



TİROZİNAZ TEMELLİ DOPAMİN BİYOSENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI

Muhammet Ali AKBIYIK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2022

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.

Muhammet Ali AKBIYIK

18/02/2022

TİROZİNİZ TEMELLİ DOPAMİN BİYOSENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI
(Yüksek Lisans Tezi)

Muhammet Ali AKBIYIK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2022

ÖZET

Bu tez çalışmasında, katekolamin ailesinin elektroaktif bir nörotransmitteri olan dopamini tayin etmek için yeni bir amperometrik biyosensör hazırlandı. Bu amaçla CDs-CPTMS (karbon nano dot-3-Kloropropil-trimetoksisilan) ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot hazırlandı. Tirozinaz enzimi glutaraldehit ile çapraz bağlanarak modifiye karbon pasta elektrot yüzeyine immobilize edildi. Dopamin tayini, enzimatik tepkime sonucu oluşan dopaminokinonun indirgenmesi ile yapıldı. Hazırlanan dopamin biyosensörünün en uygun çalışma koşullarının incelenmesi için doğrusal çalışma aralığı belirlendi. Biyosensörün dopamine cevabına substrat derişiminin etkisi, pH ve sıcaklığın etkisi incelendi. Ayrıca CDs-CPTMS'nin miktarı, tekrarlanabilirlik ve raf ömrü belirlenerek dopamin tayinine girişim yapabilecek bazı maddelerin girişim etkileri belirlendi. Daha sonra biyosensör ile hazırlanan sentetik kan numunesinde dopamin tayini yapıldı.

Bilim Kodu : 20104
Anahtar Kelimeler : Dopamin, tirozinaz, biyosensörler, karbon pasta elektrot
Sayfa Adedi : 69
Danışman : Prof. Dr. Fatma ARSLAN

PREPARATION OF A TYROSINASE BASED DOPAMINE BIOSENSOR

(M. Sc. Thesis)

Muhammet Ali AKBIYIK

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2022

ABSTRACT

In this thesis, a new amperometric biosensor was prepared to detect dopamine, an electroactive neurotransmitter of the catecholamine family. For this purpose, carbon paste electrode modified with CDs-CPTMS (carbon nanodots-3-Chloropropyl-trimethoxysilane) was prepared. The modified carbon paste was immobilized on the electrode surface by cross-linking the tyrosinase enzyme with glutaraldehyde. Dopamine determination was made by reduction of dopaminequinone formed as a result of enzymatic reaction. The linear operating range was determined to examine the optimal operating conditions of the prepared dopamine biosensor. The effects of substrate concentration, pH and temperature on the response of the biosensor to dopamine were investigated. In addition, the amount, reproducibility and shelf life of CDs-CPTMS were determined and the interference effects of some substances that could interfere with the determination of dopamine were determined. Then, dopamine determination was made in the synthetic blood sample prepared with the biosensor.

Science Code : 20104

Key Words : Dopamine, tyrosinase, biosensors, carbon paste electrode

Page Number : 69

Supervisor : Prof. Dr. Fatma ARSLAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana zamanını ayırıp sabırla yardımcı olan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Fatma ARSLAN'a çok teşekkür ederim. Çalışmalarına katkı sağlayan ve bana yol gösteren hocam Prof. Dr. Halit ARSLAN'a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında bana yardımda bulunarak yol gösteren, zaman ayıran ve deneyimlerini benimle paylaşan Arş. Gör. Onur Can BODUR'a teşekkür ederim. Yüksek lisans boyunca ve hayatımın her alanında yanımda olan desteğini ve sevgisini esirgemeyen aileme sonsuz 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.....	5
2.1. Dopamin (DA).....	5
2.1.1. DA biyosentezi.....	6
2.1.2. DA salgılanması	7
2.1.3. DA yıkılımı	8
2.1.4. Parkinson hastalığı	8
2.2. Enzimler	10
2.2.1. Enzimlerin genel özellikleri	10
2.2.2. Enzimlerin sınıflandırılması	10
2.2.3. Enzimlerin yapısı	11
2.3. Tirozinaz Enzimi	14
2.4. Biyosensörler.....	18
2.4.1. Biyosensörlerin yapısı.....	19
2.4.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması	20
2.5. Enzim Esaslı Biyosensörler.....	21

	Sayfa
2.5.1. Amperometrik enzim biyosensörleri.....	22
2.6. Biyosensörlerde İmmobilizasyon.....	22
2.6.1. İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri	26
2.7. Karbon Pasta Elektrotlar	27
2.8. Karbon Dotlar	28
2.9. Kaynak Araştırması.....	30
3. DENEYSEL KISIM	33
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler	33
3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	35
3.3.1. Elektrokimyasal analiz cihazı	35
3.3.2. Hücre ve elektrotlar	35
3.3.3. Su banyosu	36
3.3.4. pH metre	36
3.3.5. Mikro pipet.....	36
3.3.6. Saf su cihazı	36
3.4. Dopamin Biyosensörünün Hazırlanması ve En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi.....	36
3.4.1. Çalışma elektrodun hazırlanması: Karbon pasta elektrot (CPE), modifiye karbon pasta elektrot (MCPE) hazırlanması	37
3.4.2. Karbon pasta elektrodun sabit akıma getirilmesi.....	38
3.4.3. CPE ve MCPE'nin dopamine duyarlılığının belirlenmesi	38
3.4.4. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi.....	39
3.4.5. CDs-CPTMS miktarının belirlenmesi	39
3.4.6. MCPE'ye tirozinaz enziminin immobilizasyonu.....	40

	Sayfa
3.4.7. Glutaraldehit miktarının belirlenmesi.....	40
3.4.8. DA biyosensörünün en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi.....	40
3.4.9. DA tayinine girişim yapan türlerin incelenmesi	43
3.4.10. Sentetik kan çözeltisinde DA tayini	43
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	45
4.1. CPE ve MCPE'nin DA'ya Duyarlılığının Belirlenmesi	45
4.2. Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi	46
4.3. CDs-CPTMS Miktarının Belirlenmesi.....	47
4.4. Glutaraldehit Miktarının Belirlenmesi	48
4.5. Optimum pH	49
4.6. Optimum Sıcaklık.....	50
4.7. Substrat Derişiminin Etkisi	52
4.8. Tekrarlanabilirlik.....	55
4.9. Raf Ömrünün Belirlenmesi.....	55
4.10. DA Tayinine Girişim Yapan Türlerin Etkisi	56
4.11. Sentetik Kan Numunesindeki DA'nın Tayin Edilmesi.....	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	69

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması.....	20
Çizelge 2.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması	25
Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler.....	33
Çizelge 4.1. DA tayinine girişim yapan maddeler ve girişim etkileri.....	57
Çizelge 5.1. Çalışma sonuçlarının literatür ile karşılaştırılması	60

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Dopamin (DA) molekül yapısı	5
Şekil 2.2. DA oluşum tepkimesi	6
Şekil 2.3. DA metabolizması	7
Şekil 2.4. DA yıkılımı.....	8
Şekil 2.5. Parkinson hastalığı olan beyin ve sağlıklı beyin.....	9
Şekil 2.6. Enzimin substrat ile tepkimesi.....	12
Şekil 2.7. Michaelis - Menten grafiği	13
Şekil 2.8. Lineweaver - Burk grafiği	14
Şekil 2.9. Melanin oluşum tepkimesi.....	15
Şekil 2.10. Tirozinaz enziminin üç boyutlu yapısı	16
Şekil 2.11. Tirozinaz enziminin aktif bölgesi	16
Şekil 2.12. Tirozinaz enziminin kataliz mekanizması	17
Şekil 2.13. Biyosensörlerin uygulama alanları	19
Şekil 2.14. Biyosensörlerin yapısı ve bileşenleri.....	20
Şekil 2.15. Enzim esaslı biyosensörlerin çalışma şeması	21
Şekil 2.16. İmmobilizasyon yöntemleri	23
Şekil 2.17. Glutaraldehit molekülü	24
Şekil 2.18. Glutaraldehit ile gerçekleştirilen çapraz bağlama tepkimesi	26
Şekil 2.19. Grafit molekülü.....	28
Şekil 2.20. Karbon nanomalzemeler	29
Şekil 2.21. Karbon dotların sentezi.....	29
Şekil 3.1. Teflondan yapılan karbon pasta elektrot.....	36
Şekil 3.2. CPTMS molekülü	37

Şekil	Sayfa
Şekil 3.3. Grafitin CPTMS ile yüzey alanının genişletilmesi.....	38
Şekil 3.4. MCPE hazırlanması ve çalışma hücresi şeması.....	38
Şekil 4.1. DA tayini için tepkime şeması.....	45
Şekil 4.2. CPE ve MCPE'nin DA'ya duyarlılığının belirlenmesi.....	46
Şekil 4.3. MCPE'nin DA'ya duyarlılığına çalışma potansiyelinin etkisi	47
Şekil 4.4. MCPE'nin DA'ya duyarlılığına CDs-CPTMS miktarının etkisi.....	48
Şekil 4.5. Biyosensörün DA'ya duyarlılığına glutaraldehit miktarının etkisi	49
Şekil 4.6. Biyosensörün DA'ya duyarlılığına pH'nın etkisi	50
Şekil 4.7. Biyosensörün DA'ya duyarlılığına sıcaklığın etkisi.....	51
Şekil 4.8. Biyosensörün amperometrik cevap akımına DA derişiminin etkisi.....	53
Şekil 4.9. DA biyosensörü için kalibrasyon grafiğı 1	53
Şekil 4.10. DA biyosensörü için kalibrasyon grafiğı 2.....	54
Şekil 4.11. Biyosensörün amperometrik cevap akımına DA derişiminin etkisi, Lineweaver-Burk grafiğı	54
Şekil 4.12. Biyosensörün tekrarlanabilirliğinin incelenmesi	55
Şekil 4.13. Biyosensörün raf ömrünün incelenmesi	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

°C	Santigrat derece
%	Yüzde
mg	Miligram
g	Gram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
M	Molar derişim
mM	Milimolar derişim
µM	Mikromolar derişim
nM	Nanomolar derişim
V	Volt
mV	Milivolt
µA	Mikroamper
nA	Nanoamper
Δi	Akım farkı
R ²	Lineer regresyon katsayısı
s	Saniye
dk	Dakika

Kısaltmalar

Açıklamalar

AA	Askorbik asit
BSA	Bovin serum albümin
CDs	Karbon nano dot
CPE	Karbon pasta elektrot
CPTMS	3-Kloropropil-trimetoksisilan
CV	Dönüşümlü voltametri

Kısaltmalar**Açıklamalar****DA**

Dopamin

DPV

Diferansiyel puls voltametrisi

E

Enzim

EC

Enzim kodu

ES

Enzim - substrat ara kompleksi

I_{max}

Maksimum akım farkı

K_m

Michaelis-Menten sabiti

LOQ

Alt tayin sınırı

MCPE

Modifiye karbon pasta elektrot

S

Substrat

UA

Ürik asit

V_{max}

Maksimum hız

1. GİRİŞ

Dopamin (3,4-dihidroksifenetilamin) katekolamin ailesinin elektroaktif bir nörotransmitteridir. Dopamin (DA) insan beynindeki en önemli nörotransmitterdir ve tirozinaz enzimi için bir substrattır. DA'nın merkezi sinir sistemi (CNS) (mesaj iletimini sağlar), adrenal sistem, hormonal sistemler ve kardiyovasküler sistemlerin işleyişinde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. DA, lokomotor aktivite, biliş, duygu, pozitif pekiştirme, besin alımı ve endokrin düzenleme gibi çeşitli işlevleri kontrol eder. Ayrıca beynin ön lobunda da bulunan DA; problem çözme, dikkat ve hafıza için önemli bir yere sahiptir ve beynin diğer alanlarındaki bilgi akışını kontrol eder.

DA birçok besinde, gram başına birkaç nanogramdan birkaç mikrograma kadar bulunmaktadır. Örneğin, muz, avokado ve muz kabuğunda yüksek derişimlerde bulunur. Portakal, domates, elma ve diğer bitkilerdeki dopamin içeriği nispeten düşüktür ve gram başına 1 µg'dan azdır. Bununla birlikte DA, kişinin yemek veya başka bir uyarıcı ile ödüllendirilmesi durumunda salgılanır ve ödül kimyasalı olarak da isimlendirilir.

DA'nın vücuttaki normal derişim aralığı yaklaşık $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M seviyelerindedir. Anormal düzeydeki DA insanlar için ölümcül olabilir. DA'nın derişim seviyesindeki değişim, Parkinson, Alzheimer, Şizofreni, dikkat eksikliği, hiperaktivite ve uyuşturucu bağımlılığı dahil olmak üzere belirli nörolojik bozuklukların çeşitliliği ve ilerlemesi ile doğrudan ilişkilidir. Bununla beraber vücutta, DA ile birlikte ürik asit, askorbik asit gibi maddeler de bulunur. Bu maddeler girişim etkisine neden olarak DA'nın doğru ölçümünü sınırlandırabilir. Bu nedenle, dopaminin doğru tespiti ve miktarının belirlenmesi, çeşitli nörolojik hastalıkların izlenmesi, teşhisi ve önlenmesi için bir yöntem geliştirilmelidir.

DA düzeyini izlemek için immünoassay, akış enjeksiyon analizi (FIA), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), spektrofotometrik ve kulometrik yöntem gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler yüksek hassasiyet ve seçicilik sağlasa da, genellikle pahalı donanım, yüksek eğitimli teknisyenler, uzun tayin süresi ve ön işlemler gerektirir (Rahman ve diğerleri, 2016; Zaidi, 2018; Dinakaran ve Chang, 2016; Shin ve diğerleri, 2019; Balıkçı, 2019; Ermiş, 2019; Q. Liu ve diğerleri, 2020).

DA tayini için kullanılan bu yöntemler karmaşık olduğundan ve pahalı cihaz gerektirdiğinden daha basit ve maliyeti düşük olan yöntemler geliştirilmelidir. Bu sebeple DA tayini için biyosensörlerin kullanılması düşük maliyet, hızlı tepki süresi, yüksek hassasiyet, kolay hazırlanma gibi avantajlarından dolayı tercih edilmektedir. Biyosensörlerin bu avantajlarından dolayı bu tez çalışmasında DA tayini amacıyla bir biyosensör tasarlandı.

Biyosensörler; biyolojik analitlerin tanınmasını sağlayan tanılama materyali içeren ve bir fizikokimyasal dönüştürücü yardımıyla biyolojik analit ile tanılama materyali arasındaki etkileşim sonucunda oluşan ürünün sinyalinin ölçülebilir bir sinyale dönüştürmeye yarayan cihazlardır (Özyurt, 2014).

Biyosensörler, fizik, kimya, biyoloji, biyokimya, tıp, gıda, çevre izleme ve mühendislik gibi çeşitli uygulama alanlarında kullanılır. Biyosensörler düşük maliyet, yüksek hassasiyet, kolay bulunabilirlik, hızlı ve gerçek zamanlı algılama gibi avantajlara sahiptir (Keskin ve Arslan, 2020).

Karbon, özellikle yüksek akım yoğunluklarının olduğu yerlerde yararlı elektrot malzemesidir. Karbon pasta elektrotlar (CPE), esas olarak kimyasal inertlik, sağlamlık, yenilenebilirlik, tekrarlanabilirlik, kararlı tepki, yüksek hassasiyet, düşük direnç, çeşitli algılama uygulamalarına uygunluk gibi avantajları nedeniyle elektrot olarak kullanılır. Ayrıca, CPE'ler toksik olmayan ve çevre dostu elektrotlardır (Tajik ve diğerleri, 2020). Bu özelliklerinden dolayı CPE'ler biyosensör çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır.

Literatürde DA tayini için birçok biyosensör bulunmaktadır. Bu amaçla Raghu ve diğerleri, çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ile modifiye edilen karbon pasta elektroda silika sol jel yardımıyla tutuklama yöntemi ile tirozinaz enzimini immobilize ederek diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ile DA tayini yapmışlardır (Raghu ve diğerleri, 2014). Florescu ve David, kobalt (II)-porfirin ile modifiye edilmiş altın elektroda çapraz bağlama yöntemi ile tirozinaz enzimini immobilize ederek DPV ile DA tayini yapmışlardır (Florescu ve David 2017). Bezerra ve diğerleri, 7,7,8,8 tetraisiyanokinodimetan (TCNQ) ile modifiye edilmiş karbon pasta elektroda polifenol oksidaz enzimini immobilize ederek akış enjeksiyon analizi (FIA) kullanarak amperometrik yöntem ile DA tayini yapmışlardır (Bezerra ve diğerleri, 2003). Bujduveanu ve diğerleri, CaCO_3 nanoparçacıkları ile modifiye edilmiş MWCNT

elektroduna tutuklama yöntemi ile tirozinaz enzimini immobilize ederek kronoamperometrik yöntem ile DA tayini yapmışlardır (Bujduveanu ve diğerleri, 2013). Ramu ve diğerleri, DA tayini için gözenekli grafen-polipirol-polifenol oksidaz ile modifiye edilmiş camı karbon elektrot (GCE-PG-PPy-PPO) kullanarak amperometrik yöntem ile DA tayini yapmışlardır, polifenol oksidaz enzimini çapraz bağlama ile imobileze etmişlerdir (Ramu ve diğerleri, 2021).

Bu tez çalışmasında ise, tirozinaz enzimi esaslı bir amperometrik biyosensör tasarlandı. Bu amaçla karbon dot 3-Kloropropil-trimetoksisilan (CDs-CPTMS) ilk defa Doç. Dr. Meryem Kara, Doç. Dr. Saliha Dinç ve Prof. Dr. Mustafa Özmen tarafından sentezlendi ve karakterize edildi. Karbon pasta elektrot, CDs-CPTMS ile modifiye edildi. Modifiye karbon pasta elektrodun yüzeyine tirozinaz enzimi çapraz bağlanarak immobilize edildi. DA, tirozinazın substratı olduğundan, hazırlanan biyosensörde tirozinaz enzimi kullanıldı. Tirozinazın kullanılması DA ölçümü için yüksek seçicilik sağlar.

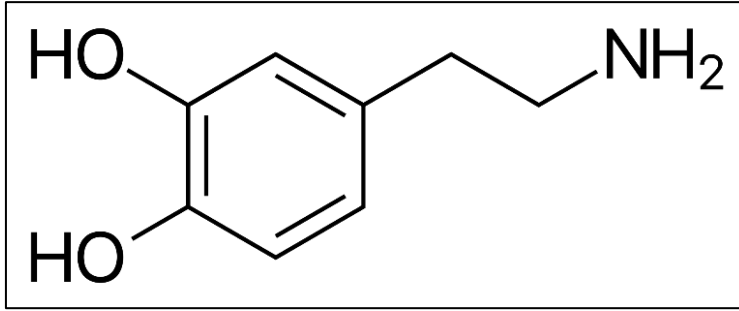
Dopamin tayini, Ag/AgCl'ye karşı -0,15 V'de enzimatik tepkime sonucunda oluşan dopaminokinonun elektrokimyasal olarak indirgenmesiyle yapıldı. Ardından dopamin biyosensörü için optimum çalışma koşulları araştırıldı. Hazırlanan biyosensörün dopamine cevabına pH, sıcaklık ve substrat derişiminin etkisi belirlendi. Ayrıca karbon pasta elektrodu modifiye etmede kullanılan CDs-CPTMS miktarı, biyosensörün doğrusal çalışma aralığı ve girişim yapan maddelerin etkisi incelenmiştir. Bununla birlikte biyosensör sentetik kan numunesine uygulandı.

Literatür incelendiğinde CDs-CPTMS/CPE elektroda tirozinaz enzimi immobilize edilerek hazırlanan bir DA biyosensörü olmadığı görölmektedir. Bu nedenle bu tez çalışması özgün bir çalışma niteliği taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dopamin (DA)

Dopaminin (DA), kimyasal formülü $C_8H_{11}NO_2$ olup, kimyasal olarak adlandırılması 3,4-dihidroksifenetilamin şeklindedir ve molekül yapısı şekil 2.1.'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Dopamin (DA) molekül yapısı

DA, memeli merkezi sinir sistemlerinde mesaj iletimini sağlayan, katekolaminlerin önemli bir üyesi olan nörotransmitter molekülüdür (Wightman ve diğerleri, 1988). Motor ve bilişsel işlevlerde yer alır ve merkezi sinir, hormonal, boşaltım (böbrek) ve kardiyovasküler sistemlerde hayati bir rol oynar (Joshi ve diğerleri, 2010).

Beynin ön lobunda ki dopamin; problem çözme, dikkat ve hafıza için önemli bir yere sahiptir ve beynin diğer alanlarındaki bilgi akışını kontrol eder (Balıkçı, 2019). Bununla birlikte dopamin, kişinin yemek veya başka bir uyarıcı ile ödüllendirilmesi durumunda salgılanır ve ödül kimyasalı olarak da isimlendirilir (Ermiş, 2019).

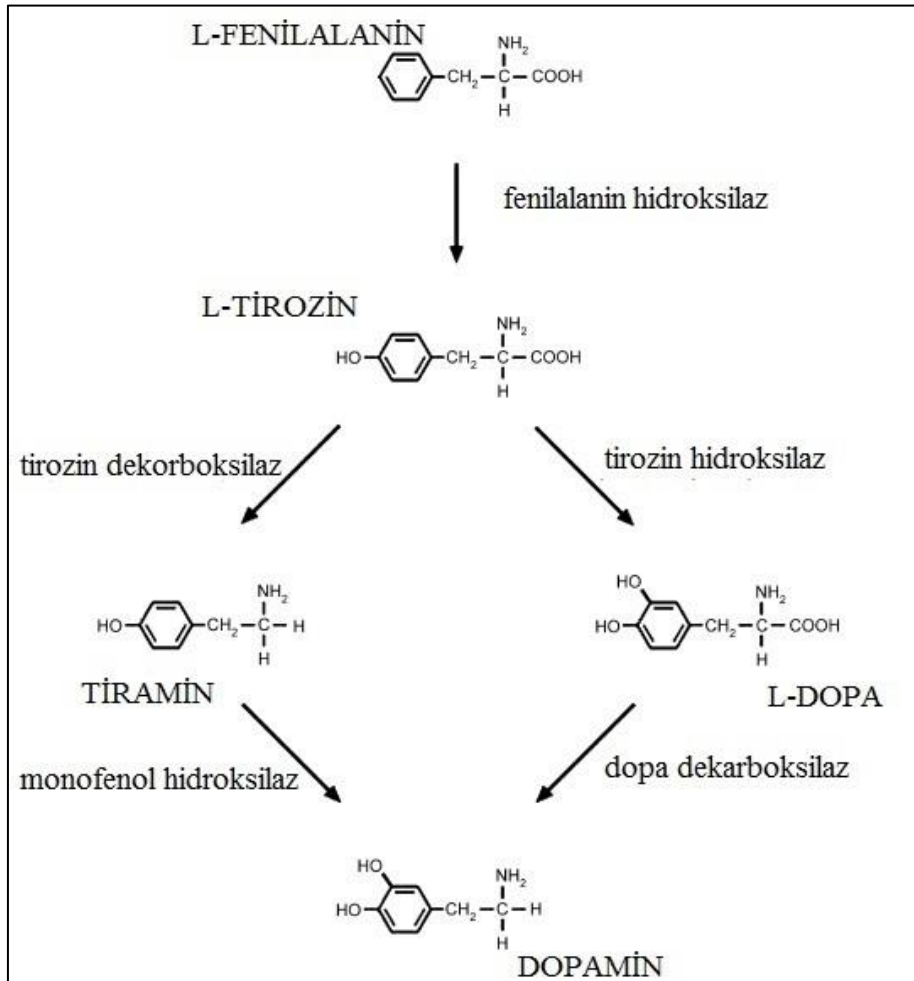
DA ilk olarak 1909 - 1910'da Berlin ve Londra'daki adrenal medulla araştırmaları sırasında sentezlendi, doğal olarak oluşan dopamin ise ilk olarak 1931'de süpürge otundan (*Sarothamnus scoparius*) izole edildi. DA, 1950'lere kadar, merkezi sinir sistemdeki ana katekolaminlerin sentezinde bir ara madde olarak biliniyordu. 1957'de Carlsson dopaminin nörotransmitter molekülü olduğunu keşfetti (Foley, 2019).

Dopaminin hayvanlardaki çoklu işlevi göz önüne alındığında, bitkiler üzerinde araştırmalar yapıldı ve 1968'de diğer bitkilerde de tespit edildi. Dopamin içeriği, türler arasında, gram başına birkaç nanogramdan birkaç mikrograma kadar değişir. Örneğin, muz, avokado ve

muz kabuğunda yüksek derişimlerde bulunur. Bununla birlikte, portakal, domates, elma ve diğ er bitkilerdeki dopamin içeriğı nispeten düşüktür ve gram başına 1 µg'dan azdır (Q. Liu ve diğ erleri, 2020).

2.1.1. DA biyosentezi

DA biyosentezi iki yolla gerçekleşir. Öncelikle L-Fenilalanin, fenilalanin hidroksilaz enzimi tarafından L-Tirozine dönüştürülür. Birinci yolda; L-Tirozin, tirozin hidroksilaz enzimi ile hidroksillenir ve L-DOPA'ya dönüşür. Daha sonra L-DOPA, dopa dekarboksilaz enzimi ile DA'yı oluşturur. İkinci yolda; L-Tirozin, tirozin dekarboksilaz enzimi ile Tiramine dönüşür. Daha sonra Tiramin, monofenol hidroksilaz enzimi ile DA'yı oluşturur (şekil 2.2). Böylece dopamin, tiraminin hidroksilasyonu veya L-DOPA'nın dekarboksilasyonu yoluyla üretilir. DA, kendisi bir nörotransmitter olmanın yanı sıra, epinefrin ve norepinefrinin öncüsüdür (Meiser ve diğ erleri, 2013).

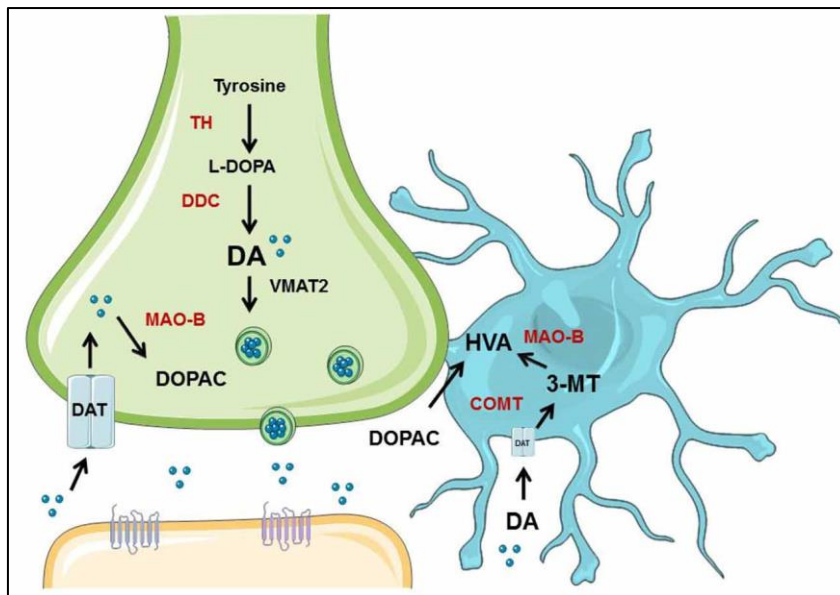


şekil 2.2. DA oluşum tepkimesi (Kulma ve Szopa, 2007)

2.1.2. DA salgılanması

İnsan beyni, bilgileri elektrik sinyalleri biçiminde işleyen ve ileten 100 milyardan fazla nörondan oluşur. Nöronlar arasındaki iletişim, sinaps adı verilen bölgede gerçekleşir. Sinaptik gelişim, normal beyin fonksiyonunu sürdürmek için kritik öneme sahiptir. Sinapslar, sinaptik vezikülleri barındıran presinaptik akson terminallerinden ve nörotransmitter reseptörleri içeren postsinaptik bir bölgeden (genellikle dendritlerde) oluşur. Presinaptik ve postsinaptik bölgeler, 20 - 25 nm'lik bir boşluk olan sinaptik yarık ile ayrılır (Van Spronsen ve Hoogenraad, 2010).

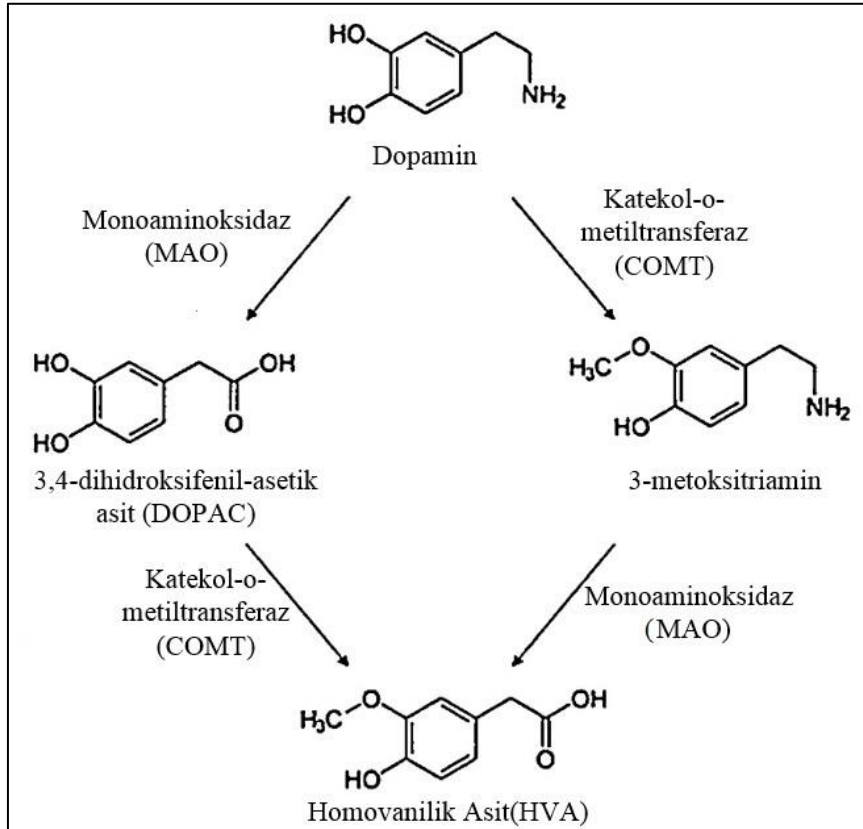
Sinapta DA, postsinaptik ya da presinaptik DA reseptörlerine veya her ikisine birden bağlanır. Bu bağ, alıcıdan bağımsız olarak, presinaptik hücrede bir elektrik potansiyeli üretir. Postsinaptik DA reseptörleri durumunda, sinyal postsinaptik nörona yayılırken, presinaptik DA reseptörleri durumunda, sinyal presinaptik hücreyi uyarabilir veya inhibe edebilir. Otoresseptörler olarak da bilinen inhibitör potansiyeli olan presinaptik reseptörler, nörotransmitterlerin sentezini ve salınımını inhibe eder, bu nedenle normal DA seviyelerini koruma işlevi görür. Sinaptik işlevini yerine getirdikten sonra DA, yüksek afiniteli DA taşıyıcılarının (DAT) veya düşük afiniteli plazma membran monoamin taşıyıcılarının eylemleri yoluyla presinaptik hücreler tarafından tekrar sitozole alınır. Sitozolde bulunan DA daha sonra veziküler monoamin taşınması (VMAT₂) etkisi ile veziküller halinde yeniden paketlenir (Şekil 2.3) (Juárez Olguín ve diğerleri, 2016).



Şekil 2.3. DA metabolizması (Winner ve diğerleri, 2017)

2.1.3. DA yıkılımı

Birkaç farklı süreç, sinapsta dopamin aktivitesini sonlandırır. Birincil süreç, presinaptik nörona dopamin geri alımından oluşur. Başka bir sonlandırma işlemi ise iki farklı enzim dopamini metabolize eder. Çoğunlukla hücre dışı bir enzim olan katekol-o-metiltransferaz (COMT) ve çoğunlukla hücre içi bir enzim olan monoaminoksidaz (MAO), her biri dopamini metabolize eder. COMT ve MAO dopamini metabolize ettiğinde, ana ürün homovanilik asitten (HVA) oluşur (Şekil 2.4). Bu metabolitin beyin omurilik sıvısındaki (BOS) derişimi, beyindeki dopaminerjik aktiviteye karşılık gelir (Kaufman ve Milstein, 2013: 504).



Şekil 2.4. DA yıkılımı (Opmeer ve diğerleri, 2010)

2.1.4. Parkinson Hastalığı

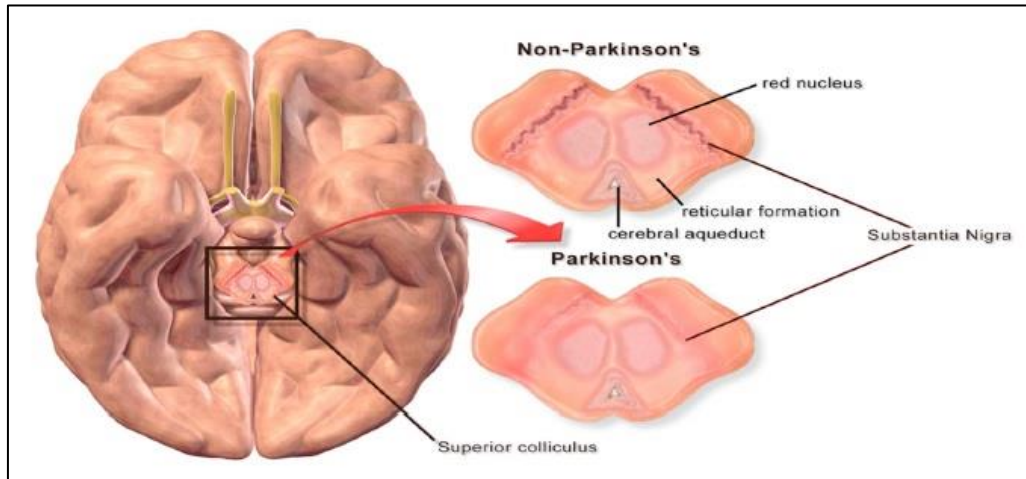
Dopamin, kardiyovasküler ve merkezi sinir sistemlerinde önemli roller oynayan bir nörotransmitterdir. Yüksek dopamin seviyeleri, kalp çarpıntısına, hipertansiyona ve kalp yetmezliğine yol açan kardiyotoksisiteyi gösterir. Aksine, merkezi sinir sistemindeki düşük dopamin seviyeleri, Parkinson hastalığı, Şizofreni, Alzheimer hastalığı, stres ve depresyon

gibi çeşitli nörolojik hastalıkların ana nedeni olarak görülmektedir (Lakard ve diğerleri, 2021).

Dopaminin BOS'taki derişimi Parkinson hastalığında 1,22 ng/mL'den ($7,96 \times 10^{-9}$ M) neredeyse tamamen tükenmeye kadar değişirken, 1,89-189 ng/mL ($1,23 \times 10^{-8}$ - $1,23 \times 10^{-6}$ M) arasındaki düşük derişim aralığı, Alzheimer ve Şizofreni bozukluklarının bir nedenidir (Zaidi, 2018).

Parkinson hastalığı (PD), hem motor hem de bilişsel işlevi etkileyen ilerleyici, nörodejeneratif bir yaşlanma bozukluğudur. Ortalama başlangıç yaşı 55 olan ilerleyici bir hastalıktır. PD'nin birincil patolojisi, özellikle substantia nigra'da (siyah bölge anlamına gelen orta beyinde bulunan yapı) yer alan dopaminerjik nöronların kaybıdır. PD'deki ana motor semptomlar tremor (titreme), rijidite (kas sertliği), bradikinezi (hareketlerin yavaşlaması), hipokinezi (düşük hareket aralığı) ve akinezidir (bilinçli hareketlerin olmaması). Tremor en çok dinlenme sırasında belirgindir. Hastanın uzuvlarının pasif hareketi için sertlik bulunur. Klinik tanı bu motor semptomlara dayalı olarak konur. Motor semptomlara ek olarak, hastalar, özellikle dikkat ve işleyen bellek gibi yürütücü işlevlerde bilişsel eksiklikler sergilerler. PD'li kişiler de depresyon ve demans için yüksek risk altındadır (Fröhlich, 2016: 291).

L-DOPA, Parkinson hastalığının tedavisi için en yaygın olarak kullanılan ilaçtır ancak yüksek üretim maliyeti bulunur (Carvalho ve diğerleri, 2000). Şekil 2.5'te Parkinson hastalığı olan beyin ile sağlıklı beyin karşılaştırılmıştır.



Şekil 2.5. Parkinson hastalığı olan beyin ve sağlıklı beyin (Gottapu ve Dagli, 2018)

2.2. Enzimler

Enzimler, canlılarda meydana gelen kimyasal tepkimelerin çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir ve tepkime sonunda hiçbir değişikliğe uğramadan ürünün yanında yeniden oluşurlar (Erdem, 2012).

2.2.1. Enzimlerin genel özellikleri

- Enzimler genellikle proteinlerin bir araya gelmesiyle oluşan biyokimyasal katalizörlerdir.
- Tepkime hızlarını kimyasal katalizörlerden 10^6 - 10^{16} kat daha fazla yükseltirler.
- Enzimler yalnızca tek bir substrata veya aynı fonksiyona sahip substrat gruplarına karşı spesifik olabilirler.
- En basit hücrede bile aynı anda pek çok sayıda biyokimyasal tepkime meydana getirir.
- Hücredeki tepkimeleri % 100 verimle ve yan ürün oluşturmada sonuçlandırır.
- Enzimatik tepkimeler canlının vücut sıcaklığında ve fizyolojik pH'da gerçekleşir.
- Enzimler sayesinde canlılardaki biyokimyasal tepkimeler daha az enerji ve düşük sıcaklıkta gerçekleştirilebilir (Calay, 2010).
- Enzimler birkaç bin ila birkaç milyon dalton arasında moleküler kütleye sahip olabilir. (Radzicka ve Richard, 1995).

2.2.2. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler tarafından katalize edilen tepkimelerin özelliklerine göre, Enzim Komisyonu (EC) sayı sistemi 1961 yılında enzimleri 6 ana sınıfa ayırmıştır: oksidoredüktazlar (EC1), transferazlar (EC2), hidrolazlar (EC3), liyazlar (EC4), izomerazlar (EC5) ve ligazlar (EC6). Bu 6 kategoriye Ağustos 2018'de yeni bir sınıf olan translokazlar (EC7) eklendi (Tao ve diğerleri, 2020).

Oksidoredüktazlar, yükseltgenme-indirgenme tepkimelerini katalize eder. Bir molekülden H^+ iyonu kopararak, o molekülün yükseltgenmesini; H^+ iyonu aktararak o molekülün indirgenmesini katalizler. Bu enzimlere, dehidrojenaz, oksidaz, peroksidaz ve redüktaz enzimleri örnek verilebilir.

Transferazlar, belirli bir grubun bir maddeden diğerine transferini katalize eder. İlgili gruplar metil, açıl, amino, glikozil veya fosfatı içerir. Bu enzimlere, metiltransferaz, asetiltransferaz ve amino asit transferaz enzimleri örnek verilebilir.

Hidrolazlar, çeşitli bağları hidrolize edebilen enzimlerdir. Bu enzimlere, amilaz, selüloz, lipaz, proteaz ve üreaz enzimleri örnek verilebilir.

Liyazlar, hidrolitik olmayan bağ kırma tepkimeleri yoluyla kimyasal grupların eklenmesini veya çıkarılmasını katalize eder. Bu enzimler, C-C, C-O, C-N, C-S ve diğer bağları parçalayarak bir çift bağın veya yeni bir halkanın oluşumuna veya çift bağlara gruplar eklenmesine yol açar. Bu enzimlere, dekarboksilaz, aldolaz ve pektinaz enzimleri örnek verilebilir.

İzomerazlar, molekül içi yeniden düzenlemeleri veya izomerizasyon tepkimelerini katalize eder. Bu enzimlere, rasemaz, epimeraz, mutaz, cis-trans-izomeraz enzimleri örnek verilebilir.

Ligazlar, hücresel düzeyde merkezi metabolizmada biyolojik olarak gerekli tepkimelerde yer alır. Karbon-karbon, karbon-sülfür, karbon-azot ve karbon-oksijen veya fosfor-ester ve azot-metal bağlarının oluşumu gibi yoğunlaştırma tepkimelerini katalize eder. Bu enzimlere, piruvat karboksilaz, amino asit ligaz, DNA ligaz ve RNA ligaz enzimleri örnek verilebilir.

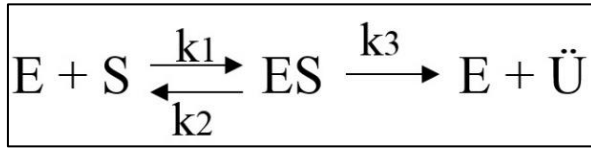
Translokazlar, iyonların veya moleküllerin hücre boyunca yer değiştirmesini veya bunların zarlar içinde ayrılmasını katalize eden ve sıklıkla ATP'nin hidrolizini içeren yeni bir EC sınıfıdır. Örneğin ADP-ATP translokaz. (Vandenberghe ve diğerleri, 2020: 24).

2.2.3. Enzimlerin yapısı

Enzimler biyolojik katalizör görevi gören genellikle protein yapısındaki maddelerdir. Örneğin ribozimler (RNA molekülleri) protein yapısında değildir. Bazı enzimler yalnızca proteinden oluşurken, bazıları da protein ile birlikte protein olmayan kısımlarda içerirler. Bu şekilde oluşan enzimlerde, enzimin protein kısmına apoenzim, protein olmayan kısmına ise, enzimden kolay bir şekilde ayrılabilirse koenzim (NAD^+ , FAD , TPP , CoA gibi organik bileşikler) veya kofaktör (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} gibi metal iyonları) denir. Bazı koenzimler

kovalent bağlanır bunlara ise prostetik grup adı verilir. Enzimlerin protein kısmına apoenzim denir ve genellikle aktif değildir. Apoenzimin koenzim ile birlikte oluşturduğu bölgeye holoenzim denir ve enzimin katalitik aktivite göstermesini sağlar (Aynacı, 2015; Koçak, 2020).

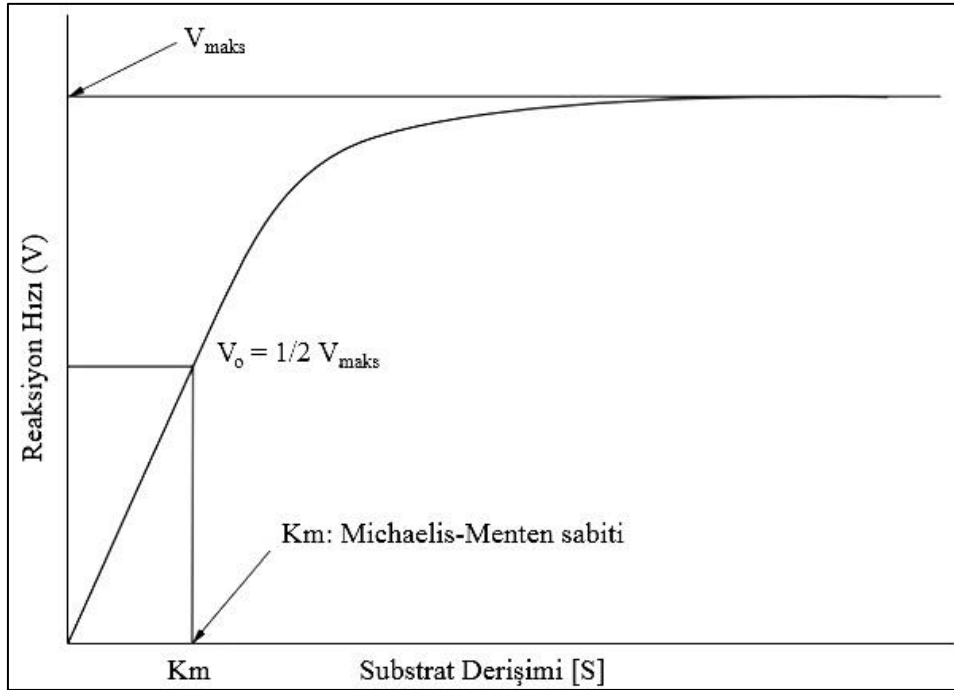
Substrat enzimin tepkimeye uğrattığı maddedir (Yıldız, 2021). Enzimin substratı ile olan tepkimesi Şekil 2.6’da verilmiştir. Bu tepkimeye enzimin substrat ile tepkimesinden enzim-substrat kompleksi oluşur, ardından oluşan kompleks ürün ve enzime dönüşür.



Şekil 2.6. Enzimin substrat ile tepkimesi

Şekil 2.6’da verilen tepkime enzimatik tepkimeler için geçerlidir ve 1903 yılında Henri tarafından türetilen ilk genel hız eşitliğidir. Burada verilen başlangıç hızı (k_1) enzimatik tepkimenin hızını belirler. ES kompleksinin E+S’ye dönüşüm hızı (k_2) E+Ü’ye dönüşüm hızından (k_3) çok daha hızlıdır (Uçar, 1984).

Enzim aktivitesini değiştiren faktörler, enzim derişimi, substrat derişimi, sıcaklık ve pH şeklinde sıralanabilir. Enzim aktivitesi, değişen substrat derişimleri altında tek bir enzim derişiminde belirlenirse, Şekil 2.7’de gösterilen hiperbolik bir grafik elde edilir (A. Blanco ve G. Blanco, 2017: 163-164).



Şekil 2.7. Michaelis-Menten grafiğı (Litwack, 2018: 100)

Tepkime hızı ve substrat derişimi arasında kesin bir ilişki kurmak için Michaelis ve Menten, K_m (Michaelis sabiti) olarak adlandırılan bir sabit tanımladılar. K_m , maksimum tepkime hızının yarısına eşit bir değere ulaştığı substrat derişimine karşılık gelir. K_m , her enzim için onu karakterize etmeye izin veren belirli bir değere sahiptir. Hiperbolik enzim-substrat doygunluğu, Michaelis ve Menten tarafından türetilen aşağıdaki denklem ile tanımlanır:

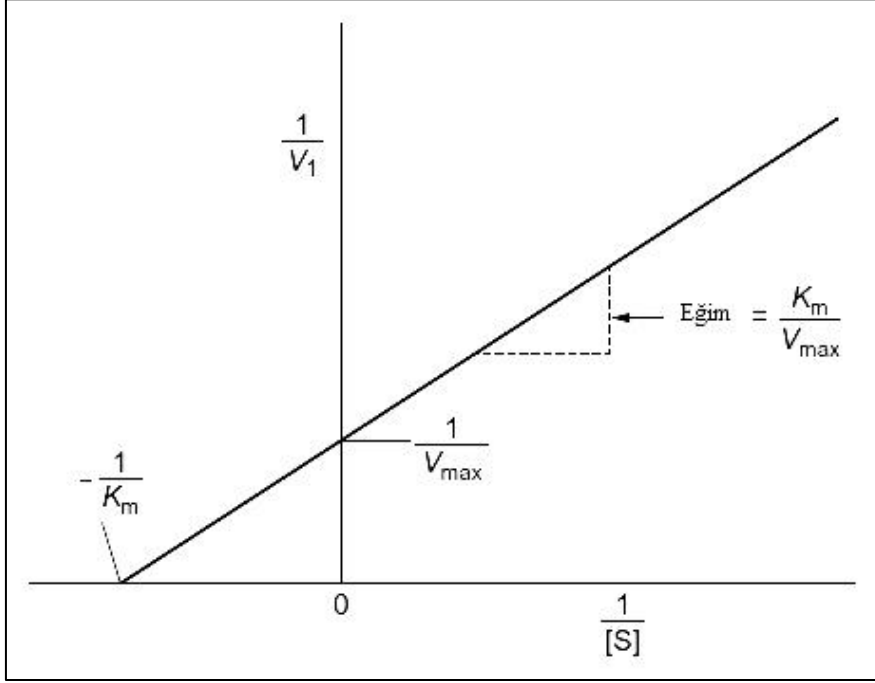
$$V = \frac{V_{maks} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Burada V , $[S]$ 'ye eşit substrat derişimi ile başlangıç hızına karşılık gelir. V_{maks} , maksimum hızı temsil eder ve K_m , spesifik substrat için Michaelis sabitine eşittir. Michaelis-Menten denklemi cebirsel olarak K_m değerinin pratik olarak belirlenmesi için faydalı eşdeğer denklemlere dönüştürülebilir. Denklem ters çevrildiğinde aşağıdaki denklem elde edilir:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{maks}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{maks}}$$

Bu son denklem Lineweaver-Burk denklemi olarak bilinir ve lineer bir çizime karşılık gelir. Başlangıç hızının tersinin ($1/V$) substrat derişiminin tersine ($1/[S]$) karşı grafiğı, düz bir çizgi

verir (Şekil 2.8). Bu doğrunun eğimi $K_m/V_{\max}$ 'a eşittir, dikey eksenle kesişimi $1/V_{\max}$ 'a karşılık gelir ve yatay eksenle kesişimi $-1/K_m$ 'yi verir (A. Blanco ve G. Blanco, 2017: 163-164).



Şekil 2.8. Lineweaver-Burk grafiği (Litwack, 2018)

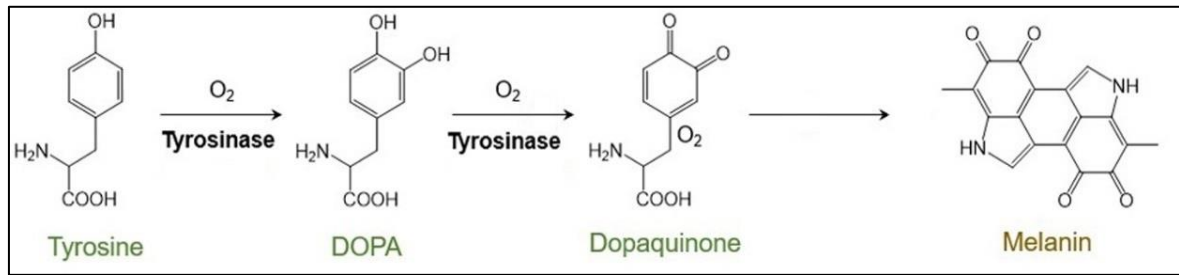
2.3. Tirozinaz Enzimi

Polifenol oksidaz (PPO) olarak da bilinen tirozinaz (EC.1.14.18.1), mikroorganizmalarda, hayvanlarda, bitkilerde ve mantarlarda yaygın olarak bulunan bakır içeren bir metalloenzimdir (S. Sharma ve diğerleri, 2003). Tirozinaz enzimi oksidoredüktazlar sınıfına giren bir enzimdir (Ercili-Cura ve diğerleri, 2015: 78).

Schoenbein 1856'da tirozinaz enziminin yemeklik mantarlarda bulunduğunu keşfetmiştir (Keleş, 1987). Tirozinaz enzimi diğer kaynaklardakine göre muz, avokado, şeftali, elma, mantar, patates, çay yaprakları, kahve tohumları ve tütün yapraklarında daha yüksek derişimlerde bulunur (Özçelik, 2005). Ayrıca kayısı, yabani gül, enginar, yabani pirinç, ıspanak, yonca, buğday, yulaf, bezelye, şeker kamışı yaprağı, bakla yaprakları, fasulye, domates, mısır yaprakları, üzüm, armut, zeytin, gibi meyve ve sebzelerde de tirozinazın olduğu tespit edilmiştir (Owusu, 1989).

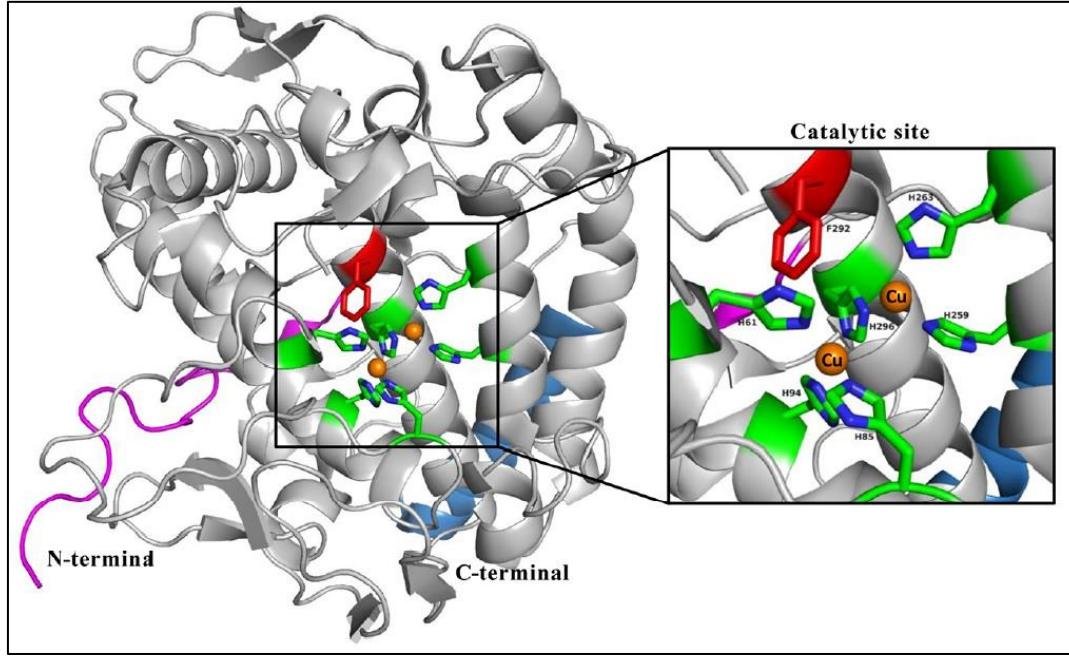
Doğada yaygın olarak bulunan tirozinazlar, pigmentasyon ve bağışıklık sistemi gibi birçok temel biyolojik işlevde yer alır (Jaenicke ve Heinz, 2003). Bu enzim, canlı organizmaların UV radyasyonlarına karşı savunma mekanizması için melanin üretimi gibi farklı işlevleri yerine getirmesi için çok önemlidir. Bitkiler için tanenler, lignin, flavonoidler gibi fenolik polimerlerin üretiminde ve bitkilerde bitki hücre solunumu sırasında redoks potansiyelinin düzenlenmesi ve yaraların iyileşmesi için önemlidir (Claus ve Decker, 2006).

Tirozinaz enzimi melanin oluşmasına sebep olur (Şekil 2.8) ve bu da sebze ve meyvelerde esmerleşmeye neden olur. Bu esmerleşme meyvelerde önemli kayıplara neden olur. Muz, şeftali, kayısı, elma gibi meyveler ve yapraklı sebzelerdeki esmerleşmeler istenmeyen bir durumdur. Ancak, çay, kahve, kakao, siyah incirler ve siyah üzümde tirozinaz aktivitesinden doğan esmerleşme istenen bir durumdur. Bu ürünler bu şekilde karakteristik özelliklerine kavuşurlar (Yılmazoğlu, 2017).



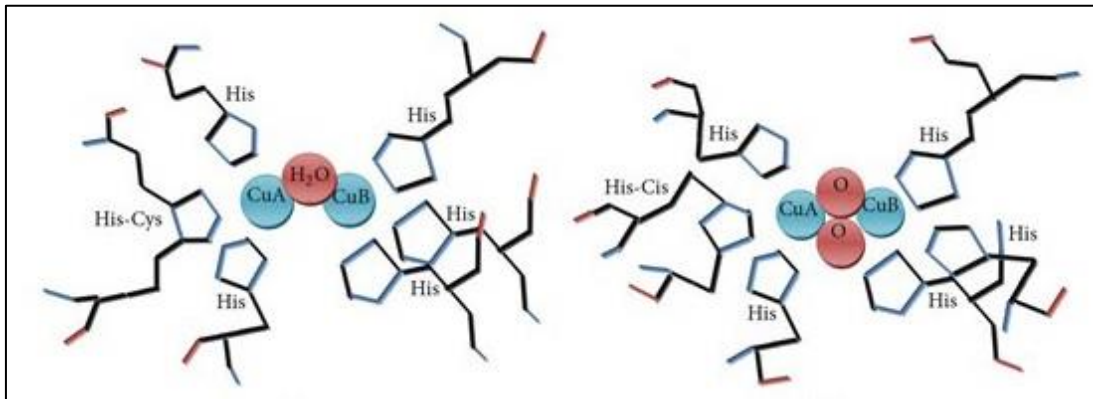
Şekil 2.9. Melanin oluşum tepkimesi (Kwak ve diğerleri, 2020)

Birçok tirozinaz kaynağı nedeniyle yapısal özellikleri, doku ve hücrelerdeki dağılımları ile birlikte doğada çeşitlilik gösterir, bu nedenle tüm türler arasında ortak bir protein gözlenmez. Fark, birincil yapı, boyut, aktif bölge gibi modifikasyon sonrası bölgelerde ve glikozilasyon mekanizmasında gözlenir (Şekil 2.10) (Nawaz ve diğerleri, 2017).



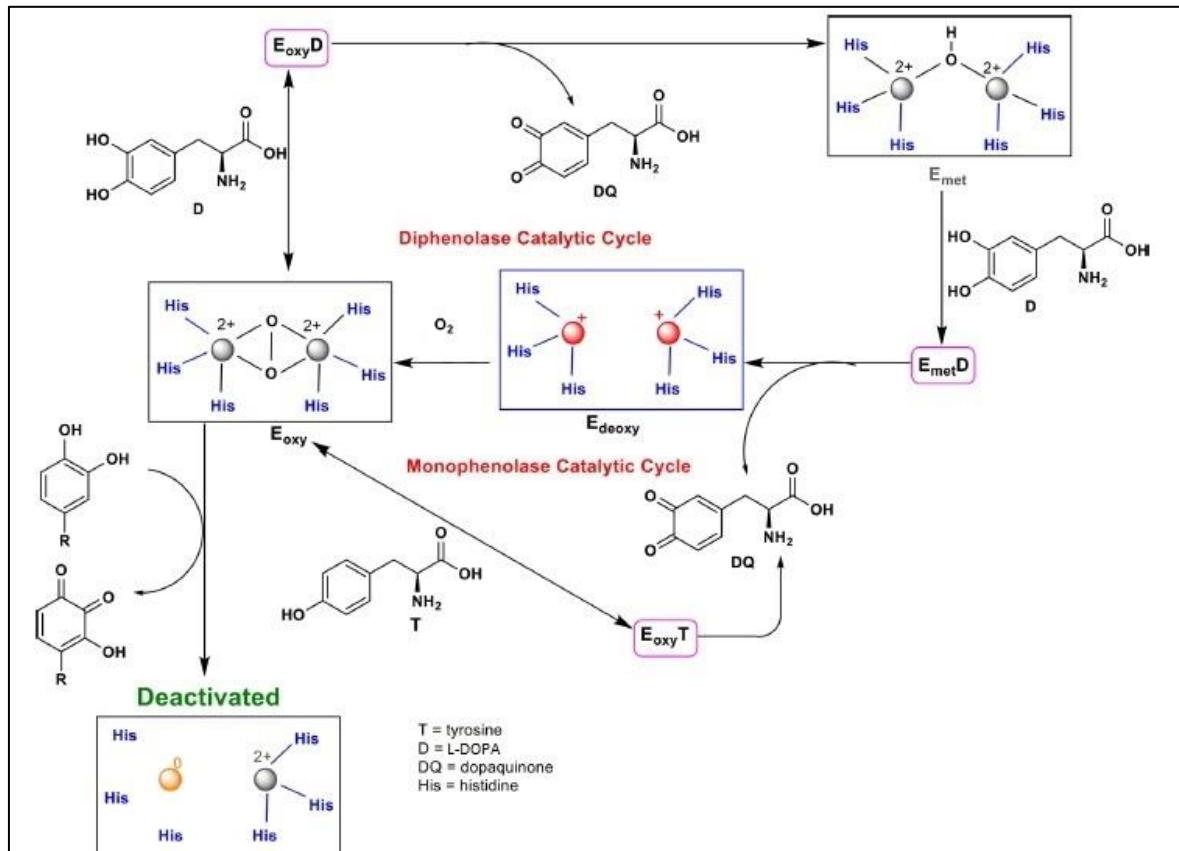
Şekil 2.10. Tirozinaz enziminin üç boyutlu yapısı (Pillaiyar ve diğerleri, 2018)

Genel olarak tirozinazın yapısı, aktif merkezi, N-terminali ve C-terminali olmak üzere üç alandan oluşur. Farklı tür tirozinazlar arasında, merkezi alan, altı histidin kalıntısı ve iki bakır iyonu (CuA ve CuB) içeren en çok korunan bölgedir. Aktif bölgede, sistein ve histidin kalıntıları arasında bir tiyoeter bağı oluşur ve histidin, katalitik mekanizma için bakır iyonlarından birini koordine eder. Tiyoeter bağı, bağlanma bölgesindeki histidin kalıntısını stabilize etmek için oluşturulur. N-terminal alanında, bir transit peptit, enzimin son pozisyonunu düzenler ve bir proteolitik bölünmeye uğrar. Protirozinaz adı verilen gizli bir tirozinaz öncüsü, bir yer tutucu kalıntısı yoluyla aktif bölgeye girişi engelleyen merkezi ve C-terminal alanlarından oluşur. Bu kalıntı, substrat veya bir inhibitöre benzer şekilde aktif bölgeye girer (Şekil 2.10 ve Şekil 2.11) (Pillaiyar ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.11. Tirozinaz enziminin aktif bölgesi (Nawaz ve diğerleri, 2017)

Tirozinazın katalitik mekanizması, bakır iyonlarının oksidasyon durumundaki farklılıklarla birlikte okso-, metoksi- ve deoksi- tirozinazlar olmak üzere üç farklı durumu içerir. Monofenolaz aktivitesinde (L-tirozinin L-DOPA'ya oksidasyonu), deoksi-tirozinaz (E_{deoksi}) oksijene bağlanır ve okso-tirozinaz (E_{oksi}) oluşturur ve daha sonra L-DOPA'ya katalize edilen L-tirozin'i oluşturur. Bu işlemde, enzim sonunda daha fazla O_2 bağlanması için E_{deoksi} olarak geri dönüştürülür. Difenolaz aktivitesinde ise (L-DOPA'nın dopakinona oksidasyonu), okso-tirozinazın rejenerasyonu, iki yakın bakır merkezin bir hidroksi ligandı ile köprülendiği metoksi-tirozinaz (E_{met}) oluşturmak üzere yalnızca bir oksijen atomu bırakır. Tirozinaz esas olarak, örneğin fenoller, tirozini oksitleyemeyen ve tirozin oksidasyonu başlatmadan önce bir L-DOPA tarafından E_{met} formunda oluşur. Bu, E_{met} 'in diğer formlara kıyasla L-DOPA'ya daha yüksek afinitesini açıklar. E_{met} L-DOPA'yı katalize ettikten sonra, E_{deoksi} formunu yeniden oluşturmak için oksijen atomunu kaybeder. Katekol oksidasyonu, Cu^{2+} 'nin Cu atomuna indirgenmesi ve tirozinazın deaktivasyonu ile sonuçlanan fenolik oksidatif mekanizmaya dayanmaktadır (Şekil 2.12) (Pillaiyar ve diğerleri, 2018).



Şekil 2.12. Tirozinaz enziminin kataliz mekanizması (Pillaiyar ve diğerleri, 2018)

2.4. Biyosensörler

Biyosensörler, hassas ve seçici sinyaller üretebilen biyolojik algılama elemanlarından oluşan cihazlardır. Bir hedef ile enzimler, proteinler ve antikorlar gibi ilgili biyotanıma elemanları arasındaki etkileşimlerden kaynaklanan fizikokimyasal değişiklikler, bir dönüştürücü tarafından üretilen sinyal miktarının doğrudan analit derişimi ile ilişkili olduğu ölçülebilir elektronik sinyallere dönüştürülür. Biyosensörler tıbbi teşhis, ilaç keşfi, gıda güvenliği ve çevresel izleme gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (Şekil 2.13). (Moon ve diğerleri, 2018).

Bütün canlı organizmalar hayatlarına devam edebilmek ve yaşadıkları ortama uyum sağlamak için çevrelerindeki değişiklikleri anında algılamaları gerekir. Biyosensörler bu algılama mekanizmasını temel alarak çalışırlar. Canlı organizmaların, algılama hassasiyetleri çok yüksektir. Örneğin köpeklerin koku alma duyusu, insanın koku alma duyusuna oranla yüz bin kat daha fazladır. Kelebekler, eşlerinin saldığı birkaç tane molekülü algılayabilirler. Bazı yılan balıkları, bin litre suda çok az miktardaki yabancı maddeyi bile hemen algılama yeteneğine sahiptir. Algiler zehirli maddelere karşı hassastır. Analiz sistemleri ile canlı organizmaların algılamasını sağlayan biyolojik maddeler birleştirilerek biyosensörler oluşturulur (Kurbanoglu ve diğerleri, 2020).

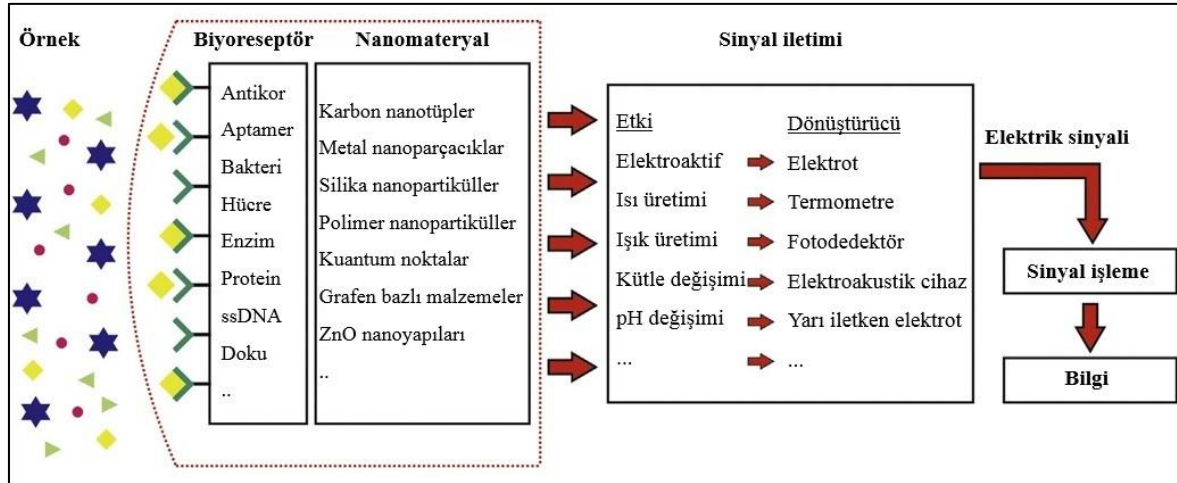
Biyosensörlerin tarihi 1962 yılında bilim adamı Leland C. Clark tarafından enzim elektrotlarının geliştirilmesiyle başlamıştır. Biyosensörler, immünosensörler, glukometreler, biyoçipler ve biyobilgisayarlar olarak da bilinir (Mohanty ve Koucianos, 2006).



Şekil 2.13. Biyosensörlerin uygulama alanları (Bhalla, ve diğerleri, 2016)

2.4.1. Biyosensörlerin yapısı

Bir biyosensör birkaç bileşenden oluşabilir: analit, biyoreseptör, dönüştürücü, elektronik cihaz (Şekil 2.14). Bir analit, fizyolojik/patolojik sağlık koşullarının tespiti için karmaşık biyolojik örneklerde (kan, idrar, ter ve tükürük) bulunan ve saptanması gereken bir belirteç veya gösterge görevi gören bir maddedir. Biyoreseptörler (biyokimyasal molekül), tamamlayıcı analitleri, enzim substratları (glikoz, üre) inhibitörleri, antijenler, tamamlayıcı DNA/RNA iplikçikleri ile birlikte proteinler, enzimler, antikorlar, nükleik asitler, hücreler ve hormonlardır. Dönüştürücüler, analit-biyoreseptör etkileşimleri arasında üretilen bir tür enerjiyi dönüştürmek ve ölçülebilir bir sinyal üretmek için işlev görür. Bir analitin biyolojik olarak tanınmasından elde edilen sinyal, optik ve elektrik sinyalleri şeklinde gösterilir. Dönüştürücüler ve diğer elektronik devrelerden oluşan elektronik cihazlar, sinyallerin yükseltilmesine ve uygun formatta görüntülenmesine yardımcı olur (Kaur ve diğerleri, 2019: 211).



Şekil 2.14. Biyosensörlerin yapısı ve bileşenleri (Di Pietrantonio ve diğerleri, 2019: 182)

2.4.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması

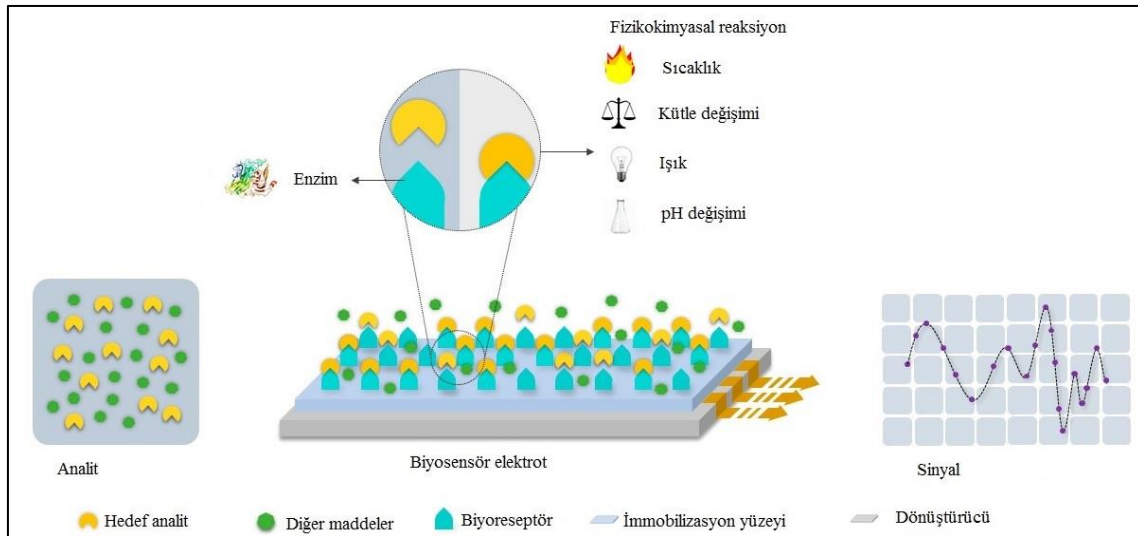
Biyosensörler biyobileşene göre ve dönüştürücüye göre sınıflandırılabilir (Çizelge 2.1). Biyobileşen esaslı biyosensörler enzim, mikrobiyal, immün, nükleik asit biyosensörleri şeklinde sıralanabilir. Elektrokimyasal, termal, optik, piezoelektrik biyosensörlerde dönüştürücüye göre sınıflandırılmış biyosensörlerdir (Bodur, 2019).

Çizelge 2.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması (Bodur, 2019)

Biyobileşene göre	Dönüştürücüye göre	
Enzim	<u>Optik</u>	• Spektroskopik • İnternal reflektans • Elipsometrik • SPR (Yüzey Plazmon Rezonans)
Hücre		
Mikroorganizma		
Doku		
Organel	<u>Elektrokimyasal</u>	• Potansiyometrik • Amperometrik • Voltametrik • İmpedimetrik • Konduktometrik
Virüs		
Nükleik asit		
İmmüno ajanlar		
Reseptörler	<u>Akustik</u>	• Piezoelektrik • Yüzey dalga sensörleri • Manyetik akustik rezonatör v.b.
	<u>Termal</u>	
	<u>Micro-cantilever temelli</u>	

2.5. Enzim Esaslı Biyosensörler

Enzimler, belirli tepkimeler için biyolojik katalizörlerdir ve kendilerini spesifik substrata bağlayabilirler. Bu katalitik eylem enzim esaslı biyosensörlerde kullanılır. Enzim esaslı biyosensörler analitik yaklaşımlarla karşılaştırıldığında, yüksek hassasiyet, seçicilik, taşınabilirlik, düşük maliyet, minyatürleştirme ve seri üretim olanakları gibi dikkate değer avantajlara sahiptir. Ayrıca, enzim esaslı biyosensörler, hızlı, spesifik, hassas, ucuz, çevrimiçi ve/veya gerçek zamanlı algılama için uygulamalara sahiptir. Enzim esaslı biyosensörleri tasarlamak için kullanılan en yaygın enzim türü peroksidazlar, oksidoredüktazlar, amino oksidazlar ve polifenol oksidazlardır (Pérez ve diğerleri, 2019). Şekil 2.15'te enzim esaslı biyosensörlerin çalışma şeması verilmiştir.



Şekil 2.15. Enzim esaslı biyosensörlerin çalışma şeması (Campaña, 2019)

Enzim biyosensörleri enzimatik tepkime sonucu oluşan sinyalin ölçülmesine dayalı olarak elektrokimyasal, optik, kalorimetrik ve piezoelektrik enzim biyosensörleri olarak sınıflandırılır. Elektrokimyasal enzim biyosensörler amperometrik (birincil nesil, ikincil nesil, üçüncül nesil), potansiyometrik (proton duyar, amonyak duyar, karbondioksit duyar, diğer iyon duyar) ve yarı iletken temelli olarak sınıflandırılır. Optik enzim biyosensörleri ise absorpsiyon, flouresans ve biyoluminesans temelli olarak sınıflandırılır (Akın, 2017).

2.5.1. Amperometrik enzim biyosensörleri

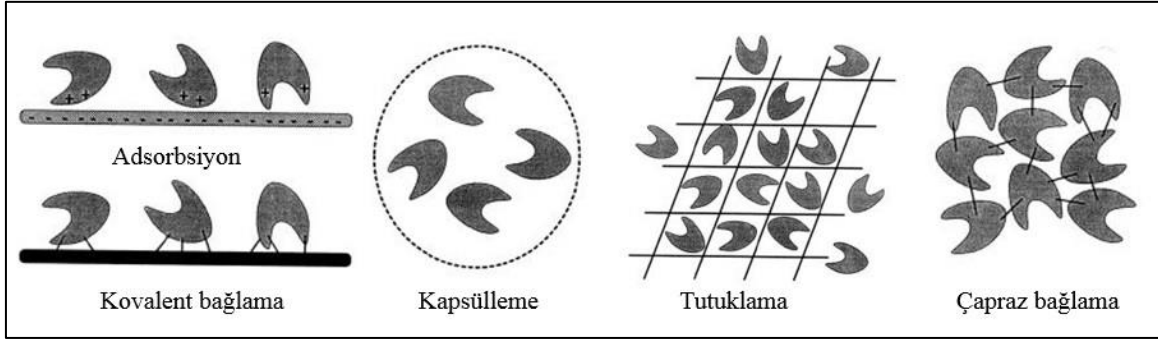
Elektrokimyasal biyosensörler içinde en fazla kullanılan biyosensör çeşidi amperometrik temelli biyosensörlerdir. Amperometrik biyosensörler çoğunlukla enzim esaslı olarak kullanılmaktadır. Çalışma prensibi, çalışma ve referans elektrot arasına sabit bir potansiyel uygulanmasına dayanır. Uygulanan potansiyel, redoks tepkimelerinin gerçekleşmesini sağlayan akımı oluşturur. Bu akımın büyüklüğü, çözeltide bulunan enzim substratının yani hedef analitin derişimi ile doğru orantılıdır. Hem katodik hem de anodik tepkimeler amperometrik olarak izlenebilir. Oksidaz enzimleri, bu biyosensörlerde en sık kullanılan enzimlerdir (Terry ve diğerleri, 2005).

2.6. Biyosensörlerde İmmobilizasyon

Enzim immobilizasyonu, bir enzimin hareket özgürlüğünü büyük ölçüde kısıtlamak için özel olarak tasarlanmış bir tekniktir. Çoğu hücre doğal olarak bir şekilde immobilize hale getirilir, bu hücreler için fiziksel bir destek sağlar. Biyosensörler tasarlanırken ilk adım, amaçlanan kullanım ve uygulama dikkate alınarak, destek malzemesine, ardından ana immobilizasyon yöntemine karar vermektir. İmmobilizasyon yöntemine karar verirken; kullanılabilir yüzey alanı, geçirgenlik, yoğunluk, depolama kararlılığı, enzim aktivitesi, pH ve sıcaklığa karşı direnç vb. gibi noktaların göz önünde bulundurulması gerekir (Bickerstaff, 2003).

Enzimin immobilizasyonu, enzim temelli biyosensörlerin yapımında önemli bir adımdır, çünkü genellikle enzim stabilitesini artırır ve enzim ile alttaki dönüştürücü arasında yakın bir temas sağlar (D'Souza, 2001).

Kararlı bir biyosensör için ön koşul, biyoreseptörün dönüştürücünün (elektrot) yüzeyinde tersinir veya tersinmez bir yöntem kullanılarak immobilize edilmesidir. Bunu başarmak için, numune türü, istenen seçicilik gibi kriterlere dayalı olarak adsorpsiyon, kovalent bağlama, kapsülleme, çapraz bağlama, tutuklama gibi farklı stratejiler kullanılabilir (Şekil 2.16) (Ensafi, 2019: 2).



Şekil 2.16. İmmobilizasyon yöntemleri (Bickerstaff, 2003: 4)

Adsorpsiyon yöntemi

Adsorpsiyon nispeten basit ve ucuz bir immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntemde enzimin kimyasal yapısı değiştirilmez, fiziksel olarak immobilize edilir. Ancak enzim, özellikle sulu çözücülerde dışarı sızma eğiliminde olduğu için sınırlamaları vardır. Bu yöntem, organik çözeltilerde kullanım için ve lipazların immobilizasyonu için uygundur. Adsorpsiyon, özellikle enzimin ucuz olduğu büyük ölçekli işlemlerde düzenli olarak kullanılır (Brady ve Jordaen, 2009).

Kovalent bağlama yöntemi

Bu yöntemde enzim algılayıcı üzerine fonksiyonel gruplar yardımıyla kovalent bağlanır. Kovalent immobilizasyon yöntemleri, diğer immobilizasyon teknikleri ile karşılaştırıldığında genellikle daha karmaşık ve zaman alıcıdır, ancak biyomoleküller ve boyaların sızması muhtemel olmadığından çok güvenilirdir. Kovalent immobilizasyonun biyomolekül aktivitesini değiştirebileceği unutulmamalıdır. Bağlanma kritik bölgelerde (örneğin, bir enzim-aktif bölgesi veya bir antikör-bağlanma bölgesi) meydana gelirse, aktivite tamamen kaybedilebilir. Bu tür inaktivasyonu önlemek için, substrat, inhibitörler ve diğer efektörler, biyomoleküllerin aktif veya bağlanma bölgesini korumak için genellikle immobilizasyon ortamına dahil edilir (Biran ve diğerleri, 2008: 33).

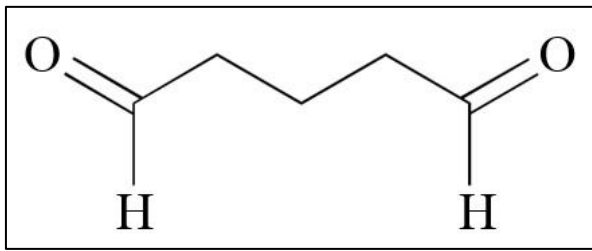
Tutuklama yöntemi

Tutuklama immobilizasyonunda, enzim doğrudan destek yüzeyine bağlanmaz, ancak yalnızca substrat ve ürünlerin geçişine izin veren, enzimi tutan bir polimerik ağ içinde

tutulur. Bu işlem iki aşamada gerçekleştirilir: enzim bir monomer çözeltisine karıştırılır, daha sonra bu çözeltinin kimyasal bir tepkime ile polimerizasyonu gerçekleştirilir. Enzim, bir polimer kafes ağı içinde fiziksel olarak immobilize edildiğinden, polimer ile kimyasal olarak etkileşime girmez. Böylece yöntem, enzim stabilitesini iyileştirebilir, enzim sızıntısını ve denatürasyonunu en aza indirebilir. Bununla birlikte, yöntemin bir sınırlaması, polimerizasyon süresinin uzaması jel matrisi kalınlığını artırır, bu nedenle substrat, enzim aktif bölgesine ulaşmak için jel matrisinin derinliklerine yayılamaz. Yöntem ayrıca düşük enzim yükleme kapasitesine sahiptir ve destek materyali, polimerizasyonun etkileri olarak bozulabilir (Hiep ve Kim, 2017).

Çapraz bağlama yöntemi

Çapraz bağlama yönteminde, bir malzeme enzimleri birbirleriyle veya başka bir proteinle ya da bir destek malzemesiyle çapraz bağlar. Çapraz bağlama materyali, spesifik aminoasitleri hedefleyebilir. Glutaraldehit (Şekil 2.17), benzokinon ve dekstran-polialdehit çapraz bağlama için kullanılan yaygın maddelerdir (Imam ve diğerleri, 2021). Çapraz bağlama yöntemi, immobilize enzimin bağlanmasını ve stabilitesini artırır, ancak immobilizasyon prosedürü kolay olmasına rağmen zaman alıcıdır ve pahalı kimyasal reaktifler kullanır. Ayrıca enzimin katalitik aktivitesini de değiştirebilir (A. Sharma ve diğerleri, 2021). Çizelge 2.2’de immobilizasyon yöntemleri karşılaştırılmıştır.

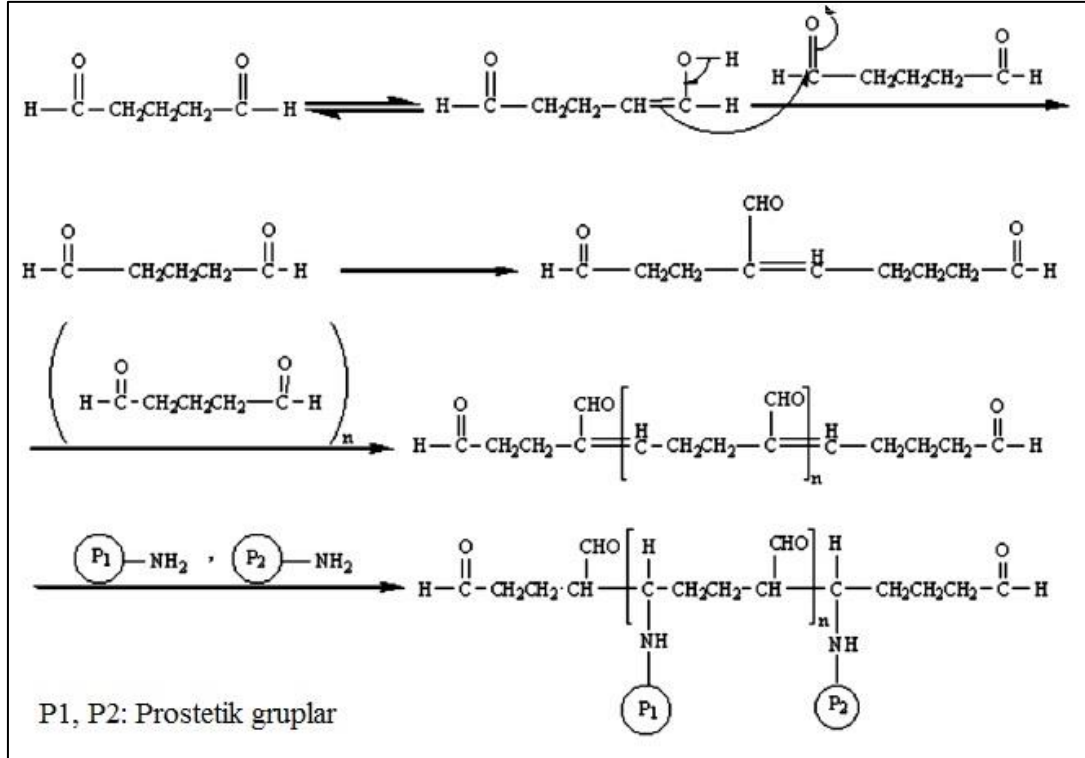


Şekil 2.17. Glutaraldehit molekülü

Çizelge 2.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması (Sassolas ve diğerleri, 2012)

Yöntem	Bağlayıcı yapı	Avantajları	Dezavantajları
Adsorpsiyon	Zayıf bağlar	• Basit ve kolay • Enzimin aktivite kaybı düşük	• Desorpsiyon • Spesifik olmayan adsorpsiyon
Kovalent bağlama	Enzimin fonksiyonel grupları ile destek üzerindeki kimyasal bağlanma	• Difüzyon bariyeri yok • Kararlı • Kısa tepki süresi	• Matris yenilenebilir değil • Polimer taşıyıcı sterik engelleme neden olur
Tutuklama	Enzimin bir jel veya polimer içine dahil edilmesi	• Enzim aktivitesini etkileyecek kimyasal tepkime yok • Polimerleşme hızlı • Polimer içinde birkaç enzim immobilize edilebilir	• Difüzyon bariyeri • Enzim sızıntısı • Polimerleşme için yüksek derişimlerde monomer ve enzim gereklidir
Çapraz bağlama	Enzim/çapraz bağlayıcı (örn. glutaraldehit) ile inert molekül (örn. BSA) arasındaki bağ	• Basit • Enzim stabilitesini artırır	• Enzim aktivite kaybı • Pahalı reaktif

Enzim veya protein yapısındaki maddelerin elektrot yüzeyine kovalent bağlama ile immobilizasyonda kullanılan glutaraldehitin çapraz bağlama tepkimesi Şekil 2.18’de verilmiştir;



Şekli 2.18. Glutaraldehit ile gerçekleştirilen çapraz bağlama tepkimesi (Koçak, 2020)

2.6.1. İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri

Enzimler suda çözünmeyen bir maddeye kimyasal veya fiziksel olarak bağlanarak immobilize edilir. İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri;

- Süzme, santrifüj gibi yöntemlerle kimyasal tepkime sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir.
- pH, sıcaklık gibi koşullara karşı daha dayanıklıdır.
- Tekrar tekrar kullanılabilir.
- Uzun süre kullanılabilir.
- Serbest enzime göre daha kararlıdır.
- Kontrollü ürün oluşumu gerçekleştirilebilir.
- Birden fazla adımda gerçekleşen tepkimeler için uygundur.
- Enzimin kendini parçalaması ihtimali azalır.
- Serbest enzime göre daha yüksek aktivite gösterebilir.
- Karıştırma, çalkalama gibi çalışmalar için uygundur (Çınar ve diğerleri, 2017).

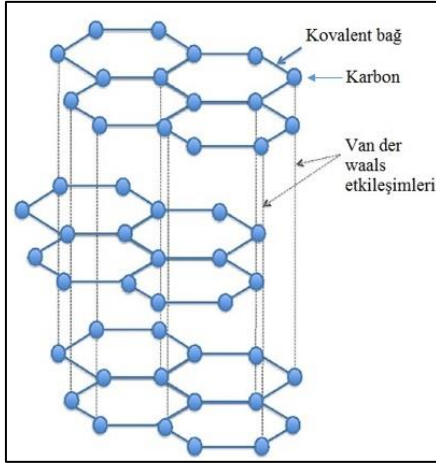
2.7. Karbon Pasta Elektrotlar

Kendine özgü özellikleri nedeniyle çok dikkat çeken karbon, biyosensör çalışmalarında sıkça karşılaşılan karbon pasta elektrotta (CPE) kullanılır (Tembe ve diğerleri, 2005). Karbon pasta dışında ekran baskılı karbon elektrot, camsı karbon, karbon fiber, altın, platin gibi farklı elektrotlar kullanılarak da biyosensör çalışmaları yapılmaktadır (Hočevan ve diğerleri, 2005).

Karbon pasta elektrot organik, inorganik ve biyolojik bileşiklerin biyokimyasal analizi için yaygın olarak kullanılan elektrotlardan biridir. Karbon pasta elektrotlar, düşük artık akım, geniş potansiyel aralığı, düşük maliyet, kolay hazırlama ve toksik olmama gibi avantajlar sunar. Ayrıca, yüzeyin tekrarlanabilirliği, kararlılığı ve yenilenebilirliği özelliklerinden dolayı en çok tercih edilen elektrotlardır (Piovesan ve diğerleri, 2020).

Karbon pasta elektrot, karbonun (grafit tozu) bağlayıcı bileşen (organik sıvı, parafin, nujol veya benzeri gibi iletken olmayan bir mineral yağ) ile karıştırılmasıyla elde edilir. Kararlı kimyasal eylemsizliği ve iyi yapışma kabiliyeti sayesinde, nujol gibi iletken olmayan bu sıvılar, karbon pasta elektrodun üretimde her zaman tercih edilmektedir. Buna rağmen, mineral yağ bağlayıcı kullanmanın iki belirgin dezavantajı vardır. Birincisi, madeni yağın, petrolün rafine edilmesinde ve ham petrolün işlenmesinde yer aldığından ve bazı açıklanmayan bileşenler, tespit ve analiz üzerinde öngörülemeyen etkilere yol açabilir. İkincisi, bu bağlayıcının iletken olmaması, bu da karbon pasta elektrodun elektrokimyasal tepkisini bir dereceye kadar zayıflatabilir. (H. Liu ve diğerleri, 2005). Grafit tozu dışında karbon siyahı, lif karbon, seramik ya da camsı karbon, tek kristalli grafit ve pirolitik grafit karbon pasta elektrot hazırlanırken kullanılır (Bodur, 2019).

Grafit altıgen şeklinde istiflenmiş karbon katmanlarından oluşur (Şekil 2.19). Bu katmanlar birbirlerine Van der Waals etkileşimleri ile bağlantılıdır. Bu özellik katmanlar arasına modifiye edici maddenin yerleşmesini sağlar. Grafit anizotropiktir ve molekül yapısı sebebiyle iyi bir elektriksel ve termal iletkenidir. Bu elektriksel iletkenlik, grafitin elektrokimyasal elektrotlar olarak kullanılmasını sağlar (Chung, 2002).



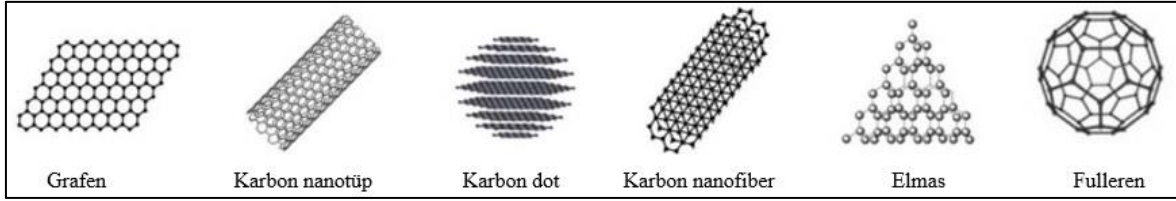
Şekil 2.19. Grafit molekülü (Tanzi ve diğerleri, 2019: 55)

Karbon pasta elektrotlar modifiye edilerek hedef analite karşı elektrokimyasal tepkisi ve seçiciliği geliştirilebilir. Karbon pasta elektrotların modifiye edilmesi için birçok yöntem kullanılabilir. Kimyasal ve biyolojik yöntem başlıca iki tanesidir ve üç prosedürden herhangi biri ile modifiye işlemi yapılabilir;

- Modifiye edicinin elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu
- Modifiye edicinin elektrot yüzeyine kovalent bağlanması
- Modifiye edicinin karbon pasta ile doğrudan karıştırılması (Zaib ve diğerleri, 2015)

2.8. Karbon Dotlar

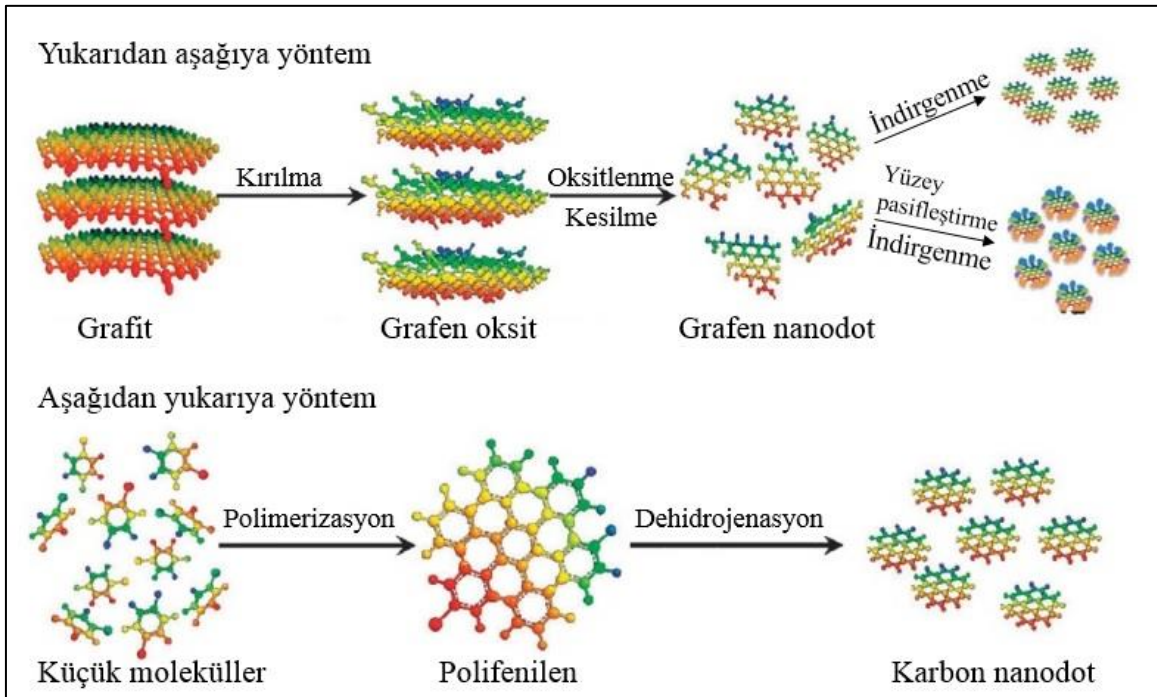
Yapısında karbon bulunan birçok nanomalzeme bulunur karbon dotlar da bu nanomalzemelerden biridir (Şekil 2.20). Karbon dotlar (noktalar) ilk olarak 2004 yılında SWCNT (tek duvarlı karbon nanotüp) saflaştırılması sırasında keşfedildi. Karbon dotlar, partikül boyutları 10 nm'den küçük olan yeni bir karbon nano malzeme sınıfıdır. Bu nanomalzemeler, düşük toksisite, düşük üretim maliyeti, suda iyi çözünme, ayarlanabilir floresans emisyonu, elektrik iletimi ve yüksek biyoyumluluk gibi özelliklere sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle karbon dotların üretimi, büyük ilgi görmektedir (Nasrollahzadeh ve diğerleri, 2019: 180).



Şekil 2.20. Karbon nanomalzemeler (Wang ve Dai, 2015)

Karbon dotlar çekirdek yapısı ve yüzey gruplarına bağlı olarak, karbon kuantum noktaları (CQD), grafen (GQD) veya grafen oksit (GOQD) kuantum noktaları ve karbonize polimer noktaları (CPD) olarak sınıflandırılabilir (Feng ve diğerleri, 2021).

Karbon dotlar, hücre görüntüleme, kanser tedavisi, ilaç/gen taşıyıcı araçlar, hastalıkların teşhisi, kataliz, enerji, sensör ve biyosensörler gibi çok çeşitli uygulama alanlarında kullanılırlar (Sagbas ve Sahiner, 2018: 652). Karbon dotlar genellikle iki şekilde sentezlenebilir: grafit malzemelerin karbon kaynağı olduğu “yukarıdan aşağıya” yöntemler ve karbon kaynağı olarak organik moleküllerin kullanıldığı “aşağıdan yukarıya” yöntemlerdir. Bu nedenle, karbon dotlar sırasıyla grafen nanodotları ve karbon nanodotları olarak da ifade edilebilir (Şekil 2.21) (Tuerhong ve diğerleri, 2017).



Şekil 2.21. Karbon dotların sentezi (Shen ve diğerleri, 2012)

2.9. Kaynak Araştırması

Bezerra ve diğerleri, akış enjeksiyon analizi (FIA) ile ilaç örneklerinde DA'nın tayini için amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu amaçla 7,7,8,8-tetrasiyanoquinodimetan (TCNQ) ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrodun yüzeyine polifenol oksidaz enzimini immobilize etmişlerdir. Hazırlanan elektrodu akış detektörü olarak kullanmışlardır. Amperometrik tayini, +0.10 V'lık bir potansiyelde (Ag/AgCl'ye karşı) gerçekleştirmişlerdir. Geliştirilen biyosensörün, önemli bir enzimatik aktivite kaybı olmadan 60 günde 500 kadar ölçüme olanak tanıyan iyi bir stabilite ve tekrarlanabilirlik gösterdiğini bulmuşlardır. Biyosensörün, doğrusal çalışma aralığının 2×10^{-2} - 2×10^{-4} M ve bağlı standart sapmasının %1,5'ten düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Serbest ve immobilize enzim için Km değerlerini, sırasıyla $1,45 \times 10^{-2}$ ve $1,91 \times 10^{-2}$ M bulmuşlardır. İlaç örneklerinin analizlerinde, yaklaşık %3,4'ten daha düşük bir sapma ile tayin yapmışlardır (Bezerra ve diğerleri, 2003).

Lupetti ve diğerleri, ham kabak özünden elde edilen peroksidaz ile modifiye edilmiş bir biyosensör geliştirerek, ilaç numunelerinde dopamin tayin etmişlerdir. DA tayinini hidrojen peroksit varlığında ve -0,02 V'lık potansiyelde dopaminokininonun indirgenme akımına dayanarak gerçekleştirmişlerdir. Biyosensörün, doğrusal çalışma aralığını $5,0 \times 10^{-4}$ - $3,0 \times 10^{-3}$ M ($R^2=0,9982$), tayin sınırını $2,6 \times 10^{-5}$ M olarak hesaplamışlardır. pH 6,0 ve 0,1 M fosfat tampon çözeltisinde $7,9 \times 10^{-4}$ M dopamin varlığındaki 10 ölçüm için bağlı standart sapma değerini %1,2'den az olduğunu bulmuşlardır. Biyosensörü gerçek örneklerle uyguladıklarında dopamin geri kazanımının %94,8 - %106 aralığında olduğunu gözlemlemişlerdir (Lupetti ve diğerleri, 2005).

Njagi ve diğerleri, DA'nın in vivo izlenmesi için yeni bir implante edilebilir enzim esaslı karbon fiber mikro biyosensör geliştirmişlerdir. Bu çalışmada biyosensör, bir biyopolimer kitosan ve seryum bazlı metal oksitlerden oluşan biyoyumlu bir matris içinde tirozinaz enzimi immobilize edilerek üretilmiş ve ~100 µm çapında bir karbon fiber mikro elektrodun yüzeyine yerleştirilmiştir. DA tayinini dopaminokininonun elektrokimyasal olarak indirgenme akımına dayanarak gerçekleştirmişlerdir. Optimum koşullarda mikro biyosensör, $1,0 \times 10^{-9}$ M DA algılama limitine, 2×10^{-7} - $2,2 \times 10^{-4}$ M doğrusal aralığa ve 14.2 nA/µM hassasiyete sahiptir. Biyosensör askorbik asit, ürik asit, serotonin, norepinefrin, epinefrin ve L-DOPA'ya karşı iyi bir seçicilik göstermiştir. Mikro biyosensör anestezi uygulanmış bir sıçanın beyinde elektrikle uyarılan dopamin salınımını sürekli, gerçek zamanlı izleyebilmiş

ve $1,69 \times 10^{-6}$ M'ye kadar dopamin seviyelerini tayin etmeye olanak sağlamıştır (Njagi ve diğerleri, 2010).

Bujduveanu ve diğerleri, CaCO_3 nanoparçacıkları ile modifiye edilmiş çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) elektroduna tirozinaz enzimi immobilize edilmiş oldukça hassas bir dopamin biyosensörü üretmişlerdir. DA tayinini -0,2 V potansiyelde optimum pH değerinde (6,0) kronoamperometrik yöntemle gerçekleştirmişlerdir. Biyosensörün dopaminin tayini sınırını $1,5 \times 10^{-8}$ M olarak hesaplamışlardır. Ürik asit ve askorbik asidin girişim etkisi yapmadığını belirlemişlerdir (Bujduveanu ve diğerleri, 2013).

Huang ve diğerleri, Altın-karbon dotlar (Au-CDs) ve kitosan (CS) modifiye camsı karbon elektrot (GCE) ile yeni bir kompozit filmi (Au-CDs-CS/GCE) basit bir şekilde hazırlayarak hassas ve güvenilir bir DA biyosensörü geliştirmişlerdir. Biyosensör, fazla miktarda askorbik asit (AA) ve ürik asitten (UA) gelen girişim etkisini bastırma konusunda iyi bir yetenek sergilemiştir. Optimum koşullar altında, doğrusal çalışma aralığını 1×10^{-8} - $1,0 \times 10^{-4}$ M ve tayin sınırını 1×10^{-9} M tespit etmişlerdir. Ayrıca biyosensörün aktivitesini en az 2 hafta koruyabildiği sonucuna varmışlardır (Huang ve diğerleri, 2014).

Raghu ve diğerleri, DA tayini için yeni bir biyosensör tasarlamışlardır. Yaptıkları çalışmada dönüşümlü voltametri (CV) tekniği kullanılarak karbon pasta elektrot, yüzeyinde polimerize bir glisin (Gly) filmi hazırlanıp, çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ile modifiye edilmiştir. Daha sonra yaban turpundan elde edilen peroksidaz enzimi, silika sol-jel tutuklama yoluyla elektroda immobilize edilmiştir. İmmobilize peroksidaz ile CPE yüzeyi arasında bir elektron taşıyıcısı olan poli(Gly)'nin uygulanabilirliğini anlamak için CV tekniği kullanılmıştır. Diferansiyel puls voltametrisi (DPV) kullanılarak DA'nın kalibrasyon eğrisini $1,5 \times 10^{-5}$ - $8,65 \times 10^{-4}$ M aralığında elde edilmiştir. DA'nın tayin sınırı (LOD) ve miktar tayin sınırını (LOQ) sırasıyla 6×10^{-7} ve 2×10^{-6} M olarak bulunmuştur. Gözlenen Michaelis-Menten sabiti (K_m) 0,5 mM bulunarak enzimin iyi bir biyolojik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Biyosensörün yüksek hassasiyet, seçicilik ve tekrarlanabilirlik gösterdiği de kanıtlanmıştır. Ayrıca biyosensörü, çeşitli maddelerin varlığında klinik örneklerde DA'yı tayin etmek için kullanmışlardır (Raghu ve diğerleri, 2014).

Canbay ve Akyılmaz, DA tayinine yönelik çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT)-nafyon-sisteamin (CA) modifiye tirozinaz biyosensörü geliştirmeyi amaçlamışlardır. Geliştirilen

biyosensör ile amperometrik yöntemle 0,2 V’de dopamin ölçümleri yapılmış ayrıca +0,4 ile -0,15 V potansiyel arasında diferansiyel puls voltametri yöntemi kullanılarak dopamin tayini yapılmıştır. Biyosensörün optimum pH değerini 7,5 ve optimum sıcaklığını 35 °C bulmuşlardır. Biyosensörün doğrusal çalışma aralığını $5,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ μM olarak belirlemişlerdir. Ayrıca geliştirilen biyosensör ile ilaç ve muz örneklerinde dopamin tayini de yapmışlardır (Canbay ve Akyilmaz, 2014).

Roychoudhury ve diğerleri tarafından, nikel oksit (NiO) nanoparçacıklar, indiyum kalay oksit (ITO) ve tirozinaz enzim konjugatı kullanılarak bir dopamin biyosensörü geliştirilmiştir. DA tayinini dönüşümlü voltametri tekniği ile -0,1 V ile +1,5 V potansiyel aralığında 100 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Üretilen biyosensör, $2,0 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ M doğrusal çalışma aralığında olup $1,038 \times 10^{-6}$ M’lik bir tespit sınırı ile 60,2 nA/ μM ’lik yüksek hassasiyet göstermiştir. Biyosensörün 45 saniyelik bir tepki süresine, girişim yapan maddelerin varlığında iyi tekrarlanabilirlik ve seçiciliğe, uzun raf ömrüne (45 gün) sahip olduğunu doğrulamışlardır (Roychoudhury ve diğerleri, 2016).

Florescu ve David, DA tespiti için tirozinaz temelli bir biyosensör geliştirmişlerdir. Seçiciliğin artırılması için, altın elektrotlar kobalt (II)-porfirin (CoP) filmi ile modifiye edilmiş, elektrot yüzeyine tirozinaz enzimi çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edilmiştir. DA’nın elektrokimyasal tayini için diferansiyel puls voltametrisini kullanılıp ve dopaminokinonun indirgeme akımından faydalanmışlardır. Deneyler, $2,0 \times 10^{-6}$ - $3,0 \times 10^{-5}$ M doğrusal bir derişim aralığında gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün tayin sınırını $4,3 \times 10^{-7}$ M bulmuşlardır. Biyosensör performansını dopamin ilacı varlığında test ederek, %96 geri kazanım ve %5 bağıl standart sapma (BSS) değerlerini elde etmişlerdir. Biyosensörün insan idrarı ve kan serumu gibi gerçek örneklerde uygulamışlardır (Florescu ve David, 2017).

Ramu ve diğerleri, DA tayini için gözenekli grafen-polipirol-polifenol oksidaz ile modifiye edilmiş camısı karbon elektrot (GCE-PG-PPy-PPO) kullanarak bir biyosensör geliştirmişlerdir. Amperometrik yöntemle optimum pH’ı, dopamin derişimi ve tayin sınırını belirlemişlerdir. DA’nın doğrusal çalışma aralığını 2×10^{-8} - $4,6 \times 10^{-5}$ M arasında ve en düşük tayin sınırını 4×10^{-9} M olarak bulup, Michaelis-Menten sabiti (Km) ve aktivasyon enerjisini sırasıyla 31,32 μM ve 37,4 kJ/mol olarak hesaplamışlardır. Ayrıca geliştirdikleri biyosensörü, insan idrar örneğindeki dopamin miktarını belirlemek için kullanmışlardır (Ramu ve diğerleri, 2021).

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri üreticiler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Temin Edildiği Üretici Firma
Grafit tozu	Merck
Mineral yağ (nujol)	Sigma
Dopamin ($C_8H_{11}NO_2$)	Trc-canada
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Merck
Monosodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)	Merck
Glisin ($C_2H_5NO_2$)	Sigma
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Asetik asit (CH_3COOH)	Merck
Glutaraldehit ($C_5H_8O_2$)	Aldrich
Sığır serum albümin (BSA)	Sigma
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich
Tirozinaz enzimi (Mantardan saflaştırılmıştır)	Fluka
Ürik Asit ($C_5H_4N_4O_3$)	Sigma
Askorbik Asit ($C_6H_8O_6$)	Sigma
L-Tirozin	Wisent Inc.
Epinefrin	Sigma-Aldrich
Norepinefrin	Sigma-Aldrich
L-Dopa	Merck
Glukoz ($C_6H_{12}O_6$)	Sigma-Aldrich
Katekol	BDH Chemicals

3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler

Tirozinaz enzimi çözeltisi: Aktivitesi 5000 ünite/mg olan tirozinaz enziminden (mantardan saflaştırılmış) 3,0 mg alınıp toplam hacmi 2,0 mL olacak şekilde pH 7,0 fosfat tamponu ile seyreltildi ve her biri 0,5'er mL'lik çözeltiler halinde deney tüplerine alındı. Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltileri +4 °C'de buzdolabında, uzun süre kullanılmadığında ise derin dondurucuda saklandı.

Dopamin çözeltisi: Katı dopaminden gerekli miktarda tartılarak fosfat tamponu ile çözülerek 10 ml $1,0 \times 10^{-3}$ M stok çözelti hazırlandı. Stok çözeltiden uygun miktarda seyreltilerek gereken derişimlerde dopamin çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler deney öncesinde taze olarak hazırlandı. Çözeltiler kullanılmadıkları zaman $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklandı.

Fosfat tamponu: pH değeri 6,0; 7,0; 8,0 olan 0,1 M fosfat tamponu çözeltileri hazırlamak için disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) ve monosodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) gereken miktarda tartılarak saf suda çözüldü. 0,1 M NaOH yardımı ile hazırlanan tampon çözeltilerin pH'ı ile ayarlandı. Tampon çözelti kullanılmadığı zaman $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklandı.

Glisin tamponu: pH değeri 9,0 olan tampon çözelti hazırlamak için glisin gereken miktarda tartılarak saf suda çözüldü, 0,1 M NaOH yardımı ile hazırlanan tampon çözeltinin pH'ı ayarlandı. Tampon çözelti kullanılmadığı zaman $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklandı.

Asetik asit - asetat tamponu: pH değeri 5,0 olan tampon çözelti hazırlamak için sodyum asetat gereken miktarda tartılarak saf suda çözüldü, 0,1 M CH_3COOH yardımı ile hazırlanan tampon çözeltinin pH'ı ayarlandı. Tampon çözelti kullanılmadığı zaman $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklandı.

Sodyum hidroksit çözeltisi: 0,1 M derişimde sodyum hidroksit çözeltisi hazırlamak için katı sodyum hidroksitten gereken miktarda tartılıp saf suda çözüldü.

Glutaraldehit çözeltisi: %25'lik glutaraldehit çözeltisi önce %5,0'lik glutaraldehit çözeltisine seyreltildi. Daha sonra %5,0'lik glutaraldehit çözeltisinden %2,5'luk glutaraldehit çözeltisi yine aynı şekilde seyreltilip hazırlandı, çözelti $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklandı.

Askorbik asit çözeltisi: Katı askorbik asitten gereken miktarda tartılıp tampon çözeltide çözülerek askorbik asit çözeltisi hazırlandı, çözelti $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklandı.

Ürik asit çözeltisi: Katı Ürik asitten gereken miktarda tartılıp tampon çözeltide çözülerek askorbik asit çözeltisi hazırlandı, çözelti $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklandı.

L-Tirozin çözeltisi: Katı L-Tirozinden gereken miktarda tartılıp tampon çözeltide çözülerek tirozin çözeltisi hazırlandı, çözelti +4 °C’de buzdolabında saklandı.

Epinefrin çözeltisi: Katı epinefrinden gereken miktarda tartılıp tampon çözeltide çözülerek epinefrin çözeltisi hazırlandı, çözelti +4 °C’de buzdolabında saklandı.

Norepinefrin çözeltisi: Katı norepinefrinden gereken miktarda tartılıp tampon çözeltide çözülerek norepinefrin çözeltisi hazırlandı, +4 °C’de çözelti buzdolabında saklandı.

L-Dopa çözeltisi: Katı L-Dopadan gereken miktarda tartılıp tampon çözeltide çözülerek L-Dopa çözeltisi hazırlandı, çözelti +4 °C’de buzdolabında saklandı.

Glukoz çözeltisi: Katı glukozdan gereken miktarda tartılıp tampon çözeltide çözülerek glukoz çözeltisi hazırlandı, çözelti +4 °C’de buzdolabında saklandı.

Katekol çözeltisi: Katı katekolden gereken miktarda tartılıp tampon çözeltide çözülerek katekol çözeltisi hazırlandı, çözelti +4 °C’de buzdolabında saklandı.

3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

3.3.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

Tüm elektrokimyasal deneyler bilgisayar bağlantılı çalışan CHI firmasının 1230-A modeli elektrokimyasal analiz cihazı kullanılarak yapıldı.

3.3.2. Hücre ve elektrotlar

Amperometrik ölçümler, içerisinde üç elektrot bulunan elektrokimyasal hücrede gerçekleştirildi. Çalışma elektrodu olarak 0,3 cm çapındaki (teflondan özel olarak yapılmış) karbon pasta elektrot (Şekil 3.1), referans elektrot olarak BAS RE-5B Ag/AgCl ve karşıt elektrot olarak da MW-1032 platin tel kullanıldı. Çalışma elektrodu kullanılmadığı zaman çalışmanın ilerleme basamaklarına bağlı olarak saf suda ya da tampon çözelti içerisinde +4 °C’de buzdolabında saklandı.



Şekil 3.1. Teflondan yapılan karbon pasta elektrot

3.3.3. Su banyosu

Isıtma, soğutma ve su döngüsü bulunan termostatlı Grant GD120 su banyosu kullanıldı.

3.3.4. pH metre

Hazırlanan tampon çözeltiler HANNA HI-8424 pH metre ile ölçüldü.

3.3.5. Mikro pipet

10 μ L - 1000 μ L çözeltilerin hücre içerisine ilavesinde ve çözeltiler hazırlamada Brand marka $\pm 0,05$ μ L hassasiyeti olan mikro pipetler kullanıldı.

3.3.6. Saf su cihazı

Tüm deneylerde kullanılan çözeltiler, GFL marka saf su cihazından elde edilen saf su ile hazırlanıp kullanılmıştır.

3.4. Dopamin Biyosensörünün Hazırlanması ve En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

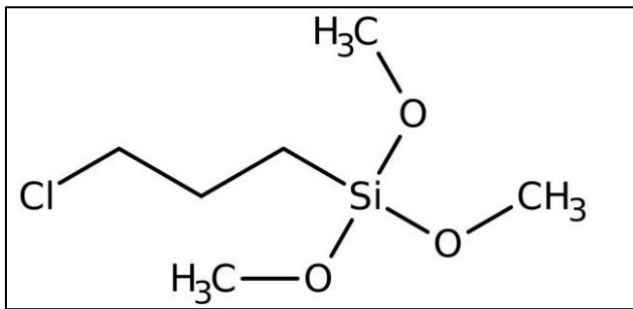
Hazırlanan biyosensörün; DA'ya duyarlılığı, çalışma potansiyeli, pH etkisi, kullanılan CDs-CPTMS miktarı, sıcaklık etkisi, girişim etkisi, glutaraldehit miktarı, DA derişiminin etkisi, tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü parametreleri incelenerek en iyi çalışma koşulları belirlendi.

3.4.1. Çalışma elektrodunun hazırlanması: Karbon pasta elektrot (CPE) ve modifiye karbon pasta elektrot (MCPE) hazırlanması

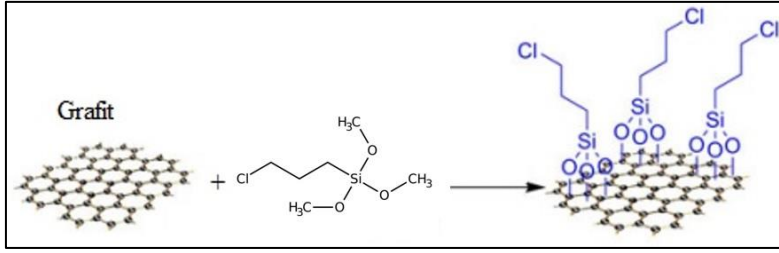
Karbon pasta elektrodu hazırlamak amacıyla uygun miktarda grafit tozu, hassas terazi ile tartılıp saat camı üzerine alındı. Grafit tozu üzerine bir arada tutma özelliği olan mineral yağ (nujol) uygun miktarda mikro pipet ile damlatılarak eklendi. Grafit tozu ve nujol uygun bir kıvam alana kadar karıştırıldı. Hazırlanan karışım saf su ile temizlenen karbon pasta elektrot içerisindeki boşluğa madde kaybı olmayacak şekilde dolduruldu (Şekil 3.4). Doldurma işleminden sonra karbon pasta elektrot yüzeyi özel bir ped yardımı ile düz ve pürüzsüz hale getirildi. Ardından CPE tekrar saf su ile yıkandı ve kullanıma hazır hale getirildi. Yapılan bütün çalışmalarda CPE'ler, grafit tozu miktarı (0,065 g) sabit ve nujol miktarı 40 µL olacak şekilde hazırlandı.

Modifiye karbon pasta elektrot ise; CPE'nin hazırlama şeklinden farklı olarak, hazırlanan karbon pastaya (grafit tozu + nujol) uygun miktar CDs-CPTMS ilave edilip karıştırılması ve elektroda doldurulması ile gerçekleştirildi. MCPE tüm deneyler için bu şekilde hazırlandı.

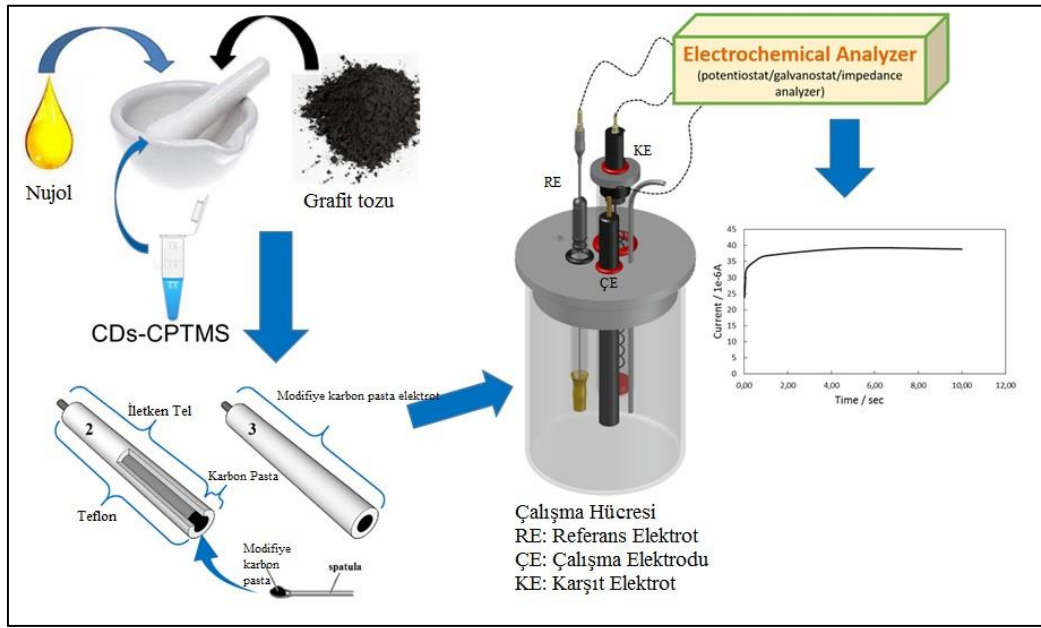
Bu çalışmada modifiye işlemi için kullanılan madde (karbon nano Dot-CPTMS) CDs-CPTMS'dir (Şekil 3.2). CPTMS (3-Kloropropil-trimetoksisilan) olarak adlandırılır. Bu madde karbon pastanın yüzey alanının genişletilmesini sağladı (Şekil 3.3). CDs-CPTMS bu çalışma için ilk defa Selçuk Üniversitesi öğretim üyeleri Doç. Dr. Meryem Kara, Doç. Dr. Saliha Dinç ve Prof. Dr. Mustafa Özmen tarafından sentezlenerek karakterize edilmiştir.



Şekil 3.2. CPTMS molekülü



Şekil 3.3. Grafitin CPTMS ile yüzey alanının genişletilmesi (Naeimi ve Ansarian, 2017)



Şekil 3.4. MCPE hazırlanması ve çalışma hücresi şeması

3.4.2. Karbon pasta elektrodun sabit akıma getirilmesi

Elektrokimyasal hücreye pH'ı 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu çözeltisi ve 1M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi ilave edildi. Hücre içerisine çalışma elektrodu (MCPE), karşıt (Pt tel) ve referans (Ag/AgCl) elektrot yerleştirildi (Şekil 3.4). Çalışılacak potansiyelde elektrot akımı sabitleninceye kadar bekletildi ve sabitlenen akım değeri denge akımı olarak kaydedildi. CPE tüm deneylerde bu işlemle sabit akıma getirildi.

3.4.3. CPE ve MCPE'nin dopamine duyarlılığının belirlenmesi

Hazırlanan CPE ve MCPE'nin DA'ya duyarlılığının karşılaştırılması, tirozinaz ile DA'nın enzimatik tepkimesi sonucu açığa çıkan dopaminokinonun oluşturduğu katodik (indirgenme) akımının ölçümüne dayanarak belirlendi. Elektrokimyasal hücreye pH'ı 7,0

olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu çözeltisi, 1M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi ve 50 μ L tirozinaz enzimi (5000 ünite/mL) ilave edildi. CPE çalışılan potansiyelde sabit akıma getiriliktten sonra denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içerisine DA'nın derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M aralığında olacak şekilde ilaveler yapıldı. Her ilavede çözelti manyetik karıştırıcıyla 20 dk karıştırıldı ve 200 s sonra ölçülen akım değerleri kaydedildi. Kaydedilen akım değerleri denge akımından çıkarıldı ve akım farkı değerleri (Δi) hesaplandı. Artan derişimlerde yapılan DA ilavelerine karşı artan akım farkları grafiğe geçirildi. Aynı işlem MCPE için de yapılarak elde edilen grafikler karşılaştırıldı. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi.

3.4.4. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

MCPE'nin en uygun çalışma potansiyelinin belirlenmesi amacıyla, -0,2 V , -0,15 V , -0,1 V potansiyellerde çalışmalar yapıldı. Elektrokimyasal hücreye pH'ı 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi ve 50 μ L tirozinaz enzimi (5000 ünite/mL) ilave edildi. MCPE çalışılan potansiyelde sabit akıma getiriliktten sonra denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içerisine DA'nın derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M aralığında olacak şekilde ilaveler yapıldı. Her ilavede çözelti manyetik karıştırıcıyla 20 dk karıştırıldı ve 200 s sonra ölçülen akım değerleri kaydedildi. Kaydedilen akım değerleri denge akımından çıkarıldı ve akım farkı değerleri (Δi) hesaplandı. Artan derişimlerde yapılan DA ilavelerine karşı artan akım farkları grafiğe geçirildi. Bu işlem basamakları çalışılan tüm potansiyeller için tekrarlandı ve en uygun çalışma potansiyeli belirlendi. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi.

3.4.5. CDs-CPTMS miktarının belirlenmesi

Karbon pasta elektrotlar farklı CDs-CPTMS miktarları (50, 100, 200 μ L) ile hazırlanarak en uygun miktarı belirlendi. Elektrokimyasal hücreye pH'ı 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi ve 50 μ L tirozinaz enzimi (5000 ünite/mL) ilave edildi. MCPE belirlenen çalışma potansiyelinde sabit akıma getiriliktten sonra denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içerisine DA'nın derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M aralığında olacak şekilde ilaveler yapıldı. Her ilavede çözelti manyetik karıştırıcıyla 20 dk karıştırıldı ve 200 s sonra ölçülen akım değerleri kaydedildi. Kaydedilen akım değerleri denge akımından çıkarılarak akım farkı değerleri (Δi) hesaplandı. Artan derişimlerde yapılan

DA ilavelerine karşı artan akım farkları grafiğe geçirilerek en uygun CDs-CPTMS miktarı tespit edildi. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi.

3.4.6. MCPE'ye tirozinaz enziminin immobilizasyonu

Tirozinaz enzimi MCPE'ye çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edildi. İmmobilizasyon işlemi için öncelikle bir ependorfa 2,0 mg BSA (sığır serum albümin), 50 µL tampon çözelti, 100 µL tirozinaz enzimi (5000 ünite/mL) ve 20 µL glutaraldehit (% 2,5) ilave dilerek bir çözelti hazırlandı. Daha sonra bu karışım, hazırlanan MCPE yüzeyinin her yerine eşit dağılacak şekilde mikro pipet yardımıyla damlatıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Kuruyan enzim elektrot saf suyla yıkandı ve yüzeye tutunmayan enzim, elektrottan uzaklaştırıldı. Hazırlanan enzim elektrot sonraki deneylerde kullanıldı. Enzim elektrot her deney aşamasında tekrar hazırlandı ve kullanılmadığında fosfat tamponunda +4 °C'de buzdolabında saklandı.

3.4.7. Glutaraldehit miktarının belirlenmesi

Enzim immobilizasyonuna çapraz bağlayıcı etkisini incelemek amacıyla farklı miktarlarda (10, 20, 30 µL) %2,5'luk glutaraldehit içeren enzim elektrotlar hazırlandı. Enzim elektrotlar belirlenen çalışma potansiyelinde sabit akıma getirildi ve denge akımları kaydedildi. Denge akımları kaydedildikten sonra çalışma hücresi içerisine DA'nın derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M aralığında olacak şekilde ilaveler yapıldı. Her ilavede çözelti manyetik karıştırıcıyla 20 dk karıştırıldı ve 200 s sonra ölçülen akım değerleri kaydedildi. Kaydedilen akım değerleri denge akımından çıkarıldı ve akım farkı değerleri (Δi) hesaplandı. Artan derişimlerde yapılan DA ilavelerine karşı artan akım farkları grafiğe geçirilerek en uygun glutaraldehit miktarı tespit edildi. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi.

3.4.8. DA biyosensörünün en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi

Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi amacıyla, pH'ın etkisi, sıcaklık etkisi, substrat derişiminin etkisi, enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrünün belirlenmesi çalışmaları yapıldı.

pH etkisi

Hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımına pH etkisini incelemek amacıyla pH 5,0 için asetik asit sodyum asetat tamponu; 6,0; 7,0; 8,0 için fosfat tamponu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$); 9,0 için glisin tamponu çözeltileri kullanıldı. Hazırlanan tampon çözeltilerle aynı pH'a sahip olacak şekilde hücre içindeki derişimi $5,0 \times 10^{-6}$ M olan DA çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan biyosensör belirlenen çalışma potansiyelinde sabit akıma getirildi ve denge akımı kaydedildi. Denge akımı kaydedildikten sonra hücre içerisine DA'nın derişimi $5,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde ilave edildi. Çözelti manyetik karıştırıcıyla 20 dk karıştırıldı ve 200 s sonra ölçülen akım değeri kaydedildi. Kaydedilen akım değeri denge akımından çıkarıldı ve akım farkı değeri (Δi) hesaplandı. Bu işlem diğer pH değerindeki bütün tampon çözeltiler için yapıldı. Hesaplanan Δi değerleri pH değerlerine karşı grafiğe geçirildi. Grafik kullanılarak en uygun pH değeri bulundu. Bundan sonraki deney aşamalarında bulunan en uygun pH değeri kullanıldı. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi.

Sıcaklık etkisi

Elektrokimyasal hücreye pH'ı 6,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu çözeltisi ve 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi ilave edildi. Biyosensör, termostatl dolaşım su banyosu kullanılarak 20 °C'ye ayarlanıp belirlenen çalışma potansiyelinde sabit akıma getirildi ve denge akımı kaydedildi. Denge akımı kaydedildikten sonra hücre içerisine DA'nın derişimi $5,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde ilave edildi. Çözelti manyetik karıştırıcıyla 20 dk karıştırıldı ve 200 s sonra ölçülen akım değeri kaydedildi. Kaydedilen akım değeri denge akımından çıkarıldı ve akım farkı değeri (Δi) 20 °C için hesaplandı. Aynı işlem 30, 40, 50, 60 °C sıcaklıkları için de gerçekleştirildi. Hesaplanan Δi değerleri sıcaklık değerlerine karşı grafiğe geçirildi. Grafik kullanılarak biyosensörün en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık bulundu. Fakat deneysel çalışmalar oda sıcaklığında yapıldı. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi.

Substrat derişiminin etkisi

Hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine substrat derişiminin optimum şartlarda etkisini incelemek amacıyla önce biyosensör pH'ı 6,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu çözeltisi ve 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi içerisinde ve belirlenen çalışma potansiyelinde sabit akıma getirildi ve denge akımı kaydedildi. Denge akımı

kaydedildikten sonra çalışma hücresi içerisine DA derişimi $1,0 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M aralığında olacak şekilde ilaveler yapıldı. Her ilavede çözelti manyetik karıştırıcıyla 20 dk karıştırıldı ve 200 s sonra ölçülen akım değerleri kaydedildi. Kaydedilen akım değerleri denge akımından çıkarılarak akım farkı değerleri (Δi) hesaplandı. Bulunan değerler artan DA derişimlerine karşı grafiğe geçirildi (Michaelis-Menten eğrisi). Bu grafikten yararlanılarak DA tayini için doğrusal çalışma aralığı belirlendi ve elde edilen verilerden Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten $K_{m(göz)}$ ve $I_{maks(göz)}$ değerleri belirlendi. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi.

Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

Biyosensörün optimum şartlarda tekrar kullanılabilirliğini belirlenmek için, biyosensör pH'ı 6,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu ve 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit içeren çözeltide belirlenen çalışma potansiyelinde sabit akıma getirildi ve denge akımı kaydedildi. Denge akımı kaydedildikten sonra hücre içerisine DA'nın derişimi $5,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde ilave edildi. Çözelti manyetik karıştırıcıyla 20 dk karıştırıldı ve 200 s sonra ölçülen akım değeri kaydedildi. Kaydedilen akım değeri denge akımından çıkarıldı akım farkı değeri (Δi) hesaplandı. Deney 17 kez daha tekrarlandı elde edilen akım farkları (Δi) ölçüm sayısına karşı grafiğe geçirildi. Biyosensörün tekrar kullanımlardaki aktivitesindeki azalma belirlendi. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi.

Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Biyosensörün raf ömrünü belirlenmek için, biyosensör pH'sı 6,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu ve 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit içeren çözeltide belirlenen çalışma potansiyelinde sabit akıma getirildi ve denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresine, hücre içi derişimi $5,0 \times 10^{-7}$ M olacak şekilde DA çözeltisi ilave edildi. Çözelti manyetik karıştırıcıyla 20 dk karıştırıldı ve 200 s sonra ölçülen akım değeri kaydedildi. Kaydedilen akım değeri denge akımından çıkarıldı ve akım farkı değeri (Δi) hesaplandı. Deney farklı aralıklarla (1-3-10-15-25. gün) tekrar edildi. Hesaplanan Δi değerleri gün sayısına karşı grafiğe geçirildi ve biyosensörün raf ömrü belirlendi. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi.

3.4.9. DA tayinine girişim yapan türlerin incelenmesi

DA tayinine bazı maddelerin girişim etkisi incelendi. Bu maddeler ve derişimleri; $3,0 \times 10^{-4}$ M ürik asit ve $1,0 \times 10^{-4}$ M askorbik asit (Ustabas, 2010), $5,0 \times 10^{-3}$ M glukoz (Akın, 2017), $1,0 \times 10^{-5}$ M epinefrin ve norepinefrin (Chernecky ve Berger, 2013), $1,0 \times 10^{-4}$ M tirozin (Alsharhan ve Ficicioglu, 2020), $1,0 \times 10^{-5}$ M L-Dopa (Goetz ve diğerleri, 1993), $1,0 \times 10^{-3}$ M katekol (Canbay ve Akyilmaz, 2014), kandaki değerlerine göre belirlendi. DA'nın normal derişim aralığı yaklaşık $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M (Zaidi, 2018) olduğundan 10^{-3} M stok DA çözeltisi hazırlandı. Biyosensör 1 M 1 mL sodyum klorür ve pH'sı 6,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu çözeltisinde belirlenen çalışma potansiyelinde sabit akıma getirildi ve denge akımı kaydedildi. Hücre içerisine $1,0 \times 10^{-3}$ M DA çözeltisinden yeteri kadar ilave edilerek DA'nın hücre içi derişiminin kandaki alt sınır değeri ($1,0 \times 10^{-7}$ M) olması sağlandı. Çözelti 20 dk karıştırıldı ve 200 s sonra ölçülen akım değeri kaydedildi. Ölçülen bu akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı değeri (Δi) hesaplandı. Daha sonra girişimi incelenen tür, hücre içindeki derişimi yukarıda verilen derişiminden 10 000 kat seyreltme olacak şekilde hücreye ilave edildi. Çözelti tekrar 20 dk karıştırıldı ve 200 s sonra ölçülen akım değeri kaydedildi. Ölçülen bu akım değeri DA'nın cevap akımından çıkarılarak çalışılan türün cevap akımı değeri hesaplandı. Bu akım farkı ile incelenen maddenin yüzde olarak ne kadar girişim yaptığı hesaplandı. Aynı işlem diğer maddeler için de tekrarlanarak her bir maddenin DA tayinine ne kadar girişim yaptığı bulundu. Deneyler üç tekrarlı gerçekleştirildi.

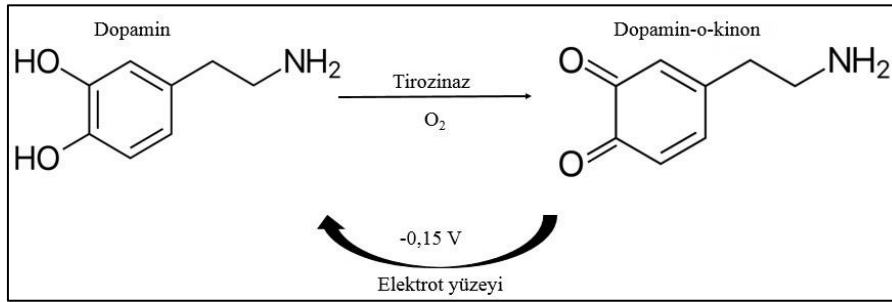
3.4.10. Sentetik kan numunesinde DA tayini

Hazırlanan biyosensörün gerçek örneklerle uygulanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla kan serumunda bulunan, girişim yapabilecek türlerin Bölüm 3.4.9'da belirtilen miktarlarını içeren sentetik çözelti hazırlandı. Hücre içerisine ilave edilen sentetik çözeltideki DA derişimi $1,0 \times 10^{-7}$ M olacak şekilde ayarlandı. Biyosensör 1 M 1 mL sodyum klorür ve pH'ı 6,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu çözeltisinde belirlenen çalışma potansiyelinde sabit akıma getirildi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücre içerisine 10 000 kat seyreltme olacak şekilde sentetik numuneden ilave edildi. Çözelti 20 dk karıştırıldı ve 200 s sonra amperometrik bir cevap akımı ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen bu akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı değeri (Δi) hesaplandı. Bu akım değerine karşılık gelen

DA derişimi kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplandı. Deneyler üç tekrarlı geręekleřtirildi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, dopamine duyarlı yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Bu amaçla, karbon pasta elektrot CDs-CPTMS ile modifiye edildi. Daha sonra tirozinaz enzimi, glutaraldehit ile çapraz bağlanarak modifiye karbon pasta elektrot yüzeyine immobilize edildi. Dopamin tayini enzimatik tepkime sonucu oluşan dopaminokinonun $-0,15$ V'de DA'ya indirgenmesine dayanarak yapıldı (Şekil 4.1).

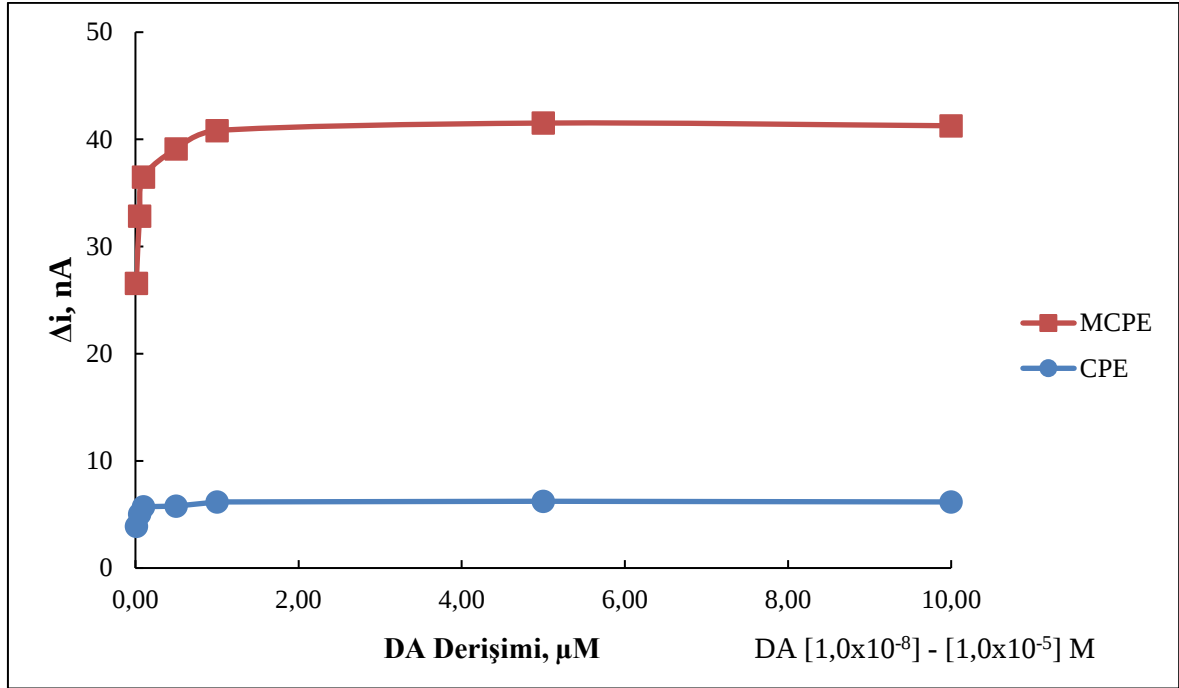


Şekil 4.1. DA tayini için tepkime şeması

Hazırlanan biyosensörün en iyi çalışma şartları (pH, sıcaklık, substrat derişimi) belirlendi. Sonra biyosensörün çalışmasına tekrarlanabilirlik ve raf ömrünün etkisi incelendi. DA tayinine girişim yapabilecek türlerin etkileri incelendikten sonra biyosensör sentetik kan numunesindeki DA'nın tayininde kullanıldı.

4.1. CPE ve MCPE'nin DA'ya Duyarlılığının Belirlenmesi

Tirozinaz DA'nın dopaminokinona dönüşümünü katalize eder. Dopaminokinonun DA'ya indirgenmesiyle oluşan katodik akımların kaydedilmesi ile karbon pasta elektrot ve modifiye karbon pasta elektrodun DA'ya duyarlılıkları karşılaştırıldı. CPE ve MCPE $-0,2$ V potansiyelde sabit akıma getirildi ve denge akımları kaydedildi. Çalışma hücresi içerisine DA derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M aralığında olacak şekilde ilaveler yapılarak DA derişimine karşı elde edilen akım farkları (Δi) grafiğe geçirildi (Şekil 4.2). Grafik incelendiğinde MCPE'de elde edilen akımların CPE'de elde edilenden yaklaşık 7 kat daha fazla olduğu görüldü. MCPE'deki akımların daha yüksek çıkma sebebi modifiye için kullanılan CDs-CPTMS'nin iletkenliği arttırması olarak yorumlandı.

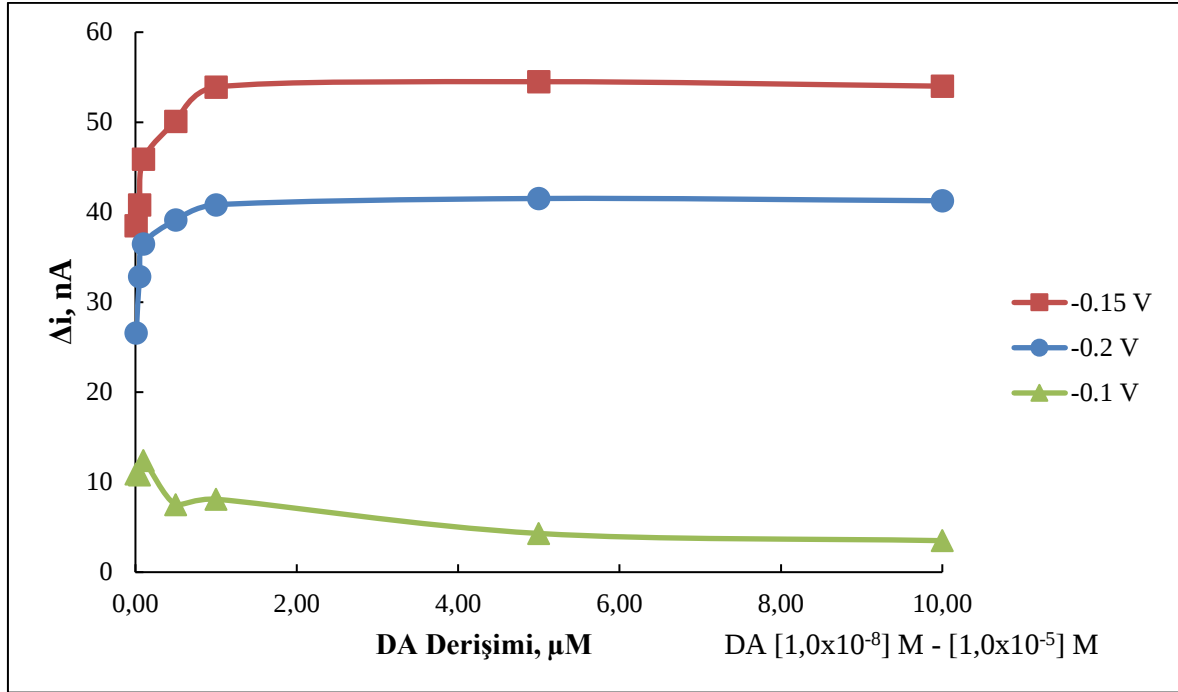


Şekil 4.2. CPE ve MCPE'nin DA'ya duyarlılığının belirlenmesi (-0,2 V, 25 °C, 0,1 M pH=7,0 fosfat tamponu)

4.2. Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi

MCPE'nin DA'ya duyarlılığına en iyi çalışma potansiyelinin etkisinin araştırılması için -0,10 V, -0,15 V, -0,2 V potansiyellerde DA derişimine karşı ölçülen akım farkları (Δi) grafiğe geçirildi (Şekil 4.3). Elde edilen grafik incelendiğinde dopaminokinonun en yüksek indirgenme akımının -0,15 V'de olduğu tespit edildi. Bu verilerden yola çıkarak çalışma potansiyeli -0,15 V olarak belirlenerek sonraki deney aşamalarında bu potansiyelde çalışıldı.

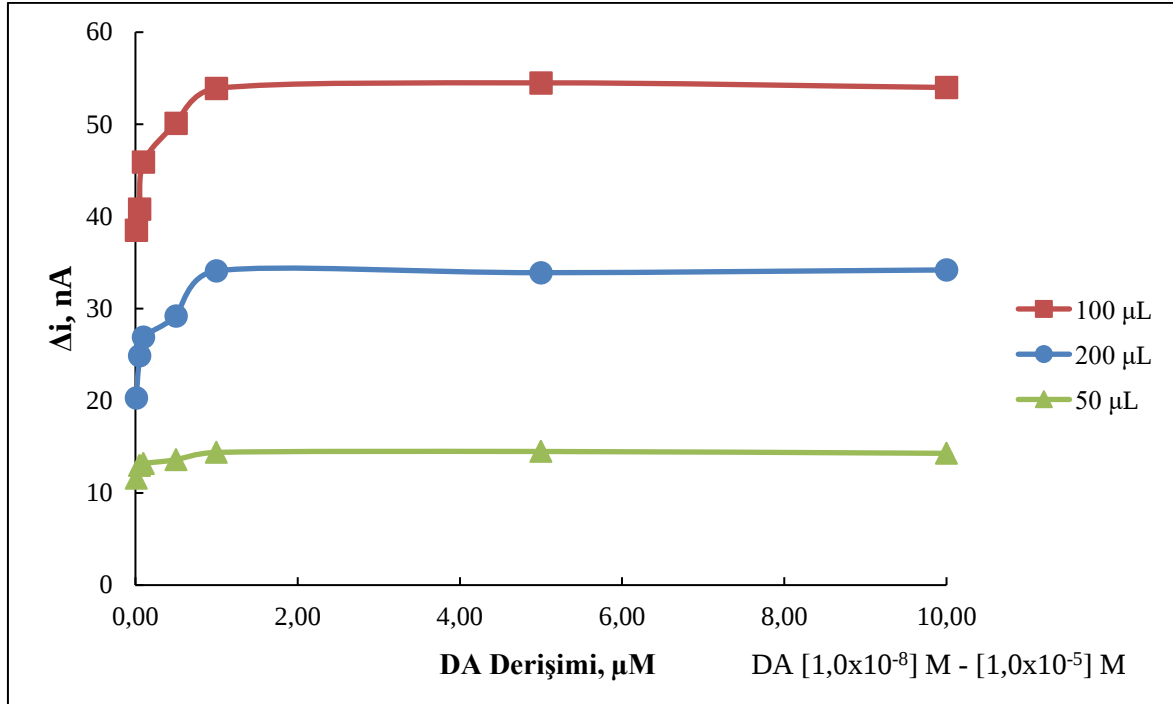
Literatürde -0,1 V (Zhou ve diğerleri, 2007), -0,15 V (Njagi ve diğerleri, 2010), -0,2 V (Ori ve diğerleri, 2014) potansiyelde çalışılan DA biyosensörlerine karşılaşılmaktadır.



Şekil 4.3. MCPE'nin DA'ya duyarlılığına çalışma potansiyelinin etkisi (25 °C, 0,1 M pH=7,0 fosfat tamponu)

4.3. CDs-CPTMS Miktarının Belirlenmesi

Bölüm 3.4.1'e göre hazırlanan MCPE'de kullanılan CDs-CPTMS miktarının DA duyarlılığına etkisi araştırıldı. Bu amaçla farklı miktarlarda (50, 100, 200 μL) CDs-CPTMS içeren çalışma elektrotları hazırlandı. Hazırlanan elektrotlar dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içerisine derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde DA çözeltileri ilave edilerek akım değışimleri ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akımlardan denge akımı çıkarılarak akım farkları (Δi) hesaplandı. DA derişimlerine karşı akım farkları (Δi) grafiğe geçirildi (Şekil 4.4). Grafik incelendiğinde CDs-CPTMS miktarı arttığında cevap akımının arttığı ancak fazla miktarda eklendiğinde düştüğü görülmektedir. Bunun sebebi CDs-CPTMS miktarının karbon pastanın mekanik kararlılığına dolayısıyla cevap akımına etki etmesidir. Grafikteki sonuçlar karşılaştırıldı ve en uygun CDs-CPTMS miktarının 100 μL olmasına karar verildi. Bundan sonraki deney aşamalarında hazırlanan karbon pasta elektrotlar 100 μL CDs-CPTMS ile modifiye edildi.



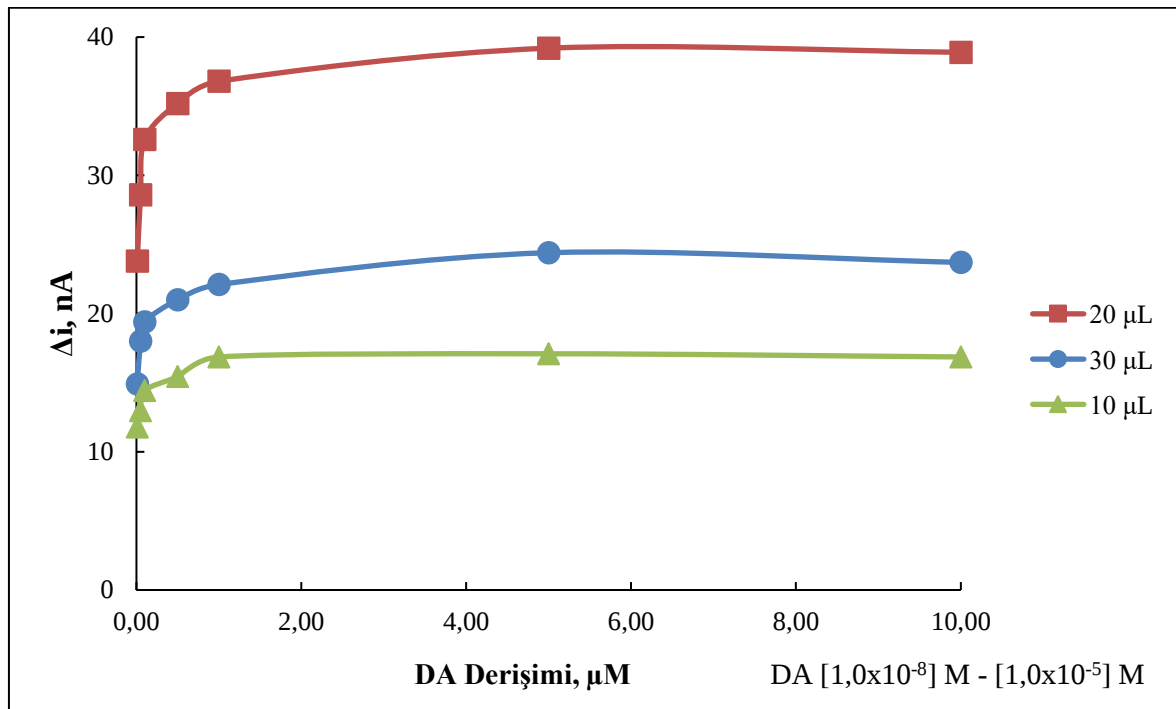
Şekil 4.4. MCPE'nin DA'ya duyarlılığına CDs-CPTMS miktarının etkisi (-0,15 V, 25 °C, 0,1 M pH=7,0 fosfat tamponu)

4.4. Glutaraldehit Miktarının Belirlenmesi

Glutaraldehit, enzim immobilizasyonu için kullanılan en etkili çapraz bağlama reaktiflerinden biridir. Glutaraldehit nötr pH civarındadır ve enzimde bulunan amin gruplarıyla hızla tepkimeye girerek termal ve kimyasal olarak kararlı çapraz bağlar oluşturmayı sağlar. Enzim glutaraldehit oranının ve derişiminin seçimi önemlidir çünkü enzimin katalitik aktivitesini etkiler (Migneault ve diğerleri., 2004). Glutaraldehit çözeltisinin miktarı düşük olduğunda, immobilize edilmiş enzim miktarı daha az olur ve bu enzimin aktivitesinin düşük olmasına sebep olur. Glutaraldehit çözeltisinin miktarının çok fazla olması da, enzimin aktif merkezinin yapısını değiştirerek enzim aktivitesinin azalmasına neden olur (Chen ve diğerleri, 2013). Bu sebepten dolayı enzim immobilizasyonunda kullanılacak glutaraldehit miktarının enzimin aktivitesine etkisi araştırılmalıdır.

MCPE'ye enzim immobilize etmek için kullanılan glutaraldehit miktarını belirlemek için, 10 μL , 20 μL , 30 μL (% 2,5'luk) glutaraldehit içeren enzim elektrotlar hazırlandı. Enzim elektrotlar dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içerisine derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M aralığında olacak şekilde DA çözeltileri ilave edilerek akım

değişimleri ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akımlardan denge akımı çıkarılarak akım farkları (Δi) hesaplandı. DA derişimlerine karşı akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.5). Grafik incelendiğinde glutaraldehit miktarı 10 μL 'den 20 μL 'ye çıkarıldığında cevap akımının arttığı ancak 20 μL 'den 30 μL 'ye çıkarıldığında ise düştüğü görülmektedir. Bunun sebebi yeterli miktarda olmayan glutaraldehidin enzim immobilize etmek için yapıyı bir arada tutamaması ve fazla miktarda olduğunda ise enzimin aktif bölgesine aşırı bağlanma sonucu enzimin aktivite kaybına sebep olmasıdır. Grafikteki sonuçlar karşılaştırıldı ve en fazla enzim aktivitesi sağlayan glutaraldehit miktarının 20 μL olmasına karar verildi. Bundan sonraki deney aşamalarında kullanılan elektrotlara, tirozinaz enzimi 20 μL glutaraldehit yardımı ile immobilize edildi.



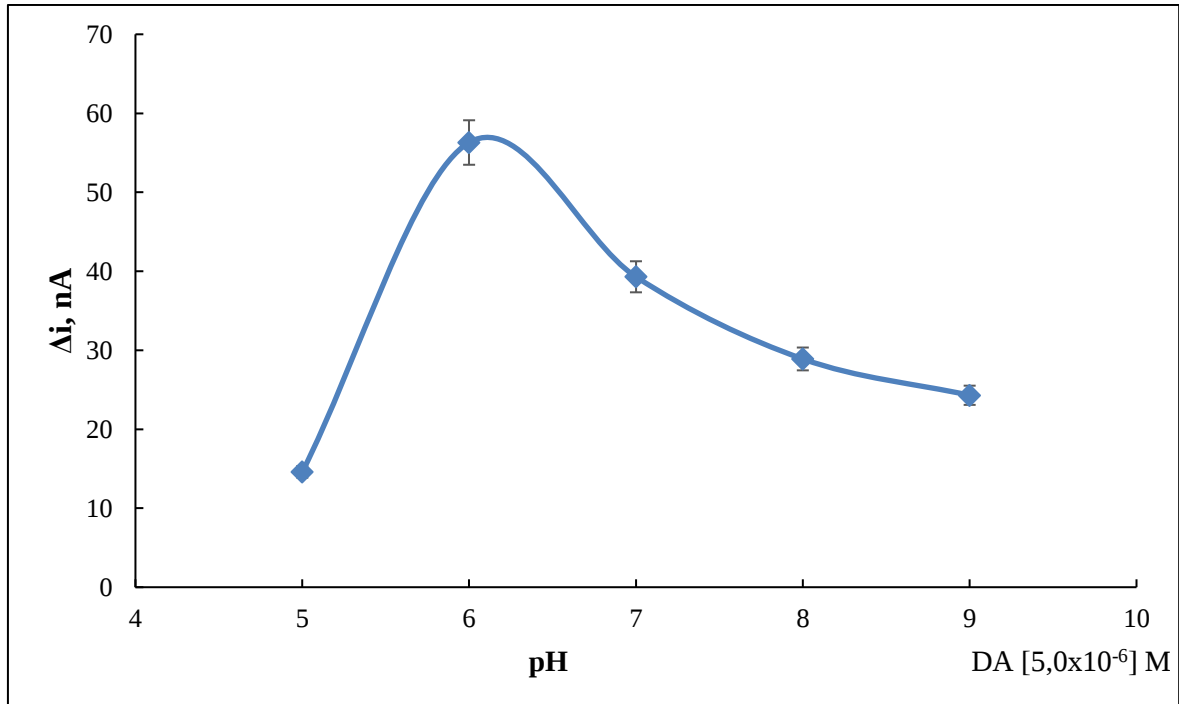
Şekil 4.5. Biyosensörün DA'ya duyarlılığına glutaraldehit miktarının etkisi (-0,15 V, 25 °C, 0,1 M pH=7,0 fosfat tamponu)

4.5. Optimum pH

pH enzim aktivitesini etkileyen faktörlerden biridir. pH enzimde bulunan iyonik bağlar ve hidrojen bağlarını etkileyerek enzim aktivitesini değiştirir (Eed, 2012). DA biyosensörünün performansına pH'nın etkisi incelendi. Hazırlanan biyosensör farklı pH değerine (5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0) sahip tampon çözeltilerde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içerisine, hücre içi derişimi sabit ($5,0 \times 10^{-6} \text{ M}$) olacak şekilde DA çözeltisi ilave

edilerek akım değişimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Aynı işlem tüm pH değerleri için uygulandıktan sonra pH değerlerine karşı akım farkları (Δi) grafiğe geçirildi (Şekil 4.6). Grafik incelendiğinde en yüksek akımın pH 6,0 tamponundan elde edildiği görüldü. Bundan sonraki deney aşamalarında pH 6,0 değerinde çalışıldı.

Literatürde farklı maddelerle yapılan DA biyosensörü çalışmalarında farklı pH değerleri ve bu çalışma ile uyumlu pH değerleri bulunmaktadır. Örneğin; pH 6,0 (Montereali ve diğerleri, 2010; Xiang ve diğerleri, 2007), 7,4 (Cosnier ve diğerleri, 1997), 7,8 (Bezerra ve diğerleri, 2003). Enzimin farklı şekilde immobilize edilmesi veya immobilizasyonda farklı bir madde kullanılması pH değerlerinin farklı olmasına neden olabilmektedir.



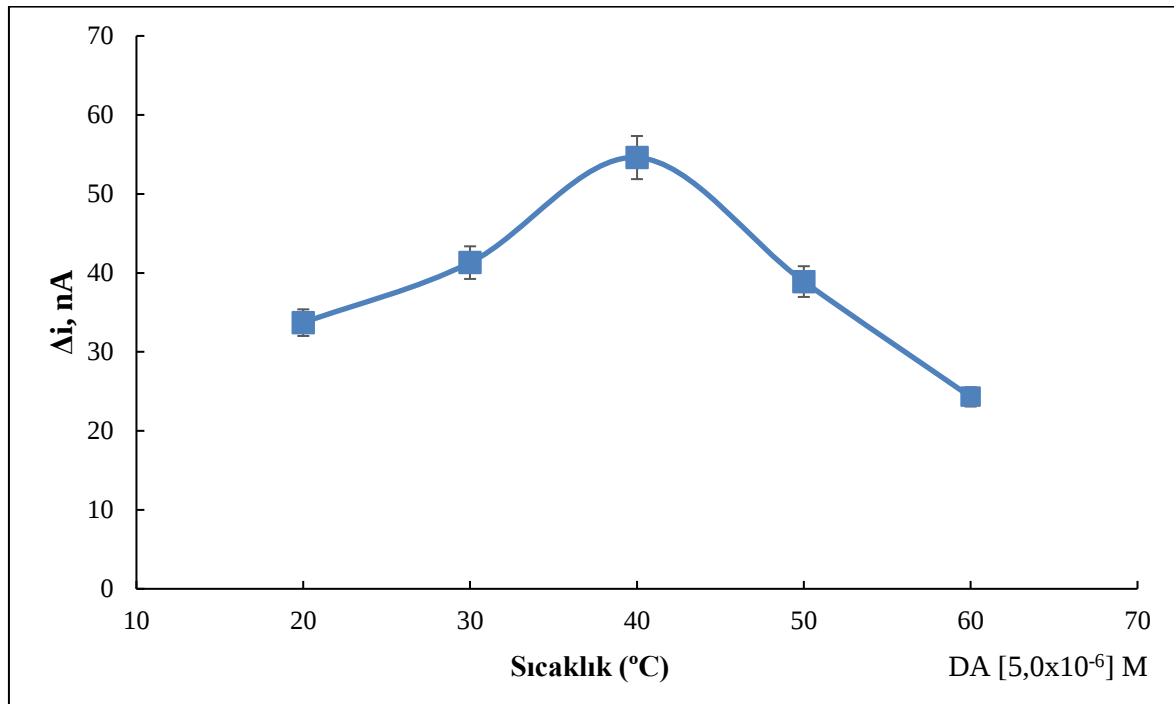
Şekil 4.6. Biyosensörün DA'ya duyarlılığına pH'nın etkisi (-0,15 V, 25 °C, 0,1 M fosfat tamponu)

4.6. Optimum Sıcaklık

Sıcaklık enzim aktivitesine etki ettiğinden sıcaklığının seçimi son derece önemlidir. Enzimle yapılan çalışmalar aktivite kaybına yol açmayan sabit bir sıcaklıkta yapılır. Sıcaklık enzim aktivitesini belirli bir noktaya kadar artırır ancak yüksek sıcaklıkta enzim denatüre olur ve aktivitesini kaybeder (Daniel ve Danson, 2013).

DA biyosensörünün performansına sıcaklığın etkisi incelendi. Hazırlanan biyosensör farklı sıcaklıklarda (20, 30, 40, 50, 60 °C) dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içerisine, hücre içi derişimi sabit ($5,0 \times 10^{-6}$ M) olacak şekilde DA çözeltisi ilave edilerek akım değişimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Aynı işlem tüm sıcaklıklar için uygulandıktan sonra sıcaklığa (°C) karşı akım farkları (Δi) grafiğe geçirildi (Şekil 4.7). Grafik incelendiğinde en yüksek akımın 40 °C’de olduğu görülmeye rağmen bundan sonraki deney aşamalarında oda sıcaklığında çalışıldı. Çünkü biyosensörler için çalışma şartları pratik olmalıdır.

Literatürde farklı maddelerle yapılan DA biyosensörü çalışmalarında farklı optimum sıcaklıklar görülebilmektedir. Örneğin; 38 °C (Fooladsaz ve diğerleri, 2012), 35 °C (Canbay ve Akyılmaz, 2014), 45 °C (Ramu ve diğerleri, 2021). İmmobilizasyon yönteminin veya immobilizasyonda kullanılan maddenin farklı olması optimum sıcaklıkta değişikliğin olmasına neden olabilmektedir.



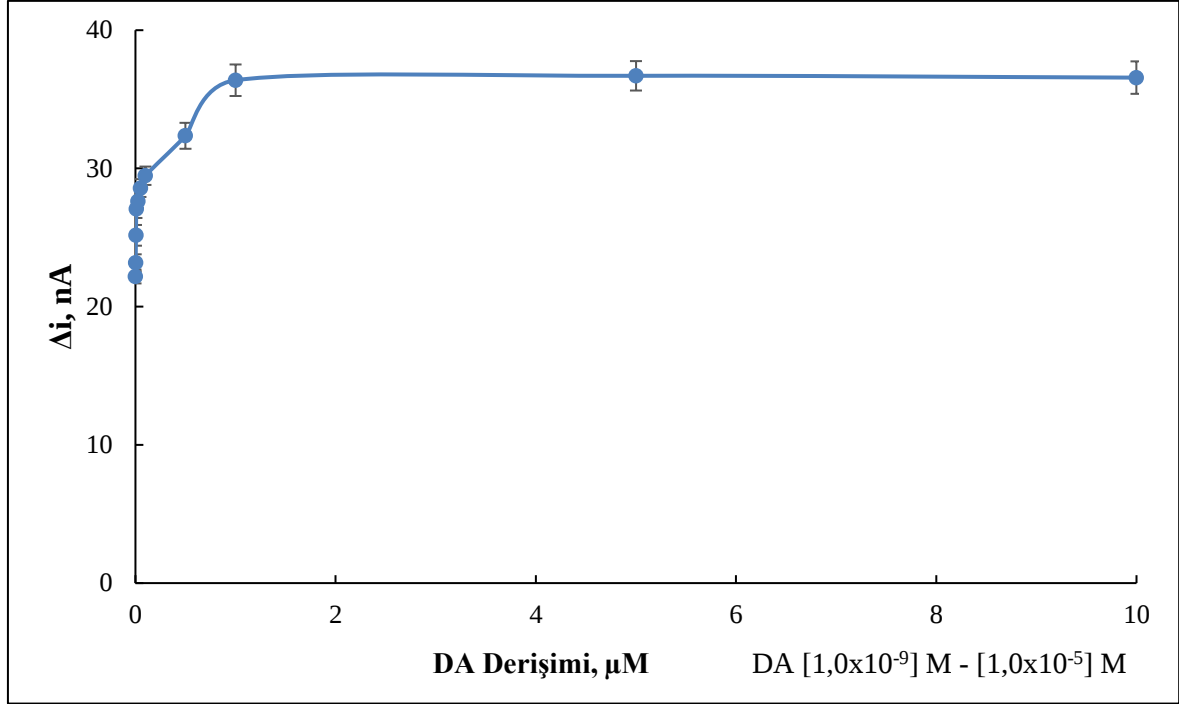
Şekil 4.7. Biyosensörün DA’ya duyarlılığına sıcaklığın etkisi (-0,15 V, 0,1 M pH=6,0 fosfat tamponu)

4.7. Substrat Derişiminin Etkisi

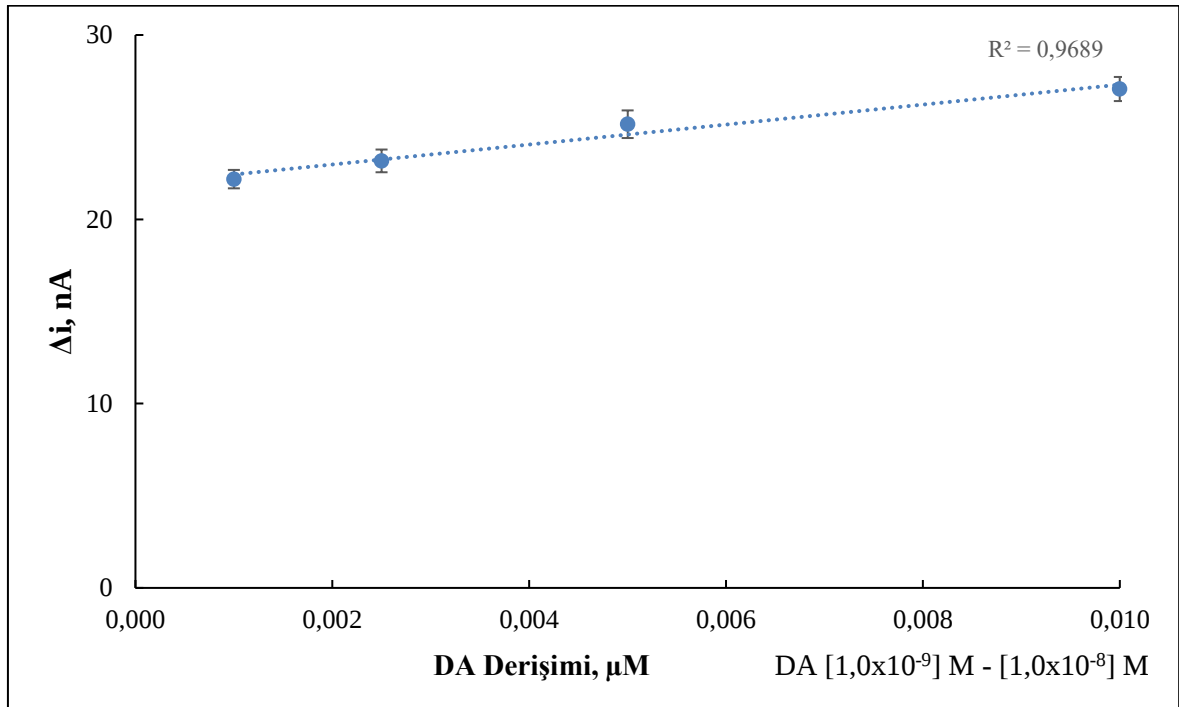
Biyosensörün DA'ya duyarlılığına substrat derişiminin etkisi incelendi. Hazırlanan biyosensör -0,15 V potansiyelde, pH 6,0 tampon çözeltisinde, 25 °C'de dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içerisine derişimi $1,0 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde DA çözeltileri ilave edilerek akım değişimleri kaydedildi. Kaydedilen akımlardan denge akımı çıkarılarak akım farkları (Δi) hesaplandı. DA derişimine karşı akım farkları (Δi) grafiğe geçirildi (Şekil 4.8). Grafikten $1,0 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-8}$ M ($R^2 = 0,9689$; Şekil 4.9) ile $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-7}$ M ($R^2 = 0,9611$; Şekil 4.10) aralığında iki adet doğrusal çalışma aralığı elde edildi. DA için alt tayin sınırı (LOQ), $LOQ=10s/m$ formülü ile $1,0 \times 10^{-9}$ M olarak hesaplandı ve cevap süresi 200 s olarak belirlendi.

Literatürde doğrusal aralığı ve alt tayin sınırı $2,0 \times 10^{-8}$ - $4,6 \times 10^{-5}$ M, $4,0 \times 10^{-9}$ M (Ramu ve diğerleri, 2021), $1,0 \times 10^{-8}$ - $2,2 \times 10^{-4}$ μ M, $1,0 \times 10^{-9}$ M (Njagi ve diğerleri, 2010), $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ M, $1,0 \times 10^{-9}$ M (Huang ve diğerleri, 2014) şeklinde hesaplanan DA biyosensörü çalışmaları bulunmaktadır. Literatür ile karşılaştırıldığında bu tez çalışmasında bulunan doğrusal aralığın oldukça geniş ve düşük tayin sınırına sahip olduğu görölmektedir.

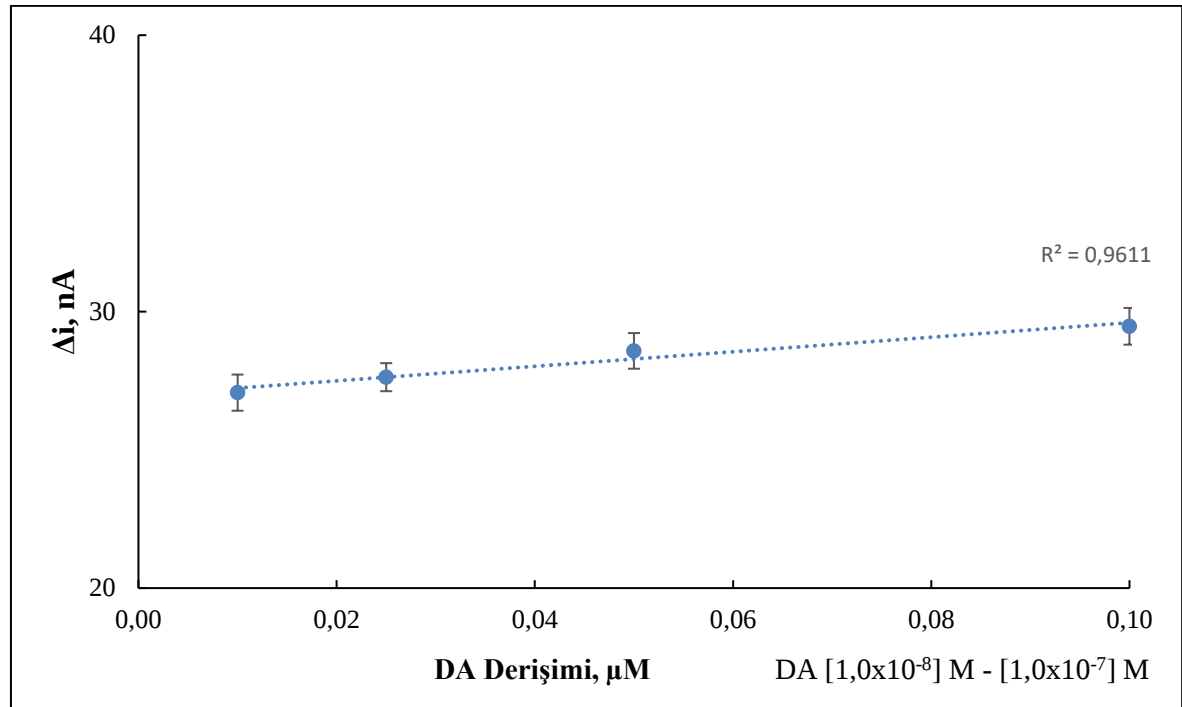
Enzimler için spesifik veriler olan V_{max} ve K_m değerlerini bulmak için DA derişimine karşı akım farklarının tersi alınarak $1/[DA] - 1/\Delta i$ grafiği (Lineweaver-Burk, Şekil 4.11) elde edildi. $K_{m(göz)}$ değeri 0,623 nM, $I_{max(göz)}$ değeri 31,2 nA olarak hesaplandı. $K_{m(göz)}$ değerinin literatür ile karşılaştırıldığında 7 μ M (Bujduveanu ve diğerleri, 2013), 5,33 μ M (Sethuraman ve diğerleri, 2021) oldukça düşük olduğu görölmektedir. $K_{m(göz)}$ değerinin düşük olması hazırlanan biyosensörde enzimin DA'ya ilgisinin yüksek oluğunu gösterir.



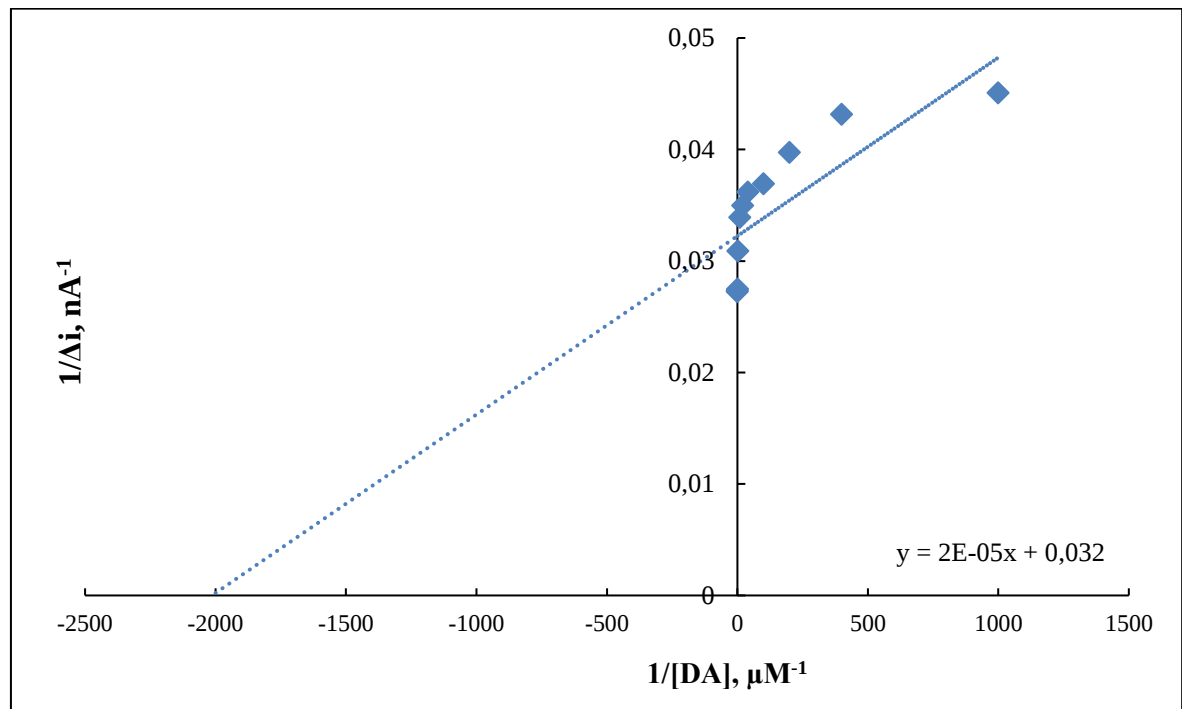
Şekil 4.8. Biyosensörün amperometrik cevap akımına DA derişiminin etkisi (-0,15 V, 25 °C, 0,1 M pH=6,0 fosfat tamponu)



Şekil 4.9. DA biyosensörü için kalibrasyon grafiğı 1 (-0,15 V, 25 °C, 0,1 M pH=6,0 fosfat tamponu)



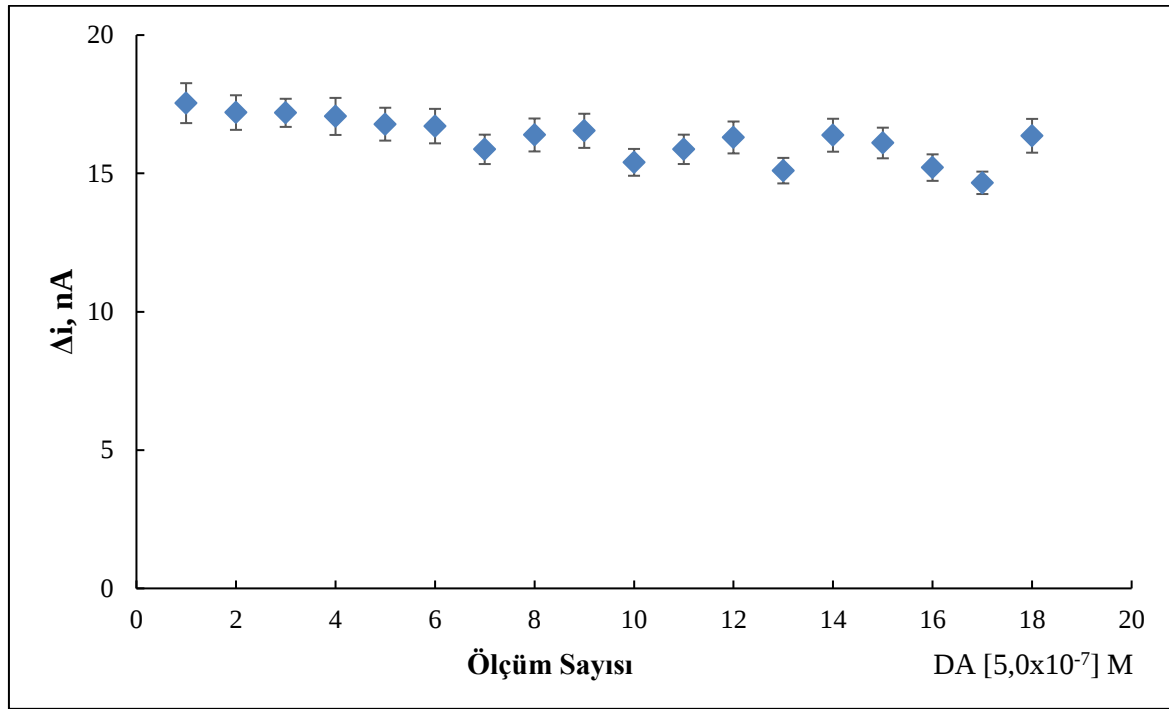
Şekil 4.10. DA biyosensörü için kalibrasyon grafiği 2 (-0,15 V, 25 °C, 0,1 M pH=6,0 fosfat tamponu)



Şekil 4.11. Biyosensörün amperometrik cevap akımına DA derişiminin etkisi, Lineweaver-Burk grafiği (-0,15 V, 25 °C, 0,1 M pH=6,0 fosfat tamponu)

4.8. Tekrarlanabilirlik

DA biyosensörüne tekrarlanabilirliğin etkisi incelendi. Hazırlanan biyosensör -0,15 V potansiyelde, pH 6,0 tampon çözeltisinde, 25 °C’de dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içerisine derişimi $5,0 \times 10^{-7}$ M olacak şekilde DA çözeltisi ilave edilerek akım değışimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Aynı işlem 18 kez uygulandıktan sonra ölçüm sayısına karşı akım farkları (Δi) grafiğe geçirildi (Şekil 4.12). 18 ölçüm sonunda biyosensörün başlangıç aktivitesinin % 7,21’ini kaybettiği görüldü. Elde edilen akım değışimlerinden bağıl standart sapma %4,88 olarak hesaplandı.

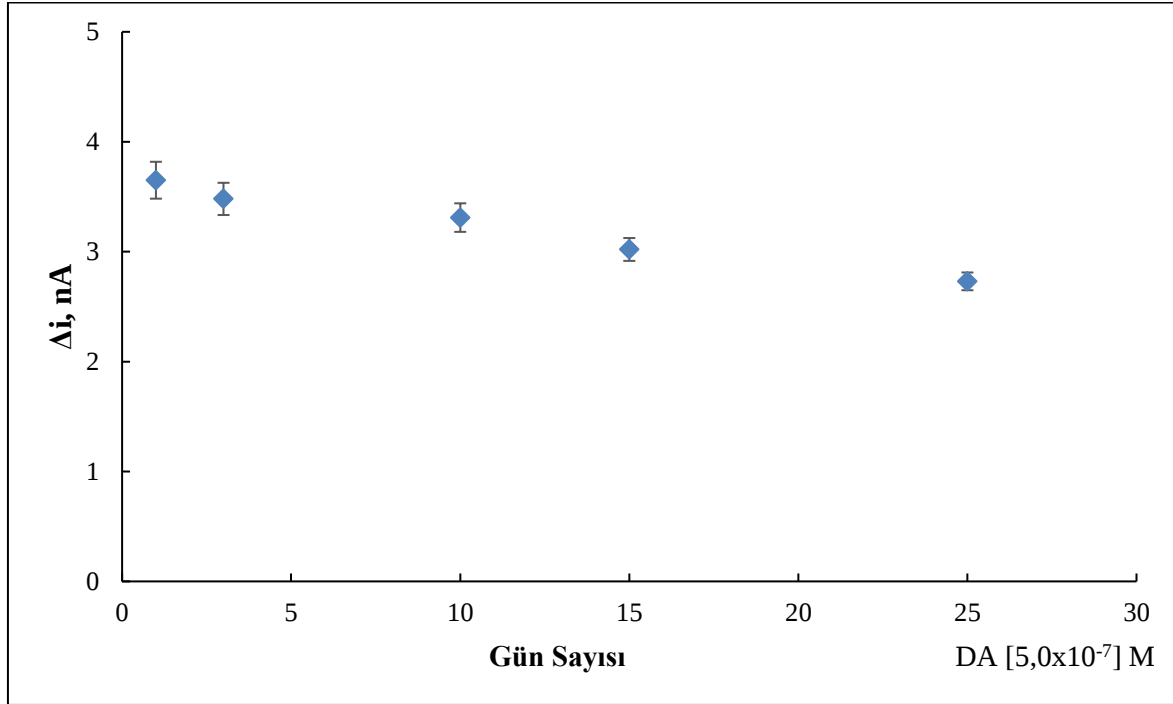


Şekil 4.12. Biyosensörün tekrarlanabilirliğinin incelenmesi (-0,15 V, 25 °C, 0,1 M pH=6,0 fosfat tamponu)

4.9. Raf Ömrünün Belirlenmesi

DA biyosensörüne raf ömrünün etkisi incelendi. Hazırlanan biyosensör -0,15 V potansiyelde, pH 6,0 tampon çözeltisinde, 25 °C’de dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içerisine derişimi $5,0 \times 10^{-7}$ M olacak şekilde DA çözeltisi ilave edilerek akım değışimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Aynı işlem 25 gün boyunca belirli aralıklarla (1 - 3 - 10 - 15 -

25. gün) uygulandıktan sonra depolama süresine karşı akım farkları grafiğe geçirildi (Şekil 4.13). Grafik incelendiğinde aktivitedeki düşüş hızının 1. günden 10. güne kadar az olduğu 10. günden sonra biraz daha fazla olduğu kaydedilmiştir. Biyosensörün 25 günün sonunda başlangıç aktivitesinin % 75'ini koruduğu görüldü.



Şekil 4.13. Biyosensörün raf ömrünün incelenmesi (-0,15 V, 25 °C, 0,1 M pH=6,0 fosfat tamponu)

4.10. DA Tayinine Girişim Yapan Türlerin Etkisi

Gerçek örneklerde tayin yapılırken tayin edilecek maddenin yanında girişim etkisine neden olabilecek başka maddelerde bulunur. Girişim içeren numuneleri ölçerken, girişim etkilerini iyileştirmek ve tanı için daha doğru ölçümler sağlamak önemlidir. Numunenin seyreltilmesi girişimin etkisini azaltabilir (Park, 2019; Wen ve diğerleri, 2007). Bu nedenle kan serumunda bulunabilecek ve girişim etkisine neden olabilecek bazı maddelerin DA tayini üzerine etkisi araştırıldı. Bu maddeler ve derişimleri; $3,0 \times 10^{-4}$ M ürik asit ve $1,0 \times 10^{-4}$ M askorbik asit (Ustabaş, 2010), $5,0 \times 10^{-3}$ M glukoz (Akın, 2017), $1,0 \times 10^{-5}$ M epinefrin ve norepinefrin (Chernecky ve Berger, 2013), $1,0 \times 10^{-4}$ M tirozin (Alsharhan ve Ficicioglu, 2020), $1,0 \times 10^{-5}$ M L-Dopa (Goetz ve diğerleri, 1993), $1,0 \times 10^{-3}$ M katekol (Canbay ve Akyilmaz, 2014), kandaki değerlerine göre belirlendi.

Hazırlanan biyosensör -0,15 V potansiyelde, pH 6,0 tampon çözeltisinde, 25 °C’de dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içerisine derişimi $1,0 \times 10^{-7}$ M olacak şekilde DA çözeltisi ilave edilerek akım değişimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Daha sonra girişim etkisi incelenen madde 10 000 kat seyreltme olacak şekilde hücreye ilave edilerek akım değişimi ölçüldü. Aynı işlem tüm maddeler için tekrarlandı ve elde edilen akım farklarından yararlanılarak çalışılan maddenin yüzde olarak ne kadar girişim yaptığı hesaplandı. Girişim yapan maddeler ve girişim oranları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. DA tayinine girişim yapan maddeler ve girişim etkileri

Girişim yapan madde	Hücre içi Derişim (M)	% Girişim
Tirozin	$1,0 \times 10^{-8}$	2,08
Epinefrin	$1,0 \times 10^{-9}$	2,36
Norepinefrin	$1,0 \times 10^{-9}$	2,75
Katekol	$1,0 \times 10^{-7}$	3,59
Glukoz	$5,0 \times 10^{-7}$	5,35
Ürik asit	$3,0 \times 10^{-8}$	Girişim etkisi yok
Askorbik asit	$1,0 \times 10^{-8}$	Girişim etkisi yok
L-Dopa	$1,0 \times 10^{-9}$	Girişim etkisi yok

4.11. Sentetik Kan Numunesindeki DA’nın Tayin Edilmesi

Biyosensörün gerçek örneklere uygulanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla kan serumunda bulunan, girişim yapabilecek türlerin Bölüm 4.10’da belirtilen derişimlerini içeren sentetik kan çözeltisi hazırlandı. Hücre içerisine ilave edilen sentetik çözeltideki DA derişimi $1,0 \times 10^{-7}$ M olacak şekilde ayarlandı. Biyosensör -0,15 V potansiyelde, pH 6,0 tampon çözeltisinde, 25 °C’de dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içerisine, 10 000 kat seyreltme olacak şekilde sentetik numuneden ilave edilerek akım değişimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Deney 3 kez tekrarlanarak akım farkı değerlerine karşılık gelen DA derişimi kalibrasyon grafiği (Şekil 4.10) kullanılarak $(1,0 \pm 0,27) \times 10^{-7}$ M olarak hesaplandı.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında dopamin tayini için tirozinaz temelli amperometrik bir biyosensör hazırlandı. Hazırlanan dopamin biyosensörü için şu sonuçlar elde edildi;

Biyosensörün hazırlanmasında kullanılan modifiye edici madde (CDs-CPTMS) biyosensörün dopamine duyarlılığını arttırdı.

Çalışma potansiyeli -0,15 V olarak belirlendi.

En ideal pH 6,0 olarak tespit edildi. En ideal sıcaklık 40 °C olarak tespit edildi, ancak oda sıcaklığında (25 °C) çalışıldı. En uygun cevap süresi 200 s olarak belirlendi.

Doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-8}$ M, $R^2=0,9689$ ve $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-7}$ M, $R^2=0,9611$ olarak bulundu. Bu sonuç biyosensörün geniş aralıkta ve düşük derişimlerde DA tayinine olanak sağladığını gösterir.

Tayin sınırı $1,0 \times 10^{-9}$ M olarak hesaplandı. Bu değer literatür ile karşılaştırıldığında oldukça küçük bir değerdir. Bu sonuç biyosensörün çok düşük dopamin derişimlerine karşı hassas olduğunu gösterir.

Biyosensörün $K_{m(göz)}$ değeri 0,623 nM, $I_{max(göz)}$ değeri ise 31,2 nA olarak hesaplandı. K_m değerinin literatürdeki K_m değerleri ile karşılaştırıldığında oldukça düşük olduğu görüldü. K_m değerinin düşük olması MCPE'deki CDs-CPTMS maddesi tirozinazın dopamine ilgisini arttırdığı sonucunu gösterir.

Tekrarlanabilirlik incelendiğinde biyosensörün 18 ölçüm sonunda başlangıç aktivitesinin %7,21'ini kaybettiği görüldü. Bağıl standart sapma %4,88 olarak hesaplandı. Elde edilen bu sonuç biyosensörün tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu gösterir.

Raf ömrü incelendiğinde biyosensörün 25 günün sonunda başlangıç aktivitesini %75 oranında koruduğu görüldü.

Dopamin tayinine diğer maddelerin yaptığı girişim etkisi tamamen yok edilemese de seyreltme ile yüksek oranda azaltılmıştır. Girişim yapan maddeler ve % girişim oranları; tirozin (%2,08), epinefrin (%2,36), norepinefrin (%2,75), katekol (%3,59), glukoz (%5,35) olarak hesaplandı.

Sonuç olarak dopamin tayini için hazırlanan biyosensör, uygun cevap süresine, geniş çalışma aralığına, düşük alt tayin sınırına, oldukça iyi bir tekrarlanabilirliğe ve raf ömrüne sahiptir. Ayrıca biyosensörün hazırlanması pratik ve maliyeti düşüktür.

Çizelge 5.1. Çalışma sonuçlarının literatür ile karşılaştırılması

Taşıyıcı	DA tayini metodu	İmmobilizasyon tekniği	Doğrusal aralık	Tayin sınırı	K_m	Opt. pH	Opt. sıcaklık	Raf ömrü	Referans
7,7,8,8-tetra siyano kinon dimetan (TCNQ)	Ampero metrik (FIA) +0,1 V	Birden fazla teknik	$2,0 \times 10^{-2}$ - $2,0 \times 10^{-4}$ M	150 μ M	$1,91 \times 10^{-2}$ M	7,8	-	60 gün	(Bezerra ve diğerleri, 2003)
Kobalt(II)-porfirin (CoP)	DPV	Çapraz Bağlama	2 - 30 μ M	0,43 μ M	92,68 μ M	8,0	-	15 gün	(Florescu ve David, 2017)
Çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT)	DPV (-0,2) - (+0,6) V	Tutuklama	15 - 865 μ M	0,6 μ M	0,5 mM	7,0	-	2 hafta sonunda aktivite kaybı olmamıştır	(Raghu ve diğerleri, 2014)
MWCNT-Nafion-Sisteamin	Ampero metrik +0,2 V	Birden fazla teknik	0,05 - 100 μ M	3 nM	-	7,5	35 °C	4 hafta sonunda aktivite % 95 kalmıştır	(Canbay ve Akyilmaz, 2014)
CaCO ₃ nano partikül-MWCNT elektrot	Ampero metrik -0,2 V	Tutuklama	0,015-30 μ M	15 nM	7 μ M	6,0	-	-	(Bujduveanu ve diğerleri, 2013)
PG-PPy-PPO modifiye camı karbon elektrot	Ampero metrik +0,5 V	Çapraz Bağlama	0,02-46 μ M	4 nM	101,32 μ M	5,5	45 °C	60 gün sonunda aktivite % 95 kalmıştır	(Ramu ve diğerleri, 2021)
CDs-CPTMS ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot	Ampero metrik -0,15 V	Çapraz Bağlama	0,001 - 0,01 μ M, 0,01 - 0,1 μ M	1 nM	0,623 μ M	6,0	40 °C	25 gün sonunda aktivite % 75 kalmıştır	Bu çalışma

KAYNAKLAR

- Akın, D. (2017). *Glukoza Duyarlı Grafen Esaslı Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 5-13.
- Alsharhan, H., and Ficicioglu, C. (2020). Disorders of Phenylalanine and Tyrosine Metabolism. *Translational Science of Rare Diseases*, 5(1-2), 3-58.
- Aynacı, E. (2015). *Asetilkolin Biyosensörünün Hazırlanması, Alzheimer Tedavisi İçin Yeni Asetilkolinesteraz İnhibitörlerinin Sentezi, Spektrofotometrik ve Elektrokimyasal Yöntemlerle İnhibisyon Özelliklerinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 8-11.
- Balıkçı, B. (2019). *Politiyofen/Karbon Nanotüp Kompozitine Dayalı Yeni Bir Dopamin Biyosensörü Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Burdur, 4-23.
- Bezerra, V. S., De Lima Filho, J. L., Montenegro, M. C. B. S. M., Araújo, A. N., and Da Silva, V. L. (2003). Flow-injection amperometric determination of dopamine in pharmaceuticals using a polyphenol oxidase biosensor obtained from soursop pulp. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33(5), 1025-1031.
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., and Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1-8.
- Bickerstaff, G. F. (1997). Immobilization of Enzymes and Cells. In G.F. Bickerstaff (Eds.), *Immobilization of Enzymes and Cells*. Totowa, NJ: Humana Press, 1-12.
- Biran, I., Yu, X., and Walt, D. R. (2008). Optrode-based fiber optic biosensors (bio-optrode). In F.S. Ligler and C.R. Taitt (Eds.), *Optical Biosensors*. Amsterdam: Elsevier, 3-82.
- Blanco, A., and Blanco, G. (2017). *Medical Biochemistry*. (First Edition). London: Academic Press, 163-164.
- Bodur, O. C. (2019). *Alzheimer Hastalığının Teşhisi İçin Asetilkolin Biyosensörünün Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 5-48.
- Brady, D., and Jordaan, J. (2009). Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology Letters*, 31(11), 1639-1650.
- Bujduveanu, M. R., Yao, W., LeGoff, A., Gorgy, K., Shan, D., Diao, G. W., Ungureanu, E. M., and Cosnier, S. (2013). Multiwalled Carbon Nanotube-CaCO₃ Nanoparticle Composites for the Construction of a Tyrosinase-Based Amperometric Dopamine Biosensor. *Electroanalysis*, 25(3), 613-619.
- Calay, Ö. (2010). *Tirozinaz Enziminin Bazı Tıbbi Bitkiler Tarafından İnhibisyonu*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 3-38.

- Campañ a, A. L., Florez, S. L., Noguera, M. J., Fuentes, O. P., Puentes, P. R., Cruz, J. C., and Osma, J. F. (2019). Enzyme-based electrochemical biosensors for microfluidic platforms to detect pharmaceutical residues in wastewater. *Biosensors*, 9(1), 41.
- Canbay, E., and Akyilmaz, E. (2014). Design of a multiwalled carbon nanotube-Nafion-cysteamine modified tyrosinase biosensor and its adaptation of dopamine determination. *Analytical Biochemistry*, 444(1), 8-15.
- Carvalho, G. M. J., Alves, T. L. M., and Freire, D. M. G. (2000). L-DOPA production by immobilized tyrosinase. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 84-86(1), 791-800.
- Chen, H., Zhang, Q., Dang, Y., and Shu, G. (2013). The effect of glutaraldehyde cross-linking on the enzyme activity of immobilized β -galactosidase on chitosan bead. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(7), 932-935.
- Chernecky, C. C., Berger B. J. (2013). Catecholamines - plasma. In C.C. Chernecky, B. J. Berger (Eds.), *Laboratory Tests and Diagnostic Procedures*. St. Louis, MO: Elsevier Saunders, 302-305.
- Chung, D. D. L. (2002). Review: Graphite. *Journal of Materials Science*, 37(8), 1475-1489.
- Claus, H., and Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(1), 3-14.
- Cosnier, S., Innocent, C., Allien, L., Poitry, S., and Tsacopoulos, M. (1997). An Electrochemical Method for Making Enzyme Microsensors. Application to the Detection of Dopamine and Glutamate. *Analytical Chemistry*, 69(5), 968-971.
-  ınar, E., Ercan, S., ve G le  i, N. (2017). Lewatit Partik l ne  reaz Enziminin İmmobilizasyonu. *Batman Üniversitesi Ya am Bilimleri Dergisi*, 7(2/2), 124-136.
- D'Souza, S. F. (2001). Immobilization and stabilization of biomaterials for biosensor applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 96(1-3), 225-238.
- Daniel, R. M., and Danson, M. J. (2013). Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding. *FEBS Letters*, 587(17), 2738-2743.
- Di Pietrantonio, F., Cannat , D., and Benetti, M. (2019). Biosensor technologies based on nanomaterials. In V. Dinca and M. P. Suchea (Eds.), *Functional Nanostructured Interfaces for Environmental and Biomedical Applications*. Amsterdam: Elsevier, 181-242.
- Dinakaran, T., and Chang, S.-C. (2016). A new nano-composite carbon ink for disposable dopamine biosensors. *Analytical Science and Technology*, 29(1), 35-42.
- Eed, J. (2012). Factors Affecting Enzyme Activity. *ESSAI*, 10(19), 48-51.
- Ensafi, A. A. (2019). An introduction to sensors and biosensors. In A. A. Ensafi (Eds.), *Electrochemical Biosensors*. Amsterdam: Elsevier, 1-10.

- Ercili-Cura, D., Huppertz, T., and Kelly, A. L. (2015). Enzymatic modification of dairy product texture. In J. Chen and A. Rosenthal (Eds.), *Modifying Food Texture: Novel Ingredients and Processing Techniques*. Cambridge: Woodhead Publishing, 71-97.
- Erdem, C. (2012). *Glukoz Tayini İçin Nikel Oksit Modifiye Karbon Pasta Elektrotların Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 28-34.
- Ermiş, N. (2019). *Moleküler Baskılanmış Sensörle Dopamin Tayini ve Hidrojel Kullanılarak Dopaminin Kontrollü Salınımının İncelenmesi*, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 4-27.
- Feng, Z., Adolfsson, K. H., Xu, Y., Fang, H., Hakkarainen, M., and Wu, M. (2021). Carbon dot/polymer nanocomposites: From green synthesis to energy, environmental and biomedical applications. *Sustainable Materials and Technologies*, 29, e00304.
- Florescu, M., and David, M. (2017). Tyrosinase-based biosensors for selective dopamine detection. *Sensors*, 17(6), 1314.
- Foley, P. B. (2019). Dopamine in psychiatry: a historical perspective. *Journal of Neural Transmission*, 126(4), 473-479.
- Fooladsaz, K., Negahdary, M., Rahimi, G., Habibi-Tamijani, A., Parsania, S., Akbari-dastjerdi, H., Sayad, A., Jamaledini, A., Salahi, F., and Asadi, A. (2012). Dopamine determination with a biosensor based on catalase and modified carbon paste electrode with zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Electrochemical Science*, 7(10), 9892-9908.
- Fröhlich, F. (2016). Parkinson's Disease. In F. Fröhlich (Eds.), *Network Neuroscience*. London: Academic Press, 291-296.
- Gottapu, R. D., and Dagli, C. H., (2018). Analysis of Parkinson's Disease Data. *Procedia Computer Science* 140, 334-41.
- Hiep, H., and Kim, M. (2017). An overview of techniques in enzyme immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6), 157-163.
- Hočevár, S. B., Švancara, I., Vytrás, K., and Ogorevc, B. (2005). Novel electrode for electrochemical stripping analysis based on carbon paste modified with bismuth powder. *Electrochimica Acta*, 51(4), 706-710.
- Huang, Q., Zhang, H., Hu, S., Li, F., Weng, W., Chen, J., Wang, Q., He, Y., Zhang, W., and Bao, X. (2014). A sensitive and reliable dopamine biosensor was developed based on the Au-carbon dots-chitosan composite film. *Biosensors and Bioelectronics*, 52, 277-280.
- Imam, H. T., Marr, P. C., and Marr, A. C. (2021). Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. *Green Chemistry*, 23(14), 4980-5005.

- Jaenicke, E., and Heinz, D. (2003). Tyrosinases from crustaceans form hexamers. *Biochem Journal*, 371(2), 515-523.
- Joshi, P., Joshi, H. C., Sanghi, S. K., and Kundu, S. (2010). Immobilization of monoamine oxidase on eggshell membrane and its application in designing an amperometric biosensor for dopamine. *Microchimica Acta*, 169(3), 383-388.
- Juárez Olguín, H., Calderón Guzmán, D., Hernández García, E., and Barragán Mejía, G. (2015). The role of dopamine and its dysfunction as a consequence of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-13.
- Kaufman, D. M., and Milstein, M. J. (2013). *Kaufman's Clinical Neurology for Psychiatrists*. (Seventh Edition) London: Elsevier, 501-525.
- Kaur, J., Choudhary, S., Chaudhari, R., Jayant, R. D., and Joshi, A. (2019). Enzyme-based biosensors. In K. Pal, H. B. Kraatz, A. Khasnobish, S. Bag, I. Banerjee and U. Kuruganti (Eds.), *Bioelectronics and Medical Devices: From Materials to Devices - Fabrication, Applications and Reliability*. Duxford: Woodhead Publishing, 211-240.
- Keleş, F. (1987). Gıdalarda Enzimatik Esmerleşme ve Kontrolü. *Doğa Dergisi*, 11(1), 105-121.
- Keskin, M., ve Arslan, F. (2020). Biyosensörler. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 1(1-2), 51-60.
- Koçak, H. (2020). *Bisfenol-A Tayini İçin Bir Biyosensör Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 18-37.
- Kulma, A., and Szopa, J. (2007). Catecholamines are active compounds in plants. *Plant Science*, 172(3), 433-440.
- Kurbanoglu, S., Erkmén, C., and Uslu, B. (2020). Trends in Analytical Chemistry Frontiers in electrochemical enzyme based biosensors for food and drug analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 124, 115809.
- Kwak, H., Shin, S., and Hyun, J. (2020). Colorimetric Assay of Tyrosinase Inhibition Using Melanocyte Laden Hydrogel Fabricated by Digital Light Processing Printing. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 84, 252-59.
- Lakard, S., Pavel, I. A., and Lakard, B. (2021). Electrochemical biosensing of dopamine neurotransmitter: A review. *Biosensors*, 11(6), 179.
- Litwack, G. (2018). *Human Biochemistry*. (First Edition). London: Academic Press, 100-101.
- Liu, H., He, P., Li, Z., Sun, C., Shi, L., Liu, Y., Zhu, G., and Li, J. (2005). An ionic liquid-type carbon paste electrode and its polyoxometalate-modified properties. *Electrochemistry Communications*, 7(12), 1357-1363.

- Liu, Q., Gao, T., Liu, W., Liu, Y., Zhao, Y., Liu, Y., Li, W., Ding, K., Ma, F., and Li, C. (2020). Functions of dopamine in plants: a review. *Plant Signaling and Behavior*, 15(12), 1827782.
- Lupetti, K. O., Ramos, L. A., Vieira, I. C., and Fatibello-Filho, O. (2005). A zucchini-peroxidase biosensor applied to dopamine determination. *Il Farmaco*, 60(2), 179-183.
- Meiser, J., Weindl, D., and Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), 1-18.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., and Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, 37(5), 790-802.
- Mohanty, S. P., and Koucias, E. (2006). Biosensors: A tutorial review. *IEEE Potentials*, 25(2), 35-40.
- Monteale, M. R., Seta, L. Della, Vastarella, W., and Pilloton, R. (2010). A disposable Laccase-Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis: B, Enzymatic*, 64(3-4), 189-194.
- Moon, J. M., Thapliyal, N., Hussain, K. K., Goyal, R. N., and Shim, Y. B. (2018). Conducting polymer-based electrochemical biosensors for neurotransmitters: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 102, 540-552.
- Naeimi, H., and Ansarian, Z. (2017). Immobilized polytriazole complexes of copper(I) onto graphene oxide as a recyclable nanocatalyst for synthesis of triazoles. *Applied Organometallic Chemistry*, 31(11), 1-11.
- Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., and Issaabadi, Z. (2019). Green Nanotechnology. In M. Nasrollahzadeh, S. M. Sajadi, M. Sajjadi, Z. Issaabadi and M. Atarod (Eds.), *Interface Science and Technology*. Amsterdam: Elsevier, 145-198
- Nawaz, A., Shafi, T., Khaliq, A., Mukhtar, H., and ul Haq, I. (2017). Tyrosinase: Sources, Structure and Applications. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 3(5), 135-141.
- Njagi, J., Chernov, M. M., Leiter, J. C., and Andreescu, S. (2010). Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Analytical Chemistry*, 82(3), 989-996.
- Opmeer, E. M., Kortekaas R., and Aleman, A. (2010). Depression and the Role of Genes Involved in Dopamine Metabolism and Signalling. *Progress in Neurobiology*, 92(2), 112-133.
- Ori, Z., Kiss, A., Ciucu, A. A., Mihailciuc, C., Stefanescu, C. D., Nagy, L., and Nagy, G. (2014). Sensitivity enhancement of a “bananatrode” biosensor for dopamine based on SECM studies inside its reaction layer. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 190, 149-156).

- Owusu-Ansah, Y.J. (1989). Polyphenoloxidase in wild rice (*Zizania palustris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(4), 901-904.
- Özçelik, D. (2005). *Mantardan (Agaricus bisporus) Tirozinaz Enziminin İzole Edilmesi ve Fenol Giderilmesinde Kullanılması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 4-30.
- Özyurt, M. (2014). *Glukoz Tayini İçin Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 8-14.
- Park, S. (2019). Improvement of biosensor accuracy using an interference index detection system to minimize the interference effects caused by icterus and hemolysis in blood samples. *Analyst*, 144(17), 5223-5231.
- Pérez, J. A. C., Sosa-Hernández, J. E., Hussain, S. M., Bilal, M., Parra-Saldivar, R., and Iqbal, H. M. N. (2019). Bioinspired biomaterials and enzyme-based biosensors for point-of-care applications with reference to cancer and bio-imaging. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 168-176.
- Pillaiyar, T., Namasivayam, V., Manickam, M., and Jung S-H. (2018). Inhibitors of Melanogenesis: An Updated Review. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(17), 7395-7418.
- Piovesan, J. V., Santana, E. R., and Spinelli, A. (2020). A carbon paste electrode improved with poly(ethylene glycol) for tannic acid surveillance in beer samples. *Food Chemistry*, 326, 127055.
- Radzicka, A., and Wolfenden, R. (1995). A proficient enzyme. *Science*, 267(5194), 90-93.
- Raghu, P., Reddy, T. M., Gopal, P., Reddaiah, K., and Sreedhar, N. Y. (2014). A novel horseradish peroxidase biosensor towards the detection of dopamine: A voltammetric study. *Enzyme and Microbial Technology*, 57, 8-15.
- Rahman, S. F., Min, K., Park, S. H., Park, J. H., Yoo, J. C., and Park, D. H. (2016). Selective determination of dopamine with an amperometric biosensor using electrochemically pretreated and activated carbon/tyrosinase/Nafion®-modified glassy carbon electrode. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21(5), 627-633.
- Ramu, P., Vimal, S. P., Suresh, P., Saravanakumar, U., Sethuraman, V., and Anandhavelu, S. (2021). Electrochemically Deposited Porous Graphene-Polypyrrole-Polyphenol Oxidase for Dopamine Biosensor. *Electroanalysis*, 33(3), 774-780.
- Roychoudhury, A., Basu, S., and Jha, S. K. (2016). Dopamine biosensor based on surface functionalized nanostructured nickel oxide platform. *Biosensors and Bioelectronics*, 84, 72-81.
- Sagbas, S., and Sahiner, N. (2018). Carbon dots: Preparation, properties, and application. In A. Khan, M. Jawaid, Inamuddin and A. M. Asiri (Eds.), *Nanocarbon and its Composites: Preparation, Properties and Applications*. Duxford: Woodhead Publishing, 651-676.

- Sassolas, A., Blum, L. J., and Leca-bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489-511.
- Sethuraman, V., Sridhar, T. M., and Sasikumar, R. (2021). Development of an electrochemical biosensor for determination of dopamine by gold modified poly(thiophene-3-boronic acid)-polyphenol oxidase modified electrode. *Materials Letters*, 302, 130387
- Sharma, A., Thatai, K. S., Kuthiala, T., Singh, G., and Arya, S. K. (2021). Employment of polysaccharides in enzyme immobilization. *Reactive and Functional Polymers*, 167, 105005.
- Sharma, S.-Y. S., Vinay K. Sharma, and Niti. (2003). Mushroom Tyrosinase : Recent Prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2837-2853.
- Shen, J., Zhu, Y., Yang, X., and Li, C. (2012). Graphene quantum dots: Emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices. *Chemical Communications*, 48(31), 3686-3699.
- Shin, J. W., Yoon, J., Shin, M., and Choi, J. W. (2019). Electrochemical Dopamine Biosensor Composed of Silver Encapsulated MoS₂ Hybrid Nanoparticle. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 24(1), 135-144.
- Van Spronsen, M., and Hoogenraad, C. C. (2010). Synapse Pathology in Psychiatric and Neurologic Disease. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 10(3), 207-214.
- Tajik, S., Beitollahi, H., Nejad, F. G., Safaei, M., Zhang, K., Van Le, Q., Varma, R. S., Jang, H. W., and Shokouhimehr, M. (2020). Developments and applications of nanomaterial-based carbon paste electrodes. *RSC Advances*, 10(36), 21561-21581.
- Tanzi, M. C., Farè, S., and Candiani, G. (2019). *Foundations of Biomaterials Engineering*. (First Edition). London: Academic Press, 55.
- Tao, Z., Dong, B., Teng, Z., and Zhao, Y. (2020). The Classification of Enzymes by Deep Learning. *IEEE Access*, 8, 89802-89811.
- Tembe, S., Karve, M., Inamdar, S., Haram, S., Melo, J., and D'Souza, S. F. (2005). Development of electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized in composite biopolymeric film. *Analytical Biochemistry*, 349(1), 72-77.
- Terry, L. A., White, S. F., and Tigwell, L. J. (2005). The application of biosensors to fresh produce and the wider food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1309-1316.
- Tuerhong, M., XU, Y., and YIN, X. B. (2017). Review on Carbon Dots and Their Applications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 45(1), 139-150.
- Turhan, K. N. (1994). *Poli (Phe-Lys) İle Modifiye Edilen Polistiren Yüzeylerde İnvertazın İmmobilizasyonu ve Kinetiğinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2-21.

- Uçar, T. (1984). *Trigliseridlerin Candida Cyldracea Lipazı ile Hidrolizinde Yüzey ve Çözücü Etkileri - Arayüzey Kinetiği*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 4-24.
- Ustabaş, S. 2010. *Glukoz Tayini İçin Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 42-43.
- Vandenbergh, L. P. de S., Karp, S. G., Binder Pagnoncelli, M. G., von Linsingen Tavares, M., Libardi Junior, N., Valladares Diestra, K., Viesser, J. A., and Soccol, C. R. (2020). Classification of enzymes and catalytic properties. In S. P. Singh, A. Pandey, R. R. Singhanian, C. Larroche and Z. Li (Eds.), *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Catalysis and Technologies*. Amsterdam: Elsevier, 11-30.
- Wang, Z., and Dai, Z. (2015). Carbon nanomaterial-based electrochemical biosensors: An overview. *Nanoscale*, 7(15), 6420-6431.
- Wen, G., Zhang, Y., Shuang, S., Dong, C., and Choi, M. M. F. (2007). Application of a biosensor for monitoring of ethanol. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(1), 121-129.
- Wightman, R. M., May, L. J., and Michael, A. C. (1988). Detection of Dopamine Dynamic in the Brain. *Analytical Chemistry*, 60(13), 769A-793A.
- Winner, B. M., Zhang, H., Farthing, M. M., Karchalla, L. M., Lookingland, K. J., and Goudreau, J. L. (2017). Metabolism of dopamine in nucleus accumbens astrocytes is preserved in aged mice exposed to MPTP. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 410.
- Xiang, L., Lin, Y., Yu, P., Su, L., and Mao, L. (2007). Laccase-catalyzed oxidation and intramolecular cyclization of dopamine: A new method for selective determination of dopamine with laccase/carbon nanotube-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta*, 52(12), 4144-4152.
- Yıldız, S. (2021). *Mürdüm Eriğinden (Prunus insititia) Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2-15.
- Yılmazoğlu, B. (2017). *Giresun Yöresinde Yetişen Yenilebilir Kanlıca Mantarından (Lactarius Salmonicolor) Tirozinaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Giresun, 11-22.
- Zaib, M., Athar, M. M., Saeed, A., and Farooq, U. (2015). Electrochemical determination of inorganic mercury and arsenic-A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 895-908.
- Zaidi, S. A. (2018). Development of molecular imprinted polymers based strategies for the determination of Dopamine. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 265, 488-497.
- Zhou, Y. L., Tian, R. H., and Zhi, J. F. (2007). Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized on a boron-doped diamond electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(6), 822-828.



GAZİ GELECEKTİR..