

**BALIK ETİ TAZELİĞİNİN TESPİTİ İÇİN KSANTİN OKSİDAZ
ENZİMİNİN POLİPİROL-POLİVİNİLSÜLFONAT FİLME
İMMOBİLİZASYONU İLE AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR
HAZIRLANMASI**

Nezaket DOLMACI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2009
ANKARA**

Nezaket DOLMACI tarafından hazırlanan BALIK ETİ TAZELİĞİNİN TESPİTİ
İÇİN KSANTİN OKSİDAZ ENZİMİNİN POLİPİROL-POLİVİNİLSÜLFONAT
FİLME İMMOBİLİZASYONU İLE AMPEROMETRİK BİR BİYOSENSÖR
HAZIRLANMASI adlı bu tezin yüksek lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

.....

Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans
tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

.....

Kimya A. D., Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

.....

Kimya A. D., Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Selma ATEŞ

.....

Kimya A. D., Gazi Üniversitesi

Tarih:/...../.....

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini
onamıştır.

Prof. Dr. Nail ÜNSAL

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Nezaket DOLMACI

**BALIK ETİ TAZELİĞİNİN TESPİTİ İÇİN KSANTİN OKSİDAZ
ENZİMİNİN POLİPİROL-POLİVİNİLSÜLFONAT FİLME
İMMOBİLİZASYONU İLE AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR
HAZIRLANMASI
(Yüksek Lisans Tezi)**

Nezaket DOLMACI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Haziran 2009**

ÖZET

Bu çalışmada, ksantin ve hipoksantin tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Ksantin oksidaz, pirol ve polivinilsülfonat ile birlikte platin elektrot yüzeyine immobilize edildi. Ksantin ve hipoksantin tayini, enzim yüzeyindeki enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ürik asidin +0,30 V' da yükseltgenmesine dayanılarak yapıldı. Ksantin ve hipoksantin biyosensörünün cevabına pH' nın, sıcaklığın ve substrat derişiminin etkisi incelendi. Enzim elektrodun hipoksantin için doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-3}$ M, tayin sınırı $1,0 \times 10^{-7}$ M olarak tespit edildi. İmmobilize edilen ksantin oksidazın K_M gözlenen ve V_{MAX} gözlenen değerleri sırasıyla 0,0154 mM ve 1,203 $\mu A/dakika$ olarak bulundu. Enzim elektrodun en iyi çalışma pH' sı 7,75 ve sıcaklığı 25 °C olarak belirlendi. 30 gün sonundaki amperometrik cevabının başlangıç değerinin % 49' u olduğu görüldü. Balık numunelerinde, balık eti tazeliğini yitirdikçe hipoksantin miktarının arttığı gösterildi.

Bilim Kodu : 201.1.020

**Anahtar Kelimeler : Ksantin, hipoksantin, ksantin oksidaz, biyosensör,
polipirol-polivinilsülfonat, balık eti tazeliği**

Sayfa Adedi : 88

Tez Yöneticisi : Prof.Dr. Ahmet YAŞAR

**AN AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR FISH FRESHNESS DETECTION
FROM XANTHINE OXIDASE IMMOBILIZED IN POLYPYRROLE-
POLYVINYLSULPHONATE FILM
(M.Sc. Thesis)**

Nezaket DOLMACI

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
June 2009**

ABSTRACT

In this study, new amperometric biosensor for determination of xanthine was developed. Xanthine oxidase with pyrrole and polyvinylsulphonate has been immobilized by entrapment method on the surface of platinum electrode. Determination of xanthine-hypoxanthine was performed by means of oxidation of uric acid liberated during the enzyme reaction on the surface of the enzyme electrode at +0.30V (SCE). The effects of pH, substrate concentration and temperature on the response of the xanthine-hypoxanthine biosensor were investigated. The linear working range of enzyme electrode was 1.0×10^{-7} – 1.0×10^{-3} M of hypoxanthine concentration, the detection limit was 1.0×10^{-7} M. The apparent K_M and V_{max} of immobilized xanthine oxidase were found to be 0.0154 mM and 1.203 μA / min, respectively. The response current of the biosensor drops to 49% of its initial value after 30 days. The sensor was applied to the determination of hypoxanthine in fish meat and hypoxanthine amount was found to be increased over days of storage.

Science Code : 201.1.020

**Key Words : Xanthine, hypoxanthine, biosensor, xanthine oxidase,
polypyrrole-polyvinylsulphonate, fish freshness**

Page Number : 88

Adviser : Prof. Dr. Ahmet Yaşar

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren hocam Prof. Dr. Ahmet YAŞAR' a, Yrd. Doç. Dr. Fatma ARSLAN' a, Araş. Gör. Dr. Servet ÇETE' ye laboratuvarındaki cihazlarını kullanmama müsaade eden sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Halit ARSLAN' a ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan başta Zeynep Alev PINARBAŞI arkadaşım olmak üzere aileme ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Enzimler	3
2.1.1. Enzimlerin yapısı ve özellikleri	4
2.1.2. Enzimlerin görevleri	5
2.1.3. Reaksiyon hızını etkileyen faktörler	6
2.2. Ksantin Oksidaz Enziminin Özellikleri ve Ksantin-Hipoksantin Tayininin Önemi	7
2.3. İmmobilize Enzimler	11
2.3.1. İmmobilizasyonun enzim aktifliğine etkisi	13
2.4. Biyosensörler	17
2.4.1. Biyosensörlerin yapısı ve fonksiyonu	19
2.4.2. Biyobileşenler	20
2.4.3. Dönüştürücüler (Transdüserler)	20
2.4.4. Biyosensörlerin uygulama alanları	20

Sayfa

2.5. İletken Polimerler	21
2.5.1. İletken polimerlerin elektrokimyasal yöntemle üretilmesi	22
2.5.2. İletken polimerlerde enzim immobilizasyonu.....	23
2.6. Biyobileşen İmmobilizasyonu.....	25
2.6.1. Kovalent bağlanma	26
2.6.2. İyonik bağlanma.....	27
2.6.3. Adsorpsiyon	27
2.6.4. Tutuklama (Hapsetme).....	27
2.6.5. Çarpraz bağlama yöntemi	27
2.7. Enzim Sensörleri	29
2.7.1. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması	30
2.8. Kaynak Araştırması.....	31
3. DENEYSEL KISIM.....	44
3.1. Cihazlar ve Malzemeler	44
3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı	44
3.1.2. Hücre ve elektrotlar.....	44
3.1.3. pH metre.....	45
3.1.4. Su banyosu	45
3.1.5. Mikro pipet.....	45
3.1.6. Argon gazı.....	45
3.1.7. Saf su.....	45
3.1.8. SEM analizi.....	45
3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri	46

Sayfa

3.2.1. Kullanılan çözeltiler	46
3.3. Platin Yüzeye Polipirrol-Polivinilsülfonat (PPy-PVS) Kaplanması	47
3.4. Platin/polipirrol-polivinilsülfonat (Pt/PPy-PVS) Elektrodunun Hidrojen Peroksida Duyarlılığının Belirlenmesi	48
3.5. Platin/polipirrol-polivinilsülfonat (Pt/PPy-PVS) Elektrodunun Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi	49
3.6. Platin/ polipirrol-polivinilsülfonat Elektrodunda Girişim Etkisinin Çalışılması.....	50
3.6.1. Pt/PPy-PVS elektrodunun + 0,3 V da ürik aside duyarlılığı.....	50
3.6.2. Pt/PPy-PVS elektrodunun + 0,3 V da ürik asid girişim etkisinin İncelenmesi	50
3.6.3. Pt/PPy-PVS elektrodunun + 0,3 V da ksantin girişim etkisinin İncelenmesi	51
3.7. Enzim Elektrodunun Hazırlanması	51
3.8. Enzim Elektrodun Ksantine Duyarlılığının Belirlenmesi	52
3.9. Enzim Elektroda Ürik Asidin Girişim Etkisinin İncelenmesi.....	52
3.10. Metilen Mavisinin İndirgenme Potansiyelinin Belirlenmesi	53
3.11. Pt/PPy-PVS Elektrodunun Metilen Mavili ve Oksijensiz Ortamda Ksantin Derişimine Duyarlılığı	53
3.12. Enzim Elektrodun Metilen Mavili ve Oksijensiz Ortamda Ksantine Duyarlılığı	54
3.13. Enzim Elektrodunun Metilen Mavili ve Oksijensiz Ortamda Hipoksantine Duyarlılığı.....	55
3.14. Enzim Elektrodunun En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi	55
3.14.1. pH' nın etkisi.....	55
3.14.2. Sıcaklığın etkisi.....	55

Sayfa

3.14.3. Substrat derişiminin etkisi	56
3.14.4. Enzim elektrodunun tekrar kullanabilirliğinin belirlenmesi	56
3.14.5. Enzim elektrodunun raf ömrünün belirlenmesi.....	56
3.15. Balık Eti Numunesinde Hipoksantin Tayini	56
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	58
4.1. Polipiról- polivinilsülfonat Kaplanması	60
4.2. Platin/polipiról-polivinilsülfonat Elektrodun Hidrojen Perokside duyarlılığı	61
4.3. Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi	62
4.4. Platin/ polipiról- polivinilsülfonat (Pt/PPy-PVS)Elektrodunda Girişim Etkisi	63
4.4.1. Platin/polipiról-polivinilsülfonat elektroduna + 0,3 V da ürik aside duyarlılığı.....	63
4.4.2. Platin/polipiról-polivinilsülfonat elektroduna + 0,3 V da ürik asit girişim etkisi.....	64
4.4.3. Platin/polipiról-polivinilsülfonat elektroduna + 0,3 V da ksantin girişim etkisi.....	65
4.5. Enzim Biyosensörünün Hazırlanması	65
4.6. Enzim Elektrodun Ksantine Duyarlılığının Belirlenmesi	67
4.7. Enzim Elektroda Ürik Asidin Girişim Etkisinin İncelenmesi.....	67
4.8. Metilen Mavisinin İndirgenme Potansiyelinin Belirlenmesi	68
4.9. Platin/polipiról- polivinilsülfonat Elektrodunun Metilen Mavili ve oksijensiz Ortamda Ksantin Derişimine Duyarlılığı	68
4.10. Enzim Elektrodun Metilen Mavili ve Oksijensiz Ortamda Ksantine ve Hipoksantine Duyarlılığı	69
4.11. Enzim Elektrodun En İyi Çalışma Koşulları.....	71

	Sayfa
4.11.1. pH etkisi	71
4.11.2. Sıcaklık etkisi	72
4.11.3. Substrat derişimi etkisi	73
4.11.4. Enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliğı	75
4.11.5. Raf ömrünün belirlenmesi	76
4.12. Balık Eti Numunesinde Hipoksantin Tayini	78
4.13. SONUÇ	81
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	88

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar.....	12
Çizelge 2.2. İletken polimerlerin kullanıldığı glikoz biyosensörleri.....	24
Çizelge 2.3. İletken polimerlerin kullanıldığı biyosensörler.....	24
Çizelge 2.4. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması.....	26
Çizelge 2.5. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması	31
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar.....	46
Çizelge 4.1. Hazırlanan biyosensörün özellikleri ve optimum koşulları	77

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bir substrat molekülünü bağlayan bir aktif bölgesi enzimin şematik olarak gösterilmesi	4
Şekil 2.2. Reaksiyonlarda enerji profili	5
Şekil 2.3. Enzim reaksiyon hızlarının sıcaklık profili.....	6
Şekil 2.4. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi	7
Şekil 2.5. Ksantin ksantin oksidaz enzimi ile ürik aside yükseltgenme mekanizması.....	8
Şekil 2.6. Pürin nükleotitlerinin ürik aside yıkımı	9
Şekil 2.7. Hipoksantin ürik aside dönüşümü.....	10
Şekil 2.8. Metilen mavisi varlığında hipoksantin ürik aside dönüşümü	10
Şekil 2.9. İmmobilizasyonun enzim aktivitesine etkisi.....	13
Şekil 2.10. Enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi	14
Şekil 2.11. Aktivasyon enerjisinin bulunması.....	15
Şekil 2.12. Yüklü taşıyıcıların mikro çevresinde oluşan iyonik tabakanın şematik gösterimi (a): Polianyonik taşıyıcı, (b): Polikasyonik taşıyıcı.....	15
Şekil 2.13. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi	17
Şekil 2.14. Biyosensörlerin çalışma prensibi	19
Şekil 2.15. Direkt bağlama ile enzim immobilizasyonu	29
Şekil 2.16. Bir enzim sensörünün genel gösterimi.....	30
Şekil 3.1. Kaplama ve ölçme yapmada kullanılan hücre sistemi.....	44
Şekil 4.1. Ksantin ürik aside yükseltgenmesi sırasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron aktarımı	59
Şekil 4.2. Pt/PPy-PVS elektrodu kullanılarak hidrojen peroksit derişimi ile akım arasındaki ilişkinin incelenmesi	62

Şekil	Sayfa
Şekil 4.3. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi için hidrojen peroksit derişimine karşı akım grafiğı	63
Şekil 4.4. Pt/PPy-PVS elektrodu kullanılarak ürik asit derişimi ile akım arasındaki ilişkinin incelenmesi	64
Şekil 4.5. Pt/PPy-PVS elektrodu kullanılarak ksantin derişimi ile akım arasındaki ilişkinin incelenmesi	65
Şekil 4.6. Enzim sensörünün ksantine duyarlılığının incelenmesi.....	67
Şekil 4.7. Pt/PPy-PVS elektrodunun oksijensiz ortam metilen mavisi varlığında ksantine duyarlılığı	69
Şekil 4.8. Enzim elektrodunun oksijensiz ortam metilen mavisi varlığında hipoksantine duyarlılığı	70
Şekil 4.9. Enzim elektrodunun oksijensiz ortam metilen mavisi varlığında ksantine duyarlılığı.....	70
Şekil 4.10. Biyosensörün hipoksantine duyarlılığına pH' nın etkisi	71
Şekil 4.11. Biyosensörün hipoksantine duyarlılığına sıcaklığın etkisi	72
Şekil 4.12. Biyosensörün amperometrik cevabına hipoksantin derişiminin etkisi.....	73
Şekil 4.13. Hipoksantin biyosensörü için kalibrasyon grafiğı.....	74
Şekil 4.14. Biyosensörün hipoksantine duyarlılığını gösteren Lineweaver – Burk grafiğı.....	75
Şekil 4.15. Enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliğinin 20 ölçüm sonucuna göre incelenmesi	76
Şekil 4.16. Biyosensörün raf ömrü	76
Şekil 4.17. Standart ekleme yöntemi ile günlük balık eti süzüntüsünde tayin edilen hipoksantin miktarı	79
Şekil 4.18. Standart ekleme yöntemi ile iki günlük balık eti süzüntüsünde tayin edilen hipoksantin miktarı.....	79
Şekil 4.19. Standart ekleme yöntemi ile beş günlük balık eti süzüntüsünde tayin edilen hipoksantin miktar	80

Şekil**Sayfa**

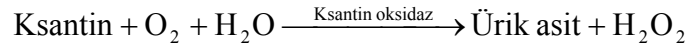
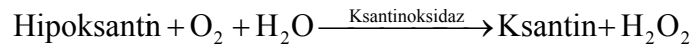
Şekil 4.20. Standart ekleme yöntemi ile yedi günlük balık eti süzüntüsünde tayin edilen hipoksantin miktarı.....	80
---	----

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Polipirol-polivinilsülfonat filmin SEM ile alınmış fotoğraf	61
Resim 4.2. Enzim elektrodun SEM ile alınmış fotoğrafı	66

1. GİRİŞ

Ksantin oksidaz enzimi, pürin metabolizmasında rolü olan önemli bir enzimdir. Enzimin aktif merkezinde flavin adenin dinükleotit (FAD), molibden, demir ve sülfür grupları bulunur [1–4]. Ksantin oksidaz enzimi daha çok karaciğerde olmak üzere, ince barsak mukozası, diğer dokularda ve sütte bulunur. Ksantin oksidaz enzimi dokularda hipoksantini ksantine, ksantini ise ürik aside dönüştürür.



Ksantin oksidaz enziminin substratları olan ksantin ve hipoksantin dokulardaki miktarı çeşitli hastalık hallerinde değişim göstermektedir. Örneğin, kalp krizi geçiren hastalarda ksantin miktarının artmasıyla doku harabiyeti olmaktadır [3]. Hipoksantin miktarı ise, balık etinin tazeliği hakkında fikir vermektedir [5]. Balık eti tazeliğini yitirmeye başladığı zaman yapısında bulunan pürin nükleotitlerinin yıkılması sonucu hipoksantin oluşmaktadır ve hipoksantin tazeliğini yitirmiş balık etinde zamanla artmaya başlamakta ve balıkta acı bir tat oluşturmaktadır [6]. Ksantin ve hipoksantin tıbbi ve biyolojik açıdan önemli olduğundan, tayininin kısa sürede ve ekonomik bir şekilde yapılabilmesi için ksantin oksidaz enzimi ile bir biyosensör hazırlanması düşünülmüştür. Bunun için ksantin oksidaz enzimi, bakırheksakloroplatinata [1], heparine [7] ve ferrisiyanür içeren kobalt fitalosiyaninden oluşan çift medyatörlü sisteme [8] immobilize edilerek ksantine duyarlı biyosensörler hazırlanmıştır. Ayrıca enzimin poli-(8-pirol-1-laktobionamidooktan) 'a kovalent bağlanmasıyla [9] ve bir iletken redoks polimeri olan poli- (merkaptop-benzokinon)'a hapsedilmesiyle [2] de ksantin biyosensörleri hazırlanmıştır.

Bizim çalışmamızda ise, ksantine ve hipoksantine duyarlı yeni bir amperometrik biyosensör hazırlandı. Ksantin ve hipoksantin tayini, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ürik asidin +0,30 V' da yükseltgenmesi esasına dayanılarak yapıldı. Bu amaçla platin elektrot üzerinde, polipirol-polivinilsülfonat (PPy-PVS)

polimerlerinden oluşan iletken bir film hazırlandı ve bu elektrodun hidrojen peroksida duyarlılığı incelendi. Bu inceleme sırasında hidrojen peroksitle birlikte ürik asidin de aynı potansiyelde yükseltgendiği görüldü. Bu girişimin ortadan kaldırılması için oksijensiz ortamda ksantin oksidazdan gelen elektronların alıcısı olarak metilen mavisinin görev yapmasına ve hidrojen peroksit oluşumunun engellenmesine karar verildi [10]. Bunun sonucunda + 0,30 V da tek başına ürik asit oluştu ve yükseltgendi. Ardından ksantin oksidaz polipirol-polivinilsülfonat filme hapsetme yöntemiyle immobilize edildi. Enzim elektrodun ksantin ve hipoksantine duyarlılığı ve immobilize edilen enzimin özellikleri incelendi. Biyosensör için en iyi çalışma koşulları araştırıldı ve ksantin ve hipoksantin biyosensörünün performansını etkileyen faktörler incelendi. Son olarak balık eti numunelerinde tazelik faktörüne bağlı olarak hipoksantin miktarının nasıl değiştiği incelendi.

Bu çalışmada, Fatma Arslan tarafından 2004 yılında hazırlanan ksantin tayini için polipirol filme ksantin oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması doktora tezinden yararlanıldı [11]. Ancak bu çalışma, Pt/PPy-PVS elektrodunun hazırlama koşullarının farklı olması, substrat olarak hipoksantin kullanılması, en önemlisi oksijensiz ortamda metilen mavisi kullanılarak ürik asit duyarlılığı ölçülmesi sonucu ksantin veya hipoksantin derişimine ulaşılması ve balık eti numunesinde enzim elektrodun kullanılması yönünden yararlanılan tez ve diğer çalışmalardan farklıdır ve orijinaldir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

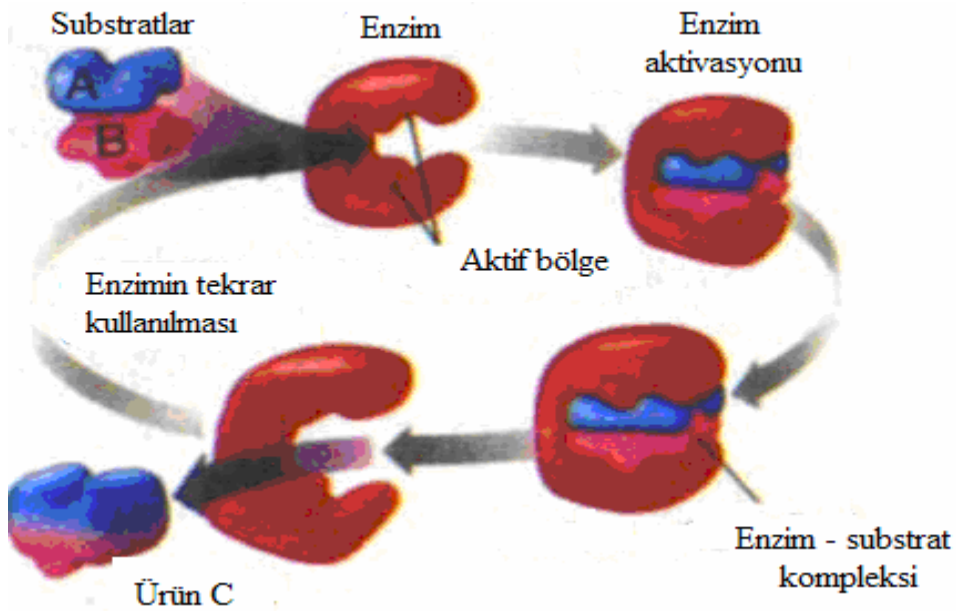
Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan protein yapısındaki biyokimyasal katalizörlerdir. Enzimler, gerekli koşulların sağlanması durumunda doğal ortamlarının dışında pek çok alanda kullanılabilirler. Bu nedenle enzimlerin yapı ve fonksiyonlarını, kataliz mekanizmalarını ve enzimlerin katalizlediği her türlü metabolik ve biyokimyasal reaksiyonların neden ve nasıl gerçekleştiğini inceleyen enzimoloji bilim dalı, başta biyokimya ve moleküler biyoloji olmak üzere mikrobiyoloji, genetik, tıp, biyoteknoloji, farmakoloji ve toksikoloji gibi bilim dalları ve çeşitli endüstriyel alanlar için büyük önem taşımaktadır.

Enzimoloji alanındaki bilgi birikimi ve enzim- substrat, enzim- inhibitör ilişkilerinin ve enzimatik mekanizmaların açıklanabilmesi isteği aktif merkez yapı aydınlatma çalışmalarını teşvik etmiştir. Bu teşvik sonucunda, seçimli inhibitörlerin kullanımıyla bu konuda önemli gelişmeler kaydedilmiştir ve enzim molekülünün üç boyutlu konformasyonu X- ışınları kristalografisi yardımıyla tam anlamıyla açıklığa kavuşturulmuştur [12].

İnsanlar binlerce yıl öncesinden bu yana alkol fermantasyonu, bira ve ekmek yapımı gibi ilk biyoteknolojik çalışmalarla aslında enzimlerden yararlanmışlardır. Buna karşılık enzimler hakkında bilimsel denebilecek araştırma ve bulgular ancak geçtiğimiz yüzyılda görülmeye başlanmıştır. 1783 yılında Spallanzani' nin atmaca mide suyunun eti çözebileceğini bulması, 1811 yılında Kirrchoff' un buğday nişastasının zamanla dekstrin ve diğer bileşiklere dönüştüğünü belirlemesi enzimoloji konusundaki ilk çalışmalar olarak gösterilebilir [12].

2.1.1. Enzimlerin yapısı ve özellikleri

Enzimler kimyasal bakımdan protein yapısında moleküllerdir. Enzimin protein yapısının yanında enzime aktiflik kazandıran gruplar vardır. Enzimin protein kısmına apoenzim, protein olmayan parçasına kofaktör denir. Apoenzim ve kofaktörün oluşturduğu aktif yapıya da haloenzim denir [4]. Kofaktör arasında metal iyonları ve organik yapıda olan koenzimler yer alır. Sıklıkla karşılaşılan metal iyonları Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , koenzimler ise NAD^+ , FAD ’ dır. Enzimler sadece bir substrata veya aynı fonksiyonlu grubu olan substrat serisine karşı etkindir. Enzim reaksiyonlarında yan ürünler meydana gelmez. Enzim molekülü büyük olmasına karşın, substrat enzim molekülünün her yerine değil aktif merkez denilen özel bir yerine bağlanır ve biyokimyasal reaksiyonlar burada meydana gelir. Aktif merkez substrata uyumlu olan üç- boyutlu bir yüzey oluşturan aminoasit yan zincirleri içerir ve aktif merkez substratı bağlayarak bir enzim- substrat kompleksi meydana getirir, ardından oluşan kompleks ürüne dönüştükten sonra enzim üründen ayrılır(Şekil 2.1).

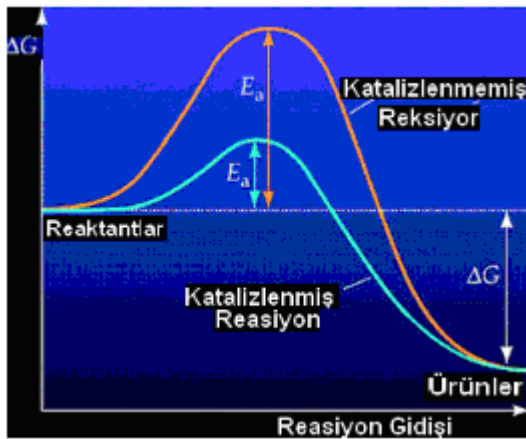


Şekil 2.1. Bir substrat molekülünü bağlayan bir aktif bölge enziminin şematik olarak gösterilmesi

Enzimle katalizlenen reaksiyonların hızı kimyasal olanlara göre $10^3 - 10^8$ kere daha fazladır. Tipik olarak, her enzim molekülü saniyede 100- 1000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir. Enzim aktifliği düzenlenebilir. Yani, enzimler ürün oluşum hızı ve hücrenin ihtiyacını karşılayacak şekilde aktive ve inhibe edilebilirler [13].

2.1.2. Enzimlerin görevi

Enzimler ilgili reaksiyonları ılıman koşullarda çok hızlı ve spesifik bir biçimde katalizyebilmektedirler. Enzim reaksiyonlarında substrat ürüne dönüşürken enzim-substrat kompleksi üzerinden geçtiği kabul edilir. Aktif merkezin substrata çok uygun geometride olması uygun yön ve açıda bulunması, enzimlerin substrat kompleksinin oluşmasını çok kolaylaştırır ki; etki reaksiyon serbest enerji (ΔG) değişiminin yaklaşık 10 kat küçülmesine yani reaksiyon hızlarının yüz milyon kat artmasına yardım eder (Şekil 2.2). Bundan başka aktif komplekste bir gerginlik meydana gelir ki, ürüne dönüşürken bu gerginliğin giderilmesinde reaksiyon hızının artmasına katkısı olur [14].



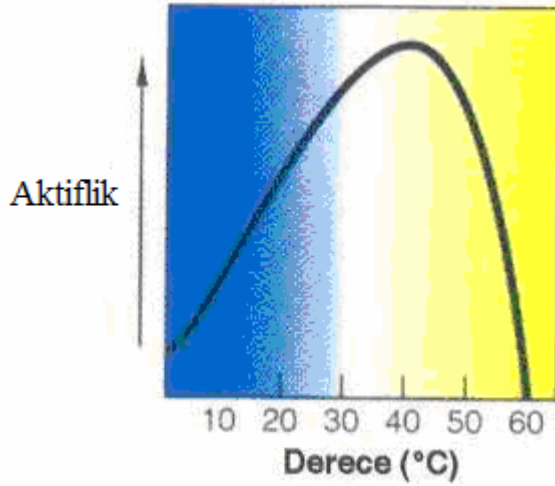
Şekil 2.2. Reaksiyonlarda enerji profili

Enzimler konusundaki tüm ayrıntılı bilgiler enzimlerin çeşitli pratik uygulamalarda da kullanımlarını gündeme getirmiştir. Enzimlerden başlıca endüstriyel, tıbbi, bilimsel ve analitik amaçlı olmak üzere dört farklı alanda yararlanılmaktadır [12].

2.1.3. Reaksiyon hızını etkileyen faktörler

A-Sıcaklık

Sıcaklık moleküllerin hareketini artırdığından tüm kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonların da hızını artırır. Enzimler protein yapısında olduklarından belirli bir sıcaklıktan sonra denatüre olmaya başlarlar. Bu önce enzim molekülünün tersiyer yapısının, sıcaklık artıkça sekonder yapısının bozulması ve enzimin aktif merkezi etkilenerek reaksiyon hızının keskin düşmesi demektir (Şekil 2.3) [14].



Şekil 2.3. Enzim reaksiyon hızlarının sıcaklık profili

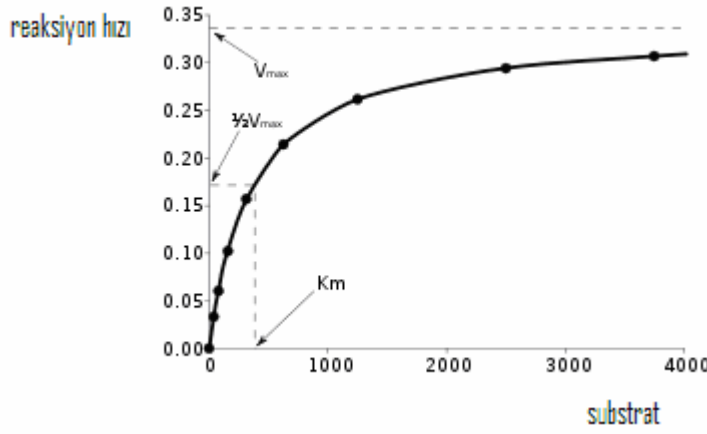
B- pH

Enzim substrat ve koenzim moleküllerinde asitli ve bazlı gruplar vardır. Enzim-substrat kompleksinin en kararlı bir biçimde oluşması, yani hızının maksimum olması için bu grupların belirli bir iyonlaşma durumunda olması gereklidir. Bunun dışındaki iyonlaşmalarda enzim-substrat kompleksi zayıflar ve reaksiyon hızı düşer. Bu, optimum bir pH' da reaksiyon hızının en yüksek olması demektir. pH- hız grafiği çan eğrisi şeklindedir. Her enzimin pH 3 ile 8 arasında olan optimum bir pH' ı vardır. Çok asitli ve bazlı ortamlarda enzim molekülü denatüre olacağından, reaksiyon hızı tersinmez olarak sıfıra düşer. Enzimlerle yapılan in vitro deneylerde

reaksiyon ortamının tampon çözeltisini hazırlamak için öncelikle optimum pH' sının bilinmesi ve tayin edilmesi gereklidir [14].

C-Substrat derişimi

Enzimatik bir reaksiyon hızı substrat derişimi artıkça artar ve belirli bir substrat derişiminde hızı maksimum olur. Bu noktada enzim substrata tamamen doymuştur, bu noktadan sonra hız değişmez (şekil 2.4).

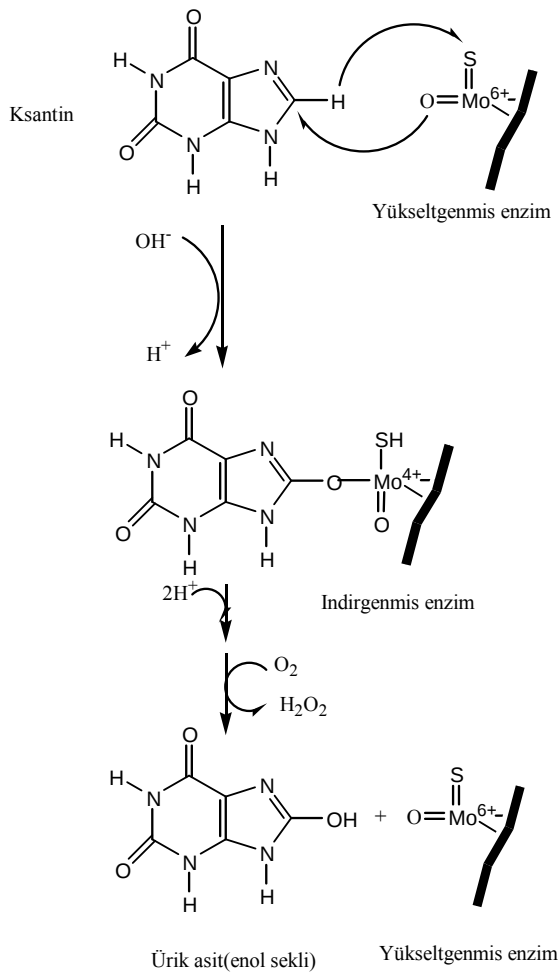


şekil 2.4. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi

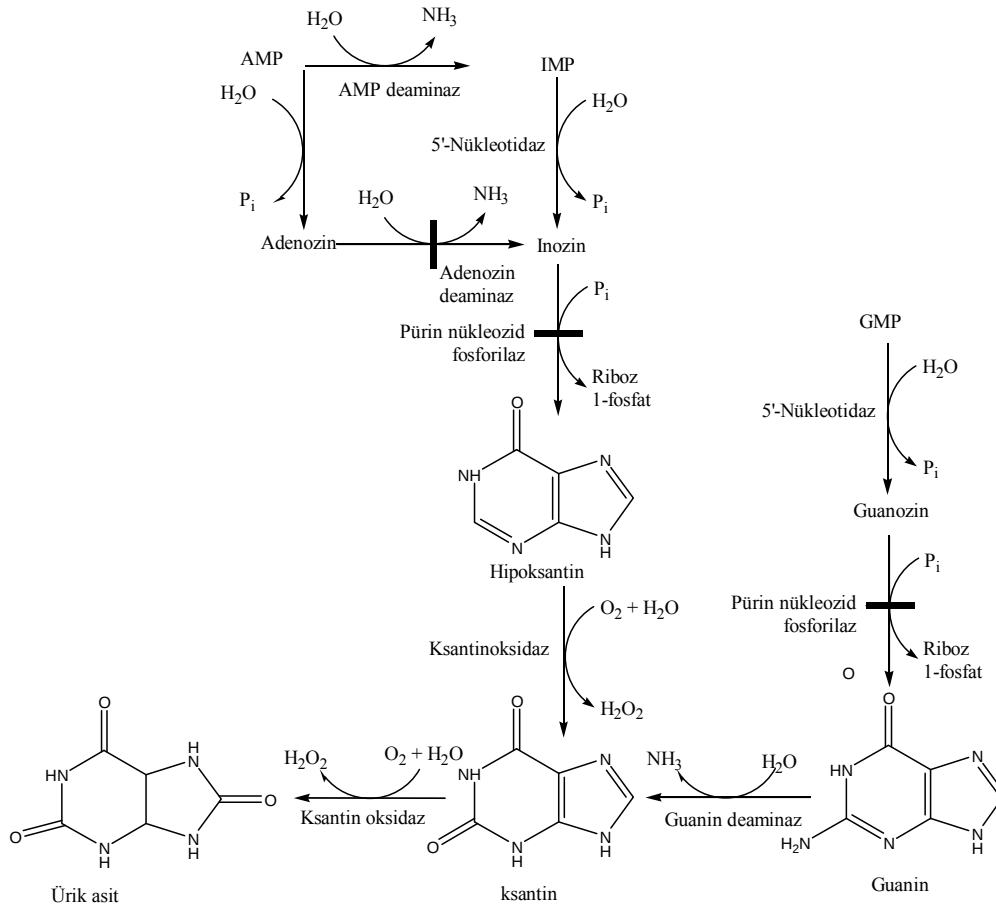
2.2. Ksantin Oksidaz Enziminin Özellikleri ve Ksantin-Hipoksantin Tayininin Önemi

Ksantin oksidaz enzimi, aktif merkezinde FAD, molibden, demir ve sülfür grupları bulunduran bir flavoproteindir [1,4,8]. Bu enzim organizmada iki şekilde bulunmaktadır. Birincisi dehidrojenaz, diğeri ise oksidaz aktifliği şeklindedir. Dehidrojenaz aktifliği gösteren enzim bol oksijenli ortamda tiol (SH) gruplarının yükseltgenmesiyle oksidaz aktifliği gösterir hale gelir [3]. Ksantin oksidaz enzimi ksantin veya hipoksantin ürik aside yükseltgenme reaksiyonunu katalizler. Bu reaksiyona ait mekanizma şekil 2.5' de verilmiştir. Ksantin veya hipoksantin yükseltgenmesi sırasında elektronlar enzimin aktif merkezindeki molibden tarafından alınır ve molibden +6' dan +4 yükseltgenme basamağına indirgenir. Elektronlar

molibdenden demir sülfür merkezine gelir ve oradan da FAD' ye aktarılarak $\text{FAD} \rightarrow \text{FADH}_2$ ye indirgenir, sonra FADH_2 den elektronlar oksijene verilir ve oksijen indirgenerek hidrojen peroksit oluşturur. Bu sırada indirgenen enzim de yükseltgenmiş hale geçer [3,4]. Oksijenin az olduğu durumlarda (kalp krizi ve organ nakli gibi) adenin nükleotidinin aşırı parçalanması sonucu substrat birikmesi meydana gelerek dokularda ksantin fazlalığı olmaktadır (Şekil2.6) ve bu da doku harabiyetine sebep olmaktadır. Dokuda fazladan biriken ksantinın bir kısmı plazmaya geçer ve kalp krizi tanısında kullanılır [3]. Bu sebepten dolayı ksantin tıbbi ve biyolojik anlamda önem kazanmaktadır. Bu nedenler ksantin tayini için sensörlerin hazırlanması çalışmalarının yapılmasını gerektirmektedir.



Şekil 2.5. Ksantinın ksantin oksidaz enzimi ile ürik aside yükseltgenme mekanizması

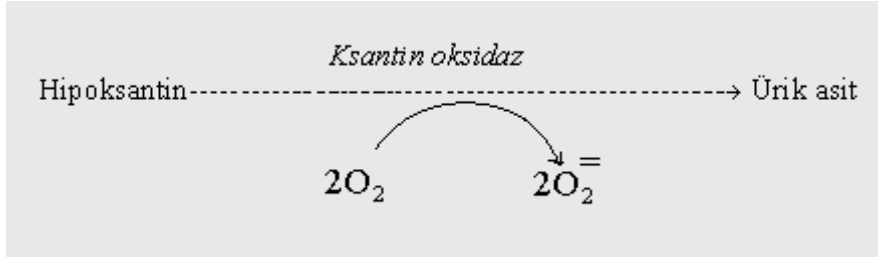


Şekil 2.6. Pürin nükleotitlerinin ürik aside yıkımı

Balık eti tazeliğini yitirmeye başladığı zaman yapısında bulunan pürin nükleotitlerinin yıkılması sonucu hipoksantin oluşturur ve hipoksantin tazeliğini yitirmiş balık etinde zamanla artmaktadır ve balıkta acı bir tat oluşturmaktadır. Balık dokusunda bulunan hipoksantin miktarı, balık tipi ve balık etinin konumuna göre değişmektedir [15, 16]. İlk zamanlarda yıkım ürünü olan hipoksantin balık etinin tazeliğini belirlemede kullanılmasına rağmen son zamanlarda balık eti tazeliği hakkında fikir veren K_1 değeri hesaplanarak balık eti tazeliği hakkında daha kesin sonuçlara ulaşılabilmektedir [15, 16].

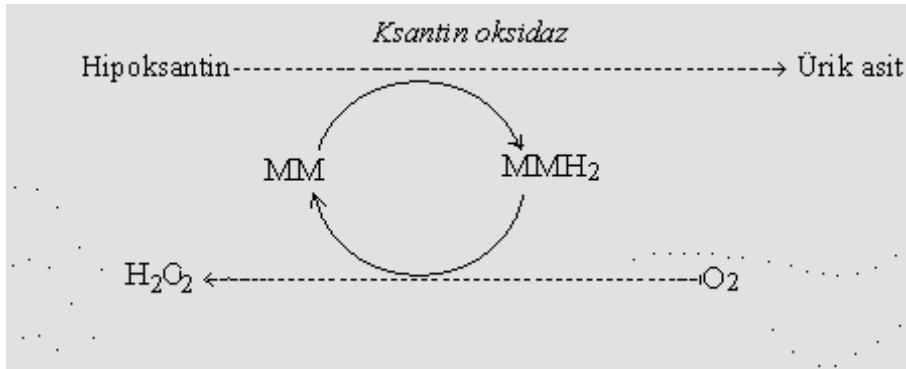
Doku iskemisi sırasında ksantin dehidrojenaz yapısında NAD^{+} ya bağımlı olarak bulunan enzim ksantin oksidaza çevrilir [17]. Bu sırada dokuda hipoksantin birikimi olur. İskemik dokuların reperfüzyonu ile ksantin oksidaz hipoksantini katalize eder

ve elektronlarını moleküler oksijene transfer ederek oksijeni süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit indirger (Şekil2.7.) [10].



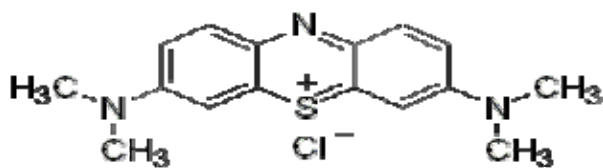
Şekil 2.7. Hipoksantin ürik aside dönüşümü

Yapılan son çalışmalar metilen mavisinin serbest oksijen radikal oluşumunun önlenmesinde oldukça etkili olduğunu göstermiştir [10,18,19]. Ortamda metilen mavisi varlığında hipoksantin ürik aside dönüşümü sırasında reaksiyonu katalizleyen ksantin oksidazdan elektron alıcısı olarak metilen mavisi görev yapar (Şekil 2.8) [10].



Şekil 2.8. Metilen mavisi varlığında hipoksantin ürik aside dönüşümü

Metilen mavisinin (MM) molekül yapısı aşağıdaki gibidir.



2.3. İmmobilize Enzimler

Bilindiği gibi enzimler suda çözünen, katalizörlerdir. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktifliğini kaybetmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Ancak, serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. Katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktifliğini kaybetmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir.

Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümleyebilmek, enzimleri endüstri için daha çekici hale getirmek için özellikle son otuz yılda enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yoğunlaşmış olup, bu alanda yapılan yayınların sayısı yıldan yıla katlı bir şekilde artmaktadır.

Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen bir kopolimere monomer gibi katılarak ve suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanarak immobilize edilirler.

İmmobilize enzimin serbest enzime üstün yönleri vardır. İlk olarak immobilize enzimler süzme, santrifüjleme gibi ayırma yöntemleriyle reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler. Ayrıca immobilize enzimlerde ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problemle karşılaşılmaz. Bu enzimler; çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.s.) karşı daha dayanıklıdır, birçok kez ve uzun süre kullanılabilirler, sürekli işlemlere tabii tutulabilirler, doğal enzime kıyasla daha kararlıdır, ürün oluşumu kontrol altında tutulabilirler, birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur, bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktiflik gösterilebilirler ve mekanik çalışmalar için uygundur.

Enzim immobilizasyonunda doğal ve sentetik birçok organik ve inorganik madde kullanılmaktadır. Taşıyıcı, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Taşıyıcının hidrofilik özellik, suda çözünmeme, gözenekli yapı, mekanik, kimyasal ve termal kararlılık, uygun tanecik şekli, mikroorganizmalara karşı dirençlilik, ucuzluk, zehirsizlik ve yenilenebilme özelliklerine sahip olması gerekir. Ayrıca kovalent bağlanmada kullanılacak taşıyıcılar ılımlı koşullarda enzimle kovalent bağ oluşturabilecek fonksiyonel gruplar taşımalıdır [12].

Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan taşıyıcılar Çizelge 2.1’ de verilmiştir.

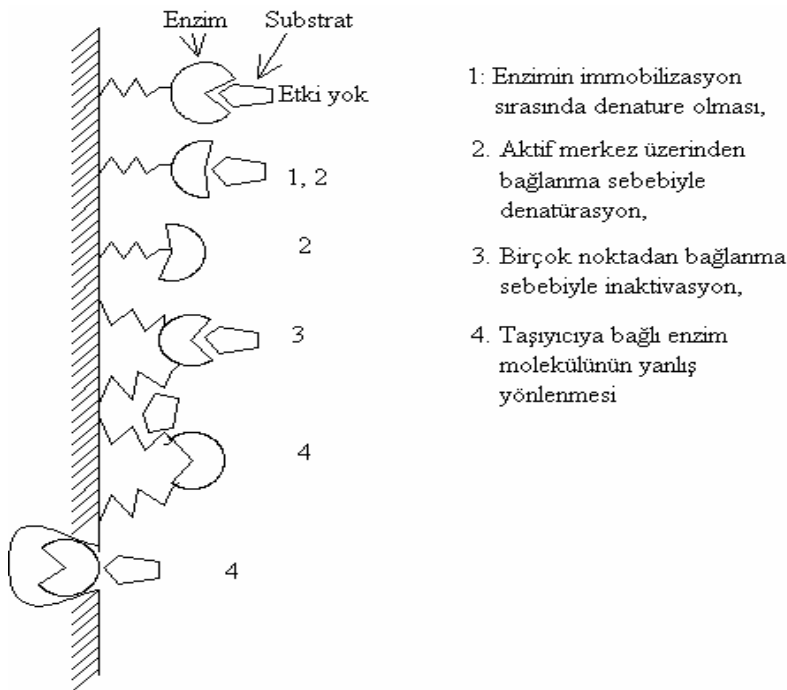
Çizelge 2.1. Enzim immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcılar

Anorganik	Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler
Kil, cam	Selüloz	Polistiren türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamit
Bentonit	Dekstra	Naylon
Hidroksiapatik	Agar ve agaroz	Vinil ve alil polimerler
Zirkonyum dioksit	Karragenan	Oksironlar
Nikel oksit	Kollogen	Metakrilat
Pomza taşı	Kitin ve kitozan	İyon değiştirici reçineler
Aktif karbon	Jelâtin	Maleik anhidrit polimerleri
Metaller	Albümin	
Metal oksitler	İpek	

2.3.1. İmmobilizasyonun enzim aktifliğine etkisi

Endüstriyel üretimde kullanılacak bir immobilize enzim örneğinin kararlılığı en önemli kriterlerden biridir. İmmobilize enzimin kararlılığından anlaşılan, belirli çalışma koşullarında enzim aktifliğinin zamana bağlı olarak korunmasıdır. Bu sıradaki enzim aktifliği kaybı değişik nedenlere dayanmaktadır (mikrobiyal yıkım, sıcaklığın etkisi , pH veya kimyasal başka etkiler vb.). Bunun dışında taşıyıcının parçalanması veya başka sebepler ile matriksten enzimin uzaklaşması da aktiflik kaybına neden olur. Ayrıca substrat çözeltisindeki kirlilikler tarafından matriks gözeneklerinin tıkanması da immobilize enzimi etkisiz hale getirir.

Teorik olarak immobilizasyondan sonra enzimin spesifik aktifliğinin düşmesi beklenir. Enzim aktifliğindeki düşmenin başlıca sebepleri enzimin immobilizasyon sırasında denatüre olması, aktif merkez üzerinden bağlanma sebebiyle denatürasyon , birçok noktadan bağlanma sebebiyle inaktivasyon ve taşıyıcıya bağlı enzim molekülünün yanlış yönlendirilmesidir. Enzim aktifliğindeki düşmenin başlıca sebepleri şekil 2.9 'da verilmiştir.



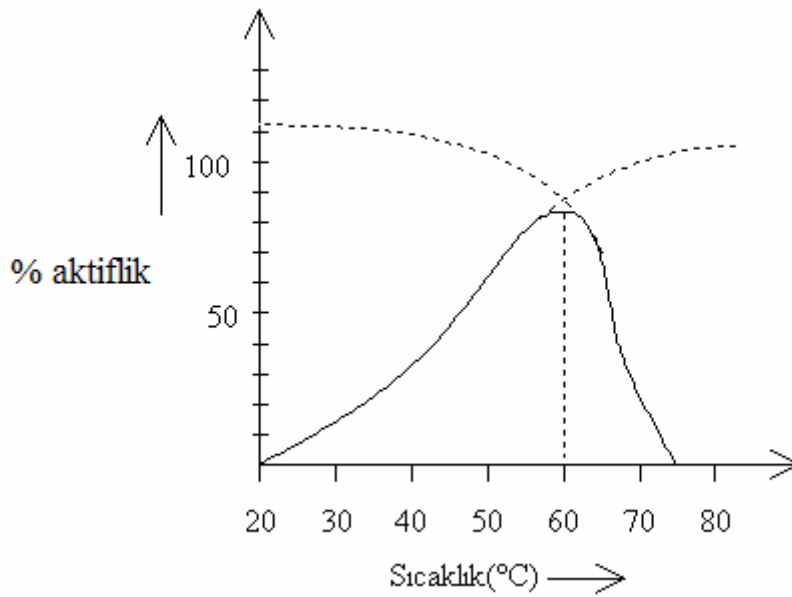
Şekil 2.9. İmmobilizasyonun enzim aktifliğine etkisi

Enzim immobilizasyonunun verimi aktifliği hakkında fikir vermez. Bağlı enzimin ne oranda aktif enzim molekülü içerdiği ancak “aktif merkez tayinini” ile belirlenebilir [12].

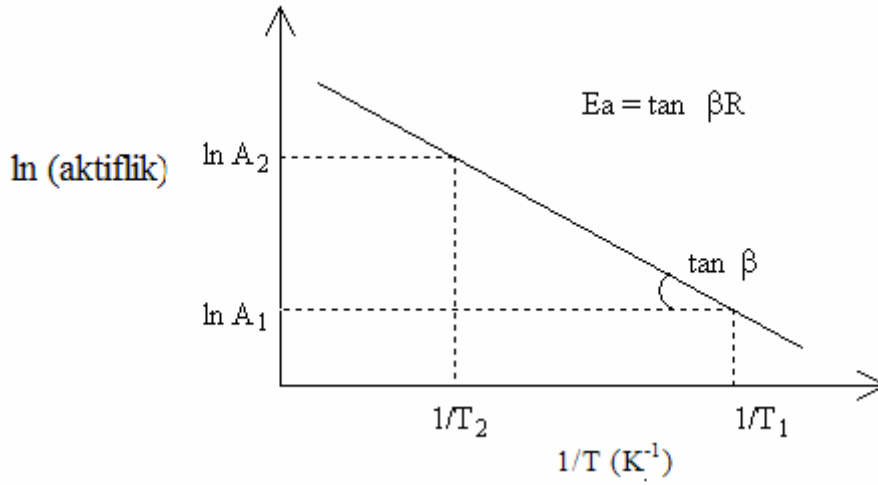
İmmobilize enzim aktifliği sıcaklığa, pH’ a ve substrat derişimine bağlı olarak değişir.

A-) Aktifliğe Sıcaklığın Etkisi:

Genellikle serbest ve immobilize enzim aktifliğine sıcaklığın etkisi optimum eğrileri çizilerek belirlenir (Şekil 2.10). İmmobilizayondan sonra enzimin optimum sıcaklığı değişir. Bu değişimi daha iyi yorumlayabilmek için Arrhenius diyagramını çizilerek ~ (bağlı aktiflikler) $1/T$ ’ye karşı grafiğe geçirilir (Şekil 2.11).



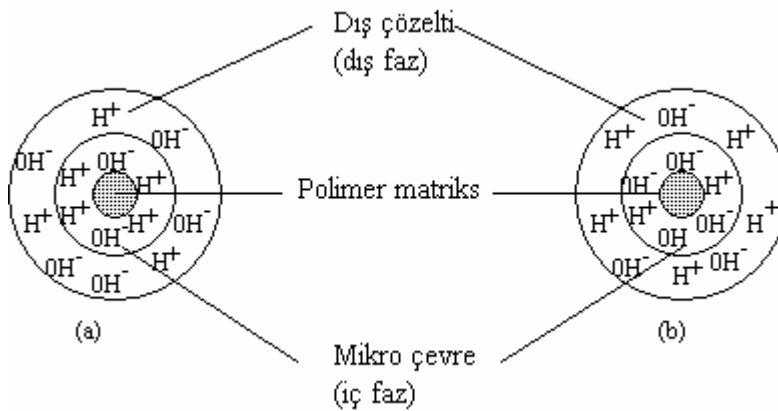
Şekil 2.10. Enzim aktifliğinin sıcaklığa bağlı değişimi



Şekil 2.11. Aktivasyon enerjisinin bulunması

B-)Aktifliğe pH Etkisi:

İmmobilize enzimin immobilizasyondan sonra optimum pH değerinde kayma gözlenir. Bu üç şekilde açıklanabilir. İlk olarak, enzim yüklü taşıyıcılarda immobilize edilirse enzimin mikro çevresi ile ölçüm yapılan çözelti bölgesi arasında H^+ ve OH^- gruplarının dağılımı bakımından önemli farklılıklar oluşur (Şekil 2.12). Polianyonik yapıli taşıyıcılarda immobilize enzimin optimum pH'sı bazik bölgeye, polikasyonik taşıyıcılarda ise asidik bölgeye kaymaktadır [12]. Bu kaymayı en düşük düzeyde tutabilmenin tek yolu çözeltinin iyon şiddetini artırmaktır [12].



Şekil 2.12. Yüklü taşıyıcıların mikro çevresinde oluşan iyonik tabakanın şematik gösterimi (a): Polianyonik taşıyıcı, (b): Polikasyonik taşıyıcı

Taşıyıcıya bağlı enzimlerin pH-aktiflik eğrilerindeki kaymanın diğer bir nedeni; kovalent bağlanma sırasında enzim molekülünün uğradığı kimyasal değişmedir. Bu etkiyi inceleyebilmek için taşıyıcının yüksüz olması gerekir. Axen ve çalışma arkadaşları, siyanojenbromür ile aktif hale getirilmiş Sephadex'e (yüksük bir taşıyıcı) kovalent bağlı α -kimotripsinin pH-aktiflik eğrilerinin doğal α -kimotripsininkine kıyasla oldukça bazik bölgeye kaydığını saptamışlardır [12].

pH-aktiflik eğrisinin serbest enziminkine kıyasla asidik veya bazik bölgeye kaymasının nedenlerinden biri de, enzimatik reaksiyon sonucu immobilize enzim molekülünün mikroçevresinde H^+ veya OH^- iyonu birikmesidir. Bu durumda, reaksiyon sonunda asidik veya bazik bir ürünün oluşması söz konusudur. Özellikle gözenekli yapıdaki polimer taşıyıcılara bağlı enzimlerde mikro çevresi ile dış çözelti arasında pH farkı oluşmaktadır. Çünkü aşırı difüzyon etkisi sonucu iyonların dış çözeltiye geçmesi zor olmaktadır.

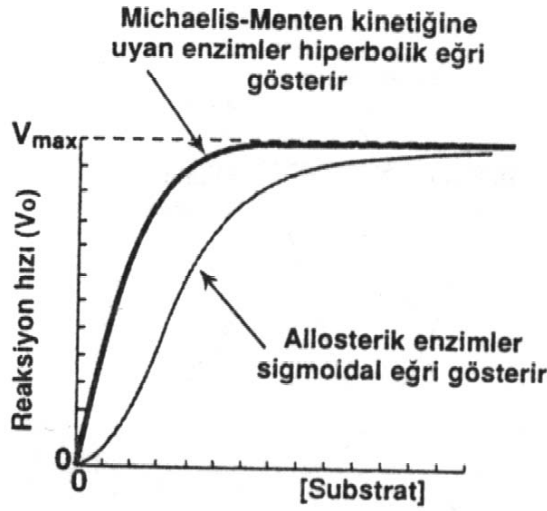
C-)Aktifliğe Substrat Konsantrasyonun Etkisi:

İmmobilize enzimlerin kinetik davranışları serbest enziminkinden oldukça farklıdır [12]. Bu 4 etmene bağlıdır.

- Enzim konformasyonundaki değişme,
- Sterik engeller,
- Mikro çevre etkileri
- İç ve dış difüzyon etkileri

Difüzyon etkisi sebebiyle immobilizasyondan sonra enzimin substrat doygunluk eğrisi hiperbolik değil allosterik enzimlerde olduğu gibi sigmoidaldır (Şekil 2.13). Dolayısıyla Michaelis-Menten kinetiğinden sapma gösterirler. Serbest ve immobilize enzimin Michaelis sabitleri (K_m)'de doğal olarak farklıdır ve bu farkı belirtmek için immobilize enzimin Michaelis sabiti K_{mapp} ($K_{mgöz}$) şeklinde sembolize edilir. Genelde $K_{mgöz}$ K_m değerinden daha büyüktür. Fakat substratla zıt yüklü bir

taşıyıcıda enzim immobilize edilirse elektrostatik çekim sebebiyle tersi bir durum ile karşılaşılabilir.



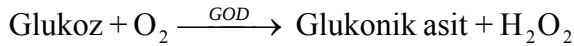
Şekil 2.13. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi

Serbest ve immobilize enzimin Michaelis sabitleri arasındaki farkı en alt düzeye indirebilmek için immobilize enzimin tanecik çapının küçülmesi, karıştırma hızının artırılması gerekir [12].

2.4. Biyosensörler

Biyosensör, biyolojik olaylardaki biyokimyasal değişimleri algılayarak, biyolojik olayın teşhisine olanak tanıyan bir ölçme sistemi olarak tanımlanabilir.

Biyosensörlerin tarihi 1950' li yılların ortalarında L.C.Clark' ın Cincinnati Hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O_2 miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başladı. 1962 yılında Clark ve Lyons glukozoksidaz enzimini O_2 elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeye başladılar. Böylece yeni bir analitik sistem oluşturdular. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin (enzim) yüksek spesifikliğini diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını belirlemiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur.



GOD = Glukoz oksidaz

Bir biyolojik sıvıdaki glukoz ve çözünmüş oksijen elektrot etrafındaki membranı geçerek elektrot yüzeyine ulaştığında glukoz oksitlenerek glukonik aside dönüşür ve bu sırada O₂ harcanır. Ortamdaki glukoz bittiğinde O₂ tüketimi durur. O₂ elektrodu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözünmüş O₂ ölçülür, aradaki fark ortamdaki glukozun oksidasyonu için harcanan O₂ olup buradan biyolojik sıvıdaki glikoz miktarı hesaplanır. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanırken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini mümkündür. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine biyosensör adı verildi. Clark ve Lyons' un geliştirdiği ilk biyosensörde elektron alıcısı olarak oksijen kullanılırken, ikinci generasyon biyosensörlerde O₂ yerine elektronları enzimin redoks merkezinden elektron yüzeyine taşıyabilen bir redoks medyatörü kullanılmaya başlandı.



M_{red} = M_{ox} = redoks medyatörü

Medyatörler ve özellikleri:

Medyatörler oksidoredüktazların koenzimlerinin yenilenmesinde önemli rol oynarlar. Enzim çözünmüş şekilde değilse koenzimin hareketi azalır ve elektronların elektrot ve koenzim arasında taşınması için bir medyatöre gereksinim duyulur. Medyatörün tatmin edici bir fonksiyon gösterebilmesi için aşağıdaki özellikleri de sağlaması gerekir.

- Kolay indirgenip yükseltgenebilmesi,
- Yükseltgenmiş ve indirgenmiş hali kararlı olması,
- Çözeltideki oksijen ile reaksiyon vermemesi,

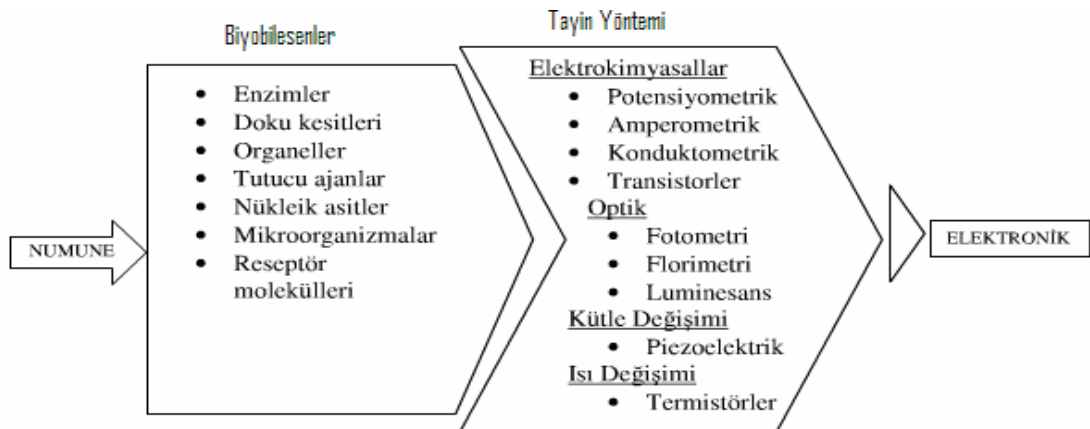
–Hücre içi uygulamalar için zehirli olmaması.

Üçüncü generasyon biyosensörlerde enzimin redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında direkt elektriksel iletişim sağlanmış ve redoks medyatörlerine gereksinim kalmamıştır.

Biyosensörlerde biyobileşen olarak enzimler yanında doku kültürleri, mikroorganizmalar, organeller, antikorlar ve nükleik asitler de kullanılabilmekte olup, ölçme tekniğine göre amperometrik, potansiyometrik, termal, piezoelektrik, akustik veya optik sensörler olarak adlandırılırlar. Biyosensörlerin yüksek spesifikliği yanında; renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir derişim aralığında doğrudan ölçme yapma gibi üstünlükleri vardır. Bunun yanında reseptör olarak adlandırılan biobileşenlerin pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenmesi biyosensörün kullanım ömrünü kısalttığından istenmemektedir.

2.4.1. Biyosensörlerin yapısı ve fonksiyonları

Biyosensörler biyobileşenler (reseptör) ile fiziksel bileşenlerden (transdüser) oluşurlar. Biyosensörün görevi biyolojik bir olayın elektriksel sinyale dönüştürülmesidir [12]. Şekilde bir biyosensörün çalışma prensibi şematize edilmiştir (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Biyosensörlerin çalışma prensibi

2.4.2. Biyobileşenler

Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar, nükleik asitler ve biyolojik zarlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler sensörlerde biyobileşen olarak kullanılırlar. Biyosensörlerin yapısında görev alan biyobileşenler çoğu kez biyoreseptör olarak adlandırılırlar. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler dönüştürücü tarafından algılanır. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir. Uygun bir enzimin bulunamaması veya enzimin kararsız olması ve birden çok sayıda maddenin tayini durumlarında hücre sistemleri veya mikroorganizmalar kullanılır. Mikroorganizmalar değişik mutajenite testlerinde başarı ile kullanılmaktadırlar [20].

2.4.3. Dönüştürücüler (Transdüserler)

Transdüserler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyona göre transdüser seçilir. Elektrotlar amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde kullanılır ve burada hedef analittir. (O_2 elektrodunda çözünmüş O_2 , pH elektrodunda H^+ iyonu gibi) .

2.4.4. Biyosensörlerin uygulama alanları

Biyosensörlerin, klinik teşhis, tıbbi uygulamalar, süreç denetleme, biyoreaktörler, kalite kontrol, tarım ve veterinerlik, bakteriyel ve viral teşhis, ilaç üretimi, endüstriyel atık su denetimi, madencilik, askeri savunma sanayi gibi alanlarda yaygın olarak kullanımı söz konusudur.

Biyosensörler; gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler, bazı anorganik bileşikler yanında enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar.

Hiç kuşkusuz biyomedikal sektör biyosensörler için en iyi pazardır. Bu alanda uygulama olanağı bulunan ilk biyosensörler enzim sensörleridir. Ticari olarak

üretileen ilk biyosensör ise şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayininde kullanılan glukoz oksidaz elektrodudur. Biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde başta glukoz olmak üzere birçok monosakkarit, aminoasitler, organik asitler (laktik asit), üre ve alkol tayinlerinde enzim sensörleri kullanılmaktadır. Ayrıca, gıdalardaki yabancı maddeler (pestisitler, toksinler ve hormonlar vb.) yanında aroma ve tazelik gibi kompleks değişkenlerin tayin için de biyosensörler hazırlanabilir. Toprak, hava ve su kirliliğinin kontrolünde mikrobiyal sensörler ve enzim sensörleri kullanılmaktadır. İlaçların kötü amaçla kullanımı ve uyuşturucu ile mücadelede de biyosensörler kullanılabilir. Böylece uyuşturucu madde arayan köpeklerin yerini biyosensörler alabilir ve gümrüklerde, karakollarda zaman kazanılabilir. Ayrıca son yıllarda tıbbi analizörlere enzim elektrotları takılarak yoğun bakım ünitelerinde kullanılmaya başlanmıştır.

2.5. İletken Polimerler

Polimerler ilk kullanımlarından bu yana elektriksel yalıtkanlığı iyi maddeler olarak bilinirler ve bu özelliklerinden dolayı elektriksel yalıtkanlığın arandığı alanlarda önemli kullanım yerleri bulmuşlardır.

İletken polimerler son zamanlarda büyük oranda elektrokimyanın çalışma alanını oluşturmaktadırlar. İletken polimerlerin kimyasal, biyosensör teknolojisi, enerji korunumu ve depolamasının ilaç ve enzim faaliyetlerinde bir yeri vardır. İlk olarak elektrokimyasal polimerizasyon metodu 1900 yılında Szarvasy tarafından yapıldı [21].

İletkenlik konusunda en önemli adım 1979'da Diaz'ın pirolü elektrokimyasal yöntemle yükseltgeyerek polipirolu üretmesiyle atıldı. Polipirol anot üzerinde üretilebildi ve güçlü bir film olarak yüzeyden çıkarıldığında iletkenliği 100 S/cm' ye ulaşabildi. Benzer şekilde, elektro yükseltgenme yöntemiyle iletken politiyofen anot üzerinde üretildi. Karbosol ve indol gibi aromatik bileşiklerden de elektrokimyasal yöntemlerle polimerler üretildi. Anilinin elektro yükseltgenmesiyle anot yüzeyinde toz halde iletken polianilin elde edildi. Bazı iletken polimerler kimyasal yöntemlerle

de üretilebilmektedir. Örneğin pirol, Br_2 , veya AsF_5 ile yükseltgendiğinde iletken polipirol elde edilmiştir [21].

İletken polimerlerin fiziksel dayanıklılığı genellikle çok üstün olmamaktadır. Bu polimerlerin atmosferde hızla iletkenliklerini kaybedebilmeleri ve şekillendirilmelerinin zorluğu kullanım alanlarını kısıtlamaktadır. İletken polimerlerin mekanik özelliklerini iyileştirebilmek için bazı dayanıklı yalıtkan polimerlerle kompozitler veya kopolimerler üretilmektedir. Yalıtkan bir polimer film, yükseltgeyici madde içeren bir çözelti içinde şişirildikten sonra saf pirole daldırılarak veya pirol buharına tutularak matriks içinde polipirol oluşturulabilir. Elektrokimyasal yöntemde ise anot yüzeyi polikarbonat veya poliamit gibi yalıtkan bir filmle kaplandıktan sonra pirol içeren elektroliz çözeltisinde yükseltgenme ile polikarbonat-polipirol kopolimeri elde edilebilir. Bu şekilde elde edilen kopolimer film dayanıklı ve iletkendir.

2.5.1. İletken polimerlerin elektrokimyasal yöntemle üretilmesi

Elektrokimyasal olarak başlatılan polimerleştirmelerde iletken polimerler genellikle anot yüzeyinde yükseltgenme sonucunda büyümeye başlarlar. Çözelti içerisinde de belirli oranda polimer oluşabilir. Katot bölgesinde oluşan polimerleştirmelere daha ender rastlanır. Yükseltgenen monomer genellikle radikal katyon oluşturur ve yeni monomer katılmasının ardından elektron aktarımları sonucunda yüzeyde artı yüklü polimer zincirleri oluşur. Çözeltideki elektrolidin ClO_4^- , BF_4^- gibi anyonları da artı yüklü polimerlerde dopant olarak yer alır ve nötürleşmeyi sağlarlar. Yükseltgenmiş polimer iletkendir ve elektrolizle indirgenince nötürleşir ve anyonlar çözeltiye geçer indirgenmiş polimer iletkenliğini kaybeder.

İletken polimerlerin elektrokimyasal olarak üretilmeleri sırasında polimerlere medyatörler, enzimler, kompleks yapıcı ligandlar ve antikorlar bağlanabilir. Klinik uygulamalar için çok gerekli olan biyouyumluluk polisakkaritler veya heparinin polimere bağlanmasıyla sağlanabilmektedir [21]. İletken polimerlerin substrat veya ürün ile kimyasal uyumu veya ayırıcı davranışı yanında elektronik devrelere

elektronik sinyal gönderebilme özelliklerine de sahip oluşu tercih nedeni olmaktadır. İletken polimerin kullanıldığı biyosensörlerde amperometri, potansiyometri ve çözelti iletkenliği ölçümü gibi yöntemlerden yararlanılır.

Elektrokimyasal polimerleşme ile elde edilen polimerin yapısı, mol kütlesi, iletkenliği ve fiziksel dayanıklılığı deney koşullarına göre değişkenlik gösterir. Çözücü olarak genellikle dielektrik sabiti yüksek olan ancak nükleofilik karakter göstermeyen organik çözücüler tercih edilir. Anot olarak platin levha, camsı karbon veya ITO (indiyum kalay oksit) camı kullanılır. Elektrolitlerin yüksek potansiyelerde bozunmaması istenir ve tetra alkallerin BF_4^- veya ClO_4^- tuzları tercih edilir. Bu anyonlar aynı zamanda polimerler için en uygun dopantlardır. Anot potansiyelinin de aşırı yükseltgenmeye neden olmayacak şekilde düşük tutulması gerekir. Aşırı yükseltgenen polimerin ana zincirindeki konjuge çift bağlar kırılır ise konjugasyon kesintiye uğrar ve iletkenlik düşer.

2.5.2. İletken polimerlerde enzim immobilizasyonu

İletken polimerler elektrotların elektro analitik uygulamalarında, enzim immobilizasyonuna sıklıkla rastlanılmaktadır. Çizelge 2.2 ve 2.3’ da görüldüğü gibi enzim kullanılan biyosensörlerin geniş bir uygulama alanı bulunmaktadır.

Aizawa ve Foulds tarafından yapılan öncü çalışmaların ardından enzimler çeşitli iletken polimerlerle immobilize edildi. Elektroliz çözeltisinde monomerlerle birlikte enzimin yer aldığı polimerizasyon yöntemi dışında bazı teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzim molekülüne monomer kimyasal olarak bağlanabilmekte ve ardından iletken polimer elektrolizle üretilenmektedir. Bu yöntem ile kovalent bağlı enzim elektrot elde edilmektedir [21].

Çizelge 2.2. İletken polimerlerin kullanıldığı glikoz biyosensörleri

Enzim	Polimer	Tayin yöntemi
Glukoz oksidaz	Polipirol	Amperometri
		Potansiyometri
	Poli(N-Metilpirol)	Amperometri
	Polianilin	Amperometri
	Poli(o-fenilendiamin)	Amperometri
	Poliindol	Amperometri
Glukoz oksidaz ve peroksidaz	Polipirol	Amperometri
Glukoz oksidaz ve katalaz	Polipirol	Amperometri
Glukoz dehidrojenaz	Polipirol	Amperometri

Çizelge 2.3. İletken polimerlerin kullanıldığı biyosensörler

	Enzim	Polimer	Tayin yöntemi
D-Alanin	D-Aminoasit oksidaz	Polipirol	Amperometri
Atrazin	Tirosinaz	Polipirol	Amperometri
Kolesterol	Kolesterol oksidaz	PPD	Amperometri
	Kolesterol oksidaz ve	Polipirol	Amperometri
	Kolesterol esteraz		
Kolin	Kolin oksidaz	Polipirol	Amperometri
Dopamin	Tirosinaz	Polipirol	
Katekolamin			
Galaktoz	Galaktoz oksidaz	Polianilin	Amperometri
Glutamat	Glutamat dehidrojenaz	Polipirol	Amperometri
	Fruktoz dehidrojenaz	Polipirol	Amperometri
	Pepsin	Polianilin	Kondüktometri
Fruktoz			
Hemoglobin	Peroksidaz	Polipirol	Amperometri
Hidrojen peroksit		Polianalin	

Birden fazla enzimin iletken polimerlere immobilize edilmesiyle de biyosensörler hazırlanabilmektedir. Laktat dehidrojenaz ve laktat oksidaz enzimlerinin poli (fenilendiamin) polimerine immobilize edilmesiyle çok hassas sensörler yapılmıştır [21].

2.6. Biyobileşen İmmobilizasyonu

Biyosensörler farklı özellikteki iki elemanın (dönüştürücü ve biyobileşen) kombinasyonu ile oluşurlar. Uygun biyoreseptör ve dönüştürücü seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması aşılması gereken en önemli sorundur. Bu bağlama işlemi biyoreseptör immobilizasyonu olarak tanımlanır. Bağlama işleminde çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen transdüser ve biyoreseptöre göre belirlenir. İmmobilizasyon biyoreseptörün kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. Biyosensör immobilizasyonunda başlıca beş yöntem kullanılmaktadır. Bunlar kovalent bağlama, iyonik bağlama, adsorbsiyon, çapraz bağlama ve tutuklama yöntemidir. Taşıyıcıya bağlanmada bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanır. Molekül yapısındaki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlanmada rol alırlar.

İmmobilizasyon işlemi sırasında veya immobilizasyondan sonra aktif merkezin zarar görmeyeceği bir yöntem seçilmelidir. Böyle bir seçimin sağlıklı olabilmesi için enzimin yapısının çok iyi bilinmesi gerekir. Enzim ile taşıyıcı arasında herhangi bir bağlama söz konusu ise ya da bu bağlanmanın aktif merkez üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli veya immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır [12]. Bu koruma bazen substrat bazen de kompetitif inhibitör tarafından sağlanır. Çizelge 2.4’ de enzim immobilizasyon yöntemleri çeşitli bakımlardan karşılaştırılmıştır.

Taşıyıcıya bağlanma sonucu enzim molekülünün fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişmesi doğaldır. Enzim molekülünün hareket yeteneği sınırlanır, konformasyonu değişir, kimyasal kovalent bağlanma durumunda yükü ve kimyasal yapısı değişir.

Çizelge 2.4. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Özellik	Kovalent Bağlama	Adsorpsiyon	İyonik Bağlama	Çapraz bağlama yöntemi	Tutuklama yöntemi
Hazırlanması	Zor	Kolay	Kolay	Zor	Zor
Enzim aktifliği	Yüksek	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek
Bağ gücü	Kuvvetli	Zayıf	Orta	Kuvvetli	Kuvvetli
Substrat spesifikliğı	Değişebilir	Değişmez	Değişmez	Değişebilir	Değişmez
Rejenerasyon	Mümkün değil	Mümkün	Mümkün	Mümkün değil	Mümkün değil
Genel uygulanabilirlik	Orta	Düşük	Orta	Düşük	Yüksek
İmmobilizasyon masrafı	yüksek	düşük	düşük	orta	Düşük

2.6.1. Kovalent bağlanma

Kovalent bağlanma biyoreseptörün dönüştürücü yüzeyine kimyasal bir reaksiyon sonucu kovalent bağlanmasıdır. Enzimler aktifleştirilmiş dönüştürücü yüzeylerine bağlanabileceğı gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanarak immobilize edilen enzim preparatının dönüştürücü yüzeyinde bir film veya tabaka oluşturmasıyla da biyosensörler hazırlanabilir [22].

Enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktifliğı için aktif merkezdeki amino asitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların sterik olarak rahatsız edilmemesidir. Kovalent bağlanma enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir [22].

2.6.2. İyonik bağlanma

İyonik bağlanma biyoreseptörün dönüştürücü yüzeyine kimyasal bir reaksiyon sonucu iyonik olarak bağlanmasıdır.

2.6.3. Adsorpsiyon

Bu yöntemde biyobileşenin film veya tabakaya adsorbe olması sağlanır. Biyobileşenlerin kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna göre immobilizasyon yöntemi belirlenir. Enzimler için uygulanan tüm immobilizasyon yöntemleri protein yapısındaki diğer biyoreseptörler için de uygulanabilir. Örneğin; hayvan ve bitki dokuları membran yapısında olduklarından farklı immobilizasyon yöntemleri uygulamak gerekir.

2.6.4. Tutuklama (Hapsetme)

Biyoreseptörün bir membran veya tabaka (matriks) içerisinde hapsedilmesidir. Enzimler makro moleküler yapı proteinler olup polimer jel tabakalarda ve daha basit olarak diyaliz membranlarında tutuklanabilirler. Bu yöntem enzimler yanında organeller, hücreler ve antikorlar için de uygulanabilirler. Elektrokimyasal polimerizasyon diğer bir tutuklama yöntemidir. Örneğin; altın kaplanmış cam slaytlarda potansiyometrik elektropolimerizasyon ile m-fenilendiaminin polimerleştirilmesiyle oluşan film içinde glukoz oksidaz immobilize edilmiştir. Bu yöntemin başka birçok uygulaması vardır [21].

2.6.5. Çapraz bağlama yöntemi

Tutuklama yöntemi ile kimyasal bağlamanın birleştirilmiş şekli olarak uygulanır. Tutuklanmış biyoreseptör glutaraldehit gibi iki fonksiyonlu reaktiflerle film veya tabakaya kovalent bağlanır. Bu yöntem biyosensör hazırlanmasında daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde uygulanır. Çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehit, hexametilen diizosiyanat,

diflorodinitrobenzen, bismaleimidoheksen, disüksinilsüberat sık kullanılır. İki fonksiyonlu reaktifler enzimler yanında organeller, hücreler ve antijenlerin immobilizasyonunda uygulanır.

Çapraz bağlamada iki yöntem kullanılır.

Daldırma yöntemi

Elektrot önce enzim ve çapraz bağlayıcının bulunduğu karışıma veya enzim, albümin, jelatin gibi (suda çözünen protein) ve çapraz bağlayıcının bulunduğu karışıma daldırılır, sonra kendi eksenine etrafında homojen bir enzim tabakası elde edilecek şekilde döndürülür. Bundan sonra elektrot glisin çözeltisine daldırılarak nötürleştirilir ve çapraz bağlayıcının fazlası ve diğer reaksiyona girmeyen maddeler yıkanarak uzaklaştırılır. Yöntem çok kolay ve özellikle küçük dönüştürücüler için çok uygundur [21].

Direkt bağlama yöntemi

Bu yöntemde yaklaşık 10 µL enzim çözeltisi bir kılcal boru yardımıyla dönüştürücü yüzeyine ince bir tabaka oluşturacak şekilde damlatılır(Şekil 2.15(a)). Daha sonra çapraz bağlayıcı reaktif ilave edilir (Şekil 2.15(b)). Bu yöntemde daldırma yöntemine göre daha az biyobileşen ile çalışılabilmektedir [21].

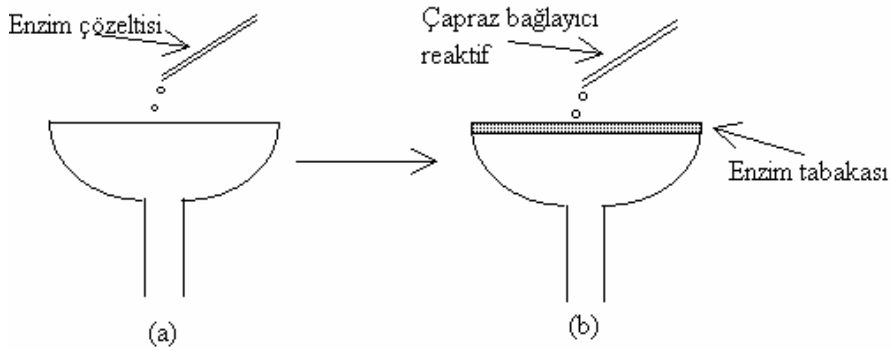
İmmobilizasyon yöntemine göre biyosensörün ortalama ömürleri aşağıda verilmiştir.

Adsorpsiyon: 1 gün

Membranda tutuklama: 1 hafta

Fiziksel tutuklama: 3–4 hafta

Kovalent bağlama: 4–14 ay

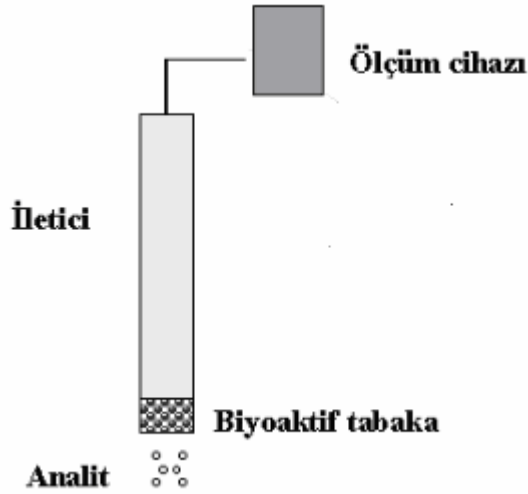


Şekil 2.15. Direkt bağlama ile enzim immobilizasyonu

2.7. Enzim Sensörleri

Biyosensör teknolojisinin tarihsel geçmişine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleriyle başladığı görülmektedir. 1962 de Clark ve Lyons ve 1967 de Updike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik glukoz oksidaz enzim elektrotları bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır. Biyosensör teknolojisindeki ilk örnekler özellikle amperometrik ve potansiyometrik temelli enzim elektrotları şeklinde ortaya çıkmışlardır. Bu durumun en önemli nedeni o tarihteki bilgi ve teknolojik birikimin söz konusu çalışmalar için yeterli düzeye ulaşmış olmasıdır.

En genel anlamda bakıldığında diğer biyosensörlerde olduğu gibi enzim sensörleride biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm sisteminden oluşur. Diğer biyosensörlerden tek fark biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimlerin yer almasıdır. Buna karşılık diğer biyosensörlerde olduğu gibi biyoaktif tabakanın iç ve dış yüzeylerinde membranlar, iletici ile ölçüm düzeneği arasında sinyal yükselticiler, mikroişlemciler veya ölçüm düzeneğiyle bağlantılı kaydedici veya bilgisayar sistemleri gereksinimlerine göre eklenen unsurlardır [12]. Bir enzim sensörünün gösterimi Şekil 2.16’ da verilmiştir.



Şekil 2.16. Bir enzim sensörünün genel gösterimi

Bir enzim elektrodunda enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği reaksiyona uygun bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir iletici ile birleştirilmektedir. İletim sistemi biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ürünün miktarındaki artışı tespit edebilecek şekilde seçilebilir. Derişimlerinin hızlı bir şekilde dengeye ulaşabilmesi için difüzyon engelini en aza indirmek amacıyla biyoaktif tabaka kalınlığının mümkün olduğunca ince olması gerekmektedir. Bunun yanı sıra biyoaktif tabakada sabit bir substrat derişimi sağlayabilmek için ölçüm çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması gerekmektedir. Doğal olarak tayin edilecek türlerin ölçüm çözeltisindeki, biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka iletici ara yüzeyindeki derişimleri farklı olur. İletici sistemin ölçme sistemine gönderdiği sinyal biyoaktif tabaka ile iletici ara yüzeyindeki derişimlerdeki değişikliğe bağlıdır. Ancak söz konusu derişimler denge halinde ölçme çözeltisindeki derişimlerle orantılı olduğu için çoğu zaman kalibrasyon grafiği çizilerek sonuca varılır.

2.7.1. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

Enzimatik sensörlerin sınıflandırılması en yaygın şekilde, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sinyalin belirlenme ilkesine göre yapılmaktadır (Bkz. Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

1. Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensörleri
a. Amperometrik esaslı enzim sensörleri
Birinci nesil amperometrik enzim elektrotları
İkinci nesil amperometrik enzim elektrotları
Üçüncü nesil amperometrik enzim elektrotları
b. Potansiyometrik esaslı enzim sensörleri
Proton duyar potansiyometrik enzim elektrotları
Amonyum duyar potansiyometrik enzim elektrotları
Karbondiyoksit duyar potansiyometrik enzim elektrotları
Diğer iyon duyar potansiyometrik enzim elektrotları
c. Yarı iletkenleri esas alan enzim sensörler,
Enzim alan etki transistörleri (ENFET)
2. Optik esaslı enzim sensörleri;
Absorpsiyon esaslı optik enzim sensörleri.
Flouresans esaslı optik enzim sensörleri.
Biyoluminesans esaslı optik enzim sensörleri.
3. Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri
4. Piezoelektrik esaslı enzim sensörleri

2.8. Kaynak Araştırması

Fatma Arslan ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada ksantin tayini için bir biyosensör hazırlamak için, elektrokimyasal hücrede bulunan pirol, ferrosen ve asetonitril içinde tetrabutylamonyum tetraflorboratı dönüşümlü voltametri ile pirol elektropolimerleşmesiyle Pt yüzeyine taşımışlardır. Bu taşınmayı 0,0 V - 0,9 V (SCE) potansiyelde 50 mV/s tarama hızında gerçekleştirmişlerdir. Elektropolimerizasyon prosesinden sonra çapraz bağlama yöntemiyle glutaraldehit/bovin serum albumin kullanarak polipirol film üzerine ksantin oksidazı immobilize etmişlerdir. + 0,7 V uygulanan sabit potansiyelden 3-4 dk sonra ksantine

karşı biyosensörün tepkisini ölçmüşlerdir. Ksantin enzimatik reaksiyonu sonucunda oluşan H_2O_2 'nın elektrokimyasal tayininin amperometrik tayinin temelini oluşturduğunu göstermişlerdir. Analitik performans tayini için çeşitli deneysel durumların etkisini araştırmışlar ve sensörün tayin sınırını 1×10^{-6} M olarak belirlemişlerdir [23].

Pınar Esmâ Erdem ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada kreatinaz ve sarkozine oksidaz immobilizasyonu ile kreatin tayini için yeni bir enzim elektrot oluşturmuşlardır. Platin çalışma elektrodu yüzeyine polivinilferrosenyum içinde enzimi immobilize etmişlerdir. Enzim sistemi için en iyi immobilizasyon metodunu, glutaraldehit ve bovin serum albumin ile çapraz bağlama yöntemi olarak seçmişlerdir. Kreatin tayinini Ag/AgCl karşı +0,70 V da H_2O_2 nin yükseltgenmesine dayandırmışlardır. Doğrusal çalışma aralığını $2,00 \times 10^{-5}$ - $3,20 \times 10^{-4}$ M ve cevap süresi 50 s olarak belirlemişlerdir. pH, sıcaklık, enzim oranı ve tampon konsantrasyonu araştırmışlar ve sırasıyla 7,5 37° C, 2,5:1 (CI:SO) ve 0,05 bulmuşlardır. Ayrıca enzim elektrot için tekrarlanabilirlik ve raf ömrü çalışmışlardır [24].

Servet Çete ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada ürik asit tayini için biyosensör hazırlamak için elektrokimyasal hücrede bulunan pirol, ferrosen ve asetonitril içinde tetrabutylamonyum tetraflorboratı Ag/AgCl elektroda karşı 0,0 – 1,0 V da 50 mV/s tarama hızında dönüşümlü voltametri ile pirol elektropolimerleştirilmesiyle Pt yüzeyine taşımışlardır. Elektropolimerizasyon prosesinden sonra ürikaz enzimini polipirol film üzerine glutaraldehit/ jelatin kullanılarak çapraz bağlama yöntemiyle immobilize etmişlerdir. Ag/AgCl ' e karşı +0,70 V da uygulanan sabit potansiyelde ürik aside karşı biyosensörün cevabını 330 s de ölçmüşlerdir. Enzim elektrot için tayin sınırı 5×10^{-7} M ve raf ömrü 5 hafta olarak belirlendi. Biyosensörün amperometrik cevabına girişim etkini araştırmışlardır ve biyolojik sıvıda ürik asit tayini yapmışlardır [25].

Servet Çete ve arkadaşları 2007 yılında polipirol film üzerine ürikaz enzimini glutaraldehit/jelatin kullanarak çapraz bağlama yöntemiyle immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimin K_M değerini, 0,44 mM, serbest enzimin K_M değerinden, 0,39

mM, daha yüksek bulmuşlardır. Serbest ve immobilize enzim için sıcaklık ve pH değerlerini sırasıyla 8,5, 8,0 ve 35 °C ve 55 °C olarak bulmuşlardır. Serbest ve immobilize enzim için raf ömrü sonrasındaki enzim aktivitesinin başlangıç aktivitesinin sırasıyla % 42 ve % 49 unu gösterdiğini göstermişlerdir. 5×10^{-5} M sabit ürik asit derişiminde 30 ölçüm sonunda amperometrik akımın başlangıç aktivitesinin % 77,7 sini gösterdiği göstermişlerdir [26].

Fatma Arslan ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada ferrosen mediatörlü polipirol elektrot hazırlamışlardır ve elektrodun H_2O_2 e hassasiyetini araştırmışlardır. Polipirolu, 50 mV/s tarama hızında ve 0,0 – 0,9 V potansiyel aralığında pirolün polimerazasyonu ile $0,5 \text{ cm}^2$ Pt yüzeyine kaplamışlardır. Oda sıcaklığında 0,025 M pH 7 fosfat tamponunda H_2O_2 e elektrodun hassasiyetini araştırmışlardır. Çalışma potansiyelini + 0,70 V ve pirol ve ferrosen derişimini sırasıyla 0,2 M ve 10 mM olarak belirlemişlerdir. Polipirolü elektrot yüzeyine 26 çevrim sonucunda kaplamışlardır [27].

Meliha Çubukçu ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada ksantin ve hipoksantin tayini için değıştirilmiş karbon mikro taneciğı ile altın nanotanecikleri ve ksantin oksidaz enzimi ile birlikte bir komposit elektrot hazırlamışlardır. Ksantin için sistemin iyileştirilmesinden sonra biyosensörü hipoksantin ve ksantin için karakterize etmişlerdir. Doğrusal derişim aralığını ksantin denkleminin $y=0.24x+0.712$ olduğu durum için $5,00 \times 10^{-7}$ - $1,00 \times 10^{-5}$ M, hipoksantin denkleminin $y=0.014x+0.575$ olduğu durum için $5,00 \times 10^{-6}$ - $1,50 \times 10^{-4}$ M olarak elde etmişlerdir. Elde edilen sonuçlarda ksantin ve hipoksantin biyosensörlerinin yapısında altın-nanotaneciklerini içerip içermemesi durumunu karşılaştırılmışlardır. Geliştirilmiş sistemi konserve tuna balığı örneğı tayini için kullanmışlardır ve umut verici sonuçlar elde etmişlerdir [28].

Ülkü Anık Kirgöz ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada ksantin tayini için ksantin oksidaz bağı karbon elektrot geliştirmişlerdir. Enzimatik reaksiyon kataliziyle değerlendirilen ksantin oksidaz immobilizasyonlu karbon kaplı materyali hidrojen peroksidin amperometrik tayininde biyosensör olarak kullanılmışlardır. Biyosensör için optimum çalışma koşulları araştırılmışlardır ve sırasıyla hipoksantin

ve ksantin için sistemi kalibre etmişlerdir. Sırasıyla $1,0 \times 10^{-7}$ ve $5,3 \times 10^{-6}$ M ksantin ve hipoksantin tayin sınırı ile $5,0 \times 10^{-7}$ - $4,0 \times 10^{-5}$ M ksantin derişim aralığında ve $2,0 \times 10^{-5}$ - $8,0 \times 10^{-5}$ M hipoksantin derişim aralığında biyosensör için doğrusallık elde etmişlerdir. İlaveten iyileştirme için enzim miktarı, örnek uygulaması ve kesinlik araştırılmışlardır [29].

Shengshui Hu ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları çalışmada orijinal hipoksantin sensörünü, sodyum montmorillonat-metil violojen karbon kaplı değiştirilmiş elektrot kullanarak oluşturmuşlardır. Ksantin oksidazı, polianalin film kaplı elektrot yüzeyine elektropolimerizasyon ile immobilize etmişlerdir. Hipoksantin tayinini ksantin oksidaz içeren enzimatik reaksiyonun oksijen tüketimine dayandırmışlardır. Oksijenin elektro katalitik indirgenmesini ve sensörün tepkisini dönüşümlü voltametri kullanılarak değerlendirmişlerdir. 1μ - 0,4 mM hipoksantin aralığında sensörün tepkisini doğrusal bulunmuşlardır ve minimum algılama noktası 0,8 mM bulmuşlardır. Sensörü balık etinde hipoksantin tayini için uygulanabilir ve örnekte bir arada bulunan maddelerin girişimini yok etmek için de etkili bulmuşlardır [5].

Asha Chaubey ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmada polipirol-polivinilsülfonat (PPy-PVS) filme elektrokimyasal polimerizasyon ile laktat dehidrojenaz (LDH) enzimi immobilizasyonunu glutaraldehit kullanarak çapraz bağlama yöntemiyle icra etmişlerdir. LDH- immobilizasyonlu PPy-PVS filmin karakterizasyonu FTIR ve dönüşümlü voltametri kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Bu PPy-PVS-LDH n tayin sınırı 1×10^{-4} M, cevap süresi 40 s ve raf ömrü iki hafta olduğu ve bu elektrotların 0,5 den 6 mM' a kadar L-laktat tahmini için kullanılabilir olduğu göstermişlerdir [30].

S. Ghosh ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları çalışmada balık tazeliği tespiti için amperometrik enzim elektrot geliştirmişlerdir. Bunun için balık dokusundaki hipoksantin, inosin ve inosin monofosfat miktarları ölçülmesi için polipirol iletken polimeri ve ferrosen karboksilik asit medyatörü kullanılarak hazırlanan elektrot yüzeyine ksantin oksidaz, nükleosit fosforilaz ve nükleotitaz enzimleri immobilize etmişler ve kantitatif olarak hipoksantin, inosin, inosin monofosfat miktarları

belirlemişlerdir. Hipoksantin için $1,0 \times 10^{-4}$ - $2,0 \times 10^{-3}$ M; inosin için, $1,0 \times 10^{-4}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M; inosin monofosfat için, $1,0 \times 10^{-4}$ - $1,5 \times 10^{-3}$ M olarak çalışma aralıklarını vermişlerdir [6].

C Nicola. ve arkadaşları 1986 yılında yaptıkları çalışmada iletken bir polimer olan polipirola glukoz oksidaz enziminin hapsedilmesi ile bir biyosensör hazırlamışlardır. Hazırlanan biyosensörün cevap süresi 20-40 saniye, çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-3}$ - $1,0 \times 10^{-1}$ M olarak belirlemişlerdir [31].

Mirtha Umana ve arkadaşları 1986 yılında yaptıkları çalışmada protein-modifiye elektrotlar geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, enzim varlığında pirolün elektropolimerizasyonu gerçekleştirmişlerdir ve elektrot yüzeyinde polipirrol filmin büyümesi sırasında enzimin film içine hapsolmasını sağlamışlardır. Glukoz tayinini dolaylı yoldan yapmışlar ve enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksit miktarını, hidrojen peroksidin I_2 ile +0,20 V' da indirgenmesi esasına dayanarak ölçmüşlerdir. $2,0 \times 10^{-4}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M glukoz derişim aralığında lineerlik gözlemişler ve n cevap süresini 5 dakika olarak vermişlerdir[32].

T. Maruyama ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları çalışmada pruvat oksidaz enzimini iletken bir polimer olan polipirola immobilize etmişlerdir. Serbest enzim için K_m değerini 5,6 mM iken V_{maks} değeri ise $63,4 \mu M \text{ dak}^{-1}$ ve immobilize enzim için K_m değerini 9,8 mM, V_{maks} değeri ise $54,5 \mu M \text{ dak}^{-1}$ olarak bulmuşlardır [33].

H. Gülce ve arkadaşları 1995 yılında yaptıkları çalışmada glukoz tayini için yeni bir biyosensör hazırlamışlardır. Bu çalışmada glukoz oksidaz enzimi polivinilferrosenyum yüzeye immobilize etmişler ve +0,60V'da en iyi çalışma koşullarını araştırmışlardır. Hazırladıkları enzim elektrot için çalışma aralığını, $1,0 \times 10^{-5}$ - $2,2 \times 10^{-2}$ M ve cevap süresini 40 - 60 saniye olarak bulmuşlardır. Biyosensörün 150 gün sonra başlangıç cevabının %50 'sini gösterdiğini göstermişlerdir [34].

S. B. Adeloju ve arkadaşları 1996 yılında yaptıkları çalışmada üre tayini için bir biyosensör yapmışlardır. Bu çalışmada üreaz enzimi polipirol yüzeye immobilize etmişler ve elektrot için en iyi çalışma koşulları araştırmışlardır. Üre tayini için akış injeksiyon yönteminden faydalanmışlardır [35].

John M.T. ve arkadaşları 1996 yılında yaptıkları çalışmada flavini uzaklaştırılmış ksantin oksidaz enzimi kullanılarak hipoksantin için medyatörün bulunduğu bir biyosensör hazırlamışlardır. Bu çalışmada kalsiyum klorür ile enzimden flavin adenin dinükleotit grubu uzaklaştırılarak deflavo ksantin oksidaz enzimi elde etmişlerdir. Medyatör olarak 1,1'-dimetil ferrosen kullanmışlardır. Doğal ve flavini uzaklaştırılmış enzim için reaksiyon hızlarını $10,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ve $9,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ olarak bulmuşlardır. Enzim elektrot için 150 analiz sonrasında sinyalin gözlenmediği ve 227 °K' de bir ay boyunca aktifliğini % 80 koruduğunu gözlemişlerdir [36].

Gorou Arai ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, ksantin oksidaz enzimini poli(merkaptop-benzokinon) filme immobilize etmişler, ksantin ve hipoksantin tayinleri için bir biyosensör hazırlamışlardır. Hazırladıkları biyosensörün çalışma aralığını ksantin için $1,0 \times 10^{-6}$ - $8,0 \times 10^{-5}$ M, hipoksantin için $1,0 \times 10^{-6}$ - $5,0 \times 10^{-5}$ M olarak tespit etmişlerdir [2].

F. Selampınar ve arkadaşları 1997 yılında yaptıkları çalışmada invertaz enzimini polipirol yüzeye immobilize etmişler ve sakkaroz tayini için en iyi çalışma koşullarını spektrofotometrik yöntemle belirlemişlerdir. Hazırladıkları biyosensörün 20 gün sonra % 77 cevap verdiğini göstermişlerdir [37].

Rafael Radi ve arkadaşları 1997 yılında yaptıkları çalışmada heparin kompleksine ksantin oksidaz enzimi immobilize etmişler ve kinetiğini incelemişlerdir. Immobilize edilmiş ksantin oksidazın aktifliğinin serbest ksantin oksidazınkinden farklı olduğunu göstermişlerdir. Serbest ksantin oksidaz için K_m değeri $3,0 \mu\text{M}$ iken, immobilize ksantin oksidaz için $15 \mu\text{M}$ olarak hesaplamışlardır [7].

C.A.B. Garcia ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları çalışmada iki farklı immobilizasyon tekniğini kullanarak, D-fruktoz 5-dehidrojenaz enziminin immobilizasyonu ile fruktoz tayini yapabilmek için amperometrik biyosensörler geliştirmişlerdir. Birinci biyosensörde, polipirrol film içine D-fruktoz-5-dehidrojenaz enzimi hapsedmişler, medyatör olarak sodyum ferrisiyanür kullanmışlar, ikinci biyosensörde ise ferrosiyanür destek elektrolit olarak kullanılarak polipirrol film hazırlamışlardır. Birinci biyosensörde enzim çapraz bağlama ile immobilize ederken ikinci biyosensörde hapsedme tekniği kullanmışlardır. Hazırlanan biyosensörler iki hafta süreyle 200 numuneye uygulamışlar ve pH, iyonik şiddet, cevap süresi ve girişimlerin etkisi gibi analitik parametreleri incelemişlerdir. Her iki biyosensör ile fruktoz konsantrasyonu çalışma aralığını $1,0 \times 10^{-4}$ - $8,0 \times 10^{-4}$ M olarak tayin etmişlerdir. Cevap süresini birinci biyosensör için 8 saniye, ikinci biyosensör için 15 saniye vermişlerdir [38].

Emrah Kılınç ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kobalt fitalosiyanin ve ferrosiyanür medyatörleri kullanılarak ksantin tayini için amperometrik biyosensör hazırlamışlardır. Ksantin oksidaz ve kobalt fitalosiyaninden oluşan karbon pasta elektrot hazırlamışlar ve biyosensörün optimum çalışma pH' sını 8 - 9, çalışma aralığını 1 - 15 mM olarak belirlemişlerdir. n tekrar kullanılabilirliğinin bağıl standart sapması % 10,26, cevap süresinin 30 saniye ve 60 gün boyunca bekletildiğinde birinci günkü cevabının % 60'ını gösterdiğini görmüşlerdir [8].

Cheng Qiong ve arkadaşları 1998 yılında yaptıkları çalışmada ksantin oksidaz enzimini ipek/selüloz asetat membrana immobilize ederek balık eti tazeliği tespiti için bir elektrot hazırlamışlardır. Hazırladıkları biyosensörde enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksidin ölçümünü esas almışlardır. n balık örnekleri için uzun süre kararlı ve yüksek duyarlılığa sahip olduğunu görmüşlerdir. Hipoksantin için tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonu $1,0 \times 10^{-7}$ M olarak verilirken çalışma aralığını $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M bulmuşlardır [39].

Haiyan Wang ve Shaolin Mu tarafından 1999 yılında yapılan çalışmada kolesterol oksidaz enzimini polianilin filme immobilize etmişler ve enzimin

biyoelektrokimyasal özellikleri incelemişlerdir. Amperometrik cevabı +0,60 V' ta ölçmüşlerdir. Enzim n en iyi çalışma sıcaklığını 35 ° C, en iyi çalışma pH' sını ise 7,26 olarak bulmuşlardır. Enzim katalizli reaksiyon için aktivasyon enerjisi 71,1 kJmol⁻¹ ve Km sabiti 3,26 mM olarak bulmuşlardır. Hazırladıkları biyosensörün çalışma aralığını 0,05–0,2 mM olduğu ve 11 gün sonra başlangıç cevabının % 4 'ünü gösterdiği görmüşlerdir [40].

J. C. Vidal ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları çalışmada serumda glukoz ve kolesterol tayini için bir biyosensör hazırlamışlardır. Glukoz oksidaz ve kolesterol oksidaz enzimlerini polipirol film içerisine hapsetmişler ve poli-o-fenilendiamin film ile yüzey kaplamışlardır. Biyosensörün analitik performansını bir polipirol tek tabakadan oluşan biyosensörünki ile karşılaştırmışlardır. Tek tabakalı elektrodun tayin sınırını 1,35 µM ve iki tabakalı elektrot için 0,68 µM olarak bulmuşlardır [41].

Jianhong Pei ve Xiao-yuan 2000 yılında yaptıkları çalışmada CuPtCl₆ ile hazırlanan kimyasal modifiye elektrot üzerine ksantin oksidaz enzimini immobilize ederek ksantin ve hipoksantin tayini için biyosensörler hazırlamışlardır. Enzim elektrot için pH, sıcaklık, çalışma potansiyeli parametrelerini incelemişlerdir. Biyosensörün çalışma aralığını ksantin için 6,0x10⁻⁷ - 2,0x10⁻⁴ M, hipoksantin için ise 5,0x10⁻⁷ - 2,0x10⁻⁴ M, tayin sınırını ve cevap süresini her iki substrat için sırasıyla 1,0x10⁻⁷ M ve 15 saniye bulmuşlardır. Bir hafta sonunda enzim n başlangıç amperometrik cevabının % 60' a düştüğünü görmüşlerdir [1].

Miroslav Stredansky ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmada ksantin oksidaz enzimi ile tiyofilin için seçici ve duyarlı bir biyosensör hazırlamışlardır. Amperometrik enzim n hazırlanması için süt ksantin oksidazı kullanmışlar ve bu enzimin substrat spesifikliğı üzerinde çalışmışlardır. Hazırlanan biyosensörün optimum pH' sını ksantin için 5,5 bulurken, tiyofilin için 6,5 - 8,5 olarak tespit etmişlerdir. Tiyofilin için ölçülebilen en küçük konsantrasyonu 2,0x10⁻⁷ M, çalışma aralığını 1,0x10⁻⁶ - 5,0x10⁻⁵ M olarak bulmuşlardır. Hazırlanan tiyofilin biyosensörünün kararlılığının üç aydan fazla sürdüğünü görmüşlerdir [42].

Pierro Gros ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmada yalancı referans elektrot olarak $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ içeren polipirol filmin kullanılması ile amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. D-Laktik asit tayinini için ferrisiyanür içeren polipirol filmi, pirol ve potasyum ferrosiyanürün bulunduğu sulu çözeltide doymuş kalomele karşı +0,80 V da anodik polimerizasyonla elde etmişlerdir. Bu çalışmada $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} / \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ redoks sisteminin tersinir olduğunu belirtmişler ve hazırlanan yalancı referans elektroda D-Laktat dehidrojenaz enzimini çapraz bağlamayla immobilize etmişlerdir. Hazırladıkları biyosensörün duyarlılığı $20 \mu\text{A}/\text{mM}^{-1}$, biyosensörün cevap süresi 3 dakika, çalışma aralığını $1,0 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ve tayin sınırını $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ olarak vermişler, biyosensörün depo kararlılığını 2 aydan daha fazla olduğunu açıklamışlardır [43].

F. Palmisano ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmada, glukoz ve laktat tayinlerinin aynı anda yapılması için girişimleri araştırmışlardır. Platin +0,70 V da polipirol ile 10 mM KCl çözeltisi içinde kaplanarak glukoz oksidaz ve laktat oksidaz enzimlerini yüzeye çapraz bağlama tekniği ile immobilize etmişlerdir. Glukoz ve laktat derişimlerini akış enjeksiyon sistemiyle tayin etmişlerdir. Biyosensörün duyarlılığını glukoz için $9,9 (\pm 0,1)$ ve laktat için $7,2 (\pm 0,1)$ olarak belirlemişlerdir. Depo kararlılığının ise iki aydan fazla olduğunu görmüşlerdir [44].

Asha Chaubey ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışma elektrokimyasal olarak hazırlanan polipirol-polivinilsülfonat film üzerine laktat dehidrojenaz enziminin immobilizasyonu ile laktat biyosensörü hazırlamışlardır. PPy-PVS filmin karakterizasyonu FTIR ve dönüşümlü voltametri tekniği ile yapmışlardır. PPy-PVS-LDH için cevap süresini 40 saniye, ölçülebilen en küçük derişimi $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$, raf ömrü iki haftadan fazla ve lineer derişim aralığını 0,5 - 6,0 mM olarak tespit etmişlerdir [45].

Juan C. Vidal ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmada kolesterol tayini için amperometrik bir biyosensör hazırlamışlardır. Bu çalışmada kolesterol oksidaz enzimini pirolün elektropolimerleşmesi sırasında polipirol filme hapsedilerek immobilize etmişlerdir. Hazırladıkları biyosensörün analitik özelliklerini flow-akış

sistemi ile belirlemişlerdir. Yaptıkları elektrot tipleri için cevap sürelerini şöyle açıklamışlardır:

Pt / PPy-Cox	7,5 saniye
Pt / PPy-Cox + FMN	7,5 saniye
Pt / PPy-Cox + FAD	7,4 saniye
Pt / PPy-Cox + FcMc	28,2 saniye
Pt / Pt / PPy-Cox	6,3 saniye

Elektrot tipleri için tayin sınırları ise aşağıdaki gibi tespit etmişlerdir [46].

Pt / PPy-Cox	5,70mM
Pt / PPy-Cox + FMN	12,0mM
Pt / PPy-Cox + FAD	17,0mM
Pt / PPy-Cox + FcMc	10,9mM
Pt / Pt / PPy-Cox	14,0mM

Shengshui Hu ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmada ksantin oksidaz enzimi ve polianilinden oluşan karbon pasta elektrot hazırlayarak hipoksantin tayini için bir biyosensör hazırlamışlardır. Medyatör olarak N,N-dimetil-4,4-bipiridinyum kullanılarak hipoksantin tayinini $-0,72\text{ V}$ da çözelti içindeki oksijen miktarındaki azalma miktarını belirleyerek yapmışlardır. Hazırlanan biyosensörün çalışma aralığını $1,0 \times 10^{-6} - 4,0 \times 10^{-5}\text{ M}$ ve tayin sınırını $8,0 \times 10^{-7}\text{ M}$ olarak bulmuşlardır [47].

Y. Nakabayashi ve H.Yoshikawa 2000 yılında yaptıkları çalışmada medyatör olarak ferrosenin kullanıldığı hidrojen peroksida duyarlı bir biyosensör hazırlamışlardır. Bunun için peroksidaz enzimi ferrosen ve polifenilen oksit içeren bir karbon pasta elektrot hazırlamışlardır. Biyosensörün çalışma aralığını $6,0 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-6}\text{ M}$ olarak hesaplamışlar ve 140 gün sonra %95 amperometrik cevap verdiğini göstermişlerdir [48].

H. Gülce ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları çalışmada alkol tayini için yeni bir amperometrik biyosensör hazırlamışlardır. Platin yüzeye polivinil ferrosenyum kaplamışlar ve alkol oksidaz enzimini filme hapsederek immobilize etmişlerdir. Alkol tayinini enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan hidrojen peroksidin +0,70 V' ta yükseltgenmesine dayanarak yapmışlardır. Hazırladıkları biyosensörün çalışma aralığını, metanol için $5,0 \times 10^{-4}$ - $3,7 \times 10^{-3}$ M, etanol için $5,0 \times 10^{-4}$ - $3,0 \times 10^{-3}$ M, butanol için $5,0 \times 10^{-4}$ - $6,2 \times 10^{-3}$ M, benzil alkol için $5,0 \times 10^{-4}$ - $5,2 \times 10^{-3}$ M olarak görmüşlerdir. Biyosensörün optimum sıcaklık çalışması sırasında en yüksek akım 80 °C' de elde edilmesine rağmen çalışma sıcaklığı olarak 30 °C seçmişlerdir. Optimum pH 8,0 iken metanol için Km değeri 5,78 mM olarak belirlemişlerdir. Hazırlanan biyosensörün 36 gün sonra başlangıç cevabının % 1'ini gösterdiğini görmüşlerdir [49].

Sabine Reiter ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları çalışmada osmium kompleksi ve polipirol den hazırlanan film içine hapsedilmiş glukoz oksidaz ile glukoz biyosensörü hazırlamışlardır. Camsı karbon yüzeyinde bulunan polimerin bağlı bulunduğu osmiyum kompleksinin enzimden elektron transferi gerçekleştirdiğini ve oksijen varlığında enzimatik reaksiyon sonucu hidrojen peroksit meydana geldiğini göstermişlerdir. Oksijen ile osmiyum kompleksinin enzimden gelen elektronları almak için yarıştığı yazılan bu literatürde biyosensörün çalışma aralığını $1,0 \times 10^{-5}$ – $1,5 \times 10^{-4}$ M olarak vermişlerdir [50].

Langun Mao ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları çalışmada hücre kültür ortamında hipoksantin tayini için mikro düzeyde ksantin oksidaz amperometrik biyosensörünü hazırlamışlardır. Film hidrofobik olduğu için ksantin oksidaz immobilizasyonunda nafyon kullanmışlardır. Nafyon kaplı mikroyu 5 saat ksantin oksidaz çözeltisi içinde karıştırılarak bekletmişler ve nafyon ve ksantin oksidaz ile modifiye etmişlerdir, karbon fiber üzerine polifenol elektropolimerizasyonu yapmışlardır. Hipoksantin miktarını enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksidin +0,60 V' da (Ag/AgCl) yükseltgenmesiyle belirlemişlerdir ve enzim n hipoksantin için çalışma aralığını 5,0 µM- 1,8 mM olarak, tayin sınırını ise $1,5 \times 10^{-6}$ M ve duyarlılığını 3,144 nA/mM olarak bulmuşlardır [51].

Isabella Moser ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada glukoz, laktat, glutamin ve glutamatın bir arada tayini için bir mikro elektrot geliştirmişlerdir. Glukoz oksidazı, laktat oksidaz, glutamat oksidaz, glutaminaz enzimleri hidroksietil metakrilat jeli içerisine hapsederek biyosensör hazırlamışlardır. Biyosensörün lineer derişim aralığını glukoz için; 0,1-35 mM, laktat için, 0,05-15 mM, glutamin için 0,05 – 10 mM ve glutamat için, 0,001-5 mM tespit etmişlerdir. Hazırlanan biyosensörün cevap süresini glukoz için 25 s, laktat için, 15 s, glutamin için 10 s ve glutamat için 10 s olarak vermişlerdir. Bütün bileşenler için depo kararlılığının +4 °C de 2 yıldan fazla olduğunu görmüşlerdir [52].

Sean Brahim ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada polipirol-hidrojel kompozit film kullanılarak glukoz, kolesterol ve galaktoz tayinleri için bir biyosensör geliştirmişlerdir. Hazırladıkları biyosensörün çalışma aralığını, glukoz için $5,0 \times 10^{-5}$ - $2,0 \times 10^{-2}$ M, kolestrol için $5,0 \times 10^{-4}$ - $1,5 \times 10^{-3}$ M ve galaktoz için $1,0 \times 10^{-4}$ - $1,0 \times 10^{-2}$ M olarak tespit etmişlerdir. Biyosensörün cevap süresini 40 saniye olarak tespit ederken ve 250 gün sonra biyosensörün amperometrik cevabının glukoz oksidaz ve galaktoz oksidaz için % 70, kolesterol oksidaz için % 20 olduğu göstermişlerdir [53].

H. Gülce ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada galaktoz tayini için yeni bir amperometrik enzim elektrot hazırlamışlardır. Bunun için galaktoz oksidaz enzimini polivinil ferrosenyum matriksine hapsederek immobilize etmişler ve +0,70 V sabit potansiyelde enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksidin ölçümüne dayanarak galaktoz tayini yapmışlardır. Hazırladıkları biyosensörün cevap süresini 30 - 40 saniye ve çalışma aralığını $1,0 \times 10^{-5}$ - $5,0 \times 10^{-2}$ M olarak bulmuşlardır [54].

Fang Xu ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada glukoz ve hipoksantin tayini için Pd-IrO₂ modifiye kullanarak çift enzimli bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bunun için modifiye elektrot yüzeyine ksantin oksidaz ve glukoz oksidaz enzimleri çapraz bağlanma yöntemi ile immobilize etmişler ve en iyi çalışma koşulları belirlemişlerdir. Hazırladıkları biyosensörün çalışma aralığını, glukoz için $5,0 \times 10^{-6}$ -

$2,5 \times 10^{-3}$ M, hipoksantin için $1,0 \times 10^{-6}$ - $5,0 \times 10^{-4}$ M, tayin sınırını ise, glukoz için $1,0 \times 10^{-6}$ M ve hipoksantin için $2,0 \times 10^{-7}$ M olarak bulmuşlardır. n cevap süresini, glukoz için 15 s, hipoksantin için 25 s olarak belirlemişlerdir. Biyosensörün 20 gün sonra %70 amperometrik cevap verdiği gösterilmiştir [55].

H. Zhao ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada ferrisiyanürün medyatör olarak kullanıldığı polipirol yüzeye enzimin immobilize edilmesiyle formik aside duyarlı bir biyosensör hazırlamışlardır. n çalışma aralığını, $1,0 \times 10^{-4}$ - $4,0 \times 10^{-3}$ M, tayin sınırını ise $6,0 \times 10^{-5}$ M olarak bulmuşlardır. Biyosensörün 4 gün sonunda %30 cevap verdiği göstermişlerdir [56].

H. Gülce ve arkadaşları yaptıkları çalışmada glukoz ve galaktoz tayini için çift enzimli bir biyosensör hazırlamışlardır. +0,70 V' da n en iyi çalışma koşullarını araştırmışlardır. Çalışma aralığını $5,0 \times 10^{-4}$ - $2,0 \times 10^{-3}$ M olarak bulurken ve tekrar kullanılabilirliği ile ilgili bağıl standart sapmayı %4,2 olarak tespit etmişlerdir [57].

Enrique Llaudet ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada merkezi sinir sisteminden pürinlerin ayrılmasına ilişkin üçlü enzim mikro elektrot sensörü hazırlamışlardır. Bu çalışmada, platin mikro kullanılarak laktobionamid ve amfilik polipiroidan oluşan kompozit film içine ksantin oksidaz, pürin nükleosit fosforilaz ve adenoazin deaminaz enzimleri hapsedilerek biyosensör hazırlamışlardır ve n duyarlılığının $100 - 222 \text{ mA/M.cm}^2$ ve kararlılığının 5 gün sonrasında % 100 cevap göstermesinden dolayı yüksek olduğunu görmüşlerdir. Biyosensörün cevap süresini 2 saniye ve çalışma aralığını $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M olarak vermişlerdir. [9].

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Cihazlar ve Malzemeler

3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

Elektrokimyasal analiz cihazı olarak, sabit potansiyelde akım ölçümlerinin yapıldığı ve dönüşümlü voltametri tekniğinin kullanıldığı bilgisayar bağlantılı BAS Epsilon-EC-Ver 1.40.67NT elektrokimyasal analiz cihazı kullanıldı.

3.1.2. Hücre ve elektrotlar

Amperometrik ölçümler, Şekil 3.1' de verilen üç elektrotlu hücre sisteminde yapıldı. Referans elektrot olarak BAS RE-5B no' lu Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak MW - 1032 no' lu platin tel ve çalışma elektrodu olarak 0,5 cm² yüzey alanlı polipirrol-polivinilsülfonat ile kaplanmış Pt levha elektrotlar kullanıldı.



Şekil 3.1. Kaplama ve ölçme yapmada kullanılan hücre sistemi

3.1.3. pH metre

Tampon çözeltilerinin pH' ları ORION Model 720A pH-iyonmetre cihazı ile ölçüldü.

3.1.4. Su banyosu

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

3.1.5. Mikro pipet

5 µL - 500 µL çözelti ilaveleri için Volac marka $\pm 0,05$ µL hassasiyeti olan mikro pipetler kullanıldı.

3.1.6. Argon gazı

Çözeltide çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için, inert gaz olarak Kargaz firmasından temin edilen yüksek saflıktaki (% 99,999) argon gazı kullanıldı.

3.1.7. Saf su

Çözeltilerin hazırlanmasında GFL 2104 Gesellschaft für Labortechnik mbH marka cihazından elde edilen iki kere damıtılmış su kullanıldı.

3.1.8. SEM analizi

Hazırlanan elektrotların yüzey fotoğrafları Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Kimya Mühendisliği bölümünde Joel JSM-6360LV marka cihazla yapıldı.

3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri

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

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

Kimyasal Madde	Saflık Dereceleri	Temin Edildiği Firma
Pirol (C_4H_5N)	%97, $\rho=0,966g/cm^3$	Fluka
Ürik asit ($C_5N_4O_3H_4$)	% 99	Sigma
Sodyum hidroksit (NaOH)	%96	BDH
Ksantin($C_5N_4O_2H_4$)	%99	Sigma
Hidrojen peroksit(H_2O_2)	%35, $\rho=1,13kg/L$	Merck
Sodyumdihidrojenfosfat(NaH_2PO_4)	%99	Sigma
Sodyummonohidrojenfosfat(Na_2HPO_4)	%99	Sigma
Polivinilsülfonat	%25	Aldrich
Hipoksantin($C_5N_4OH_4$)	%99	Sigma
Sodyum Perklorat($NaClO_4$)	%99,8	Sigma

3.2.1. Kullanılan çözeltiler

Enzim çözeltisi: Toplam aktifliği 100 ünite olan ksantin oksidaz enziminden 5,0 mg alındı ve saf suda çözüldükten sonra hacim ölçülü balonda 10 mL’ ye tamamlandı (10 ünite/ml). Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında bekletildi, ancak uzun süre kullanılmadığı durumlarda çözelti derin dondurucuda saklandı.

Ürik asit çözeltisi: Katı ürik asitten belli bir miktar tartılarak 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisinde çözüldükten sonra derişimi 0,1 M pH=7,4 olan fosfat tamponu ile tamamlanarak derişimi 1×10^{-3} M olan 25 mL stok ürik asit çözeltisi hazırlandı.

Ksantin çözeltisi: Katı ksantinden belli bir miktar tartılarak 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisinde çözüldükten sonra derişimi 0,1 M pH=7,4 olan fosfat tamponu ile tamamlandı derişimi 1×10^{-2} M ve 1×10^{-4} M olan 25 mL stok ksantin çözeltileri hazırlandı.

Hipoksantin çözeltisi: Katı hipoksantinden belli bir miktar tartılarak 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisinde çözüldükten sonra derişimi 0,1 M pH=7,4 olan fosfat tamponu ile tamamlandı ve derişimi 1×10^{-2} M ve 1×10^{-4} M olan 25 mL stok hipoksantin çözeltileri hazırlandı.

Sodyum hidroksit çözeltisi: Belli bir miktar sodyum hidroksit alındı ve saf suda çözüldükten sonra derişimi 0,1 M olacak şekilde 10 mL çözeltisi hazırlandı.

Sodyum perklorat çözeltisi: Belirli bir miktar sodyum perklorat alındı ve saf suda çözüldükten sonra derişimi 0,1 M olacak şekilde 10 mL çözeltisi hazırlandı.

Hidrojen peroksit çözeltisi: % 35 lik $\rho=1,13\text{kg/L}$ olan hidrojen peroksitten belirli bir miktar alınarak derişimi yaklaşık 1×10^{-2} M olacak şekilde 100 mL stok çözelti hazırlandı.

Fosfat tamponun hazırlanması: Toplam fosfat derişimi 0,1 M olacak şekilde sodyum dihidrojen fosfat ve sodyum monohidrojen fosfattan belirli miktar alınarak çözüldü ve hazırlanan çözeltinin pH' sı 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisiyle 7,4' e ayarlandı. Tampon çözeltisi kullanılmadığı zaman buzdolabında saklandı.

3.3. Platin Yüzeye Polipirol-Polivinilsülfonat (PPy-PVS) Kaplanması

Elektrot yüzeyinin temizlenmesi: Kaplama işleminden önce platin levhanın yüzeyi mekanik, kimyasal ve elektrokimyasal olarak temizlendi. Önce yüzey sıfır numara zımpara ile parlatıldı, sonra aleve tutuldu 5 dk süre ile aseton, etil alkol, derişik HCl ve derişik nitrik asit içerisinde bekletildi. Elektrot yüzeyi bol saf su ile yıkandıktan sonra 5 M H_2SO_4 içinde -2,0 V - + 2,0 V arasında tarama yapılarak elektrokimyasal

olarak temizlendi. Tekrar saf su ile yıkandı, kurutuldu ve asetonitrille birkaç kez yıkanarak yüzeydeki su uzaklaştırıldı. Her kaplama işleminden önce yüzey bu şekilde temizlendi [39].

Kaplama işlemi, temizlenmiş platin levha elektrodunun yüzeyinin iletken polimer olan polipirol-polivinilsülfonat ile kaplanması ile gerçekleşti. Polipirol-polivinilsülfonat (PPy-PVS) elektrot yüzeyine pirol ve polivinilsülfonatin elektropolimerleşmesi ile biriktirildi. Elektropolimerleşmede üçlü elektrot sistemi kullanıldı (Şekil 3.1). Çalışma elektrodu olarak platin levha ($0,5 \text{ cm}^2$), karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak da doymuş kalomel elektrot (SCE) kullanıldı. Polipirol-polivinilsülfonat, kaplamak amacıyla 0,1 M pirol, %25 ' lik polivinilsülfonat (PVS) ve saf sudan oluşan 5 mL' lik çözelti hazırlandı. Bu çözeltiye temizlenmiş platin elektrot, doymuş kalomel elektrot ve platin levha daldırıldı ve 10 dakika oksijensiz argon gazı geçirilerek çözeltideki oksijen uzaklaştırıldı. Ardından dönüşümlü voltametri cihazı ile -1000 V - +2000 V arasında 50 mV/s tarama hızında çevrim alınarak pirol ve polivinilsülfonatin platin yüzeyde elektropolimerleşmesi gerçekleştirildi. Kaplama işleminden sonra elektrot yüzeyi saf su ile yıkandıktan sonra kullanılmak üzere fosfat tamponu içinde bekletildi ve böylece platin/ polipirol-polivinilsülfonat elektrot hazırlandı. Hazırlanan polipirol-polivinilsülfonat elektrodunun yüzey filminin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile fotoğrafı alındı.

3.4. Platin/polipirol-polivinilsülfonat (Pt/PPy-PVS) Elektrodunun Hidrojen Peroksit Duyarlılığının Belirlenmesi

Bölüm 3.3' de belirtildiği şekilde hazırlanan polipirol-polivinilsülfonat kaplanmış platin elektrotlar hipoksantin ve ksantin biyosensörü yapımında kullanılacağından ve enzimatik reaksiyon sonucunda elektroaktif tür olan hidrojen peroksit oluştuğundan, bu elektrodun hidrojen peroksit duyarlılığı belirlendi.

Polipirol-polivinilsülfonat kaplanmış elektrodun duyarlılığını belirlemek için Bölüm 3.3' de kullanılan üçlü elektrot sistemli elektrokimyasal hücre kullanıldı.

Elektrokimyasal hücreye pH' sı 7,4 olan 9 mL' lik fosfat tampon çözeltisi ve 0,1 M 1 mL destek elektrolit olarak kullanılan sodyum perklorat ilave edildi. Kararlı akım elde etmek için çalışma potansiyeli olarak denenen +0,70 V sabit potansiyelde platin/polipirol-polivinilsülfonat elektrot dengeye getirildi ve kararlı akım kaydedildi. Bölüm 3.2.1' de belirtildiği gibi hazırlanan $1,0 \times 10^{-2}$ M stok çözeltisinden mikro pipet yardımıyla elektrokimyasal hücreye hidrojen peroksit ilave edildi ve +0,70 V sabit potansiyel uygulanarak her 5 dakika sonundaki akımlar kaydedildi. Hidrojen peroksit derişimine karşı akım değerleri grafiğe geçirildi ve elektrodun hidrojen perokside doğrusal cevap verdiği aralık belirlendi.

3.5. Platin/polipirol-polivinilsülfonat (Pt/PPy-PVS) Elektrodunun Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi

Bölüm 3.3' de hazırlanan platin/polipirol-polivinilsülfonat elektrodun hidrojen perokside duyarlılığını araştırırken, hidrojen peroksidin yükseltgenebilmesi için uygun potansiyelin belirlenmesi amacıyla, çeşitli çalışma potansiyellerinde kalibrasyon eğrileri çizildi. Bu potansiyeller şöyledir: 0,70 V, 0,60 V, 0,50 V, 0,40 V ve 0,30 V. Bu potansiyelerde çizilen kalibrasyon eğrilerinden en iyi çalışma potansiyeli belirlendi. Bunun için yüzey alanı $0,5 \text{ cm}^2$ olan ve Bölüm 3 .3. de belirtildiği şekilde temizlenen ve çalışma elektrodu olarak kullanılan platin levha elektrodun, en uygun çalışma potansiyelini belirlemek amacıyla Bölüm 3.3. de kullanılan üçlü elektrot sistemli elektrokimyasal hücre kullanıldı. Elektrokimyasal hücreye pH' sı 7,4 olan 9 mL' lik fosfat tampon çözeltisi ve 0,1 M 1 mL destek elektrolit olarak kullanılan sodyum perklorat ilave edildi. Kararlı akım elde etmek için ilk olarak çalışma potansiyeli olarak seçilen +0,7 V sabit potansiyelde platin/polipirol-polivinilsülfonat elektrot dengeye getirildi. Dengeye gelmesi için yaklaşık bir saat beklendi ve kararlı akım kaydedildi. Bölüm 3.2.1' de belirtildiği gibi hazırlanan $1,0 \times 10^{-2}$ M stok çözeltisinden mikro pipet yardımıyla elektrokimyasal hücreye artan derişimlerde hidrojen peroksit ilave edildi, her bir ilaveden sonra elektrokimyasal hücre 300 saniye karıştırıldı ve 200 saniye +0,70 V sabit potansiyel uygulanarak akımlar kaydedildi. Hidrojen peroksit derişimine karşı akım değerleri grafiğe geçirildi (kalibrasyon eğrisi) ve platin/polipirol-polivinilsülfonat elektrodun

hidrojen peroksida doğrusal cevap verdiği aralık belirlendi. Aynı işlemler 0,60 V, 0,50 V, 0,40 V ve 0,30 V sabit potansiyellerinde gerçekleştirildi ve düşük potansiyelde en yüksek akım farkını veren çalışma potansiyeli belirlendi.

3.6. Platin/polipirrol-polivinilsülfonat (Pt/PPy-PVS) Elektrodunda Girişim Etkisinin Çalışılması

Platin/polipirrol-polivinilsülfonat elektroduna ürik asit ve ksantin girişim etkisinin çalışılması için deneyler yapıldı.

3.6.1. Pt/PPY-PVS elektrodunun 0,3 V da ürik aside duyarlılığı

Bölüm 3.3. deki gibi hazırlanan platin/ polipirrol-polivinilsülfonat elektrodunun ürik aside duyarlılığını belirlemek için, Bölüm 3.3’ de kullanılan üç elektrot sistemli hücre kullanıldı ve Bölüm 3.4’ de anlatıldığı gibi elektrokimyasal hücre hazırlandı. Kararlı akım elde etmek için çalışma potansiyeli olarak seçilen +0,30 V sabit potansiyelde elektrot dengeye getirildi ve yaklaşık bir saat sonunda kararlı akım kaydedildi. Bölüm 3.2.1’ de belirtildiği şekilde hazırlanan $1,0 \times 10^{-3}$ M stok çözeltisinden mikro pipet yardımıyla elektrokimyasal hücreye ürik asit ilave edildi ve her bir ilaveden sonra elektrokimyasal hücre 300 saniye karıştırıldı ve 200 saniye +0,30 V sabit potansiyel uygulanarak akımlar kaydedildi. Ürik asit derişimine karşı akımlar grafiğe geçirildi ve elektrodun ürik aside doğrusal cevap verdiği belirlendi.

3.6.2. Pt/PPy-PVS elektrodunun +0,3 V da ürik asit girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.3’ de kullanılan üç elektrot sistemli hücre kullanıldı ve Bölüm 3.4’ de anlatıldığı gibi elektrokimyasal hücre hazırlandı. +0,30 V sabit potansiyelde elektrot dengeye getirildi ve yaklaşık bir saat sonunda kararlı akım kaydedildi. Ardından hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde hidrojen peroksit ilave edildi, elektrokimyasal hücre 300 saniye karıştırıldı ve 200 saniye +0,30 V sabit potansiyel uygulanarak akım kaydedildi. Ardından yine anlatıldığı şekilde hücre hazırlandı ve kararlı akım kaydedildikten sonra hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde ürik

asit ilave edildi, elektrokimyasal hücre 300 saniye karıştırıldı ve 200 saniye +0,30 V sabit potansiyel uygulanarak akım kaydedildi. Son olarak aynı koşullarda hazırlanmış hücreye kararlı akım kaydedildikten sonra hücre içi derişimleri $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde hidrojen peroksit ve ürik asit ilave edildi, elektrokimyasal hücre 300 saniye karıştırıldı ve 200 saniye +0,30 V sabit potansiyel uygulanarak akım kaydedildi. Bu üç adım sonunda elde edilen akım farkları kıyaslanarak ürik asit girişim miktarı tayin edildi.

3.6.3. Pt/PPy-PVS elektrodunun 0,3 V da ksantin girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.3' deki gibi hazırlanan platin/polipirol-polivinilsülfonat elektrodunun ksantin duyarlılığını belirlemek için, Bölüm 3.3' de kullanılan üç elektrot sistemli hücre kullanıldı ve Bölüm 3.4' de anlatıldığı gibi elektrokimyasal hücre hazırlandı. Kararlı akım elde etmek için çalışma potansiyeli olarak seçilen +0,30 V sabit potansiyelde elektrot dengeye getirildi ve yaklaşık bir saat sonunda kararlı akım kaydedildi. Bölüm 3.2.1' de belirtildiği şekilde hazırlanan $1,0 \times 10^{-2}$ M stok çözeltisinden mikro pipet yardımıyla elektrokimyasal hücreye ksantin ilave edildi ve her bir ilaveden sonra elektrokimyasal hücre 300 saniye karıştırıldı ve 200 saniye +0,30 V sabit potansiyel uygulanarak akımlar kaydedildi. Ksantin derişimine karşı akımlar grafiğe geçirildi ve elektrodun ksantine doğrusal cevap verip vermediği belirlendi.

3.7. Enzim Elektrodunun Hazırlanması

Temizlenmiş platin levha elektrodunun yüzeyinin iletken polimer olan pirol, polivinilsülfonat ve enzimle kaplanması sonucu gerçekleşti. Polipirol-polivinilsülfonat (PPy-PVS) enzim üçlüsü elektrot yüzeyine hapsedme yöntemiyle ile immobilize edildi. İmmobilizasyonda üçlü elektrot sistemi kullanıldı (Şekil 3.1). Çalışma elektrodu olarak platin levha ($0,5 \text{ cm}^2$), karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak da doymuş kalomel elektrot (SCE) kullanıldı. İmmobilizasyon için 0,1 M pirol, %25 lik polivinilsülfonat (PVS), 100 ünite/10 mL ksantin oksidaz enzim çözeltisi ve saf sudan oluşan 5 mL' lik çözelti hazırlandı. Bu

çözeltiyi temizlenmiş platin elektrot, doymuş kalomel elektrot ve platin levha daldırıldı ve 10 dakika oksijensiz argon gazı geçirilerek çözeltideki oksijen uzaklaştırıldı. Ardından dönüşümlü voltametri cihazı ile -1000 V - +2000 V arasında 50 mV/s tarama hızında çevrim alınarak platin yüzeyine immobilizasyon gerçekleştirildi. Immobilizasyon işleminden sonra elektrot yüzeyi saf su ile yıkandıktan sonra kullanılmak üzere fosfat tamponu içinde bekletildi ve böylece enzim elektrot hazırlandı. Son olarak hazırlanan enzim elektrodunun yüzey filminin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile fotoğrafı alındı.

3.8. Enzim Elektrodun Ksantine Duyarlılığının Belirlenmesi

Bölüm 3.7' de ki gibi hazırlanan enzim elektrodun ksantine duyarlılığını belirlemek amacıyla, üçlü elektrot sistemli bir elektrokimyasal hücre kullanıldı. Bu hücrede çalışma elektrodu olarak hazırlanan enzim elektrot, karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak da doymuş kalomel elektrot kullanıldı. Elektrokimyasal hücreye pH' sı 7,4 olan fosfat tampon çözelti ve 0,1 M sodyum perklorat çözeltisi ilave edildi. Bu çözeltideki fosfat derişimi 0,1 M idi. + 0,30 V sabit potansiyelde enzim elektrodun kararlı hale gelmesinden sonra, kararlı akım değeri kaydedildi ve hücreye mikro pipet yardımıyla stok ksantin çözeltisinden ilave edildi. Hücre 300 saniye karıştırıldıktan sonra hücreye 200 saniye + 0,30 V sabit potansiyel uygulayıp hücreden geçen akım kaydedildi. Daha sonra yapılan her ksantin ilavesinden sonra aynı işlemler uygulanıp akım değerleri kaydedildi ve ksantin derişimine karşı ölçülen akım değerleri grafiğe geçirildi ve ksantin için duyarlı çalışma aralığı belirlendi.

3.9. Enzim Elektroda Ürik Asidin Girişim Etkisinin İncelenmesi

Bölüm 3.7' de kullanılan üç elektrot sistemli hücre kullanıldı ve Bölüm 3.8' de anlatıldığı gibi elektrokimyasal hücre hazırlandı. + 0,30 V sabit potansiyelde elektrot dengeye getirildi ve yaklaşık bir saat sonunda kararlı akım kaydedildi. Ardından hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde ksantin ilave edildi, elektrokimyasal hücre 300 saniye karıştırıldı ve 200 saniye +0,30 V sabit potansiyel uygulanarak akım kaydedildi. Ardından yine anlatıldığı şekilde hücre kuruldu ve kararlı akım

kaydedildikten sonra hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde ürik asit ilave edildi, elektrokimyasal hücre 300 saniye karıştırıldı ve 200 saniye +0,30 V sabit potansiyel uygulanarak akım kaydedildi. Son olarak aynı koşullarda hazırlanmış hücreye kararlı akım kaydedildikten sonra hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde ksantin ve ürik asit ilave edildi, elektrokimyasal hücre 300 saniye karıştırıldı ve 200 saniye +0,30 V sabit potansiyel uygulanarak akım kaydedildi. Üç adım sonunda elde edilen akım farkları kıyaslanarak ürik asit girişim yapıp yapmadığı belirlendi.

3.10. Metilen Mavisinin İndirgenme Potansiyelinin Belirlenmesi

Metilen mavisi, ksantin veya hipoksantin ürik aside dönüşümü sırasında reaksiyonu katalizleyen ksantin oksidazdan oksijensiz ortamda elektron alıcısı olarak görev yaptı. Elektronlar moleküler oksijen yerine metilen mavisine aktarıldı [9].

Üçlü elektrot sistemi kullanıldı (Şekil 3.1). Çalışma elektrodu olarak platin levha ($0,5 \text{ cm}^2$), karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak da doymuş kalomel elektrot (SCE) kullanıldı. Metilen mavisinin dönüşümlü voltametri (CV) ile indirgenme potansiyelinin belirlenmesi için, hücre içi derişimi 1×10^{-2} M metilen mavisi, 0,1 M sodyumperklorat ve pH' sı 7,4 fosfat tamponu içeren 5 mL' lik çözelti hazırlandı. Ardından dönüşümlü voltametri cihazı ile -1200 V - +900 V arasında 200 mV/s tarama hızında çevrim alınarak metilen mavisinin CV' si çekildi ve metilen mavisinin indirgenme potansiyeli belirlendi.

3.11. Pt/PPy-PVS Elektrodunun Metilen Mavili ve Oksijensiz Ortamda Ksantin Derişimine Duyarlılığı

Bölüm 3.3' deki gibi hazırlanan platin/polipirol-polivinilsülfonat elektrodunun ksantin duyarlılığını belirlemek için, Bölüm 3.3' de kullanılan üç elektrot sistemli hücre kullanıldı ve 100 ünite/10 mL ksantin oksidaz, pH' sı 7,4 fosfat tamponu, 0,1 M sodyumperklorat ve metilen mavisi içeren elektrokimyasal hücre hazırlandı. Hücre oksijenli ortama kapatıldı ve hazırlanan çözelti içindeki çözünmüş oksijenin

uzaklaşması için, hücre içinden 5 dakika oksijensiz argon gazı geçirildi. Kararlı akım elde etmek için çalışma potansiyeli olarak seçilen + 0,30 V sabit potansiyelde elektrot dengeye getirildi ve yaklaşık bir saat sonunda kararlı akım kaydedildi. Bölüm 3.2.1' de belirtildiği şekilde hazırlanan $1,0 \times 10^{-2}$ M stok çözeltisinden mikro pipet yardımıyla elektrokimyasal hücreye ksantin ilave edildi ve her bir ilaveden sonra elektrokimyasal hücreden 300 saniye argon gazı geçirildi, hücre 300 saniye karıştırıldı ve 200 saniye +0,30 V sabit potansiyel uygulanarak akımlar kaydedildi. Ksantin derişimine karşı akımlar grafiğe geçirildi ve elektrodun ksantine doğrusal cevap verdiği belirlendi.

3.12. Enzim Elektrodun Metilen Mavili ve Oksijensiz Ortamda Ksantine Duyarlılığı

Bölüm 3.7' de ki gibi hazırlanan enzim elektrodun ksantine duyarlılığını belirlemek amacıyla, üçlü elektrot sistemli bir elektrokimyasal hücre kullanıldı. Bu hücrede çalışma elektrodu olarak hazırlanan enzim elektrot, karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak da doymuş kalomel elektrot kullanıldı. Elektrokimyasal hücreye pH' sı 7,4 olan fosfat tampon çözelti, hücre içi derişimi 1×10^{-3} M metilen mavisi, 0,1 M sodyum perklorat çözeltisi ilave edildi ve hücre oksijensiz ortama kapatıldı. Hazırlanan hücre içinden 5 dakika argon gazı geçirildi. + 0,30 V sabit potansiyelde enzim elektrodun kararlı hale gelmesinden sonra, kararlı akım değeri kaydedildi ve hücreye mikro pipet yardımıyla stok ksantin çözeltisinden ilave edildi. Hücreden 300 saniye oksijensiz argon gazı geçirildi, hücre 300 saniye karıştırıldı ve 200 saniye +0,30 V sabit potansiyel uygulanıp hücreden geçen akım kaydedildi. Daha sonra yapılan her ksantin ilavesinden sonra aynı işlemler uygulanıp akım değerleri kaydedildi ve ksantin derişimine karşı ölçülen akım değerleri grafiğe geçirildi ve ksantin için duyarlı çalışma aralığı belirlendi.

3.13. Enzim Elektrodunun Metilen Mavili ve Oksijensiz Ortamda Hipoksantine Duyarlılığı

Bölüm 3.12’ de anlatılan işlemlerin aynısı hipoksantin substratı için uygulandı ve hipoksantin için doğrusal çalışma aralığı belirlendi.

3.14. Enzim Elektrodunun En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Enzim elektrodun çalışma koşullarının belirlenmesi için elektrot için pH’ nın etkisi, sıcaklığın etkisi, substrat derişiminin etkisi ve enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü belirlenmesi çalışıldı.

3.14.1. pH’ nın etkisi

Bölüm 3.7’ de ki şekilde hazırlanan ve kararlı hale getirilen biyosensörün cevabına pH’ nın etkisini belirlemek için hipoksantin derişimi 1×10^{-4} M olan çalışma çözeltisinin pH’ sı 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 7,75; 8,0; 8,5; 9,0 olarak değiştirildi. Bu çözeltelerde tampon derişimi 0,1 M’ dı. Her bir çözelti + 0,30 V’ da ki akım değerleri için Bölüm 3.12’ de ki şekilde okunarak pH’ ya karşı grafiğe geçirildi ve optimum çalışma pH’ sı belirlendi.

3.14.2. Sıcaklığın etkisi

Hazırlanan ve kararlı hale getirilen biyosensörün cevabına sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 25 – 60 °C sıcaklık aralığında 8 farklı sıcaklıkta (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60) biyosensörün 1×10^{-4} M hipoksantine amporemetrik cevabı ölçüldü ve sıcaklığa karşı ölçülen akım değerleri grafiğe geçirildi.

3.14.3. Substrat derişiminin etkisi

Bölüm 3.7’ deki gibi hazırlanan ve kararlı hale getirilen biyosensörün ksantine cevabının ve çalışma aralığının belirlenmesi için 5×10^{-6} – 1×10^{-3} M derişim aralığındaki hipoksantin çözeltilerine karşı biyosensörün amporemetrik cevabı ölçüldü ve hipoksantin derişimine karşı grafiğe geçirildi (Michaelis – Menten eğrisi). Bu grafikten yararlanılarak biyosensörün tayin sınırı ve çalışma aralığı belirlendi. Ayrıca elde edilen verilerden Lineweaver – Burke Grafiği çizildi ve ksantin oksidaz enzimine özgü olan K_M gözlenen, V_{maks} gözlenen değerleri belirlendi.

3.14.4. Enzim elektrodunun tekrar kullanabilirliğinin belirlenmesi

Bölüm 3.7’ e göre hazırlanan ve dengeye getirilen biyosensörün optimum şartlarda tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için 1×10^{-4} M hipoksantin derişiminde arka arkaya yapılan 20 ölçüm sonucu elde edilen amperometrik cevap akımlarına karşı ölçme sayısı grafiğe geçirildi ve bu grafikten ölçülen akım değişimleri kullanılarak aktiflikteki azalma değeri hesaplandı.

3.14.5. Enzim elektrodunun raf ömrünün belirlenmesi

Hazırladığımız biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi amacıyla 30 gün boyunca biyosensör +4 °C de buzdolabında bekletildi ve farklı günlerde 7 defa olmak üzere sabit hipoksantin derişimde (1×10^{-4} M) amporemetrik cevabı ölçüldü. Saklama süresine karşı amperometrik cevap grafiğine geçirilerek enzim elektrodun raf ömrü belirlendi.

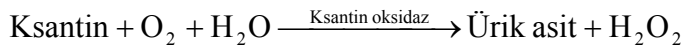
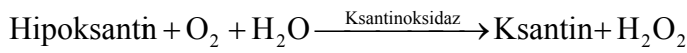
3.15. Balık Eti Numunesinde Hipoksantin Tayini

Balık eti numunesini hazırlamak için, 3 gram balık eti karıştırıcıdan geçirildi ve 15 mL saf su ile homojenize edildi. Ardından bu karışım süzüldü ve süzöntü 100 mL’ ye tamamlandı [58].

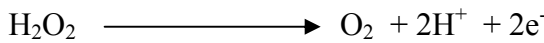
Tayin için standart ekleme yönteminden yararlanıldı ve Bölüm 3.7' de ki gibi hazırlanan enzim elektrodun balık etindeki hipoksantin miktarının belirlenmesi amacıyla, üçlü elektrot sistemli elektrokimyasal hücre kullanıldı. Bu hücrede çalışma elektrodu olarak hazırlanan enzim elektrot, karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak da doymuş kalomel elektrot kullanıldı. Elektrokimyasal hücreye pH' sı 7,75 olan fosfat tampon çözelti, hücre içi derişimi 1×10^{-3} M metilen mavisi ve 0,1 M sodyum perklorat çözeltisi ilave edildi. Hazırlanan hücre içinden 5 dakika argon gazı geçirildi. +0,30 V sabit potansiyelde enzim elektrodun kararlı hale gelmesinden sonra, kararlı akım değeri kaydedildi ve hücreye hazırlanmış balık eti numunesi çözeltisinden 1 mL ilave edildi. Hücreden 300 saniye oksijensiz argon gazı geçirildi, 300 saniye karıştırıldı ve 200 saniye +0,30 V sabit potansiyel uygulanıp hücreden geçen akım kaydedildi. Ardından hücreye sırasıyla 1×10^{-5} , $2,5 \times 10^{-5}$, 5×10^{-5} M hipoksantin çözeltileri ilave edildi ve sırasıyla aynı akım okuma işlemleri uygulandı. Bu işlem bir, iki, beş, yedi günlük balık numunelerinde tekrarlandı ve tazeliğini yitiren balık numunesinde hipoksantin miktarının nasıl değiştiğine bakıldı.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada ksantin ve hipoksantine duyarlı bir amperometrik enzim elektrot hazırlandı. Bu amaçla platin bir yüzey üzerine iletken polimer olan polipirrol-polivinilsülfonat kaplandı. Çalışmada amporemetrik bir biyosensör yapılması düşüncesi, ksantin oksidaz enzimi varlığında ksantini veya hipoksantini aşağıdaki reaksiyona göre hidrojen peroksit oluşturmaya dayanmaktadır [1].

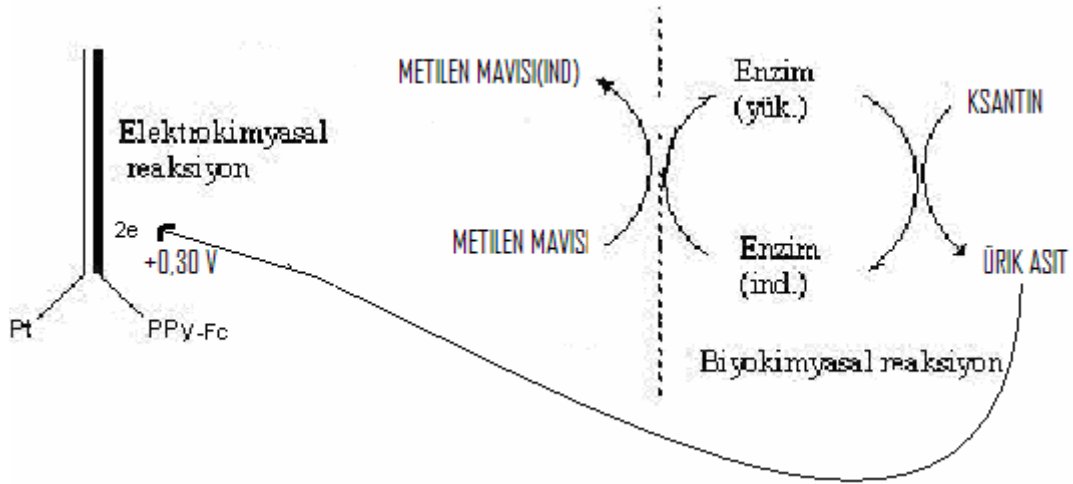


Bilindiği üzere hidrojen peroksit platin elektrot yüzeyinde sabit bir potansiyelde aşağıdaki reaksiyona göre yükseltgenmektedir [1, 40, 41].



Yükseltgenmenin meydana geldiği bir potansiyelde çalışıldığında devreden geçen anodik akım oluşan hidrojen peroksidin derişimi, dolayısıyla ksantin derişimi ile orantılıdır [1, 5]. Bu çalışmada ksantin oksidaz enziminin polipirrol-polivinilsülfonat içeren filme hapsedme yöntemiyle immobilizasyonu ile hazırlanan biyosensörün çalışma prensibi benzer reaksiyonlara dayanmaktadır. Yapılan çalışmalarda ürün olarak oluşan ürik asidin de yükseltgenmenin meydana geldiği potansiyellerde yükseltgendiği ve devreden geçen anodik akımın sadece oluşan hidrojen peroksitten değil ürik asitten de kaynaklandığı tespit edilmiştir ve bu girişimin engellenmesi gerekti. Ortamda metilen mavisi bulunduğunda ksantin ürik aside dönüşümü sırasında reaksiyonu katalizleyen ksantin oksidazdan elektron alıcısı olarak metilen mavisi görev yapar [10]. Bu nedenle oksijensiz ortamda ortama metilen mavisi katılmasına karar verildi. Böylece ortamda oksijen olmadığı zaman ksantin oksidazdan elektron alıcısı olarak metilen mavisi görev yaptı ve kendisi kimyasal reaksiyonla indirgenmiş formuna dönüşürken hipoksantin veya ksantinde kimyasal olarak ürik aside yükseltgendi. Oluşan ürik asit ise elektroaktif ürün olduğundan

uygulanan potansiyelde referans elektrotu karşı elektrokimyasal olarak yükseltgendi ve yükseltgenmenin meydana geldiği potansiyelde çalışıldığında devreden geçen anodik akım oluşan ürik asit derişimi, dolayısıyla ksantin veya hipoksantin derişimi ile doğru orantılı oldu. Bu çalışmada kullanılan metot örneğine literatürde herhangi bir şekilde karşılaşılmamıştır. Bu nedenle çalışmamız orijinal bir çalışmadır. Bu çalışmada Pt/PPy-PVS elektrodu ile enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan ürik asidin dolayısıyla ksantin veya hipoksantin ölçülmesinde çözeltide ve elektrot yüzeyinde gerçekleşen olaylar şematik olarak Şekil 4.1’ de gösterilmektedir.



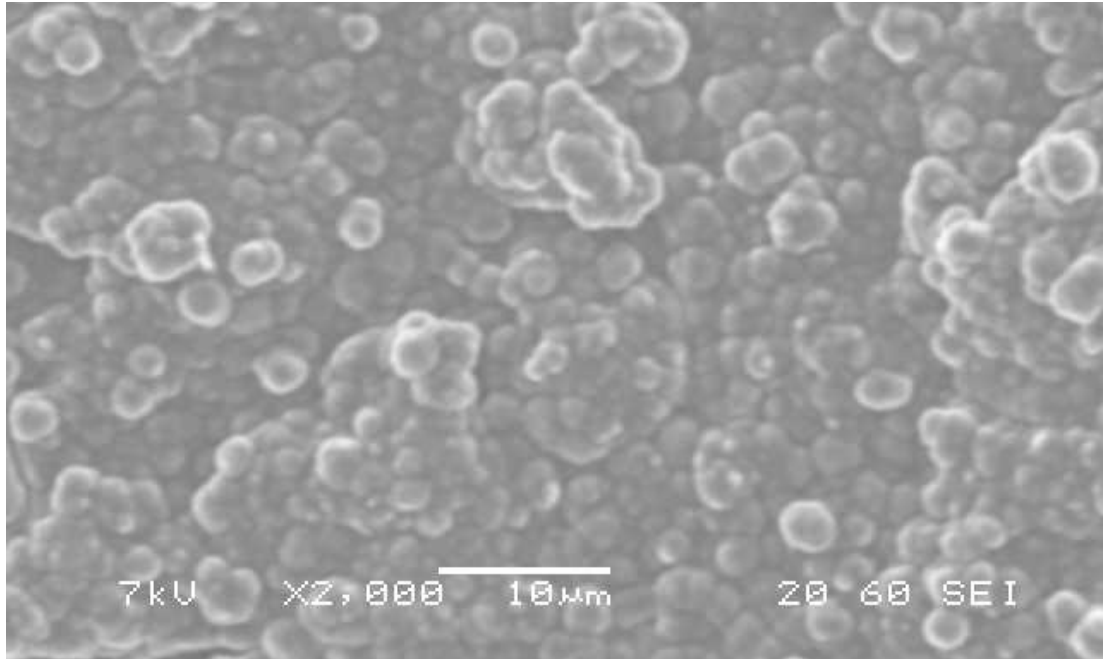
Şekil 4.1. Ksantin ürik aside yükseltgenmesi sırasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron aktarımı

Şemaya göre ksantin elektronlarını enzime vererek ürik aside yükseltgenir. Elektronları alan enzim indirgenir, enzimin aktif merkezindeki elektron aktarımları Bölüm 2.2’ de anlatıldığı gibi gerçekleşir. Yeni bir substrat molekülü ile reaksiyona girebilmesi için enzimin yeniden yükseltgenmesi gerekir, bu nedenle enzim elektronları metilen mavisine vererek yeniden yükseltgenmiş hale geçer. Ortamda yeterli derişimde metilen mavisine olduğundan substrat bitene kadar enzim elektronlarını metilen mavisine aktarmaya devam edip enzim yükseltgenmiş haline döner. Ardından oluşan ürik asit +0,30 V da elektrot yüzeyinde elektrokimyasal olarak yükseltgenir. Metilen mavisine burada oksijen görevi görmektedir ve enzimden gelen elektronları alıp indirgenmektedir. Çalışmada enzim elektrodun hazırlanması

için optimum koşullar, çalışma pH' sı, çalışma sıcaklığı, raf ömrü ve tekrarlanabilirliği gibi parametreler incelenmiş ve ilgili sonuçlar ve yorumlar aşağıda verilmiştir. Son olarak ise balık eti numunesinde, balık eti tazeliğine bağlı olarak hipoksantin miktarının nasıl değiştiği incelendi ve yorumlandı.

4.1. Platin Yüzeye Polipirol-polivinilsülfonat Kaplanması

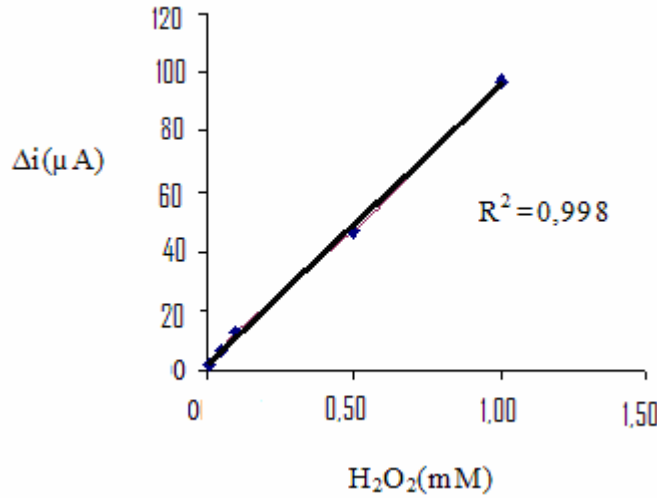
Pt yüzeye polipirol-polivinilsülfonat kaplanması ile ilgili literatürde pek çok çalışma mevcuttur [28]. Ancak bizim çalıştığımız şartlarda ve sistemlerde kaplama koşullarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla platin yüzeye polipirol-polivinilsülfonatın elektropolimerleşmesi çevrim alınarak polimerleştirme yoluyla kaplama yapıldı, çünkü literatürde elektropolimerleşme için çevrim alınarak yapılan kaplamaların daha homojen olduğu belirtilmektedir [45]. Çevrim alarak kaplama yapmamızın diğer bir nedeni ise, yaptığımız sistemde yük sayarak film kalınlığını tespit etmek mümkün olmadığından çevrim yolu ile bağl film kalınlıklarının etkisini incelemektir. Platin elektrot yüzeyinin polipirol-polivinilsülfonat ile çevrim alınarak kaplanmasında çevrim -1,0 V - +2,0 V potansiyel aralığında yapıldı. Elektron yüzeyindeki filmin kalınlaşması ile elektron aktarımı zorlaşmakta ve akımda azalmalar meydana gelmektedir. PPy-PVS filmin renginin kalınlık arttıkça siyah renk olduğu görüldü. Hazırlanan Pt/PPy - PVS elektrot yüzeyindeki filmin taramalı elektron mikroskobu ile çekilen fotoğrafı Resim 4.1' de görülmektedir. Bu fotoğrafta polipirol-polivinilsülfonatın şeklinin düzensiz karnabahar olduğu gözlemlendi. Filmin içeriğindeki atomların tespitinde ise polipirol-polivinilsülfonat yapısında bulunan azot karbon hidrojen ve oksijen gibi atomları cihaz göremedi, çünkü bu atomları teşhis edebilecek güçte değildi.



Resim 4.1. Polipirol-polivinilsülfonat filmin SEM ile alınmış fotoğrafı

4.2. Platin/polipirol-polivinilsülfonat Elektrodun Hidrojen Peroksit Duyarlılığı

Platin elektrodun yüzeyi polipirol-polivinilsülfonat ile kaplandığında hidrojen peroksit duyarlılığının olup olmayacağını incelemek amacıyla Bölüm 3.3’ deki gibi hazırlanan Pt/PPy-PVS elektrodun hidrojen peroksit duyarlılığı incelendi. Bu amaçla hidrojen peroksit derişime karşı + 0,70 V da elde edilen akımlar grafiğe geçirildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.2’ dedir. Buradan da görüleceği gibi 1×10^{-5} - 1×10^{-3} M hidrojen peroksit derişim aralığında polipirol-polivinilsülfonat kaplanmış elektrodun hidrojen peroksit doğrusal cevap verdiği gösterildi.

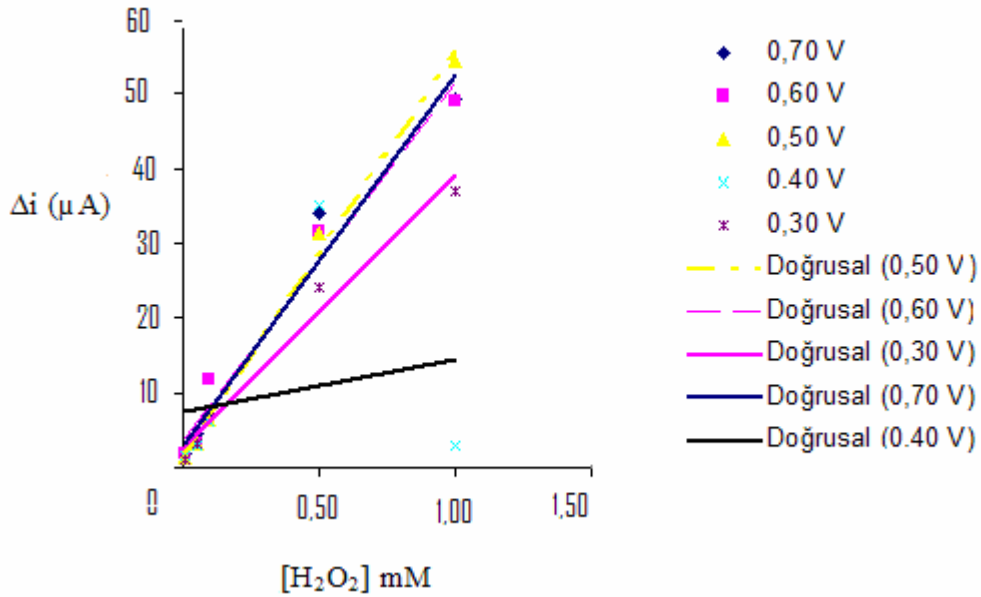


Şekil 4.2. Pt/PPy-PVS kullanılarak hidrojen peroksit derişimi ile akım arasındaki ilişkinin incelenmesi

4.3. Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi

Biyosensör yapımı için kullanılacak Pt/PPy-PVS elektrodunun hidrojen perokside duyarlılığı incelenirken, hidrojen peroksidin yükseltgenmesi için çeşitli potansiyelerde çalışmalar yapılarak hidrojen peroksit derişimine karşı akım değerleri grafiğe geçirildi (Bkz. Şekil 4.3). Şekil incelendiğinde, akım değışmelerinin en yüksek olduğu eğrinin +0,70 V, +0,60 V ve +0,50 V elde edildiğı gözlemlendi ancak bu potansiyelde numune ortamında bulunan ksantin ve hipoksantin dışındaki maddeler kolaylıkla yükseltgenebileceğinden bu potansiyelde çalışmamaya karar verildi. Sonuç olarak akım sıçramalarının yüksek, doğrusallığın en iyi olduğu ve girişim etkisinin en düşük olduğu +0,30 V' luk potansiyelde çalışmaya karar verildi.

Literatürde farklı potansiyelde çalışmalara rastlanmıştır. Bunların büyük bir kısmı +0,70 V olmak üzere +0,60 V ve + 0,20 V daki çalışmalarda bulunmaktadır [6, 23, 59].

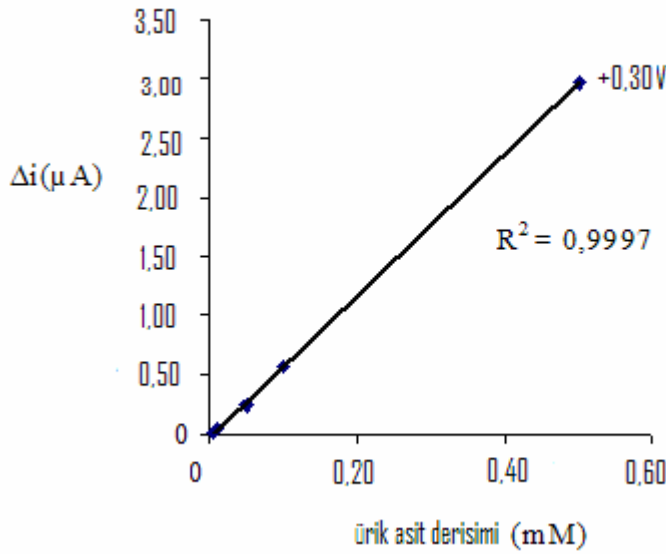


Şekil 4.3. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi için hidrojen peroksit derişimine karşı akım grafiğı

4.4. Platin/ polipirol-polivinilsülfonat (Pt/PPy-PVS) Elektrodunda Girişim Etkisi

4.4.1. Platin/polipirol-polivinilsülfonat elektrodunun + 0,3 V da ürik aside duyarlılığı

Bölüm 3.3' deki gibi hazırlanan Pt/PPy-PVS elektrodunun ürik aside duyarlı olup olmadığı incelendi. Bu amaçla ürik asit derişimine karşı + 0,30 V da elde edilen akımlar grafiğı geçirildi ve elde edilen eğri Şekil 4.4' de verildi. Buradan da görüleceğı gibi hazırladığımız elektrot artan ürik asit derişimlerine orantılı şekilde artan akım verdi. Bu ise ksantin oksidazın katalizlediğı, ksantinden ürik asit ve hidrojen peroksit oluşması reaksiyonunda devreden geçen anodik akımın ürik asit ve hidrojen peroksitten kaynaklanacağını göstermektedir. Sonuç olarak ortamdan ya ürik asidin ya da hidrojen peroksidin uzaklaştırılması gerekti.



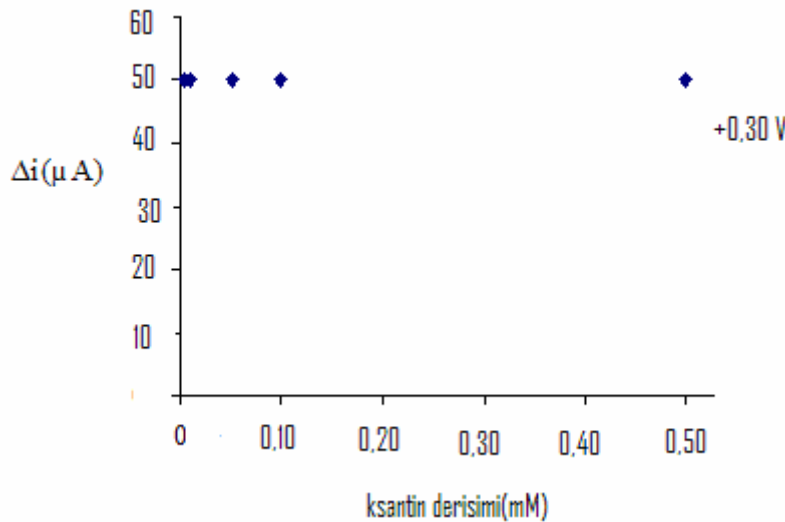
Şekil 4.4. Pt/PPy-PVS elektrodu kullanılarak ürik asit derişimi ile akım arasındaki ilişkinin incelenmesi

4.4.2. Platin/polipirol-polivinilsülfonat elektroduna + 0,3 V’ da ürik asit girişim etkisi

Bölüm 3.3’ de hazırlanan Pt/PPy-PVS elektrodunun çalışma potansiyeli olarak karar verilen +0,30 V’ da elektrokimyasal hücrede tek başına ürik asit, tek başına hidrojen peroksit ve ikisinin karışımı bulunduğu zaman nasıl bir anodik akım farkı vereceği araştırıldı. Bunun için sabit bir çalışma derişimi olarak 1×10^{-4} M substrat derişimi seçildi ve aynı şartlar altında hücreden geçen anodik akımlar karşılaştırıldı. Sonuç olarak tek başına devreden geçen hidrojen peroksit anodik akımı yanında tek başına devreden geçen ürik asit anodik akımının daha düşük olduğu gözlemlendi ancak ürik asit ve hidrojen peroksit aynı elektrokimyasal hücre içinde bulunduklarında devreden tek başlarına verdikleri anodik akım toplamı kadar anodik akımın geçtiği gözlemlendi. Bu durum sayısal olarak anlatılmak istendiğinde hidrojen peroksit ve ürik asidin ikisinin birlikte bulunduğu hücrede ürik asidin hidrojen peroksit anodik akımına % 13’ luk bir girişim yaptığı gözlemlendi.

4.4.3. Platin/polipirol-polivinilsülfonat elektroduna + 0,3 V' da ksantin girişim etkisi

Bölüm 3.3' de hazırlanan Pt/PPy-PVS elektrodun çalışma potansiyeli olarak karar verilen +0,30 V' da ksantine duyarlı olup olmadığı incelendi. Bu amaçla ksantin derişimine karşı +0,30 V da elde edilen akımlar grafiğe geçirildi ve elde edilen eğri Şekil 4.5' de verildi. Şekilden de görüldüğü gibi artan ksantin derişimlerine karşı anodik akımda herhangi bir değişim olmadı. Buda bize çalışma potansiyelinde substrat olarak kullanacağımız ksantinin girişim yapmadığını gösterdi.



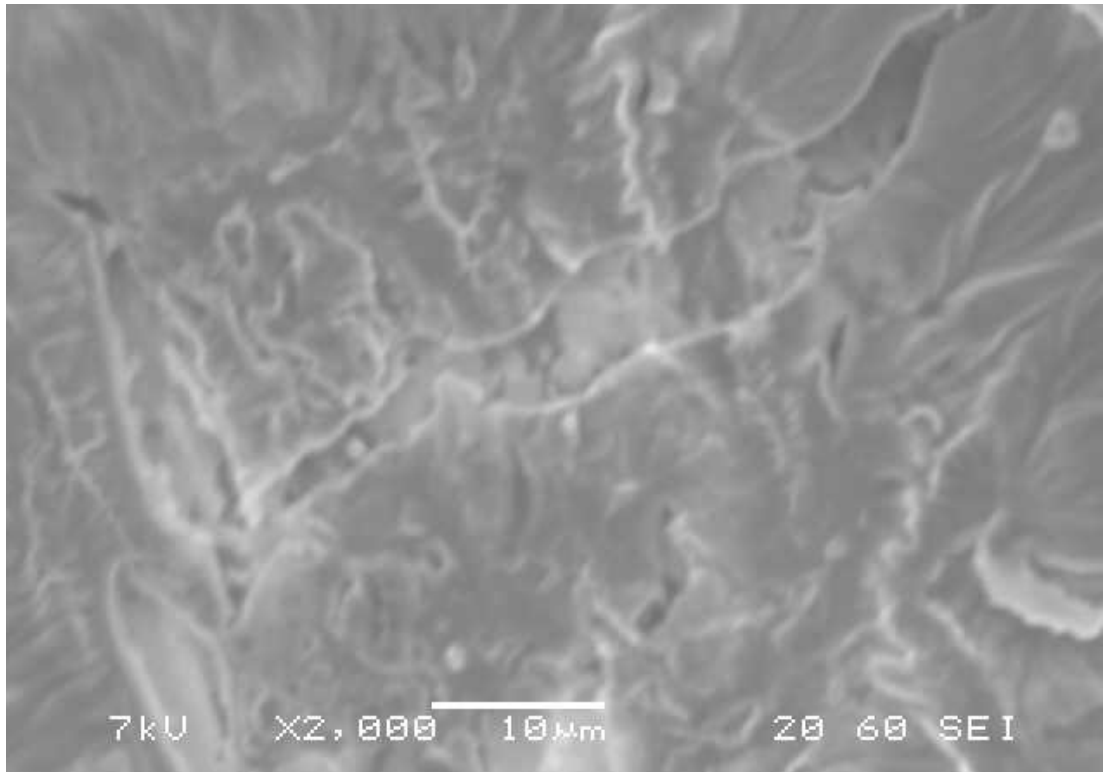
Şekil 4.5. Pt/PPy-PVS elektrodu kullanılarak ksantin derişimi ile akım arasındaki ilişkinin incelenmesi

4.5. Enzim Biyosensörünün Hazırlanması

Ksantin ve hipoksantin duyarlı bir biyosensör hazırlamak amacıyla optimum koşullarda polipirol-polivinilsülfonat filme ksantin oksidaz enzimi immobilize edildi. Literatürde iletken polimerler üzerine immobilizasyon için çeşitli metotlar verilmektedir [33, 37, 44, 55, 57]. Yaptığımız çalışmada ksantin oksidaz enzimini polipirol-polivinilsülfonat filme hapsedme yöntemini ile immobilize edildi [6]. Bunun için ksantin oksidaz enzimi, polipirol ve polivinilsülfonattan oluşan çözelti hazırladık ve elektrokimyasal olarak platin levhaya immobilize olmaları sağlandı. Polipirol

polimerleşme reaksiyonu sırasında, yükseltgenen monomer olan polipirrol radikal katyon oluşturdu ve yeni monomer katılmasını takibenden elektron aktarımları sonucunda yüzeyde artı yüklü polipirrol polimer zincirleri oluştu. Bu oluşum sırasında ortamda negatif yüklü olarak bulunan polivinilsülfonat polimeri ve negatif yüklü olarak bulunan ksantin oksidaz enzimi elektrostatik çekim ile yüzeye taşındı.

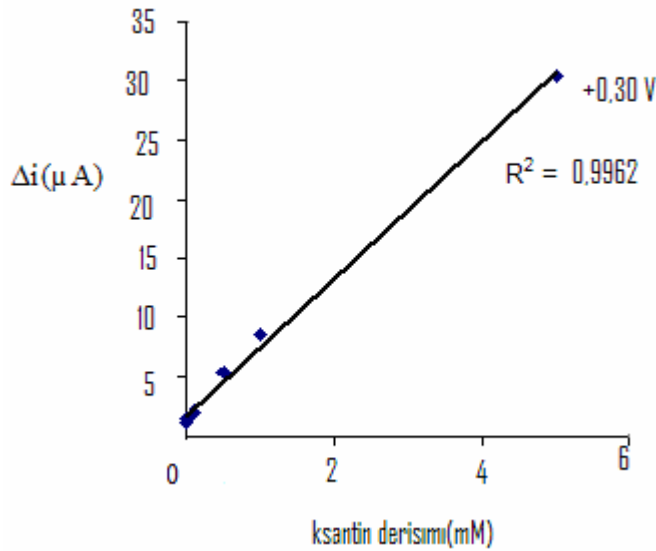
İmmobilizasyon işleminden sonra elektrot yüzeyinin SEM analizleri yapıldı (Resim 4.2). Filmin içeriğine bakıldığında PPy-PVS filmindekinden farklı olarak dallanmaların olduğu görülmüştür.



Resim 4.2. Enzim elektrodun SEM ile alınmış fotoğrafı

4.6. Enzim Elektrodun Ksantine Duyarlılığının Belirlenmesi

Pt/PPy-PVS elektrodunun hidrojen peroksit duyarlı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmişti. Aynı şekilde enzim elektrodunda ksantine duyarlı olması beklendi. Bunun için elektrodun 3.8’ de anlatıldığı şekilde ksantine duyarlı olup olmadığı belirlendi ve ksantin derişimine karşı amporemetrik akım farkları grafiğe geçirildi (Bkz. Şekil 4.6). Şekilden de görüleceği gibi bu şekilde hazırlanan enzim elektrodun ksantine duyarlı olduğu görüldü.



Şekil 4.6. Enzim sensörünün ksantine duyarlılığının incelenmesi

4.7. Enzim Elektroda Ürik Asidin Girişim Etkisinin İncelenmesi

Hazırladığımız Pt/PPy-PVS elektrot hidrojen peroksit derişimi yanında ürik aside de duyarlıydı artan derişim miktarlarına orantılı olarak anodik akım vermişdi. Bu girişimin enzim elektrotta da olup olmadığını anlamak için Bölüm 3.9’ da anlatıldığı şekilde ilk olarak ksantin daha sonra ürik asidin tek başlarına oluşturdukları akımlar belirlendi ve ardından aynı derişime denk gelecek şekilde hazırlanan ürik asit ve ksantin karışımının oluşturduğu akım değeri okundu. Sonuç olarak Pt/PPy-PVS elektrotta olduğu gibi enzim elektrotta da ürik asidin girişi yaptığı ve ksantin ve ürik asit karışımında tek başlarına verdikleri akımın toplamı kadar akım verdiği gözlemlendi.

Sonuç olarak bu girişimin ortadan kaldırılması için bir çözüm yolu bulunması gerekti. Bunun içinde ya ksantinden ksantin oksidaz katalizliğinde oluşan hidrojen peroksidin ya da aynı şekilde oluşan ürik asidin ortamdan uzaklaştırılmasına karar verildi.

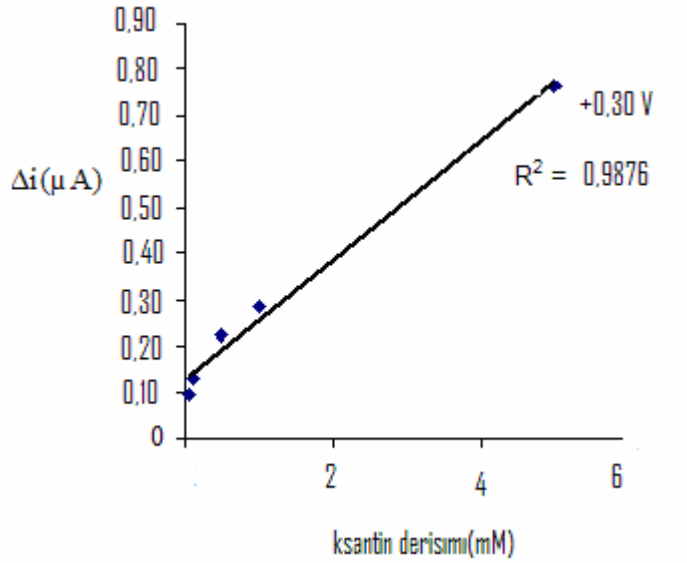
4.8. Metilen Mavisinin İndirgenme Potansiyelinin Belirlenmesi

Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarını belirlemek için yapılan çalışmalarda görüldü ki sadece hidrojen peroksit duyarlı elektrot olarak tasarlanan enzim elektrot aynı zamanda aynı ortamda ürün olarak oluşan ürik aside de duyarlılık gösterdi. Bu sorun için literatürden edinilen bilgiden yararlanıldı. Ortamda metilen mavisinin varlığında hipoksantin ürik aside dönüşümü sırasında reaksiyonu katalizleyen ksantin oksidazdan elektron alıcısı olarak metilen mavisinin görev yapar [10]. Bu bilgiden yararlanılarak ortam oksijensiz hale getirilerek hipoksantin ya da ksantin metilen mavisinin varlığında ksantin oksidaz enzimi katalizliğinde sadece ürik asit oluşturması ve oluşan ürik asidin elektroaktif tür olmasından dolayı çalışma potansiyelinde elektrokimyasal olarak yükseltgenip ksantin veya hipoksantine denk gelecek anodik akımı oluşturması düşünüldü. Bu düşüncenin uygulanabilmesi için çalışma potansiyelinde metilen mavisinin yükseltgenmemesi gerekiyordu. Çalışılan potansiyelde metilen mavisinin yükseltgenip yükseltgenmediğini anlamak için dönüşümlü voltametri ile metilen mavisinin indirgenme potansiyeli -0,75 V olarak belirlendi. Metilen mavisinin indirgenme potansiyeli yorumladığında çalıştığımız potansiyelde yükseltgenecek bir değer olmadığı sonucuna varıldı ve bu yöntemde çalışmaya karar verildi.

4.9. Platin/polipirol-polivinilsülfonat Elektrodunun Metilen Mavili ve Oksijensiz Ortamda Ksantin Derişimine Duyarlılığı

Yönteme karar verdikten sonra bu yöntemle Pt/PPy-PVS elektrodun serbest enzimli ortamda ksantine duyarlı olup olmadığı belirlendi. Bunun için Bölüm 3.11’ de anlatıldığı gibi elektrodun ksantin derişimine duyarlı olup olmadığı incelendi ve Şekil 4.7’ da görüldüğü gibi elektrodun ksantine duyarlı olduğu belirlendi. Sonuç

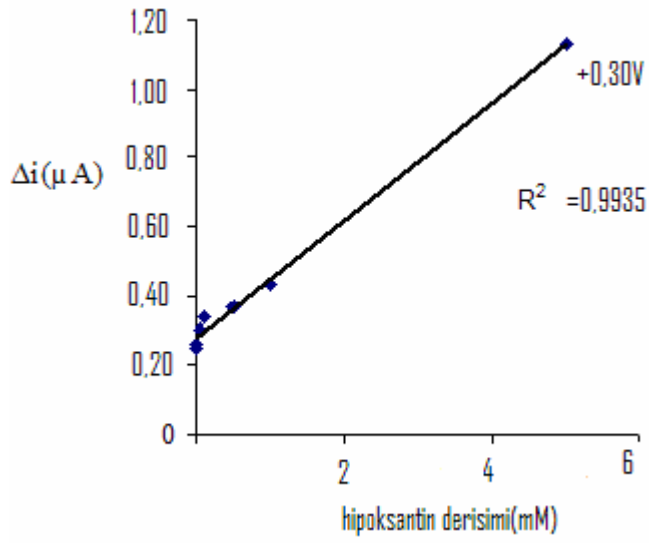
olarak hipoksantin veya ksantin substratı serbest ksantin oksidaz katalizörlüğünde oksijensiz ortam ve metilen mavisi varlığında kimyasal olarak ürik asit oluşturdu ve oluşan ürik asitte elektrokimyasal olarak yükseltgenip ksantin veya hipoksantine karşılık gelen bir anodik akım oluşturdu.



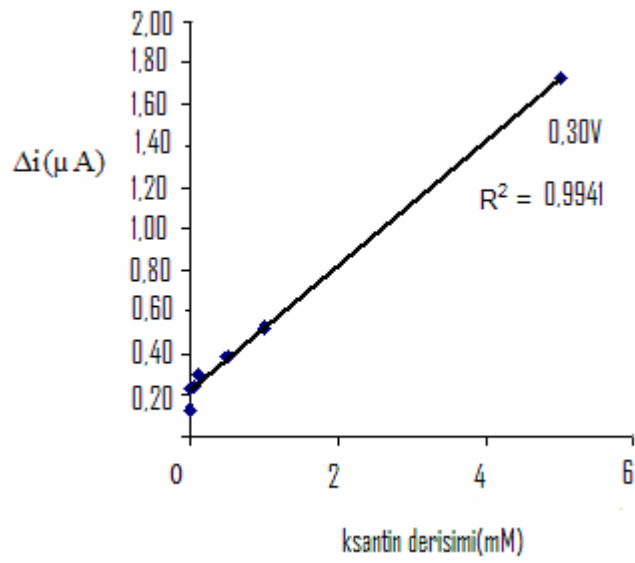
Şekil 4.7. Pt/PPy-PVS elektrodunun oksijensiz ortam metilen mavisi varlığında ksantine duyarlılığı

4.10. Enzim Elektrodun Metilen Mavili ve Oksijensiz Ortamda Ksantine ve Hipoksantine Duyarlılığı

Pt/PPy-PVS elektrodunun metilen mavisi varlığında ve oksijensiz ortamda ksantine duyarlı olduğu gösterildi. Bu durumun enzim elektrot içinde geçerli olup olmadığını anlamak için Bölüm 3.12 ve Bölüm 3.13’ de anlatıldığı şekilde elektrodun ksantine ve hipoksantine duyarlılığı araştırıldı. Yapılan deneyler sonunda enzim elektrodun Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’ de hipoksantin ve ksantine duyarlı olduğu gösterildi.



Şekil 4.8. Enzim elektrodunun oksijensiz ortam metilen mavisi varlığında hipoksantine duyarlılığı



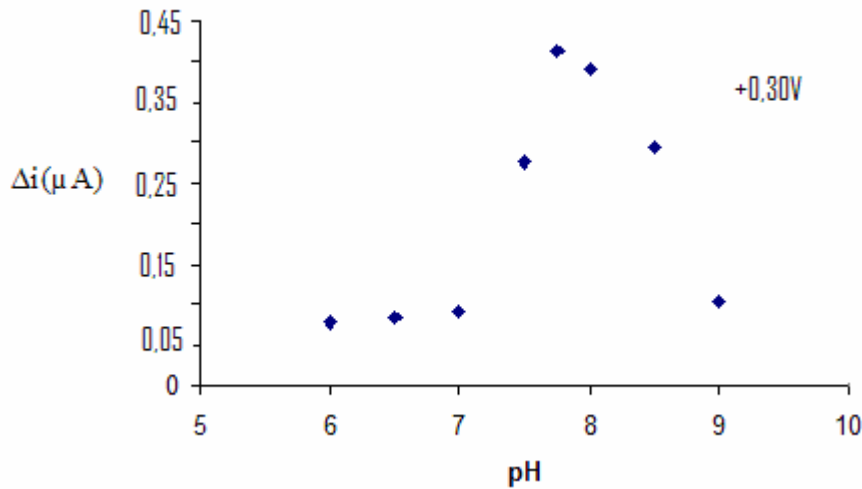
Şekil 4.9. Enzim elektrodunun oksijensiz ortam metilen mavisi varlığında ksantine duyarlılığı

4.11. Enzim Elektrodun En İyi Çalışma Koşulları

Enzim elektrotlarının cevabına etki eden çeşitli parametreler vardır. Bunlar çözeltinin pH' ısı, sıcaklığı, substrat derişimi, raf ömrü ve tekrarlanabilirlik değişkenleridir. Bu çalışmada hazırladığımız ksantin biyosensörünün amperometrik cevabına söz konusu olan değişkenlerin etkisi incelendi ve ilgili sonuçlar aşağıda verildi.

4.11.1. pH etkisi

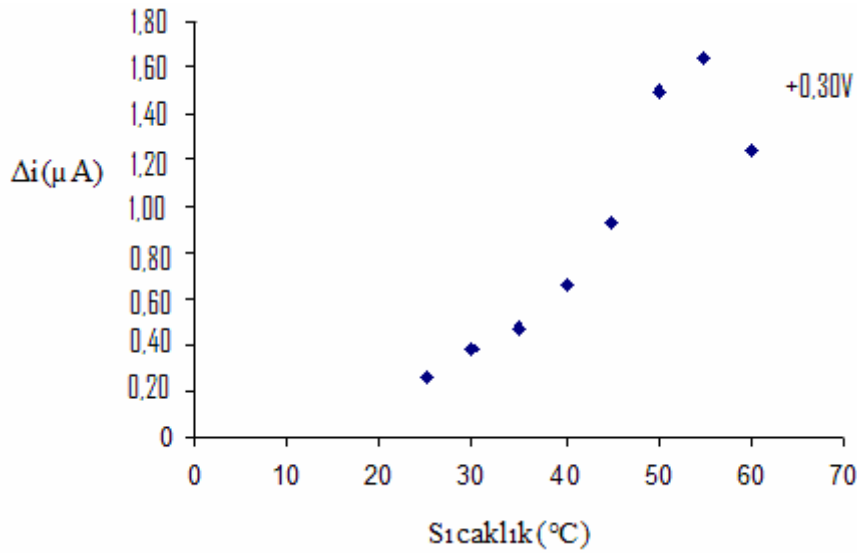
pH, enzim aktifliğini etkileyen faktörlerden birisidir. Her enzimin aktifliğinin en yüksek olduğu bir pH değeri vardır. Örneğin; midede bir sindirim enzimi olan pepsin pH 2-4 de en yüksek aktifliğini gösterirken, tripsinin en yüksek aktifliği gösterdiği pH değeri 8-10 olarak verilebilir. Bu nedenle her enzimin en uygun çalışma pH' ının belirlenmesi gerekmektedir. Ksantin oksidaz için bu pH' nın tespitinde, $1,0 \times 10^{-4}$ M sabit hipoksantin derişiminde, pH değiştirilerek, akım farkları ölçüldü ve grafiğe geçirildi. Bu grafikten de görüldüğü gibi ksantin oksidaz için en uygun pH' nın 7,75 olduğu görülmektedir (Şekil 4.10). Bu değer literatür verilerinin birçoğu ile uyumludur [15]. Ksantin tayininin yapıldığı biyosensör çalışmalarında, 7,75' den farklı pH larda da (pH 8,0 ve 9,0) çalışmalar yapıldığı görülmektedir. Bu farkın immobilize edilen polimer materyali ve immobilizasyon türünün farklı olmasından ileri geldiği söylenebilir [8, 42].



Şekil 4.10. Biyosensörün hipoksantine duyarlılığına pH' nın etkisi

4.11.2. Sıcaklık etkisi

Enzimlerin aktifliği sıcaklıkla büyük oranda değişmektedir. Her enzimin optimum aktifliği gösterdiği bir sıcaklık vardır [21]. Bu nedenle, hazırladığımız ksantin ve hipoksantin biyosensörünün cevabının sıcaklıkla nasıl değiştiğinin incelenmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla, hazırlanan biyosensörün amperometrik cevabı sabit hipoksantin derişiminde ($1,0 \times 10^{-4}$ M) çeşitli sıcaklıklarda incelendi ve sıcaklık $^{\circ}\text{C}$ – akım farkı (Δi) grafiği çizildi (Şekil 4.11).

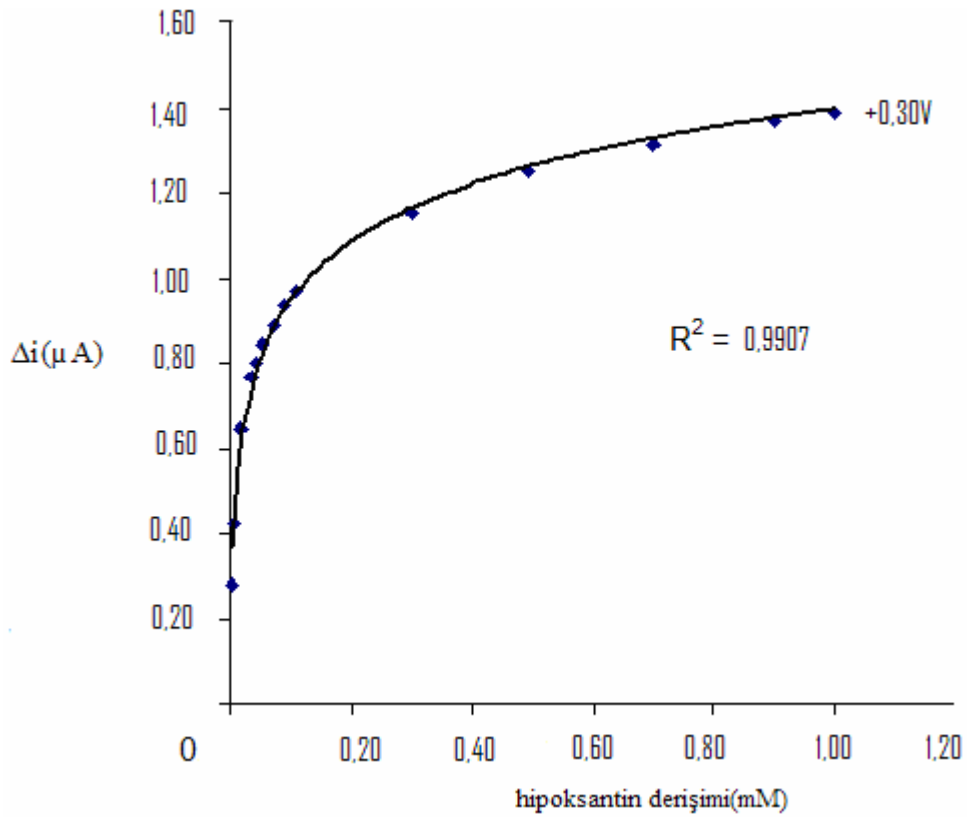


Şekil 4.11. Biyosensörün hipoksantine duyarlılığına sıcaklığın etkisi

Şekilden de görüldüğü gibi, akım farklarının 55°C ye kadar arttığı ve daha sonra azalmaya başladığı belirlendi ve en yüksek akım farkının 50°C ’ de elde edildiği gözlemlendi. Bu sıcaklığın üstünde enzimin termal denatürasyona uğradığını söyleyebiliriz. 55°C 'nin enzimler için yüksek bir sıcaklık olduğu düşüncesiyle bu sıcaklık uygun olarak seçilmedi. Daha çok sayıda çalışmada kullanılabilmesi ve çalışma koşullarının kolay olması nedenlerinden dolayı 25°C çalışma sıcaklığı olarak seçildi [29,47].

4.11.3. Substrat derişimi etkisi

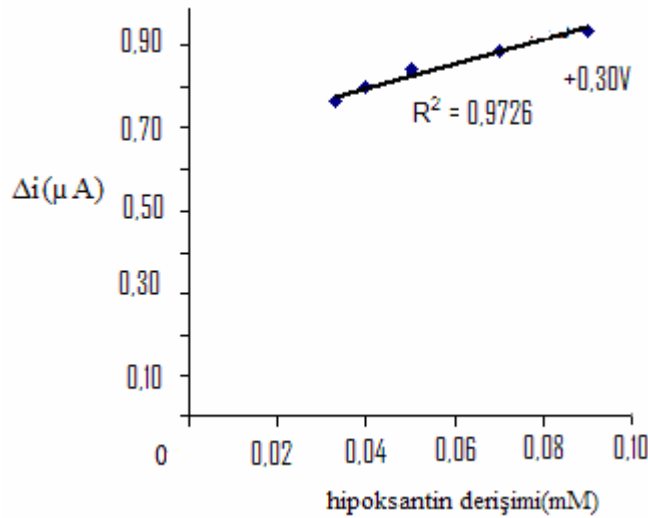
Hazırlanan ksantin ve hipoksantin biyosensörünün, analitik amaçlarla kullanılabileceği doğrusal çalışma aralığını belirlemek için $1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-3}$ M derişim aralığında hazırlanan bir seri çözelti için akım değışimleri kaydedilerek grafiğe geçirildi (Şekil 4.12).



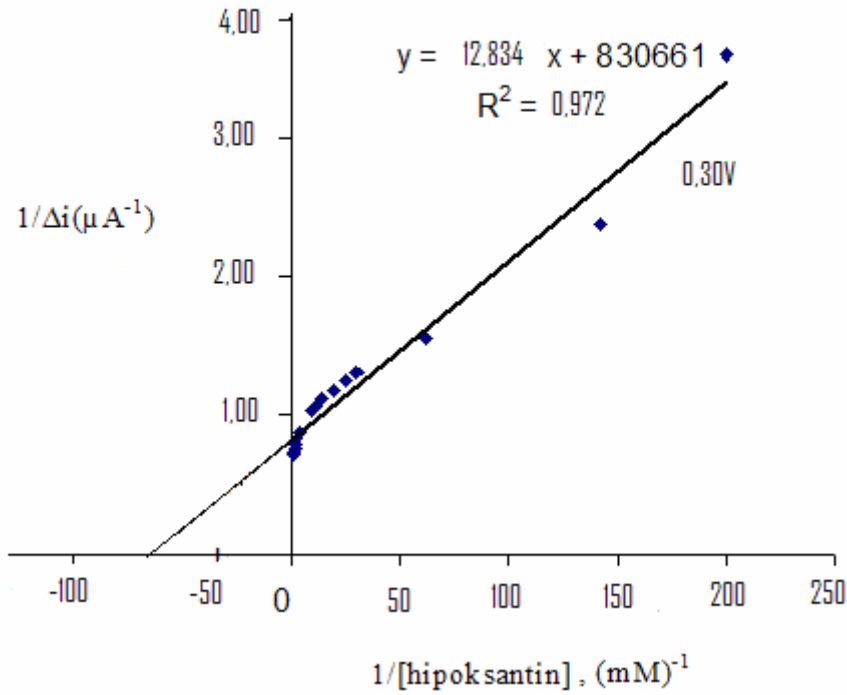
Şekil 4.12. Biyosensörün amperometrik cevabına hipoksantin derişiminin etkisi

1×10^{-3} M' a kadar olan kısımda iki tane doğrusal bölge görölmektedir. Bunlardan biri $1,0 \times 10^{-5} - 9,0 \times 10^{-5}$ M diğeri, $1,1 \times 10^{-4} - 7,0 \times 10^{-4}$ M aralıklarıdır [29]. Düşük derişim aralığı için grafik Şekil 4.13.' de verildi. Bu grafiğin doğrusallığının oldukça iyi olduğu ve kantitatif amaçla ksantin tayini için kullanılabileceği söylenebilir. Hazırladığımız ksantin biyosensörü için alt tayin sınırı $1,0 \times 10^{-7}$ M olarak belirlendi. Şekilden hipoksantin derişiminin $1,0 \times 10^{-3}$ M dan daha yüksek olduğu durumlarda akımın sabit kaldığı ve bundan da ksantin oksidaz enziminin hipoksantine doyduğu söylenebilir. Enzimler için bir spesifik bir veri olan K_M gözlenen sabitini bulmak

amacıyla hipoksantin derişimine karşı akım değişimi verilerinden yararlanıldı ve $(1/[\text{hipoksantin}]) - 1/\Delta i$ grafiği (Linewear – Burke) çizildi (Şekil 4.14). Bu eğrinin x eksenini kestiği değerden $-1/K_M$ değeri bulundu ve buradan K_M gözlenen değeri 0,0154 mM ve V_{maks} gözlenen değeri 1,203 $\mu\text{A}/\text{dakika}$ olarak hesaplandı. K_M , enzimler için spesifik sabit bir değerdir. Enzimin substrata karşı ilgisinin bir ölçüsüdür, eğer K_M değeri büyükse enzimin substrata karşı ilgisinin az, K_M değeri küçükse enzimin substrata karşı ilgisinin fazla olduğundan bahsedilir. $V_{\text{maks.}}/K_M$ oranı büyük olan enzimin aktifliğisi yüksek anlamına gelmektedir. Hazırlanan biyosensörün hipoksantine ilgisini gösteren K_M gözlenen değeri 0,0154 mM iken literatürlerde verilen K_M gözlenen değerleri 7 mM; 1,11 mM; 0,04 mM dır [1,2,8,12]. Enzimatik reaksiyon bir taşıyıcı ortam üzerinde geręekleştiięinden, her taşıyıcı ortamda enzimin substrata ilgisi aynı olmamaktadır, bu nedenle K_M gözlenen değerlerinde farklılıklar gözlenmesi normaldir.



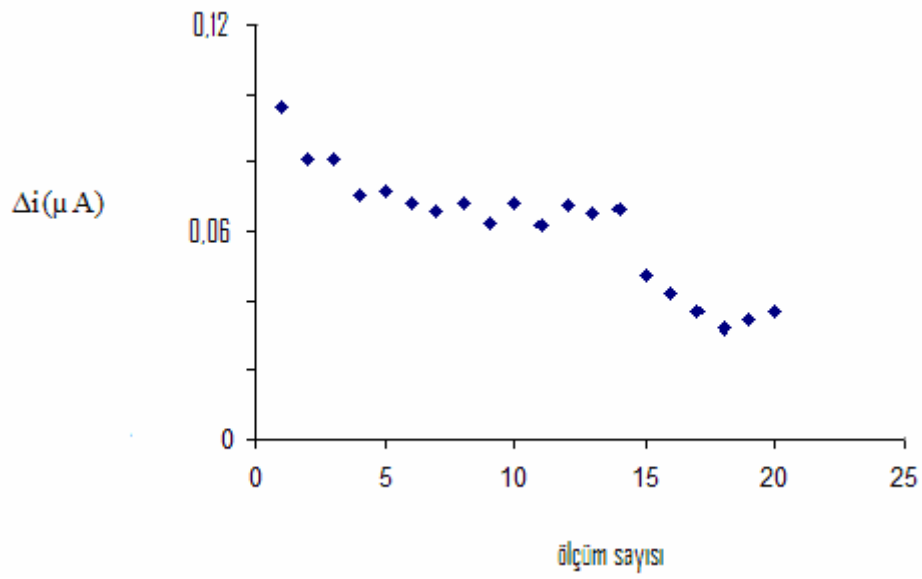
Şekil 4.13. Hipoksantin biyosensörü için kalibrasyon grafiği



Şekil 4.14. Biyosensörün hipoksantine duyarlılığını gösteren Lineweaver – Burk grafiği

4.11.4. Enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliği

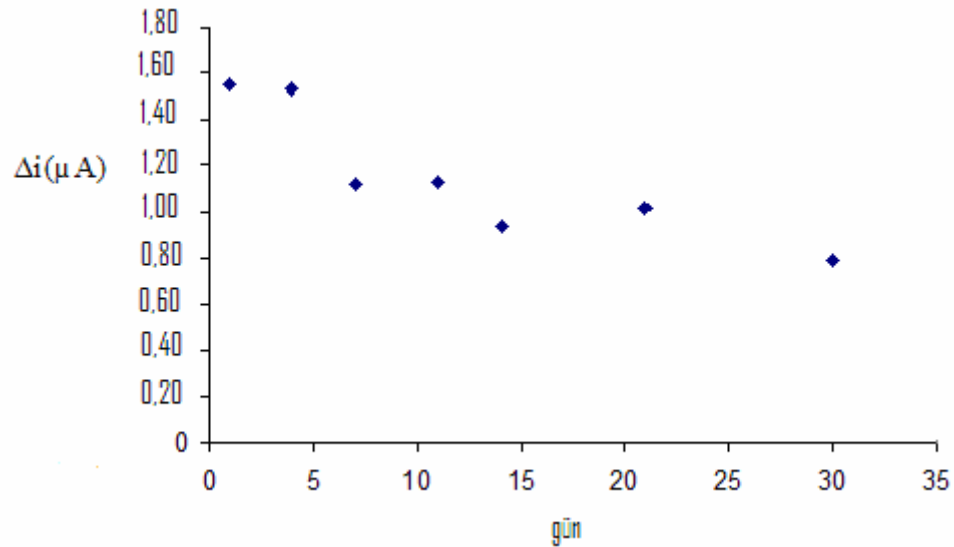
Hazırlanan enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliği Bölüm 3.14.4’ de anlatıldığı gibi, incelendi ve ardı ardına yapılan ölçümler sonucu elde edilen akım değişimleri, ölçüm sayısına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.15). Sabit hipoksantin derişiminde ($1,0 \times 10^{-4}$ M) yapılan 20 ölçüm sonucunda elde edilen akım değişimlerinden hesaplanan bağıl standart sapma % 26,0 olarak hesaplandı.



Şekil 4.15. Enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliğinin 20 ölçüm sonucuna göre incelenmesi

4.11.5. Raf ömrünün belirlenmesi

Enzim elektrodunun buzdolabında (+4 °C) fosfat tamponu içinde (pH= 7,75) bekletilerek, çeşitli günlerde ölçülen akım değerlerinden raf ömrünün belirlenmesi çalışması Bölüm 3.7.9’ da anlatıldığı gibi yapıldı. Saklama süresine karşı akım değişimi değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Biyosensörün raf ömrü

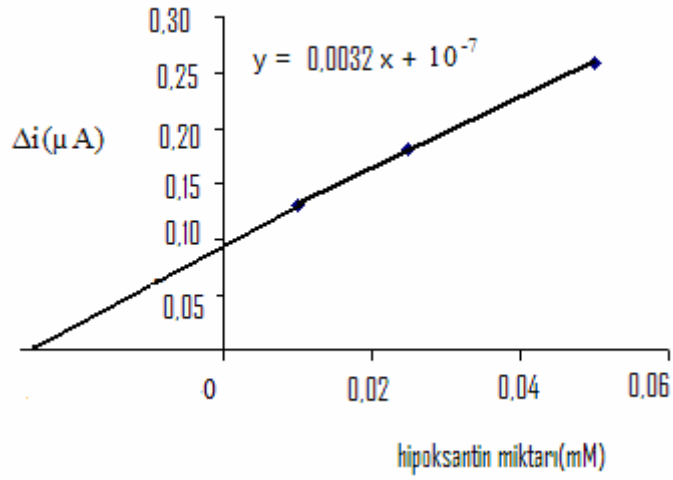
Sabit hipoksantin derişimi ($1,0 \times 10^{-4}$ M) kullanılarak yapılan çalışmada, ilk bir hafta akım değişiminin aynı kaldığı, 7– 10 gün içinde akımda hızlı bir düşme olduğu gözlemlendi. 11- 21 gün içinde akımda çok fazla değişiklik görülmediği, 21 günden sonra akımda düşmelerin başladığı ve 30. gün sonunda hipoksantin biyosensörünün başlangıç amperometrik cevabının %49 ini gösterdiği görüldü. Bu da bize hazırladığımız biyosensörün çok uzun süre kullanılamayacağını göstermektedir. Biyosensörün amperometrik cevabının zamanla düşmesi şu şekilde açıklanabilir. Enzimler kullanılmadıkları zaman uygun koşullarda muhafaza edilsin veya edilemesin zamana karşı aktiflik kaybına uğrarlar. Serbest enzimlerde bu kayıp daha hızlı olurken immobilize enzimlerde aktifliğin daha uzun süre korunduğu yapılan araştırmalardan bilinmektedir. Bu aktiflik kaybının sebepleri şunlar olabilir: Enzimin aktif merkezinin geometrik şeklinde sıcaklığın, havanın ve bazı kimyasal maddelerin etkisi ile değişiklikler meydana gelmesi ya da aktif merkezdeki grupların çevresindeki diğer gruplarla etkileşmesi sonucu meydana geldiği düşünülebilir. Bu nedenle biyosensörün kullanılmadığı süre içinde ömrünün azalması söz konusu olmaktadır. Bütün bu çalışmalar sonucunda, hazırladığımız hipoksantin biyosensörünün özellikleri ve optimum çalışma koşulları Çizelge 4.1.' de özetlendi.

Çizelge 4.1. Hazırlanan biyosensörün özellikleri ve optimum koşulları

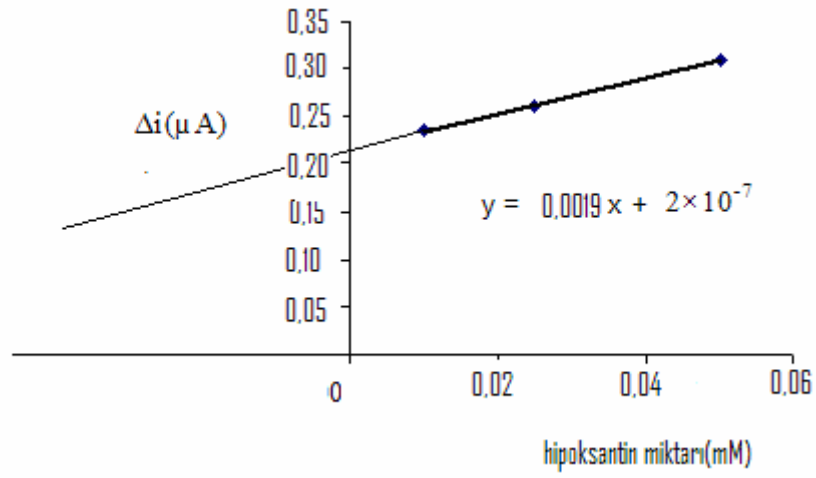
Değişkenler	Optimum koşullar
Sıcaklık	25°C
pH	7,75
Çalışma aralığı	$1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-3}$ M
Tayin sınırı	$1,0 \times 10^{-7}$ M
Tekrarlanabilirlik	20 ölçüm sonucundaki bağıl standart sapma %26,0
Raf ömrü	30 gün sonunda enzim elektrot başlangıç amperometrik cevabının %49'ini korumaktadır.
Ksantin oksidaz enziminin K_m gözlenen ve V_{Max} gözlenen değeri	0,0154 mM, 1,203 μ A/dakika

4.12. Balık Eti Numunesinde Hipoksantin Tayini

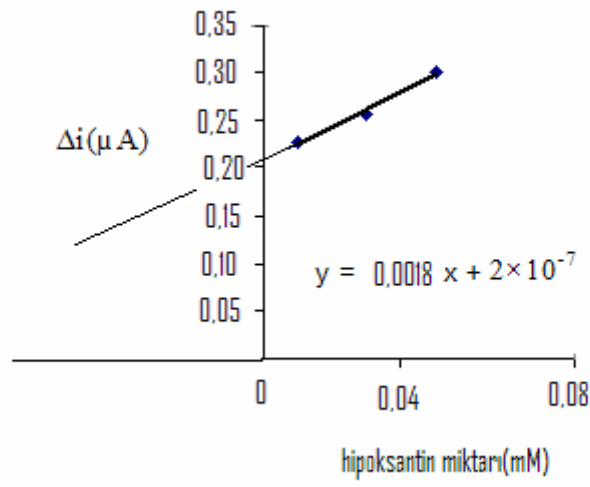
Balık eti numunelerinde Bölüm 3.15’ de anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalarda balık eti tazeliğini yitirdikçe balık eti dokusunda oluşan hipoksantin miktarının artması beklendi [15]. Bu miktar artması pürin nükleotitlerinin yıkımı sonucu oluşan hipoksantinden meydana gelmektedir. Bunun için Türkiye’ de çok tüketilen ve en çok bulunan balık olan çipura balık türü seçildi. Bu balık tazelikleri bir günlük, iki günlük, 5 günlük ve 7 günlük balık olmak üzere depolandı ve Bölüm 3.15’ de anlatıldığı şekilde analize hazırlandı. Balık eti içinde bulunan hipoksantin miktarını doğru bir şekilde tayin edebilmek için standart ekleme metodundan yararlanıldı bu yöntemle tazelikleri farklı olan balık numunelerindeki hipoksantin miktarı tayin edildi. Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’ de x eksenini kesim noktasından hipoksantin miktarı tespit edilmiştir ve gerekli seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra balık numunesinde bulunan hipoksantin miktarı tayin edilmiştir. Günlük balık için $3,125 \times 10^{-3}$ M, iki günlük balık için $1,053 \times 10^{-2}$ M, beş günlük balık için $1,11 \times 10^{-2}$ M ve yedi günlük balık süzöntüsü için $1,54 \times 10^{-2}$ M bulunmuştur. Sonuçlar beklenildiği gibi çıkmıştır ve balık eti tazeliğini yitirip eskidikçe içindeki hipoksantin miktarının arttığı gösterilmiştir. Ayrıca balık öldükten bir gün sonra hipoksantin miktarında otuz kat artış görülürken daha sonraki günlerde bu kadar büyük bir artış görülmemiştir.



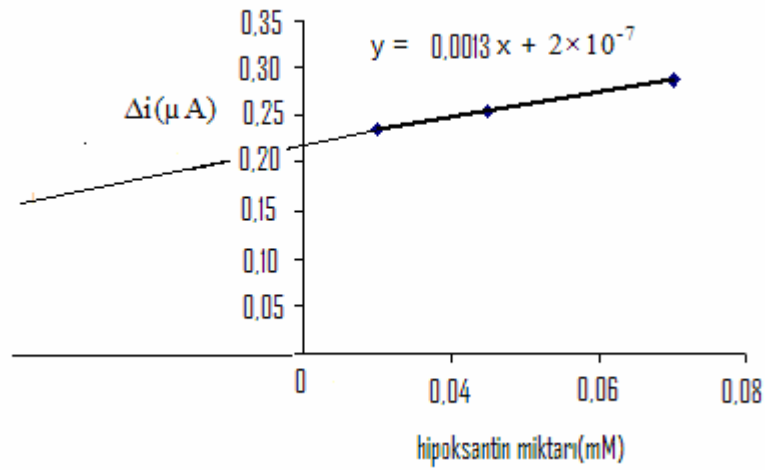
Şekil 4.17. Standart ekleme yöntemi ile günlük balık etinde tayin edilen hipoksantin miktarı



Şekil 4.18. Standart ekleme yöntemi ile iki günlük balık etinde tayin edilen hipoksantin miktarı



Şekil 4.19. Standart ekleme yöntemi ile beş günlük balık etinde tayin edilen hipoksantin miktarı



Şekil 4.20. Standart ekleme yöntemi ile yedi günlük balık etinde tayin edilen hipoksantin miktarı

4.13. Sonuç

Bu çalışmada hazırlamış olduğumuz hipoksantin biyosensörü;

- 1) Geniş bir derişim aralığında ($1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M) çalışabilmektedir,
- 2) Tayin sınırı ($1,0 \times 10^{-7}$ M) düşüktür,
- 3) n tekrarlanabilirliği iyi sayılır (20 ölçüm için bulunan bağıl standart sapma % 26,0).
- 4) Raf ömrü ilk bir hafta için % 98 dir. (30 gün sonra başlangıç amperometrik cevabının % 49' ini göstermektedir).
- 5) Polipirol-polivinilsülfonat filme immobilize edilen ksantin oksidaz enziminin K_M gözlenen değeri 0,0154 mM ve V_{maks} gözlenen değeri 1,203 $\mu A/dakika$ olarak tespit edildi.
- 6) Biyosensörün hazırlanması uzun işlemler almaktadır, fakat çok sayıda kullanımının maliyeti düşürmesi ekonomik açıdan önemlidir.
- 7) Balık eti numunelerinde tazeliği yitirdikçe hipoksantin miktarı artışını doğrulamıştır.

KAYNAKLAR

1. Pei, J. And Li, X., "Xanthine and hypoxanthine sensors based on xanthine oxidase immobilized on a CuPtCl₆ chemically modified electrode and liquid chromatography electrochemical detection", *Analytica Chimica Acta*, 414:205-213 (2000).
2. Arai, G., Takahashi, S. And Yasumori, I., "Xanthine and hypoxanthine sensors based on xanthine oxidase immobilized in poly(mercapto-p-benzoguinone) film", *Jovinal of Electroanalytical Chemistry*, 410:173-179 (1996).
3. Bahagavan, N.V., "Xanthine Oxidase Reaction", Medical Biochemistry, *Novel Kitap Evi*, İstanbul, 652-654 (1990).
4. Grisham, G., "Xanthine Oxidase", Biochemistry 2nd ed., *Sounders Colloge Publishing*, USA, 912 (1999).
5. Hu, S. And Liu, C.C., "Amperometric sensor for fish freshness basedon immobilized multi-enzyme modified electrode", *Electroanalysis*, 9:1229-1231 (1998).
6. Ghosh, S., Sarker D. And Misra T.N., "Development of on amperometric enzyme electrode biosensor for fish freshness detectron", *Sensors and Actuctors B*, 53: 58-62 (1998).
7. Radi, R., Rubbo, H., Bush, K. And Freeman, B.A., "Xanthine Oxidise Binding to Glycpsamin oglicans: Kinetics and Superoxide Dismutase Interactions of immobilized Xanthine Oxidase – Heparin Complexes", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339:125-135(1997).
8. Kılınc, E., Erdem, A., Gocgunnec, L., Dalbasti, T., Karaoglan, M. And Ozsas, M., "Butternilk based cobalt phthalocyanine dispersed ferricyanide mediated amperometric biosensor for the determination of xanthine", *Electroanalysis*, 10: 273-275 (1998).
9. Laudet, E., Botting, N.P., Crayston, J.A. And Dale, N., "Athrec-enzyme microelectrode sensor for detecting purine release from central nervous system", *Biosensors and Bioelectronics*, 18:43-53 (2003).
10. Salaris, S.C., Babbs, C.F. And Voorhees, W.D. III., "Methylene blue as an inhibitor of superoxide generation by xanthine oxidase: A potential new drug for the attenuation of ischemial reperfusion injury", *Biochem Pharmacol*, 42(3): 499-506 (1991).

11. Arslan, F., “ Ksantin tayini için polipirol filme ksantin Oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması”, Doktora Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 1-40 (2004).
12. Telefoncu, A., “Immobilize Enzimler”, Enzimoloji, Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu, **Kuşadası**, 1-243 (1997).
13. Champe, P. And Harvey, R., “Enzimler”, Biyokimya, **Nobel Tıp Kitap Evleri**, İstanbul, 48 – 53 (1997).
14. Tüzün, C., “Enzim Reaksiyonlarına Sıcaklığın ve pH’nın Etkisi”, Biyokimya, Palme Yayınları, **Ankara**, 125-130 (1992).
15. Ghosh, S. , Sarker, D. And Misra, T.N. , “ Development of an amperometric enzyme electrode biosensor for fish freshness detection“, **Sensors and actuators B.**, 53 : 58-62 (1998).
16. Watanabe, E., Tamada, Y. and Hamada-Sato, N., “ Develepment of Quality Evaluation Sensor for Fish Freshness Control Based on K_I Value ”, **Biosensor & Bioelectronics**, 21: 534- 538 (2005).
17. Parks, D.A., Williams, T.K. And Beckman, J.S., “Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Oxidase in İschemic Rat İntestine: A Reevaluation”, **Am J Physiol**, 254:768-774 (1988).
18. Kelner, M. J., Bagnell, R., Hale, B. And Alexander, N.M., “Methylene Blue Competes with Paraquat for Reduction by Flavo-Enzymes Resulting in Decreased Superoxide Production in the Presence of Heme Proteins”, **Arch Biochem. Biophys.**, 262(2):422-426 (1988).
19. Kemer, M.J., Bagnell, R., Hale, B. And Alexander, N.M.,” Potential of Methylene Blue Block Oxygen Radical Generation in Reperfusion İnjury”, **Basic Life Sci.**, 49:895-898 (1988).
20. Telefoncu, A., “Biyosensörlere Genel Bakış” ,Biyosensörler, Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu, **Kuşadası**, 1-9 (1999).
21. Akbulut, U., “İletken Polimerlerle Transdüser Hazırlanması”, Biyosensörler, **Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu**, Kuşadası, 10, 14, 16, 52, 54 (1999).
22. Telefoncu, A., “Biyoreseptör İmmobilizasyonu” , Biyosensörler, Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu, **Kuşadası**, 42-61 (1999).
23. Arslan, F., Yaşar, A. and Kılıç, E., “ An Amperometric Biosensor for Xanthine Determination Prepared from Xanthine Oxidase İmmobiilized in Polypyrrole Film”, **An International Journal**, 34(1):113-128 (2006).

24. Erden, P. E., Pekyardımcı, Ş., Kılış, E. and Arslan, F., "An Amperometric Enzyme Electrode for Creatine Determination Prepared by the Immobilization of Creatinase and Sarcosine Oxidase in Poly(vinyl Ferrocenium)", *An International Journal*, 34(2):223-239 (2006).
25. Çete, S., Yaşar, A. and Arslan, F., "An Amperometric Biosensor for Uric Acid Determination Prepared from Uricase Immobilization in Polypyrrole Film", *An International Journal*, 34(3):367-380 (2006).
26. Çete, S., Yaşar, A., Arslan, F., "Immobilization of Uricase Upon Polypyrrole-Ferrosenyum Film", *Taylor & Francis*, 35(6):607-620 (2007).
27. Arslan, F., Yaşar, A., and Kılıç, E., "Preparation of Pt/polypyrrole-ferrocene hydrogen peroxide sensitive electrode for the use as a biosensor" *Russian Journal of Electrochemistry*, 42(2):137-140 (2006).
28. Çubukçu, M., Timur, S. And Anik, Ü., "Examination of performance of glassy carbon paste electrode modified with gold nanoparticle and xanthine oxidase for xanthine and hypoxanthine detection", *Talanta*, 74: 434- 439 (2007).
29. Kirgöz, Ü.A. , Timur, S., Wang, J. And Telefoncu, A., "Xanthine oxidase modified glassy carbon paste electrode ", *Electrochemistry communication*, 6: 913-916 (2004).
30. Chaubey, A. , Gerard, M., Singhal, R. And Sinng, V.S., "Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole-polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors" , *Electrochimica Acta*, 46: 723-729 (2000).
31. Foulds, N.C. And Lowe, C.R., "Enzyme entrapment in electrical conducting polymers" *J.Chem.Soc., Faraday Trans. 1*, 82:1259-1264 (1986).
32. Umona, M., Waller, J., "Protein - modified electrodes. The Glucose oxidase / Polypyrrole System.", *Anal. Chem.*, 58: 2979-2983 (1986).
33. Maruyama, T., Shinohara, H., Ikariyama, Y. And Aizawa M., "Modulation of the function of an enzyme immobilized in a conductive polymer by electrochemical changing of the substrate concentration", *J. Electroanal. Chem.*, 374: 293-301 (1993).
34. Gülce, H., Özyörük, H., Çelebi, S. And Yıldız, A., "Amperometric enzyme electrode for aerobic glucose monitoring prepared by glucose oxidase immobilized in poly(vinyl ferrosenium)", *Journal of Electroanalytical*, 394: 63-70 (1995).

35. Adeloju, S.B., Show, S.J. And Wallace, G.G., "Polypyrrole-based amperometric flow injection biosensor for urea", *Analytica Chimica Acta*, 323: 107-113 (1996).
36. Luong, M.T.J. And Thatipamala, R., "Kinetics and performance of a mediated biosensor for hypoxanthine using deflaus xanthine oxidase", *Analytica Chimica Acta*, 319: 325-333 (1996).
37. Selampinar, F., Akbulut, V., Özden, M.Y. And Toppare, L., "Immobilization of invertase in conducting polymer matrices", *Biomaterials* , 18: 1163-1168 (1997).
38. Garcia, C.A.B., Neto, G. O. And Kubota, L.T., "New fructose biosensors utilizing a polypyrrole film and D-Fructose 5-dehydrogenase immobilized by differerent processes", *Analytica Chimica Acta*, 374: 201-208 (1998).
39. Qiong, C., Tuzhi, P. And Liju, Y., "Silk fibroin/cellulose asetate membrane electrodes incorporating xanthine oxidase for the determination or fish freshness", *Analytica Chimica Acta*, 369: 245-251 (1998).
40. Wang, H. And Mu, S., "Bioelectrochemical characteristics of cholesterol oxidase immobilized in polyaniline film", *Sensors and Actuators B.*, 56: 22-30 (1999).
41. Vidal, J.C., Garcia – Ruiz, E. And Castillo, J.R., "In situ preparation of over oxidized PPy/oPPD bilayer biosensors for the determination of glucose and cholesterol in serum", *Sensors and Actuators B.*, 57:219-226 (1999).
42. Stredonsky, M., Pizzariello, A., Miertus, S. And Suore, J., "Selective and sensitive biosensor for theophylline based on xanthine oxidase electrode", *Analytical Biochemistry*, 258: 225-229 (2000).
43. Gros, P., Durliat, H. And Comtat, M., "Use of polypyrrole film containing $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ as pseudo – reference electrode: application for amperometric biosensors", *Electrochimica Acta*, 46: 643-650 (2000).
44. Palmisano, F., Rizzi, R., Centonze, D. And Zambonin, P.G., "Simultaneous monitoring of glucose and lactate by an interference and cross – talk free dual electrode amperometric biosensor based on electropolymerizedthin films", *Biosensors and Bioelectronics*, 15:531-539 (2000).
45. Chaubey, A., Gerard, M., Singhal, R., Singh, V.S. and Malhotra, B.D., "Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrroleplyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors", *Electrochimica Acta*, 46:723-729 (2000).

46. Vidal, J.C., Garcia – Ruiz E. And Castillo, J.R., “Strategies for the improvement of an amperometric cholesterol biosensor based on electropolymerisation in flow system: use of charge – transfer mediators and platinization of the electrode”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24: 51-63 (2000).
47. Hu, S., Xu, C., Luo, J. And Cui, D., “Biosensor for detection of hypoxanthine based on xanthine oxidase immobilized on chemically modified carbon paste electrode”, *Analytica Chimica Acta*, 412: 55-61 (2000).
48. Nakabayashi, Y. And Yashikawa, M., “Amperometric biosensors for sensing hydrogen peroxide based on electron transfer between horseradish peroxidase and ferrocene as a mediator”, *Analytical Sciences*, 16: 609-613 (2000).
49. Gülce, H., Gülce, A., Kavanoz, M., Coşkun, H. and Yıldız, A., “A new amperometric enzyme electrode for alcohol determination”, *Biosensors and Bioelectronics*, 17:517-521 (2002).
50. Reiter, S., Habermüller, K. And Shuhman, W., “Areagentless glucose biosensor based on glucose entrapped into osmium - complex modified polypyrrole films”, *Sensors and Actuators B*, 79:150-156 (2001).
51. Mao, L., Xu, F., Xu, Q. And Jin, L., “Miniaturized amperometric biosensor based on xanthine oxidase for monitoring hypoxanthine in cell culture media”, *Analytical Biochemistry*, 292: 94-101 (2001).
52. Moser, I., Jobst, G. and Urban, G.A., “Biosensor array for simultaneous measurement of glucose, lactate, glutamate”, *Biosensors and Bioelectronics*, 17:297-302 (2002).
53. Brahim, S., Narinesingh, D. And Guiseppi-Elie, A., “Ralypridine –hydrogel composites for the construction of clinically important biosensors”, *Biosensors*, *Electrochimica Acta*, 46:723-729 (2000).
54. Gülce, H., Ataman, İ., Gülce, A. And Yıldız, A., “A new amperometric enzyme electrode for galactose determination”, *Enzyme and Microbial Technology*, 30:41-44 (2002).
55. Xu, F., Wang, L. And Gao, M. Et All., “Amperometric sensors for glucose and hypoxanthine based on a Pd-IrO₂ modified electrode by a co-cross-linking bienzymic system”, *Talanta*, 57(2): 365-373 (2002).
56. Zhao, H., Yuan, Y., Adelojue, S. And Wallace, G.G., “Study on the formation of the prussian blue films on the polypyrrole surface as a potential mediator system for biosensing applications”, *Analytica Chimica Acta*, 472: 113-121 (2002).

57. Gülce, H., Gülce, A. and Yıldız, A., "A Novel two-enzyme amperometric electrode for lactose determination", *Analytical Sciences*, 18: 147-150 (2002).
58. Hu, S., Xu, C., Luo, J., Luo, J., And Cui, D., "Biosensor for determination of hypoxanthine based on xanthine oxidase immobilized on chemically modified carbon paste electrode", *Analytica Chimica Acta*, 412: 55- 61 (2000).
59. Agui, L., Manso, J., Yanez-Sedeno, P. and Pingarron, J., "Amperometric biosensor for hypoxanthine based on immobilized xanthine oxidase on nanocrystal gold-carbon paste electrodes", *Sensors and Actuators B*, 113:272-280 (2006).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DOLMACI, Nezaket
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 23.09.1986 KKTC
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (537) 683 65 55
e- mail : n__dolmaci@hotmail.com

Eğitim Derece

Eğitim Birimi

Mezuniyet tarihi

Lisans	Gazi Üniversitesi/ Kimya Bölümü
Lise	19 Mayıs Türk Maarif Koleji

2007
2003

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

İnternet, Spor