



# **MEDYATÖRLÜ YENİ BİR KOLİN BİYOSENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI**

**Rüya BASKIN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2018**

Rüya BASKIN tarafından hazırlanan “MEDYATÖRLÜ YENİ BİR KOLİN BİYOSENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Fatma ARSLAN

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

**Başkan:** Prof. Dr. Emel EMREGÜL

Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

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

.....

**Üye:** Doç. Dr. Servet ÇETE

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Tez Savunma Tarihi: 16/01/2018

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

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

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

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

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

Rüya BASKIN

16/01/2018

MEDYATÖRLÜ YENİ BİR KOLİN BİYOSENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI  
(Yüksek Lisans Tezi)

Rüya BASKIN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Ocak 2018

ÖZET

Bu çalışmada kolin tayini için kolin oksidaz ve medyatöre dayalı yeni bir amperometrik kolin biyosensörü geliştirildi. Biyosensör, Pt yüzeyde pirolün polivinilsülfonat varlığında elektrokimyasal olarak polimerleşmesi ve sonrasında medyatör varlığında kolin oksidaz enziminin polipirol-polivinilsülfonat filmi üzerine çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmesiyle hazırlandı. Medyatör olarak Toluidin mavisi O (TBO) kullanıldı. Kolin oksijenli ortamda kolin oksidaz enzimi aracılığıyla betaine yükseltgendi. Reaksiyon sonucunda betain yanında hidrojen peroksit oluştu. Hidrojen peroksit toluidin mavisi ile reaksiyona girerek medyatörü indirgedi. Kolin tayini, indirgenmiş medyatörün  $-0,23\text{ V}$  'da elektrot üzerinde yükseltgenmesine dayanılarak yapıldı. Hazırlanan biyosensörün kolin tayini için çalışma aralığı belirlendi. Biyosensör cevabına substrat derişiminin, pH'nın ve sıcaklığın etkisi araştırıldı. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü tayin edildi. Biyolojik ortamlarda olabilecek girişimlerin biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi. Biyosensörün sentetik kan numunesindeki performansı belirlendi.

Bilim Kodu : 20104  
Anahtar Kelimeler : Biyosensör, Kolin, Kolin oksidaz, Toluidin Mavisi O  
Sayfa Adedi : 87  
Danışman : Prof. Dr. Fatma ARSLAN

## PREPARATION OF A NEW CHOLINE BIOSENSOR WITH MEDIATOR

(M. Sc. Thesis)

Rüya BASKIN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2018

## ABSTRACT

In this study, we report a new choline oxidase and mediator based amperometric choline biosensor for the determination of choline. A biosensor was prepared by electropolymerization of pyrrole in the presence of polyvinylsulfonate on the surface of a platinum electrode and immobilization of choline oxidase with crosslinking procedure in the presence of the mediator onto PPy-PVS film after the electropolymerization process. Toluidine Blue O (TBO) was used as a mediator. Choline is oxidized to betaine and hydrogen peroxide by choline oxidase in oxygenated media. Mediator reduced by reaction with hydrogen peroxide. The amperometric response was based on the electrocatalytic properties of TBO. The changes in the anodic current at -0.23 V vs Ag/AgCl produced by TBO was proportional to the choline concentration changes in sample. Linear operating range of the biosensor was determined. The effects of substrate concentration, pH and temperature on the response of the choline biosensor were investigated. The operational and storage stability of the biosensor were identified. The effects of initiatives which may be in biological media were examined. The performance of biosensor has been observed in synthetic blood sample.

Science Code : 20104  
Key Words : Biosensor, Choline, Choline oxidase, Toluidine Blue O  
Page Number : 87  
Adviser : Prof. Dr. Fatma ARSLAN

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bana yol gösterici olan, bilgilerini benimle paylaşıp gerçeğe buluşturma yeteneğini bana kazandıran, tecrübesini, desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen tez danışmanım Değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Fatma ARSLAN'a;

Çalışmalarımın başından itibaren çok değerli çabaları, yol göstericiliği ve tüm samimiyeti ile deneyimlerini paylaşan, teknik destek ve yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Halit ARSLAN'a, bu süre içerisindeki her türlü katkıları için Sayın Prof. Dr. Ahmet YAŞAR ve Sayın Doç. Dr. Servet ÇETE'ye;

Çalışmalarım esnasında sürekli yardım ve desteklerini gördüğüm Dr. Elif AYNACI KOYUNCU'ya saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmalarımın başlarında önerilerini ve yardımlarını eksik etmeyen arkadaşım Ayşe Tuğçe TUNÇ TAŞÇIOĞLU'na ve çalışmalarım boyunca bana sürekli destek olan çok sevdiğim değerli dostlarıma;

Eğitim hayatım boyunca her türlü fedakârlığı gösteren ve her zaman yanımda olan annem ve babama, iyi kötü her anımda varlığıyla güç veren canım kardeşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                             | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                                                  | iv    |
| ABSTRACT.....                                                               | v     |
| TEŞEKKÜR.....                                                               | vi    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                           | vii   |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....                                                   | x     |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....                                                     | xi    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                                | xiii  |
| 1. GİRİŞ.....                                                               | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                                      | 9     |
| 2.1. Enzimler .....                                                         | 9     |
| 2.1.1. Oksidaz enzimleri.....                                               | 14    |
| 2.1.2. Kolin oksidaz enziminin özellikleri .....                            | 15    |
| 2.2. Biyosensörler.....                                                     | 16    |
| 2.2.1. Biyosensörlerin tarihçesi .....                                      | 18    |
| 2.2.2. Biyobileşen.....                                                     | 18    |
| 2.2.3. Biyosensörlerin çalışma mekanizması .....                            | 18    |
| 2.2.4. Dönüştürücüler (transdüserler).....                                  | 19    |
| 2.2.5. Biyobileşen immobilizasyonu .....                                    | 20    |
| 2.2.6. Enzim immobilizasyonu.....                                           | 20    |
| 2.2.7. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak malzemelerin özellikleri ..... | 21    |
| 2.2.8. Enzim immobilizasyon metotları .....                                 | 21    |
| 2.2.9. Elektrokimyasal esaslı biyosensörler .....                           | 28    |
| 2.3. Medyatör .....                                                         | 31    |

|                                                                                   | <b>Sayfa</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 2.3.1. Toluidin mavisi O .....                                                    | 32           |
| 2.4. İletken Polimerler.....                                                      | 33           |
| 2.4.1. Pirol .....                                                                | 35           |
| 2.4.2. Pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu.....                               | 36           |
| 2.5. İdeal Biyosensör Performans Faktörleri.....                                  | 37           |
| 2.6. Kaynak Araştırması .....                                                     | 40           |
| <b>3. DENEYSEL KISIM .....</b>                                                    | <b>53</b>    |
| 3.1. Cihazlar ve Malzemeler .....                                                 | 53           |
| 3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı.....                                         | 53           |
| 3.1.2. Hücre ve elektrotlar.....                                                  | 53           |
| 3.1.3. pH metre .....                                                             | 53           |
| 3.1.4. Su banyosu .....                                                           | 54           |
| 3.1.5. Mikro pipet .....                                                          | 54           |
| 3.1.6. Argon gazı .....                                                           | 54           |
| 3.1.7. Saf su.....                                                                | 54           |
| 3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri .....                                   | 54           |
| 3.2.1. Kullanılan çözeltiler.....                                                 | 55           |
| 3.3. Platin Yüzeye Polipirol-polivinilsülfonat(PPy-PVS) Filminin Kaplanması ..... | 57           |
| 3.4. Enzim Elektrodunun Hazırlanması .....                                        | 58           |
| 3.5. Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi .....                                    | 58           |
| 3.6. Medyatör ve Hidrojen Peroksit Etkileşiminin Belirlenmesi.....                | 59           |
| 3.7. Serbest Enzimin ve İmmobilize Enzimin Koline Duyarlılığının Belirlenmesi ..  | 59           |
| 3.8. Gluteraldehit Miktarının Enzim Elektrodun Cevabı Üzerine Etkisi .....        | 59           |
| 3.9. Enzim Elektrodunun En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi .....            | 60           |

|                                                                                     | <b>Sayfa</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.9.1. pH'nın etkisi .....                                                          | 60           |
| 3.9.2. Sıcaklığın etkisi .....                                                      | 61           |
| 3.9.3. Substrat derişiminin etkisi .....                                            | 61           |
| 3.9.4. Raf ömrü .....                                                               | 62           |
| 3.9.5. Tekrarlanabilirlik .....                                                     | 62           |
| 3.10. Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler.....                                | 62           |
| 3.11. Sentetik Kan Numunesinde Kolin Tayini .....                                   | 63           |
| <b>4. SONUÇ VE TARTIŞMA .....</b>                                                   | <b>65</b>    |
| 4.1. Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi .....                                      | 66           |
| 4.2. Medyator ve Hidrojen Peroksit Etkileşiminin Belirlenmesi .....                 | 66           |
| 4.3. Serbest Enzimin ve İmmobilize Enzimin Koline Duyarlılığının Belirlenmesi ..... | 67           |
| 4.4. Gluteraldehit Miktarının Enzim Elektrodun Cevabı Üzerine Etkisi .....          | 68           |
| 4.5. Enzim Elektrodunun En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi .....              | 69           |
| 4.5.1. pH'nın etkisi .....                                                          | 69           |
| 4.5.2. Sıcaklığın etkisi .....                                                      | 70           |
| 4.5.3. Substrat derişiminin etkisi .....                                            | 71           |
| 4.5.4. Enzim elektrot için kalibrasyon grafiğinin çizilmesi.....                    | 73           |
| 4.5.5. Raf ömrü .....                                                               | 74           |
| 4.5.6. Tekrarlanabilirlik .....                                                     | 75           |
| 4.6. Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler.....                                 | 76           |
| 4.7. Sentetik Numunede Kolin Tayini .....                                           | 76           |
| 4.8. Sonuç .....                                                                    | 77           |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                              | <b>79</b>    |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                               | <b>87</b>    |

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge                                                                                                             | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 1.1. Kolin içeren birtakım besinler ve kolin miktarları .....                                               | 4     |
| Çizelge 2.1. Enzimin bağlanmasını sağlayan fonksiyonel gruplar .....                                                | 23    |
| Çizelge 2.2. Konjüge yapıya sahip bazı iletken polimerler ve kimyasal formülleri .....                              | 34    |
| Çizelge 2.3. Bazı iletken polimerler ve kimyasal formülleri .....                                                   | 34    |
| Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan diğer kimyasalların adları, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar ..... | 55    |
| Çizelge 4.1. Biyosensör üzerine girişim yapan maddeler ve etkileri .....                                            | 76    |
| Çizelge 4.2. Literatürdeki kolin biyosensörleri ile bu çalışmada hazırlanan biyosensörün karşılaştırılması .....    | 78    |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil                                                                                                       | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 1.1. Kolinin insan vücudundaki temel fonksiyonları.....                                               | 1     |
| Şekil 1.2. Kolin türevi bileşiklerin kimyasal yapıları .....                                                | 2     |
| Şekil 1.3. Kan ve karaciğerdeki kolin fonksiyonlarını gösteren diyagram.....                                | 3     |
| Şekil 1.4. Kolinin betaine dönüşümü.....                                                                    | 3     |
| Şekil 1.5. Kolin içeren bileşimlerin diyet alımı, metabolizması ve sağlık durumu arasındaki ilişkileri..... | 5     |
| Şekil 2.1. Enzim tarafından katalizlenen ve katalizlenmeyen tepkimelerin karşılaştırılması .....            | 9     |
| Şekil 2.2. Enzim substrat ilişkisi (anahtar kilit modeli).....                                              | 11    |
| Şekil 2.3. Enzim substrat ilişkisi (uygunluk modeli).....                                                   | 12    |
| Şekil 2.4. Sıcaklığa bağlı olarak enzim aktifliğinin değişimi .....                                         | 13    |
| Şekil 2.5. Enzim kinetiğinde Michealis-Menten grafiği ve bağıntısı .....                                    | 13    |
| Şekil 2.6. Kolin oksidazın üç boyutlu yapısı .....                                                          | 16    |
| Şekil 2.7. Biyosensörlerin genel yapısı.....                                                                | 17    |
| Şekil 2.8. Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması .....                                                  | 19    |
| Şekil 2.9. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....                                                             | 22    |
| Şekil 2.10. Kovalent bağlama .....                                                                          | 24    |
| Şekil 2.11. Adsorpsiyon.....                                                                                | 25    |
| Şekil 2.12. İyonik bağlama .....                                                                            | 25    |
| Şekil 2.13. Çapraz bağlama .....                                                                            | 27    |
| Şekil 2.14. Polimer matrikste tutuklama.....                                                                | 28    |
| Şekil 2.15. Mikrokapsülleme .....                                                                           | 29    |
| Şekil 2.16. Toluidin mavisi O a)indirgenmiş b)yükseltgenmiş halleri .....                                   | 33    |
| Şekil 2.17. Pirolün kararlı rezonans sınır formülleri.....                                                  | 35    |

| Şekil                                                                                                        | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.18. Pirolün elektrokimyasal yükseltgenme ile polimerleşme mekanizması.....                           | 37    |
| Şekil 3.1. Kaplama ve ölçümde kullanılan BAS C3 hücre sistemi.....                                           | 53    |
| Şekil 4.1. Kolinin betaine yükseltgenmesi sırasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron aktarımları..... | 65    |
| Şekil 4.2. Toluidin mavisi O'nun dönüşümlü voltametri ile elde edilen yükseltgenme pikleri .....             | 66    |
| Şekil 4.3. Medyatör ve hidrojen peroksit etkileşimi .....                                                    | 67    |
| Şekil 4.4. Pt / PPy-PVS elektrodun ve enzim elektrodun koline karşı duyarlılığı.....                         | 67    |
| Şekil 4.5. Gluteraldehit miktarının biyosensör aktivitesine etkisi .....                                     | 69    |
| Şekil 4.6. Enzim elektrodun cevabına pH'nın etkisi.....                                                      | 70    |
| Şekil 4.7. Enzim elektrodun cevabına sıcaklığın etkisi .....                                                 | 71    |
| Şekil 4.8. Enzim elektrot için Michaelis - Menten grafiği.....                                               | 72    |
| Şekil 4.9. Enzim elektrot için Lineweaver – Burk grafiği .....                                               | 72    |
| Şekil 4.10. Kolin biyosensörü kalibrasyon grafiği.....                                                       | 74    |
| Şekil 4.11. Enzim elektrodun raf ömrü .....                                                                  | 75    |
| Şekil 4.12. Elektrodun tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi .....                                        | 75    |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

### Simgeler

### Açıklamalar

|      |                    |
|------|--------------------|
| °C   | Derece Celcius     |
| g    | Gram               |
| mM   | Milimolar derişim  |
| mV   | Milivolt           |
| ppb  | Milyarda bir       |
| s    | Saniye             |
| μM   | Mikromolar derişim |
| μA   | Mikroamper         |
| μmol | Mikromol           |
| Δi   | Akım farkı         |

### Kısaltmalar

### Açıklamalar

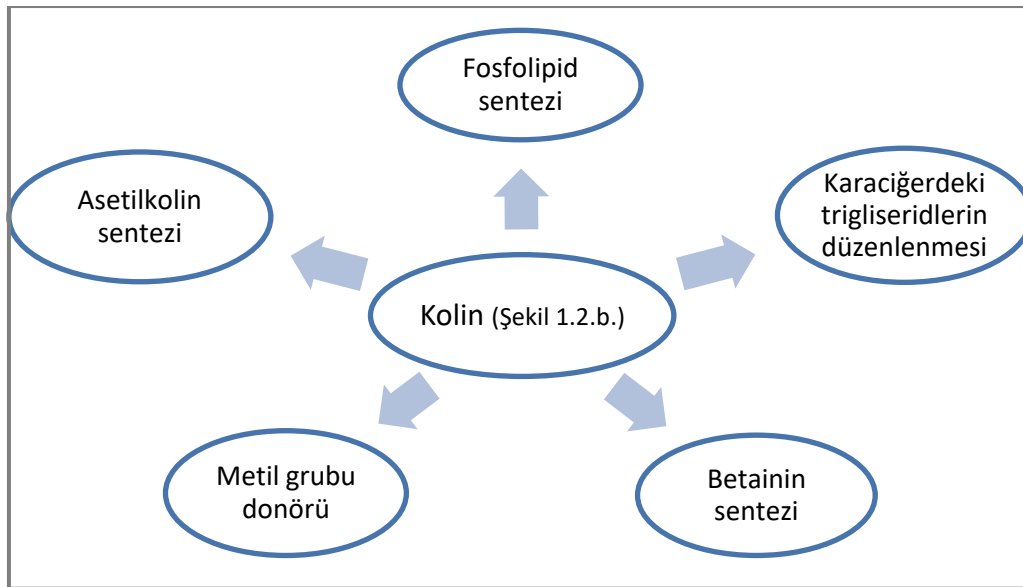
|      |                                |
|------|--------------------------------|
| AChE | Asetilkolin esterase           |
| ALT  | Alanin transaminaz             |
| ATP  | Adenozin trifosfat             |
| BOS  | Beyin omurilik sıvısı          |
| BSA  | Sığır serum albumini           |
| ChOx | Kolin oksidaz                  |
| FAD  | Flavin adenin dinükleotit      |
| FIA  | Akış enjeksiyon analizi        |
| NAD  | Nikodinamid adenin dinükleotid |
| PPy  | Polipirol                      |
| Pt   | Platin                         |
| PVS  | Polivinil sülfonat             |
| TBO  | Toluidin mavisi O              |

## 1. GİRİŞ

Kolin (trimetil etanolamin) kimyasal formülü  $(CH_3)_3N^+(CH_2)_2OH X^-$  olan kuaterner amonyum bileşiğidir ve suda çözünen temel bir besin maddesidir [1,2]. B vitamini türü olan kolin, insan vücudundaki önemli metabolik yollarda rol oynamaktadır [3].

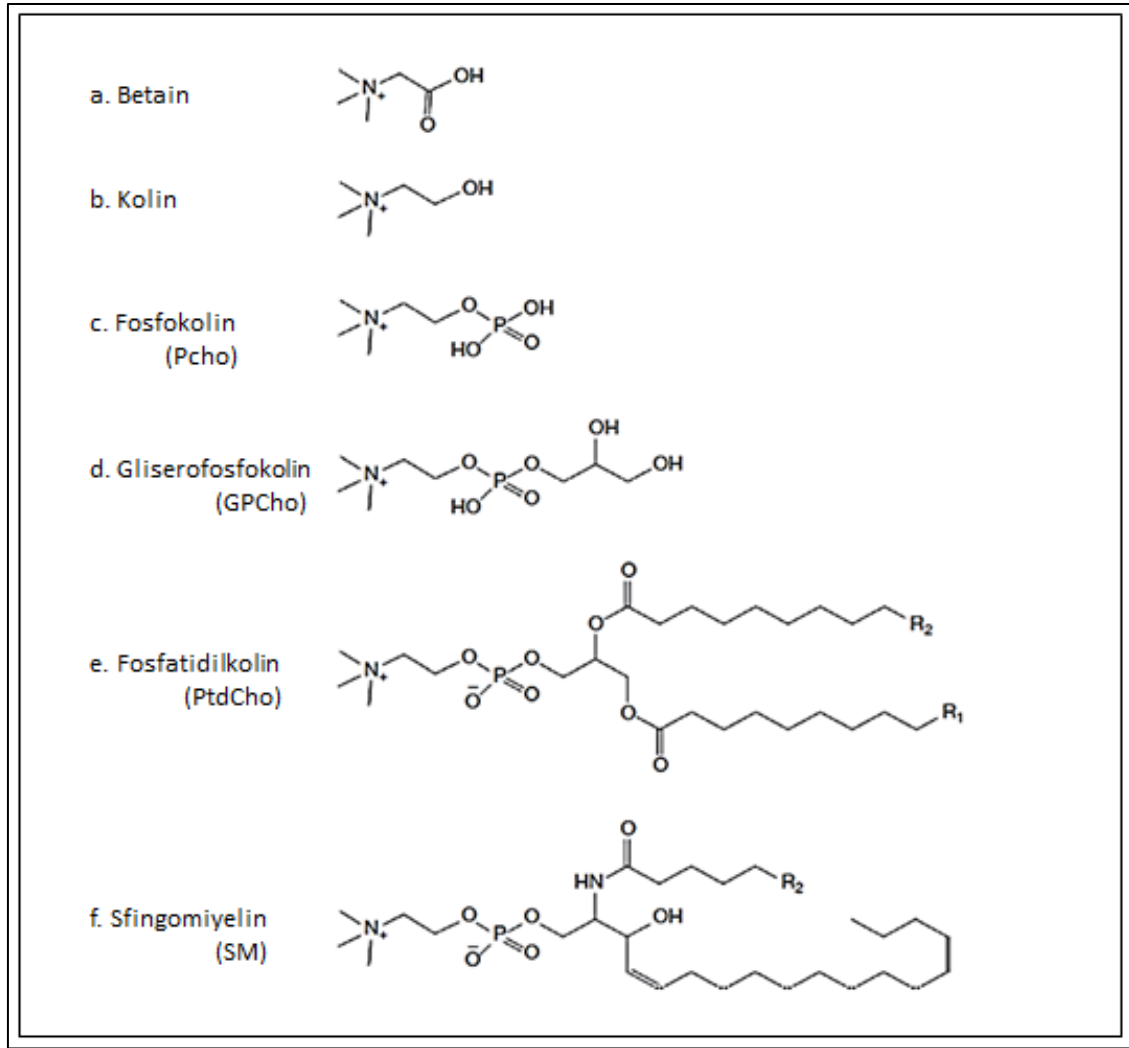
İnsanlar sadece çok az miktarda kolin üretebilir, ancak sağlıklı kalabilmek için diyetini tüketirler [4].

Kolin üç ana fizyolojik amaç için gerekli olan önemli bir besindir: (1) hücre zarlarına ve zar-ötesi sinyali sağlamak için bir yapı sağlayan fosfatidilkolin ve sfingomyelin gibi fosfolipidlerin sentezinde önemli bir rol oynar ve karaciğerdeki aşırı trigliseritlerin taşınması için önemlidir; (2) kolin, metaboliti olan betainin önemli bir kaynağıdır ve homosistein metabolizması için gerekli olan önemli bir metil grubu donörüdür. (3) bellek ve kas kontrolü ile ilgili bir nörotransmitter olan asetilkolinin öncül maddesidir. Bu nedenle, kolin kantitatif tayini, özellikle Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların teşhisinde önemlidir [5].



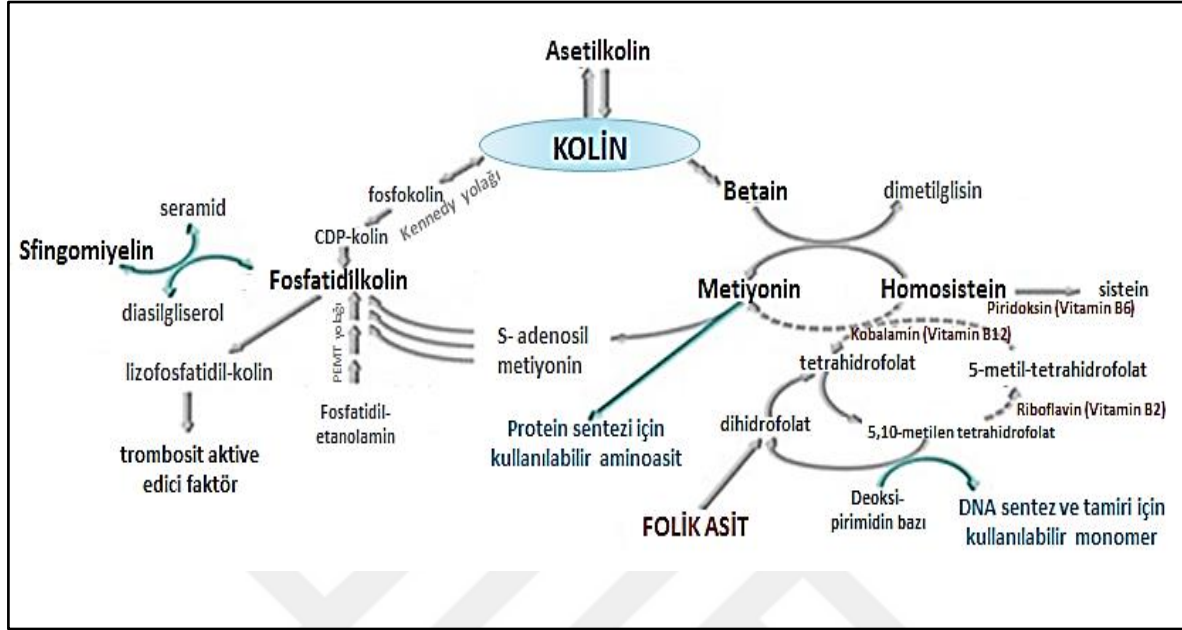
Şekil 1.1. Kolinin insan vücudundaki temel fonksiyonları

Kolin fosfatidiletanolamin metiltransferazın (PEMT) etkisiyle karaciğerde sentezlenir (Şekil 1.3) [6]. Endojen biyosentez, insanlarda kolinin taleplerini karşılamak için yeterli değildir ve yeterince kolin bulunmayan gıdalarla beslenme karaciğer yağlanması ve karaciğer hücre ölümüne neden olmaktadır [7,8]. Diyet kolin; serbest kolin, fosfatidilkolin (lesitin), fosfokolin, sfingomiyelin ve gliserofosfokolin formlarından temin edilir (Şekil 1.2). Bu kolin türevlerinin hepsi kolini üretmek için hidrolize edilebilir [7].



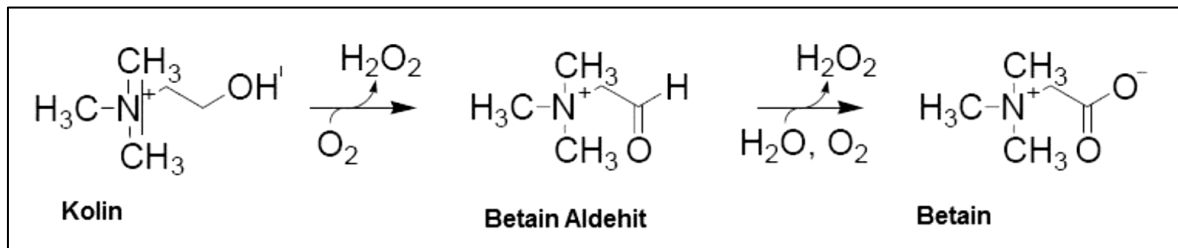
Şekil 1.2. Kolin türevi bileşiklerin kimyasal yapıları [7]

Kolin, asetilkolinin asetilkolin esteraz enzimi ile ve hücre plazma zarının önemli bir bileşeni olan fosfatidilkolinin fosfolipaz D enzimi ile hidrolizinin bir ürünüdür [9].



Şekil 1.3. Kan ve karaciğerdeki kolin fonksiyonlarını gösteren diyagram [10]

Kolin oksidaz enzimi yardımı ile kolin, betaine yükseltgenir. Bu reaksiyon sonucu oksijen harcanırken iki mol hidrojen peroksit açığa çıkar (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Kolinin betaine dönüşümü

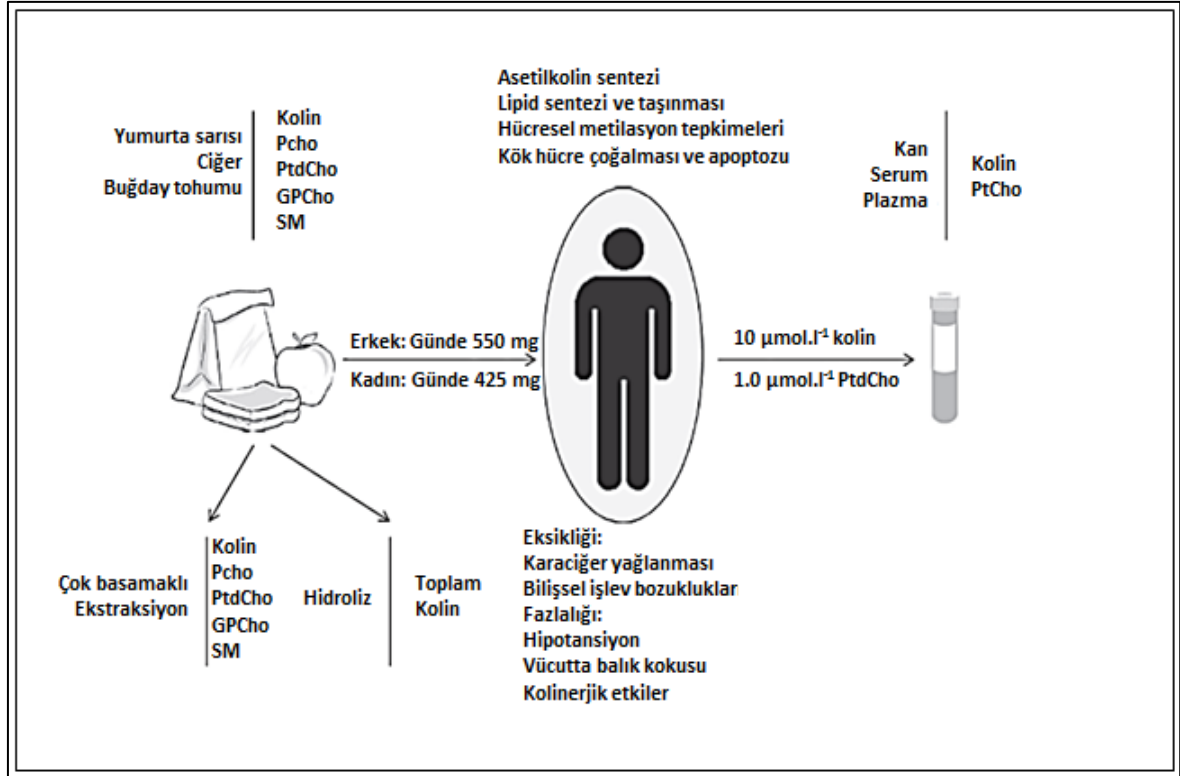
Kolin, çok sayıda bitki ve hayvan organlarının bir ana bileşeni olarak çok farklı alanlarda bulunabilir. Örneğin; safra, beyin, yumurta sarısı, şerbetçiotu, belladona, strophantus. İnsan anne sütündeki temel besin olarak ya da farklı biyolojik sıvıların kurucu maddesi olarak amniyotik sıvıda bulunur [9]. Kolin içeren birtakım besinler Çizelge 1.1’de gösterilmiştir.

Kolin, nöral tüp defektleri, yağlı karaciğer hastalığı ve diğer patolojilerin riskini azaltmada önemli bir rol oynamaktadır [4].

ABD Ulusal Bilimler Akademisi Enstitüsü Gıda ve Beslenme Kurulu, erkekler için günde 550 mg, gebe olmayan kadınlar için günde 425 mg, hamileler için günde 450 mg kolinin yeterli bir alım seviyesi olduğunu belirledi [7].

Çizelge 1.1. Kolin içeren birtakım besinler ve kolin miktarları [11]

| Hayvansal ve Bitkisel Gıdalar | Miktarı      | Miktarı(g) | Kolin (mg) | 100 g'daki kolin(mg) |
|-------------------------------|--------------|------------|------------|----------------------|
| Greyfurt                      | 1 adet       | 246g       | 19         | 8                    |
| Badem                         | 1 kase       | 143g       | 74         | 52                   |
| Fıstık                        | 1 kase       | 146g       | 77         | 53                   |
| Pişmiş fasülye                | 2 kase       | 354g       | 108        | 31                   |
| Ispanak                       | 1 porsiyon   | 454g       | 113        | 25                   |
| Yumurta                       | 1 adet       | 50g        | 147        | 294                  |
| Tavuk                         | 0,5 porsiyon | 227g       | 150        | 66                   |
| Süt(%1 yağlı)                 | 1 quart      | 976g       | 173        | 18                   |
| Brokoli                       | 1 porsiyon   | 454g       | 182        | 40                   |
| Mezgit balığı                 | 0,5 porsiyon | 227g       | 190        | 84                   |
| Buğday tohumu                 | 1 kase       | 113g       | 202        | 179                  |
| Soya fasülyesi                | 1 kase       | 186g       | 216        | 116                  |
| Sığır ciğeri                  | 5 ons        | 142g       | 473        | 333                  |



Şekil 1.5. Kolin içeren bileşimlerin diyet alımı, metabolizması ve sağlık durumu arasındaki ilişkileri

İnsanlardaki plazmada açlık kolin derişimleri  $7\text{--}20 \mu\text{mol.l}^{-1}$  aralığında yani ortalama  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  olarak bildirilmiştir [12].

İnsanlar kolince eksik beslendiklerinde, kas hücrelerinde (miyositler) dirençsizliğin arttığı [13] ve plazma homosistein derişiminin yükselmesinden kaynaklanan [14], serumda kreatin fosfokinazın arttığı belirlenmiştir. Kolin eksikliği karaciğer hastalığında da rol oynayabilir. Karaciğer ALT enziminin seviyesinin artması da bunun bir işaretidir [15]. Kolinin asetilkolin sentezinde de görev almasından dolayı, hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar ile kolince eksik beslenmenin beynin hazıfa kısmında fizyolojik ve psikolojik önemli sorunlar oluşumuna neden olduğu ortaya çıkarılmıştır [16,17].

Alzheimer hastalığı (AH) özellikle altmış yaşın üzerinde artan zihinsel işlev bozukluğunun en sık görülen nedenidir. Bu nörodejeneratif hastalıkta, kolinerjik eksiklik ile zihinsel işlev bozukluğunun başlangıcı, seyri ve derinliği arasında net bir ilişki kurulabilir. Hastalığın sebebi kesin olarak bilinmemektedir. Günümüzde hastalığın semptomatik tedavisinde en çok kullanılan yöntem, kolinerjik eksikliğin klinik tablo ile olan yakın ilişkisi nedeniyle

asetilkolinin sinaptik aralıkta daha uzun kalmasını sağlamaktır [18]. Yapılan araştırmalar ile kolin eksikliğinin Alzheimer hastalığını oluşturma riskinin oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir [19].

Ayrıca 1-8 yaş arası çocuklarda günlük 1000 mg, 9-13 yaş arası çocuklarda günlük 2000 mg, 14-18 yaş arasında günlük 3000 mg, 19 yaş ve üzerinde günlük 3500 mg'ın üstünde kolin tüketiminin hipotansiyon gibi olumsuz etkilere yol açtığı belirlenmiştir. Hipotansiyona ek olarak, yüksek kolin alımının diğer yan etkileri arasında, trietilamin üretiminden kaynaklanan vücudun balık gibi kokması ve terleme, kusma ve ishal gibi kolinerjik etkileri bulunmaktadır [12].

Beyin dokusu, serum, gıdalar ve pestisit gibi maddelerde kolin tayini yapılabilmektedir. Kolin miktarını belirlemek için kromatografik (Sıvı kromatografisi, İyon kromatografisi, Gaz kromatografisi-Kütle Spektrumu) [20,21], spektroskopik ( $^1\text{H-NMR}$ , AAS, UV) [22-24] ve elektrokimyasal (Amperometrik, Potansiyometrik, Kondüktometrik) [25-27] yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler hızlı, duyarlı, tekrarlanabilir, verimli ve yüksek seçiciliktir. Elektrokimyasal yöntemlere göre diğerlerinin maliyet, karmaşık cihaz yapısı, bazı maddelere karşı duyarlılık sorunu ve geri döndürülemez bir şekilde adsorbe olmuş maddelerin tayin edilememesi gibi birtakım nedenlerden dolayı dezavantajları vardır.

Literatürde elektrokimyasal bir yöntem olan kolin biyosensörü ile ilgili çalışmalar vardır [9,28-51]. Amperometrik kolin biyosensörlerinin çoğu enzimatik tepkime sonucu açığa çıkan hidrojen peroksitin ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) anodik potansiyellerde doğrudan oksidasyonuna dayanılarak yapılmıştır [28-39]. Biyolojik sıvılarda bulunan ve elektrokimyasal olarak aktif olan askorbik asit, ürik asit ve parasetamol gibi türler bu potansiyellerde kolayca okside edilir ve akım üreterek bir girişim etkisi oluştururlar [28-30,33-37]. Bu problem, medyatörler kullanılarak çalışma potansiyelinin düşürülmesiyle önlenebilir [9,40,46,49].

Literatür incelendiğinde prusya mavisi, metilen mavisi gibi medyatörlerin kullanıldığı çalışmalar yapıldığı görülmüştür [9,46]. Ancak medyatör olarak toluidin mavisi O (TBO)'nun kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda da bu amaçla, TBO kullanılarak, çalışılan yükseltgenme potansiyelleri düşürülmüş ve böylece girişim etkisinin azaltılması avantajı sağlanmıştır.

Çalışmamızda koline duyarlı yeni bir amperometrik biyosensör hazırlandı. Bu amaçla Platin/Polipirol-polivinilsülfonat (Pt/PPy - PVS) elektrodu pirolün elektrokimyasal olarak polimerleşmesiyle hazırlandı. Daha sonra kolin oksidazın medyatör (TBO) varlığında çapraz bağlama yöntemiyle immobilizasyonu sağlanarak Pt/PPy - PVS-ChOx(TBO) enzim elektrodu elde edildi. Kolin tayini, enzimatik reaksiyon sonucu indirgenmiş olan medyatörün, -0,23 V elektrot potansiyelinde yükseltgenmesi esasına dayanılarak yapıldı. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşulları belirlendi ve performansını etkileyen faktörler incelendi. Daha sonra biyolojik sıvılardaki elektroaktif türlerin tayin üzerine bozucu etkisi araştırılarak, elektrodun sentetik numunedeki ölçüm performansı değerlendirildi.



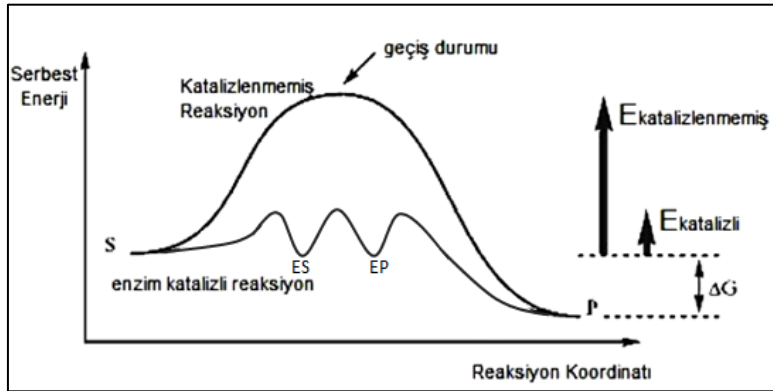


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Enzimler

Katalizörler kimyasal tepkimelerin hızını arttıran ve katalitik tepkime sonucunda kendisi değişikliğe uğramayan türler olarak tanımlanabilirler. Kimyasal bir tepkimenin katalizi termodinamik açıdan, söz konusu tepkimenin aktivasyon enerjisi düşürülerek meydana getirilmektedir. Reaktantlar ve tepkimedeki geçiş durumu arasındaki serbest enerji farkı aktivasyon enerjisidir. Aktivasyon enerjisindeki bu düşüş ya geçiş durumunun katalizör tarafından stabilize edilmesi ya da katalizörün tepkime için daha düşük enerjili yollar bulmasıyla gerçekleşir [52].

Katalizörlerin bahsedilen bu özellikleri göz önünde bulundurularak enzimler, genellikle protein yapısında biyokimyasal katalizörlerdir. Canlı organizmalarda kimyasal tepkimeleri katalize ederler ve hiçbir yan ürün oluşmasına izin vermeden spesifik olarak yüzde 100'lük bir ürün verimi sağlarlar (Şekil 2.1). Çoğunlukla renksizdirler ve bazen yeşil, sarı, mavi, kırmızı ya da kahverengi olabilirler. Suda ya da tuz çözeltisinde çözünebilirler [53,54].



Şekil 2.1. Enzim tarafından katalizlenen ve katalizlenmeyen tepkimelerin karşılaştırılması

Enzimler genel olarak altı büyük sınıfa ayrılır. Bunlar kısaca şunlardır:

1. Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme indirgenme reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.
2. Transferazlar: Fonksiyonel bir grubun transfer reaksiyonunu katalize eden enzimlerdir.
3. Hidrolazlar: Bu enzimler çeşitli bağların hidrolizini yani hidrolitik reaksiyonları katalize ederler.

4. Liyazlar: C-C, C-O ve C-N arasındaki bağları hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla kıran veya bu atomlar arasına bir çift bağ ilave eden enzimlerdir.
5. İzomerazlar: İzomerizasyon reaksiyonlarını yani bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri katalize eden enzimlerdir.
6. Ligazlar (Sentetazlar): C-O, C-S, C-N ve C-C arasında bir bağ oluşmasını sağlarlar. Bu enzimler genellikle ATP'deki veya diğer trifosfatlardaki pirofosfatı hidrolize ederek iki molekülün birbirine bağlanmasını katalize ederler [55].

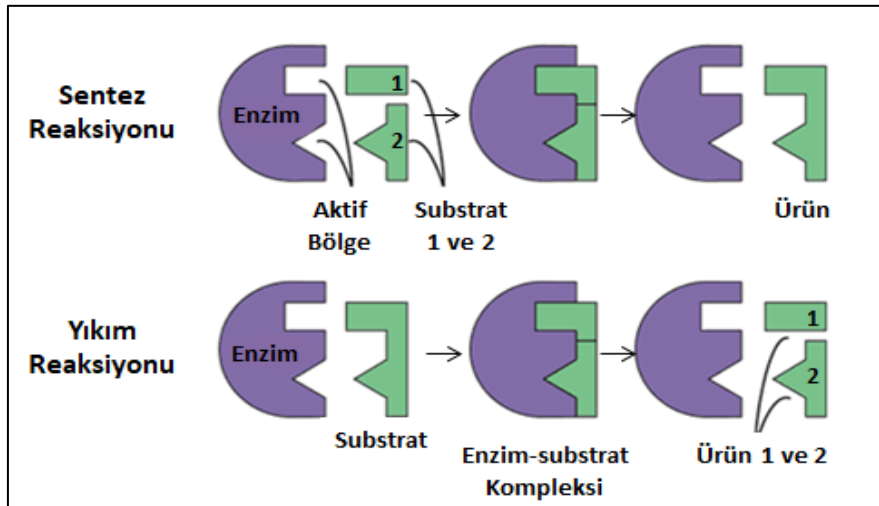
Enzim Komisyonunca, her enzim için, enzimin katalize ettiği reaksiyonu belirleyen bir sistemik isim ve enzimin durumunu kesinlikle ortaya koymak için bir sınıflandırma numarası verilmiştir.

Enzimlerin sınıflandırılmalarında dört diziden oluşan sayılar kullanılmaktadır. Dizide yer alan birinci sayı, enzimin hangi sınıfa ait olduğunu göstermektedir. İkinci, üçüncü ve dördüncü sayılar alt ve daha alt sınıflarını açıklamaktadır. Bunu bir örnekle açıklamak gerekirse, örneğin sınıflandırma numarası 1.1.1.1. olan enzim, yani "Alkol dehidrogenaz" ele alındığında, bu numara dizisinde ilk sıradaki 1 sayısı enzimin oksidoredüktaz sınıfında bulunduğunu, ikinci dizideki 1 sayısı, verici (donör) maddenin CH—OH grubu üzerine etki yaptığını, üçüncü 1, akseptör olarak  $\text{NAD}^+$  ve  $\text{NADP}^+$ 'den yararlandığını, dördüncü 1 ise doğrudan doğruya enzimin sistemik adı olan "Alkol:NAD oksidoredüktaz"ı açıklamaktadır [56].

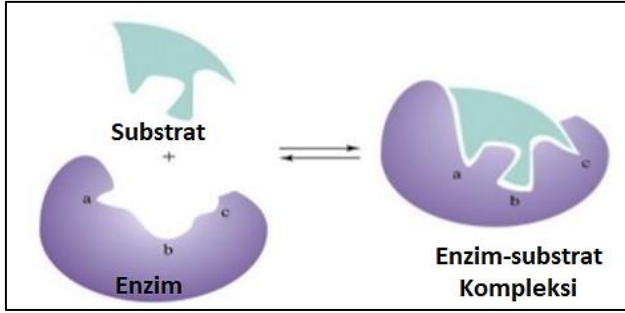
Enzimlerin aktivite göstermeleri için gerekli olan ve protein yapısında olmayan genellikle metal iyonlarından oluşan yan grupları 'kofaktör' olarak adlandırılır. Örneğin piruvat kinaz kofaktör olarak  $\text{K}^+$ 'a, heksokinaz  $\text{Mg}^{2+}$ 'e ihtiyaç duyar. Enzimlerin aktivite göstermek için ihtiyaç duyduğu kompleks organik moleküllere ise 'koenzim' denir. Örneğin süksinat dehidrogenaz enziminin koenzimi FAD'dır. Spesifik atomların veya fonksiyonel grupların aktarımında koenzimlerin rolü büyüktür. Enzimin koenzim veya kofaktörü ile birlikte ve katalitik bakımdan tamamen aktif durumuna ise 'holoenzim' adı verilir. Koenzim ve kofaktör enzimden ayrılacak ve enzim inaktif hale gelecek olursa, enzimin diyalize edilemeyen ve yalnız proteinden meydana gelmiş bu inaktif şekli ise 'apoenzim' olarak adlandırılır [57].

Enzimlerle tepkimeye giren kimyasal moleküllere substrat adı verilir. Enzimler genellikle bir tek substratı ürüne dönüştürür. Enzim moleküllerinde aktif merkez denilen özel bir bölge bulunur. Aktif merkez substrata uyumlu üç boyutlu bir yüzey oluşturan ve bağ yapım ile yıkımında görev alan amino asit yan zincirleri içerir. Aktif bölgeler, enzimin toplam hacmine oranla küçük bir kısmını oluşturur, bir yarık ve girinti içinde yer alırlar. Spesifik bağlanma olayı, atomların aktif bölgede belirli bir şekilde düzenlenmeleri sonucu meydana gelir. Substrat sahip olduğu şekil ile bölgeye tam oturabilmelidir. Fischer'in enzimle substrat arasındaki bu anahtar kilit modeli kataliz olayının stereospesifikliğini iyi bir şekilde açıklamaktadır (Şekil 2.2). Aktif merkez substratı bağlayarak bir enzim-substrat (ES) kompleksi meydana getirir. ES kompleksi, enzim-ürün (EÜ) kompleksine dönüşür ve enzim üründen ayrılır [58].

Bununla beraber, daha sonra yapılan çalışmalarda bazı enzimlerin aktif bölgelerinin formunu koruyan bir yapıda olmadığı belirlenmiştir. Koshland'ın modeline göre aktif merkez esnek yapıdadır; substrat varlığında, proteinin tersiyer yapısında oluşan bir değişiklikle, enzim substratını katalize uygun en doğru biçimde bağlayacak biçimsel bir değişikliğe uğrar. Bu ikinci çeşit bağlanma modeline etkileşme sonucu uygunluk ( induced fit ) adı verilir (Şekil 2.3) [59].



Şekil 2.2. Enzim substrat ilişkisi (anahtar kilit modeli)

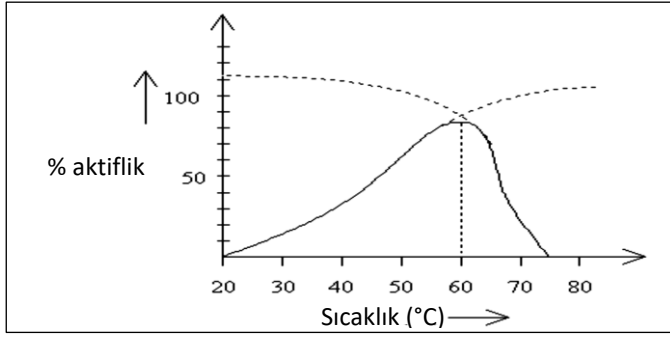


Şekil 2.3. Enzim substrat ilişkisi (uygunluk modeli)

Enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların hızını etkileyen en önemli faktörler; sıcaklık, ortam pH'sı ve substrat derişimidir. Substrat derişimi arttıkça enzimatik tepkime hızı başlangıçta doğrusal olarak artar. Daha sonra doğrusallıktan sapar ve belli bir substrat derişiminden sonra hız maksimuma ulaşır. Bu noktadan sonra substrat derişiminin artması ile tepkime hızını artırmak mümkün değildir. Bunun nedeni, bu durumda enzimin substratına karşı doygun durumda olmasıdır.

Enzim, substrat ve koenzim molekülleri asidik veya bazik gruplara sahiplerdir. “ES” kompleksinin en kararlı şekilde oluşması, yani oluşma hızının maksimum olması için bu grupların belirli bir iyonik formda olması gereklidir. Bunun dışındaki formlarda “ES” kompleksi zayıflar ve reaksiyon hızı düşer. Bu, optimum bir pH'da reaksiyon hızının en yüksek olması demektir. Optimum pH'nın altında veya üstünde enzimatik reaksiyon hızı azalmaktadır. Çok aşırı uçlarda ise, enzim inaktive olabilmektedir. Bundan dolayı, enzim çalışmalarında pH'yı optimum noktada sabit tutmak için tamponlar kullanılmaktadır. Kullanılan tamponun cinsi, substratın yapısı ve enzimin elde edildiği kaynak gibi faktörler optimum pH'yı etkilemektedir [57].

Sıcaklık arttıkça moleküllerin hareketliliği de arttırdığından kimyasal ve biyokimyasal tepkime hızlarında da artış olur. Protein yapısında olan enzimler, belirli bir sıcaklıktan sonra denatüre olmaya başlarlar. Bu durum, enzim molekülünün ilk olarak tersiyer yapısının ve sıcaklık arttıkça da sonrasında sekonder yapısının bozulması anlamına gelir. Enzimin aktif merkezi yapının bozulmasından etkilenir ve tepkime hızı ani olarak düşüş gösterir (Şekil 2.4) [58].



Şekil 2.4. Sıcaklığa bağlı olarak enzim aktifliğinin değişimi

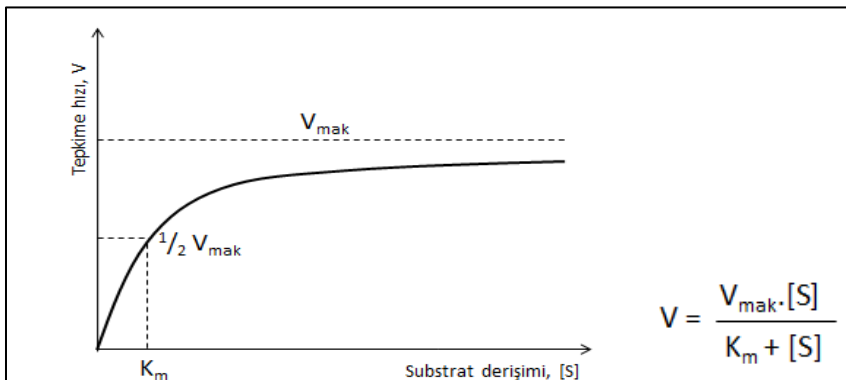
Daha önce de belirtildiği gibi enzim tepkimelerinin hızı kimyasal kinetikten farklılık göstererek, sıcaklıkla önce artar; sonra azalır. Enzim aktivitesi belirli bir optimum sıcaklığa kadar artar fakat sıcaklık denatürasyon sıcaklığına yaklaştıkça hız artışı yavaşlar ve birdenbire keskin olarak sıfıra düşer [60]. Enzimatik reaksiyonlar, kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi bu optimum sıcaklığa kadar Arrhenius kanununa uyar. Bu bölgede reaksiyon hız sabiti ve maksimum hız için;

$$k = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

$$r_m = k_3 \cdot [E]_0 \text{ yazılabilir.}$$

Eğer bu iki eşitlik birleştirilip gerekli hesaplamalar yapıp grafiğe geçirilirse elde edilen doğrunun eğiminden enzimin aktivasyon enerjisi hesaplanır [61].

Enzim reaksiyonlarında, sabit enzim derişimde substratın ürüne dönüşme hızı 1913'de Michealis ve Menten tarafından incelenmiş ve bir bağıntı ile verilmiştir. Bu, hiperbolik bir bağıntıdır, matematiksel ifadesi ve grafiği Şekil 2.5'de verilmiştir.



Şekil 2.5. Enzim kinetiğinde Michealis-Menten grafiği ve bağıntısı

Bu grafikte  $V$ ; tepkime hızı,  $V_{\text{mak.}}$ ; maksimum tepkime hızı,  $1/2V_{\text{mak.}}$ ; yarı maksimum tepkime hızı,  $[S]$ ; substrat derişimi ve  $K_m$ ; maksimum tepkime hızının yarısına karşılık gelen substrat derişimidir.  $V_{\text{mak.}}$  ve  $K_m$ , bir enzimin kinetik özelliklerini belirleyen iki temel sabittir. Bir enzimin  $V_{\text{mak.}}$ 'sı ne kadar büyük ve/veya  $K_m$ 'si ne kadar küçük ise kinetik bakımdan o derece etkin demektir [60].

Enzim miktarlarının saptanmasının zor olması ve birçok enzimin saf örneklerinin bulunmaması nedeniyle, enzim miktarı yerine enzim ünitesi kullanılmaktadır. Enzim aktivitesi ise turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı, enzim molekülü tarafından bir saniyede ürüne çevirilen substrat molekülü sayısıdır. Birçok enzimin turnover sayısı  $1,0 \times 10^4$ 'tür. Bazı enzimler  $1,0 \times 10^5$  turnover sayısına sahiptir. Katalaz  $4,0 \times 10^7$ 'lik bir değer ile bilinen en fazla turnover sayısına sahiptir. İkinci en yüksek olarak karbonik anhidraz  $4,0 \times 10^5$ 'lik bir değere sahiptir. Turnover sayısı yalnızca saf enzim için ifade edildiğinden enzim aktivitesi, spesifik aktivite ile belirtilir. Spesifik aktivite 1 mg protein başına enzim ünitesi (EÜ/mg protein) olarak açıklanır. Klinikte, biyolojik sıvılarda ölçülen enzim aktiviteleri optimum şartlarda 1 saniyede 1 mol substratın ürüne dönüşümünü katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanır. Bu birim, uluslararası birim (katal) olarak kabul edilir.

Klinikte enzim çalışmaları çok büyük pratik öneme sahiptir. Bazı hastalıkların nedenlerinin belirlenmesinde özellikle de kalıtsal genetik hastalıklarda enzim eksikliği, bir ya da daha fazla enzimin total azalması ve enzimin fazla aktivitesinin bazı hastalıklara neden olduğu düşünülmektedir. Kan plazması, eritrosit veya doku numunesinde bulunan enzimin aktivite ölçümü kesin hastalık tanısı için oldukça önemlidir. Bununla birlikte günümüzde sadece tıpta değil, aynı zamanda kimyasal endüstri, gıda prosesi ve ziraatte de kullanılan önemli pratik araçlardır. Bugün yaklaşık 2000 kadar enzim tanımlanmış, bunların birçoğu saf elde edilerek kinetikleri incelenmiş ve 200'den fazlası kristallendirilmiştir. Ancak yapılan genetik çalışmalar henüz tespit edilememiş birçok enzimin var olduğunu göstermektedir [62].

### 2.1.1. Oksidaz enzimleri

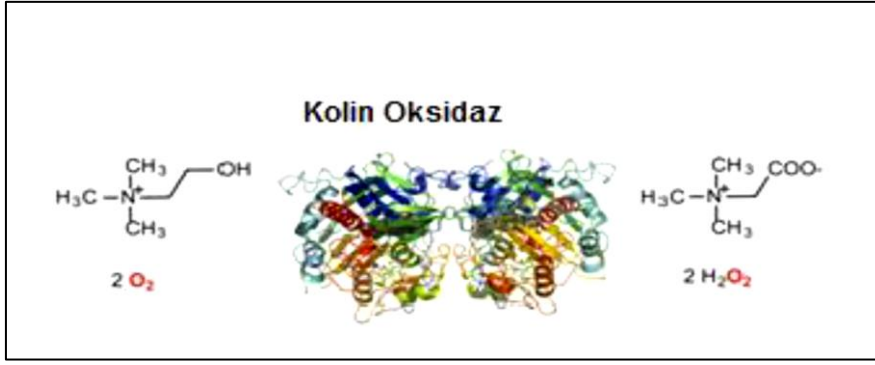
Biyokimyada oksidoredüktazlar elektronların bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlarlar ve oksidaz enzimleri bunların alt sınıfını oluştururlar. Bu biyolojik katalizörler moleküler oksijenin ( $O_2$ ) elektron alıcı olarak bulunduğu indirgenme-yükseltgenme

tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Oksidazların görev aldığı enzimatik reaksiyonlar sonucunda genellikle substrattan çıkarılan hidrojen ve elektronlar, koenzim üzerinden doğal kosubstrat olan oksijene aktarılırlar. Sonuç olarak oksijen, su veya hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) indirgenir [63].

### 2.1.2. Kolin oksidaz enziminin özellikleri

E.C. 1.1.3.17 olan kolin oksidaz (kolin – oksijen 1 – oksidoredüktaz) enzimi (Şekil 2.6) kofaktör olarak FAD'ın kullanıldığı iki yarı tepkime sonunda kolinin betain ve hidrojen peroksit dönüşümünü katalizler. Birinci yarı tepkimede kolinin hidroksil protonu hızlı bir şekilde yakalanır ve ara ürün olarak alkoksit meydana gelir. Bu tepkimeden sonra alkoksitin  $\alpha$  – karbonundan flavinin N(5) atomuna hidrid iyonu transferi gerçekleşir. Böylece kolin betain aldehite dönüşür ve flavin yükseltgenmiş olur. Devamında betain aldehit enzimin aktif bölgesinde hidratlanarak gem – diol kolin oluşumu gerçekleştirilir. İkinci yarı basamakta ise gem – diol kolin esas ürünü olan glisin betaine yükseltgenmesi gerçekleşir. Bu yarı tepkimelerde, yükseltgenmiş flavin tarafından oksijene iki elektron aktararak  $H_2O_2$ 'e indirgenmesi sağlanır.

His99, enzimin aktif bölgesinde yer alan fonksiyonel bir gruptur. Bu grup enzim – alkoksit kompleksinde FAD'ın en uygun şekilde yerleşimini sağlar. Substratın bağlandığı ana grup ise Glu312'dir. Bu grup da trimetilamonyum gruplarıyla elektrostatik etkileşime girerek substratın en ideal şekilde yerleşiminde görev alır. Önemli bir bağlanma noktası olan His351 grubu hidrid iyon transferinde substratın konumlanmasında görev alır ve kolinin yükseltgenmesi sırasında kararlılığı sağlar. Temel olarak oksijen flavini yükseltgediğinde, kolin reaksiyonunda minimum etkinin oluşmasını sağlayan grup Val464 grubu kalıntılarıdır. Son olarak enzim bağlı flavinin aktif bölgenin polaritesinin ve kolinin glisin betaine dönüşümünde kararlılığın sağlanmasında görev alan grup His 466'dır. Kolin oksidaz enzimindeki bu aktif üç histidin bölgesi de süperoksit anyonlarının elektrostatik kararlılığında ve oksijen tarafından indirgenmiş flavinin kararlılığında görev almazlar [61].



Şekil 2.6. Kolin oksidazın üç boyutlu yapısı [61]

## 2.2. Biyosensörler

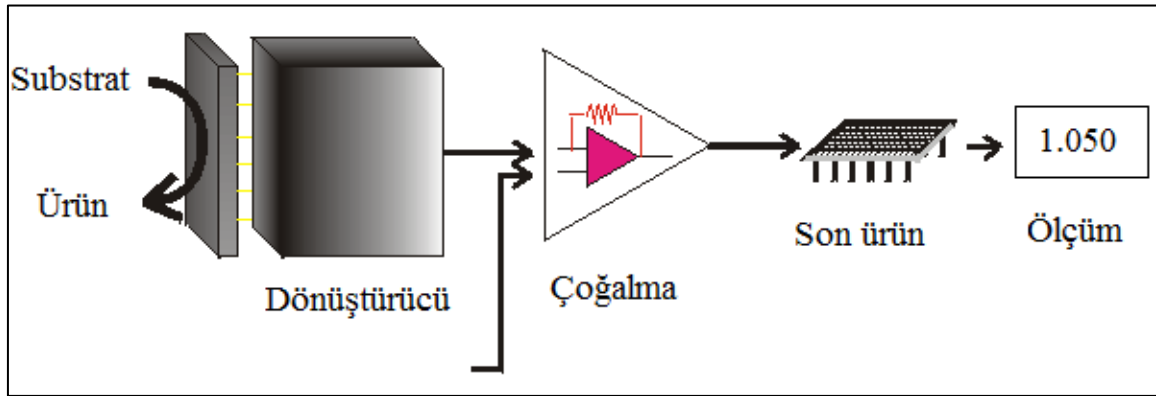
Biyomateryaller; biyolojik unsurlarla etkileşim halinde olan yapılar veya yüzeylerdir. Bu materyallerin geliştirilmesi çalışmaları 1960'lı yıllarda başlamıştır. Yaklaşık elli yıllık bir süreçte hızlı bir gelişim gösteren üretim çalışmaları günümüzde yeni bir bilim dalı haline gelmiş ve artık “Biyomateryal Bilimi” olarak adlandırılmaktadır. Biyomateryaller; tıp, biyoloji, kimya, doku mühendisliği, bilgisayar ve malzeme bilimlerinin de ortak bir paydası olarak değerlendirilmektedir. Biyomateryal biliminin, son yıllarda adından sıkça söz ettiren ve pek çok farklı alanlarda yaygın kullanımı bulunan bir alt dalı da “Biyosensörler”dir.

Biyosensörler, analiz edilecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu madde ile etkileşimi sonucu ortaya çıkardığı sinyalin, ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bu etkileşim ürünlerinin bir ölçüm sistemi ile ölçülmesi olarak tanımlanabilir. Daha genel bir ifade ile, bir biyosensör; biyolojik bir ajanla birleştirilmiş olan fiziko-kimyasal detektördür ve bu yapı istenilen ürünün analizi amacıyla kullanılmaktadır [64].

Tüm canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri hızlıca algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için bu değişimlere adapte olmaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin hücre dışı (invitro) kullanımı ve geliştirilmesi için temel oluşturmuştur [65].

Biyosensör sistemleri üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; “biyo algılayıcı/ biyobileşen”, “transdüser/dönüştürücü” ve “dedektör” bölümleridir (Şekil 2.7). Biyolojik

algılayıcı elementin seçiciliği ile, çevirici hedef analitin derişimiyle orantılı olarak sinyal üretir. Bu sinyal proton derişimindeki değişimden, amonyak ve oksijen gibi gazların salınması ya da yükseltgenmesi, ışık emisyonu, absorpsiyon ya da reflektans, ısı emisyonu, kütle değişimi ve bunun gibi değişimlerden kaynaklanır. Sinyal dönüştürücü yardımıyla akım, potansiyel, sıcaklık değişimi, ışığın absorpsiyonu, ya da elektrokimyasal, termal, optik olarak ya da piezoelektrik anlamda kütle artışıyla ölçülebilir forma çevrilir. Sinyal ayrıca ileriki analizler için güçlendirilebilir, işlenebilir ya da depolanabilir [66].



Şekil 2.7. Biyosensörlerin genel yapısı [64]

Biyosensörler sekiz parametreye göre nitelendirilirler:

- 1- Duyarlılık: Cihazın ölçülecek maddedeki miktar değişimine bire bir cevap vermesi demektir.
- 2- Seçicilik: Cihazın sadece analiz edilecek maddedeki özgünlüğünü gösterir. Cihaz başka reaktiflere ilgi göstermez ve hatalı sonuç vermez.
- 3- Ölçüm aralığı: Cihazın ölçebildiğı analit derişiminin aralığıdır.
- 4- Ölçüm süresi: Cihazın ölçme hızını gösterir.
- 5- Tutarlılık: Cihazın sonuçlarındaki tutarlılığı belirtir.
- 6- Tespit sınırı: Cihazın tespit edebileceğı en düşük derişimini ifade eder.
- 7- Ömrü: Cihazın, performansında gözle görülür bir azalma olmadan verdiğı hizmet süresidir.
- 8- Kararlılık: Belirli bir süre içinde cihazın duyarlılığındaki değişimleri dikkate alan bir kalite ölçüm değeri [64].

### 2.2.1. Biyosensörlerin tarihçesi

Biyosensörlerin tarihi 1950'li yılların ortalarında L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD ) ameliyat sırasında kanın  $O_2$  miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons, Glukozoksidaz (GOD) enzimini  $O_2$  elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır. Böylece yeni bir analitik sistem oluşturmuşlardır. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifisikliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur. Bir biyolojik sıvıdaki glukoz ve çözünmüş oksijen elektrot etrafındaki membranı geçerek elektrot yüzeyine ulaştığında glukoz oksitlenerek glukonik aside dönüşür ve bu sırada  $O_2$  harcanır. Ortamdaki glukoz bittiğinde  $O_2$  elektrodu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözünmüş  $O_2$  ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glukozun oksidasyonu için harcanan  $O_2$  olup buradan biyolojik sıvıdaki glukoz miktarı hesaplanır [64].

### 2.2.2. Biyobileşen

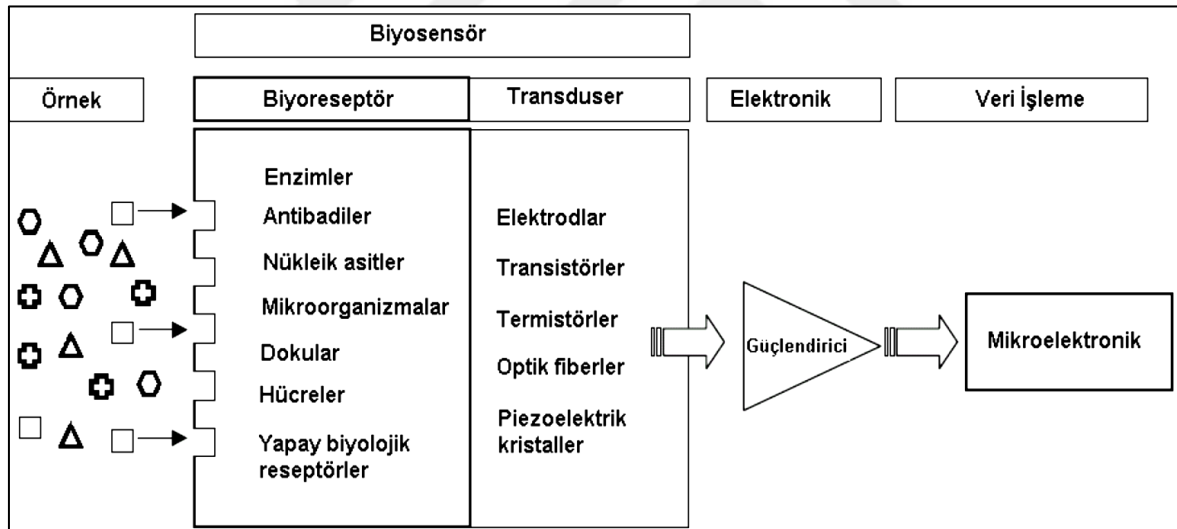
Biyosensörlerin biyobileşenleri sadece analitin seçici olarak tanınmasından sorumlu değildir, aynı zamanda dönüştürücü üzerinde izlenen kimyasal sinyalin oluşumu ve nihai olarak son cihazın duyarlılığından sorumludur. İki ayrı kategoriye ayrılabilirler: katalitik ve katalitik olmayan.

Katalitik grup; enzimleri, mikroorganizmaları ve dokuları içerir. Bu elementleri içeren cihazlar, metabolitlerin milimolar ile mikromolar aralığında izlenmesi için uygundur ve sürekli izleme için kullanılabilir. Katalitik olmayan (afinite) biyobileşen, antikorları (veya antijenler), lektinleri, reseptörleri ve nükleik asitleri içerir. Bu biyobileşenler, mikromolar ile pikomolar arasındaki derişimlerde hormonların, steroidlerin, ilaçların, mikrobik toksinlerin, kanser işaretleyicilerinin ve virüslerin ölçülmesinde tek kullanımlık cihazlar için daha uygundur [67].

### 2.2.3. Biyosensörlerin çalışma mekanizması

Biyosensörlerin çalışması esnasında, öncelikle biyosensör yüzeyi üzerine çözelti içerisinden substrat taşınır. Difüzyon, karıştırma vb. gibi çeşitli yöntemlerle substratın

taşınması gerçekleştirilebilir. Substrat bir gözenekli membran (selülozik diyaliz membranı gibi) üzerine absorplanmış veya dönüştürücü ile polimerik membran (selofan, selüloz, asetat/nitrat, polivinil alkol, poliüretan vb. ) arasına sandviç edilmiş veya polimerik bir jel içinde hapsedilmiş olan bir biyobileşenin aktif bölgesine difüzlenir. Biyobileşen polimerik olabilir. Hapsetme işlemi için akrilamid, jelatin, agaroz vb. gibi doğal ya da sentetik polimerler kullanılabilir. Substrat ile biyobileşen tepkimeye girerler. Gerçekleşen tepkime sonunda gaz molekülleri ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$ , vb. ) kullanılabilir ya da salınabilir, seçimli iyonlar oluşabilir ( $H^+$ ,  $NH_4^+$ , diğer tek değerlikli anyon ve katyonlar), ısı açığa çıkar veya kaybolur, optik yoğunluk değişebilir, elektron salınabilir ya da kullanılabilir. Biyobileşen ve substratın tepkimesi sonucunda meydana gelen ürün, dönüştürücü yüzeyine taşınır ve burada yukarıda anlatılan değişimler algılanıp elektriksel devrelerle ölçülebilecek bir boyuta çevrilir (Şekil 2.8). Ölçülen elektriksel sinyal ile analit derişimi doğru orantılıdır [68].



Şekil 2.8. Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması [69]

#### 2.2.4. Dönüştürücüler (transdüserler)

Dönüştürücüler biyosensörlerin biyo-algılayıcı işlemi ile üretilen sinyale cevap veren ve güçlendirilebilir, depolanabilir, görüntülenebilir ve analiz edilebilir bir formda cevabı çıkartılan fiziksel bileşenleridir. Bunlar, elektrokimya, elektrik iletkenliği, flüoresans, optik, kütle algılama ve spektrometri dahil olmak üzere birçok farklı fiziksel ilkeye dayanmaktadır [67].

Dönüştürücüler dört grupta incelenebilir:

1) Elektrokimyasal dönüştürücüler

- Amperometrik esaslı
- Potansiyometrik esaslı
- Konduktometrik esaslı

2) Optik dönüştürücüler

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

3) Kütle değişimini temel alan dönüştürücüler

4) Isı değişimini temel alan dönüştürücüler

- Termistörler

Ticari olarak üretilen tür ve sayıları, yayınlanan makale sayısı ve ölçülen madde çeşitleri dikkate alındığında, elektrokimyasal ölçüme dayalı sistemlerin diğerlerine kıyasla çok daha yüksek oranda ilgi gördüğü söylenebilir. En yaygın kullanılan elektrokimyasal algılayıcılar ise potansiyometrik ve amperometrik esaslı olanlardır [70].

### 2.2.5. Biyobileşen immobilizasyonu

Dönüştürücü ve biyobileşenlerin kombinasyonu ile oluşan biyosensörlerde, biyobileşenin dönüştürücü üzerinde sabitlenmesi aşılması gereken en önemli sorundur. Bu sabitleme işlemi biyobileşen immobilizasyonu olarak tanımlanır. Sabitleme işleminde farklı yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen dönüştürücü ve biyobileşene göre belirlenir. Immobilizasyon, biyobileşenin kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar [65].

### 2.2.6. Enzim immobilizasyonu

Endüstriyel uygulamalarda çoğunlukla sulu çözeltiler kullanıldığından, katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden tekrar elde edilmesi mümkün değildir. Serbest enzim, tepkime ortamından istendiği anda uzaklaştırılmaz ve bu nedenle

reaksiyonun kontrolü çok güç bir hal alır. Tepkimenin istenilen zamanda durdurulması için ortama enzimin etkinliğini durduran bir madde yani inhibitör eklenebilir. Fakat serbest enzim tarafından kirletilmiş olan tepkime ürünlerine inhibitör de yeni bir kirlilik unsuru olacaktır. Endüstriyel proseslerde bu faktörlerin tümü maliyeti oldukça arttırmaktadır. Bunun yanında serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar. Enzimlerin tekrar kullanımı maliyet açısından da önemlidir. Bundan dolayı enzimlerin bir matrikse immobilizasyonu gerçekleştirilir [71].

#### **2.2.7. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak malzemelerin özellikleri**

İmmobilize enzimlerin aktivitesi, mevcut yüzey alanı, gözeneklilik, hidrofilik karakter, reaksiyon koşulları ve immobilizasyon için seçilen metoda bağlıdır. Genel olarak, tüm enzimlerin immobilizasyonu için kullanılan malzemelerin aşağıdaki özellikleri taşıması gerekir:

- (a) enzim bağlanması için gerekli olan reaktif fonksiyonel grupların varlığı
- (b) mikro ortamdaki değişikliklerle kararlılık (pH, iyonik mukavemet)
- (c) enzim kararlılığını sağlamak ve sızıntıyı önlemek
- (d) substratların ve reaksiyon ürünlerinin serbestçe difüzyonuna izin vermek
- (e) tespit edilenlerin seçicilik ve duyarlılığını sağlamak
- (f) kolay hazırlanma ve düşük maliyet
- (g) immobilizasyon yönteminin enzimin aktivitesini değiştirebilen toksik veya denatüre reaktifler içermemesi [72].

#### **2.2.8. Enzim immobilizasyon metotları**

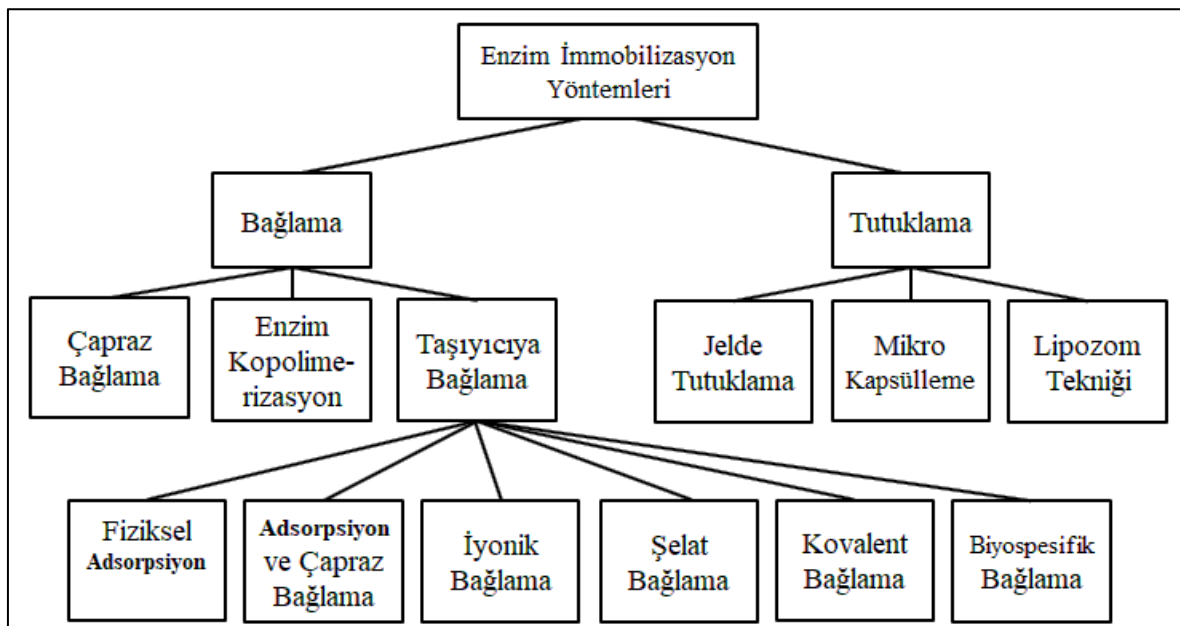
Enzimi sabitlemek için kullanılan yöntem, immobilize biyokatalizörleri içeren birçok pratik uygulama ve cihazın geliştirilmesi için önemli bir adımdır. 1950'de ilk kez enzim immobilizasyonu kullanılmaya başlanmıştır. Bundan sonra, enzim aktivitesini veya biçimini etkilemeyen ve geniş bir yüzey yelpazesine uygulanabilecek yeni ve daha etkili yöntemlerin geliştirilmesine yönelik önemli çabalar gösterildi [72]. Enzimin yüksek aktivite ile elektrot yüzeyinde ince tabaka içerisinde fiziksel olarak bağlanması kovalent veya kovalent olmayan metotlarla meydana getirilir. Basitçe immobilizasyon, serbest bir

enzimin elektrot yüzeyinde yarı geçirgen bir membran kullanılarak tutulması ile gerçekleştirilir [73].

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere üstünlükleri vardır. Bunlar;

- Süzme , santrifüjleme vb. gibi yöntemlerle reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi problemi ortadan kalkar.
- pH, sıcaklık vb. çevre koşullarına karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Serbest enzime göre daha karardır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini takip eden çok basamaklı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda, serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalama (otoliz) ihtimali azalır [74].
- Mekanik çalışmalar için uygundur.
- Otomatik işlemlere imkân verir.
- Endüstriyel boyutta önemli ekonomi sağlarlar [75].

Enzim immobilizasyon yöntemlerinin şematik olarak gösterimi Şekil 2.9'da verilmiştir.



Şekil 2.9. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Fiziksel veya kimyasal olarak immobilize edilen enzimlerin, diğer maddelerle etkileşimi daha azdır ve daha iyi bir kararlılık gösterirler.

### Taşıyıcıya bağlama yöntemleri

Taşıyıcıya bağlama enzim molekülünün protein yapısından yararlanılarak gerçekleştirilir. Bu bağlamada molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler görev alırlar.

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak olan taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekir. Immobilizasyon işlemi, oda sıcaklığı, nötral pH vb. gibi normal koşullarda yapılır. Taşıyıcı büyük ölçüde hidrofobik karakterli olmamakla birlikte suda çözünmemeli, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde, enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması, taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine engel olması, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımaya dikkat edilir.

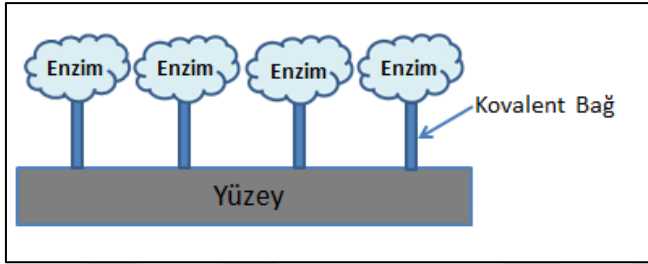
- Kovalent bağlama

Enzimlerin kovalent olarak reaktif taşıyıcılara bağlanma işlemi genellikle sulu ortamlarda yapılır. Reaktif taşıyıcı ve enzimdeki bağlanmaya olanak sağlayan fonksiyonel gruplar Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Enzimin bağlanmasını sağlayan fonksiyonel gruplar

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

Kovalent bağlanmanın enzim aktivitesi için gereksinim duyulan gruplar üzerinden yapılmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler sebebiyle bu grupların rahatsız edilmemesi enzimin taşıyıcıya bağlanmasında dikkat edilecek önemli noktalardır. Taşıyıcıya kovalent bağlanma enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar ile meydana gelir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Kovalent bağlama

- Adsorpsiyon

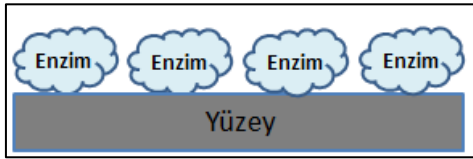
Enzim immobilizasyonunda uygulanan en eski ve en basit metottur. Suda çözünmeyen taşıyıcılarda adsorpsiyon yöntemi, enzim immobilizasyonunda fazlaca kullanılmaktadır.

Yöntemin temeli, enzim çözeltisi ile yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın karıştırılması ve fazla enzimin iyice yıkanarak uzaklaştırılmasına dayanmaktadır (Şekil 2.11). Van der Waals kuvvetleri enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan kuvvetlerdir. İyi bir adsorpsiyon meydana getirmek için genellikle adsorban bir ön işleminden geçirilmelidir.

Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, kalsiyum karbonat, kül, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nisasta, gluten ve kalsiyum fosfattır.

Suda çözünmeyen taşıyıcı üzerinde bir enzimin adsorpsiyonu çözücü, pH, sıcaklık, enzim-adsorban oranı ve iyon şiddeti gibi faktörlere bağlıdır. Adsorpsiyon için optimum koşulların saptanması, aktivitenin önemli ölçüde geri kazanılması için çok önemlidir. Adsorpsiyon mekanizması genellikle çok karışıktır ve birçok olasılıktan hangisinin meydana geleceğinin önceden belirlenmesi zordur.

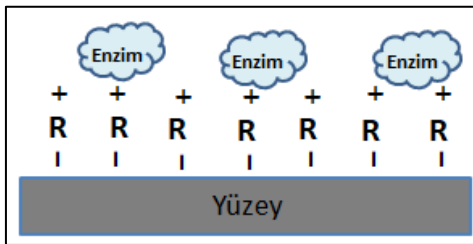
Yöntemin yararları; enzimin immobilizasyon işleminin basit olması, farklı şekil ve yükteki taşıyıcıları seçme imkanı vermesi ve immobilizasyonu uygularken aynı zamanda enzim saflaştırılmasına imkan tanımasıdır. Yöntemin zararları; immobilizasyon işleminin kolay olmasına rağmen optimum koşulların belirlenmesi çok zordur. Enzimle taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma olmazsa, bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçer ve ürünlerin kirlenmesine sebep olur.



Şekil 2.11. Adsorpsiyon

- İyonik bağlama

Suda çözünmeyen ve iyon değiştirme yeteneğine sahip taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanan bir yöntemdir (Şekil 2.12). Bazı durumlarda fiziksel adsorpsiyon da iyonik bağlama yanında etkili olmaktadır. İyonik bağlama çok yumuşak şartlarda meydana geldiğinden, enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe sebep olmaz. Ancak; enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığı için enzim kaşısı söz konusudur.



Şekil 2.12. İyonik bağlama

- Şelat bağlama

Bir takım transizyon metallerinin şelat yapma özelliklerine dayanarak enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması mümkündür. Yöntem ilk kez 1971 yılında uygulanmıştır ve daha sonra da kullanılmaya devam edilmiştir.

- Biyospesifik bağlama

Enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanılarak immobilizasyonunun yapıldığı yöntemdir. Lektinler, spesifik karbohidrat atıklarını içeren enzimlere kuvvetlice bağlanırlar.

Spesifik monoklonal antikorlarını suda çözünmeyen materyale bağlayarak hazırlanan taşıyıcılar ile enzim immobilizasyonu başarılı bir şekilde yapılmıştır.

#### Çapraz bağlama yöntemleri

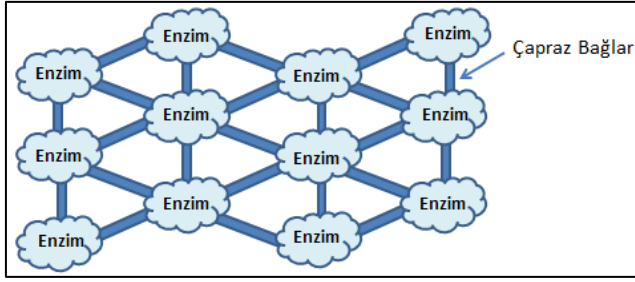
Enzim molekülleri arasında kovalent bağlar oluşturan küçük molekül, bi veya multi fonksiyonel reaktifler suda çözünmeyen kompleksleri meydana getirirler (Şekil 2.13). Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH ya da immobilize edilecek enzime oldukça bağımlıdır. Çapraz bağlanmada intermoleküler bağlanmalar ve intramoleküler bağlanmalar gerçekleşmektedir.

Bu yöntemde enzim immobilizasyonu 4 farklı şekilde gerçekleştirilir:

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

En çok bilinen çapraz bağlama reaktifleri; glutraldehit, heterosiklik halojenürler, kloroformat ve karbonildiimidazol, bioksiranlar, divinilsülfoler, pbenzokinon, transizyon metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir.

En çok kullanılan çağraz bağlama reaktifi glutraldehitdir.



Şekil 2.13. Çapraz bağlama

### Kopolimerizasyon yöntemleri

Enzimlerin kopolimerizasyon reaksiyonunda bir polimer matriksine monomerlerden biri gibi davranarak bağlandığı yöntemdir. Polimer matrikse tutuklamaya benzemektedir fakat bu yöntemin enzim kaçınsının önlenmiş olması gibi üstünlüğü bulunmaktadır.

### Tutuklama yöntemleri

Tutuklama prensip olarak bir enzim molekülünü belirli bir ortamda kalmaya zorlamaktır. Böylelikle enzim bulunduğu yerden dışarıya çıkamaz. İşlem, polimer matriks içindeki kafeslerde uygulanabilir veya yarı geçirgen membranlar içerisinde mikrokapsülleme ile gerçekleştirilebilir. Enzim molekülünün fiziksel ya da kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olması, bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özelliktir.

- Polimer matrikste tutuklama

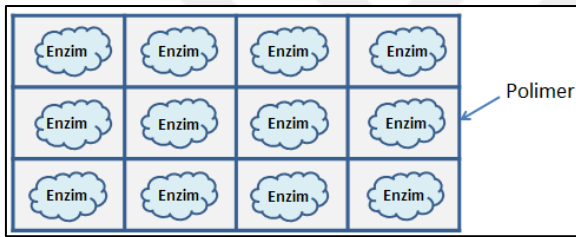
Enzimin polimerizasyon ve çapraz bağlamanın olduğu ortamda bulunması ile, çapraz bağlanma sonucu meydana gelen odacıklarda (kafes) tutuklanmasına dayanan yöntemdir (Şekil 2.14). Bu amaçla en çok kullanılan polimer; N,N'- metilenbisakrilamit ile çapraz bağlanmış poliakrilamittir.

Yöntemin temeli, enzim çözeltisi içinde yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin meydana getirilmesidir. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanıp, bunların ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir.

Uygun çaptaki substrat molekülleri polimer kafes içinde tutuklanmış enzim moleküllerine ulaşır ve reaksiyon ürünleri de dışarı çıkar. Bu tip immobilizasyon, ilk kez 1963 yılında tripsin, kimotripsin ve diğer enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmıştır.

Oldukça kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem olması ve çok az miktarlarda enzim kullanılarak gerçekleştirilebilir olması bu yöntemin yararlarıdır. İmmobilizasyon nötral ve suda çözünmeyen taşıyıcılarla da gerçekleştirilebilir ve kimyasal bir bağlanma olmadığı için yüklü taşıyıcıya ihtiyaç duyulmamaktadır.

Yöntemin zararları; immobilizasyon esnasında inaktivasyonun deney koşullarına oldukça bağımlı olması ve immobilize enzimin yalnızca küçük moleküllu substratlara karşı yüksek aktivite göstermesidir.



Şekil 2.14. Polimer matrikste tutuklama

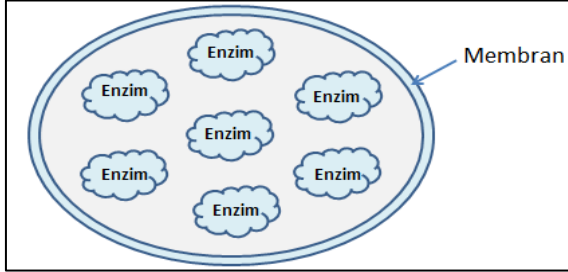
- Mikrokapşülleme

Bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasına dayanmaktadır (Şekil 2.15). Mikrokapşüllerin boyutları 1-100 µm arasındadır.

Kimyasal mikrokapşülleme, enzimler için daha çok kullanılan immobilize yöntemidir. Bu yöntemde enzim immobilizasyonu; sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen membran mikrokapşüllerde tutuklama olmak üzere iki grupta incelenebilir.

Sürekli mikrokapşüllerde membran katı, süreksiz mikrokapşüllerde lipozomlar ise bir sıvı tabakadır. İmmobilizasyonda kullanılan membranın yarı geçirgen olması gerekmektedir. Bunun yanında bu yarı geçirgen membranın gözenek çaplarının büyüklükleri substrat moleküllerinin kapsül içine girebileceği ve ürün moleküllerinin kapsülden dışarı

çıkabileceği ölçüde olmalıdır. Bu yöntemle immobilize edilmiş enzimin verimliliği substrat moleküllerinin boyutları ne kadar küçük olursa o ölçüde artacaktır [76].



Şekil 2.15. Mikroapsülleme

### 2.2.9. Elektrokimyasal esaslı biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler olarak amperometrik, potansiyometrik, yarı iletken, optik, kalorimetrik, piazoelektrik ve kuru reaktif kimyası esaslı biyosensörler hazırlanıp kullanılmaktadır.

- Amperometri esaslı biyosensörler

Genellikle, amperometri, bir elektrokimyasal hücrede uygulanan sabit bir potansiyeldeki akım değerinin veya yoğunluğunun ölçülmesine dayanır. Akım yoğunluğu, çözelti içindeki derişimleri ile orantılı olarak çalışma elektrodu yüzeyinde yükseltgenme – indirgenme yapan elektrokimyasal aktif parçacıkların varlığının bir fonksiyonudur. Elektroliz sırasında, çalışma elektrodu ölçülen maddenin doğasına ve uygulanan voltaj değerine bağlı olarak anot veya katot görevi görebilir.

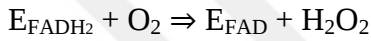
Amperometrik biyosensörler üç ana sınıfa ayrılabilir:

- Medyatörsüz (birinci nesil) amperometrik biyosensörler
- Medyatörlü (ikinci nesil) amperometrik biyosensörler
- Enzim ve elektrot arasında direkt elektron transferi kullanılan ( üçüncü nesil ) amperometrik biyosensörler

### Medyatörsüz amperometrik biyosensörler

Bunlar, doğal substratların derişiminin veya enzim reaksiyonu ürünlerinin ölçülmesine dayanan sensörlerden oluşur. Herhangi bir reaksiyon esnasında bazı ürünler üretilir ve bazı substratlar azaltılır. Oluşan ürünler elektroaktif ise, derişiminin doğrudan amperometrik sensör ile ölçülebilir. Genellikle bu tür reaksiyonları katalizleyen enzimler çeşitli oksidazlardır.

Gerçekleşen reaksiyonlar aşağıdaki gibidir:



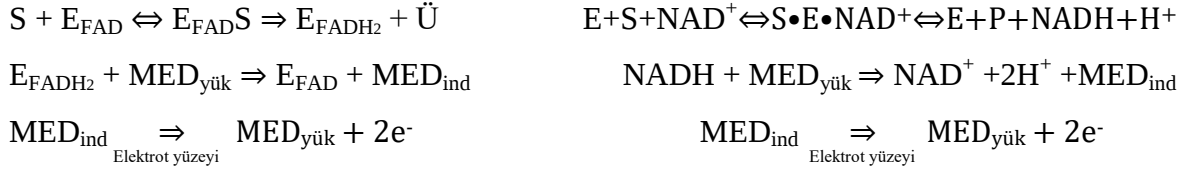
Birinci nesil amperometrik biyosensörlerin temel dezavantajları şöyledir:

- Tekrarlanabilir yüzey elde etmek için elektroda ön işlem uygulama gerekliliği, sensör cevabına elektrot geometrisinin etkisi;
- Biyosensör cevabına biyokatalitik ve yarı geçirgen membranlardaki parçacık kütlesinin etkisi;
- Özellikle uzun süreli uygulamalarda Faraday'ın işlemleri nedeniyle sensör kalibrasyonunun sürekli olarak düzeltilmesi gerekliliği;
- Çözeltideki spesifik olmayan partiküllerin karışması sonucunda oluşan girişim etkisinin sürekli olarak düzeltilmesi gerekliliği.

### Medyatörlü amperometrik biyosensörler

İkinci amperometrik biyosensör grubu, elektron taşıyıcıları olarak alternatif yükseltgeyici ajanlar yani medyatörlerin kullanıldığı dönüştürücülerden oluşur. Sonuç olarak, düşük potansiyellerle çalışılabilir, böylece oksijenin (oksidaz durumunda) ve sensör cevabı üzerine girişim yapan farklı maddelerin etkileri azalır. Genel olarak bir medyatör, elektronları enzimin redoks merkezi ile çalışma elektrodu arasında transfer eden küçük molekül kütleli maddelerdir.

Burada gerçekleşen reaksiyonlar şöyledir:



### Doğrudan elektron transferi temelli amperometrik biyosensörler

Üçüncü grup amperometrik biyosensörleri, enzim ve elektrot arasındaki direkt elektron transferi üzerine kuruludur. Bu olaya genellikle biyoelektrokataliz denir. Bu biyolojik sensörlerin temel özelliklerini diğer amperometrik sensörlerden ayıran en önemli özellik, elektrottan substrat molekülüne doğru, doğrudan elektron transferinin gerçekleştirilmesidir [77].

- Potansiyometri esaslı biyosensörler

Potansiyometri bilindiği üzere en genel anlamda çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümüne dayanmaktadır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi ile doğrudan analit derişimi tanımlanmış olur. Elde edilen sinyal Nerst Kanunu uyarınca derişiminin logaritması ile orantılıdır. Potansiyometrik ölçümlerde kullanılan başlıca sensörler pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyon ya da katyonlara duyarlı iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz duyarlı elektrotlardır [78].

### **2.3. Medyatör**

Elektron aktarım hızını arttırmak amacıyla amperometrik enzim elektrotlarda medyatörler kullanılmaktadır. Medyatörler indirgenmiş bir enzimi yükseltgeyebilen ve elektrot üzerinde tekrar yükseltgenebilen elektron aktarıcılardır. Medyatör kullanımı ile birlikte çalışılan yükseltgenme potansiyelleri düşürülerek ortamda bulunan hedef analit dışındaki diğer elektroaktif türlerin girişim etkisinin azaltılması ve ölçümlerin oksijen bağımlılıklarının azaltılması gibi üstünlükler ortaya çıkar.

İdeal bir medyatörde bulunması gereken özellikler: İndirgenmiş enzimle hızlı reaksiyon vermesi, kararlı indirgenmiş ve yükseltgenmiş formlarının olması, indirgenmiş halinin oksijenle reaksiyon vermemesi, çalışma koşullarında kararlı olması ve elektron aktarımı sırasında yan reaksiyonlara katılmaması, numunedeki diğer elektroaktif türlerden daha düşük bir redoks potansiyelinin olması ve toksik olmaması şeklinde belirtilebilir [79].

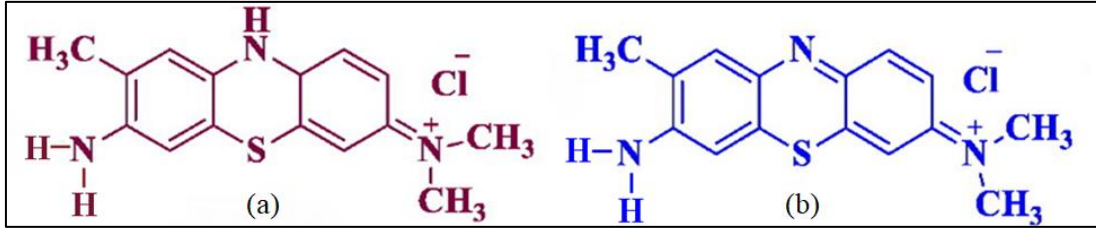
Medyatörler ölçüm çözeltisine ilave edilebilir veya elektrot yüzeyinde immobilize edilebilir. Çözeltiye ilave edilmesi immobilize edilmesine göre daha kolay fakat teknolojik değildir. Dahası, medyatör olarak kullanılan metilen mavisi, ftalosiyanın veya metil menekşe gibi organik renklendiriciler toksiktir, indirgemeye kararsızdır, pH duyarlıdır ve çoğunlukla kendiliğinden oksitlenebilirler. Bu nedenle immobilize edilmiş medyatörler daha ideal ve daha teknolojidir [77].

Biyosensör uygulamalarında; kinonlar ve türevleri, ferrosen ve türevleri, Alizarin sarısı, tetratiyafulvalen, potasyum hekzasiyanoferat, rutenyum heksammin gibi maddeler, metilen mavisi, toluidin mavisi gibi organik boyalar ve tetratiyafulvalentetrasiyanoquinodimetan, Prusya mavisi, tetrasiyanoquinodimetan, N-metil fenazyum-tetrasiyanoquinodimetan gibi iletken tuzlar medyatör olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [79].

### 2.3.1. Toluidin mavisi O

Tolonyum klorür olarak da bilinen toluidin mavisi, asitli doku bileşenlerini (sülfatlar, karboksilatlar ve fosfat kökleri) seçici olarak boyayan asidofilik metakromatik bir boyarmaddedir. Toluidin mavisi, nükleik asitler için bir afiniteye sahiptir ve bu nedenle yüksek DNA ve RNA içeriğine sahip dokularda bu nükleik asitler tarafından tutulur. Tiyazin grubunun bir üyesidir ve hem suda hem de alkolde kısmen çözünürdür.

Toluidin mavisi, 1856'da William Henry Perkin tarafından keşfedilmesinin ardından çeşitli tıbbi uygulamalarda tanınmış ve bundan sonra da ilk olarak boya endüstrisinde kullanılmıştır. Metilalanin veya aminotoluen olarak da bilinir. Temelde üç izoforma sahiptir; o-toluidin, p-toluidin ve m-toluidin [80]. Katyonik bir fenotiyazin boya olan Toluidin Mavisi O (o-toluidin) (Şekil 2.16), özel bir elektrokimyasal indikatör olarak kullanılan elektrokimyasal olarak aktif moleküllerden biridir [81].



Şekil 2.16. Toluidin mavisi O a)indirgenmiş b)yükseltgenmiş halleri [82]

## 2.4. İletken Polimerler

İletken polimerler metaller ve yalıtkanlar arası bir iletkenliğe sahip polimerlerdir. Metaller ve yarı iletkenlerde doğal olarak bulunmayan bazı malzeme özellikleri iletken polimerlerle elde edildiği için iletken polimerler genellikle sentetik metal veya organik 8 metal olarak da adlandırılmaktadır. Polimerler, ilk kullanımlarından bu yana elektriksel yalıtkanlığı iyi maddeler olarak bilinirler ve bu özelliklerinden dolayı elektriksel yalıtkanlığın arandığı kabloların kılıflanması gibi alanlarda önemli kullanım yerleri bulmuşlardır. Kolay işlenmeleri, esneklikleri, estetik görünümeleri, hafiflikleri ve kimyasal açıdan inert olmaları da üstün özellikleridir.

İletken polimerlerin yapılarındaki sırayla değişen tek ve çift bağlardan oluşan konjuge zincirler ve uzun konjuge çift bağlı zincirler, bunları diğer polimerlerden ayıran temel özelliktir. Bu nedenle iletkenlik özelliğine sahiplerdir. Dolayısıyla yalnızca konjuge olmuş polimerler elektriği iletebilirler. Bu polimerler çok önceleri değişik yöntemlerle sentezlenmelerine rağmen iletkenliklerinin farkına varılamadığı için önemsenmemiştir.

İlk kez, poliasetilen üzerine yapılan çalışmalar ile, bir polimerin elektriği doğrudan elektronlar üzerinden iletebileceği anlaşılmıştır. Shirakawa sentezlediği poliasetilenin iletkenliğini katkılama (doplama) yoluyla büyük ölçüde arttırmıştır. Çizelge 2.2’de bazı iletken polimer zincirlerinin kimyasal yapıları gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Konjüge yapıya sahip bazı iletken polimerler ve kimyasal formülleri

| Polimer          | Yapısı |
|------------------|--------|
| Poliasetilen     |        |
| Polipirol        |        |
| Politiyofen      |        |
| Poli-parafenilen |        |
| Polianilin       |        |

Günümüzde polipirol, polianilin, politiyofen, polifuran, poli(N-vinil karbazol) gibi çok sayıda polimerin iletken olduğu bilinmekte ve bunların toz, süspansiyon, film veya levhalar halinde ticari üretimi yapılmaktadır. İletken polimerler içerisinde polipirol ve polianilinin özel bir yeri vardır. Çizelge 2.3.'de çok bilinen iletken polimerlerin monomer ve polimer yapıları verilmiştir [83].

Çizelge 2.3. Bazı iletken polimerler ve kimyasal formülleri

| Monomer Formülü              | Polimer Adı      | Polimer Yapısı |
|------------------------------|------------------|----------------|
| $\text{HC} \equiv \text{CH}$ | Poliasetilen     |                |
|                              | Poli-parafenilen |                |
|                              | Politiyofen      |                |
|                              | Polianilin       |                |
|                              | Polipirol        |                |

Önemli iletken polimerlerden birisi olan Polipirol, kimyasal ya da elektrokimyasal yolla sentezlenebilir.

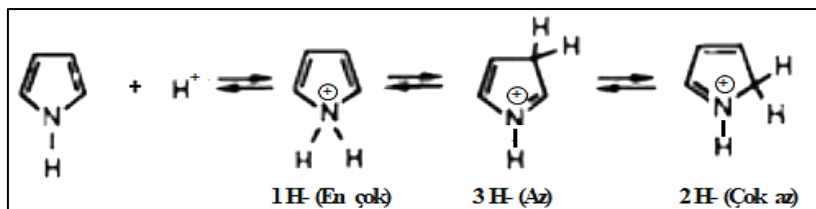
Kimyasal yöntemde, örneğin  $\text{Fe}^{+3}$  gibi bir yükseltgen kullanılırsa, toz halinde Polipirol elde edilir. Erimez ve çözünmez olduğu için kimyasal yöntemlerle elde edilen toz halindeki polipirolün işlenmesi söz konusu değildir, presleme gibi yöntemlerle ancak belli şekillere sokulabilir.

Polipirol filmler pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu ile hazırlanır. Levha ya da tambur şeklindeki elektrotlar kullanılarak farklı boyutlarda ya da sürekli polipirol filmler elde edilir [84]. Elektrokimyasal polimerizasyon ile oluşan polipirol, elektrot yüzeyinde çözünmeyen bir çökelti verir; diğer polimerlerden farklı olarak çökelmeyle polimerin molekül kütlesi sınırlanmaz. Polipirolün yapısı çözücüye, elektrolitin doğasına, elektrolit derişimine ve akım yoğunluğuna bağlıdır. Genellikle, uygun bir polipirol filminin yoğunluğu  $1,48 \text{ g/cm}^3$  tür. Sentezlenen polipirol, pirolen daha düşük bir potansiyelde yükseltgenebilmektedir [83]. Polipirol filmlerin mekanik özellikleri diğer iletken polimerlerden iyidir, atmosfer koşullarında daha kararlıdır [84].

#### 2.4.1. Pirol

Pirol, kaynama noktası  $131^\circ\text{C}$  olan bir sıvıdır. Kendine özgü ve hoş olmayan bir kokusu vardır. Suda ve organik çözücülerde çözünür. Derişik asitlerle veya ısıtılınca polimerleşebilir. İlk kez, havasız ortamda kemiklerin ısıtılarak damıtılmasıyla meydana gelen kırmızı renkli katrandan yalıtılmıştır. Taş kömürü katranında ve kemik, boynuz vb. gibi hayvansal artıkların saflaştırılmasıyla elde edilen katranlarda bulunur.

Pirolün N-, 2- ve 3- yerlerine proton bağlanabilir; her üçünde de pozitif yük “N” üzerinde bulunur (Şekil 2.17). Bunlardan  $\text{NH}_2^+$  türü (1H-türü), 2H- ve 3H- türlerinden daha fazladır.



Şekil 2.17. Pirolün kararlı rezonans sınır formülleri [83]

#### 2.4.2. Pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu

Pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu sulu veya susuz çözeltilerde ve oksijensiz ortamlarda anodik indirgenme ile başlayıp devam eder. Burada radikal katyonlar ilk olarak dimerleşip ardından tekrar yükseltgenmekte veya başka monomere katılıp ardından yükseltgenmektedir.

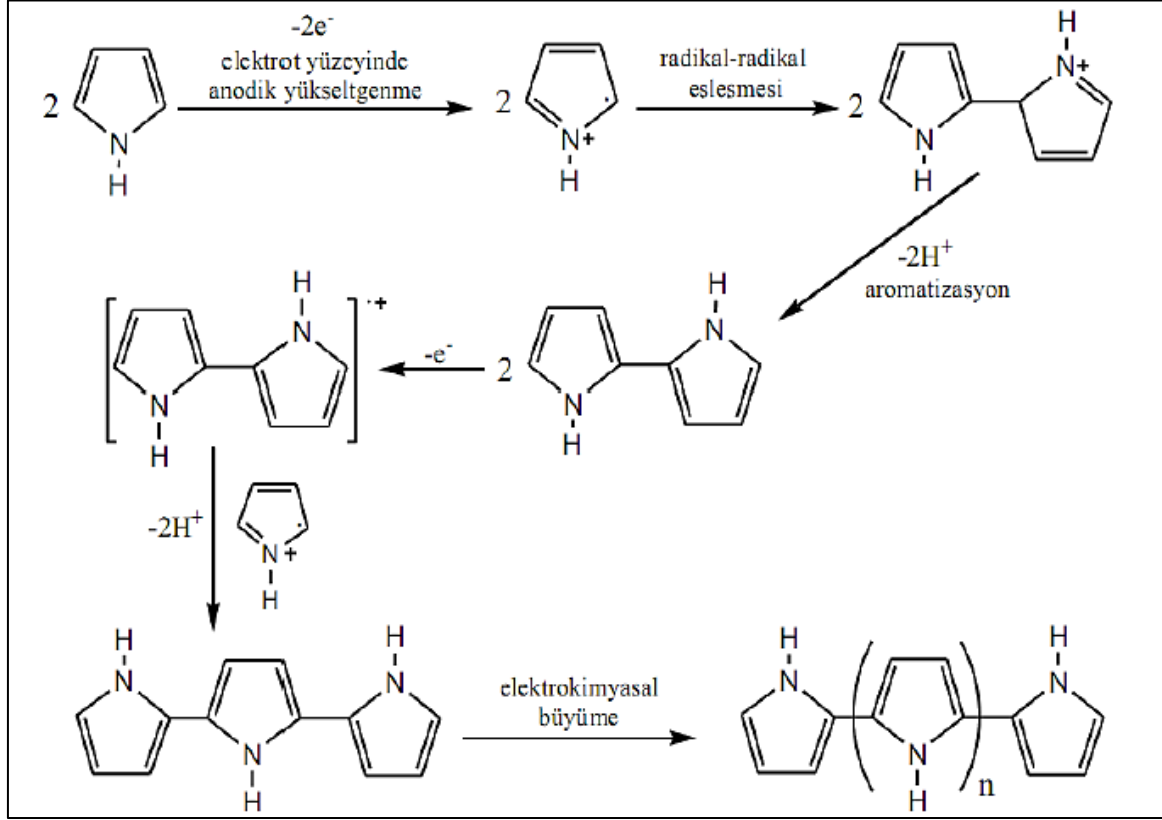
Yükseltgenme sonucunda dikasyon oluşur. Daha sonra dikasyon iki proton kaybedip nötürleşir. Nötürleşmeden sonra yeniden yükseltgenme ile başlayan basamağa döner ve bu mekanizma polimerleşme duruncaya kadar tekrarlanır (Şekil 2.18). Deney koşullarına bağlı olarak oluşturulan polimerin yapısı, mol kütlesi, iletkenliği ve fiziksel dayanıklılığı değişkenlik gösterir.

Çözücü olarak çoğunlukla dielektrik sabiti yüksek olan fakat nükleofilik karaktere sahip olmayan organik çözücüler kullanılır. Anot olarak platin levha, camı karbon veya indiyum kalay oksit (ITO) camı tercih edilmektedir. Elektrolitlerin yüksek potansiyellere karşı dayanıklı olması gerekir ve genellikle tetra alkilerin  $\text{BF}_4^-$  veya  $\text{ClO}_4^-$  tuzları tercih edilir. Bu anyonlar polimerler için en uygun dopantlardır.

Aşırı yükseltgenmeye neden olmaması için anot potansiyeli düşük tutulmalıdır. Aşırı yükseltgenen bir polimerin ana zincirindeki konjuge çift bağlar kırılırsa konjugasyon kesintiye uğrar ve iletkenlik azalır. Örneğin polipirol sulu çözeltide  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  referans elektroduna göre +0,8 volttan daha yüksek potansiyellerde aşırı oksitlenerek iletkenliğini kaybedebilir.

Öncelikle pirol katyon radikali elektrot yüzeyinde meydana gelir. Ardından proton çıkışı ile dimerizasyon gerçekleşir. Monomere kıyasla dimer biraz daha kolay yükseltgenir. Bu nedenle sonraki eşleşme tepkimelerine izin vermek için tekrar yükseltgenir. Polimerin yükseltgenme potansiyeli her zaman monomerin yükseltgenme potansiyelinden daha düşüktür. Polimer elektrokimyasal olarak iletken bir hale iyonlaşır. Sonuç olarak destek elektrolitin karşıt iyonu ile eşleşerek elektriksel nötrallik sağlanır. Anyonlar gibi negatif yüklü moleküller de elektrokimyasal polimerleşme sırasında elektrolitik çözelti içerisinde bulunabilir. Pozitif yüklü polimer iskeletine birçok biyolojik tür katkılanabilir veya

polimer içerisinde tutuklanabilir. Elektrokimyasal polimerleşmenin meydana geldiği sırada katılanma işleminin eşzamanlı olarak gerçekleşmesi de mümkündür [85].



Şekil 2.18. Pirolün elektrokimyasal yükseltgenme ile polimerleşme mekanizması [85]

## 2.5. İdeal Biyosensör Performans Faktörleri

Enzim sensörlerinin ne kadar kullanılabilir olduğunu, çalışma niteliklerini ve verimini belirleyen beş önemli faktör bulunmaktadır;

### Kararlılık

Diğer faktörlerde yeterli koşullar sağlandıktan sonra bir enzim elektrodunun kullanılabilirliğinin en önemli göstergelerinden biri, biyosensör ömrünün uzunluğu hakkında fikir veren kararlılıştır. Biyosensörün uzun ömürlü olması aynı materyalle fazla sayıda analiz yapılabileceğini gösterir. Bu durum iş gücünü ve maliyeti düşürmesi açısından oldukça avantajlıdır. Başta organik moleküller olmak üzere tüm maddeler doğada yıkıma uğrarlar. Bu nedenle biyosensörlerin de belli bir ömürleri vardır.

Biyosensör ömrü depolama ve çalışma şartları olarak başlıca iki durumda incelenir. Kullanılmadan ideal koşullarda depolanan biyosensör ömrü ile sürekli çalışma koşullarındaki biyosensör ömrü doğal olarak farklıdır. Enzim sensörünün kararlılığı biyolojik materyal açısından incelendiğinde enzimin saflık derecesi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi gibi değişkenlerin önem taşıdığı görülür. İmmobilizasyon yöntemine göre değerlendirildiğinde; kimyasal yöntemlerle hazırlanan biyosensör ömrü fiziksel yöntemlerle hazırlananlara göre daha uzundur. Enzimin saflık derecesi arttıkça doğal ortamındaki bileşenlerinden uzaklaşması nedeniyle kararlılıkta azalma gerçekleşebilir.

### Duyarlılık

Doğrusal aralık, kalibrasyon grafiğinde substrat derişimiyle akım cevabı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu derişim aralığıdır. Bu doğrusal grafiğin en alt sınırına tayin sınırı denir. Bu değer bir kesinlik ve doğruluk ifade etmektedir. Tayin sınırı kalibrasyon grafiğinin, doğrusal kısmının uzatılarak x eksenini kestiği noktadan bulunur.

Potansiyometrik enzim sensörlerinde kalibrasyon grafiği substrat (veya ürün) derişiminin logaritması ile potansiyel arasında çizilir. Amperometrik enzim sensörlerinde ise substrat (ya da ürün) derişimiyle akım arasında doğrusal grafikler elde edilir. Tayin sınırının genel olarak  $10^{-5}$  M'dan daha düşük bir değer olması önemlidir. Diğerlerine kıyasla amperometrik enzim sensörlerinde oldukça yüksek duyarlılıklar elde edilmektedir. Doğrusal çalışma aralığının ve tayin sınırının çalışma için uygunluğu, analizi yapılacak olan maddenin analiz ortamındaki düzeyi ve girişim yapabilecek diğer maddelerle birlikteliğinden önemli ölçüde etkilenmektedir.

Ayrıca biyosensör cevabını etkileyen değişkenlerin doğrudan sensör kalibrasyonunu etkileyeceği gözden kaçırılmamalıdır. Enzim sensörlerine bakıldığında sensör cevabını etkilemesi sonucu tayin aralığını değiştirebilenler başlıca faktörler pH, sıcaklık ve girişim yapan maddelerdir. Optimum pH'dan uzaklaşıldığı durumda biyoaktif tabakadaki toplam enzim aktivitesinde değişimler gerçekleşebilir. Optimum sıcaklıktan uzaklaşıldığında enzim sensörünün cevabı olumsuz yönde etkilenir. Buna karşın çeşitli kimyasal türlerin difüzyon hızlarının sıcaklıkla artması ile birlikte enzim sensör cevap akımını yükseltir. Herhangi bir girişim yapan madde enzim sensörü cevabına temel olarak üç şekilde etki

edebilir. Bu etkileşimlerden ilki, girişim yapan maddenin etkisini temel sensör üzerinde, ikincisi biyoaktif tabakadaki enzim üzerinde, üçüncüsü enzimatik tepkimedeki bileşikler üzerinde göstermesiyle gerçekleşir.

### Seçicilik

Diğer analiz sistemleri ile karşılaştırıldığında seçicilik biyosensörler için en önemli özelliktir. Enzimler, genel olarak spesifik enzimler haricinde seçicilik sırasında antikor ve nükleik asitlerden sonra gelmektedirler. Buradan mutlak spesifik bir enzim konu olduğunda seçiciliğin en üst seviyelere yükseleceği söylenebilir.

Seçiciliği etkileyen; sensörle girişimler, biyokatalizörle girişimler ve pH gibi bazı parametreler vardır. Sensörde meydana gelebilecek girişimleri önlemenin en iyi yolu örnekteki girişim yapan maddelerin etkilemediği, tepkime bileşenlerinin bir tanesine duyarlı bir sensör kullanmaktır. Böylece bu problem bir çözüme kavuşturulabilir. Ortamın pH'ı da enzim ve sensöre değişik şekillerde etki edebilir. Her enzimin aktivitesini en yüksek düzeyde gösterdiği bir optimum pH'ı bulunmaktadır. Taşıyıcının yapısından kaynaklı, immobilizasyon sonrası bazı hallerde optimum pH'da kaymalar gerçekleşebilir. Ayrıca söz konusu enzimatik tepkimede yüklü substratların bulunması halinde pH'a bağlı olarak bu substratların yük durumlarındaki değişimler de seçicilik üzerine etki edebilir. Sabit bir potansiyelde çalıştıkları halde amperometrik sensörlerin spesifikliği potansiyometrik sensörlere göre daha yüksektir.

### Yanıt süresi

Pratik bir işlem sonucunda çok kısa bir sürede sonuç alınabilmesi nedeniyle biyosensörlerin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Aşağıda verilen üç aşama bir biyosensörün yanıt süresini etkileyen olaylardır;

1. Analiz ortamından membran yüzeyine substratın difüzyon hızı,
2. Substratın membran içine difüzlenme hızı ve biyokatalizörün aktif merkezi ile ne kadar hızlı tepkime verdiği,
3. Meydana gelen ürünün sensör yüzeyine ne kadar hızlı difüzlendiğidir.

Çözeltinin karıştırılma hızı, substrat derişimi, enzim derişimi, pH, sıcaklık ve sensör yüzeyinde herhangi bir membranın kullanılıp kullanılmadığı ve kullanılıyorsa membranın niteliği ile kalınlığı ve yapısı bu üç olayı etkileyen temel unsurlardır.

Yanıt süresi genellikle birkaç saniye ile birkaç dakika arasında değişmektedir. 5 dakikaya kadar olan değerler kabul edilebilir fakat 10 dakikaya kadar çıkan süre fazla uzun kabul edilir.

### Tekrarlanabilirlik

Basit olarak aynı örnek ile arka arkaya ölçümler alınarak bulunan değerlerden standart sapma veya korelasyon katsayısının hesaplanması ile belirlenir. Hazırlanacak olan enzim sensörü ile tekrarlanabilir sonuçlar alınmasında enzim aktivitesi, kararlılığı ve saflık düzeyi oldukça yüksek öneme sahiptir [86].

## **2.6. Kaynak Araştırması**

J.M. Kauffmann ve diğerleri tarafından, elektrolit yüzeyinde ChOx tarafından üretilen  $H_2O_2$  tayinine dayanan bir kolin biyosensörü geliştirildi. Biyosensör, bir yaban turbu peroksidaz (HRP) immobilizeli katı karbon pasta elektrotuna (sCPE) tutturulan ChOx'dan oluşturuldu. HRPscPE, redoks medyatörü olan fenotiyazin molekülü ve bir diyaliz membranı kullanılarak elektrot yüzeyinde fiziksel olarak tutulan ChOx içeriyordu. Medyatör miktarı, uygulanan potansiyelin etkisi gibi çeşitli parametreler çalışıldı. Kolin ölçümleri 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,4) içinde gerçekleştirildi. Kolinin amperometrik olarak tayini 0,0 mV'lık bir potansiyelde yapıldı. Tayin sınırı  $1,0 \times 10^{-7}$  M ve doğrusal çalışma aralığı  $5,0 \times 10^{-7}$  -  $7,0 \times 10^{-5}$  M olarak bulundu. Bu biyosensör, fosfatidilkolinden (PC) salınan kolinin saptanması için kullanıldı [9].

Francesco Palmisano ve diğerleri tarafından, ChOx enziminin aminopropil modifiyeli gözenekli cam boncuklar üzerinde glutaraldehitte eşleştirilmesi ile immobilize edilmiş bir enzim reaktörü (IMER) hazırlanmıştır. ChOx-IMER, bir akış enjeksiyon konfigürasyon sisteminde, aşırı oksitlenmiş polipirol film ile modifiye edilmiş Pt yüzeyine dayalı bir amperometrik sensöre bağlanmıştır. Ortaya çıkan analitik cihaz, koline seçici olarak tepki vermiş ve  $46,9 \pm 0,2 \mu C \text{ mM}^{-1}$ 'lik bir hassaslık ve 3'e eşit bir sinyal-gürültü oranında

hesaplanan tayin sınırı  $7\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Hassasiyet yaklaşık 20 gün boyunca sabit kalmış ve daha sonra yavaş yavaş bozulmaya başlamıştır. 2 ay sonra başlangıç hassasiyetinin % 70'i korumaya devam ettiği belirlenmiştir. Bu uygulama süt hidrolizatlarında kolin tayini için gösterilmiştir [28].

Richie L.C. Chen ve diğerleri tarafından, biyokatalizör immobilizasyonu için destek materyal olarak doğal kireçli zar kullanarak bir amperometrik kolin biyosensörü geliştirildi. Kolin oksidaz, kitin yapısındaki zara kovalent olarak immobilize edildi ve sonra bir amperometrik akış hücresinin platin elektrotuna bağlandı. Akış hücresi, önerilen FIA sisteminin kolin tayin cihazı olarak kullanıldı. Sensör sinyalinin, düşük tayin sınırı ve yüksek tekrarlanabilirlik ile kolin derişimiyle doğrusal olarak ilişkili olduğu belirlendi. Sistemin, sentetik kimyasalların veya doğal ürünlerin kolinesterazı engelleyici etkilerinin ölçülmesinde yararlı olduğu kanıtlandı [29].

Qiang Chen ve diğerleri, ChOx ve poli(etilenimin) (PEI) ve poli(dialildimetilamonyum klorür) (PDDA) gibi polikasyonları kullanarak kolin biyosensörlerinin yapımı için katmanlı biriktirme tekniği kullanmışlardır. Amperometrik kolin sensörleri hazırlamak için bir platin elektrot ChOx / PEI veya ChOx / PDDA ince film ile kaplamışlardır. Sensörlerin amperometrik cevaplarının polikasyonların türüne bağlı olduğunu göstermişlerdir. ChOx / PDDA filminin, kolinin geçirgenliğini bastırdığı ve ChOx / PEI film tabanlı sensörlerinkinden daha düşük yanıt verdiğini belirlemişlerdir [30].

Qiang Chen ve diğerleri tarafından, kolin tayini için ChOx, çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNTs), altın nanopartiküller (GNp) ve poli(Dialildimetilamonyum Klorit)den oluşan nanokompozit filme dayalı yeni bir amperometrik kolin biyosensörü geliştirildi. GNp dekoreli çok duvarlı karbon nanotüpler klasik kimyasal yöntemle sentezlendi ve -SH ve altın(Au) arasındaki özel etkileşim yoluyla MWCNTs üzerine bağlandı. ChOx enzimi MWCNTs-GNp matrisine bağlı ve ayrıca elektrostatik olarak PDDA ile sadece bir dağıtıcı değil, aynı zamanda bir bağlayıcı malzeme olarak adsorbe edildi. Sentezlenen MWCNTs-GNp'nin mikroskobik yapısı ve bileşimi transmisyon elektron mikroskobu ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi ile karakterize edildi ve elde edilen kolin biyosensörlerinin özellikleri elektrokimyasal ölçümler ile izlendi. Hassasiyet ve seçiciliği dikkate alınarak kolin tayini için çalışma potansiyeli 0,35V seçildi. Elde edilen biyosensörün 0,001-0,5 mM

kolin aralığında geniş doğrusallık sergilediği belirlendi. Ayrıca, iyi tekrarlanabilirliği, girişimi bastırma yeteneği ve uzun ömürlü olduğu tespit edildi [31].

C.S. Pundir ve diğerleri tarafından, camsı karbon elektrodun (GCE) yüzeyinde elektrobirikime tabi tutulan karboksilatlı çok katlı karbon nanotüplerin (c-MWCNT) ve zirkonyum oksit nanopartiküllerinin ( $ZrO_2NP$ ) nanokompozitinin üzerine AChE ve ChOx'un birlikte immobilizesi ile çift enzimli kolin biyosensörü oluşturuldu. Çalışma elektrodu olarak AChE-ChO/c-MWCNT/  $ZrO_2NPs$ /GCE, referans elektrot olarak Ag / AgCl ve karşıt elektrot olarak Pt tel kullanıldı. Enzim elektrodu, taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier dönüşümü kızıl ötesi (FTIR) spektroskopisi ve dönüşümlü voltametri (CV) çalışmaları ile karakterize edildi, optimize edildi ve değerlendirildi. Biyosensörün pH 7,4 ve 25°C de +0,2 V çalışma potansiyelinde, 4 saniye içinde iyi yanıt verdiği gözlemlendi. Biyosensörün tayin sınırı ve çalışma aralığı sırasıyla 0,01  $\mu M$  ve 0,05-200  $\mu M$  olarak bulundu. Enzim elektrotunun yarı ömrü 60 gün olarak belirlendi. Biyosensör ile ölçülen serum kolin seviyesi, görünüşte sağlıklı kişilerde 9,0-12,8  $\mu mol / L$  (ortalama 10,81  $\mu mol / L$ ) ve Alzheimer hastalığı olan insanlarda 5,0-8,4  $\mu mol / L$  (ortalama 6,53  $\mu mol / L$ ) olarak belirlendi. Enzim elektrodun, bir takım girişim yapan maddelerden etkilenmediği görüldü [32].

Takeshi Shimomura ve diğerleri, 12 nm gözenek çapı (F127M) olan hibrid bir mezo-gözenekli zar içerisinde, immobilize ChOx kullanarak bir kolin biyosensörü hazırladılar. Ölçümleri, enzimatik kolin oksidasyonunun bir ürünü olan  $H_2O_2$  tayinine dayanarak yaptılar. Çalışma aralığı ve yanıt süresini, sırasıyla 5,0-800  $\mu M$  ve yaklaşık 2 dk olarak buldular. Sensörün, basit enzim sensörüne kıyasla çok kararlı olduğunu ve ilk aktivitenin %85'inin, 80 gün boyunca saklandıktan sonra bile korunduğunu gösterdiler. Bu sonuçlardan, kolin oksidazın başarıyla immobilize edildiğini, iyi stabilize gösterdiğini ve aynı zamanda enzim tepkimesinin verimli bir şekilde ilerlediğini belirlediler. Hibrid mezo-gözenekli membran F127M'nin bu yeteneği ile, elektrokimyasal biyosensörler için kullanılacak enzimin etkili bir şekilde immobilizasyonunun yapılabileceğini sundular [33].

Yoon-Bo Shim ve diğerleri tarafından, bir ChOx enzimi ve bir ChOx/HRP enziminin poli(-5,2':5',2''tertiyofen-3'-karboksilik asit) (poli-TTCA) modifiyeli elektrotlar (CPME) üzerine kovalent immobilizasyonu ile amperometrik kolin biyosensörü üretilmiştir. İlkinde

+ 0,6V'luk bir çalışma potansiyelinde kolin çözeltisinde enzimatik olarak üretilen  $H_2O_2$ 'nin yükseltgenmesine dayanılarak çalışılmıştır. ChOx / HRP ile modifiyeli elektrotta, -0,2V potansiyelde kolin çözeltisinde  $H_2O_2$  indirgeme işlemi kullanılmıştır. Uygulanan potansiyel, pH ve sıcaklık gibi sensörlerin hassasiyetini etkileyen parametreler optimize edilmiştir. İki sensörün performansları karşılaştırıldığında, ChOx / HRP/ CPME 'a dayalı olanın doğrusal aralığı  $1,0 \times 10^{-6}$ - $8,0 \times 10^{-5}$  M arasında ve ChOx/ CPME 'a dayalı olanın  $1,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-5}$  M olarak bulunmuştur. Biyosensörlerin tayin sınırları sırasıyla yaklaşık  $1,0 \times 10^{-7}$  M ve  $4,0 \times 10^{-7}$  M olarak belirlenmiştir. Sensörlerin cevap süresi 5 saniyeden az olarak bulunmuştur. Sensörlerin, girişim yapan türlere karşı yüksek seçicilikleri gösterilmiştir. ChOx / HRP / CPME'ye dayalı sensörünün raf ömrünün, ChOx / CPME'ye göre daha uzun olduğu tespit edilmiştir [34].

Keeley L. Baker ve diğerleri, sensör duyarlılığı,  $O_2$  etkileşimi ve seçicilik gibi in vivo izleme için önemli hususları araştıran, beyin hücre dışı kolinin saptanması için birinci nesil biyosensörün gelişimini açıkladılar. Kolin biyosensör tasarımlarının kapsamlı optimizasyonunu, koline karşı yüksek hassasiyete sahip bir biyosensör ile sonuçlandırdılar ( $0.54 \pm 0.03$  nA/ $\mu$ M). Oksijen girişim çalışmaları, atmosferik  $O_2$  seviyelerine (200  $\mu$ M) kıyasla, 50  $\mu$ M  $O_2$ 'de akımda % 1'lik bir düşüş olduğunu gösterdi; bu sensör ile, fizyolojik  $O_2$  dalgalanmalarıyla ilişkili akımdaki değişikliklerden bağımsız olarak güvenilir kolin tayini yapılabileceğini gösterdiler. Beyinde bulunan fizyolojik olarak önemli endojen elektroaktif tür olan askorbik asit (AA) 'nın girişimini permselektif membran olarak polifenilen diamin (PPD) kullanılarak düşürdüler. Biyosensörün, kolini başarıyla tespit ettiği belirlendiler [35].

Yiting Wang ve diğerleri tarafından, MWCNT ve ZnO nanopartiküllerinin sinerjik etkisine duyarlı olan hassas ve kararlı bir kolin / asetilkolin biyosensörü geliştirildi. Bu çok katmanlı yapı ile kolin ve asetilkoline hızlı bir amperometrik yanıt veren, ChOx ve AChE'nin biyoaktivitesini muhafaza eden uygun bir mikro çevre sağlandı. Nanomalzeme esaslı kolin / asetilkolin sensörün oldukça duyarlı ve uzun süreli raf ömrünün (90 gün) olduğu belirlendi. 1,0 ünitelik ChOx ve AChE yükleyerek hazırlanan sensörün, sırasıyla doğrusal çalışma aralıkları 1,0  $\mu$ M - 0,8 mM ve 1,0  $\mu$ M – 1,0 mM, duyarlılıkları 178  $\mu$ A mM<sup>-1</sup>cm<sup>-2</sup> ve 180  $\mu$ A mM<sup>-1</sup>cm<sup>-2</sup> ve tayin sınırları 0,3  $\mu$ M olarak bulundu. Hazırlanan sensör insan kan plazması örneklerinde kolini saptamak için kullanıldı ve elde edilen

sonuçların HPLC-MS/MS analizinde bulunan kolin miktarları ile tutarlı olduğu saptandı [36].

J. Langer ve diğerleri, kolin tayini için, kolin oksidazı kontrollü gözenekli ve nanometre kalınlığında nano-yapılandırılmış polianilin tabakalarında immobilize ederek polianilin-kolin oksidaz (PChOx) biyosensörünü geliştirdiler. Kontrollü bir kalınlığa sahip polianilin filmi hazırlamak ve enzim moleküllerinin immobilizasyonu için elektrokimyasal teknikler kullandılar. Bir PChOx sensörünün elektriksel yanıtının kolin derişimine bağı ve duyarlılığının amperometrik olarak  $5 \mu\text{A} / \text{mM}$ , potansiyometrik olarak  $10 \text{ mV} / \text{mM}$  değerine ulaştığını belirlediler.  $+0,4 \text{ V}$ 'luk sabit bir potansiyelde çalıştılar ve askorbik aside ait girişim etkisi olmadığını gösterdiler. Ayrıca biyosensörün 1 aylık depolama süresince enzim aktivitesini kaybetmediğini belirlediler [37].

Fangqiong Tang ve diğerleri bu çalışmada, oldukça duyarlı bir kolin biyosensörü oluşturmak için altın nanokorlarını kullanmışlardır. Kolin biyosensörlerini, bir sol-jel yöntemi ile Au nanorodlardan ve polivinil alkolden (PVA) oluşan kompozit immobilizasyon membranı matrisine ChOx'ın immobilizesi ile oluşturmuşlardır. Dönüşümlü voltamogramlar (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisinin (EIS), altın nanorodların PVA modifiyeli enzim elektrodunun elektriksel iletkenliğini artırabileceğine dair kanıt sağladığını göstermişlerdir. Deneysel sonuçlar ile, modifiye elektrodun akım cevabının nanorodsuz olana göre birkaç kattan daha büyük olduğunu göstermişlerdir. Biyosensörlerin deney koşulları optimize edilmiş ve elde edilen elektrotların doğrusal aralık, tekrarlanabilirlik, tepki süresi ve kararlılığına göre performansını da sunmuşlardır [38].

Merve Özdemir ve diğerleri, kolin oksidazın elektrokimyasal olarak polimerize olan PPy-PVS filmi üzerine tutuklanma tekniğı ile immobilizasyonuna dayanan bir amperometrik kolin biyosensörü geliştirmişlerdir. pH ve sıcaklığın etkilerini araştırmış ve optimum parametreleri sırasıyla  $9,0$  ve  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  olarak bulmuşlardır. Bölgede  $1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$  ( $R^2 = 0,997$ ) ve  $1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$  ( $R^2 = 0,986$ ) arasında iki doğrusal aralık belirlemişlerdir. Enzim elektrodunun raf ömrü ve tekrarlanabilirliğini de çalışmışlardır [39].

Guoli Shen ve diğerkleri tarafından, kolin oksidaz ve yaban turbu peroksidazı (HRP) olmak üzere iki enzim kullanarak kolinin tayini için bir amperometrik enzim biyosensörü geliştirildi. Biyosensör, bir HRP immobilizeli karbon pasta elektrotuna çapraz bağlanmış ChOx'dan oluşturuldu. Biyosensör, HRP enzimi ve tiyonin monomerini içeren bir karbon macunu içinde, politiyoninin yerinde elektropolimerizasyonu ile hazırlandı ve daha sonra ChOx, kitosan filmi kullanılarak glutaraldehit ile çapraz bağlama yoluyla immobilize edildi. Yerinde elektrojenlenmiş politiyoninin, HRP enzimi ve elektrot yüzeyi arasında elektron dönüşümünü iyi bir verimle sergilediği ve macun içindeki enzim immobilizesine iyileşme sağladığı gösterildi. Tiyonin ve enzim miktarı, uygulanan potansiyel, pH, vb. gibi parametreler çalışıldı. Kolinin amperometrik olarak tespiti, 1/15 M fosfat tampon solüsyonunda (pH 7,4) doymuş kalomel elektrotu karşı  $\pm 0,2$  V uygulanan bir potansiyelde,  $5,0 \times 10^{-6}$  ve  $6,0 \times 10^{-4}$  M kolin arasında doğrusal bir tayin aralığında ve 15 s'lik bir tepki süresi ile gerçekleştirildi. Serum numunelerindeki fosfatidilkolinin analizi için uygulandığında, biyosensör sonuçları ile hastane yöntemiyle elde edilenler arasında 0,997'lik bir korelasyon elde edildi [40].

Jing-Juan Xu ve diğerkleri,  $H_2O_2$  varlığında  $MnO_2$  nanopartikül modifiye edilmiş elektrotun bir reaktivite modunu bildirmişlerdir.  $MnO_2$  nanopartikül modifiye elektrotları,  $H_2O_2$ 'nin indirgenme/ yükseltgenmesine yönelik iki yönlü elektrokatalitik bir yeteneği özelliğine dayanarak, kolin biyosensörü, camı karbon (GC) elektrot üzerine kitosan hidrojel, kolin oksidaz ve  $MnO_2$  nanopartiküllerinden oluşan bir biyo-kompozitin doğrudan elektrokimyasal birikimi ile oluşturmuşlardır. Biyokompoziti, enzimin biyoaktivitesini koruyabilmesi için bir sığınak sağlayacak ve kolayca homojen olacak şekilde hazırlamışlardır. Kare dalga voltametrinin sonuçlarından, elektrokatalitik indirgenme akımlarını  $1,0 \times 10^{-5} - 2,1 \times 10^{-3}$  M aralığında kolin klorür derişiminin artışı ile doğrusal olarak arttığı, askorbik asit ve ürik asidin belirgin bir girişimi olmadığını gözlemişlerdir. Ayrıca iyi tekrarlanabilirlik ve kararlılık elde etmişlerdir [41].

Qiang Chen ve diğerkleri, farklı polikasyonlara sahip kolin sensörlerinin üretimi için bir tabakalı kırıgılaşıma tekniği kullandılar. Her biri aynı enzime (ChOx) sahip fakat poli (etilenimin) (PEI) ve poli (dialildimetilamonyum klorür) (PDDA) olmak üzere farklı polikasyonlara sahip iki tür ChOx / polikasyon ince filmi kullandılar. ChOx / PEI veya ChOx / PDDA ince film ile kaplanmış Pt elektrotlarını kolin sensörleri olarak kullandılar. ChOx / PEI film modifiyeli sensörün, ChOx / PDDA film tabanlı sensörlerden daha

yüksek bir tepki, daha geniş doğrusal aralık ve daha kısa yanıt süresi gösterdiğini belirlediler [42].

David Emerson ve diğerleri tarafından, glukoz, galaktoz veya kolin için, ilgili oksidaz enziminin bir Clark tipi oksijen mikro elektrot ucuna tutturulmasıyla mikrobiyosensörler oluşturuldu. Enzim bir poliakrilamit matrisinde elektrot ucu üzerine immobilize edildi ve daha sonra bir poliüretan membran ile kaplandı. Bu mikrobiyosensörlerin uç çapları 15-40 pm, tepki süresi 0,5-5 s ve analitin 2  $\mu$ M kadar düşük miktarını algıladığı gösterildi. Doğrusal aralık poliüretan kaplamanın kalınlığına bağlı olarak glukoz ve galaktoz biyosensörler için 10 mM'ye kadar genişletildi. Glukoz sensörlerinin en kararlı olduğu ve 6 aya kadar aktivitesine devam edebildiği, galaktoz sensörlerinin 1 ay, kolin sensörlerinin yaklaşık 2 hafta boyunca çalışmaya devam edebildiği ve genellikle daha az duyarlı olduğu belirlendi [43].

Qiang Chen ve diğerleri tarafından, kolin sensörlerinin üretiminde MWCNT'ler ile kombine edilen katmanlı biriktirme tekniği kullanıldı. MWCNT filmi platin elektrot yüzeyinde hazırlandı. Pozitif yüklü polialilamin (PAA) ile negatif yüklü MWCNT'ler ve poli (vinil sülfat) (PVS) arasındaki elektrostatik etkileşime dayanarak, modifiye elektrot üzerine permselektiv tabaka olarak kullanılmak üzere polimer (PVS / PAA)<sub>3</sub> filmi adsorbe edildi. Ardından PDDA ve ChOx çok katmanlı filmler, elektrot üzerine katmanlı bir şekilde sabitlendi, bu nedenle koline karşı güçlendirilmiş bir biyosensör oluşturuldu. Kolin biyosensörünün,  $5 \times 10^{-7}$  -  $1 \times 10^{-4}$  M aralığında doğrusallığı ve MWCNT varlığında 7,6 s yanıt süresi ile 12,53  $\mu$ A / mM hassasiyeti gösterildi. İyi tekrarlanabilirlik, uzun süreli kararlılık ve girişimin azaltıldığı sergilendi. Çalışmanın biyosensör üretiminde diğer enzimlerin immobilizesi için de kullanılabilir olduğu gösterildi [44].

Qiang Chen ve diğerleri tarafından, ChOx'ın MWCNT modifiyeli platin (Pt) elektrot üzerinde bir sol-jel silikat film içine immobilizasyonu ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tayinine dayanan yeni bir amperometrik biyosensör üretilmiştir. Dönüşümlü voltametri sonuçları ile, karbon nanotüplerinin düşük bir potansiyelde (Ag / AgCl'ye karşı 0,16V) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin oksidasyonuna karşı iyi bir elektrokatalitik etkinliğe sahip oldukları gösterilmiştir. Çalışma potansiyeli, pH ve sıcaklık gibi kolin biyosensörünün deney parametreleri incelenmiştir. Bunun yanında doğrusal çalışma aralığı  $5 \times 10^{-6}$  -  $1 \times 10^{-4}$  M ve 8 s'den daha düşük bir yanıt süresi ile kolinin hassas bir şekilde belirlendiği gösterilmiştir. Ayrıca kolinin tayin sınırı yaklaşık

$1 \times 10^{-7}$  M olarak tespit edilmiştir. Bu biyosensör, serum örneklerinde fosfolipaz D (PLD) tarafından lesitinden salınan kolini saptamak için kullanılmıştır [45].

Qiang Chen ve diğerleri tarafından, Prusya mavisi (PB) ile modifiye edilmiş Pt elektrot üzerine ChOx'ın tabaka-tabaka (LBL) çok katmanlı film olarak immobilize edilmesiyle bir amperometrik kolin biyosensörü geliştirildi. ChOx/LBL filmlerini hazırlamak için 6-O-Etoksitrimetilamonyokozitoz (EACC) kullanıldı. Kolin tayini için Ag / AgCl'ye karşı 0,0V çalışma potansiyeli kullanıldı ve düşük tayin sınırı ( $5 \times 10^{-7}$  M), kısa cevap süresi (10 s), yüksek hassasiyet ( $88,6 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) ve iyi bir seçicilik gözlemlendi. Sonuçlar, LBL filmlerinin ultra ince doğasına ve PB tarafından  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin verimli katalitik indirgenmesine bağlı olabilecek düşük çalışma potansiyeline dayanılarak açıklandı. pH, sıcaklık ve uygulanan potansiyelin kolin biyosensörünün amperometrik cevabı üzerine etkileri değerlendirildi. Görünür Michaelis-Menten sabitinin  $(0,083 \pm 0,001) \times 10^{-3}$  M olduğu bulundu. Biyosensörün, EACC çok katmanlı filmde ChOx'ın kuvvetli bir şekilde adsorpsiyonundan dolayı uzun süreli raf ömrüne sahip olduğu görüldü. Biyosensör, serum örneklerinde fosfatidilkolin analizinde uygulandığında, ölçüm değerlerinin hastane yöntemi ile yapılan ölçüm sonuçları ile uyumlu olduğu görüldü [46].

Richie L.C. Chen ve diğerleri tarafından, karaciğer fonksiyonu için gerekli olan serum kolinesterazın aktivitesini ölçmek için bir kapiler elektroforez yöntemi ve dayanıklı bir kolin biyosensörü geliştirildi. Kapiler elektroforez yönteminde, kaplanmamış bir erimiş silika kapilerde benzoat ve benzoilkolinin (kolinesterazın yapay substratı) ayrılmasına dayanıldı. Benzoilkolinin ve benzoatın göç sürelerinin sırasıyla 1,3 dakika ve 5,5 dakika olduğu gözlemlendi.  $A_{233}$  sinyallerinin pik alanlarına göre her iki analit için doğrusal çalışma aralığı 0,01-50,0mM olarak ve 1,0 mM benzoilkolin ve benzoatın bağıl standart sapmaları sırasıyla %4 ve %6'dan az olarak belirlendi. FIA-kolin sensörü, saflaştırılmış doğal bir kitinöz membranla kaplanan çalışma elektrotu ile oluşturuldu. Biyomembran, ChOx immobilizasyonunda destek materyal olarak kullanıldı ve aynı zamanda elektrot yüzeyinde protein adsorpsiyonunu da engellediği görüldü. Kalibrasyon eğrisi 0,05 - 5,0mM arasında belirlendi ( $r = 0.999$ ). 1,0 mM kolin ( $n = 7$ ) için bağıl standart sapmanın % 3'ten az olduğu ve biyoaktif membranın aktivitesini yaklaşık 2 ay koruduğu izlendi [47].

Xiurong Yang ve diğerleri, kolin tayini için supramoleküler mimariye sahip hassas bir biyosensör tasarlayıp uyguladılar. Tolinli a-siklodekstrin polimeri ve platin nanopartiküllü

altın elektrotu üzerine ChOx ve HRP'ı 1-adamantan karboksilik asit bağlama yoluyla immobilize ettiler. Kare dalga voltametrisinden, 0,38 mV'de indirgenme akımlarının,  $10^{-9}$ - $10^{-2}$  M aralığında kolin derişimlerinin logaritması ile doğrusal bir ilişkiye sahip olduğunu ve tayin sınırının 0,1 nM'ye kadar düştüğünü gösterdiler. Ayrıca bu biyosensörün iyi seçicilik, tekrarlanabilirlik ve kararlılık sergilediğini belirlediler [48].

Moosavi-Movahedi ve diğerleri tarafından, bambu benzeri çok duvarlı karbon nanotüpleri (BCNT'ler), iyonik sıvı (IL) ve Prusya mavisi (PB) nanokompozit modifiyeli camı karbon (GC) elektrodu kullanarak hassas bir amperometrik kolin biyosensörü geliştirildi. PB nanoparçacıklar önce BCNTs/IL/GC elektrodunun yüzeyinde elektrolitik hale getirildi. Sonra,  $Ni^{2+}$  iyonları, yumuşak alkali ortamda kararlılığını arttırmak için PB yapısına elektrokimyasal olarak dahil edildi. Daha sonra bir çapraz bağlama yöntemi kullanılarak elektrot üzerine ChOx immobilize edildi. Kolinin amperometrik ölçümleri 0,05 M fosfat tamponu (pH 7,4) içinde -0,05 V sabit potansiyelde yapıldı. Kolin biyosensörünün  $345,4 \text{ A mM}^{-1} \text{ cm}^2$ 'lik yüksek bir duyarlılığı ve  $4,5 \times 10^{-7}$  M'lik bir tayin sınırı olduğu tespit edildi. Doğrusal çalışma aralığı  $4,5 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-4}$  M olarak bulundu. Biyosensörün, 2 s ile kısa yanıt süresi,  $9,7 \times 10^{-5}$  M'lik düşük  $K_M$  değeri, uzun raf ömrü ve yüksek seçiciliği gösterildi [49].

Hongjuan Zeng ve diğerleri tarafından, Chox'ın poli(3,4-etilendioksitiofen) (PEDOT) üzerine elektrokimyasal polimerizasyonunun etkisini açıklandı. PEDOT ve PEDOT / Chox filmlerinin özellikleri XPS ve UV-vis absorpsiyon teknikleri ile karakterize edildi. Kolin tespiti için yeni UV-vis absorbans yöntemi geliştirildi. 1/30 M fosfat tampon çözeltisi (pH 8,0) ortamında, 293 nm'de çok hassas bir absorbans pikinin olduğu gözlemlendi. UV-vis absorpsiyon yoğunluğu ve kolin derişimi arasındaki doğrusal ilişki  $1,0 \times 10^{-6}$  -  $5,1 \times 10^{-5}$  M arasında elde edildi. Bu yöntem aynı zamanda çeşitli yem katkı maddeleri örneklerinde kolini belirlemek için de uygulandı [50].

Fangqiong Tang ve diğerleri,  $H_2O_2$ -hassas kuantum noktalarına (QD'ler) dayanan kolin ve asetilkolinin tespiti için basit, hızlı ve duyarlı bir biosensör oluşturmuşlardır. Kolin için tayin sınırını 0,1  $\mu\text{M}$  ve lineer aralık sırasıyla 0,1-0,9  $\mu\text{M}$  ve 5-150  $\mu\text{M}$  olarak bulmuşlardır. Asetil kolin için tayin sınırını 10  $\mu\text{M}$  ve doğrusal aralığı 10-5000  $\mu\text{M}$  olarak bulmuşlardır. Geniş doğrusal aralıkların, kolin ve asetilkolinin rutin analizleri için uygun olduğunu göstermişlerdir. Biyosensörlerin deneysel koşullarını uygun hale getirmiş ve

anti-girişim yeteneğini de sunmuşlardır. Süt örneklerinde kolin tayininde doğrusal çalışma aralığını 5-150  $\mu\text{M}$  olarak bulmuşlardır. Serumdaki asetilkolinin tayininde doğrusal aralığı 10-140  $\mu\text{M}$  olarak belirlemişlerdir [51].

C.S.Pundir ve Nidhi Chauhan tarafından, bir altın elektrodunun yüzeyine yerleştirilen çitozan (CHIT)/altın kaplı ferrikoksidanoz partiküllerinin ( $\text{Fe@AuNPs}$ ) elektron nanokompozitinin üzerine AChE ve ChOx karışımının kovalent olarak immobilizesi ile bir amperometrik asetilkolin biyosensörü hazırlandı. Bu bir çalışma elektrodu olarak kullanılırken, referans elektrot olarak  $\text{Ag} / \text{AgCl}$  ve karşıt elektrot olarak Pt tel kullanıldı. Biyosensörde, kolinin immobilize ChOx ile oksidasyonundan üretilen  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin elektrokimyasal ölçümüne dayanıldı ve bu da asetilkolinin immobilize AChE ile hidrolizinden üretildi. Biyosensörün, 3 s cevap süresi ile 0,2 V çalışma potansiyeli, pH 7,0 ve 30 °C optimum koşulları belirlendi. Enzim elektrotunun, asetilkolin için 0,005  $\mu\text{M}$ 'lik bir tayin sınırı ve 0,005-400  $\mu\text{M}$ 'lik bir doğrusal çalışma aralığı belirlendi. Biyosensör ile, görünüşte sağlıklı kişilerde ve Alzheimer hastalarında plazma asetilkolini ölçüldü. Enzim elektrodunun 3 aylık bir süre boyunca 100 kullanımdan sonra ilk aktivitesinin % 50'sini koruduğu görüldü [87].

Sanjay Upadhyay ve diğerleri tarafından, paraokson etil, aldikarb ve sarkin bulguları için altın-platin bimetalik nanopartiküllerin 3-aminopropiltrietoksi silan modifiyeli camı karbon elektrot üzerine elektron yerleştirilmesine dayanan bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Biyosensör, AChE / ChOx'ın glutaraldehit ile çapraz bağlanarak modifiye elektrot üzerine immobilize edilmesiyle hazırlandı. Au ve Pt nanoparçacıklarının sinerjik etkisinin,  $\text{H}_2\text{O}_2$  tespiti için düşük potansiyel ile iyi elektrokatalitik aktivite gösterdiği belirlendi. Modifiye elektrot üzerinde immobilize enzimler kullanan inhibitörler için  $\text{IC}_{50}$  ve inhibisyon hızı sabiti ( $K_i$ ) değerleri belirlendi. Paraokson etil, sarin ve aldikarb, AChE enziminin % 30-40 inhibisyon seviyesinde sırasıyla 150-200 nM, 40-50 nM ve 40-60  $\mu\text{M}$ 'ye kadar saptanabildi ve geniş aralıkta doğrusallık izlendi [88].

H. Gülce ve diğerleri tarafından, polivinilferrosenyum perklorat ( $\text{PVF}^+\text{ClO}_4^-$ ) kaplı Pt elektrot yüzeyine dayalı enzim elektrotlarının geliştirilmesi için basit bir enzim immobilizasyonu yöntemi araştırıldı. Enzimler, polivinil perasenyum perklorat kaplı Pt elektrodu enzim solüsyonuna birkaç kez batırılarak, iyon değiştirme işlemi vasıtasıyla polimer matrisinde tutuldu. Kolin ve asetilkolin enzim elektrotları, bir Pt elektrot yüzeyine

kaplı  $PVF^+ClO_4^-$  matriks içinde ChOx ve AChE'nin birlikte immobilizesi ile geliştirildi. Enzimatik olarak üretilen  $H_2O_2$ 'nin elektrooksidasyonuna bağlı olan enzim elektrotlarının amperometrik yanıtları doymuş kalomel elektroda karşı + 0,70V'da ölçüldü. Polimerik filmin kalınlığının, pH, sıcaklık, alt sınır ve enzim derişimlerinin biyosensör cevabına etkisi araştırıldı. Optimum pH 25 °C'de pH 7,4 olarak belirlendi. Tekrarlanabilirlikte bağl hatanın  $\pm\%$  5,0 olduğu görüldü. Yanıt süresi 30-50 s olarak bulundu.  $1,0 \times 10^{-6} M$  kolin ve asetilkolinin substrat derişiminde doğrusal çalışma aralığının üst sınırı 1,2 mM olarak belirlendi. Michaelis-Menten sabiti ve immobilize enzim sisteminin aktivasyon enerjisi sırasıyla 1,74 mM asetilkolin ve  $14.92 \text{ kJ mol}^{-1}$  olarak bulundu. Girişim yapan maddelerin etkileri ve enzim elektrotların karalılıkları araştırıldı [89].

Baoyan Wu ve diğeri tarafından, AuNP'lere ve MWCNT'lere dayanan yeni bir AChE / ChOx biyoenzim amperometrik asetilkolin biyosensörünü, kendi kendine montaj prosesi ile sol-jel tekniğı kombinasyonu yaparak geliştirildi. Pt elektrodun yüzeyine MWCNT ve ChOx içeren tiyollenmiş bir sulu silika solüsyonu damlatıldı ve daha sonra AuNP'ler, tiyolat sol-jel şebekesi ile birleştirildi. Son olarak, AChE yüklemesini optimize etmek için elektrot üzerinde farklı PDDA-AChE katmanlarını bir araya getirmek için poli PDDA ve AChE'nin tekrar birikimi tekrarlandı. Ortaya çıkan biyosensörler arasında iki kat PDDA-AChE çok tabakalı filmlere dayanan biyosensörün en iyi performansı gösterdiği belirlendi. 0,005-0,4 mM geniş doğrusal aralık,  $3,395 \mu A / mM$  yüksek hassasiyet ve 15 saniye içinde hızlı amperometrik yanıt süresi sergilendi. Ayrıca biyosensörün uzun raf ömrü ve yüksek tekrarlanabilirliği gösterildi [90].

R. Pilloton ve diğeri, enzim inhibisyonuna dayalı organofosfor (OP) insektisidler için bir amperometrik biyosensör geliştirilmesi amacıyla serbest ve immobilize AChE kullanımı ile ilgili çalışmışlardır. Artık enzim aktivitesinin ölçümünü, AChE'nin OP ile kuluçkalandığı aynı numunede doğrudan gerçekleştirmişlerdir. AChE'ı bir naylon ağ üzerinde immobilize etmişler ve sensör üzerine monte edilmemiş olarak, inkübasyon ve ölçüm aşamalarını ayrı ayrı gerçekleştirmek mümkün olmuştur: inkübasyon basamağını, inhibitör bulunduran numunede, ölçüm aşamasını, tampon içerisine spesifik Substrat içeren standart bir solüsyonda yapmışlardır. Ayrıca bu iki aşamalı prosedürle, sadece ince bir çapraz bağl ChOx tabakası ile örtülmüş olan ve herhangi bir zar içermeyen Pt elektrodu hassasiyet, kesinlik ve tayin sınırı gibi parametreleri elde etmek için de kullanmışlardır [91].

V. Hasırcı ve diğerleri, poli(2-hidroksietil metakrilat) membranlar üzerinde AChE ve ChOx'ın birlikte immobilize etmişler ve aldikarb girişimi üzerine O<sub>2</sub> tüketimindeki değişimi ölçtüler. Enzimlerin immobilizesini tuzaklanma ya da epiklorohidrin ve Cibacron Blue F36A aktivasyonu da dahil olmak üzere bir hibrid immobilizasyon yöntemi ile yüzeye tutunarak gerçekleştirdiler. İmmobilize enzimlerin uzun raf ömürlerinin olduğunu belirlediler. Aldicarb tayininde doğrusal çalışma aralığını tutuklu ve yüzey immobilize enzimler için sırasıyla 10 - 500 ve 10 - 250 ppb olarak buldular. Membran yüzeylerindeki immobilize enzimlerin, aldikarb varlığına serbest enzimlerden daha hızlı yanıt verdiğini belirlediler. Ayrıca 25 dakika içinde tutuklanan ve yüzey immobilize enzimlerinin sırasıyla 23 ve 12 ppb kadar düşük Aldicarb derişimlerinin tespit edilebildiğini gösterdiler [92].

Xianwei Meng ve diğerleri tarafından, C-noktaları hazırlanması için basit ve yeni bir yöntem önerilmiştir. İlk olarak, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve Fe<sup>2+</sup> varlığında C-noktalarının flüoresansının görünüşte azaldığı gösterilmiştir. Bu bulguya dayanarak, C-noktaları, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tespiti için prob olarak başarılı bir şekilde benimsenmiştir. Deneysel koşullar optimize edildikten sonra, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için tayin sınırı 0,1 µM olarak bulunmuştur. Prob olarak C noktalarını kullanarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin tespitine dayanan kolin ve asetilkolinin tespiti için çevre dostu, basit ve hassas biosensörü geliştirilmiştir. Kolin için tayin sınırının 0,1 µM ve doğrusal çalışma aralığının 0,1-40 µM olduğu ve ACh için tayin sınırının 0,5 µM ve doğrusal çalışma aralığının 0,5-60 µM olduğu bulunmuştur. Biyosensörün mükemmel performansı ve bu yöntemin pratik uygulama potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir [93].



### 3. DENEYSEL KISIM

#### 3.1. Cihazlar ve Malzemeler

##### 3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

Amperometrik ölçme işlemleri için Epsilon-EC-Ver 1.40.67 NT elektrokimyasal analiz cihazı kullanıldı.

##### 3.1.2. Hücreler ve elektrotlar

Amperometrik ölçme işlemlerinde Şekil 3.1' de verilen üç elektrotlu ölçme sistemi kullanıldı. Referans elektrot olarak BAS RE-5B no'lu Ag/AgCl, karşıtlı elektrot olarak MW-1032 no'lu platin tel ve çalışma elektrodu olarak 0,5 cm<sup>2</sup> yüzey alanlı ve polipirol-polivinilsülfonat ile kaplanmış platin levha elektrotlar kullanıldı.



Şekil 3.1. Kaplama ve ölçümde kullanılan BAS C3 hücre sistemi

##### 3.1.3. pH metre

Tampon çözeltilerinin pH'larının ölçülmesi için ORION Model 720A pH-iyonmetre cihazı kullanıldı.

#### **3.1.4. Su banyosu**

Isıtma, soğutma ve sabit sıcaklık çalışmalarının gerektiği durumlarda Grant W14 marka termostatlı dolaşım su banyosu kullanıldı.

#### **3.1.5. Mikro pipet**

5  $\mu$ L – 100  $\mu$ L ve 100  $\mu$ L - 1000 $\mu$ L çözelti ilaveleri için Brand marka  $\pm$  0,05  $\mu$ L hassasiyeti olan mikro pipetler kullanıldı.

#### **3.1.6. Argon gazı**

Kargaz firmasından, çözeltide çözünmüş halde bulunan oksijeni ortamdan uzaklaştırmak için kullanılacak olan yüksek saflıktaki ( % 99,99 ) argon gazı temin edildi.

#### **3.1.7. Saf su**

GFL marka saf su cihazından, çözeltinin hazırlanmasında kullanılan saf su sağlandı.

### **3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri**

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan diğer kimyasalların adları, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar

| Kimyasal Madde                                           | Saflık Derecesi         | Temin Edildiği Firma |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------|
| Polivinilsülfonat                                        | %25 $\delta=1,18$ g/ml  | Aldrich              |
| Pirol                                                    | %98 $\delta=0,967$ g/ml | Aldrich              |
| Hidrojenperoksit                                         | %50                     | Tekkim               |
| Kolin Klorür                                             | %98                     | Sigma                |
| Toluidin Mavisi O                                        | %80                     | Sigma Aldrich        |
| Monosodyum hidrojen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) | %99                     | Sigma Aldrich        |
| Disodyum hidrojen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )   | %99                     | Sigma                |
| Parasetamol                                              | %99,4                   | -                    |
| L-(+)- Askorbik asit                                     | %99                     | Carlo Erba           |
| Ürik asit                                                | %99                     | Sigma                |
| L- Sistin                                                | %99                     | Merck                |
| L- Sistein                                               | %99                     | Merck                |
| $\beta$ - Alanin                                         | %99                     | Merck                |
| Glukoz                                                   | -                       | Merck                |
| Dopamin                                                  | %98                     | Sigma-Aldrich        |
| Sodyum Hidroksit                                         | %97                     | Merck                |
| Sodyum klorür                                            | %99                     | Merck                |

### 3.2.1. Kullanılan çözeltiler

*Hidrojen peroksit:* % 50'lik  $\delta=1,19$  g/mL olan hidrojen peroksitten 57  $\mu\text{L}$  alındı ve derişimi 0,1 M olan 10 mL stok çözeltisi hazırlandı. 10'ar mL  $1,0 \times 10^{-3}$  M,  $1,0 \times 10^{-4}$  M,  $1,0 \times 10^{-5}$  M ve  $1,0 \times 10^{-6}$  M hidrojen peroksit çözeltileri de stok çözeltinin saf su ile seyreltilmesiyle hazırlandı.

*Fosfat tamponu:* Monosodyum hidrojen fosfattan 9,63 g ve disodyum hidrojen fosfattan 10,26 g tartılarak saf suda çözüldü, analitik derişimi 0,1 M olacak şekilde seyreltilerek pH 7,0 olan 1 litre tampon çözelti hazırlandı. Aynı yol farklı pH ve derişimlerdeki tampon çözeltileri hazırlamak için de izlendi. Tampon çözeltiler buzdolabında  $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

*Glisin Tamponu:* pH'sı 9,0 ve 10,0 olan glisin tamponları hazırlamak için sırasıyla 0,64 g glisin, 0,06 g sodyum hidroksit ve 0,28 g glisin, 0,25 g sodyumhidroksit tartılarak saf suda çözüldü. Hazırlanan çözeltilerin pH'ları 0,1 M sodyumhidroksit ile ayarlandı. Tampon çözeltiler buzdolabında  $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

*Enzim çözeltisi:* Toplam aktivitesi 12,03 ünite olan kolin oksidaz enzimi alındı ve saf suda çözüldükten sonra hacim ölçülü balonda 10 mL'ye tamamlandı. Çözelti her birinde 1 mL çözelti bulunacak şekilde 10 adet deney tüpüne aktarıldı. Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında bekletildi. Çözeltiler, uzun süre kullanılmayacağı zaman derin dondurucuda saklandı.

*Kolin klorür çözeltisi:* Katı kolin klorürden 0,1396 g tartıldı ve 10 mL pH 7,0 fosfat tamponu ile seyreltilerek 0,1 M kolin klorür stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden belirli bir miktar alınarak ve aynı şekilde pH 7,0 fosfat tamponuyla seyreltilerek 10'ar mL  $1,0 \times 10^{-2}$  M -  $1,0 \times 10^{-6}$  M kolin çözeltileri hazırlandı. Farklı pH'larda kolin çözeltisi hazırlamak için değişik pH'lardaki 0,1 M fosfat tamponları, 1,0 M NaOH ve 1,0 M HCl kullanılarak istenilen pH'lara ayarlandı ve kolin çözeltileri hazırlanan yeni tamponlarla hazırlandı. Hazırlanan kolin çözeltileri kullanılmadıklarında buzdolabında saklandı.

*Askorbik asit çözeltisi:* 0,1 M 5 mL stok askorbik asit çözeltisi hazırlamak için katı askorbik asitten 0,088 gram tartılarak derişimi 0,1 M olan pH 7,0 fosfat tamponunda çözdürüldü. Farklı derişimlerdeki askorbik asit çözeltileri belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

*Ürik asit çözeltisi:*  $1,0 \times 10^{-2}$  M 50 mL stok ürik asit çözeltisi, katı ürik asitten 0,079 g tartılarak 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisinde çözüldükten sonra fosfat tamponu eklenerek hazırlandı. Farklı derişimlerdeki ürik asit çözeltileri stok çözeltiden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

*Parasetamol çözeltisi:*  $1,0 \times 10^{-2}$  M 50 mL stok parasetamol çözeltisi, katı parasetamolden 0,076 g tartılarak, üzerine fosfat tamponu eklenmesiyle hazırlandı. Farklı derişimlerdeki parasetamol çözeltileri stok çözeltiden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

*Sistein çözeltisi:* 0,1 M 5 mL stok sistein çözeltisi için, katı sisteinden 0,061 g tartılarak üzerine fosfat tamponu eklenmesiyle hazırlandı. Farklı derişimlerdeki sistein çözeltileri stok çözeltiden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

*Glukoz çözeltisi:* 0,1 M 5 mL stok glukoz çözeltisi için, katı glukozdan 0,090 g tartılarak üzerine fosfat tamponu eklenmesiyle hazırlandı. Farklı derişimlerdeki glukoz çözeltileri stok çözeltiden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

*Alanin çözeltisi:* 0,1 M 5 mL stok alanin çözeltisi için, katı alaninden 0,045 g tartılarak üzerine fosfat tamponu eklenmesiyle hazırlandı. Farklı derişimlerdeki alanin çözeltileri stok çözeltiden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

*Dopamin çözeltisi:* 0,1 M 5 mL stok dopamin çözeltisi için, katı dopaminden 0,095 g tartılarak üzerine fosfat tamponu eklenmesiyle hazırlandı. Farklı derişimlerdeki dopamin çözeltileri stok çözeltiden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

*Toluidin Mavisi O çözeltisi:* 0,001 M 5 mL stok çözeltisi, katı TBO'dan 0,0153 g tartılıp saf suda çözülerek hazırlandı.

*Sodyum hidroksit çözeltisi:* 1,0 M 25 mL çözeltisi, katı sodyum hidroksitten 1,01 g tartılıp saf suda çözülerek hazırlandı.

*Hidroklorik asit çözeltisi:* 1,0 M 25 mL çözeltisi, derişik HCl'den 2,3 mL alınıp ölçülü balonda saf su ile seyreltilerek hazırlandı.

### **3.3. Platin Yüzeye Polipirol-polivinilsülfonat (PPy-PVS) Filminin Kaplanması**

Elektrot yüzeyinin temizlenmesi: Platin levhanın yüzeyi, kaplama işleminden önce mekanik, kimyasal ve elektrokimyasal olarak temizlendi. Öncelikle platin yüzeyi sıfır numara zımpara kağıdı ile zımparalandı, daha sonra aleve tutuldu. 5'er dakikalık sürelerle aseton, etil alkol, derişik HCl ve derişik nitrik asit içerisinde bekletildi. Saf su ile yıkandı, kurutuldu ve yüzeydeki su uzaklaştırıldı. Elektrot yüzeyi her kaplama işleminden önce bu şekilde temizlendi [94].

Temizlenen Pt levha elektrodunun yüzeyi polipirol-polivinilsülfonat film ile kaplandı. Pirolün elektropolimerleşmesi ile polipirol, elektrot yüzeyine biriktirildi. Elektropolimerleşmede üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Çalışma elektrodu olarak platin

levha ( $0,5 \text{ cm}^2$ ), karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot kullanıldı. Polipirol-polivinilsülfonat filminin elde edilmesi için, pirolün hücre içi derişimi  $0,1 \text{ M}$  olacak şekilde  $71 \text{ } \mu\text{L}$  pirol,  $2,5 \text{ mL}$  polivinilsülfonat (%25) ve  $7,43 \text{ mL}$  saf su ilave edilerek toplam  $10 \text{ mL}$ 'lik bir çözelti hazırlandı. Temizlenen platin elektrot hazırlanan çözeltiye daldırıldı ve çözeltideki oksijeni uzaklaştırmak amacıyla  $10$  dakika argon gazı geçirildi. Elektropolimerizasyon işlemi dönüşümlü voltametri tekniğı ile  $50 \text{ mV/s}$  tarama hızında  $-1,0\text{V} - +2,0\text{V}$  potansiyelleri arasında yapıldı [95,96]. Polipirol 2 çevrimden sonra elde edildi. Kaplama işleminden sonra elektrot yüzeyine bağlanmayan monomerler ve kirliliklerin arındırılması için yüzey saf su ile yıkandı. Böylelikle platin/polipirol-polivinilsülfonat (Pt/PPy-PVS) elektrot hazırlandı. Elektrot, çalışmalarda kullanılmak üzere tampon çözelti içerisinde bekletildi.

#### 3.4. Enzim Elektrodunun Hazırlanması

Bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan Pt/PPy-PVS elektrodunun yüzeyi saf su ile yıkandıktan sonra,  $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$  TBO çözeltisinden elektrodun her iki yüzeyine  $25$ 'er  $\mu\text{L}$  damlatıldı ve kurutuldu. Kuruyan elektrodun her iki yüzeyine de  $45 \text{ } \mu\text{L}$ , %  $2,5$ 'luk Glutaraldehit (GA),  $1 \text{ mg}$  BSA,  $50 \text{ } \mu\text{L}$  pH  $7,0$  fosfat tamponu ve  $50 \text{ } \mu\text{L}$  kolin oksidaz enzimi içeren çözeltiden eşit miktarda ilave edilerek kuruyana kadar bekletildi. Kuruyan enzim elektrodu saf su ile yıkanıp tampon çözeltide bir süre bekletildi. Enzim elektrot kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında  $+4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 'de fosfat tamponunda saklandı.

#### 3.5. Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi

Bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan Pt/PPy-PVS çalışma elektrodu  $9 \text{ mL}$  tampon çözeltisi ve  $1 \text{ mL}$   $1 \text{ M}$  destek elektrolit (NaCl) bulunan çözeltiye daldırıldı ve dönüşümlü voltametri (CV) yöntemi ile  $-400 \text{ mV} - +400 \text{ mV}$  potansiyelleri arasında  $60$  çevrim yapılarak dengeye getirildi. Elektrot dengeye geldikten sonra hücre içi derişimi sırayla  $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$  ve  $1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$  olacak şekilde medyatör (TBO) eklendi ve CV yöntemi ile  $300 - (-400) \text{ mV}$  potansiyelleri arasında TBO'nun yükseltgenme piki tespit edildi. Elde edilen yükseltgenme pikinden çalışma potansiyeli belirlendi (Şekil 4.2).

### 3.6. Medyatör ve Hidrojen Peroksit Etkileşiminin Belirlenmesi

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan Pt/PPy-PVS çalışma elektrodu 9 mL tampon çözeltisi 1 mL 1 M destek elektrolit (NaCl) bulunan çözeltiye daldırılarak -0,23 V sabit potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Hücreye, hücre içi derişimi  $1,0 \times 10^{-3}$  M olacak şekilde medyatör ilave edildi. Medyatör ilavesinden itibaren 200 saniye sonra difüzyon akımı okundu. Daha sonra  $1,0 \times 10^{-5}$  –  $1,0 \times 10^{-3}$  arasında artan hidrojen peroksit derişimlerdeki akım değışimleri incelendi. Her ilave sonunda hücre içeri 900 s karıştırılıp, karıştırmanın bitiminden itibaren 200 s sonra difüzyon akımı ölçüldü. Okunan akımlar ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için  $\Delta i$  değeri hesaplandı ve kaydedilerek grafiğe geçirildi (Şekil 4.3).

### 3.7. Serbest Enzimin ve İmmobilize Enzimin Koline Duyarlılığının Belirlenmesi

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan Pt/PPy-PVS çalışma elektrodu 8,950 mL tampon çözeltisi, 1 mL 1 M destek elektrolit (NaCl) bulunan çözeltiye daldırılarak -0,23 V sabit potansiyelde dengeye getirildi. Daha sonra 50  $\mu$ L kolin oksidaz enzimi çözeltiye eklendi ve enzimin bulunduğu ortamda elektrodun dengeye gelmesi beklendi, denge akımı kaydedildi. Hücre içi derişimi  $1,0 \times 10^{-5}$  mM –  $5,0 \times 10^{-5}$  mM arasında artan kolin ilaveleri yapıldı. Her kolin ilavesinden sonra tepkimenin tamamlanabilmesi için 900 s karıştırıldı. Karıştırmanın bitiminden itibaren 200 s sonra difüzyon akımı okundu. Elde edilen  $\Delta i$  değeri grafiğe geçirildi (Şekil 4.4).

Bölüm 3.4’de belirtildiği gibi hazırlanan enzim elektrodu 9,0 mL tampon çözeltisi, 1 mL 1 M NaCl içeren çözeltiye daldırılarak -0,23 V sabit potansiyelde dengeye getirildikten sonra  $1,0 \times 10^{-5}$  mM -  $5,0 \times 10^{-5}$  mM arasında artan kolin derişimleri ile enzim elektrodun verdiği anodik cevap akımları grafiğe geçirildi (Şekil 4.4).

### 3.8. Gluteraldehit Miktarının Enzim Elektrodun Cevabı Üzerine Etkisi

Literatür araştırmalarından çapraz bağlayıcı reaktif olarak kullanılan gluteraldehitin bazı enzimlerin katalitik merkezlerine bağlanıp onları inhibe ettiği bilgisi dikkate alınarak, immobilizasyon işlemi sırasında kullanılan gluteraldehit miktarı değıştıriliip enzim elektrodun cevap akımları karşılaştırıldı. Bu amaçla bölüm 3.4’de anlatıldığı gibi

hazırlanan; enzim, BSA ve glutaraldehit içeren çözeltideki glutaraldehit miktarı sırasıyla kütlece %0,33, %0,58, %0,78 ve %0,94 olacak şekilde hazırlanıp aynı işlemler tekrar edildi.

Hazırlanan enzim elektrotları 9,0 mL tampon çözeltisi, 1 mL 1M destek elektrolit içeren çözeltiye daldırılarak -0,23 V sabit potansiyelde dengeye getirildi. Daha sonra  $1,0 \times 10^{-5}$  mM -  $5,0 \times 10^{-4}$  mM arasında artan kolin hücre içi derişimlerinde enzim elektrodun verdiği anodik akım değerleri ile denge akımı arasındaki farklar alınarak  $\Delta i$  değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar birlikte, artan kolin derişimlerine karşı  $\Delta i$  grafiğine geçirilerek karşılaştırılmaları yapıldı. Enzim elektrodun en iyi aktivite gösterdiği glutaraldehit miktarı bulundu (Şekil 4.5).

### 3.9. Enzim Elektrodunun En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi için, pH'nın etkisi, sıcaklığın etkisi, substrat derişiminin etkisi, enzim elektrodunun tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrünün belirlenmesi çalışıldı.

#### 3.9.1. pH'nın etkisi

Bölüm 3.4'de belirtildiği gibi hazırlanan ve sabit potansiyelde dengeye getirilen elektrodun amperometrik cevap akımı üzerine pH'nın etkisini incelemek için pH'sı 6,0; 7,0; 8,0 olan 0,1 M fosfat tamponları ve pH'sı 9,0 ve 10,0 olan glisin tamponları hazırlandı.

pH değeri 6,0 olan tampon çözeltisinden bir hücre içerisine 9 mL ve hücre içi derişimi 0,1 M olacak şekilde 1 M sodyumklorür çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Bu çözeltide enzim elektrot, -0,23 V sabit potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücreye pH değeri 6,0 olan tampon çözeltisiyle hazırlanan kolin çözeltisinden hücre içi kolin derişimi  $5,0 \times 10^{-5}$  mM olacak şekilde eklendi. Çözelti 900 s karıştırıldı ve 200 s sonra okunan akım kaydedildi. Daha sonra denge akımı ile farkı alınarak pH = 6,0 için  $\Delta i$  değeri hesaplandı.

Aynı işlemler pH değeri 7,0; 8,0; 9,0 ve 10,0 olan fosfat ve glisin tamponları için tekrar edildi. Her bir pH'ya karşı  $\Delta i$  değeri grafiğe geçirildi. Grafikten immobilize enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH değeri belirlendi (Şekil 4.6).

### 3.9.2. Sıcaklığın etkisi

Bölüm 3.4'de anlatıldığı gibi hazırlanan ve sabit potansiyelde dengeye getirilen biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine sıcaklık etkisinin incelemesi için biyosensörün amperometrik cevabı altı farklı sıcaklık değerinde ölçüldü. Hücre içine pH'sı 7,0 olan 9 mL fosfat tamponu ve hücre içi derişimi 0,1 M olacak şekilde 1 M sodyumklorür çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Grant W14 marka termostatlı dolaşım su banyosu kullanılarak hücre içindeki çözeltinin sıcaklığı 20 °C olarak ayarlandı. -0,23 V sabit potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücre içi derişimi  $5,0 \times 10^{-5}$  mM olacak şekilde kolin çözeltisi ilave edildi. Çözelti 900 s karıştırıldı, 200 s sonra akım değerleri okundu ve denge akımı ile farkı alınarak 20 °C için bir  $\Delta i$  değeri hesaplandı. Aynı işlemler 30 °C, 40 °C ve 50 °C sıcaklıkları için tekrarlanıp her bir sıcaklık için  $\Delta i$  değeri hesaplandı ve sıcaklığa karşı  $\Delta i$  grafiği çizilerek enzim elektrodun en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık değeri bulundu (Şekil 4.7).

### 3.9.3. Substrat derişiminin etkisi

Bölüm 3.4'de belirtildiği gibi hazırlanan enzim elektrot; pH'sı 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu ve hücre içi derişimi 0,1 M olacak şekilde 1 M sodyum klorürden 1 mL bulunan çözeltiye daldırıldı. -0,23 V sabit potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Dengeye getirildikten sonra  $1,0 \times 10^{-5} - 3,5 \times 10^{-5}$  mM derişim aralığında kolin ilaveleri yapıldı. Her kolin ilavesinden sonra çözelti 900 s karıştırıldı ve 200 s sonundaki akım değeri okundu. Okunan akım değeri ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir kolin derişimi için  $\Delta i$  değerleri hesaplandı. Artan kolin derişimlerine karşı  $\Delta i$  grafiği çizildi (Michaelis-Menten eğrisi) (Şekil 4.8). Çizilen bu grafikten yararlanılarak biyosensörün çalışma aralığı ve tayin sınırı belirlendi (Şekil 4.10). Ayrıca elde edilen verilerden Lineweaver-burk grafiği çizildi (Şekil 4.9) ve bu grafikten yararlanarak kolin oksidaz enzimine özgü olan  $K_{M(gözlenen)}$  ve  $I_{mak(gözlenen)}$  değerleri belirlendi.

### 3.9.4. Raf ömrü

Bölüm 3.4’de anlatıldığı gibi hazırlanan enzim elektrodun raf ömrünün belirlenebilmesi amacıyla 63 gün boyunca farklı zaman aralıklarında ölçümler alındı ve elektrodun ilk gün verdiği cevap ile son gün verdiği cevap karşılaştırıldı. Bu amaçla pH’sı 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu ve hücre içi derişimi 0,1 M olacak şekilde 1 M sodyum klorürden 1 mL bulunan çözelti hazırlandı. Hücreye daldırılan enzim elektrot -0,23 V sabit potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Elektrot dengeye geldikten sonra çözeltiye hücre içi derişimi  $1,0 \times 10^{-4}$  mM olacak şekilde kolin ilave edildi ve 900 s karıştırılarak 200 s sonundaki difüzyon akımı okundu. Ölçüm işlemi tamamlanmış olan enzim elektrot, + 4 °C’ de ayarlanan buzdolabında bir sonraki ölçüm işlemine kadar tampon çözelti içerisinde bekletildi. Aynı işlemler her ölçüm için tekrarlandı. Elde edilen  $\Delta i$  değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.11).

### 3.9.5. Tekrarlanabilirlik

Bölüm 3.4’de belirtildiği gibi hazırlanan ve her ölçümde -0,23 V sabit potansiyelde dengeye getirilen enzim elektrodun optimum şartlarda tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için  $1,0 \times 10^{-4}$  mM derişiminde kolin çözeltileri ile arka arkaya ölçümler yapıldı. Her ölçüm için denge akımı ile ölçülen akım arasındaki farktan  $\Delta i$  değeri belirlenen toplam 15 ölçüm alındı. Ölçüm sayısına karşı  $\Delta i$  değerleri grafiğe geçirildi ve elektrodun tekrarlanabilir sonuçlar verdiği belirlendi (Şekil 4.12).

## 3.10. Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler

Ölçüm ortamında bulunabilecek bazı maddelerin hazırlanan enzim elektrodun cevabına etkileri incelendi. Bu çalışmada kolin ve girişim yapan türlerin derişimleri kanda bulunan miktarlarının 100 kat seyreltilmiş haliyle alındı.

Bölüm 3.4’deki gibi hazırlanan enzim elektrodu, içerisinde 9 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 1 mL 1,0 M NaCl bulunan, toplam 10 mL’lik hücrede, -0,23 V elektrot potansiyelinde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Elektrot dengeye getirildikten sonra hücreye derişimi  $1,5 \times 10^{-4}$  mM olacak şekilde kolin ilavesi yapıldı. Çözelti 900 s karıştırıldı ve 200 s sonundaki akım okundu. Daha sonra  $1,0 \times 10^{-4}$  mM kolinin verdiği cevap akımı, denge

akımı ile okunan akım arasındaki fark alınarak kaydedildi. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi  $3,0 \times 10^{-3}$  mM olacak şekilde ürik asit eklendi. Çözelti 900 s karıştırıldı ve 200 s sonundaki akım okundu. Daha sonra denge akımı ile arasındaki fark alınarak;  $1,5 \times 10^{-4}$  mM kolin ve  $3,0 \times 10^{-3}$  mM ürik asitten elde edilen toplam cevap akımı kaydedildi. Bu akımdan  $1,0 \times 10^{-4}$  mM kolinin verdiği cevap akımı çıkarılarak  $3,0 \times 10^{-3}$  mM ürik asidin sebep olduğu cevap akımı bulundu. Bulunan bu akım toplam cevap akımına oranlanarak  $3,0 \times 10^{-3}$  mM ürik asidin yüzde girişimi hesaplandı. Aynı işlemler askorbik asit, parasetamol, sistein, glukoz, alanin ve dopamin için de tekrarlanarak yüzde girişimleri hesaplandı. Hesaplanan yüzde girişimler Çizelge 4.1' de verilmiştir.

### 3.11. Sentetik Kan Numunesinde Kolin Tayini

Bölüm 3.4'de belirtildiği gibi hazırlandıktan sonra dengeye getirilen enzim elektrot ile sentetik numunedeki kolin miktarının belirlenmesi için üçlü elektrot sistemli elektrokimyasal hücre kullanıldı. Hücrede; hazırlanan enzim elektrot çalışma elektrodu olarak, platin tel karşıt elektrot olarak ve Ag/AgCl elektrot referans elektrot olarak kullanıldı. Elektrokimyasal hücreye pH' sı 7,0 olan 9 mL 0,1 M fosfat tamponu çözeltisi ve 1 M sodyum klorür çözeltisinden 1 mL eklendi.

Kanda belirli derişimlerde bulunmakta olan maddeleri içeren sentetik numune hazırlandı. Hazırlanan çözeltideki maddeler ve derişimleri şöyledir; askorbik asit ( $1,0 \times 10^{-2}$  mM), ürik asit ( $3,0 \times 10^{-2}$  mM), parasetamol ( $1,0 \times 10^{-2}$  mM), dopamin ( $1,0 \times 10^{-4}$  mM), alanin ( $5,0 \times 10^{-2}$  mM) ve glukoz ( $5,0 \times 10^{-1}$  mM). Kolin derişimi  $1,5 \times 10^{-6}$  mM olarak sabit tutuldu. Enzim elektrodun bulunduğu hücreye, 100 kat seyreltme olacak şekilde sentetik numunedan ilave edildi. 900 s karıştırılarak 200 s sonraki difüzyon akımı ölçüldü ve akım değeri kaydedildi. Gerekli hesaplamalar yapılarak sentetik numunedeki kolin miktarı tayin edildi.



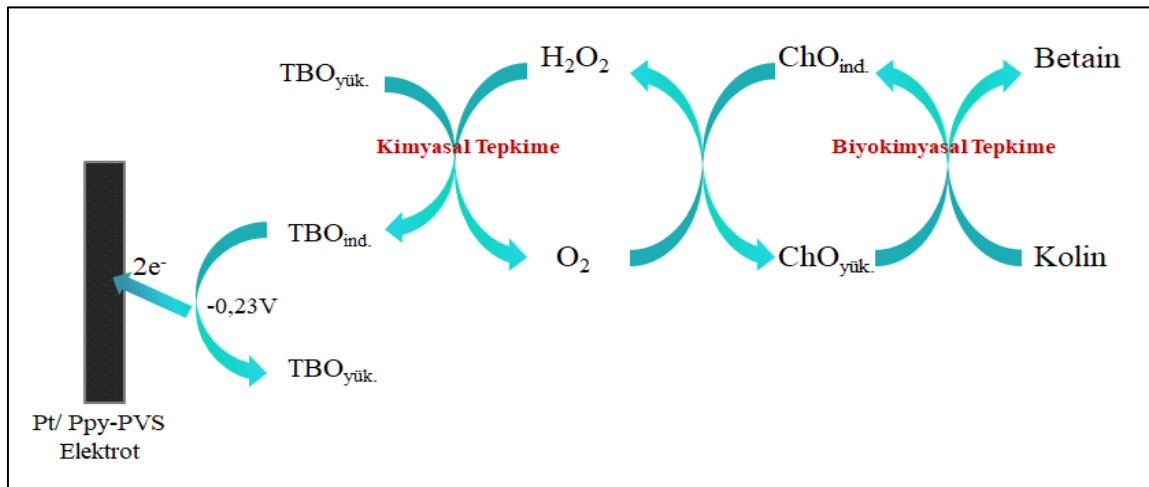
#### 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızda, elektrot yüzeyi ile enzimin aktif merkezi arasındaki elektron transferini kolaylaştırmak ve böylece elektrot potansiyelini düşürerek; girişim yapabilen maddelerin girişimlerini en düşük düzeye indirmek için elektron transfer aracıları yani medyatör kullanılmıştır.

Bu çalışmada; kan, BOS ve bunun gibi farklı biyolojik sıvılarda kolin tayini yapabilmek amacıyla yeni bir enzim elektrot geliştirildi. Enzim elektrot Pt yüzeyde pirolün polivinilsülfonat varlığında elektrokimyasal olarak polimerleşmesinden sonra medyatör olarak kullanılan TBO ve kolin oksidaz enziminin çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edilmesiyle hazırlandı. Kolinin oksijenli ortamda kolin oksidaz enzimi aracılığıyla reaksiyonu sonucunda betain ve hidrojen peroksit oluşur. Oluşan hidrojen peroksit ortamdaki medyatörü indirger. İndirgenmiş medyatörün  $-0,23$  V'da elektrokimyasal olarak elektrot yüzeyinde yükseltgenmesi sonucu kolin derişimiyle orantılı anodik akımlar elde edilir. Bu da elektrodumuzun çalışma prensibini oluşturur.

Kolin, kolin oksidaz ve TBO arasındaki reaksiyonlar Şekil 4.1'de verilmiştir.

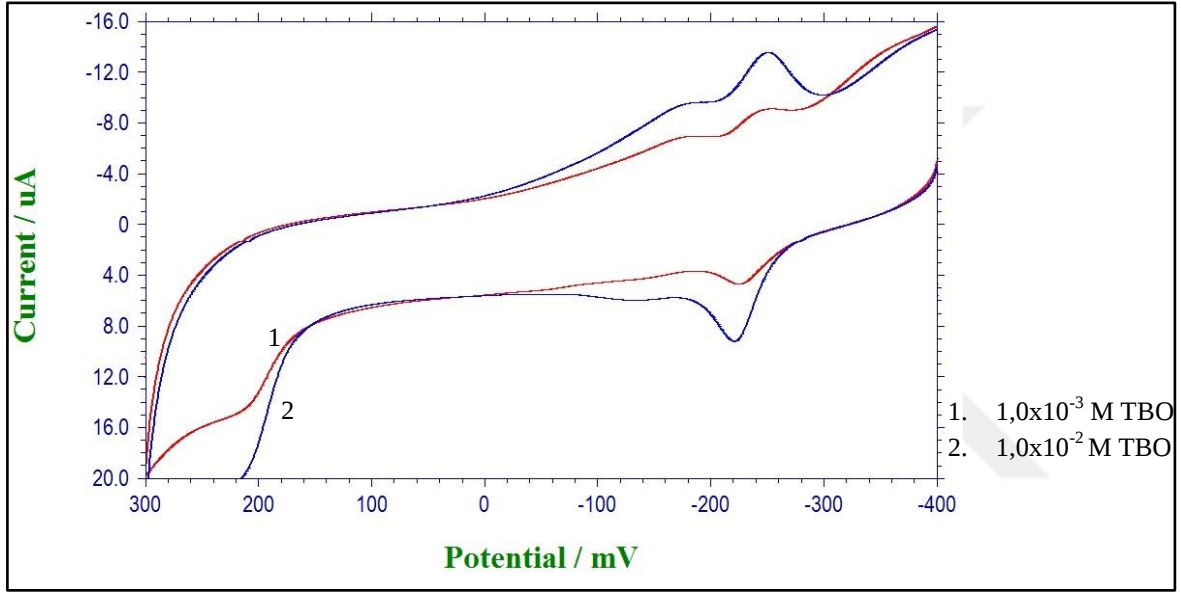
Hazırlanan kolin biyosensörünün en iyi çalışma koşulları araştırıldı. Enzim elektrot için pH, sıcaklık ve  $K_M$  gibi parametreler belirlendi.



Şekil 4.1. Kolinin betaine yükseltgenmesi sırasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron aktarımları

#### 4.1. Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi

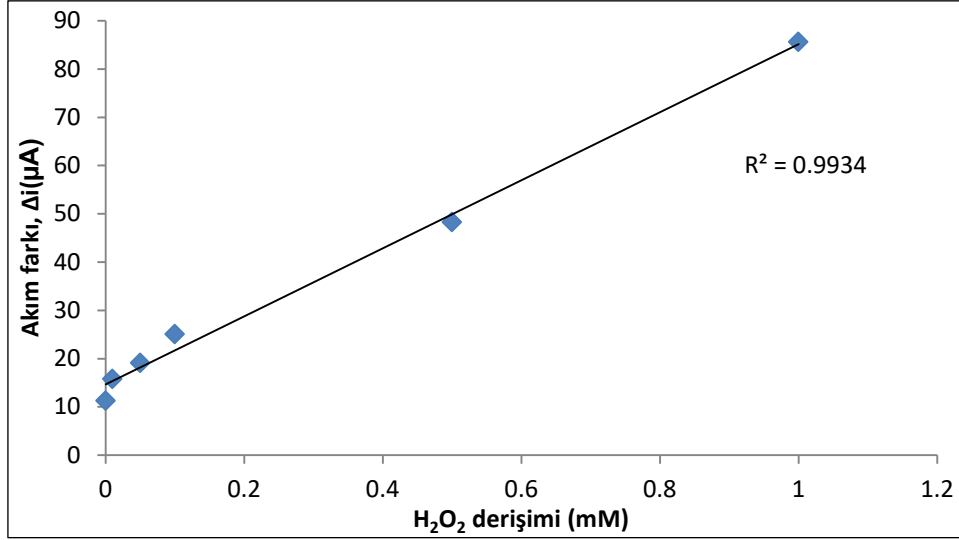
Çalışma potansiyelini belirlemek için Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan elektrodun bulunduğu hücre içine artan miktarlarda TBO ilaveleri yapılarak 300 - (-400) mV arasında dönüşümlü voltametri tekniği ile TBO’nun yükseltgenme piki tespit edildi. -0,23V’da TBO’nun yükseltgendiği görüldü ve bu potansiyel çalışma potansiyeli olarak kabul edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Toluidin mavisi O’nun dönüşümlü voltametri ile elde edilen yükseltgenme pikleri

#### 4.2. Medyator ve Hidrojen Peroksit Etkileşiminin Belirlenmesi

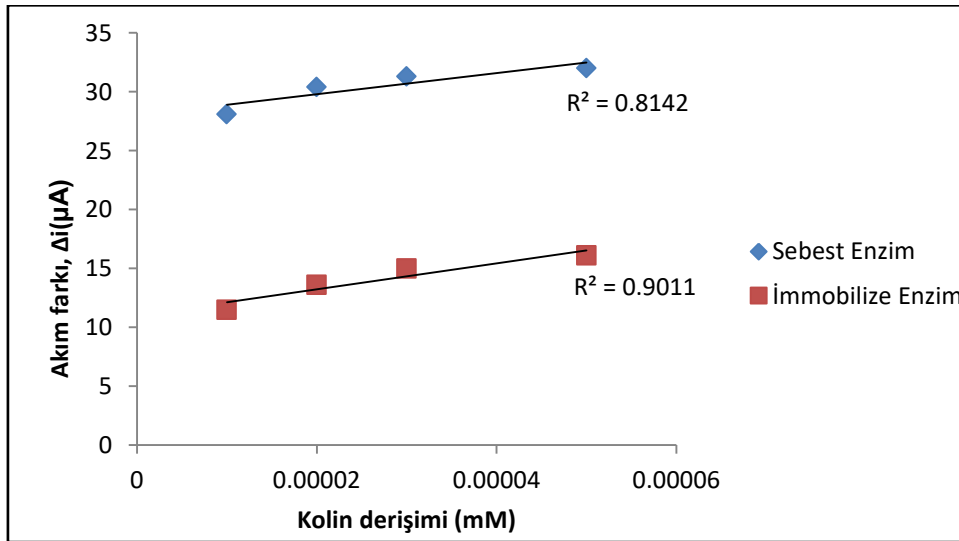
Kolinin kolin oksidaz vasıtasıyla betaine dönüşümü sırasında reaksiyon ürünü olarak hidrojen peroksit açığa çıkar ve ortamdaki Toluidin mavisi O’yu indirger. Hazırlanan biyosensörün temeli indirgenen TBO’nun elektrot yüzeyinde yükseltgenmesine dayanır. Bu sebeple Bölüm 3.3’ de anlatıldığı gibi hazırlanan Pt / PPy – PVS elektrot üzerinde medyator ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> etkileşimi araştırıldı, artan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimine karşı elde edilen akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.3). Elde edilen veriler sonucu medyatorün hidrojen peroksit'e karşı duyarlı olduğu görüldü.



Şekil 4.3. Medyator ve hidrojen peroksit etkileşimi (0,1M pH 7,0 fosfat tamponu, 25°C, -0,23V )

#### 4.3. Serbest Enzimin ve İmmobilize Enzimin Koline Duyarlılığının Belirlenmesi

İmmobilize enzim bir katı destek üzerine sabitlendiği için aktivitesinde serbest enzime göre azalma olur. Bundan dolayı, serbest ve immobilize enzimler ile yapılan çalışmalarda; cevap akımlarından serbest enzimin aktivitesinin immobilize enzime göre daha yüksek olduğu görüldü. Ancak korelasyon katsayılarına bakıldığında immobilize enzimin cevap akımlarının daha doğrusal olduğu görüldü (Şekil 4.4). İmmobilize enzimin daha kararlı olduğu belirlendi.



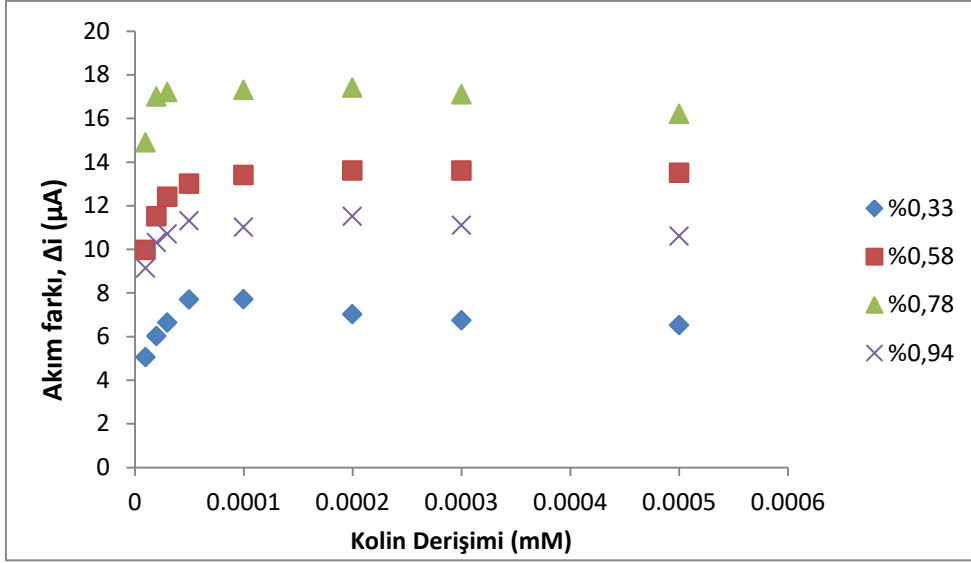
Şekil 4.4. Pt / Ppy – PVS elektrodun ve enzim elektrodun koline karşı duyarlılığı (0,1M pH 7,0 fosfat tamponu, 25°C, -0,23V)

#### 4.4. Gluteraldehit Miktarının Enzim Elektrodun Cevabı Üzerine Etkisi

Çapraz bağlama yöntemi enzim elektrotların hazırlanmasında en fazla tercih edilen enzim immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Yöntemin uygulanabilirliği basit ve kolaydır. Ayrıca bu yöntem, biyobileşen ve dönüştürücü arasında güçlü kimyasal bağlanma sağlar. Ancak çapraz bağlama boyunca enzimin aktif bölgesinde meydana gelen kimyasal değişimlerden dolayı aktivite kaybına da neden olmaktadır [97].

Gluteraldehit enzim moleküllerinin amin grupları ile etkileşime girer ve bağlanmayı gerçekleştirir. Ancak gluteraldehit küçük bir molekül olduğu için sadece enzim yüzeyinde bulunan amin grupları ile değil, enzimin iç kısımlarındaki amin grupları ile de etkileşime girebilir. Sonuçta enzimin üç boyutlu yapısı ve dolayısıyla katalitik aktivitesi etkilenebilir, çünkü enzimin aktif bölgesi fazla çapraz bağlanma ile bloke olabilir [98]. Bu nedenle, gluteraldehit ile çapraz bağlama yönteminde gluteraldehit miktarının aktiviteye etkisi araştırıldı.

Miktarları kütlece %0,33, %0,58, %0,78, %0,94'lük gluteraldehit kullanılarak kolin biyosensörleri hazırlandı ve -0,23 V'da TBO'nun yükseltgenme akımları ölçülerek kolin derişimine karşı cevap akımları grafiğe geçirildi (Şekil 4.5). Grafik incelendiğinde artan %0,33, %0,58 ve %0,78'lik gluteraldehit miktarları ile cevap akımlarının arttığı görüldü. %0,94'lük gluteraldehit kullanılarak hazırlanan biyosensörün cevap akımının azaldığı görüldü. Elde edilen sonuçlardan; %0,33 ve %0,58'lik gluteraldehitlerin yeterli etkileşim için miktarlarının az geldiği ve %0,94'lük gluteraldehit miktarının fazla gelmesinden dolayı aşırı bağlanma olduğu ve enzimin aktivitesinde azalmaya sebep olduğu şeklinde yorum yapılabilir. En yüksek cevap akımı %0,78'lik gluteraldehit ile elde edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda bu miktarda gluteraldehit alınarak immobilizasyon yapılmıştır.



Şekil 4.5. Gluteraldehit miktarının biyosensör aktivitesine etkisi (0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25°C, -0,23V)

#### 4.5. Enzim Elektrodunun En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

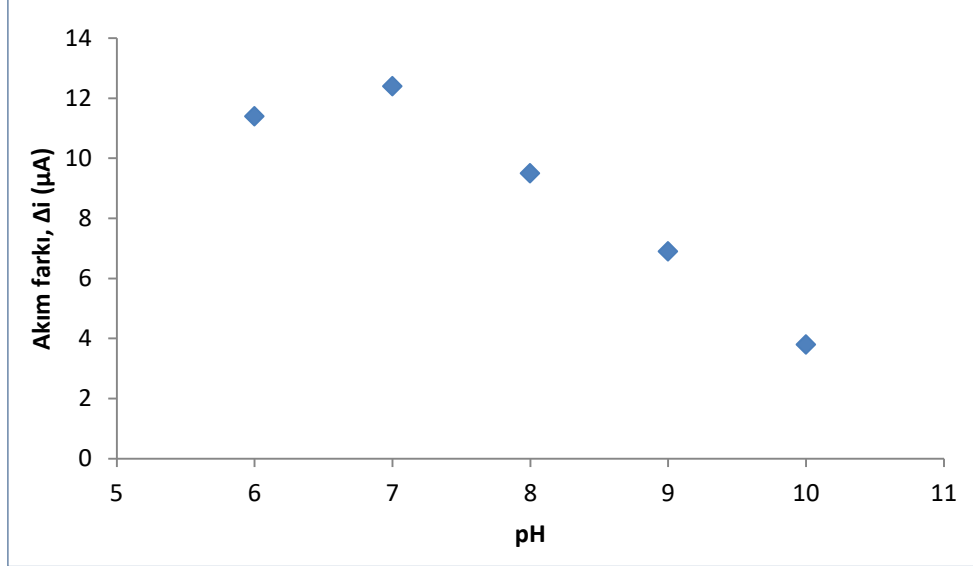
##### 4.5.1. pH etkisi

Enzimlerin aktivitelerini etkileyen en önemli faktörlerden biri de pH'dır. Çünkü her enzimin aktivitesini gösterdiği kendisine özel üç boyutlu yapısı vardır ve pH değişimi enzimin üç boyutlu yapısını da değiştirebilir. Enzimin bulunduğu çözeltideki pH değişirse, aktif bölgesindeki veya yan zincirlerdeki fonksiyonel grupların iyonlaşmasına sebep olarak aktivitede azalmaya veya artmaya neden olur. Enzimlerin maksimum derecede aktiviteye sahip oldukları pH değerine optimum pH denir.

Bölüm 3.4'deki gibi hazırlanan enzim elektroduna pH'nın etkisini belirlemek amacıyla, 6,0 – 10,0 arasında değişen farklı pH' lardaki fosfat ve glisin tamponları kullanıldı. İmmobilize edilmiş kolin oksidazın en iyi aktivite gösterdiği pH değeri 7,0 olarak bulundu (Şekil 4.6).

Literatürler incelendiğinde kolin oksidaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği pH değerlerinin 8,0 [33], 7,4 [40], 7,8 [41], 8,0 [42], 7,4 [46] olduğu görüldü. Bu veriler değerlendirildiğinde yapmış olduğumuz çalışma sonucu elde edilen pH değerinin literatür

değerlerine yakın olduğu ancak kullanılan polimerin farklı olmasından dolayı enzimin en iyi aktivite gösterdiği pH değerinin farklı olduğu görüldü.

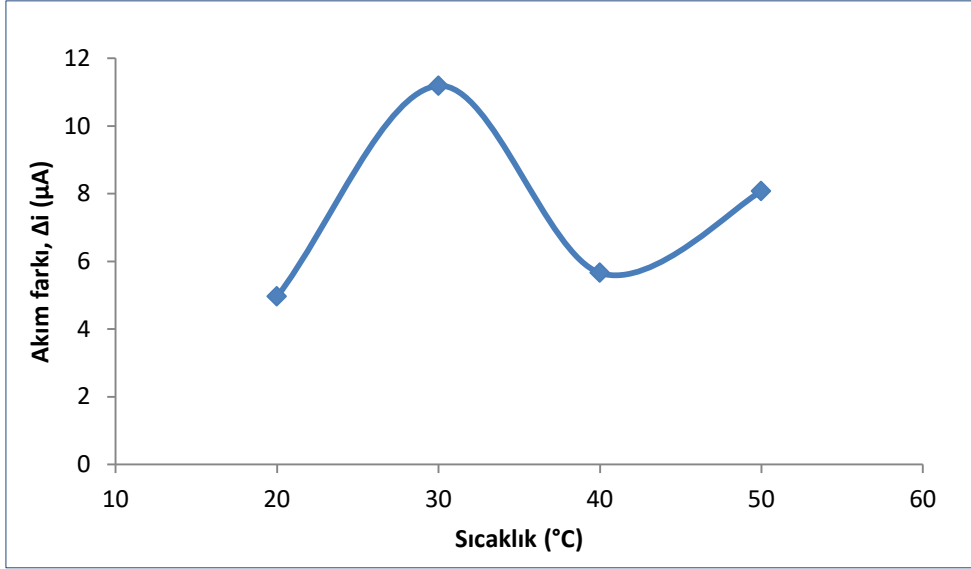


Şekil 4.6. Enzim elektrodun cevabına pH'nın etkisi ( 25°C, -0,23V )

#### 4.5.2. Sıcaklık etkisi

Enzimlerin aktivitesini etkileyen faktörlerden biri de sıcaklıktır. Enzimler, üçüncül yapıya sahiptir. Belirli bir değere kadar sıcaklık artışları genellikle enzimlerde artan aktiviteye karşılık gelir. Ancak çok yüksek sıcaklıklarda üçüncül yapının bozulması ya da birbiri üzerine yığılması sebebiyle enzim etkisiz hale geçer. Düşük sıcaklıklar da enzimin etkinliğini azaltır ama yapısını bozmadığından sıcaklık eski haline döndüğünde tekrar aktif hale gelir.

Enzim elektrodun en iyi aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek için pH 7,0 olan fosfat tamponu kullanıldı; hücre içi  $5,0 \times 10^{-5}$  mM sabit kolin derişimi ile sıcaklığın 20°C - 50°C arasında arttırılmasıyla elde edilen akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.7). Grafik incelendiğinde immobilize kolin oksidaz için en iyi sıcaklık değeri 30°C olarak bulunmuştur. Çalışma koşullarının kolay sağlanması amacıyla daha sonraki çalışmalarda 25°C oda sıcaklığında çalışılmıştır. Literatürler incelendiğinde kolin oksidaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık değerlerinin 35 °C [34], 25 °C [42] ve 30 °C [46] olduğu görüldü.

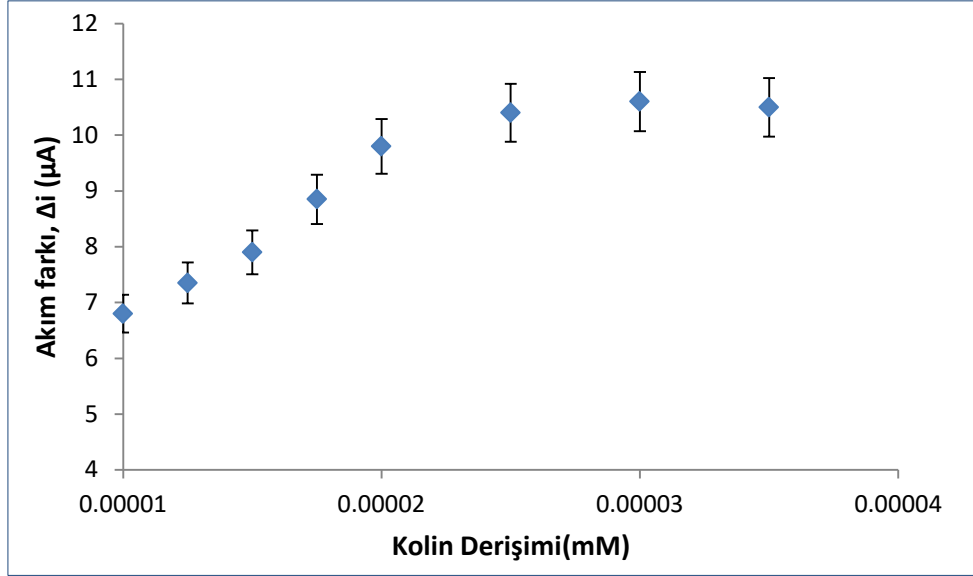


Şekil 4.7. Enzim elektrodun cevabına sıcaklığın etkisi (0,1M pH 7,0 fosfat tamponu, -0,23V )

#### 4.5.3. Substrat derişiminin etkisi

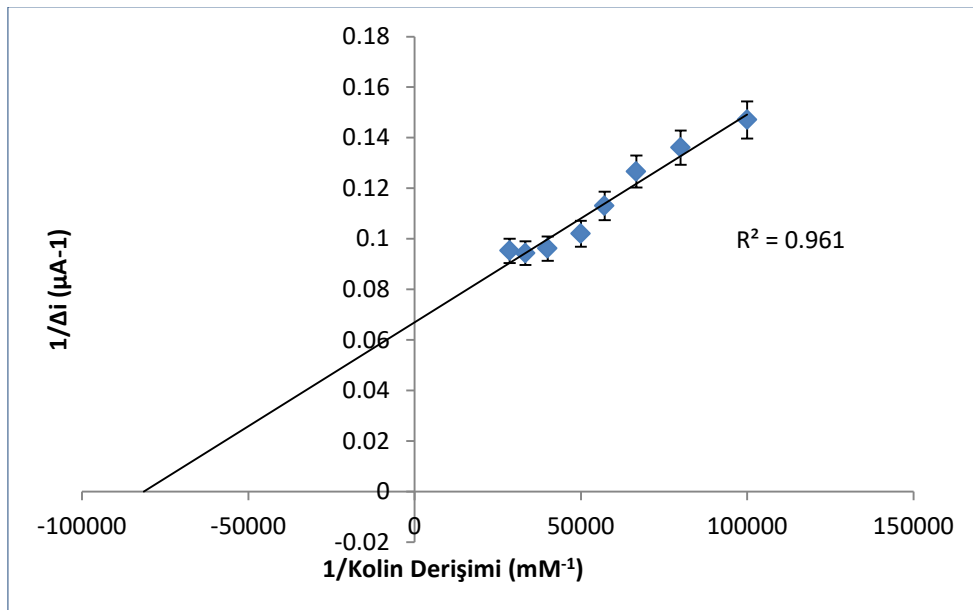
Çalışma potansiyeli, enzim derişimi, sıcaklık ve pH değerlerinin sabit olduğu bir ortamda enzimatik reaksiyon hızı, substrat derişiminin artırılmasıyla başlangıçta doğrusal bir artış gösterir. Substrat derişimi arttırılmaya devam edildiğinde önce doğrusallıktan saparak tepkime hızı artar ve daha sonra hız enzimin aktif merkezinin doymasından dolayı belirli bir düzeyde sabit kalır.

İmmobilize kolin oksidaz için -0,23 V sabit potansiyelde enzim substratına doyuncaya kadar ilaveler yapıldı. Elde edilen veriler ile Michaelis - Menten (Şekil 4.8) ve Lineweaver-Burk (Şekil 4.9) grafikleri çizilerek  $K_{M(göz.)}$  ve  $I_{mak(göz.)}$  değerleri hesaplandı. Enzim elektrodun,  $1,0 \times 10^{-5} - 3,5 \times 10^{-5}$  mM değerleri arasında artan hücre içi kolin derişimlerinde cevap akımlarının önce doğrusal olarak arttığı görüldü.  $2,0 \times 10^{-5}$  mM kolin miktarından sonra tepkime hızı sabitlendi yani enzimin substrata doyduğu görüldü.



Şekil 4.8. Enzim elektrot için Michaelis - Menten grafiği (0,1M pH 7,0 fosfat tamponu, 25°C, -0,23V )

Michaelis - Menten eğrisi hiperbolik bir eğri olduğundan dolayı  $K_{M(göz.)}$  ve  $I_{max(göz.)}$  değerleri doğru bir şekilde bulunamaz. Bundan dolayı Michaelis - Menten eşitliğinin her iki tarafının da tersi alınarak yeni bir eşitlik ve doğrusal olan bir grafik elde edilir. Bu grafikten ekstrapolasyonla  $I_{max(göz.)}$  ve/veya  $V_{max(göz.)}$  ve  $K_{M(göz.)}$  değerleri elde edilir. İmmobilize kolin oksidaz için Lineweaver – Burk grafiği Şekil 4.9’da verilmiştir.



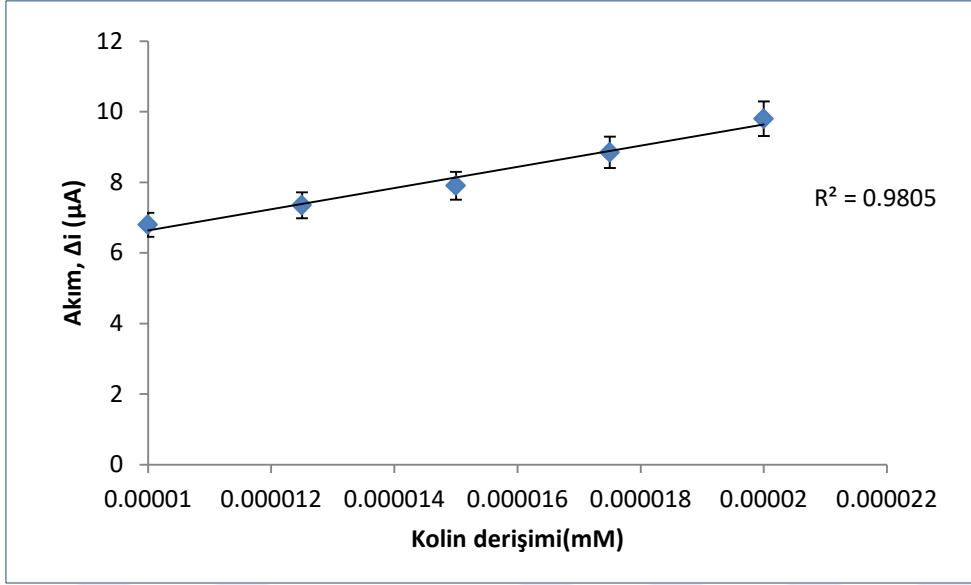
Şekil 4.9. Enzim elektrot için Lineweaver – Burk grafiği (0,1M pH 7,0 fosfat tamponu, 25°C, -0,23V )

Çizilen grafikler ile birlikte yapılan hesaplamalardan immobilize edilmiş kolin oksidaz için  $K_{M(göz.)}$  değeri  $1,19 \times 10^{-5}$  mM,  $I_{max(göz.)}$  değeri ise 14,92  $\mu$ A olarak bulunmuştur. Bulunan  $K_M$  değerleri literatür değerleri ile karşılaştırıldığında, 228  $\mu$ M [33], 0,89 mM [40],  $(0,083 \pm 0,001) \times 10^{-3}$  M [46] ve  $9,7 \times 10^{-5}$  M [49], PPy-PVS film kullanılmasıyla birlikte enzimin substratına olan ilgisinin oldukça arttığı görüldü.

Polipirolün kolay polimerize olması, membran oluşum kolaylığı ve yüksek iletkenlik gibi çok iyi özellikleri bulunmaktadır [94]. Bu çalışmada PPy iletken polimeri PVS ile doplanmıştır. Literatürde, iletken polimerlerin para-toluen sülfonat, polistiren sülfonat, polivinil sülfonat (PVS) gibi büyük polimerik anyonlar ile birlikte kullanıldığında çevresel kararlılığın, biyo-uyumluluğun ve iletkenliğin artırıldığı belirtilmektedir. Bu tipteki dopantlar indirgenme işlemi boyunca yük nötralliğini korumaya yardımcı olur [95,99]. PPy-PVS polimerinin bu özelliklerinden, düşük tayin alt sınırının gözlenmesinde de etkili olduğu düşünülmektedir.

#### 4.5.4. Enzim elektrot için kalibrasyon grafiğinin çizilmesi

Enzim elektrodun artan kolin derişimine karşı artan akım değerleri verileri doğrusal aralık kalibrasyon bölgesi olarak seçilir. Seçilen bu bölgelere dayanarak kolin oksidaz enziminin kalibrasyon bölgesinin çok düşük derişimlerde olduğu yani enzim elektrot ile çok düşük derişimlerde bile kolin tayini yapılabileceği görüldü (Şekil 4.10). Çizilen grafikten yola çıkarak Pt/PPy – PVS– ChOx(TBO) enzim elektrodunun en düşük tayin sınırı  $1,0 \times 10^{-5}$  mM, en yüksek tayin sınırı ise  $2,0 \times 10^{-6}$  mM olarak bulundu. Biyosensörün cevap süresi 200 s olarak belirlendi. Elektrodun çalışma aralığı  $1,0 \times 10^{-5}$  –  $2,0 \times 10^{-5}$  mM olarak bulundu. Çalışmada düşük tayin alt sınırının gözlenmesinin PPy-PVS polimerlerine bağlı olduğu düşünülür.

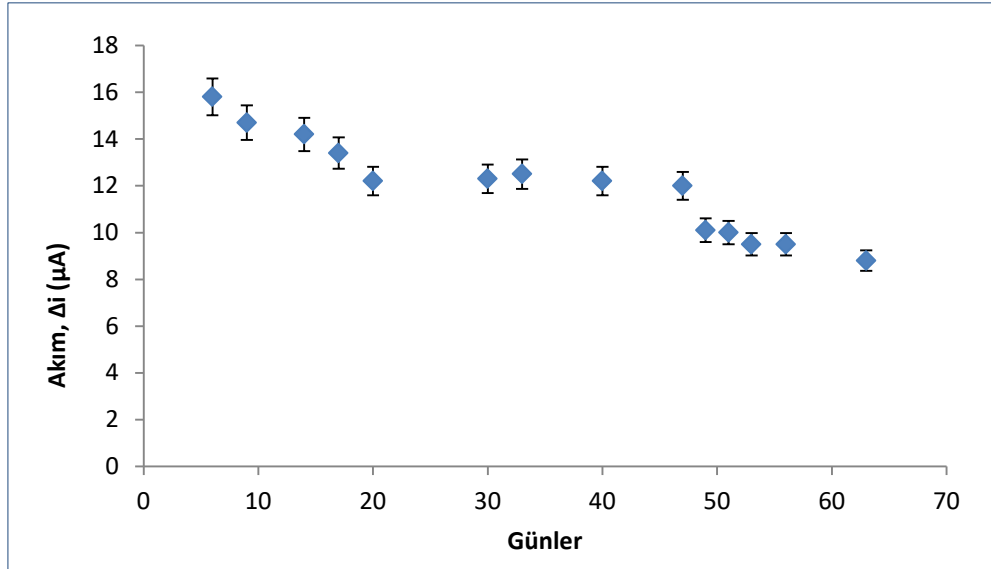


Şekil 4.10. Kolin biyosensörü kalibrasyon grafiği (0,1M pH 7,0 fosfat tamponu, 25°C, -0,23V )

#### 4.5.5. Raf ömrü

Bölüm 3.4’de anlatıldığı gibi hazırlanan elektrot ile belirli zaman aralıklarında bölüm 3.9.4’ te belirtildiği şekilde ölçümler alındı. Hücre içi derişimi  $5,0 \times 10^{-5}$  mM olacak şekilde kolin ilaveleri yapıp, 63 gün boyunca belirli aralıklarda elde edilen akım farkı değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.11). Elde edilen veriler değerlendirildiğinde elektrodun % 44,3 oranında aktivitesini kaybettiği, % 55,7’ sini koruduğu görülmektedir.

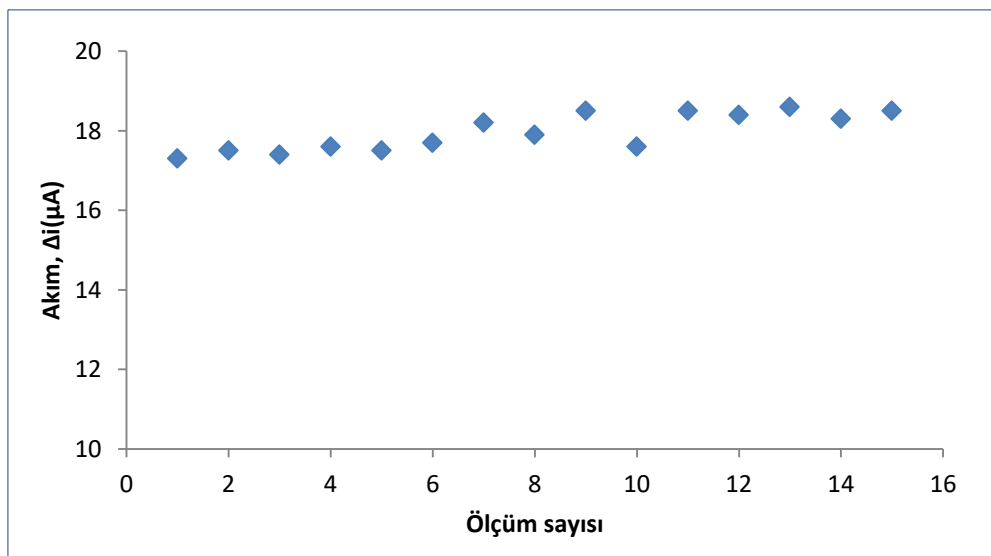
Enzimler mikrobiyal üreme vb. sebeplerden dolayı zamanla aktivitesini kaybeder. Bu sebeple kolin oksidaz çözeltisi kullanılmadığı durumlarda dondurucuda saklanmalıdır. Diğer yandan enzimlerin aktif merkezlerinde zamanla bozulmalar meydana gelebilmesi nedeniyle immobilize kolin oksidaz zaman geçtikçe elektrot yüzeyinden ayrılarak saklandığı fosfat tamponunun içerisine geçiş yapabilir. Ancak polimerin koruyucu etkisinden dolayı immobilize kolin oksidaz için raf ömrü uzun sürmüştür.



Şekil 4.11. Enzim elektrodun raf ömrü (0,1M pH 7,0 fosfat tamponu, 25°C, -0,23V )

#### 4.5.6. Tekrarlanabilirlik

Bölüm 3.4 'te belirtildiği gibi hazırlanan Pt/PPy – PVS – ChOx(TBO) elektrodu için tekrar kullanılabilirlik ölçüldü. Bu amaçla hücre içi  $1,0 \times 10^{-4}$  mM kolin ilaveleri yapılarak arka arkaya 15 ölçüm alındı. Ölçüm sayısına karşı akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.12). 15 ölçüm sonunda ise tekrarlanabilirlikte bağıl standart sapma % 2,64 olarak bulundu. Bu da enzim elektrodun tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.12. Elektrodun tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi (0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25°C, -0,23V)

#### 4.6. Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler

Tayin yapılacak olan ortamda bulunan bazı elektroaktif türlerin çalışılan potansiyelde indirgenip/yükseltgenmesiyle bozucu etki yaratabilmektedir. Medyatör kullanılarak çalışma potansiyelinin düşürülmesi veya çalışılacak numunenin seyreltilmesi ile elektroaktif türlerin bozucu etkisi azaltılabilir veya ortadan kaldırılabilir. Çalışmamızda medyatör kullanıldığında girişim etkisi yüksek olan parasetamol ve ürik asit gibi maddelerin girişim etkilerinin oldukça düşürüldüğü görüldü. Bölüm 3.10’da anlatıldığı gibi girişim yapan maddelerin etkisi belirlendi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Biyosensör üzerine ( $1,5 \times 10^{-4}$  mM kolin derişiminde) girişim yapan maddeler ve etkileri

| Girişim Yapan Madde | Hücre içi<br>Derişimi( $\mu$ M) | Kolin Hücre içi<br>Derişimi( $\mu$ M) | % Girişim   |
|---------------------|---------------------------------|---------------------------------------|-------------|
| Askorbik Asit       | 1,0                             | 0,15                                  | 12,4        |
| Parasetamol         | 1,0                             | 0,15                                  | 2,8         |
| Sistein             | 1,0                             | 0,15                                  | 0,6         |
| Glukoz              | 50,0                            | 0,15                                  | 3,9         |
| Alanin              | 5,0                             | 0,15                                  | Girişim Yok |
| Dopamin             | 0,1                             | 0,15                                  | 1,7         |
| Ürik Asit           | 3,0                             | 0,15                                  | 4,1         |

#### 4.7. Sentetik Numunede Kolin Tayini

Bölüm 3.11’deki gibi biyosensörün sentetik numunedeki davranışı araştırıldı ve kalibrasyon grafiği kullanılarak (Şekil 4.10) gerekli hesaplamalar yapıp sonuçlar incelendi. Böylece biyosensörün tayinleri ne kadar doğru yaptığı araştırıldı.

Sentetik kandaki kolinin hücre içi derişimi  $1,5 \times 10^{-5}$  mM olarak alındı. 3 denemeden sonra hazırlanmış olan kalibrasyon grafiği kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucu sentetik numunede kolin değeri  $(1,92 \pm 0,04) \times 10^{-5}$  mM olarak bulundu.

#### 4.8. Sonuç

Hazırlanan kolin duyarlı biyosensörün;

-Tayin sınırı  $1,0 \times 10^{-6}$  mM olarak belirlendi ve literatür çalışmaları ile bu değer kıyaslandığında biyosensörümüzün çok daha düşük bir tayin sınırına sahip olduğu söylenebilir. Bu da çok düşük derişimlerde bile kolin tayini yapılabileceğini göstermektedir.

-Elektrodun doğrusal çalışma aralığı ( $1,0 \times 10^{-5}$  -  $2,0 \times 10^{-5}$  mM) dar fakat çok küçük derişimlerde bile tayin yapma fırsatı vermektedir. Ayrıca biyosensör kabul edilebilir bir cevap süresine sahiptir (200 s).

-15 ölçüm sonunda sabit kolin derişiminde biyosensörün akım cevaplarının bağıl standart sapmasının % 2,64 olduğu görüldü. Bu verilere göre biyosensörümüzün yüksek bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu söyleyebiliriz.

- Enzim elektrodumuzun 63 günün sonunda başlangıçtaki amperometrik cevabının % 55,7' sini koruduğu görüldü. Bu sonuçlara göre kullandığımız PPy-PVS filmin enzim kararlılığını oldukça arttırdığını söyleyebiliriz.

-Kolin oksidaz immobilize edilerek hazırlanan enzim elektrot sistemi için  $K_M$ (gözlenen) değeri  $1,19 \times 10^{-5}$  mM ve  $I_{max}$  (gözlenen) değeri ise 14,92  $\mu A/dk$  olarak bulundu. Literatürler ile kıyaslandığında biyosensörümüzdeki enzimin çok daha düşük bir  $K_M$  değerine sahip olduğu görüldü. Bu değer düşük olması, PPy-PVS filmin kullanılmasıyla birlikte kolin oksidaz enziminin substratı olan koline karşı ilgisinin oldukça arttığını göstermektedir.

-Enzim elektrot sistemi için optimum pH değeri 7,0 olarak belirlendi.

- Enzim elektrot sistemi için optimum sıcaklık değeri 30 °C olarak bulundu.

- Girişim etkisi biyosensörler için çok önemli bir sorundur. Çalışmamızda medyatör (TBO) kullanılarak çalışma potansiyeli -0,23V'a düşürüldü. Böylece girişim etkisi yüksek olan parasetamol ve ürik asit gibi maddelerin girişim etkilerinin oldukça düşürüldüğü görüldü.

-Sonuç olarak tasarladığımız biyosensör; düşük tayin sınırına, düşük cevap süresine, iyi bir tekrarlanabilirliğe ve uzun bir raf ömrüne sahiptir. Küçük  $K_M$  değeri ile enzimin substrata karşı ilgisi oldukça fazladır. Ayrıca biyosensörler için çok önemli bir sorun olan girişim yapan maddelerin etkisi oldukça azdır.

Çizelge 4.2. Literatürdeki kolin biyosensörleri ile bu çalışmada hazırlanan biyosensörün Karşılaştırılması

| Çalışma                    | Çalışma Prensibi             | Doğrusal Aralık                 | İmmobilizasyon Tekniği | Optimum pH | Optimum Sıcaklık | $K_M$            | Referans   |
|----------------------------|------------------------------|---------------------------------|------------------------|------------|------------------|------------------|------------|
| MWCNT Film                 | $H_2O_2$ ,<br>+0,16 V        | 5- 100 $\mu M$                  | Tutuklama              | 7,4        | 35 °C            | -                | [45]       |
| EACC Çok Katmanlı Film     | Prusya Mavisi,<br>0,0 V      | 0,5- 100 $\mu M$                | Adsorpsiyon            | 7,4        | 30 °C            | 0,83±0,1 $\mu M$ | [46]       |
| HRP/CPE                    | Fenotiazin,<br>0,0 mV        | 0,5- 70 $\mu M$                 | Çapraz Bağlama         | 7,4        | 37 °C            | -                | [9]        |
| Ni-PB/BG Nanokompozit Film | Prusya Mavisi,<br>-0,05 V    | 0,45- 100 $\mu M$               | Çapraz Bağlama         | 7,4        | -                | 97 $\mu M$       | [49]       |
| PPy/PVS Film               | $H_2O_2$ ,<br>+0,3 V         | 0,1- 1 $\mu M$ ve<br>0,01- 1 mM | Tutuklama              | 9,0        | 60 °C            | 0,558 $\mu M$    | [39]       |
| PPy/pTS Film               | $H_2O_2$ ,<br>+0,3 V         | 1-100 $\mu M$                   | Çapraz Bağlama         | 9,5        | 65 °C            | 135,5 $\mu M$    | [100]      |
| PPy/PVS Film               | Toluidin Mavisi O,<br>-0,23V | 0,01- 0,02 $\mu M$              | Çapraz Bağlama         | 7,0        | 30 °C            | 0,019 $\mu M$    | Bu Çalışma |

## KAYNAKLAR

1. He, S., Wu, G.-W., Deng, H.-H., Liu, A.-L., Lin, X.-H., Xia, X.-H., Chen, W. (2014). Choline and acetylcholine detection based on peroxidase-like activity and protein antifouling property of platinum nanoparticles in bovine serum albumin scaffold. *Biosensors & Bioelectronics*. 62, 331–336.
2. Jin, J. , Muroga, M., Takahashi, F., Nakamura, T. (2010). Enzymatic flow injection method for rapid determination of choline in urine with electrochemiluminescence detection. *Bioelectrochemistry*. 79, 147–151.
3. Thiagarajan, V., Madhurantakam, S., Sethuraman, S., Rayappan, J. B. B., Krishnan, U. M. (2016). Nano interfaced biosensor for detection of choline in triple negative breast cancer cells. *Journal of Colloid and Interface Science*. 462, 334–340.
4. Kohlmeier, M., Costa da, K.A., Fischer, L.M., Zeisel, S.H. (2005). Genetic variation of folate-mediated one-carbon transfer pathway predicts susceptibility to choline deficiency in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1;102(44), 16025-16030.
5. Keihan, A. H., Sajjadi, S., Sheibani, N., Moosavi-Movahedi, A. A. (2014). A highly sensitive choline biosensor based on bamboo-like multiwall carbon nanotubes/ionic liquid/Prussian blue nanocomposite. *Sensors and Actuators B*: 204, 694–703.
6. Vance, D.E., Walkey, C.J., Cui, Z. (1997). Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from liver. *Biochim Biophys Acta*. 1348, 142–150.
7. Institute of Medicine and National Academy of Sciences USA (1998). *Dietary reference intakes for folate, thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B12, panthothenic acid, biotin, and choline*. Washington DC: National Academy Press. 402–404.
8. Zeisel, S.H., Da Costa, K.A., Franklin, P.D., Alexander, E.A., Lamont, J.T., Sheard, N.F. (1991). Choline, an essential nutrient for humans. *FASEB J*. 5, 2093–8.
9. Serradilla Razola, S., Pochet, S., Grosfils, K., Kauffmann, J.M. (2003). Amperometric determination of choline released from rat submandibular gland acinar cells using a choline oxidase biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 18, 185-191.
10. İnternet: URL:  
<http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.balchem.com%2Ffhn%2Fcholine-science-0&date=2018-01-13>, Son Eriřim Tarihi: 13.01.2018.
11. İnternet: URL:  
<http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fndb.nal.usda.gov%2Fndb%2Fsearch%2Flist%3Fqlookup%3D12036%26for%2520mat%3DFull&date=2018-01-13>, Son Eriřim Tarihi: 13.01.2018.
12. Phillips, MM (2016). Choline: Properties and Determination. *Encyclopedia of Food and Healthy*.1, 73-78.

13. Costa, K.A., Badea, M., Fischer, L.M., Zeisel, S.H. (2004). Elevated serum creatinine phosphokinase in choline – deficient humans: mechanistic studies in C2C12 mouse myoblast. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 80, 163 – 70.
14. Costa, K.A., Gaffney, C.E., Fischer, L.M., Zeisel, S.H. (2005). Choline deficiency in mice and humans is associated with increased plasma homocysteine concentration after a methionine load 1–4. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81, 440.
15. Buchman, A. L. (2009). The Addition of Choline to Parenteral Nutrition. *Gastroenterology*. 137(5), 119-128.
16. Nakamura, A., Suzuki, Y., Umegaki, H., Tajima, T., Endo, H. (2001). Dietary restriction of choline reduces hippocampal acetylcholine release in rats: in vivo microdialysis study. *Brain Research Bulletin*. 56 (6), 593–597.
17. Ikarashi, Y., Takahashi, A., Ishimaru, H., Maruyama, Y. (1994). Striatal extracellular choline and acetylcholine in choline free plazma rats. *Brain Research*. 34, 359 – 63.
18. Şahin, H.A. (2002). Asetilkolin, Kolinesterazlar ve Alzheimer Hastalığı. *Demans Dergisi*. 2, 69 – 73.
19. Ulus, İ.H., Cansev, M. (2010). Kolin'in Merkezi ve Periferik Kolinerjik Nöronlarda ve Kolinerjik İletimdeki İşlevi. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 1 (2), 68 – 80.
20. Chen, L., Oates, K., De Borja, B., Rohrer, J. (2012). Determination of Choline in Infant Formula and Other Food Samples by Ion Chromatography. *Thermo Fisher Scientific*. Sunnyvale, CA, USA.
21. Pomfret, E.A., Costa, K.A., Schurman, L.L., Zeisel, S.H. (1989). Measurement of choline and choline metabolite concentrations using high-pressure liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 180 (1), 85-90.
22. Gurantz, D., Laker, M. F., Hofmann, A. F. (1981). Enzymatic measurement of choline-containing phospholipids in bile. *Journal of Lipid Research*. 22, 373-376.
23. Wınzler, R. J., Meserve, E. R. (1945). Spectrophotometric determination of small amounts of choline. *Journal of Biological Chemistry*. 159, 395-397.
24. Chen, G., Zhang, L., Liu, Y. (2004). Simultaneous determination of allantoin, choline and l-arginine in Rhizoma Dioscoreae by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1043, 317–321.
25. Marty, J.L., Sode, K., Karube, I. (1990). Amperometric determination of choline and acetylcholine with enzymes immobilized in a photocross-linkable polymer. *Analytica Chimica Acta*. 228, 49-53.

26. Lima, J.L.F.C., Delerue-Matos, C., V. F. Vaz, M.C. (2000). Enzymatic determination of choline in milk using a FIA system with potentiometric detection.. *Analyst*. 125, 1281-1284.
27. Haberfield, P., Pessin, J. (1982). Proximate Charge Effects. 2. Enthalpies of Solvent Transfer in the Choline-Anhydrocholine Equilibrium. *Journal of the American Chemical Society*. 104, 6191-6194.
28. Pati, S., Quinto, M., Palmisano, F. (2007). Flow injection determination of choline in milk hydrolysates by an immobilized enzyme reactor coupled to a selective hydrogen peroxide amperometric sensor. *Analytica Chimica Acta*. 594, 234–239.
29. Chen, R. L. C., Hsieh, B-C., Matsumoto, K., Cheng, T-J., Yuu, G., (2007). Choline biosensor constructed with chitinous membrane from soldier crab and its application in measuring cholinesterase inhibitory activities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 45, 673–678.
30. Shia, H., Songa, Z., Huang, J., Yanga, Y., Zhao, Z., Anzaib, J-I., Osab, T., Chena, Q. (2005). Effects of the type of polycation in the coating films prepared by a layer-by-layer deposition technique on the properties of amperometric choline sensors. *Sensors and Actuators B*. 109, 341–347.
31. Qin, X., Wang, H., Wang, X., Miao, Z., Chen, L., Zhao, W., Shan, M., Chen, Q. (2010). Amperometric biosensors based on gold nanoparticles-decorated multiwalled carbon nanotubes-poly(diallyldimethylammonium chloride) biocomposite for the determination of choline. *Sensors and Actuators B*. 147, 593–598.
32. Pundir, S., Chauhan, N., Narang, J., Pundir, C.S. (2012). Amperometric choline biosensor based on multiwalled carbon nanotubes/zirconium oxide nanoparticles electrodeposited on glassy carbon electrode. *Analytical Biochemistry*. 427, 26–32.
33. Shimomura, T., Itohb, T., Sumiya, T., Mizukami, F., Onoa, M. (2009). Amperometric determination of choline with enzyme immobilized in a hybrid mesoporous membrane. *Talanta*. 78, 217–220.
34. Rahman, M.A., Park, D-S., Shim, Y-B. A. (2004). A performance comparison of choline biosensors: anodic or cathodic detections of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated by enzyme immobilized on a conducting polymer. *Biosensors and Bioelectronics*. 19, 1565–1571.
35. Baker, K.L., Bolger, F.B., Lowry, J.P. (2017). Development of a microelectrochemical biosensor for the real-time detection of choline. *Sensors and Actuators B*. 243, 412–420.
36. Zhang, L., Chen, J., Wang, Y., Yu, L., Wang, J., Peng, H., Zhu, J. (2014). Improved enzyme immobilization for enhanced bioelectrocatalytic activity of choline sensor and acetylcholine sensor. *Sensors and Actuators B*. 193, 904–910.
37. Langer, J.J., Filipiak, M., Keçinska, J., Jasnowska, J., Włodarczyk, J., Buładowski, B. (2004). Polyaniline biosensor for choline determination. *Surface Science*. 573, 140–145.

38. Ren, X., Tang, F., Liao, R., Zhang, L. (2009). Using gold nanorods to enhance the current response of a choline biosensor. *Electrochimica Acta*. 54, 7248–7253.
39. Özdemir, M., Arslan, F., Arslan, H. (2012). An amperometric biosensor for choline determination prepared from choline oxidase immobilized in polypyrrole-polyvinylsulfonate film. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 40, 280–284.
40. Yang, M., Yang, Y., Yang, Y., Shen, G., Yu, R. (2004). Bionzymatic amperometric biosensor for choline based on mediator thionine in situ electropolymerized within a carbon paste electrode. *Analytical Biochemistry*. 334, 127–134.
41. Bai, Y-H., Du, Y., Xu, J-J., Chen, H-Y. (2007). Choline biosensors based on a bi-electrocatalytic property of MnO<sub>2</sub> nanoparticles modified electrodes to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Electrochemistry Communications*. 9, 2611–2616.
42. Shi, H., Song, Z., Huang, J., Yang, Y., Zhao, Z., Anzai, J., Osa, T., Chen, Q. (2005). Effects of the type of polycation on the amperometric response of choline biosensors prepared by a layer-by-layer deposition technique. *Materials Science and Engineering C*. 25, 433–435.
43. Peteu, S. F., Emerson, D., Worden, R. M. (1996). A Clark-type oxidase enzyme-based amperometric microbiosensor for sensing glucose, galactose, or choline. *Biosensors & Bioelectronics*. 11(10), 1059–1071.
44. Qin, X., Wang, H., Wang, X., Li, S., Miao, Z., Huang, N., Chen, Q. (2009). Amperometric choline biosensors based on multi-wall carbon nanotubes and layer-by-layer assembly of multilayer films composed of Poly(diallyldimethylammonium chloride) and choline oxidase. *Materials Science and Engineering C*. 29, 1453–1457.
45. Song, Z., Huang, J-D., Wu, B-Y. , Shi, H-B., Anzai, J-I., Chen, Q. (2006). Amperometric aqueous sol–gel biosensor for low-potential stable choline detection at multi-wall carbon nanotube modified platinum electrode. *Sensors and Actuators B*. 115, 626–633.
46. Shi, H., Yang, Y., Huang, J., Zhao, Z., Xu, X., Anzai, J., Osac, T., Chen, Q. (2006). Amperometric choline biosensors prepared by layer-by-layer deposition of choline oxidase on the Prussian blue-modified platinum electrode. *Talanta*. 70, 852–858.
47. Hsieh, B-C., Hsiao, H-Y., Cheng, T-J., Chen, R.L.C. (2008). Assays for serum cholinesterase activity by capillary electrophoresis and an amperometric flow injection choline biosensor. *Analytica Chimica Acta*. 623, 157–162.
48. Zhang, Z., Wang, J., Wang, X., Wang, Y., Yanga, X. (2010). A sensitive choline biosensor with supramolecular architecture. *Talanta*. 82, 483–487.
49. Keihan, A.H., Sajjadi, S., Sheibani, N., Moosavi-Movahedi, A.A. (2014). A highly sensitive choline biosensor based on bamboo-like multiwallcarbon nanotubes/ionic liquid/Prussian blue nanocomposite. *Sensors and Actuators B*. 204, 694–703.

50. Zeng, H., Jiang, Y., Yu, J., Xie, G. (2008). Choline oxidase immobilized into conductive poly(3,4-ethylenedioxythiophene) film for choline detection. *Applied Surface Science*. 254, 6337–6340.
51. Chen, Z., Ren, X., Meng, X., Chen, D., Yan, C., Ren, J., Yuan, Y., Tang, F. (2011). Optical detection of choline and acetylcholine based on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*. 28, 50– 55.
52. Bugg, T. (2004). *Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry* (Second Edition). Oxford: Blackwell Publishing. 25-28.
53. Arnold, S., Donnert, C. (1999). Directed evolution of industrial enzymes. *Trens in Biotechnology*. 17, 135-136.
54. Söyler, M. (2006). *Van Kedisi Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, 1.
55. Nelson, D. L. ve Cox, M. M. (2013). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* (Beşinci Baskıdan Çeviri). (Çev. Elçin Y. M.). Ankara: Palme Yayıncılık. 185.
56. Bingöl, G. (1977). *Vitaminler ve Enzimler* (Birinci Baskı). Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. 50.
57. Gözükara, E. (2001). *Biyokimya* (Dördüncü Baskı). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. (2.Cilt) 1258.
58. Tüzün, C. (1992). *Biyokimya* (İkinci Baskı). Ankara: Palme Yayıncılık. 485.
59. Şen, S. (2002). *Enzim Tutuklanmış Polivinilferrosenyum Perklorat Modifiye Elektrodu ile Asetilkolin Tayini*. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 37-45.
60. Tüzün, C. (2005). *Biyokimya* (Beşinci Baskı). Ankara: Palme Yayıncılık. 84-87.
61. Özdemir, M. (2012). *Kolin Tayini için Polipirrol-Polivinilsülfonat Filme Kolin Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu ile Biyosensör Hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 10-76.
62. Beskan, U. (2011). *Glukoz Tayini için Polianilin-Polivinilsülfonat Filme Glukoz Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu ile Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 7-8.
63. Bright, H.J. ve Porter, D.J.T. (1975). Flavoprotein oxidases. *The Enzymes* (Boyer P.D.) (Üçüncü Baskı). New York: Academic Press. 3, 421-474.
64. Bulut, Y. (2011). *Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış*. 6. *Uluslararası İleri Teknolojiler Sempozyumu (IATS'11)*. Elazığ. 8-10.

65. Telefoncu, A. (1999). Biyoreseptör immobilizasyonu. *Biyosensörler. Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu*. Kuşadası. 42-61.
66. Aykut, U., Temiz, H. (2006). Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*. 3, 51-59.
67. Brian, M. P. (1996). Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. *Biosensors and Bioelectronics*. 11(11), 1079-1113.
68. Yavuz, A. G. (2005). *Polivinil Ferrosen Modifiye Elektrodunu Temel Alan Glukoz Biyosensörünün Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 12-15.
69. Velasco-Garcia, M. N., Mottram, T. (2003). Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems Engineering*. 84 (1), 1-12.
70. Topçu, M. (2003). *Altın Biriktirilmiş Polivinil Ferrosen Modifiye Pt Elektrodunu Temel Alan Glukoz Biyosensörünün Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 21-22.
71. Akkaya, A. Ve Pazarlıoğlu, N. (2012). 21.Yüzyılın Anahtar Teknolojisi:Beyaz Biyoteknoloji. *Kırıkkale Üniversitesi Bilimde Gelişmeler Dergisi*. 1, 22-33.
72. Andreescu, S., Njagi, J. ve Ispas, C. (2008). Nanostructured materials for enzyme immobilization and biosensors (Bölüm 7). *The New Frontiers of Organic and Composite Nanotechnology* (Erokhin V., Ram M. K., Yavuz Ö. ) (Birinci Baskı). Great Britain: Elsevier Yayınevi. 355-394.
73. Görgülü, M. (2011). *Hipoksantin Tayini için Polipirol-Polivinil Sülfonat Filme Ksantin Oksidaz ve Ürikaz Enzimleri İmmobilizasyonu ile Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 15.
74. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, VW. (2000). *Harper's Biochemistry* (25. Baskı). U.S.A.: McGraw-Hill Yayınevi.
75. Monsan, P., Combes, D. (1988). Enzyme stabilization by immobilization. *Methods Enzymol*. 137, 584- 598.
76. Dursun, F. (2009). *Medyatör bağlı matrislerin tyrosinase tabanlı fenol biyosensörüne uygulanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, 21-30.
77. Dzyadevych, S.V., Arkhypova, V.N., Soldatkin, A.P., El'skaya, A.V., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N. (2008). Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *ITBM-RBM*. 29, 171–180.
78. Bahadır, E. B., Meriç Pagano, S. (2014). Pestisit Analizlerinde Elektrokimyasal Biyosensörlerin Kullanımı. *Niğde Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*. 3 (2), 18-28.

79. Chaubey, A. ve Malhotra, B. D. (2002). Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 17, 441–456.
80. Sridharan, G. ve Shankar, A.A. (2012). Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 16(2), 251–255.
81. Chen, S.M., Chuang, G.H, Vasantha, V.S. (2006). Preparation and electrocatalytic properties of the TBO/naion chemically-modified electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 588, 235–243.
82. Thenmozhi, K., Sriman Narayanan, S. (2017). Horseradish peroxidase and toluidine blue covalently immobilized leak-free sol-gel composite biosensor for hydrogen peroxide. *Materials Science and Engineering: C*. 70 (1), 221-230.
83. Aydın, Z. (2007). *İletken Poli(Etilen Teraftalat)/Polipirol Kompozit Liflerinin Kimyasal Polimerizasyonla Hazırlanması ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 58-60.
84. Saçak, M. (2012). *Polimer Kimyası (Altıncı Baskı)*. Ankara: Gazi Kitabevi. 453-454.
85. Aydın, Y. (2012). *İletken Polimerlerin İçerisinde Enzim Tutuklamasıyla Yapılan Biyosensörler*. Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Karaman, 17-18.
86. Dinçkaya, E. (1999). *Biyosensörler*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları. İzmir. 81.
87. Chauhan, N., Pundir, C.S. (2014). Amperometric determination of acetylcholine—A neurotransmitter, by chitosan/gold-coated ferric oxide nanoparticles modified gold electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 6, 11–8.
88. Upadhyay, S., Rao, G. R., Sharma, M. K., Bhattacharya, B. K., Rao, V. K., Vijayaraghavan, R. (2009). Immobilization of acetylcholineesterase—choline oxidase on a gold–platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates and nerve agents. *Biosensors and Bioelectronics*. 25, 832–838.
89. Şen, S., Gülce, A., Gülce, H. (2004). Polyvinylferrocenium modified Pt electrode for the design of amperometric choline and acetylcholine enzyme electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*. 19,1261–1268.
90. Hou, S., Ou, Z., Chen, Q., Wu, B. (2012). Amperometric acetylcholine biosensor based on self-assembly of gold nanoparticles and acetylcholinesterase on the sol–gel/multi-walled carbon nanotubes/choline oxidase composite-modified platinum electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 33, 44– 49.
91. Cremisini, C., Di Sario, S., Mela, J., Pilloton, R., Palleschi, G. (1995). Evaluation of the use of free and immobilised acetylcholinesterase for paraoxon detection with an amperometric choline oxidase based biosensor. *Analytica Chimica Acta*. 311, 273-280.

92. Kök, F.N., Bozoğlu, F., Hasırcı, V. (2002). Construction of an acetylcholinesterase-choline oxidase biosensor for aldicarb determination. *Biosensors and Bioelectronics*. 17, 531-539.
93. Wei, J., Ren, J., Liu, J. , Meng, X., Ren, X., Chen, Z., Tang, F. (2014). An eco-friendly, simple, and sensitive fluorescence biosensor for the detection of choline and acetylcholine based on C-dots and the Fenton reaction. *Biosensors and Bioelectronics*. 52, 304–309.
94. Gros, P, Durliat, H, Comtat, M. (2000). Use of polypyrrole film containing  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  as pseudo-reference electrode: application for amperometric biosensors. *Electrochimica Acta*. 46, 643–650.
95. Chaubey, A., Gerard, M., Singhal, M., Singh, V.S., Malhotra, B.D. (2000). Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole-polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors. *Electrochimica Acta*. 46, 723–729.
96. Aynacı, E., Yaşar, A. and Arslan, F. (2014). An amperometric biosensor for acetylcholine determination prepared from acetylcholinesterase-choline oxidase immobilized in polypyrrole-polyvinylsulphonate film. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 202, 1028-1036.
97. Sassolas, A., Blum, L.J., and Leca-Bouvier, B.D., (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*. 30, 489-511.
98. Xin, Q., and Wightman, R.M., (1997). Enzyme modified amperometric sensors for choline and acetylcholine with tetrathiafulvalene tetracyanoquinodimethane as the electron-transfer mediator. *Analytica Chimica Acta*. 341, 43-51.
99. Arora, K., Prabhakar, N., Chand, S., and Malhotra, B.D., (2007). Immobilization of single stranded DNA probe onto polypyrrole-polyvinylsulfonate for application to DNA hybridization biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 126, 655-663.
100. Şengül, B. (2015). *Polipirol - Paratoluensülfonat (PPy - pTS) Filme Kolin Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu ile Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 59-73.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : BASKIN, Rüya  
Uyruğu : T.C. / K.K.T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 30.06.1992, Seyhan  
Medeni hali : Bekar  
Telefon : 0 (539) 380 86 64  
e-mail : ruyabaskin@gmail.com



### Eğitim

| Derece | Eğitim Birimi            | Mezuniyet tarihi |
|--------|--------------------------|------------------|
| Lisans | Gazi Üniversitesi /Kimya | 2014             |
| Lise   | Türk Maarif Koleji       | 2010             |

### İş Deneyimi

| Yıl  | Yer                                | Görev    |
|------|------------------------------------|----------|
| 2017 | Bilimsel Tıbbi Tahlil Laboratuvarı | Kimyager |
| 2015 | Çağ Kozmetik                       | Kimyager |

### Yabancı Dil

İngilizce

### Yayınlar

-

### Hobiler

Müzik, Kitap okumak, Film izlemek



*GAZİ GELECEKTİR...*