

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatih ERDEM

**DETERJANLARDA LİPAZ ENZİM MİKTARININ
ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLE TESPİT EDİLMESİ**

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA-2022

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DETERJANLARDA LİPAZ ENZİM VARLIĞININ VE MİKTARININ
ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLE TESPİT EDİLMESİ**

Fatih ERDEM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez 13/06/2022 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr.Güray KILINÇÇEKER
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr.Tunç TÜKEN
ÜYE

.....
Prof.Dr. Ahmet Murat Gizir
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Ç.Ü: Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2019-12405

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DETERJANLARDA LİPAZ ENZİM VARLIĞININ VE MİKTARININ ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLE TESPİT EDİLMESİ

Fatih ERDEM

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Güray KILINÇÇEKER
Yıl:2022, Sayfa: 69
Jüri : Prof. Dr. Güray KILINÇÇEKER
: Prof. Dr. Tunç TÜKEN
: Prof.Dr. Ahmet Murat Gizir

Bu araştırmada; biyosensörlerin elektrolitik ortamdaki elektrokimyasal davranışı incelenip, elektrokimyasal metot kullanımı ile yüzey yapı oluşumu görüntülenerek uygulamaya yönelik kullanılabilecek bir biyosensör elde edilmiştir. Bu biyosensör yardımıyla çeşitli formlardaki deterjanların içerisinde doğal biyolojik katalizör ve temizleme ajanı olarak kullanılan minör girdi lipaz enziminin miktarı ve varlığı tespit edilmiştir. Burada enzimi tanıyabilecek bir kimyasal sensör varlığından söz edemediğimiz için biyosensör zorunluluğu oluşmuştur. Polimerlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinden yararlanarak bu özel ihtiyaç doğrultusunda uyarlanmış polimer kaplı biosensör yardımıyla lipaz enzimi tespiti yapılmıştır. Yine bu çalışmada tutturma materyali olarak altın elektrot, karşı elektrot olarak ise platin elektrot kullanılmıştır. Bu durum elektrokimyasal olarak ele alınmış olup yapılacak biyosensörün kimyasal çevreye verdiği elektriksel/kimyasal tepki üzerine ölçümler yapılmıştır. Bu çalışmada; Lipaz varlığı ve miktarı bilinen numunenin deneysel ölçümü ile tekrarlanabilir, tam miktar tespiti yapılabilmektedir. Yapılan testlerde oluşan kimyasal çevrede sitokiyometrik değişimler ölçülmüş ve deterjan içerisinde lipaz enzimi varlığı ile miktarı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Platin, Altın, Elektrot, Biyonsesör, Tiyoferen, Elektrokimya, Lipaz, Elektrokimyasal Teknikler, Deterjan, biyoreseptör, Transdüser

SUMMARY

MASTER'S THESIS

DETERMINING THE PRESENCE AND AMOUNT OF LIPASE ENZYME IN DETERGENTS BY ELECTROCHEMICAL METHOD

Fatih ERDEM

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Advisor : Prof. Dr. Güray KILINÇÇEKER
Year: 2022, Pages: 69
Jury : Prof. Dr. Güray KILINÇÇEKER
: Prof. Dr. Tunç TÜKEN
: Prof. Dr. Ahmet Murat Gizir

In this study; The electrochemical behavior of the biosensors in the electrolytic environment, electrochemical methods and surface morphology were visualized and a biosensor that could be used for application was obtained. With the help of this biosensor, the amount and presence of lipase enzyme, which is the minor input used as a natural biological catalyst and cleaning agent in detergents in various forms, has been determined. Since we cannot talk about the existence of a chemical sensor that can recognize the enzyme, the necessity of a biosensor has arisen. By using the physical and chemical properties of the polymers, lipase enzyme detection was made by means of a polymer-coated sensor adapted for this special need. Again in this study, gold electrode was used as attachment material and platinum electrode was used as counter electrode. This situation was handled electrochemically and measurements were made on the electrical/chemical response of the biosensor to the chemical environment. In this study; the presence and amount of lipase can be replicated by experimental measurement of the known sample. Exactly quantifiable results were obtained. In the tests performed, the cytochromic changes in the chemical environment were measured and the presence and amount of lipase enzyme in the detergent was determined.

Keywords: Platinum, Gold, Electrode, Biosensor, Thiophene, Electrochemistry, Lipase, Electrochemical Techniques, Detergent, Bioreceptor, Transducer

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Sensörler kimyasal ve fiziksel sinyalleri algılama özelliği olan birimlerden oluşan sistemlerdir. Sensörlerin belirli kısımları sinyallerin oluşmasına yardımcı olurken diğer kısımları algılanan sinyalleri tanımlanabilir ve ölçülebilir sinyallere dönüştürmekte görevli yapı elemanlarıdır. Sensörün dedektör kısımları antikor, hücre reseptörü veya canlı doku gibi biyolojik bir oluşum tanımlayıcı ise bu tür sensörler biyolojik sensör olup biyosensör adını almaktadır. Biyosensörlerde biyolojik kısım sensörün belirli bir kısmında sabitlenir. Nanopartiküller ayrıca yüzey özelliklerini geliştirmek ve biyolojik olarak parçalanabilenleri stabilize etmek için ayrıca dönüştürücüler olarak çeşitli nanoyapıları stabilize etmek için kullanılabilir. Bu durumda sensör Nanosensör adını alır. Sensörler sağlık, endüstriyel süreçlerin kontrolü ve çeşitli çevresel değişkenlerin ölçümü alanında çok fazla uygulamaya sahiptirler.

Fiziksel ve kimyasal çevreyi anlamak, onlara uygun yanıtları vermek canlıların hayatta kalma becerisidir. Buna örnek olarak dil, gözler, deri, parmak uçları, burun gibi vücudun algılayıcıları biyosensörlere örnek olarak verilebilir. Bu örnekler çoğaltılmak istenirse mikroyapıdaki organizmalarında kendilerine ait biyosensör yapıları olduğu görülebilir. Mesela bakteriler çevresinin kimyasını algılayıp tepki vermesi ve duyargaları yardımıyla çevre kontrolü ve tepki sürecini başlatması doğal biyosensörlere örnek gösterilebilir. Çevresini bilen ve ona karşı oluşturacağı savunma mekanizması genetik aktarımın daha sağlıklı yapılmasına katkı sağlamakla birlikte olası mutasyonlar ve üreme, kendini koruma alma gibi hayati döğüleri sağlayarak canlılığını sürdürebilme gibi hayati faaliyetleri gerçekleştirebilmesini sağlamaktadır.

Bu doğal biyosensör yapıları incelenerek yaşam kimyası incelemesi ve araştırmaları için yeni biyosensör geliştirme çalışmalarına ışık tutmaktadır.

Bu çalışmada; Tiyofen, Gluteraldehit ve Lipaz enzimi ile oluşturulan biyosensörün çalışma örneklerindeki trigliserit miktarı azalması ile Lipaz enzimi

varlığı ve konsantrasyonu incelenmiştir. Çalışmada üç elektrot tekniği kullanılarak, döngüsel voltametri yardımıyla voltomogramlar elde edilmiştir. Çalışmada biyosensör oluşturulurken çalışma elektrodu olarak Altın, karşı elektrot olarak platin elektrot ve pH elektrot kombinasyonu kullanılmıştır. Altın çalışma elektrot yüzeyinde; Tiyofen kaplaması, tiyofen + enzim kaplaması, tiyofen + enzim + gluteraldehit yapıları oluşturulmuş ve bu yüzeyler SEM görüntüleriyle incelenmiştir. Elde edilmiş sonuçlarla konsanstrasyon değişimlerine bağlı olarak sitokiyometrik hesaplamalar yapılmış, trigliserit değişimleri ile lipaz aktivitesi ve konsantrasyonu belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam sırasında deneyim ve birikimlerini paylaşan, yol gösteren danışmanım Sayın Prof. Dr. Güray KILINÇÇEKER'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında bana desteğini esirgemeyen, Dr. Gökmen SİĞIRCIK'a ve Farhad ZARİFİ'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında her konuda destek sağlayan ve yanımda olan ABC Deterjan San. Ve Tic. A.Ş. Genel Müdürü Sayın Eser Arıcı Kıroğlu'na, Genel Müdür Yardımcısı Sayın Kılıç Ali Kılıç'a ve AR-GE Müdürü Taşkın Bayraktar'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda materyal destekleri için Methrohm Türkiye firmasından Ebubekir Doğan'a ve Novazymes firmasından Ebru Koçak Tümer'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında manevi desteklerini esirgemeyen çok kıymetli aile üyelerim babam Mehmet Erdem, annem Fadime Erdem ve kardeşlerim Ayhan Erdem, Ayten Kurul ve Selçuk Erdem'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda desteğini her daim yanımda hissettiğim Selen Doğru ya teşekkür ederim.

Tez çalışmamda maddi manevi desteğini her daim yanımda hissettiğim Muhammed Hasan Türemez'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZ.....	I
SUMMARY.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1.GİRİŞ	1
1.1. Biyosensörler	1
1.1.1. İyi Bir Biyosensörde Olması Gereken Özellikler	2
1.2. Biyosensörlerin Kullanım alanları	2
1.2.1. Biyosensörlerin Tarihçesi ve Özellikleri	3
1.3 Biyosensörlerin Yapısını Oluşturan Kısımlar	4
1.3.1 Biyoreseptörler.....	4
1.3.2. Transdüserler (Dönüştürücüler)	5
1.3.3. Biyoreseptör İmmobilizasyonu	5
1.3.3.1 İmmobilizasyon Yöntemleri	7
1.3.4. Biyosensör Çeşitleri	12
1.3.4.1. Elektrokimyasal Biyosensörler.....	12
1.3.4.2. Potansiyometrik Biyosensörler.....	12
1.3.4.3. Voltametrik Biyosensörler.....	13
1.3.4.3.1. Döngüsel Voltametri	14
1.3.4.3.2. Doğrusal Taramalı Voltametri (LSV/DTV)	17
1.3.4.3.3. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)	18
1.3.4.3.4. Kare Dalga Voltametrisi (KDV)	20
1.3.4.4. Amperometrik Biyosensörler	21
1.3.4.5. İletkenlik Biyosensörleri	21

1.4. Voltametrik Yöntem Cihazlarında Kullanılan Elektrotlar	22
1.4.1 Referans (Karşılaştırma) Elektrotlar:	22
1.4.1.1. Yaygın Olarak Kullanılan Karşılaştırma (Referans)	
Elektrotları	23
1.4.1.1.1. Doygun Kalomel Elektrot (SCE)	23
1.4.1.1.2. Gümüş-Gümüş Klorür (Ag/AgCl) Elektrot:.....	23
1.4.2. Karşı (Yardımcı) Elektrotlar	24
1.4.3. Genel olarak kullanılan İndikatör (Çalışma) Elektrotları	24
1.4.3.1. Civa Elektrotlar	24
1.4.3.2. Solid (Katı) Elektrotlar	25
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	31
3. MATERYAL VE METOD	39
3.1. Materyaller.....	39
3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	42
3.2.1. PBS (Fosfat Buffer Solusyonu) hazırlanması	42
3.2.2. Gluteraldehit	42
3.2.3. Triglicerit Emülsiyonunun hazırlanması.....	43
3.2.4 Elektrolit çözeltisinin hazırlanması.....	44
3.2.5 Deneyde Kullanılan Kontrollü örneklerin hazırlanması	44
3.2.6 Triton X-100	44
3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	46
3.3.1 Taramalı elektron mikroskobu.....	46
3.3.2. Döngüsel voltammetri yöntemiyle elektropolimerizasyon	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	47
4.1 Tiyofenin Elektropolimerizasyonu ve Altın Elektrot Yüzeyine	
Tutturulması.....	47
4.1.1. Tiyofen Polimerleri ile Kaplanmış Altın Elektrot Yüzeyine Lipaz	
Enzimi Tutturulması ve Gluteraldehit ile Çapraz Bağlama	
Yapılması	50

4.2 Lipaz enziminin kontrollü numunelerde tayini.....	51
4.3. Elektropolimerize edikasırtılmış Tiyofenin Karakterizasyonu	55
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	69



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Enzim immobilizasyon metotlarının karşılaştırılması.	12
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar.	39



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Bir biyosensörün yapısı ve bileşenleri.....	1
Şekil 1.2.	Elektrot yüzeyinin gösterimi.	4
Şekil 1.3.	İmmobilizasyon metotları.....	6
Şekil 1.4.	İmmobilizasyon metotlarında moleküllerin gösterimi.	6
Şekil 1.5.	Glutaraldehit-amin çapraz bağlanma mekanizması.....	10
Şekil 1.6.	Tek çevrim olarak uygulanan potansiyelin zamanla değişimi (E-t). 14	
Şekil 1.7.	İki çevrim olarak uygulanan potansiyelin zamanla değişimi (E-t)... 15	
Şekil 1.8.	Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltamogram (I-E).	16
Şekil 1.9.	LSV Potansiyel uygulama grafiksel gösterimi (E-t).....	18
Şekil 1.10.	Kapasitif akım ve Faradayik akım-zaman değişim grafiği(I-t).	19
Şekil 1.11.	Puls tipi uyarma voltomogramı(E-t).....	20
Şekil 1.12.	Doygun Kalomel elektrodun gösterimi.	23
Şekil 1.13.	Camsı karbon çalışma elektrodu yapı gösterimi.	27
Şekil 1.14.	Karbon pasta elektrot.....	28
Şekil 1.15.	Perde baskılı karbon elektrot.	29
Şekil 1.16.	Kalem Grafit Elektrot ve grafit elektrodun yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi.	30
Şekil 3.1.	Lipaz ile trigliserit hidroliz reaksiyonu.	40
Şekil 3.2.	Lipazın katalizleme reaksiyonu.	41
Şekil 3.3.	Glutaraldehitin yapısı.	43
Şekil 3.4.	Trigliserit yapısı.	44
Şekil 3.5.	Triton X-100 yapısı.	45
Şekil 4.1.	Tiyofen monomerlerinin döngüsel voltametri ile elektropolimerizasyon voltamogramı (I-E).	48
Şekil 4.2.	Tek kullanımlık altın elektrot yüzeyinin SEM görüntüsü (1000x çözünürlük).....	49

Şekil 4.3.	Elektropolimerize tiyofenin SEM görüntüsü (240.000 x çözünürlük).	49
Şekil 4.4.	Elektropolimerize tiyofen + Lipaz Enzimi SEM görüntüsü (5000x çözünürlük).	50
Şekil 4.5.	Elektropolimerize tiyofen + Lipaz Enzimi+Gluteraldehit SEM görüntüsü (10.000x çözünürlük).	51
Şekil 4.6.	%0,0 Lipaz enzimi içeren Sıvı Deterjanın Döngüsel Voltametri voltamogramı (I-E).	52
Şekil 4.7.	%1,0 Lipaz enzimi içeren Sıvı Deterjanın Döngüsel Voltametri Voltamogramı (I-E).	52
Şekil 4.8.	%1,5 Lipaz enzimi içeren Sıvı Deterjanın Döngüsel Voltametri voltamogramı (I-E).	53
Şekil 4.9.	%2,0 Lipaz enzimi içeren Sıvı Deterjanın Döngüsel Voltametri voltamogramı (I-E).	53
Şekil 4.10.	%2,5 Lipaz enzimi içeren Sıvı Deterjanın Döngüsel Voltametri voltamogramı (I-E).	54
Şekil 4.11.	Farklı Lipaz enzimi derişimlerine sahip Sıvı Deterjanların çakıştırılmış voltamogramı (I-E).	54
Şekil 4.12.	Farklı Lipaz enzimi derişimlerine sahip sıvı deterjanların kalibrasyon eğrisi (I-% derişim).	55
Şekil 4.13.	Tiyofen Polimerinin ¹³ C NMR spekturumu.	56
Şekil 4.14.	Tiyofen Polimerinin ¹ H NMR spekturumu.	56
Şekil 4.15.	Tiyofen Polimerinin FT-IR spekturumu.	57
Şekil 4.16.	Tiyofen Polimerinin Raman spektroskopisi.	57
Şekil 4.17.	Tiyofen Polimerinin Sterik Optimizasyonu.	58
Şekil 4.18.	Tiyofen Polimerinin MEP (Molecular Electrostatic Potential) Haritası.	58
Şekil 4.19.	Tiyofen Polimerinin Counter diagramı.	59
Şekil 4.20.	Tiyofen Polimerinin Muliken yük dağılımı.	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Akım
Thy	: Tiyofen
°C	: Derece santigrat
°F	: Derece Fahrenheit
Hz	: Hertz
Lb	: Libre
Gal	: Galon
μ	: Dipol moment
Rf	: Film direnci
GOD	: Glikoz Oksidaz
FADH ₂	: Dihidroflavin adenin dinükleotid

Kısaltmalar:

EIS	: Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
E	: Potansiyel
I	: Akım
R	: Direnç
T	: Sıcaklık
e ⁻	: Elektron
f	: Frekans
Pt	: Platin elektrot
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
v	: Tarama hızı / Mv
Ag	: Gümüş
Cl	: Klor
K	: Potasyum
N	: Azot

H : Hidrojen
C : Karbon
S : Kükürt
M : Molar (Molarite)

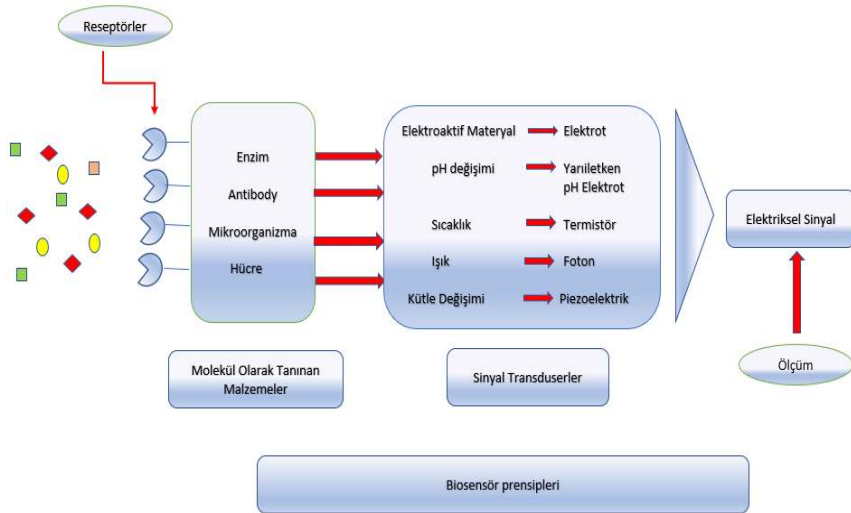


1.GİRİŞ

1.1. Biyosensörler

Biyosensörler; doğal kimyasal çevreyi anlamak için kullanılan selektif algılayıcı yapılardır. Biyolojik tabanlı yapılar olup canlıların biyokimyasal reaksiyonları üzerine oluşturulmuştur.

Bir biyosensör çevre kimyasını elektrik sinyallere dönüştürmede aracı olarak rol oynar. Bu elektriksel sinyalleri algılayıp anlamlı veriye dönüştürmek için bir biyosensör yapısında reseptör ve fizikokimyasal çeviriciyi bulundurmak zorundadır. Bu yapılar yardımıyla analiz edilecek analitte istenilen konsantrasyon değişimi ya da varlığın ölçülebilmesi mümkün kılınabilmektedir. Biyosensörlerin yapısı oluşturulurken biyomateriyal seçimi çok önemli olup tüm çalışma bu yapılar üzerinden enerji değişimleriyle yapılabilmektedir. Kimyasal çevrede oluşan bir enerjiden diğer enerjiye geçiş ölçümü yapılırken bu enerji değişimini algılayacak uygun ölçüm sistemleri çalışmaların başarıya ulaşması ve sonuçların tekrarlanabilir olmasında etkin rol oynamaktadır.



Şekil 1.1. Bir biyosensörün yapısı ve bileşenleri.

1.1.1. İyi Bir Biyosensörde Olması Gereken Özellikler

Hassasiyet: Bir biyosensörün hassasiyeti analitin derişim değışikliklerini algılama yeteneğı ile doğru orantılıdır.

Seçicilik: Bir biyosensörün karmaşık bir matriks içindeki analiti diğer türdeki analitlerden etkilenmeden ölçme yeteneğıdir.

Analiz sınırı: Bir biyosensörün tayin edebileceğı minumum konsantrasyonu ifade eder. Bu sınırı etkileyen faktörler ise elektrot yüzeyi, affinite ve immobilize edilen maddedir.

Tekrarlanabilirlik: Aynı şartlarda elde edilen sonuçların birbiri arasındaki uyum derecesidir. Tekrarlanabilirlik sonuçları ne kadar birbirine yakın ise biyosensörün güvenilirliğı o kadar fazladır.

Kalibrasyon İhtiyacı: İyi bir biyosensör kalibrasyona ihtiyaç duymamalıdır.

Ucuzluk: İyi bir biyosensör tasarımı basit ve ucuz olmalıdır.

Kullanım Ömrü: İyi bir biyosensör; cihazın analiz edilen analitin miktarına verdiği yanıtın belirli bir sürede aynı kalma süresidir. Aynı kalma süresi ne kadar uzun ise biyosensörün ömrü o kadar yüksektir.

Minimize etme ve Sanitizasyon: Bir biyosensörde kullanılan seçici kimyasalların az kullanılması sürdürülebilirlik ve kullanım açısından önemli bir özelliktir. Ayrıca elektrot yüzeylerinin hijyen edilmesi verilen yanıt sürelerinin kısaltılması, efektif ve tekrarlanabilir sonuçlar için önemli bir özelliktir.

1.2. Biyosensörlerin Kullanım alanları

Biyosensörler çok geniş kullanım alanlarına sahip olup günümüz teknolojileriyle birleştğinde çok fazla uygulama alanı bulmuştur kendisine. Yapı olarak incelendiğinde ve kullanım alanlarına bakıldığında biyosensörler daha çok insan sağlığını ilgilendiren analitlerin teşhisinde daha fazla kendine yer bulmaktadır. Bir biyosensörün kullanım alanlarından bazıları;

- Belirli alanlarda yayılan bulaşıcı hastalıkların tespiti için,

- Eser miktarda analitlerin tespiti için,
- Antijen – Antikor sistemlerini kullanarak hastalık tanılarının konulması için,
- Tedavilerde kullanılan ilaç dozajlarının zaman içindeki konsantrasyon değişimlerini ölçmek için,
- Vücuttaki hayati kimyasalların bazı efektler karşısındaki konsantrasyon değişimlerinin ölçülmesi için,
- Biyolojik ajanlar yardımıyla bunlara cevap verebilen analitleri tespit etmek için,

1.2.1. Biyosensörlerin Tarihçesi ve Özellikleri

İlk biyosensör 1950 yılı ortalarında L.C Clark'ın Cincinnati Hastahanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O₂ miktarının bir elektrot yardımıyla konsantrasyon değişimi izlenerek ortaya konulmuştur 1962 yılında L.C Clark ve Lyons Glikozoksidaz biyoyapısını O₂ elektrodu ile birleştirerek kandaki Glikoz miktarını ölçebilmişlerdir. Bu ölçüm sonrası konsantrasyon değişimi ile yenibir kimyasal yapı oluşmuştur. Bu sistem bir yandan biyolojik düzeneğin yüksek spesifikliğini yani enzimlerin çalışmasını diğer yandan ise fiziksel sistemin (elektrotların) hassaslığını birleştirerek büyük ölçekli bir uygulama alanı sağlamıştır.

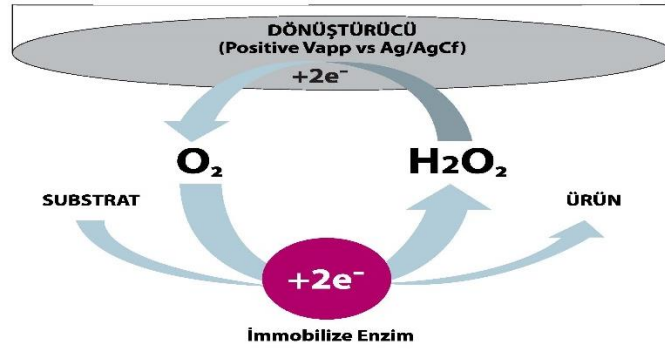
Çalışma mekanizması;

Glikoz oksidaz



Biyolojik içeriği olan ya da biyolojik bir materyaldeki glikoz ve oksijen elektrot etrafındaki zardan geçerek elektrot yüzeyine ulaştığında, glikoz glukonik aside dönüşür ve reaksiyon sırasında oksijen tüketilmeye başlanır. Mevcuttaki Glikozun tamamı bitirildiğinde oksijen tüketimi sonlanır. Bu kimyasal değişimin

tamamlanmasından sonra başlangıçtaki ve sondaki Oksijen konsantrasyon farkı hesaplanarak Glikoz miktarının hesabı yapılır.



Şekil 1.2. Elektrot yüzeyinin gösterimi.

Normal Elektrokimyasal yöntemle Anyon ve katyon belirleme sensörleri yapılabilirken sisteme biyolojik materyallerin eklenmesiyle birçok kimyasalın analiz edilebilmesi için metot geliştirilebilmenin önü açılmaktadır. Lyons ve Clarck tarafından keşfedilen ilk biyosensörde e^- alıcısı Oksijen kullanılırken, sonraki üretilen yeni nesil biyosensörlerde Oksijen yerine enzimin yükseltgenme ve indirgenme ortamından elektrot yüzeyine elektron taşıyabilen bir redoks aracı aracı madde (Mediator) tercih edilmeye başlanmıştır.



$$M_{redoks} = M_{oksijen} = \text{redoks medyatörü}$$

1.3 Biyosensörlerin Yapısını Oluşturan Kısımlar

1.3.1 Biyoreseptörler

Biyosensörlerin anayapısını oluşturan biyoyapılar yaygın olarak biyoreseptör olarak adlandırılırlar. Biyoreseptör olarak en fazla Enzimler ve Antikorlardır kullanılmaktadır. Antikor için Antijen, Enzim için reaksiyon tanıyıcısı Sübstrat, sistemlerinin araştırılmasında ilk etapta analitlerin ilgili proteinlere bağlanmasıdır. Bu bağlanma sırasında sinyal oluşturacak biyoaktif

materyallerde biyoreseptör olarak adlandırılırlar. Enzimler, mikroorganizmalar, antikorlar, dokular ve kesitleri, nükleik asitler, organaller ve hücre zarları birer biyoreseptöre örnektirler.

1.3.2. Transdüserler (Dönüştürücüler)

Transdüserler biyolojik bağlanma sırasında oluşan kimyasal reaksiyon sırasındaki elektron değişimini ölçülebilir sinyallere dönüştüren araçlardır. Ölçüm sırasında kullanılan elektrotlar Amperometrik ve Potansiyometrik analizlerin ölçüm değerlerini elde edilmesinde kullanılırlar. Optik sensörlerde hedef ışık olup, piezoelektrik sensörlerde ise amaç kristal yapının salınım rezonansının kütle yüklenmesinin değişmesidir. Bunlar haricinde devre elemanları olan termistörler ve transistörler sinyal dönüştürücü olarak kullanılırlar.

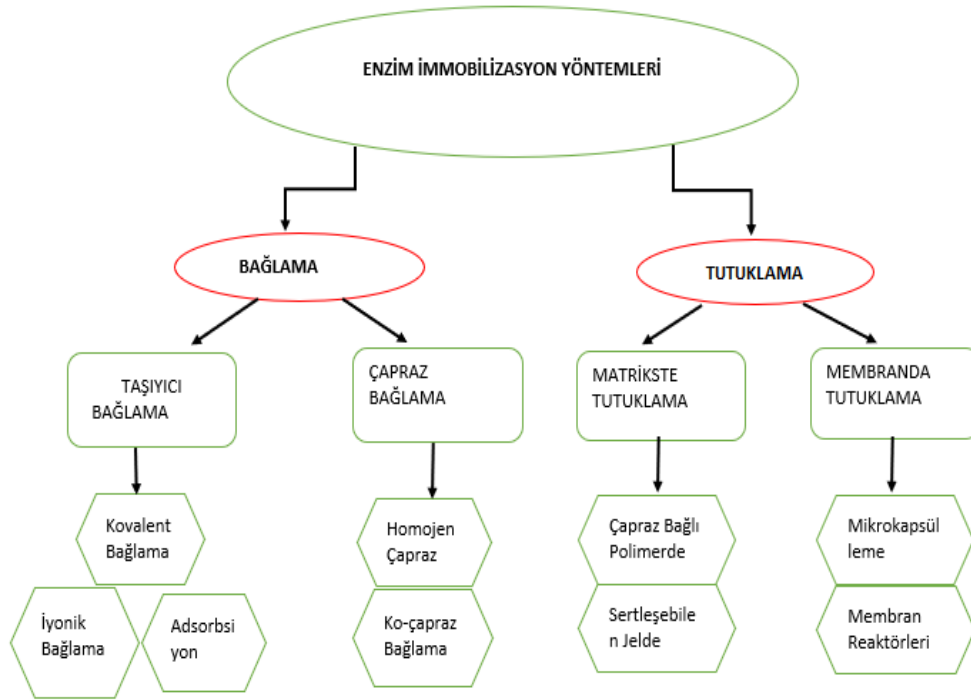
1.3.3. Biyoreseptör İmmobilizasyonu

Biyoreseptörlerin elektrotlar üzerinde immobilizasyonu fiziksel ve kimyasal tutturma yöntemleriyle gerçekleştirilir. Kimyasal tutunmaya kovalent bağlanma ve çapraz bağlanma örnek verilebilir. Fiziksel olan tutturma yöntemleri için ise adsorpsiyon, polimer matrikste tutuklanma vb. işlemler örnek verilebilir.

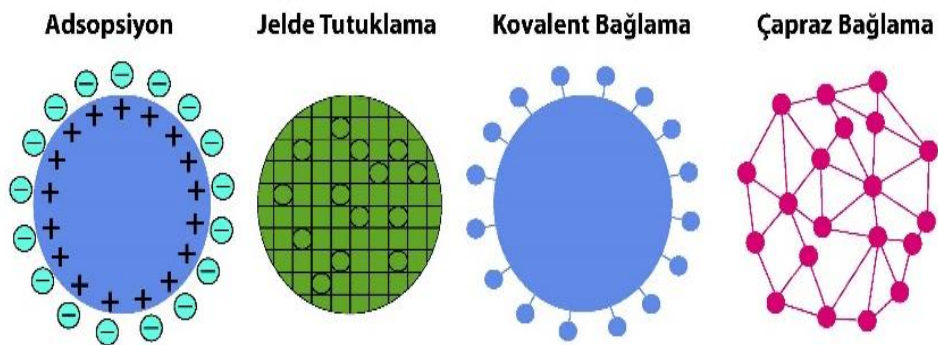
Bir biyokompanenti immobilize edebilmek için bazı gereklilikler vardır, bu gereklilikler sağlanmadan iyi bir biyosensör varlığından söz etmek mümkün olmaz. Bunlardan bazıları;

- ❖ Biyokompanentin uzun süreli stabil kalabilme yeteneği olması
- ❖ Biyoreseptör aktivitesinin immobilizasyondan sonra da devam edebilmesi
- ❖ Kullanılacak enzim ve diğer biyosensörlerin etkileşim hassasiyetlerinde değişiklik olmaması
- ❖ Biyoreseptör aktif bölge blokajı olmaması için uygunluk tespiti yapılmış olması

İmmobilize edilmiş biyoresptörler, çözünür biyosensörlere göre daha avantajlıdır. Bu avantajlar; stabil olması, ekonomik olması ve çözünme problemlerini ortadan kaldırması olarak sıralanabilir.



Şekil 1.3. İmmobilizasyon metotları.



Şekil 1.4. İmmobilizasyon metotlarında moleküllerin gösterimi.

1.3.3.1 İmmobilizasyon Yöntemleri

A-Bağlama

A-1 Taşıyıcı Bağlama

Taşıyıcı bağlama yöntemi tarihsel olarak en eski immobilizasyon metodu olup bu tarz bağlamalar kimyasal ve fiziksel bağlamalardır, yani daha özel bir tabirle, kimyasal olan bağlamalar iyonik ve kovalent bağlamalar, fiziksel olan bağlamalar ise adsorbsiyon olarak tanımlanır. Taşıyıcının uygun olarak seçilmesi immobilizasyon işleminin performansı açısından önemli bir parametredir ve taşıyıcı seçimini ise enzim çeşidi etkilemektedir. İyi bir taşıyıcı seçimi yapılabilmesi için bazı kriterler öne çıkmaktadır, bunlardan bazıları;

- ❖ Yüzey alanın geniş olması
- ❖ Hidrofilik ya da hidrofobik karakteri
- ❖ Kimyasal yapısı
- ❖ Molekül boyutu ve şekli
- ❖ Sertlik
- ❖ Aktif bölgeleri olması ve fonksiyel gruplar içermesi
- ❖ Sanitize edilebilmesi ve mikrobiyal kontaminasyona karşı dirençli olması
- ❖ Rejenerasyon yeteneği
- ❖ Geçirgenlik

A-1.1 Adsorbsiyon ile immobilizasyon

Adsorbsiyon; bir maddenin diğer bir madde yüzeyinde veya iki faz arasındaki ara yüzeyde konsantrasyonunun artması ya da bir başka ifadeyle moleküllerin temas ettikleri yüzeydeki çekme kuvvetlerine bağlı olarak o yüzeyle birleşmesidir. Bu tanımla birlikte biyoreseptörün elektrot yüzeyine, Van Der Walls, Hidrojen bağları, tuz köprüleri gibi kovalent olmayan etkileşimler ile tutturulması esasına dayanır. En başta gelen adsorbanlar, sellüloz, kollajen, silikajel ve bazı reçineler vb. kimyasallardır.

Adsorbsiyon ile immobilizasyon yönteminde, suda çözünmeyen ve adsorptif etkilere sahip, aktifliği olan taşıyıcı ile enzim uygun şartlarda (pH, affinite vb.) inkübe edildiğinde adsorptif immobilizasyon gerçekleşmiş olur. Enzimin aşırı varlığı perdeleme ve analite doğru çözünme sorunlarına neden olacağı için enzim konsantrasyonu iyi seçilmelidir. Yöntemin dezavantajları olduğu kadar avantajları da vardır, bu avantajlar; hız, ucuzluk, basitlik ve çok fazla sayıda taşıyıcı kullanma seçeneği olarak sıralanabilir (Şekil 1.4).

A-1.2 Kovalent bağlama ile immobilizasyon

Kovalent bağlama ile immobilizasyon yöntemi; taşıyıcı ve enzim arasında bir bağ oluşturulması esasına dayanır. Kovalent bağların oluşabilmesi için içeriği bilinen biyokomponentte veya bağlanılacak yüzeyde reaktif grupların olması gerekmektedir. Bağ oluşumu; taşıyıcı yüzeyindeki fonksiyonel gruplarla enzimde bulunan aminoasit fonksiyonel gruplarında olur. Bu gruplara örnek olarak -COOH, -OH, -NH₂ verilebilir.

Kovalent bağlama ile immobilizasyonda kullanılan taşıyıcılar eğer reaksiyonere değillerse yardımcı bir ajan ya da enzimle reaksiyonere hale getirilmelidirler. Biyokomponentler direk aktifleştirilmiş yüzeyde tutturulan yapıya bağlanacağı gibi daha önceden hazırlanmış immobilize bir ince tabaka sistemi ile ileticiye bağlanabilir.

Kovalent bağlama işlemiyle biyokomponent pH, iyon gücü, ısı gibi dış etkenlere daha dayanıklı hale gelir ve biyosensörlerde sağlam yapı oluşturulmuş olur. Ayrıca taşıyıcısı iyi seçilmiş bir immobilizasyon işleminde enzim aktiviteside yükselebilmektedir (Şekil 1.4).

A-1.3 İyonik bağlama ile immobilizasyon

Bu immobilizasyon yönteminde iyonik değiştirme yeteneği olan, suda çözünme özelliği olmayan taşıyıcılarla iyonik bağlama yapılmaktadır. İyonik bağlanma kolay gerçekleşebildiğinden enzim yapısında ve aktif bölgesinde

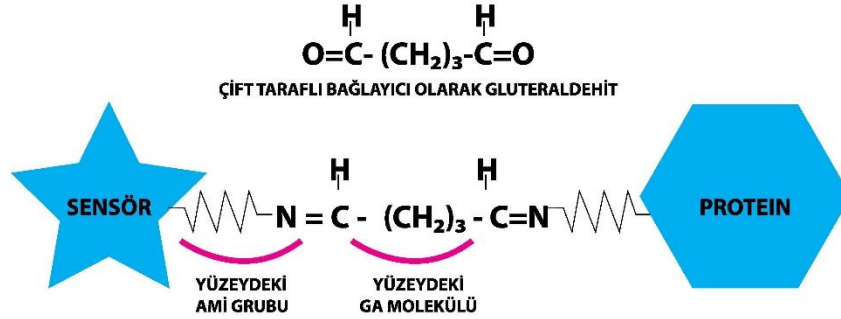
değişiklik meydana gelmez fakat oluşan bu bağ kovalent bağdaki gibi güçlü değildir. Güçlü bir etkileşim olmadığından enzimin kaçması durumu gözlenebilmekte bu da enzim kaybına neden olabilmektedir. Bu yöntemde trietilaminometil (TEAE) türevleri, karboksimetil (KM) türevleri ve dietilaminometil (DEAE) türevleri destek yapısı olarak kullanılmaktadır. Bağlanma sonrasında enzimde çok fazla konformasyonel değişiklik oluşabildiği için aktivitesinde yükselme artışı görülebilmektedir.

A-2 Çapraz Bağlama

Çapraz bağlamanın amacı iki ya da çok fazla molekülün kovalent olarak birbirlerine bağlanmasıdır. Bu bağlamada birden fazla fonksiyonel grubu olan kimyasallar kullanılmakta ve bu moleküller arasında suda çözünmeyen yapıların oluşması sağlanmaktadır. En fazla kullanılan çapraz bağlayıcı kimyasallar Gluteraldehit, Epiklorohidrin vb. bifonksiyol bileşikler olup çapraz bağlama oranı ve immobilizasyon yeteneği pH'a, enzim çeşidine, reaktif ve protein konsantrasyonuna bağlıdır. Ayrıca yapıda intermoleküler bağlanmalar yanında intramoleküler bağlanmalarda görülebilmektedir. Çapraz bağlamalar 2 çeşit olup Homo-Çapraz ve Ko-Çapraz bağlamalar olarak adlandırılmaktadırlar.

A 2.1-Gluteralehit ile çapraz bağlama

Gluteraldehit C-1 ve C-5'te aldehit yapısına sahip 5 karbonlu pentandan oluşan bir dialdehittir. Çapraz bağlama özelliği ve fiksatif rolü vardır. Amin ve amin özelliği gösteren bileşikler ile reaksiyona girerek bir Schiff bazı oluşturur. Gluteraldehitin bir uç kısmından elektrot yüzeyindeki aminlere diğer uçtaki karbondan ise proteinlerdeki N ucuna bağlanarak bu yapılarda bağlanmayı gerçekleştirir.



Şekil 1.5. Gluteraldehit-amin çapraz bağlanma mekanizması.

A-2.2 Epiklorhidrin ile çapraz bağlama

Epiklorhidrin, metildeki hidrojenlerden birinin klor ile yerine kullanıldığı 1,2-epoksipropen olan bir epoksit bileşiğidir. Bir organoklor bileşiği ve bir epoksit olup 1,2-epoksipropandan türetilmiştir. Parlama noktası 87 °F, Yoğunluk 9,8 lb/gal dır ve polimerizasyon reaksiyonuna sokulabilir. Epiklorhidrin yapısında bulunan hem epoksit halkasından hemde reaktif özellik gösteren klor ile reaksiyon verebilir. Bu sebeble bir den fazla sayıda hidroksil grubu (-OH) içeren kimyasal bileşiklerle birlikte çapraz bağlayıcı olarak kullanılabilirler.

B-Tutuklama

B-1 Matrikste tutuklama yöntemi ile immobilizasyon

Çoğunlukla jel yapıda olan makromoleküler matriksler tutuklamada taşıyıcı ajan olarak kullanılabilir. Biyoresptörler jel matriks, yarıgerçirgen membranlarda, mikrokapsül veya polimerlerde tutuklanarak hareketsizleştirilirler Polimerize edilmiş matriks; enzimlerin dışarı diffüze olmasını engellerken katalizlenecek maddelerin içeri girip çıkmasına izin verebilecek yapıda olması gerekmektedir. İmmobilize edilmiş enzim istenilen formda modifiye edilebilmekte jel olan matrislerin sertleştirilmesinde ise farklı yöntemler kullanılabilmekte ve bu yöntemlere örnek olarak Çapraz bağlı polimerde tutuklama ile sertleşebilen jelde tutuklama örnek olarak verilebilmektedir.

B-2 Membranda tutuklama yöntemi ile immobilizasyon

Membran ile tutuklamada enzim içeren sulu ortam ve yarıgeçirgen membran ile üç boyutlu yapı oluşturur. Bu yapılarda kullanılan membranlar analit çözeltisindeki reaktiflerin geçmesine izin verecek yapıda olmalıdır aksi takdirde substrat molekülleri membrandan enzimin olduğu alana geçemez ve reaksiyon oluşmaz bu nedenlerden ötürü substratları büyük olan moleküller için (Örnek olarak Proteaz) bu yöntem uygun değildir.

Enzimlerin birbirinden farklı yapı ve özellikleri olması, ayrıca kullanılan ürün ve substratın farklı kimyasal yapıda olması nedeniyle tüm enzimlerle aynı yöntemin kullanılması mümkün olmamaktadır. Bu bağlamda yöntemdeki avantaj ve dezavantajları nedeniyle immobilize edilecek enzim için farklı ya da kombine yöntemlerin seçilmesi gerekli hale gelebilmektedir.

İmmobilizasyon yöntemleri seçilirken işlem öncesi ve sonrası aktif bölgelerin zarar görmemesine dikkat edilmelidir, işleme başlamadan önce kullanılacak enzim yapısı iyi araştırılmalı, bağlanmaları aktif bölge üzerinden yapmayacak taşıyıcılar ile kombine edilmelidir. Buradaki en önemli husus biyokompanentlerin aktif bölgelerinin korunması ve doğal yapılarının bozulmamasıdır.

Yöntem ve materyal seçilirken güvenilirlik, maliyet, kararlılık, temizlenebilirlik, aktivitenin korunması gözönünde bulundurulmalıdır. Özellikle kovalent bağlanmalarda kullanılan reaktiflerin zararlı ve zehirli yapılar oluşturacağı düşünüldüğünde seçilecek sistem gıda, sağlık ve ilaç sektöründe efektif olmayacağı için seçimi çok dikkatli yapılmalıdır.

Çizelge 1.1. Enzim immobilizasyon metotlarının karşılaştırılması.

Özellik	Taşıyıcıya Bağlama			Tutuklama	Çağraz Bağlama
	Adsorbsiyon	İyonik Bağlama	Kovalent Bağlama		
Enzim aktivitesi	Düşük	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Orta
Hazırlama	Kolay	Kolay	Zor	Yüksek	Orta
Substrat spesifikliğı	Değişmez	Değişmez	Değişebilir	Değişmez	Değişebilir
Bağ gücü	Zayıf	Orta	Kuvvetli	Kuvvetli	Kuvvetli
Rejenerasyon	Mümkün	Mümkün	Mümkün değil	Mümkün değil	Mümkün değil
İmmobilizasyon giderleri	Düşük	Düşük	Yüksek	Düşük	Orta
Genel uygulanabilirlik	Düşük	Orta	Orta	Yüksek	Düşük

1.3.4. Biyosensör Çeşitleri

1.3.4.1. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler elektron sistemi ile çalışır, elektron transferi veya azalması/artması ile Enzimatik katalizlenme reaksiyonu prensibine dayanır. Bu tip enzimler elektron alıp verebilen enzimler (redoks enzimler) olup substrat olarak öncül yani Enzime has kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Elektrokimyasal biyosensörler en geniş alanda; alan etkili, iletkenlik, Potansiyometrik, voltametrik ve amperometrik olarak başlıca gruplandırılabilir.

1.3.4.2. Potansiyometrik Biyosensörler

Potansiyometri; çalışma elektrotu ve karşılaştırma elektrotu ile oluşturulan, elektrokimyasal bir haznede ölçülen potansiyel değerlerin kullanılarak hücrenin çözeltisindeki iyonların ölçümsel analizine denir. Burada elektrot potansiyeli doğrudan analitin derişimini tanımlar. Bu biyosensörlerde uygun bir transdüser ile uygun bir biyoreseptör kombine edilir, iyonların iyonofora bağlanmasıyla oluşan elektriksel gerilimdeki değişiklikler ölçülür. Bu ölçümler biyokompanenti içeren elektrokimyasal hücre içinde çoğunlukla bir substratın aktivitesi ya da elektrokimyasal değişimdeki tepkime veren maddenin aktivitesini geriliminin

ölçülmesi ile yapılır. Bu gerilim ise Nernst denklemiyle gösterilir. Potansiyometrinin dezavantajları düşük hassasiyet, farklı etkileşimlerin ve cihaz sinyallerinin alınması olarak verilebilir ayrıca potansiyometrik ölçümlerde bir referans ve bir indikatör elektrot bir araya getirilip hücre oluşturulduktan sonra aradaki potansiyel fark ölçüldüğü için gürültü nedeniyle sinyallerde kirlilik çok fazla olmaktadır.

Nernst denklemi aşağıda verildiği şekilde ifade edilmektedir.

$$E = E_o + \left[\frac{RT}{nF} \right] \ln a$$

E= V birimi ile ölçülen gerilim

E_o=a= 1 mol/L için standart gerilim

R = Gaz Sabiti

T = Kelvin cinsinden sıcaklık

F = Faraday sabiti

n = Elektron transfer sayısı

a = İlgili iyonun nispi aktivitesi

1.3.4.3. Voltametrik Biyosensörler

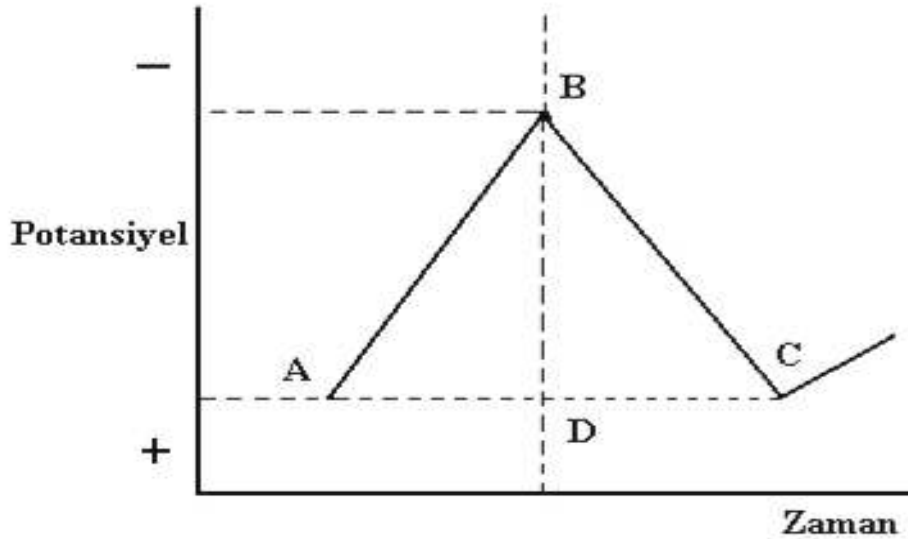
Enzimatik reaksiyonlar, çoğunlukla empedansta azalmaya, kapasitansta ve iletkenlikte artmaya neden olur. Bu durum gözönüne tutulursa rezistans, kapasitans, iletkenlik ya da empedeantaki değişiminin ölçümünü baz alan sensörler bu grupta yer almaktadır denilebilir.

Voltametri üç elektrotlu düzenekler kullanılarak istenilen çözeltilerin nicel ve nitel analizlerinin yapılmasını sağlayan bir elektrokimyasal yöntemdir. Bu yöntemde referans elektrot, çalışma elektrotu ve karşı elektrot olmak şartıyla üç elektrotlu düzenekte ve düzenli olarak değiştirilen ya da ayarlanan potansiyel için inceleme yapılır. Kombine edilen bu üç elektrotun sağlıklı inceleme yapabilmesi ve

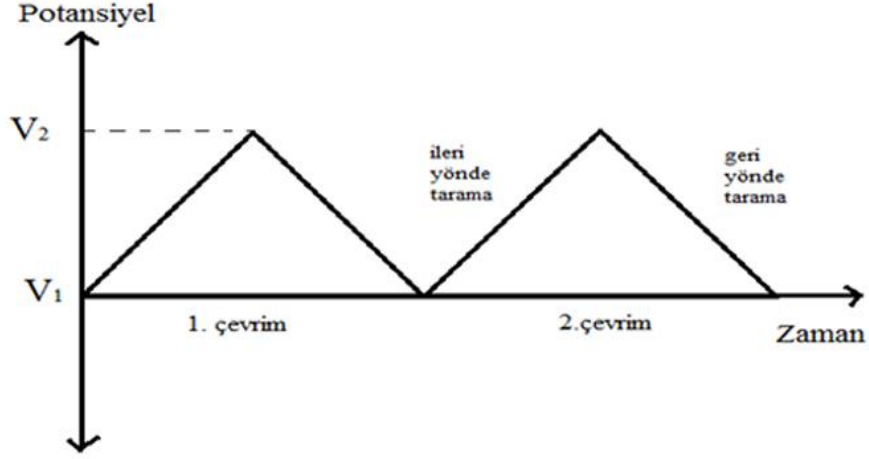
bu incelemeyi korele ederek anlamlı verilere dönüştürmesi için Potansiyostat adı verilen cihaz kullanılır. Bu cihazda; Çalışma elektrotunun ölçtüğü potansiyel referans elektrotun (karşılaştırma elektrotu) çalışma elektrotu üzerinden yardımcı bir elektrot aracılığıyla ölçülen değere ulaşana kadar akım geçirilir. Bu akımın ölçüsü çalışma elektrotunun ölçtüğü potansiyele karşı grafiği çizilerek voltamogram adı verilen potansiyel-akım grafiği oluşturulur. Bu grafikten yararlanılarak her türlü redoks redoks potansiyeli belirlenebilirken oluşan pikin büyüklüğü aracılığıyla ilgili türün analizi gerçekleştirilebilmektedir. Voltametrik Yöntemler; döngüsel voltametri (CV/DV), doğrusal taramalı voltametri (LSV/DTV), diferansiyel puls voltametri (DPV), kare dalga voltametrisi (KDV) şeklinde sıralanabilir

1.3.4.3.1. Döngüsel Voltametri

Döngüsel voltametrde (Döngüsel Voltametri, CV), karıştırılmayan bir çözeltide küçük durgun bir elektrodun akım cevabı üçgen dalga şekilli bir potansiyel ile uyarılır.



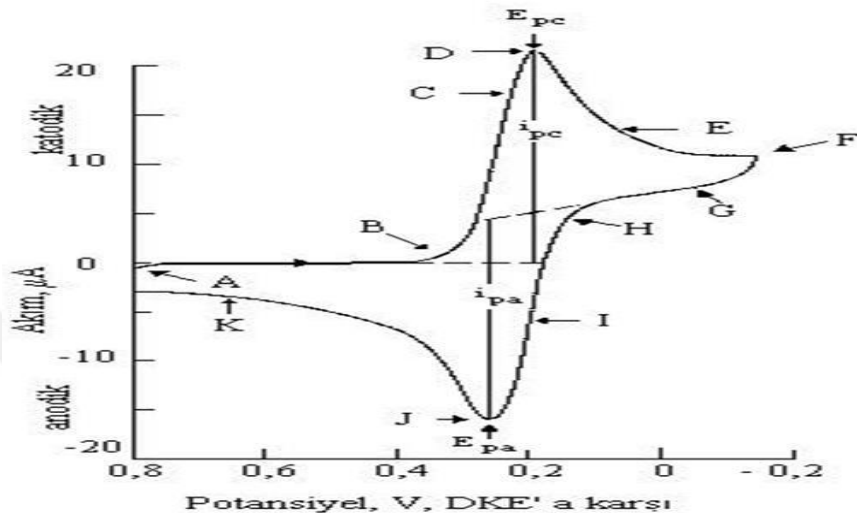
Şekil 1.6. Tek çevrim olarak uygulanan potansiyelin zamanla değişimi (E-t).



Şekil 1.7. İki çevrim olarak uygulanan potansiyelin zamanla değişimi (E-t).

Döngüsel voltammetri yöntemi elektrokimyasal yöntemler arasında en fazla kullanılan yöntem olup potansiyel zaman ile doğrusal olarak değiştirilip bu değişimde tarama hızı olarak isimlendirilir. Potansiyel taraması E1 başlangıç potansiyelinden E2 potansiyeline doğru yapılır iken dönüşte ise yine aynı hızla tarama hızında başlangıç potansiyeline doğru ters tarama yapılır, ters yöndeki potansiyeller döndürme potansiyeli adını alır ve redoksun meydana geldiği potansiyeldir. Bu ters tarama başlangıç potansiyelinde sonlandırılacağı gibi farklı bir potansiyeldede sonlandırılabilir. Taramalar sonrasında elektrot reaksiyonları ile ortaya çıkan akım ile potansiyelin grafiği çizilerek eğriler elde edilmektedir. Ayrıca ileri taramalarda anodik reaksiyon gerçekleşmiş ise geri taramada katodik reaksiyon gerçekleşecektir. Bu teknikte elektrot mekanizmaları araştırılırken miktar analizi yapılamaz fakat analiz edilecek maddenin hangi potansiyelde daha iyi yanıt verdiği ile ilgili bilgi edinilebilmektedir. Potansiyeller dışında tarama sayısı ve tarama hızıda gerçekleşecek reaksiyon mekanizmaları ve yapısı hakkında araştırmalarda kolaylık sağlamaktadır. Başlangıç taramasının yönü pozitif veya negatif olabilir. Bu da örneğin içeriğine bağlıdır. Daha negatif potansiyeller yönünde bir tarama ileri tarama, zıt yöndeki tarama da ters tarama

olarak adlandırılır. Üçgen dalga uygulandığında Şekil 1.10'daki gibi bir voltamogram elde edilir.



Şekil 1.8. Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltamogram (I-E).

Bu grafiksel eğri şöyle yorumlanır; giderek artan bir katodik gerilim uygulandığında eğrinin A-B-D-F kısmı elde edilir. İndirgenme sebebiyle bir katodik akım gözlenir (B noktası). B'den D'ye kadar olan bölgede indirgenebilen maddenin yüzey derişimi gittikçe küçülürken, akımda hızlı bir artma olur. Pik akımı iki yapıdan meydana gelir. Biri, analitin yüzey derişimini Nernst eşitliği ile verilen denge derişimine eşitlemek için gerekli kapasitif akım artışıdır. İkincisi ise normal difüzyon kontrollü akımdır. Sonra ilk akım, difüzyon tabakası elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça hızla azalır (D noktasından F noktasına). F noktasında uygulanan katodik gerilim azalma eğilimi göstermeye başlar. F-H bölgesinde indirgenebilen maddenin indirgenmesi devam eder. Ancak indirgenmiş madde derişimi azalmış olduğundan akım da azdır. Potansiyel yeteri kadar pozitif olduğunda indirgenme daha fazla devam etmez, akım sıfıra gider ve sonra da anodik yapıya ulaşır. Anodik akım, ileri yöndeki tarama sırasında yüzey

yakınlarında biriken indirgenmiş maddenin yeniden yükseltgenmesi sonucu oluşur. Bu anodik akım pik yapar ve sonra biriken indirgenmiş maddenin anodik reaksiyon yoluyla tüketilmesiyle azalır.

Döngüsel voltametrinin biyosensör sistemlerinde kullanımı

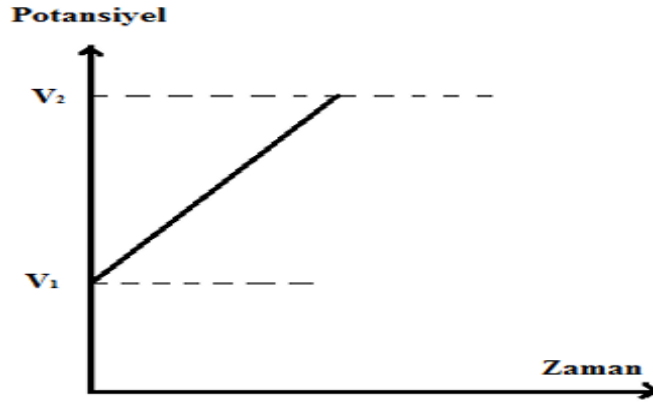
İletken olan bir maddeyi içeren bir çözeltide, çalışma elektrotuna zamanla doğrusal bir şekilde artan bir potansiyel verildiğinde akım-potansiyel eğrisinin bir pik şekli oluştuğu görülür. Bu yöntemde potansiyel taraması ileri yönde belli potansiyel değerine varınca tekrardan doğrusal bir şekilde azalarak ters çevrilirse, bu teknik döngüsel voltametri (CV) olarak adlandırılır. Döngüsel voltametrinde ileri ve geri yöne doğru potansiyel tarama hızları aynı tutulabilir ve istenilirse farklı tarama hızları da kullanılabilir. Ayrıca ileri ve geri yöne doğru olan taramalar istenilirse birçok kez uygulanabilir ya da bir kez yapılabilir.

CV yöntemi çok fazla alanda kullanılmaktadır. Bunlardan birkaçı: elektrot reaksiyonlarının kinetiklerinin incelenmesi, kantitatif analizler, çeşitli fizikokimyasal sabitlerin bulunması (D , i , E , K , $\alpha...$) yüzey modifikasyonu, adsorpsiyon olaylarının incelenmesi, kompleks yapıların belirlenmesi, elektrot reaksiyonlarının mekanizmalarının incelenmesi, biyosensörlerde immobilizasyon basamaklarının incelenmesi gibi uygulama alanları vardır. (Tekin 2008). Döngüsel voltametrinin biyosensör uygulamasındaki kullanımları, immobilizasyon kademelerinin incelenmesi ve biyoanalitin bağlanmadığını gözlemlene amaçlıdır. Döngüsel voltametri metodu ile yapılan ölçümlerde meydana gelen katodik ve anodik pikler, biyosensör üzerinde gerçekleştirilen tüm işlem sonuçları farklılık göstermektedir. Pik farklarının azalması veya artması elektrot yüzeyinde yapılan işlemin yanlış ya da doğru olduğu hakkında kesin veriler sağlamaktadır.

1.3.4.3.2. Doğrusal Taramalı Voltametri (LSV/DTV)

Doğrusal voltametri; potansiyel taramanın tek yönlü uygulandığı bir voltametrik yöntemdir. Burada potansiyel, başlangıç potansiyeli V_1 olup bitiş

potansiyeli olan V_2 ye sabit hız ile değiştirilir. Potansiyel değişimine karşı akımlar ölçülerek doğrusal Potansiyel-Zaman grafiği elde edilir. Grafiğin sıfır noktasından başlatılmamasının nedeni; analitin reaksiyon vermesi beklenen potansiyelden önceki durum kontrolü yapılması, olası girişim ya da gürültü durumunun gözlenmesidir. V_0 potansiyeli analizi yapılacak maddenin reaksiyon vermesi düşünülen potansiyelidir. Potansiyel tarama V_1 potansiyelinden tepkimenin gerçekleştiği V_0 potansiyelinin üstünde bir potansiyele (V_2) ulaşınca kadar sürdürülür.

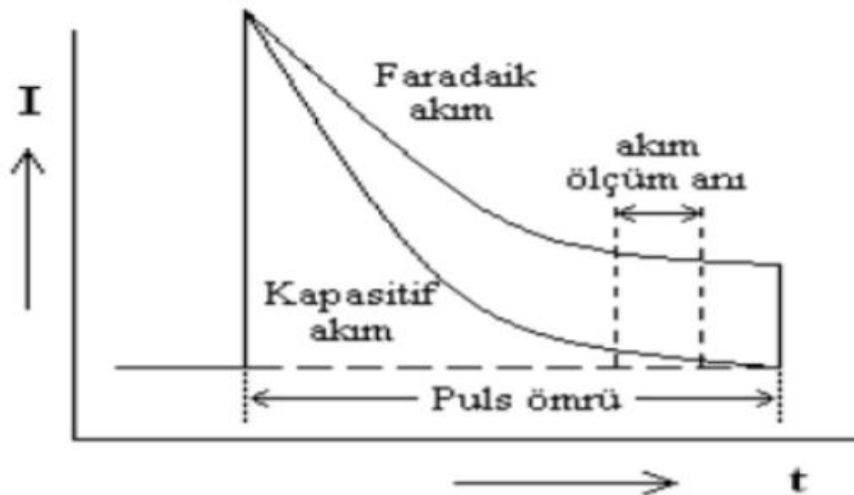


Şekil 1.9. LSV Potansiyel uygulama grafiksel gösterimi (E-t).

1.3.4.3.3. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)

Elektroaktif olmayan bir madde olmadan ve çözücü ile iletkenliği sağlamak için ortama eklenen yardımcı elektrolitli çözeltide gözlenen akıma artık akım denilmektedir. Bu akım; yüklenme yani kapasitif akım ile hücrede bulunan elektroaktif safsızlıkların oluşturduğu akımların toplamıdır. Voltametrik yöntemlerde çözeltide bulunan yükseltgenen bir potansiyel altında elektrotta bulunan yüzeyden belirli miktarda elektron alarak (n kadar) indirgenir ve indirgenmiş türü oluşturur. Oluşan akım ise Faradayik akım olarak adlandırılır. Bu yöntemde hassaslığı belirleyen artık akım olup duyarlılığın artırılmasında

potansiyelin puls şeklinde uygulanmasıyla gerçekleştirilir. Puls olarak uygulanan akım kapasitif ve faradayik akımlar zamanla azalır ve belirli bir süre sonra (t süre) kapasitif akım sıfıra ulaşırken faradayik akım belirli bir değerde sabit kalır. Puls ömrünün sonuna yaklaşıldığında akım ölçümünde kapasitif akımın sıfır olduğu ve tamamen faradayik akımın oluştuğu görülür. Bu şekilde pulsun sonunda ölçüm alınması normal puls voltametri olarak bilinir fakat bu ölçümler sırasında azda kapasitif akım bulunur, bu akımın etkisinin azaltılması, seçiciliğin artırılması için puls uygulamasından önce ve sonra akım ölçümleri alınıp farklarının alınması yöntemi kullanılır bu yöntem ise diferansiyel puls voltametri (DPV) adı verilir. Akımın iki kere ölçülmesi DPV'nin geniş ve hassas bir kullanım alanı bulmasında önemli rol oynar.



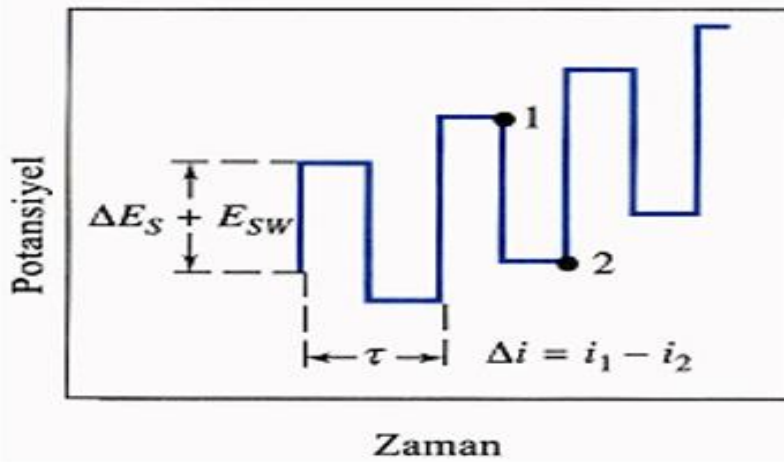
Şekil 1.10. Kapasitif akım ve Faradayik akım-zaman değişim grafiği ($I-t$).

1.3.4.3.4. Kare Dalga Voltametrisi (KDV)

Kare dalga voltametrisi diferansiyel puls voltametri (DPV)den daha fazla tercih edilen elektrokimyasal voltametri metodudur. KDV olarak kısaltılır ve çalışma elektrotuna uygulanan potansiyel büyük genişlikli ve adımsal(diferansiyel) teknik özelliği kazandıran simetrik kare dalgalar şeklindedir.

Her kare dalga döngü sürecinde akım iki kere ölçülür. İlk ölçüm ileri adımdaki pulsun sonunda (t_x) ikinci ölçüm geri adımdaki pulsun sonundadır(t_y). t_x ve t_y arasındaki fark, uygulanmış potansiyelin bir fonksiyonu olarak grafik çizildiğinde kare dalga voltomogramı elde edilmiş olur (Şekil 1.14).

Bu yöntemin en büyük avantajı hızlı bir metot olmasıdır. Etkin tarama hızı; basamak yüksekliği (ΔE_s) ve dalganın frekansının (f) değiştirilmesiyle belirlenir, bu da voltomogramların saniyeler içinde kaydedilmesine olanak verir. DPV gibi dakikalar alan metotlarla kıyaslandığında fazla ölçüm sonucu alınan deneylerde sağlayacağı yarar yadsınamaz. Diğer bir avantajı ise kare dalga ile katedilen yolun toplam akıma kapasitif etkilerin düşürülmüş olmasıdır. Bu işlem uygulandığında tarama hızı ciddi bir şekilde arttırılabilirdiği gibi $1/V$ 'lik tarama hızı kolayca yakalanabilir.



Şekil 1.11. Puls tipi uyarma voltomogramı(E-t).

1.3.4.4. Amperometrik Biyosensörler

Amperometrik biyosensörler tercih edilen biyosensör çeşitlerinden biridir. Genel manada Amperometri herhangi bir potansiyeldeki akım değişikliğini ölçülmesi temeline dayanır. Amperometrik biyosensörler analiz edilecek kimyasal içeriğin ve biyo içerik arasındaki etkileşim sonucu oluşan türlerin indirgenmesine veya yükseltgenmesine bağlı olarak çalışma yapılan elektrotta oluşan akımın ölçüldüğü biyosensör çeşididir. Çoğunlukla amperometrik biyosensörler derişim bağımlı akımları biyoaktif materyallerle kaplı elektrotlarla ölçerler. Amper-metrik dönüştürme; elektro olarak aktif ve oksidatif türlerin elektrot yüzeyinde indirgenmesi ile yapılmaktadır. Analit derişimi ile elektriksel akım arasındaki bağıntı Cottrell denklemiyle gösterilmektedir.

$$i = n.F.A.Co \left[\frac{D}{\pi t} \right]^{1/2}$$

i =ölçülecek akım

n=transfer edilmiş elektron sayısı

F=faraday sabiti

A=elektrot yüzey alanı

C_o=analit konsantrasyonu

D=difüzyon sabiti

Π=pi sabiti

t=potansiyel uygulandıktan sonra geçen süre

1.3.4.5. İletkenlik Biyosensörleri

Bu biyosensörler; analiz edilecek kimyasal içerik ile biyobileşen arasında oluşan etkileşimden sonra meydana gelen iletkenlikteki farkın ölçülmesi temeline dayanır yani elektriksel alandaki farklı değişkenler ölçülebilmektedir. Bu değişkenler çözeltinin veya hücrede kullanılan aracı kimyasalların genel iletkenliklerini ve elektrot yüzeyine oturtulmuş aynı anda impedimetrik reaksiyon gösterebilme yansıtılabilen kapasite değişimi olarak sıralanabilir.

Birçok etkileşim çözeltinin yapısında iletkenlik temelinde değişiklik meydana getirir. Bu değişiklikler oluşan yeni kimyasal bağların karakterine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Bu yüzden iletkenlik biyosensörleri yeni oluşan kimyasal çözeltideki çoğu değişikliği kolaylıkla tespit edebilir.

İlk dönem iletkenlik biyosensörleri hedef analitlerin sebep olduğu ve araçlar üzerindeki iletkenlik değişikliklerini incelemiş fakat çözelti direnci ortamdaki tüm iyonların hareketi ile belirlendiğinden iletkenlik ölçümlerinin çoğunlukla nispeten belirsiz olduğu düşünülür. Bu sorun mikroelettronik hücreler içinde sabitlenmiş enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar sonucu oluşan iletkenlikte meydana gelen değişikliklerin izlenmesiyle çözülebilir.

Direnç ve impedans, indüktans ve kapasitans arasındaki ilişkinin gösterildiği bağıntı şu şekildedir;

$$Z = R + jX = R + j(X_L - X_C)$$

Z = impedans, kompleks sayı

R = direnç

X = reaktans

X_C = kapasitif reaktans = $(2\pi f C)^{-1}$, olup f = frekans ve C = kapasitans

X_L = indüktif reaktans

j = imajiner birim

1.4. Voltametrik Yöntem Cihazlarında Kullanılan Elektrotlar

1.4.1 Referans (Karşılaştırma) Elektrotlar:

Yarı hücre potansiyeli bilinen ve diğer elektrotların potansiyellerinin bu elektrot kaynak alınarak ölçümlendiği elektrotlardır. Elektrodun bilinen bu potansiyel değeri, analit konsantrasyonundan bağımsız olmak zorundadır. İdeal bir karşılaştırma elektrodu bazı özellikleri sahip olması gerekmektedir.

İlk olarak tersinir olmalı ve mutlaka Nernst denklemi ile prensibiyle uyumlu olmalıdır. Bununla birlikte gerilimi zamanla değişkenlik göstermemelidir

ve tekrarlanabilir olmalıdır. Aynı zamanda gerilimin sıcaklıkla değişim katsayısı da mümkün olduğunca küçük olmalıdır ve polarize olmamalıdır.

1.4.1.1. Yaygın Olarak Kullanılan Karşılaştırma (Referans) Elektrotları

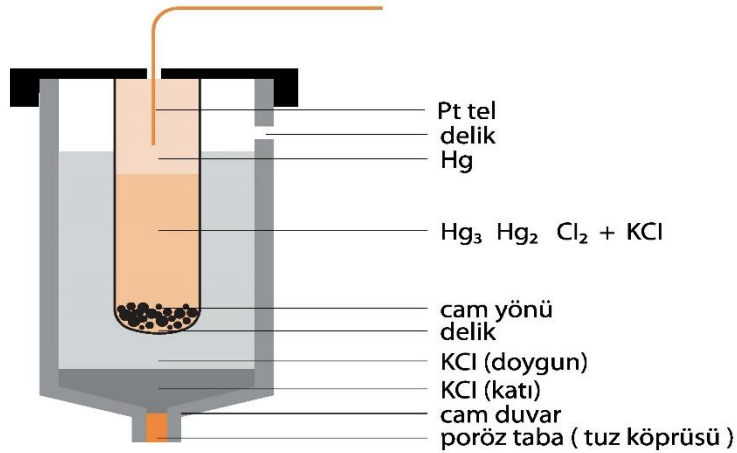
1.4.1.1.1. Doygun Kalomel Elektrot (SCE)

Klorür Kalomel elektrotlar, konsantrasyonu bilinen potasyum klorür (KCl) içinde doymuş civa (I) klorür (Hg_2Cl_2) ile etkileşen civadan oluşmaktadır.



$\text{Hg} / \text{Hg}_2\text{Cl}_2 (\text{doygun}), \text{KCl} (x\text{M})$ şeklindedir.

Yalnız klorür iyonunun aktifliğine bağlı olan elektrot gerilimi sıcaklıkla az da olsa değişim göstermektedir. Kolay hazırlanması analitik kimyada fazlaca tercih edilmesini sağlar.



Şekil 1.12. Doygun Kalomel elektrodun gösterimi.

1.4.1.1.2. Gümüş-Gümüş Klorür (Ag/AgCl) Elektrot:

Gümüş-Gümüş Klorür (Ag/AgCl) Elektrotlar, konsantrasyonu belli potasyum klorür (KCl) içerisinde gümüş klorür ile kaplanmış bir gümüş telden meydana gelmektedir.

Karşılaştırma elektrotlarının kullanılmasında, gümüş ya da civa (I) iyonları ile analit çözeltisi arasındaki reaksiyonu engellemek için elektrot çözeltisi

miktarının örnek çözeltinin üstünde olması lazımdır. Bu durum aynı zamanda elektrot çözeltisinin kontaminasyonunu da önleme amaçlıdır.

$\text{AgCl} + e^- \leftrightarrow \text{Ag} + \text{Cl}^-$ yarı tepkimesine gösteren elektrodun reaksiyonik gösterimi;

$\text{Ag/AgCl}_{(\text{doymuş})}$, 3 M KCl şeklindedir.

1.4.2. Karşı (Yardımcı) Elektrotlar

İki elektrotlu yapılardaki kutuplanmayan elektrot, üstünden akım geçtiğinden yüksek akımlarda kutuplanır. Ayrıca eğer çözelti direnci yüksek ise bu direnci yenmek için gerekli potansiyel ciddi bir düzeye çıkacağından çalışma elektrodunun polarizasyon potansiyeli yanlış algılanabilir. Bu karışıklığın önlenmesi için üçüncü bir elektrotun varlığı gerekir. Çalışma elektrodu ve yardımcı elektrottan akım geçirilip çalışma elektrodunun potansiyeli karşılaştırma elektrotuna karşı sıfır akım altında tespit edilir. Akım yardımcı elektrot üzerinden geçtiği için bu elektrotların tantal, grafit, tungsten ve platin gibi soymetal olmaları gerekmektedir.

Sarmal şekilde sarılmış bir Pt tel, elektriğin kaynaktan gelerek çözelti içinden mikroelektroda aktarılmasını sağlayan yardımcı elektrot olarak görev alır. Burada yardımcı elektrotun çalışma elektrotundaki reaksiyona etkisi olmayıp sadece ona elektron transferinde görev alır.

1.4.3. Genel olarak kullanılan İndikatör (Çalışma) Elektrotları

1.4.3.1. Civa Elektrotlar

Civa kökenli elektrotların çoğunlukla kullanılmasının birden fazla sebebi vardır. Bunlardan biri civa elektrodun geniş bir potansiyel aralığında çalışabilir olmasıdır. Bu özelliğinden dolayı negatif potansiyellerde de rahatlıkla kullanılabilir. Ayrıca sürekli yeni bir yüzey oluşturabildiği için önceki işlemlerden kalan kirlilikler civa yüzeyinden uzaklaştırılabilir. Tekrarlanabilir civa damlalarının oluşması sonucunda da tekrarlanabilir akımlar

elde edilebilmektedir. Bu elektrot sayesinde birçok metal civa ile amalgam oluşturarak indirgenmektedir. Bu esnada kendisi kolay yükseltgendiğinden fazlaca zehirli etki meydana getirmektedir ki bu da civa elektrotların olumsuz yönleri olarak görülmektedir.

Civa elektrotlarda civanın akış hızı mekanik bir iğne yardımıyla ayarlanmaktadır. Bu iğnenin kontrolü ise ya yerçekimi ivmesi (haznenin yüksekliğinin değiştirilmesi) ile ya da manyetik etki ile yapılmaktadır. Civa damlasının düşürülmesinde mekanik bir çekiç aracılığı ile yapılmaktadır.

Dört sınıfta incelenebilen Civa Elektrot çeşitleri;

- 1- Damlayan Civa Elektrotu
- 2- Asılı Civa Damla Elektrotu
- 3- Durgun Civa Damla Elektrotu
- 4- Civa Film Elektrotu

1.4.3.2. Solid (Katı) Elektrotlar

Civa elektrotların anodik gerilim sınırının alçak değerlerde olmasından dolayı kolay yükseltgenebilen bileşiklerin davranışlarını incelemek katı elektrotlarla çok kolay değildir. Bu bileşikler için daha geniş bir anodik gerilime sahip olan katı elektrotların kullanımı daha fazla öne çıkmaktadır. Katı elektrotların dönen durgun ve titreşen çeşitleri mevcuttur. Bu elektrotlar disk, tel ve levha halinde tasarlanabildiği için katı elektrotlarda yanıtın verimi ve tekrarlanabilirliği elektrot yüzeyine bağlıdır. Homojen olmayan bir yüzeye sahip olmalarından dolayı kullanım öncesinde bu elektrotlara elektrot temizleme ve parlatma işlemleri mutlaka yapılmalıdır. Bu işlemler elektrodun türüne göre değişiklik göstermekle birlikte döngüsel gerilim taraması ve mekanik parlatma en çok kullanılan yöntemlerdir. Ayrıca yüzey aktivitesinin uyarılmasını sağlamak için termal yüzey yöntemleri, kimyasal, elektrokimyasal yöntemler de kullanılmaktadır.

Solid (Katı) elektrotlarda en fazla 2 çeşit elektrot kullanılır, bunlar;

1-Metal Elektrotlar

2-Karbon Elektrotlar

1.4.3.2.1. Metal Elektrotlar

Metal elektrotlar, soy metaller kullanılarak tasarlanmış elektrotlardır. Metal elektrot tasarımında en fazla kullanılan soy metaller platin ve altındır. Nadirde olsa nikel, gümüş, bakır da kullanılabilir. Bunlarla birlikte indiyum, çinko, rutenyum, iridyum gibi metallerin oksitlerinin kullanıldığı çalışmalara da rastlanmaktadır. Ortamının pH'ına göre çok küçük negatif gerilimlerde (0,2V/0,5V) kullanılabilirler. Özellikle platin ve altın elektrotların biyosensör tasarımındaki kullanımı son yıllarda artış göstermiş olup bunun nedeni ise tiyol gruplarının bu elektrotlara olan ilgisi ve değiştirilebilir olmalarıdır (Wang, 2000).

1.4.3.2.2. Karbon Elektrotlar

Karbon temelli elektrotlar, elektrokimyasal analizlerde en fazla tercih edilen katı elektrotlardır. Çünkü karbon elektrotlar geniş bir gerilim aralığına sahiptir. Ayrıca yüzeyinin zengin bir bileşime sahip olması ve pahalı olmaması da tercih nedenlerinden birkaçıdır. Karbon elektrotlar kimyasal tepkimelere karşı isteksiz ve düşük artık akım vermeleri ile yüksek duyarlılığa sahip olmaları açısından da çok kullanılan elektrotlardır. Metal elektrotlarla kıyaslandığında elektron aktarım hızları çok düşüktür. Karbon elektrot yüzeyindeki grafit tozunun kimyasında var olan aromatik halkaların aktif oksijen uçları, çeşitli fonksiyonel grupları (karboksil grupları, hidrojen, hidroksil grupları ve kinonlar) karbon yüzeyine bağlayarak elektrot yüzeyinin kirlenmesine sebebiyet vermektedir. (Wang, 2000)

Karbon Elektrotlar 5 grupta incelenebilir, bunlar;

1. Camsı karbon elektrot
2. Perde baskılı karbon elektrot

3. Karbon-fiber elektrot
4. Karbon pasta elektrot
5. Kalem grafit elektrot

1.4.3.2.2.1. Camsı Karbon Elektrot (Glassy Carbon Electrode – GCE)

Camsı karbon elektrotun kullanım alanı çok geniştir. Geniş kullanım alanı olmasının en önemli sebeplerinin başında elektriksel ve mekaniksel özelliklerinin iyi olması gelmektedir. Ayrıca gerilim çalışma aralığının geniş olması, kimyasal açıdan reaksiyona girme isteği olmaması (inert yapıda olması) ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması da geniş kullanım alanına sahip olması nedenleri arasında sayılabilir. Elektrot gövdesi inert bir malzemeden oluşur. Camsı karbon, bu gövde içine elektrot yüzeyinden 12 mm konumuna kadar sıkıştırılarak tasarlanmaktadır. Camsı karbon elektrot ya poliakrilonitrilin yüksek sıcaklık (1000-3000 °C) ve basınç altında karbonizasyona uğratılması ya da fenolformaldehit polimerlerinin kontrollü ısıtılmasıyla (300-1200 °C) ile elde edilmektedir. Bu elektrot yüzey ön işlemine tabi tutulursa, elektrodun analitik performansında artış görülür. (Wang, 2000; Şahinçi, 2005)

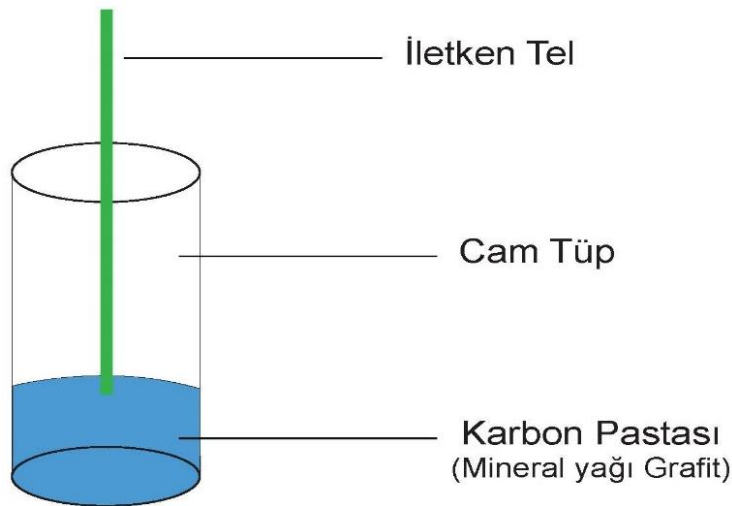


Şekil 1.13. Camsı karbon çalışma elektrodu yapı gösterimi.

1.4.3.2.2. Karbon Pasta Elektrot (Carbon Paste Electrode, CPE)

Karbon pasta elektrotlar da çoğunlukla kullanılan elektrotlardandır. En önemli tercih sebeplerinden biri kolay yenilenebilir olmaları ve yüzeylerinin tasarlanabilir olmasıdır. Oluşturdukları artık akımın düşük olması ve ucuz olmaları da tercih edilmesinde öncelikli olması nedenlerindendir. Bu elektrotlarda karbon pastası denilen bölge, grafit tozunun suda karışmayan çeşitli organik bağlayıcılarla (silikon yağı, parafin yağı, mineral yağ, bromonaftalin) karıştırılması ile hazırlanmaktadır. Bu karışım camdan yapılmış elektrot gövdesi içerisine uygun şekilde yerleştirilir. Yerleştirme sırasında iletken olan bir tel de gövdenin 2/3 üne kadar yerleştirilerek iletkenlik kazandırılmış olur.

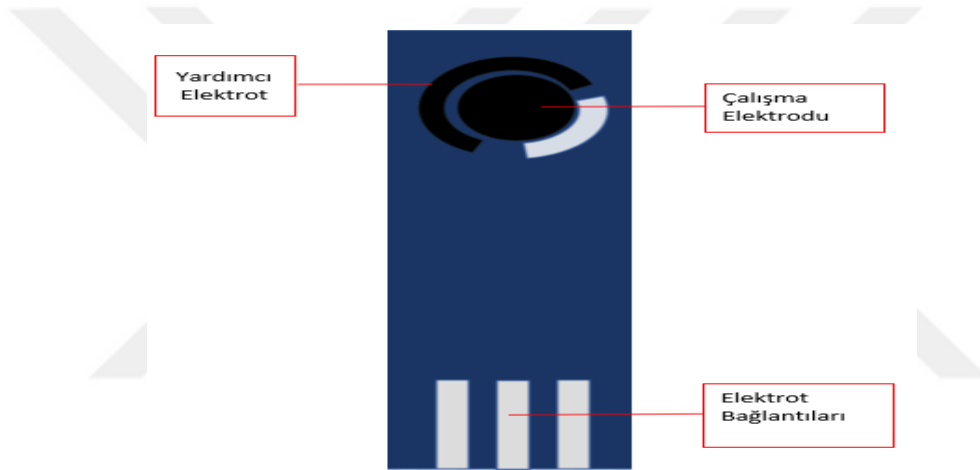
Karbon pastası adı verilen kısmın içeriği, elektrodun aktifliğini fazlasıyla etkilemektedir. En iyi performansı veren karışım, grafit ve mineral yağ karışımıdır. Geniş bir gerilim aralığında çalışmaya imkan veren karbon pasta elektrot, kolay hazırlanabilen ve hazırlanması kısa süre alan bir elektrottur. Fakat öbür elektrotlara göre tekrarlanabilirliği düşüktür. Ayrıca, kullanılan karışım yüksek oranda organik çözücü içeriyorsa, karbon pastası çözeltide bozunabilmektedir. (Kalcher, 1990; Urbaniczky ve Lundstrom, 1984; Wang, 2000)



Şekil 1.14. Karbon pasta elektrot.

1.4.3.2.2.3. Perde Baskılı Karbon Elektrot (Screen Printed Carbon Electrode, SPCE)

Geleceğin elektrotları olarak gösterilen perde baskılı elektrotların, özellikle biyosensör teknolojisinde önemi büyüktür. Perde baskılı karbon elektrotlar, çeşitli mürekkeplerin poliester esnek film, seramik ya da plastik materyaller üzerine baskısından oluşur. Çalışma elektrodunu baskılamak için genellikle karbon ve platin mürekkep baskılı olanlar kullanılırken, karşılaştırma elektrodunun baskısında gümüş baskılı olanlar daha çok tercih edilmektedir.



Şekil 1.15. Perde baskılı karbon elektrot.

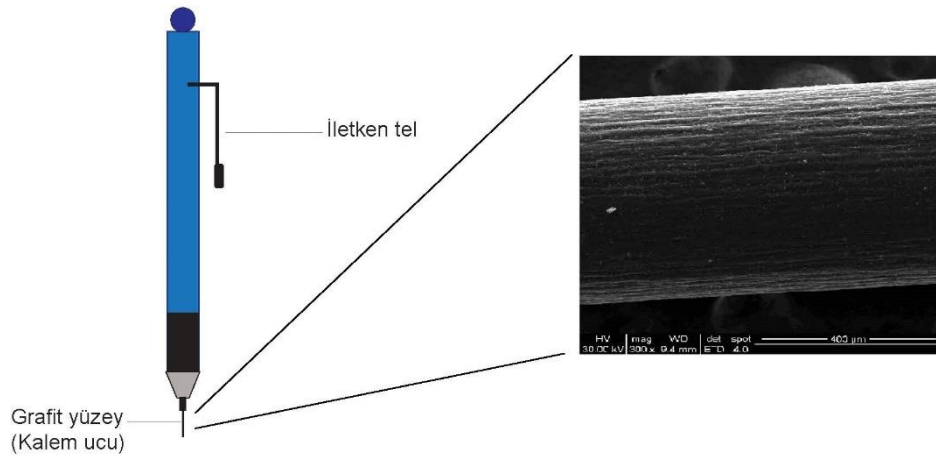
1.4.3.2.2.4. Karbon Fiber Elektrot (Carbon Fiber Electrode, CFE)

Karbon fiber elektrotlar, çok küçük boyutlara sahip olmalarından dolayı, mikro ve nano problemlerin üretilmesini olanaklı hale getirmekte ve bu da belli kolaylıklar sağlamaktadır. Örnek verilecek olursa bu elektrotların tek hücre gibi küçük hacimli ortamlarda kullanımı canlı doku incelemelerinde kullanılan diğer problemlere göre (örneğin mikrodializ problemleri) daha az zarar vermektedir. Elektrokimyasal uygulamaların çoğunda 5–20 µm çapında karbon fiberler kullanılmaktadır. Bunlar istenilen yönde difüzyonun gerçekleşmesini

sağlamaktadır. Karbon fiber elektrot, küçük boyutları nedeniyle çeşitli mikro, çevresel ölçümlerin yapılmasına katkı sağlamaktadır (Wang, 2000).

1.4.3.2.2.5. Kalem Grafit Elektrot (Pencil Graphite Electrode, PGE)

Elektrot olarak çapı ve sertliği değişiklik gösteren mekanik kurşun kalem uçları kullanılır. Bu uçlar, balmumu ve kil karışımı içerisinde grafit tozunun dağılması ve sonrasında ısı verilerek şekillendirilmesi ile üretilir. Burada kil yerine selüloz kullanılarak oksijensiz ortamda yanma işlemi uygulanırsa, selüloz karbona dönüşür ve esnek bir yapı oluşur. PGE'ler, karbon pasta ve pirolitik karbon kadar kırılğan olmayıp camsı karbon kadar da sert değildirler. Tüm katı elektrotlarda olduğu gibi karbon elektrotlarla çalışılırken de bazı bileşiklerin yükseltgenme ürünleri elektrot üzerinde birikerek ince bir film tabakası oluşturur. Bu tabaka ölçümün doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini azaltır. 20. yüzyılın sonlarından bu yana el-yapımı kalem ucu (kalem grafit) elektrotlar (PGE) diğer karbon elektrotlara göre daha fazla kullanılmaktadır (Wang ve Kawde, 2001; Wang 2000). Tek kullanımlık olmaları ve kolaylıkla yeni bir elektrot yüzeyinin oluşturulabilmesinden dolayı elektrot temizleme işlemlerine gerek yoktur.



Şekil 1.16. Kalem Grafit Elektrot ve grafit elektrodun yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Tocco ve ark., (2018) Lipaza dayalı serum numunelerinde trigliseritlerin (TG) belirlenmesi için bir elektrokimyasal biyosensörün geliştirilmesi için çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada trigliseritlerin miktar tayini, amperometrik ölçümlerle yapılmış olup önerilen elektrokimyasal biyosensör, TG'lerin kantifikasyonu için geliştirilen diğer yöntemlerin performansını iyileştirdiği gözlenmiştir. TG'lerin belirlenmesi, serum numunelerinin ön işleme tabi tutulmasını gerektirmediği çalışmalarda sonuç olarak verilmiş ve TG'lerin nicelleştirilmesi için PLS-1 algoritması kullanılmıştır. Bu algoritmaya göre, saptama ve niceleme limitleri $3,2 \times 10^{-3} \text{ gL}^{-1}$ ila $3,6 \times 10^{-3} \text{ gL}^{-1}$ ve $9,6 \times 10^{-3}$ ila $1,1 \times 10^{-2} \text{ gL}^{-1}$ arasında olup, duyarlılık $1,64 \times 10^{-6} \text{ gL}^{-1}$ bulunmuştur. Önerilen elektrokimyasal biyosensör, çok iyi bir performans, 20 günlük bir stabilite, çok iyi tekrarlanabilirlik sergilemiş ve insan serumu klinik örneklerinde TG'lerin belirlenmesi için çok iyi bir alternatif olarak sunulmuştur.

Zhang ve ark., (2014), sensörün performansını önemli ölçüde iyileştirmek için bir polidopamin ve altın nanoparçacık hibritine (GNPs@PDA) dayalı tributirin tespiti için yeni bir elektrokimyasal algılama stratejisi geliştirilmiş, yapışkan hibrit, HAuCl_4 mevcudiyetinde dopaminin oksidatif polimerizasyonu yoluyla yerinde kolayca sentezlenmiştir. Lipaz daha sonra GNPs@PDA ile kolayca konjuge edilip, enzimatik olarak aktif bırakılmış ve tributirinin hidrolizini katalize ettiği bulunmuştur. Biyomimetik malzeme PDA burada hem sensör yüzeyine bağlanmak için ideal bir bağlayıcı ajan hem de enzim lipazının aşılınması için iyi bir platform olarak iyi bir performans sergilediği görülmüştür. GNPs@PDA platformunda 50 ila 300 mg dL^{-1} arasında değişen doğrusal bir yanıt ve 0,84 mg dL^{-1} kadar düşük bir tributirin saptama limiti, hızlı yanıt süresi (20 s) ile elde edilmiş olup görünür Michaelis-Menten sabitinin (K_m^{app}) değeri, lipazın tributirine yüksek afinitesini gösteren 7,94 mg dL^{-1} olarak bulunmuştur. Sensörün uzun bir raf ömrünün yanı sıra güçlü parazit önleme özelliğine sahip olduğu ayrıca insan serum örneklerindeki

trigliserit konsantrasyonunu saptamak içinde kullanıldığı ve doğru sonuçlar verdiği ortaya konulmuştur.

Phongphut ve ark., (2013) Çalışmalarında, serigrafi baskılı karbon elektrotlar (SPCE'ler) üzerine Au/PEDOT-PSS nanokompozit mürekkep püskürtmeli baskıya ve lipaz, gliserol kinaz ve gliserol-3-fosfatın birlikte hareketsizleştirilmesine dayanan yeni ve son derece hassas, tek kullanımlık bir amperometrik trigliserit (TG) biyosensör çalışması yapılmıştır. Oksidaz, Mürekkep püskürtmeli baskı ile biriktirilen bir adım kimyasalı olarak sentezlenmiş Au/PEDOT-PSS nanokompozitinin SPCE yüzeyinde nanoçubuk yapılarında olduğu gösterilmiştir. Elektrokimyasal tepkilerin Au nanopartiküller tarafından önemli ölçüde arttırıldığı ve elektrokimyasal tespit için altın nanopartikül oluşumunun optimal hazırlama koşullarının 0,015 M EDOT ve 6,25 mM altın öncüsü olduğu bulunmuştur. Kandaki TG'lerin belirlenmesi için, 5 kat mürekkep püskürtmeli baskılı Au/PEDOT-PSS nanokompozit içeren SPCE elektrotu, 0,1 M sodyum fosfat tampon pH'ı 7,0'da 0,4 V çalışma potansiyeli ile çalıştırıldığında optimum performans sağlamış, geniş dinamik aralık (0-531 mg/dL), orta hassasiyet (2,66 μ A/mM), orta düzeyde yanıt süresi (30 s), düşük algılama sınırı (7,88 mg/dL), düşük parazit, iyi tekrarlanabilirlik ve tatmin edici kullanım ömrü (40 %, 4 °C'de 30 günlük depolamadan sonra % yanıt akımı kaybı) elde edilmiştir. Bu nedenle, SPCE'ler üzerinde mürekkep püskürtmeli baskılı Au/PEDOT-PSS nanokompoziti, TG'lerin belirlenmesi için umut verici bir yöntem olduğu ortaya konulmuştur.

Aidil ve ark., (2021) Altın nanoparçacık fonksiyonelleştirilmiş ekran baskılı elektrot kullanılarak tributirinin elektrokimyasal tespiti başlığı altında bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada yağ içeriği hacmi ve varlığının belirlenmesi gıda güvenliği ve beslenme sağlığı sektöründe büyük rol oynaması göz önünde bulundurulmuştur. Tributirin, gıdalarda sıvı yağ görevi gören trigliserit gruplarından biri olduğundan çalışma bu kimyasal üzerinden yürütülmüştür. Lipaz ile immobilize edilmiş grafen (GPH) ve altın nanopartiküller (GNP) ile

fonksiyonelleştirilmiş ekran baskılı elektrot (SPE) üzerine bir araştırma yapılmıştır. GPH'nin iki boyutlu formu ve GNP'nin üç boyutlu yapısı, enzim immobilizasyonu için uygun bir yüzey oluşturduğu gözönünde bulundurularak GPH/GRP/Lipase/SPE'nin döngüsel voltametri (CV) ölçümü reaksiyon incelenmiş, reaksiyonun varlığı tespiti yapılmıştır. 0,1 mg/ml ila 1000 mg/ml arasındaki tributirin konsantrasyonu aralığı ölçülmüş ve 0,1 mg/ml'lik saptama sınırına ulaşabildiği görülmüştür. GPH/GRP/Lipaz/SPE'nin mevcut yanıtı, oksidasyon zirvesinde 1V noktasının altında alınan tributirin konsantrasyonu ile orantılı olarak alınmış olup bu sonuçlar, GPH/GRP/Lipaz/SPE'yi özellikle trigliserit tespiti alanında kaliteli bir biyoelektrot yapılacağını göstermiştir.

Nirbhaya ve ark., (2021) gıda toksini tespiti için nanoyapılı grafit karbon nitrür bazlı ultrasensing (ultra algılama) elektrokimyasal biyosensör geliştirmişlerdir. Bu çalışmada Gıda toksini (Aflatoxin B1, AfB1) tespiti için tiyonin ile işlevselleştirilmiş grafit karbon nitrür nano tabakalarına dayalı ultrasensing platformunun üretimi ile ilgili çalışmaların sonuçları ortaya konulmuştur. Grafit karbon nitrür nano tabakalarının (g-C3N4) sentezi, melaminin polikondenzasyonu ve ardından kimyasal pulcuklu dökülme ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, g-C3N4'ün (Thn/g-C3N4) işlevselleştirilmesi için tiyonin kullanılmış ve indiyum kalay oksit (ITO) kaplı cam elektrot üzerine elektroforetik olarak bırakılmış, üretilen Thn/g-C3N4/ITO elektrotu, EDC-NHS kimyası ile anti-aflatoxin B1 (anti-AfB1) ile kovalent olarak immobilize edildi, ardından BSA molekülleri kullanılarak spesifik olmayan bölgelerin blokajı yapılmıştır. Sentezlenen nano malzemelerin ve fabrikasyon elektrotların yapısal, morfolojik, fonksiyonel ve elektrokimyasal özelliklerinin analizi için; X-ışını kırınımı, taramalı elektron mikroskobu, transmisyon elektron mikroskobu, Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi, atomik kuvvet mikroskobu ve döngüsel voltametri teknikleri kullanılmıştır. Üretilen biyoalgılama platformunun (BSA/anti-AfB1/Thn/g-C3N4/ITO) elektrokimyasal tepki çalışmaları, döngüsel voltametri tekniği kullanılarak AfB1 antijeninin saptanmasına yönelik gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen elektrokimyasal sonuçlar, $0,328 \text{ fg mL}^{-1}$ alt algılama limiti ile 1 fg mL^{-1} ile 1 ng mL^{-1} arasında lineer algılama aralığı ile $4.85 \text{ } \mu\text{A}$ log olup hassas bir şekilde AfB1'i tespit etme yeteneğine sahip biyoalgılayıcı elektrotun 7 haftaya kadar stabilitesi olduğu tespiti yapılmıştır.

Rakyova ve ark., (2021) sütte tetrasiklinlerin gerçek zamanlı tespiti için elektrokimyasal sensör geliştirmiş olup bu çalışmada inek sütündeki tetrasiklinlerin tespiti için mevcut literatür gözden geçirilmiştir. İlk olarak, süt matrisinin karmaşık yapısı açıklanarak ticari kullanımdaki test stratejileri ana hatlarıyla verilmiştir. Bunu takiben, düşük maliyetli biyosensörler alanında ortaya çıkan biyosensörler, elektrokimyasal biyosensörlere odaklanarak birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Sütteki antimikrobiyal kalıntıları tanımlayan mevcut ticari testler, büyük ölçüde beta-laktam tespiti veya spesifik olmayan mikrobiyal inhibisyon tespiti ile sınırlı ve tetrasiklin kalıntılarına özgü testler daha az yaygın olduğu vurgulanmıştır. Burada, tetrasiklinler için, bu açığı kapatma ve mevcut testlerle bağlantılı, endüstri zorluklarını ele alma potansiyeline sahip, ortaya çıkan bir dizi elektrokimyasal biyosensör algılama stratejisi gözden geçirilmiştir.

Rezvani ve ark., (2017) aktif karbonun sıfır noktası yüküne dayalı trigliserit tributirinin tespiti için amperometrik biyosensöre yönelik çalışma yapmışlardır. Grafit çubuklar aktif karbon (AC) ile modifiye edilmiş ve lipaz immobilizasyonu için destek olarak, Kitosan (CHIT) ise biyoelektrot üzerinde film oluşturmak ve hareketsizleştirilmiş enzimi tutmak için kullanılmıştır. TG saptamasının lineer aralığını genişletmek için AC, AC'nin izoelektrik noktasını geliştirmek için karboksil ve ardından amin grupları (AAC) ile işlevselleştirilmesi yapılmış, oluşturulan grafit/AAC/lipaz/CHIT biyoelektrodu, döngüsel voltametri ve alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) kullanılarak karakterize edilmiştir. Geliştirilen biyosensörün doğruluğu, tampon çözeltisinde farklı tributirin (TB) konsantrasyonlarının belirlenmesi yoluyla değerlendirilerek TB konsantrasyonu için $50 \text{ ila } 350 \text{ mg dL}^{-1}$ aralığında, $9,9 \text{ mg dL}^{-1}$ 'lik bir saptama limiti ile doğrusal tepkiler bulunmuştur. Biyosensör $0,16 \text{ } \mu\text{A mg dL}^{-1}$ 'lik iyi bir

hassasiyet gösterdiğinin tespiti yapılmış, oluşturulan biyosensörün kullanıldığı birkaç insan serum örneğinde saptanan TG seviyesi, otomatik bir biyokimyasal analiz cihazının sonuçlarıyla iyi bir uyum içinde olduğu görülmüştür. Üretilen biyosensörün çoğu insan serum materyalinden etkilenmediği ve güçlü bir parazit önleme yeteneği olduğunu ortaya konulmuştur. Tekrar üretilebilirlik ve tekrarlanabilirlik testlerindeki nispi standart sapmanın sırasıyla %3,46 ve %2,94 olduğu bulunmuştur.

Dhand ve ark., (2010) polianilin/tek duvarlı karbon nanotüpler kompozit bazlı trigliserit biyosensörünü tasarlamışlardır. İndiyum kalay oksit (ITO), cam plaka üzerine elektroforetik olarak kaplanmış PANI-SWCNT kompozit filme dayalı amperometrik trigliserit biyosensör üretilmiştir. LIP ve GDH, EDC NHS kimyası kullanılarak PANI-SWCNT/ITO elektroduna kovalent olarak immobilize edildi. CV ve EIS çalışmaları hızlı şarjı ortaya koymuş, SWCNT, PANI zincirleri arasında iletken köprüler sağladığından ve aynı zamanda şarj atlama merkezleri olarak görev yaptığından, benzer PANI sistemine kıyasla PANI-SWCNT sisteminde taşımanın 2 kat olduğu görülmüştür. Bu geliştirilmiş elektrokimyasal davranış; daha iyi biyolojilama özellikleri elde etmek için enzimlerin biyoelektrokatalitik aktivitesini arttırmak için kullanılmıştır. Elektrokimyasal tepki çalışmaları; NADH (GDH enzimi için kofaktör) ve TB (düşük elektrokimyasal potansiyelde NADH'nin oksidasyonunu katalize eden redoks aracı) varlığında LSV tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tepki çalışmalarının sonuçları, bu biyoelektrodun 50-400 mgdL⁻¹ gibi geniş bir konsantrasyon aralığında tributirini (trigliserit) iyileştirilmiş stabilite (13 hafta) ve düşük K_m^{app} değeri (1,13 mM) ile tespit edebildiğini ortaya koymuştur. Düşük K_m^{app} değeri, bu nanokompozit matris üzerine immobilize edilen enzimlerin tributirine karşı yüksek afinitesini gösteriyor olup 4.28''10 4mAmg 1dL'lik yüksek hassasiyet ve 12 s'lik düşük tepki süresi, PANI-SWCNT matrisinin önemli elektroaktif davranışı nedeniyle elektronların biyokimyasal reaksiyon bölgesinden elektrot yüzeyine hızlı ve kolay transferini ortaya çıkarmıştır. LIP-GDH/PANI-SWCNT TB/ITO biyoelektrotunun serum

örnekleriyle yeniden tepkisi, ticari uygulamalar için biyosensörün geliştirilmesine yönelik etkilerini gösterilmiştir. Lipoproteinler, ürik asit ve troponin vb. dahil olmak üzere diğer biyobelirteçleri saptamada bu verimli kompozit matrisi kullanmak için çalışmaların ve araştırmaların yapılması gerekliliği vurgulanmıştır.

Mondal ve ark., (2017) Triglicerit tespiti için son derece hassas gözenekli karbon ve metal/karbon iletken nanofiber bazlı enzimatik biyosensör geliştirmişlerdir. Bu çalışmada elektro-spinning, bir poliakrilonitril (PAN) ve gümüş nitrat harmanı ve ardından karbonizasyon kullanılarak bir Ag nanoparçacığı (NP) ile emprenye edilmiş, kısmen hizalanmış ve serbest duran karbon nanolifleri (CNF'ler) sentezlemek için kullanılmıştır. PAN/AgNO₃ harmanının pirolizlenmesi nanogözenekli CNF'leri ürettiği ve Ag NP'leri, AgNO₃'ün termal bozunması yoluyla CNF'ler içinde büyütüldüğü, sentezlenen CNF'lerin fiber çapları 130 ila 190 nm arasında değiştiği ve emdirilmiş Ag NP'lerin boyutu ~30 nm olduğu gösterilmiştir. Ag NP'lerin varlığı, Ag NP'lerin şablonlama etkisi yoluyla CNF'lerin elektrik iletkenliğini arttırdığı ve grafitizasyonunu desteklediği ortaya konulmuştur. Sentezlenen bu CNF'ler ve AgCNF'ler nanokompoziti, triglicerit moleküllerinin tespiti için indiyum kalay oksit elektrotları üzerine elektroforetik olarak yerleştirilmiştir. CNF'lerin ve AgCNF'lerin yüzeylerinin oksijen plazma işlemi, lipaz ve gliserol dehidrojenaz bienzimlerinin daha fazla yüklenmesiyle sonuçlanan AgCNF nanokompoziti, elektrokimyasal empedans spektroskopisi ve döngüsel voltametri çalışmaları ile desteklendiği gibi, CNF'lerden daha hızlı elektron transferi sergilediği bulunmuştur. Bir nanogözenekli CNF yüzeyinde 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid/N-hidroksisüksinimit birleştirme kimyası yoluyla kovalent işlevselleştirme, fabrikasyon biyosensörün triglicerit saptamasına karşı daha yüksek stabiliteye ulaştığı görülmüştür. Duyarlılığın geniş bir algılama aralığında (25-500 mg dL⁻¹) olduğu görülmüştür. Bu biyosensörlerle yapılan çalışmalarda mükemmel seçicilik, iyi tekrarlanabilirlik ve daha hızlı tepki (10 s)ler olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, AgNP'lerin dahil edilmesiyle nanogözenekli CNF'lerin geliştirilmiş grafitizasyonu ve elektriksel iletkenliği, triglicerit (TG)

biyomoleküllerinin tespiti için çalışma olacağı ve araştırmalarının yapılması sonuç olarak verilmiştir.





3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyaller

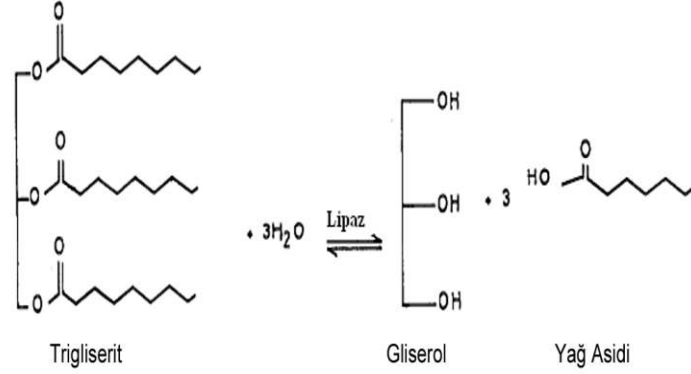
Bu çalışmada, lipaz bazlı bir enzim biyosensörü kullanarak çözelti fazındaki trigliserit miktarını ölçmeye çalışılmıştır. Bu bölümde genel olarak sarf malzemeleri, biyosensör yapma yöntemi ve test yöntemi tanıtılmaktadır. Araştırmada kullanılan kimyasallar, araç ve gereçler şunlardır:

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Marka
Aliminyum Klorür	Merck
Aseton	Merck
Asetonitril	Sigma Aldrich
Tetra Butil Amonyum Hekza Floro Fosfat	Aldrich
Lipaz Enzimi	Sigma Aldrich
Gluteraldehit	Sigma Aldrich
Trigliserit	Kale Kimya
Triton X100	Merck
Sodyum Klorür	Merck
Potasyum Klorür	Merck
Disodyum Hidrojen Fosfat	Merck
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Merck
Potasyum Ferri Siyanür	Merck
Sodyum Hidroksit	Merck
Sitrik Asit	Merck
Tiyofen	Merck
Lityum Perklorat	Aldrich

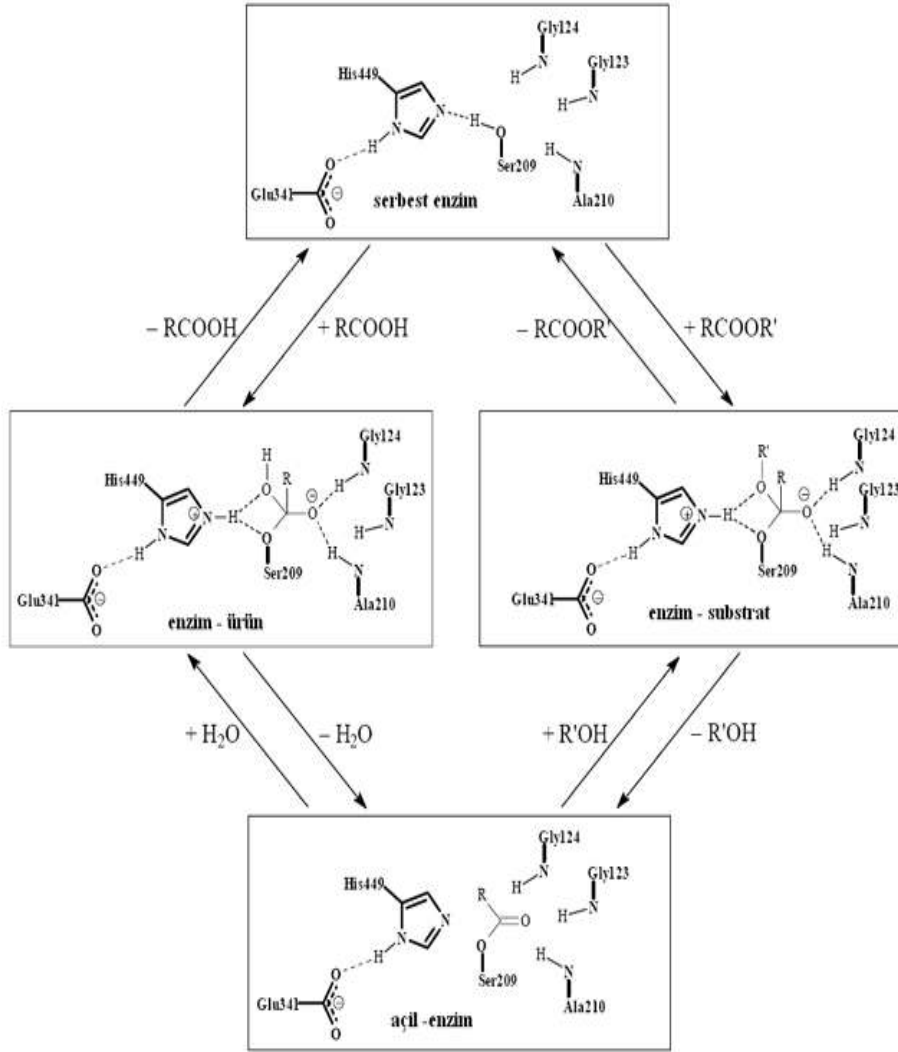
Enzim: Canlıların yapısında bulunan organik bileşikler olup aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını arttıran biyolojik katalizörlerdir. Bu çalışmada

Lipaz enzimi kullanılmıştır. Lipaz enzimi ve substratı olan trigliseritin reaksiyon mekanizması aşağıda verilmiştir;



Şekil 3.1. Lipaz ile trigliserit hidroliz reaksiyonu.

Ayrıca lipazlar sübstratlarla etkileşir ve bu etkileşim iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta enzim-açıl yapısı oluşurken ikinci basamakta ise birinci basamakta oluşan enzim-açıl yapısının hidrolizi olmaktadır. Birinci basamakta aktif bölgedeki oksijen atomları ekşi yüklenerek zincirdeki iki tane NH grubunun kararlı yapıya ulaşması sağlanır. İkinci basamakta ise oluşan oluşan kalıntılar nükleofilik su molekülünü aktif hale getirir bu nedenle reaksiyon ikinci basamakla devam eder. Asit yapıdaki ürün ortamdaki serbest hale geçer.



Şekil 3.2. Lipazın katalizleme reaksiyonu.

Çalışma Elektrodu: Altın elektrot elektrot içeriği %99,99 altın. Altın nanotaneçiklerin mükemmel elektrik iletkenliklerinden dolayı çalışma elektrodu olarak seçilmiştir.

Referans Elektrod: Ag/AgCl referans elektrot

Karşı Elektrot: 1 cm² Platin Levha, kimyasal bileşimi: %100 platin. Bu çalışmada platin elektrot kullanılmasının nedeni; yüksek iletkenlik, aşınmaya(korozyon) ve deformasyona dayanıklılıktır.

Elektrokimyasal Analiz Cihazı (CHI 660 C): Döngüsel voltametri yöntemi yardımıyla elektrokimyasal olarak enzimlerin elektrot yüzeyine oturtulması için kullanılmıştır.

Manyetik Karıştırıcı: Çözeltileri karıştırmak için kullanıldı.

pH-Metre: Çözeltilerin pH'ını ölçmek için kullanıldı.

Analitik terazi: Çözelti hazırlamada kimyasal maddelerin tartılması için, 0,1 mg'a duyarlı analitik terazi kullanıldı

Ultrasonik banyo: Çözeltileri hazırlarken, çözünenin çözünme hızını arttırmak için kullanıldı.

Dijital termometre: Çözeltilerin sıcaklıklarını ölçmek amacıyla kullanıldı

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM): Hazırlanan tüm çalışma elektrotların yüzey morfolojisinin incelenmesinde kullanıldı.

3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

3.2.1. PBS (Fosfat Buffer Solusyonu) hazırlanması

PBS çözeltisi 8 gr Sodyum Klorür, 0,2 gr Potasyum Klorür, 1,44 gram Disodyum Hidrojen Fosfat ve 0,245 gr Potasyum Dihidrojen Fosfat tartılarak 1000 ml hacme saf suyla tamamlanarak yapılmıştır. Bu çözeltinin elektron alışverişini kolay yapması için içine konsantrasyonu 5 milimolar olacak şekilde Potasyum Ferro Siyanür eklendi. Çözeltinin pH sı Sodyum Hidroksit (0,1 N) ve Sitrik Asit (0,1 M) yardımıyla 7,4 olacak şekilde ayarlandı

3.2.2. Glutaraldehit

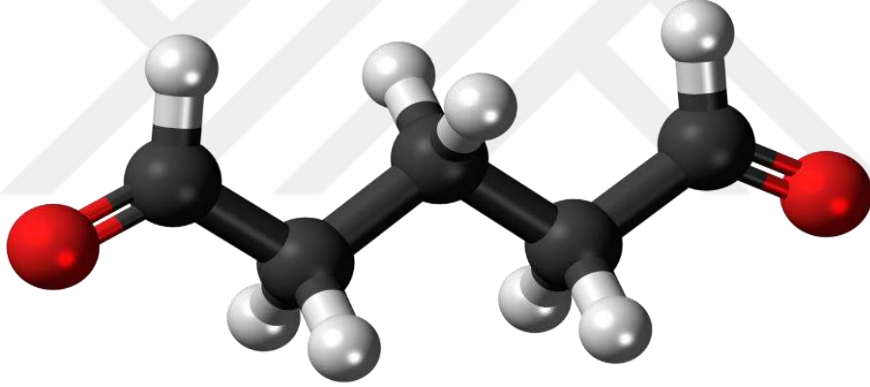
Glutaraldehit, dezenfektan, ilaç, koruyucu ve sabitleyici olarak kullanılan renksiz, yağlı, kötü kokulu bir sıvıdır. Glutaraldehit, diyaliz aletleri, bronkoskoplar, endoskoplar ve boğaz, kulak ve burun ekipmanları gibi ısıya duyarlı ekipmanları

dezenfekte etmek ve temizlemek için kullanılan soğuk bir sterilizatördür. Glutaraldehit, yüksek dezenfektan özelliklerine sahiptir ve sporlar da dahil olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalar üzerinde etkilidir.

Bu kimyasal histoloji ve patoloji laboratuvarlarında doku sabitleyici ve radyografik görüntülemeye sertleştirici ajan olarak kullanılır.

Glutaraldehit, biyomalzemelerin stabilizasyonundaki etkinliği nedeniyle en yaygın kullanılan çapraz bağlama maddesidir ve kolay erişilebilir, ekonomiktir ve sulu çözeltileri, kolajen dokuları etkin bir şekilde çapraz bağlayabilir.

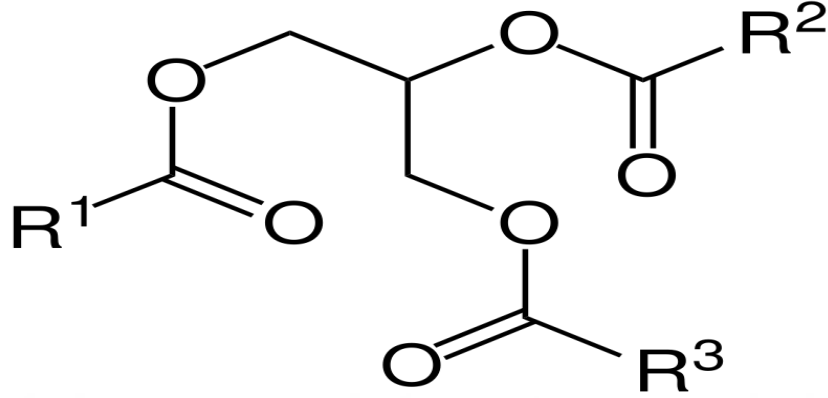
Bu çalışmada Glutaraldehitin %25 lik çözeltisi çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Bunun için elektrotlar hazırlandıktan sonra 1 damla gluteraldehit elektrot yüzeyine damlatılmış olup ve kuruması için bir gün bekletilmiştir.



Şekil 3.3. Glutaraldehitin yapısı.

3.2.3. Triglicerit Emülsiyonunun hazırlanması

Çözeltiyi hazırlamak için 0,5 g trigiliserit ve 0,4 g Triton X-100 emülsifiyer olarak 10 ml saf suya ilave edilmiş olup, sonra çözeltinin sıcaklığı 60 °C ye çıkarılıp, hacim ise saf suyla 50 ml'ye tamamlanmış olup buz dolabında bekletilmiştir. Trigiliseritin yapısı Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.4. Trigliserit yapısı.

3.2.4 Elektrolit çözeltisinin hazırlanması

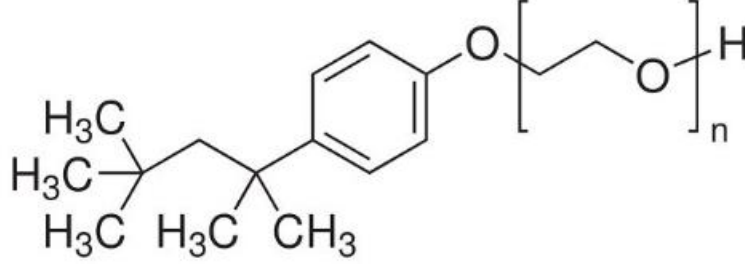
Tüm denemeler sıvı fazında yapılmış olup ve kullanılan elektrolit potasyum fosfat tamponu (PBS, 50mM) idir. Tamponda 5mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ eklenmiştir ve biyolojik ortamı simüle etmek için pH, 7,4 olarak ayarlanmıştır.

3.2.5 Deneyde Kullanılan Kontrollü örneklerin hazırlanması

Deneyde kullanılan örnekler; lokal bir tedarikçinin formül çatısı kullanılarak hazırlanan, Otomatik makinalarda çamaşırları temizleme amaçlı yıkama yapmak için kullanılan Sıvı Çamaşır deterjanlarıdır. Bu Sıvı çamaşır deterjanları laboratuvarında kontrollü olarak hazırlanmış olup %0,0, %1,0, %1,5, %2,0 ve %2,5 oranlarında Lipaz enzimi ihtiva edecek şekilde tasarlanmıştır. Bu örnekler hazırlanırken Sigma Lipaz enzimi (Sigma, Lipase Ec 3.1.2.3, Type VII) kullanılmıştır.

3.2.6 Triton X-100

Hidrofilik bir polietilen oksit zincirine ve bir aromatik hidrokarbon lipofilik ya da hidrofobik gruba sahipiyonik olmayan yüzey aktif bir madde olup bu çalışmada emülsifiyer olarak kullanılmıştır. Viskoz ve berrak bir sıvı olup çözücü olarak çok fazla kullanım alanı bulmaktadır.



Şekil 3.5. Triton X-100 yapısı.

Görünür Michaelis-Menten sabitinin hesaplanması

Bir enzimatik reaksiyonda, enzim-substrat kinetiği, Michaelis-Menten denklemi ile tahmin edilebilir. Kinetik basitçe şu şekilde tanımlanır:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K + S}$$

Bu denklemi bir enzimatik biyosensör için modelleyerek, bu denklem bir yenileme olarak yeniden yazılabilir:

$$i = \frac{i_{\max} C}{K_m + C}$$

Yukarıdaki denklemde i , akım pikinin miktarı, $i_{\max}$, en yüksek akım analit ile doymuş şartlarda, C analitin derişimi ve K_m Michaelis-Menten sabiti olarak işleme alınmıştır.

Bu denklemi ters çevirdiğinde Linveir-Berck denklemi elde edilir:

$$\frac{1}{i} = \frac{K_m}{i_{\max} C} + \frac{1}{i_{\max}}$$

Enzimatik biyosensör için, görünen Michaelis-Menten sabiti, döngüsel voltametrik akımın tepe tepkisini analit konsantrasyonu ile ters çevirerek ve diyagramın başlangıcından çizgi eğimi ve genişliği kullanılarak hesaplanır. Elde

edilen deęer ne kadar dūřukse, enzim istenen analite o kadar fazla eęilim gōsterecektir.

3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

3.3.1 Taramalı elektron mikroskobu

Alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FEI, Quanta 650 Field Emission SEM) Çukurova Üniversitesi Merkez Araştırma Enstitüsü'nde, üretilen biyoelektrot yüzeyinin morfolojisini incelemek için kullanıldı. Yediyzbin kat büyütmeli bu mikroskop, nanometre ölçeğinde yüzey araştırmalarına olanak tanır. Yüksek büyütme aralığı ve iyi çözünürlük, yüksek görüntü alan derinliği gibi avantajlara sahip bir taramalı elektron mikroskobu, yüzey topografyasının çalışmasına izin vermektedir.

3.3.2. Döngüsel voltammetri yöntemiyle elektropolimerizasyon

Bu projede, biyosensörün performansını değerlendirmek için, statik çözeltiye daldırılmış bir elektrotta ğgen bir potansiyel uygulayan ve daha sonra ortaya çıkan akımı potansiyel değişiklikler açısından kaydeden bir döngüsel voltametri tekniği kullanılmıştır. ğgen potansiyel yöntemi genellikle başlangıç (E_i), dönüş (E_s), son (E) potansiyelleri ve belirli tarama hızı ($V.sec^{-1}$) ile gerçekleştirilir. Zamanın bir fonksiyonu olarak uygulanan potansiyeli aşağıdaki gibidir.

$$E = E_i + vt$$

gidiş döngüsü için

$$E = E_s - vt$$

dönüş döngüsü için

Bu araştırmada voltametrik deneyler için referans elektrot olarak gümüş/gümüş klorür elektrot, yardımcı elektrot olarak platin elektrot ve çalışma elektrotu olarak modifiye altın elektrot olmak üzere üç elektrotlu bir sistem kullanan model 660C CHI potansiyostat/galvanostat cihazı kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada; Tiyofen, Gluteraldehit ve Lipaz enzimi ile oluşturulan biyosensörün çalışma örneklerindeki trigliserit miktarı azalması ile Lipaz enzimi varlığı ve konsantrasyonu incelenmiştir. Çalışmada üç elektrot tekniği kullanılarak, Döngüsel Voltametri yardımıyla Voltomogramlar elde edilmiştir. Çalışmada biyosensör oluşturulurken çalışma elektrodu olarak Altın, Karşı elektrot olarak Platin elektrot ve pH elektrot kombinasyonu kullanılmıştır. Altın çalışma elektrot yüzeyinde; Tiyofen kaplaması, tiyofen + enzim Kaplaması, Tiyofen + Enzim + Gluteraldehit yapıları oluşturulmuş ve bu yüzeyler SEM görüntüleriyle incelenmiştir. Elde edilmiş sonuçlarla Konsanstrasyon değişimlerine bağlı olarak sitokiyometrik hesaplamalar yapılmış, Trigliserit değişimleri ile Lipaz aktivitesi ve Konsantrasyonu belirlenmiştir.

Bu çalışmadaki sonuçlar özellikle deterjan sektöründe çalışan firmalarda ileri düzey enzim analizlerine ışık tutacak olup gelişen piyasa koşullarını takip ederek formülüzasyon kontrolleri, enzim derişimleri kolaylıkla firmalar tarafından tespit edilebilecektir. Ayrıca firmalarda kullanılan patentli ve içerik bilgisi paylaşılmayan mix enzimlerin yapısındaki miktarsal enzim ve ilgili enzim varlığı tespiti analizleri yapılabilecek olup yeni karışım enzim formülasyonlarında kullanıcılara destek olacaktır.

4.1 Tiyofenin Elektropolimerizasyonu ve Altın Elektrot Yüzeyine Tutturulması

Çalışmanın esasını Altın elektrot yüzeyine Gluteraldehit çapraz bağlayıcı ile Lipaz enziminin immobilizasyonu oluşturmaktadır.

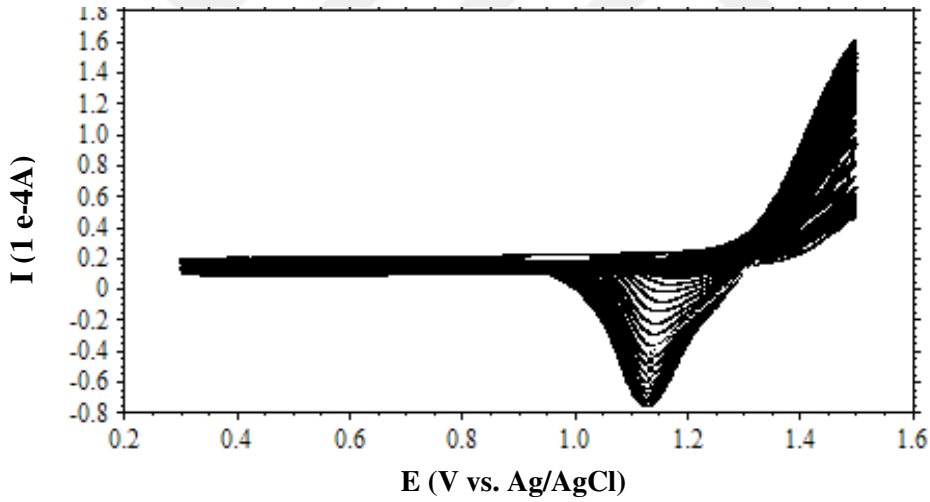
Şekil 4.1 de verilen grafik; 660C CHI potansiyostat cihazı ile altın elektrot yüzeyine Elektropolimerizasyon yöntemiyle Tiyofen monomerlerinin polimerleştirilerek oturtulması sırasında 80 sweep (döngü) kullanılmıştır. 80 döngü sonrasında Altın elektrot yüzeyinde siyah görüntüde tiyofen polimerleri

gözlemlenmiştir. Yine şekil 4.3 de altın yüzeye oturtulmuş tiyofen polimerlerinin SEM görüntüsü verilmiştir

1,1V civarlarında Tiyofen monomerleri Altın elektrot yüzeyinde polimerize olur, her döngü sonrasında (Şekil 4.1) de grafikte akım artışı izlemesiyle konsantrasyonun arttığı görülmektedir.

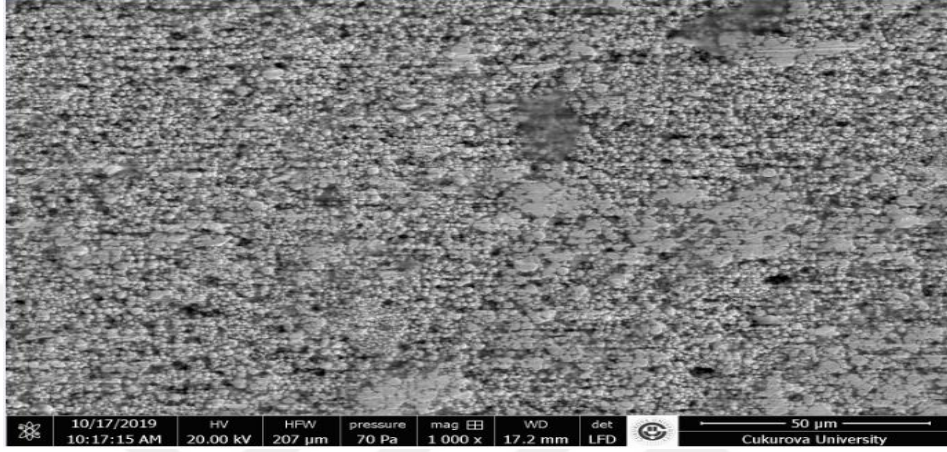
Her döngü sonrasında ince tabaka şeklinde altın elektrot yüzeyine tiyofen monomerleri, tiyofen polimerleri olarak oturmaktadır bu nedenle bir sonraki döngüde hem yeni polimerlerin oluşması hemde önceki oturmuş ince tabakadaki polimerlerin indirgeme tepkimesinden dolayı akım artışı görülmüştür.

Bu polimerizasyon işlemi geri dönüştürülemez bir reaksiyon olduğu için anodik döngüde indirgemeye karşı gelen oksidasyon pikleri grafik üzerinde gözükmemektedir.



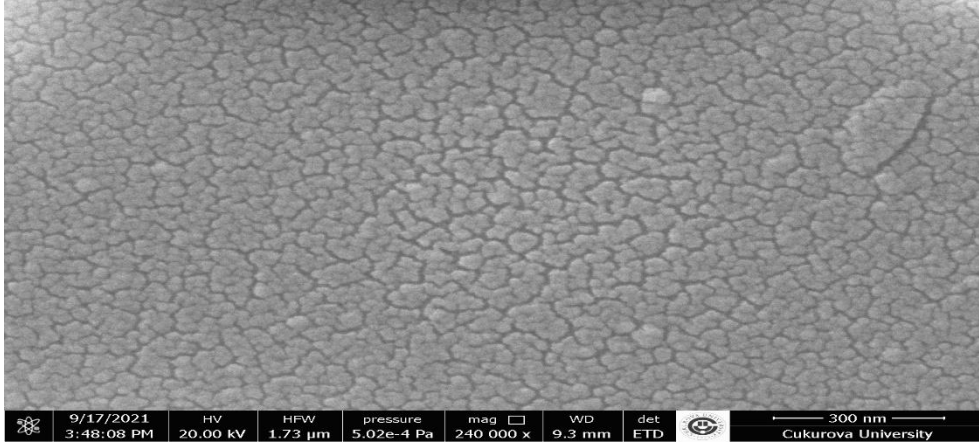
Şekil 4.1. Tiyofen monomerlerinin döngüsel voltametri ile elektropolimerizasyon voltamogramı (I-E).

Şekil 4.2’de Elektropolimerizasyon işlemi uygulanmamış altın elektrot yüzeyinin SEM görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Tek kullanımlık altın elektrot yüzeyinin SEM görüntüsü (1000x çözünürlük).

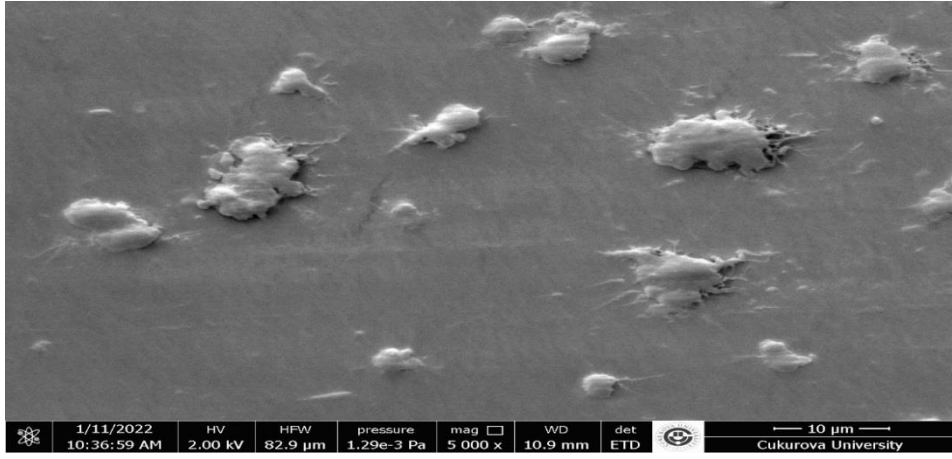
Şekil 4.3’ de Elektropolimerize olmuş Tiyofenin altın elektrot yüzeyine tutturulması sonrası SEM görüntüsünü gösterilmektedir. Polimerin tam homejen olarak altın yüzeyine oturduğu görülmektedir.



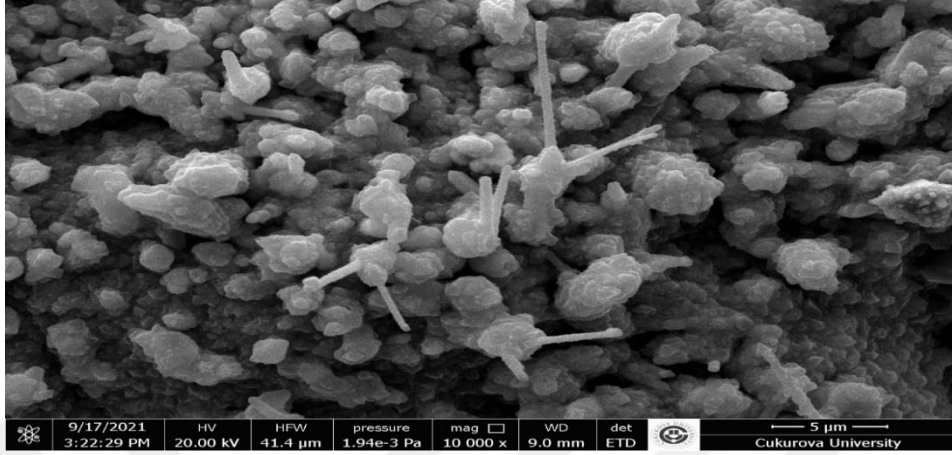
Şekil 4.3. Elektropolimerize tiyofenin SEM görüntüsü (240.000 x çözünürlük).

4.1.1. Tiyofen Polimerleri ile Kaplanmış Altın Elektrot Yüzeyine Lipaz Enzimi Tutturulması ve Gluteraldehit ile Çapraz Bağlama Yapılması

660C CHI Potansiyostat cihazı ile altın elektrot yüzeyine Elektropolimerizasyon yöntemiyle tiyofen monomerleri tiyofen polimerleri olarak oturtulduktan sonra 1 gün boyunca kurumaya bırakılmıştır. Tam kuruma işlemi gerçekleşen elektrot yüzeyine Lipaz enzimi (Sigma, Lipase Ec 3.1.2.3, Type VII) yüzeyi tamamen kaplayacak miktarda damlatılmıştır. Enzimin tiyofen polimer yüzeyinde tam tutunmasının sağlanması için 1 gün kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi gerçekleştikten sonra Tiyofen polimerleri üzerine tutturulan Lipaz (Şekil 4.4) enzimiyle çapraz bağlanma yapacak olan gluteraldehit kimyasalı Çapraz bağlama yaparak immobilizasyon işlemi yapılabilmesi için damlatılmıştır. Gluteraldehitin yüzeyde tam kuruması için 1 gün beklenildikten sonra elektrot çalışma elektrodu olarak kullanıma hazır hale getirilmiştir (Şekil 4.5). Her aşamaya ait SEM görüntülerinde Şekil 4.4 ve Şekil 4.5 da verildiği gibi homojenizasyon görülmektedir.



Şekil 4.4. Elektropolimerize tiyofen + Lipaz Enzimi SEM görüntüsü (5000x çözünürlük).

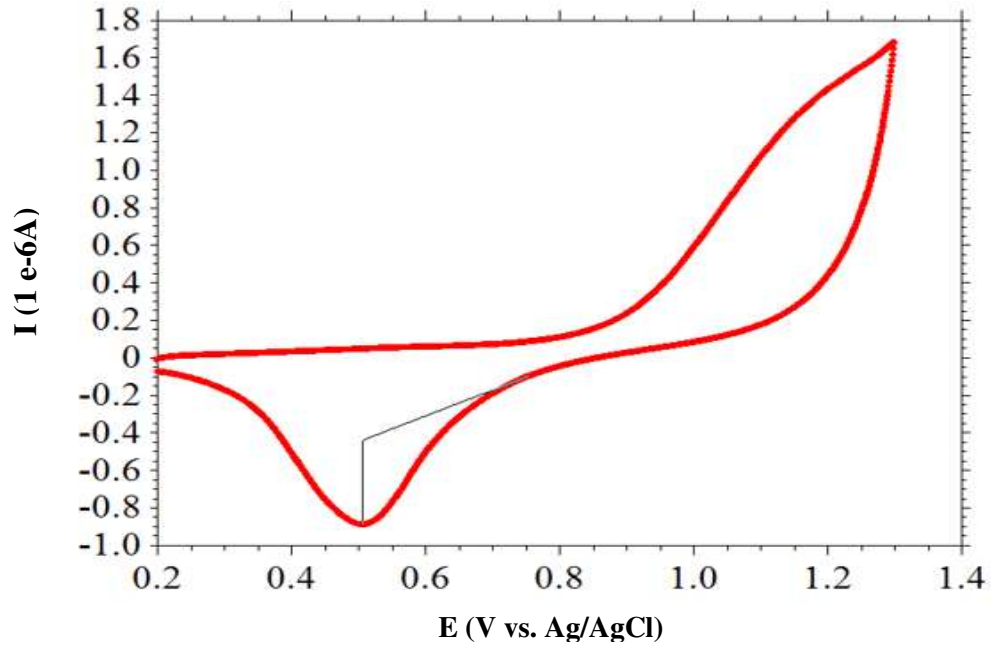


Şekil 4.5.Elektropolimerize tiyofen + Lipaz Enzimi+Gluteraldehit SEM görüntüsü (10.000x çözünürlük).

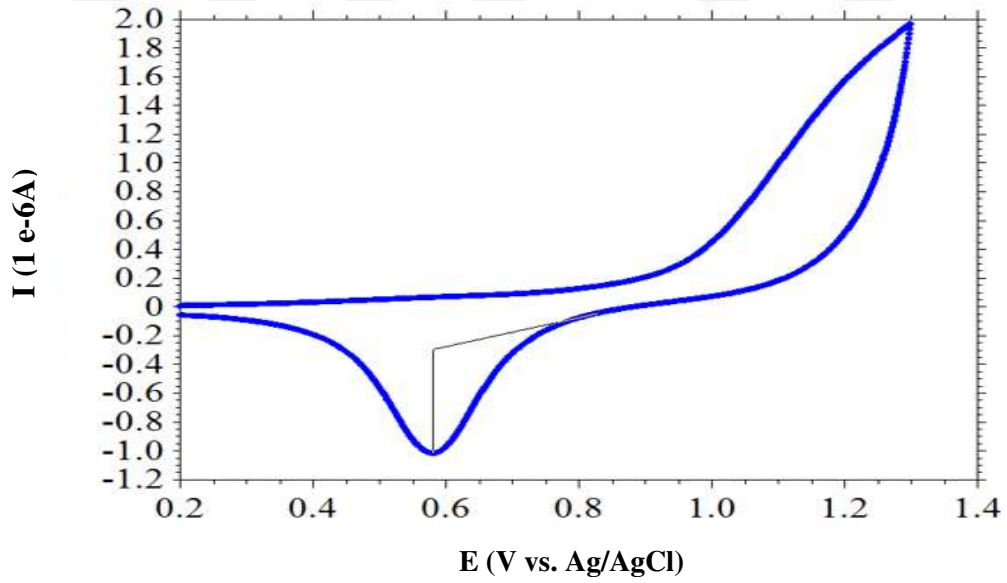
4.2 Lipaz enziminin kontrollü numunelerde tayini

Burada Sıvı çamaşır deterjanında kullanılan Lipaz enziminin farklı konsantrasyonlarda Döngüsel Voltametri yöntemiyle Voltomogramları elde edilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.6-4.11).

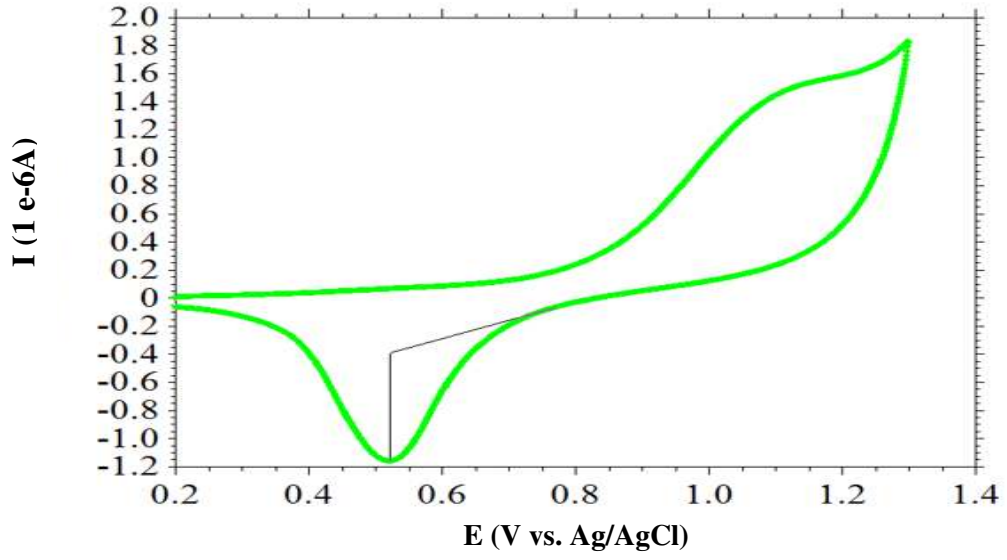
Yöntemde Trigliseriti çözmek için kontrollü olarak hazırlanan numuneler kullanılmış olup deneyde trigliserit ve sıvı çamaşır deterjanı 1:1 oranında kullanılmıştır.



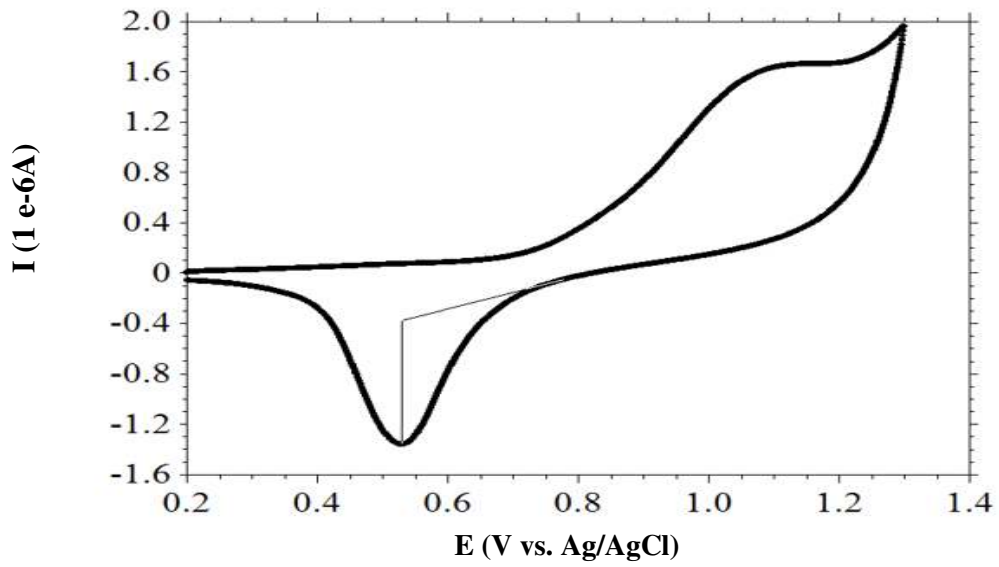
Şekil 4.6. %0,0 Lipaz enzimi içeren Sıvı Deterjanın Döngüsel Voltametri voltamogramı (I-E).



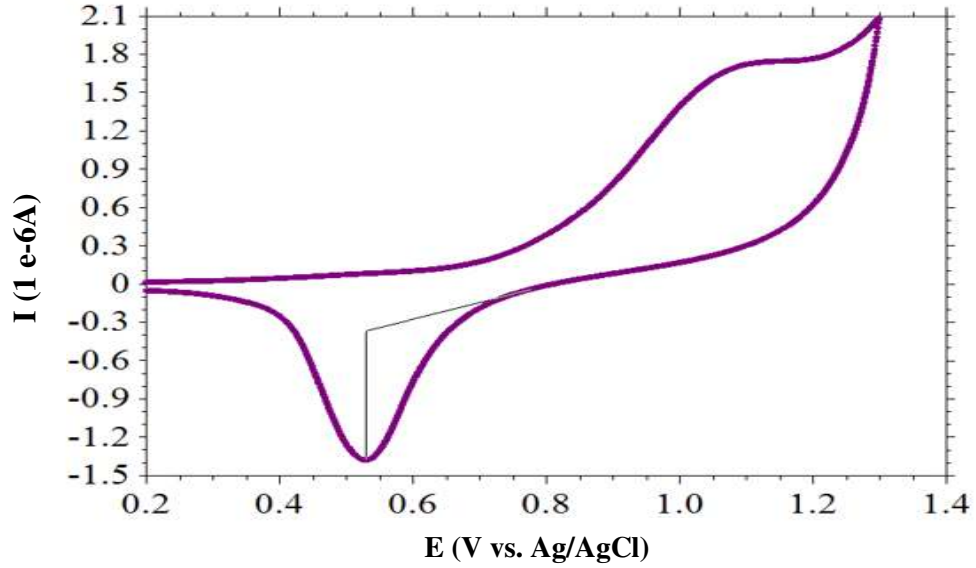
Şekil 4.7. %1,0 Lipaz enzimi içeren Sıvı Deterjanın Döngüsel Voltametri Voltamogramı (I-E).



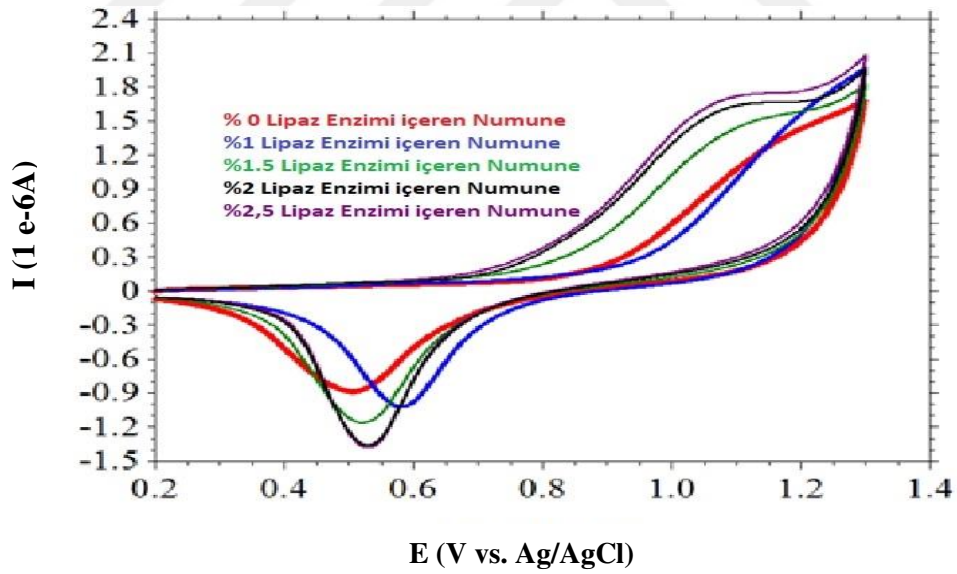
Şekil 4.8. %1,5 Lipaz enzimi içeren Sıvı Deterjanın Döngüsel Voltametri voltamogramı (I-E).



Şekil 4.9. %2,0 Lipaz enzimi içeren Sıvı Deterjanın Döngüsel Voltametri voltamogramı (I-E).

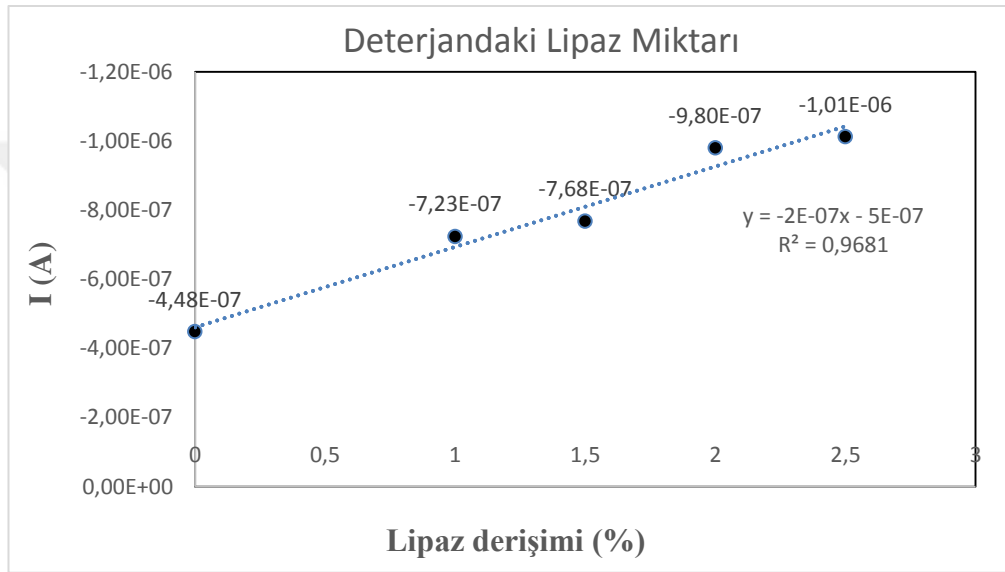


Şekil 4.10. %2,5 Lipaz enzimi içeren Sıvı Deterjanın Döngüsel Voltametri voltamogramı (I-E).



Şekil 4.11. Farklı Lipaz enzimi derişimlerine sahip Sıvı Deterjanların çakıştırılmış voltamogramı (I-E).

Döngüsel Voltametri yöntemiyle alınan voltammogramlarda pik akım sonuçları ile kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.12). Grafikte enzimin miktarı ile akımın doğrusal bağlantısı olduğu görülmektedir. Bu doğrusallık R^2 den görülmektedir. Sonuç olarak bu metot kullanılarak içeriği bilinmeyen numunelerde Lipaz enzim varlığı ve miktarı tayini yapılabilir.



Şekil 4.12. Farklı Lipaz enzimi derişimlerine sahip sıvı deterjanların kalibrasyon eğrisi (I-% derişim).

4.3. Elektropolimerize edikasırtılmış Tiyofenin Karakterizasyonu

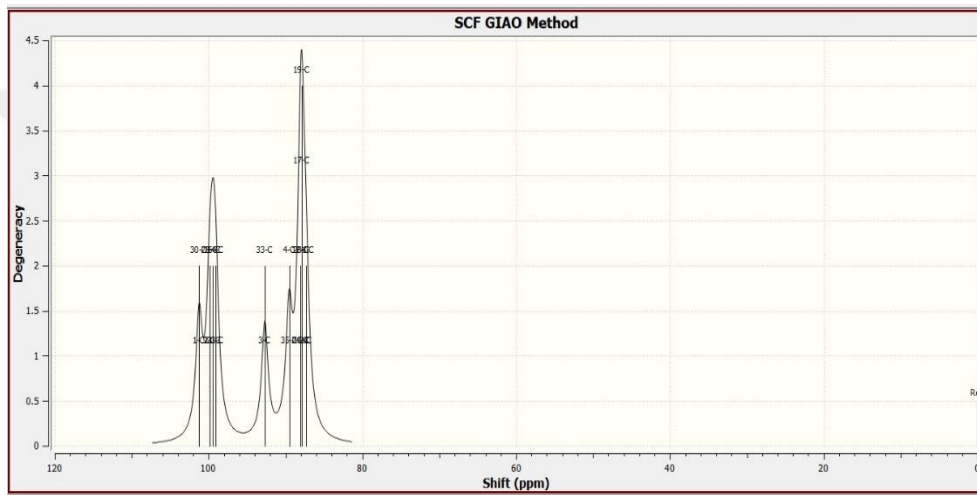
Karakterizasyon işlemleri için Gaussian 09W ve ara yüzey için Gauss View 6 ile yoğunluk fonksiyonel metodu DFT/ B3LYP ve 3-21G temel seti kullanılmıştır. Diffüzyon ve orbital girişimleri ihmal edilmiştir

C-NMR grafiği yorumlamasında Tiyofen polimerinde bulunan 2 çeşit karbon piki incelenir. Bu karbonlardan biri Tiyofen halkasında bulunan C-C bağlı karbon olup diğeri ise C-S bağlı karbonlardır. Her iki bağ yapmış karbonlar SP^2 hibritleşmeşi yapmış olup ikiside 100-150 ppm de pik vermektedir. Grafiğe bakıldığında C-C bağı yapan karbonlar 100 ppm civarında pik vermiş olup C-S

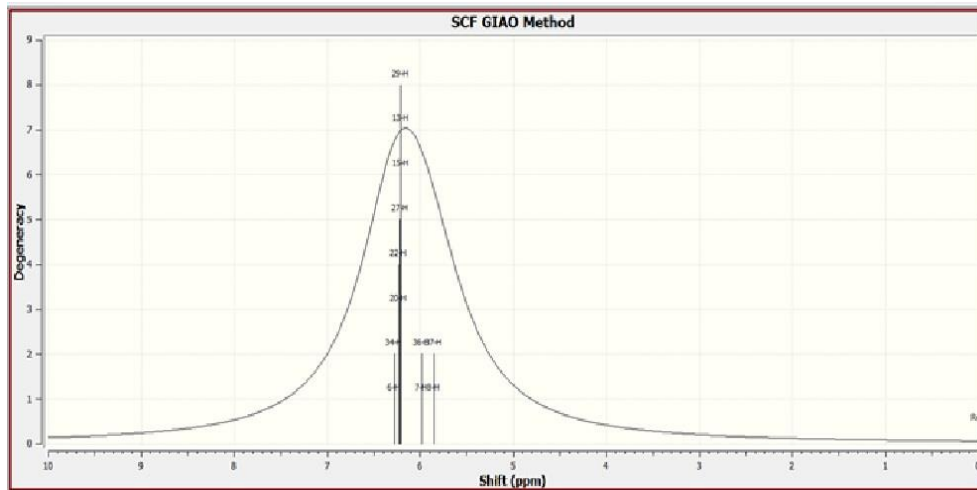
bağı yapan karbonlar 89 ppm de pik vermiştir. Bu düşüş ise kükürtteki (S) serbest elektronların etkisiyle olduğu görülmektedir (Şekil 4.13).

H-NMR da Vinil karbonlarına bağlı hidrojenler 4,5-6,5 ppm de pik vermektedir. Grafiğe bakıldığında 6,2 ppm de tiyofen polimeri halkasındaki Vinil Karbonlarına bağlı hidrojenler pik vermiştir (Şekil 4.14).

C-NMR ve H-NMR doğrulamaları grafiklerde verilmektedir.



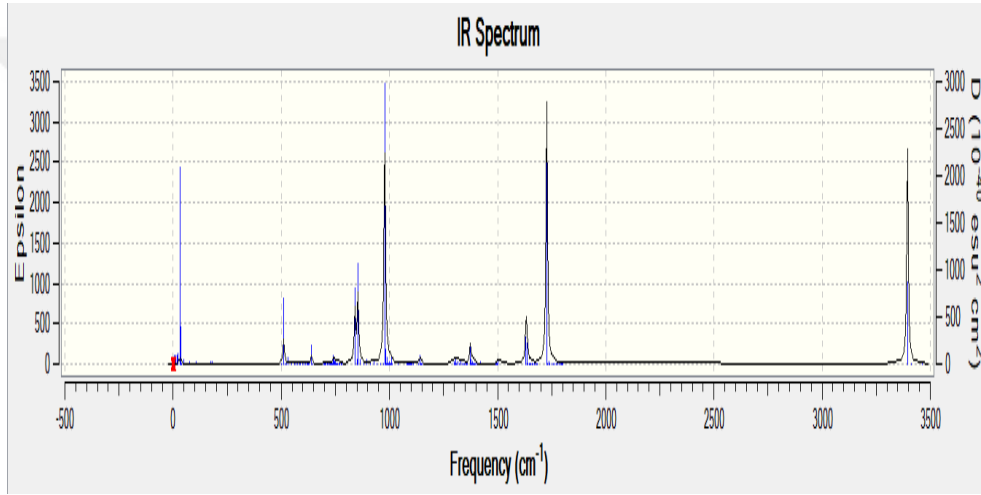
Şekil 4.13. Tiyofen Polimerinin ^{13}C NMR spekturumu.



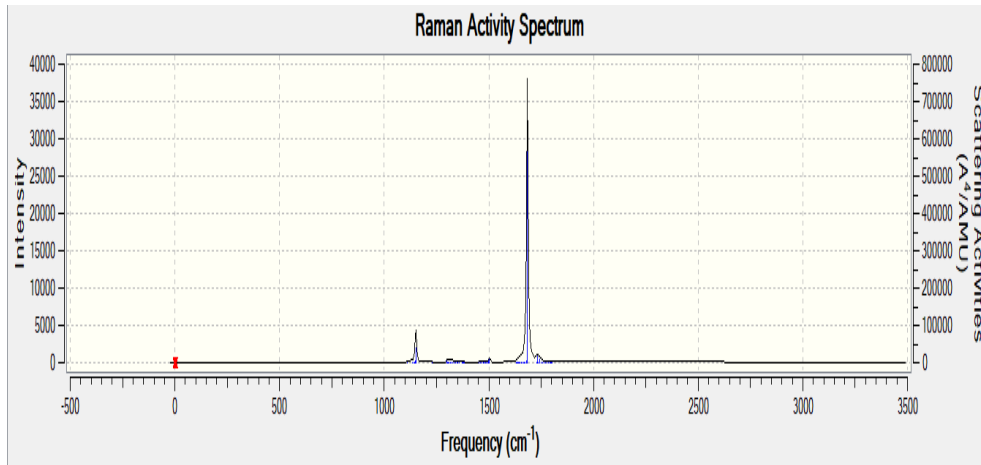
Şekil 4.14. Tiyofen Polimerinin ^1H NMR spekturumu.

Tiyofen polimerinde FT-IR spektrumu incelendiğinde; 1033-1058 cm^{-1} piki C—H sayfa yönündeki bağı titreşimini, 1440-1490 cm^{-1} piki tiyofen halkasının esnemesini, 1630 cm^{-1} piki tiyofen polimerindeki C=C çift bağı göstermektedir (Şekil 4.15).

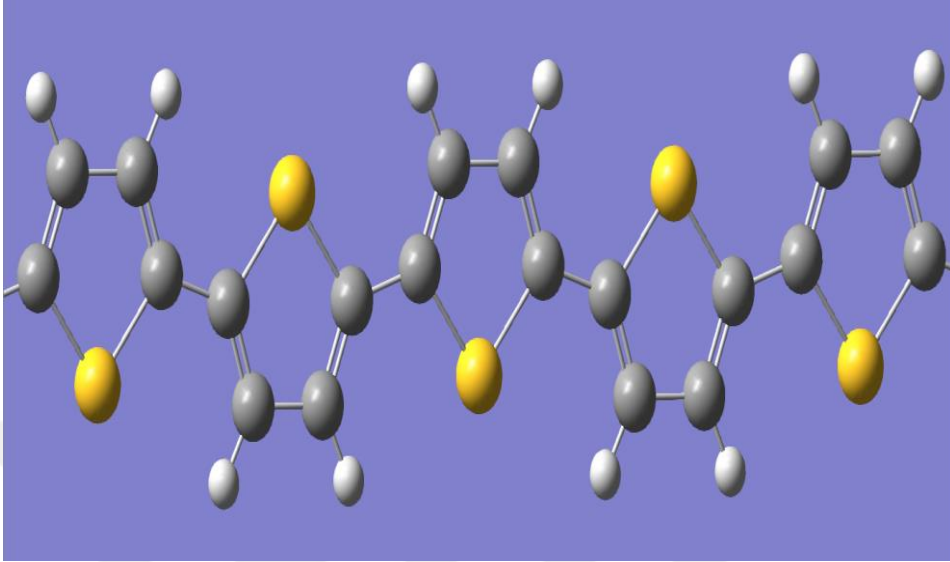
Tiyofen polimerinde Raman spektrumu incelendiğinde; 1100-1200 cm^{-1} piki C—H bükülmesini, 1600-1700 cm^{-1} piki tiyofen halkasının C=C çift bağı göstermektedir (Şekil 4.16).



Şekil 4.15. Tiyofen Polimerinin FT-IR spekturumu.

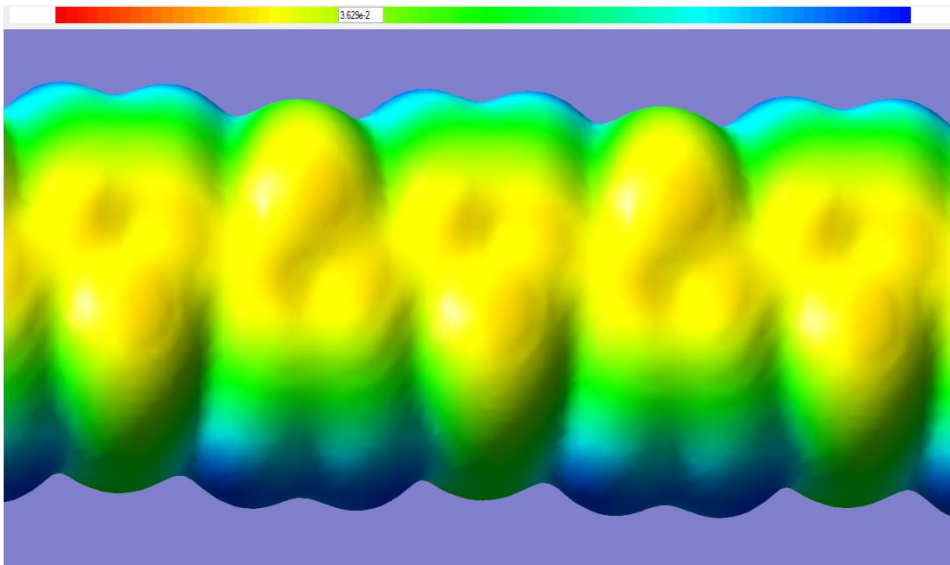


Şekil 4.16. Tiyofen Polimerinin Raman spektroskopisi.

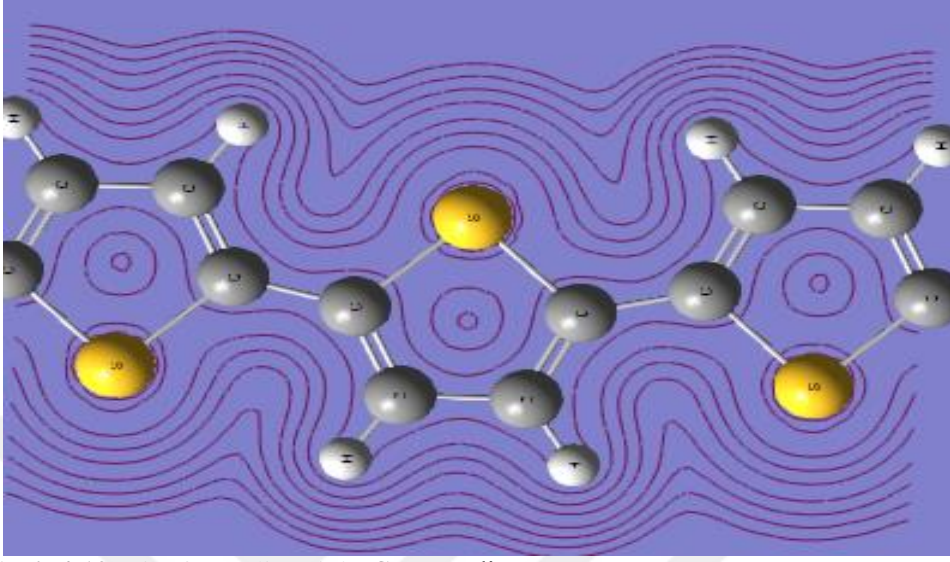


Şekil 4.17. Tiyofen Polimerinin Sterik Optimizasyonu.

Sterik optimizasyonda Tiyofen molekülünün en uygun uzaysal dizilimi hesaplanmıştır. Burada olası sterik etkiler ihmal edilmiş olup en uygun konfigürasyon Şekil 4.17’ de konfigüre edilmiştir.



Şekil 4.18. Tiyofen Polimerinin MEP (Molecular Electrostatic Potential) Haritası.



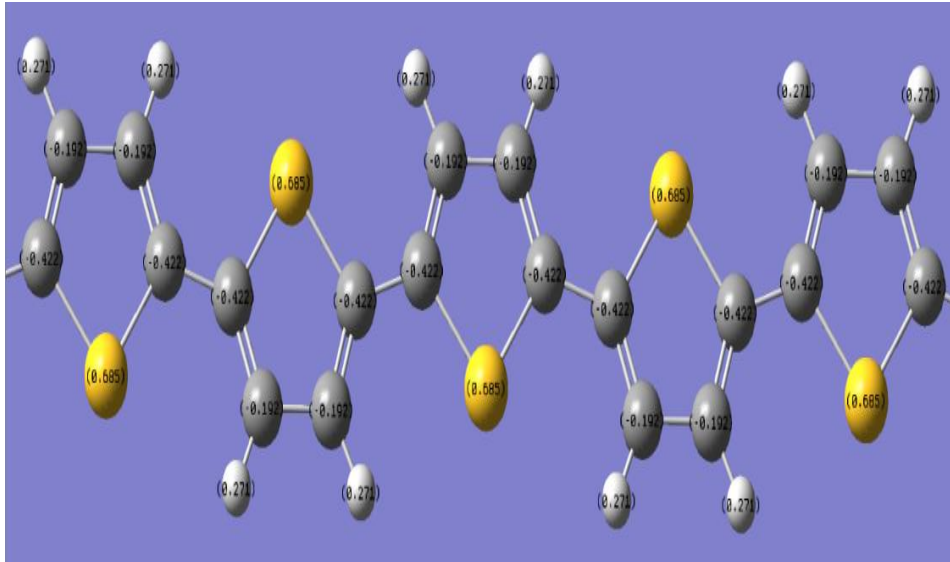
Şekil 4.19. Tiyofen Polimerinin Counter diagramı.

Moleküler elektrostatik potansiyel (MEP); haritaları moleküllerin yapısını belirmede çok kullanışlı üç boyutlu diyagramlardır. Moleküler yükler ve bu yüklerin dağılımını görünür hale getirilmesini ve görselleştirilmesini sağlamakta, molekülün boyutu ile şeklini anlamamızda yardımcı olmaktadır. Ayrıca organik kimyada karmaşık moleküllerin davranışını ve molekülün çevre kimyasını tahmin etmede büyük rol oynamaktadır. MEP haritası oluşturmak için bazı verilere ihtiyaç duyulmaktadır bu ihtiyaçlar yapıyı anlamak için moleküllerin çekirdekten belirli bir uzaklıktaki elektrostatik potansiyel enerjisi hesaplamakla başlayıp belirli konumlardaki yüklerin, çekirdeklerin ve elektronların gücünün ölçülmesiyle sonlanır. Tüm bu veri setleri Schrödinger denkleminde türetilen elektron yoğunluğu modeliyle korele edilerek bilgisayar programı aracılığıyla MEP haritaları oluşturulur. Bu MEP haritalarında verileri anlamlandırmak ve anlaşılır hale getirebilmek için düşük potansiyel enerjiler için kırmızı renkler yüksek potansiyel enerjiler için mavi renkler kullanılır, böylece renklendirme ile elektron yoğunluğu kodlanmış olur. Moleküllerdeki elektron yoğunluğu bölgesi; bir moleküldeki elektron yoğunluğunun verebileceği yaklaşık en fazla mesafeyi

gösteren yüzeydir (Bu yüzeylere Van Der Waals yüzeyleride denilmektedir). Bir molekülün MEP haritasıyla moleküldeki nükleofilik ve elektrofilik reaksiyonların gerçekleşebileceği bölgelerin belirlenmesinde ve molekül içlerinde oluşan hidrojen bağı/bağlarının oluşumu hakkında çoğu bilgiyi sağlamaktadır.

Bu haritalarda kırmızı ile gösterilen bölgeler moleküle ait dış elektronları şiddetle iten elektronca yüksek, düşük potansiyel enerji ve elektronegatif potansiyellerin olduğu bölgelerdir. Mavi ile gösterilen bölgeler ise elektronca fakir olan bölgelerdir.

Bu çalışmada tiyofene ait MEP haritası çıkarılmış olup mavi bölgelerde elektron yoğunluğu gözlenmemiş olup bu bölgeler hidrojen atomlarını göstermektedir. Tiyofen polimerinde bulunan ve tekrarlı sırayla dizilen Kükürt (S) molekülleri sarı bölgelerde konuşlanmış olup elektron çiftlerinden dolayı elektronegatiflik gösteren alan olarak tanımlanmıştır. Molekül 360 derece kendi eksenini etrafında döndürüldüğünde üstte ve altta bulunan kükürt elektron çiftlerinden dolayı sarı bölgeler görülebilmektedir. Kırmızı bölgelerin olmamasının nedeni ise molekülde aşırı elektronegatif alanların oluşmaması kaynaklıdır.



Şekil 4.20. Tiyofen Polimerinin Muliken yük dağılımı.

Polimerize edilmiş tiyofenin Mulliken yük dağılımlarına bakıldığında S-C bağındaki kükürtün atomik yükü 0,685 coulomb, S-C ve C-C bağındaki karbonun atomik yükü – 0,422 coulomb, halka içindeki C-C bağındaki karbonun atomik yükü -0,192 coulomb, C-H bağındaki hidrojenin atomik yükü 0,271 coulomb olarak bulunmuştur. Bu şekle bakarak Elektropolimerize edilmiş tiyofenin en optimize yük dağılımları ve polimerizasyondan sonraki atom yükleri tespit edilmiştir





5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Altın elektrot yüzeyinde; tiyofen, lipaz enzimi ve gluteraldehit kullanılarak enzim immobilizasyonu yapılmış olup deterjanların içerisindeki lipaz enziminin, trigliserit konsantrasyon değişiminin ölçülmesi esasına göre, varlığı ve miktarsal tayini yapılmıştır.

Kontrollü olarak üretilen sıvı çamaşır deterjanlarında lipaz enzimi varlığı ve miktarı belirlenmiş, oluşturulan biyosensörün tüm aşamalarındaki yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskopisiyle incelenmiştir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda;

1. Altın elektrot yüzeyinde kükürt içeren tiyofen polimerlerinin çok iyi bağlandığı, yüzeyden ayrılmadığı görülmüştür. Bu bağlanma kontrolü çalışmalar 10 sweep(döngü) den başlayıp 80 döngüye kadar incelenmiş en uygun yapının 80 döngü de olduğu tespit edilmiştir. 60 döngüden sonra altın elektrot yüzeyinde tiyofen polimerleri gözle görülür ve homojen yapı almış olup 80 döngüye kadar devam ettirilen bağlamada en uygun tiyofen polimer konsantrasyonu yakalanmıştır. 80 döngüden sonra elektrot yüzeyinde sağlam bağlanma miktarının azaldığı, yüzeyden ayrılmaların olduğu görülmüştür.

2. Lipaz enziminin kontrollü numuneler artan konsantrasyon voltmogramlarından kalibrasyon eğrisi çizilerek miktarının hesaplanması yapılmıştır.

3. Taramalı elektron mikroskopisi görüntüleri incelendiğinde Tiyofen polimerlerinin altın elektrot yüzeyinde bağlanma yaptığı gözlenmiştir. Bu çalışmada altın elektrot ve tiyofen uyumu incelenmiş yüzey morfolojik görüntülerle uyum tespit edilmiştir.

4. Lipaz enzim aktivitesinin en iyi 7,4 pH ve 25 °C sıcaklıkta optimal sonuçlar verdiği görülmüş olup çalışma bu değerlerde yapılmıştır. Çalışmanın diğer sıcaklıklarda ve farklı pH larda incelenmesi farklı optimal şartların olabilme durumunun belirlenmesine katkı sağlayacağını ortaya koymuştur.

5. Bu çalışmada kullanılan PBS çözeltisi içerisine eklenen potasyum ferro siyanür ilavesinin elektron alışverişini hesaplanabilir oranda arttırdığı gözlenmiştir. Potasyum ferro siyanürün zararları gözönünde bulundurulduğunda elektron alışverişinin kolaylaştırılması için farklı kimyasallar kullanarak daha fazla çalışmanın sonuçlarının gözlenmesi gerekmektedir. Yapılacak çalışmalar yeşil kimya ve sürdürülebilirlik için önem arz etmekte olup yeni çalışmalara ışık tuması açısından önemlidir.

6. Biyosensörlerin ucuzluk prensibine göre; altının pahalı olması farklı metaller ve elektropolimerizasyona uygun monomerlerin tespiti için farklı çalışmaların yapılmasının gerekliliğini ortaya koymuştur.

7. Deterjan sektöründe ürün ambalajlarında yer alan ürün içerik bilgisindeki enzim varlığı ve miktarsal tayini için çalışma önemli olup R^2 değerinin 0,9681 olarak hesaplanması çalışmanın deterjan sektöründe güvenle kullanabileceğini ortaya koymuştur. Bu konu firmaların ürettiği ürünlerinin analiz edilebilir parametrelerinin artırılması için önemli olup proses kontrolü ve rakip ürün analizleri gibi verilerin ortaya konulabilmesi için önemlidir.

8. Bu çalışmada; R^2 değerinin 1'e yaklaştırılması için çalışma kimyasal hücrelerde girişim yapan kimyasalların, yapıların ve durumların değerlendirilmesi için farklı yöntemler belirlenmesi gerekliliği ortaya konulmuştur. Bu durum deterjan sektöründeki ARGE çalışmalarından biri olan formül çatılarının geliştirilmesi için önem arz etmektedir.

9. Bu çalışmada oluşturulan biyosensör için en uygun çapraz bağlayıcının gluteraldehit olduğu tespit edilmiş olup çalışmanın farklı çapraz bağlayıcılarla denenmesi çalışmalarının önünü açmaktadır.

KAYNAKLAR

- Adhikari, B., & Majumdar, S. (2004). Polymers in sensor applications. *Progress in polymer science*, 29(7), 699-766.
- Aidil, A., Balakrishnan, S. R., Zanariah, C. W., Ismail, W. W., Sahrim, M., Ismail, I., & Jamaludin, J. (2021, November). Electrochemical Detection of Tributyrin using Gold Nanoparticle Functionalized Screen-Printed Electrode. In *2021 IEEE 19th Student Conference on Research and Development (SCORED)* (pp. 47-51). IEEE.
- Dhand, C., Das, M., Datta, M., & Malhotra, B. D. (2011). Recent advances in polyaniline based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(6), 2811-2821.
- Dhand, C., Solanki, P. R., Datta, M., & Malhotra, B. D. (2010). Polyaniline/Single-walled carbon nanotubes composite based triglyceride biosensor. *Electroanalysis*, 22(22), 2683-2693.
- Di Tocco, A., Robledo, S. N., Osuna, Y., Sandoval-Cortez, J., Granero, A. M., Vettorazzi, N. R., ... & Fernández, H. (2018). Development of an electrochemical biosensor for the determination of triglycerides in serum samples based on a lipase/magnetite-chitosan/copper oxide nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes/pectin composite. *Talanta*, 190, 30-37.
- Hussain, Z., Zafiu, C., Küpcü, S., Pivetta, L., Hollfelder, N., Masutani, A., ... & Sinner, E. K. (2014). Liquid crystal based sensors monitoring lipase activity: A new rapid and sensitive method for cytotoxicity assays. *Biosensors and Bioelectronics*, 56, 210-216.
- Kataria, M., Swati, M., Pathak, T., & Kumar, K. (2014). Enzyme Based Biosensors and Their Applications. *INDUSTRIAL ENZYMES*, 157.

- Kaur, J., Choudhary, S., Chaudhari, R., Jayant, R. D., & Joshi, A. (2019). Enzyme-based biosensors. In *Bioelectronics and Medical Devices* (pp. 211-240). Woodhead Publishing.
- Mondal, K., Ali, M. A., Singh, C., Sumana, G., Malhotra, B. D., & Sharma, A. (2017). Highly sensitive porous carbon and metal/carbon conducting nanofiber based enzymatic biosensors for triglyceride detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 246, 202-214.
- Nirbhaya, V., Chauhan, D., Jain, R., Chandra, R., & Kumar, S. (2021). Nanostructured graphitic carbon nitride based ultrasensing electrochemical biosensor for food toxin detection. *Bioelectrochemistry*, 139, 107738.
- Phongphut, A., Sriprachuabwong, C., Wisitsoraat, A., Tuantranont, A., Prichanont, S., & Sritongkham, P. (2013). A disposable amperometric biosensor based on inkjet-printed Au/PEDOT-PSS nanocomposite for triglyceride determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 178, 501-507.
- Raykova, M. R., Corrigan, D. K., Holdsworth, M., Henriquez, F. L., & Ward, A. C. (2021). Emerging electrochemical sensors for real-time detection of tetracyclines in milk. *Biosensors*, 11(7), 232.
- Rezvani, M., NAJAFPOUR, G., Mohammadi, M., & Zare, H. (2017). Amperometric biosensor for detection of triglyceride tributyrin based on zero point charge of activated carbon. *Turkish Journal of Biology*, 41(2), 268-277.
- Starodub, N. F. (2006). Biosensors for the evaluation of lipase activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40(3-4), 155-160.
- Tien, H. T., & Ottova, A. L. (1998). Supported planar lipid bilayers (s-BLMs) as electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta*, 43(23), 3587-3610.
- Torrinha, Á., Amorim, C. G., Montenegro, M. C., & Araújo, A. N. (2018). Biosensing based on pencil graphite electrodes. *Talanta*, 190, 235-247.

- Zhang, W., Tang, Y., Liu, J., Ma, Y., Jiang, L., Huang, W., ... & Tian, D. (2014). An electrochemical sensor for detecting triglyceride based on biomimetic polydopamine and gold nanocomposite. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(48), 8490-8495.
- Zhu, Y. C., Mei, L. P., Ruan, Y. F., Zhang, N., Zhao, W. W., Xu, J. J., & Chen, H. Y. (2019). Enzyme-based biosensors and their applications. In *Advances in Enzyme Technology* (pp. 201-223). Elsevier.





ÖZGEÇMİŞ

Adanada doğdu. İlk, Orta ve Lise eğitimini babasının memuriyeti nedeni ile çeşitli il ve ilçelerdeki okullarda tamamladı. Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Lisans eğitimini 2000 yılında tamamladı. İlköğretim ve Ortaöğretim Pedagoji eğitimini Lisans eğitimi ile birlikte 2000 yılında tamamladı. 2002-2006 yıllarında Adana Başkent Üniversitesi Turgut Noyan Araştırma Hastanesi Patoloji bölümünde Laboratuvar şefi olarak çalıştı. Çeşitli şirketlerde çalıştıktan sonra 2013 yılında ABC Deterjan San. Ve Tic. Anonim Şirketine Kalite Güvence Mühendisi olarak göreve başladı. 2017 yılında aynı şirkette Kalite Güvence Şefi ve 2019 yılında Kalite Güvence Müdürü oldu. 2018 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans Eğitimi almaya başladı. Halen ABC Deterjan San. Ve Tic. Anonim Şirketine Kalite Güvence bölümünde Kalite Güvence ve Kalite Kontrol Müdürü olarak göreve devam etmektedir.