sinan Mithat MUHAMMET (2008), Kolesterol tayini için biyosensör hazırlanması 73 28
- Skoog, D.A., Nieman, T.A., Holler, F.J. (1998), Enstrümantal Analiz İlkeleri s 591-610
- Švancara, I., Vytas, K., Barek, J. and Zima, J. (2001), Carbon paste electrodes in modern electroanalysis, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 31(4), 311—345.
- Özgür BAL (2012), Biyolojik sıvılardaki glukozun tayini için polipirol filme glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması 87 21
- Övgü YILMAZ (2012), Ferrosen türevini temel alan elektrokimyasal biyosensör sisteminin hazırlanması ve uygulanması 69 1,5
- Umut BESKAN (2011) , Glukoz tayini için polianilin-polivinilsülfonat filme glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması 101 2-3, 43-44
- Ustabaş, S. (2010), “Glukoz tayini için yeni bir biyosensör hazırlanması”, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-35
- Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry (1990), Lactic acid, Vol. A 15, Wiley-VCH
- Veronica Paz Zanini, Beatriz Lopez de Mishima, Velia Solis (2011), An amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilized in laponite–chitosan hydrogel on a glassy carbon electrode. Application to the analysis of l-lactate in food samples, Sensors and Actuators B 155 75–80

- Yavuz, A.G. (2005), Polivinil Ferrosen Modifiye Elektrodunu Temel Alan Glukoz Biyosensörünün Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Niğde.
- Yavuz AYDIN (2012), İletken polimerlerin içerisinde enzim tutuklamasıyla yapılan biyosensörler 66 19
- Yağmur TOPTAŞ (2011), Ağız Mikrobiyotasından İzole Edilen Bakterilerin Laktik Asit Üretim Yeteneklerinin Araştırılması 83 33-34
- Yousef A.E. (2008), “Detection of bacterial pathogens in different matrices: Current practices and challenges ” in principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems, (Ed) Zourob, M., Elwary, S. and Turner, A., Springer, New York, USA, 31-48
- Wang, J., Kawde, A.N., Erdem, A., Salazar, M. (2001). Magnetic bead based label-free electrochemical detection of DNA hybridization, Analyst, 126, sayfa 2020-2024.
- Zeynep DİZDAR (2012), Poli(laktik asit) esaslı filmlerin ısı ve basınç yardımıyla kendine ve etilen vinil alkol kopolimerine yapışma davranışının incelenmesi 92

ÖZGEÇMİŞ

Ali Cihan ÇELİK 26.05.1989 tarihinde Elazığ'da doğdu. İlköğrenimini İzmir'in Karşıyaka ilçesindeki Fevzi Paşa İlköğretim Okulunda okudu. Lise eğitimini Karşıyaka Lisesi'nde okuduktan sonra Ege Üniversitesi Kimya Bölümünü bitirdi.