

**HİPOKSANTİN TAYİNİ İÇİN POLİPİROL-POLİVİNİL SÜLFONAT FİLME
KSANTİN OKSİDAZ VE ÜRİKAZ ENZİMLERİ İMMOBİLİZASYONU İLE
YENİ BİR BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI**

Mustafa GÖRGÜLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EYLÜL 2011

ANKARA

Mustafa GÖRGÜLÜ tarafından hazırlanan HİPOKSANTİN TAYİNİ İÇİN POLİPİROL-POLİVİNİLSÜLFONAT FİLME KSANTİN OKSİDAZ VE ÜRİKAZ ENZİMLERİ İMMOBİLİZASYONU İLE YENİ BİR BİYONSENSÖR 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. Ahmet YAŞAR

.....

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Emel EMREGÜL

.....

Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Doç. Fatma ARSLAN

.....

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih:28/09/2011

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

Prof. Dr. Bilal TOKLU

.....

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.

Mustafa GÖRGÜLÜ

**HİPOKSANTİN TAYİNİ İÇİN POLİPİROL-POLİVİNİL SÜLFONAT FİLME
KSANTİN OKSİDAZ VE ÜRİKAZ ENZİMLERİ İMMOBİLİZASYONU İLE
YENİ BİR BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Mustafa GÖRGÜLÜ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Eylül 2011**

ÖZET

Bu çalışmada, hipoksantin tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Bu amaçla, platin levha üzerinde pirolün polivinilsülfonatlı ortamda elektropolimerleşmesi ile polipirol-polivinil sülfonat filmi hazırlandı. Ksantin oksidaz ve ürikaz enzimleri, polipirol-polivinil sülfonat film içine tutuklama yöntemiyle immobilize edildi. Hazırlanan enzim elektrodun optimum çalışma şartları belirlendi. Hipoksantin tayini, hazırlanan enzim elektrodun yüzeyinde gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksitin 0,40 V'da yükseltgenmesine dayanılarak yapıldı. Hipoksantin tayini için biyosensörün çalışma aralığı tayin edildi. Hipoksantin biyosensörünün cevabına pH'nın ve sıcaklığın etkisi araştırıldı. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü tayin edildi. Biyosensörün gerçek numunedeki performansı incelendi.

Bilim Kodu : 201.1.020

**Anahtar Kelimeler : Hipoksantin, ksantin oksidaz, Ürikaz, Polipirol,
Polivinilsülfonat, biyosensör**

Sayfa adedi : 91

Tez yöneticisi : Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

**PREPARING A NEW BIOSENSOR FOR HYPOXANTHINE
DETERMINATION BY IMMOBILIZATION OF XANTHINE OXIDASE AND
URICASE IN POLYPYRROLE-POLYVINYLSULPHONATE FILM**

(M. Sc. Thesis)

Mustafa Görgülü

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

September 2011

ABSTRACT

In this study, new amperometric biosensor for determination of hypoxanthine was developed. For this reason; polypyrrole-polyvinylsulphonate films have been prepared on the platinum electrode by the electropolymerization of pyrrole was carried out in the presence of polyvinylsulphonate. Xanthine oxidase and uricase enzymes have been immobilized in polyanpyrrole-polyvinylsulphonate via the entrapment method. Optimum conditions of enzyme electrode was determined. Hypoxanthine detection is based on the oxidation of hydrogen peroxide at 0,4 V produced by the enzymatic reaction on the enzyme electrode surface. The linear working range of biosensor for hypoxanthine was determined. The effects of pH and temperature on the response of the hypoxanthine biosensor were investigated. Reusability and storage stability were determined of the biosensor. The performance of biosensor has been tested at real samples.

Science Code : 201.1.020
Key Words : hypoxanthine, xanthine oxidase, uricase,
biosensor, polypyrrole, polyvinylsulphonate
Page Number : 91
Adviser : Prof. Dr. Ahmet Yaşar

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince bilgi birikimi ve tecrübesi ile beni yönlendiren, desteğini esirgemeyen ve sürekli cesaretlendiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet YAŞAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın en başından itibaren yanımda olan, deneyimlerini paylaşan Sayın Doç. Dr. Fatma ARSLAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Servet ÇETE'ye ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Halit ARSLAN'a çok değerli çabaları, yol göstericiliği ve samimiyeti için teşekkür ederim.

Arkadaşlarım Umut BESKAN, Süleyman ÇALIŞKAN, Özlem Çolak ve Merve Özdemir'e deneysel çalışmalar sırasındaki yardımları ve daha da önemlisi değerli dostlukları için minnettarım.

Ayrıca tüm yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok sevdiğim aileme de teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	vi,
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Enzimler.....	4
2.2. Ksantin Oksidoredüktaz (KOR) Enziminin Özellikleri.....	5
2.3. Ürikaz Enzimi (U) ve Özellikleri.....	11
2.4. Biyosensörler	12
2.4.1. Biyosensörlerin tarihçesi.....	12
2.4.2. Biyosensörlerin ana gövdesini oluşturan yapılar	13
2.4.3. Biyoreseptörler	14
2.4.4. Dönüştürücüler	14
2.4.5. Biyosensör dizaynında dikkat edilmesi gerekenler	14
2.4.6. Biyosensörlerde kullanılan biyoaktif yapılar	15
2.4.7. Biyosensörlerde biyoaktif bileşen immobilizasyon yöntemleri ..	15
2.4.8. Enzim immobilizasyon metodları	15

Sayfa

2.4.9. Elektrokimyasal esaslı biyosensörler	26
2.5. İletken Polimerler	27
2.5.1.İletken polimerlerin tarihsel gelişimi	27
2.5.2.İletken polimerler	28
2.5.3.Pirol	31
2.5.4.Pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu	31
2.6. Enzim Sensörleri	33
2.6.1. Enzim sensörlerinin genel çalışma prensibi	33
2.6.2. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması	35
2.7. Performans Faktörleri	36
2.7.1. Seçicilik	36
2.7.2. Kullanım ömrü	36
2.7.3. Kalibrasyon gereksinimleri.	36
2.7.4. Tekrarlanabilirlik	36
2.7.5. Kararlılık	37
2.7.6. Yüksek duyarlılık	37
2.7.7. Yeterli düzeyde tayin sınırı	37
2.7.8. Geniş ölçüm aralığı	37
2.7.9. Hızlı cevap zamanı	38
2.7.10. Basit ve ucuzluk	38
2.8. Kaynak Araştırması	38
3. DENEYSEL KISIM	48

	Sayfa
3.1. Cihazlar ve Malzemeler.....	48
3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı	48
3.1.2. Hücre ve elektrotlar	48
3.1.3. pH metre.....	49
3.1.4. Su banyosu	49
3.1.5. Mikro pipet	49
3.1.6. Argon gazı.....	49
3.1.7. Saf su.....	49
3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri.....	49
3.2.1. Kullanılan çözeltiler.....	50
3.3. Platin Yüzeye Polipirrol-polivinilsülfonat (PPy-PVS) Kaplanması.....	52
3.4. Platin/Polipirrol-Polivinilsülfonat (Pt/PPy-PVS) Elektrodun Hidrojen peroksit Duyarlılığının Belirlenmesi	53
3.5. Platin/Polipirrol-Polivinilsülfonat (Pt/PPy-PVS) Elektrodunun Serbest Enzimin Bulunduğu Çözeltide Hipoksantine Duyarlılığının Belirlenmesi	53
3.6. Platin/Polipirrol-polivinilsülfonat Elektrodunun, Serbest Enzimli Ortamda İki Enzimin Birbirlerine Karşı Oranlarının Cevap Akımlarına Etkisinin İncelenmesi	54
3.7. Platin/Polipirrol-Polivinilsülfonat Elektrodunun, Serbest Enzimli Ortamda Potansiyel Değişimine Karşı Cevap Akımlarındaki Değişimin İncelenmesi	54
3.8. Platin/Polipirrol-Polivinilsülfonat film üzerine Ksantin Oksidaz ve Ürikaz Enzimlerinin Çapraz Bağlama Yöntemi ile İmmobilizasyonu ...	55
3.9. Enzim İmmobilizasyonu Sırasında Kullanılan Glutaraldehit Miktarının Platin/Polipirrol-Polivinilsülfonat/GA-KO-U Enzim Elektrodun Cevabı Üzerine Etkisi.....	5

Sayfa

3.10. KO ve U Enzimlerini Tutuklama Yöntemi ile İmmobilize Ederek Pt/ Polipirol-Polivinilsülfonat-KO-U Enzim Elektrodunun Hazırlanması ve Bu Elektrodun Hipoksantine Duyarlılığının incelenmesi	56
3.11. Platin/Polipirol-polivinilsülfonat/Ksantinoksidaz-Ürikaz Enzim Elektrodunun Optimum Koşullarının Belirlenmesi	56
3.11.1. pH'nın etkisi	56
3.11.2. Sıcaklığın etkisi	57
3.11.3. Substrat derişiminin etkisi	57
3.11.4. Enzim elektrodunun tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi...	58
3.11.5. Enzim elektrodunun raf ömrünün belirlenmesi	58
3.12. Biyosensörün Gerçek Numuneler Üzerindeki Performansının İncelenmesi	59
3.12.1. Numune hazırlanması	59
3.12.2. Balık numunesi ile ölçüm alınması	59
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	61
4.1. Hazırlanan Pt/PPy-PVS Film Elektrodunun Duyarlılığının Test Edilmesi	63
4.2. Pt/PPy-PVS film Elektrodun Serbest Enzimli Ortamda Hipoksantine Duyarlılığının İncelenmesi	64
4.3. Platin/Polipirol-polivinilsülfonat Elektrodunun, Serbest Enzimli Ortamda İki Enzimin Birbirlerine Karşı Oranlarının Cevap Akımlarına Etkisinin İncelenmesi	65
4.4. Platin/Polipirol-Polivinilsülfonat Elektrodunun, Serbest Enzimli Ortamda Potansiyel Değişimine Karşı Cevap Akımlarındaki Değişimin İncelenmesi	67

Sayfa

4.5. Platin/Polipirol-Polivinilsülfonat film üzerine Ksantin Oksidaz ve Ürikaz Enzimlerinin Çapraz Balama ve Tutuklama Yöntemi ile İmmobilize Edilerek Sonuçların Değerlendirilmesi	68
4.6. Pt/PPy-PVS/KO-U Enzim Elektrodu Üzerine pH'nın Etkisinin İncelenmesi ve Enzim Elektrot İçin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi	70
4.7. Pt/PPyPVS/KO-U Enzim Elektrodun Değişen Sıcaklık Ortamlarında Cevap Akımlarının Ölçülmesi ve Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi	71
4.8. Pt/PPy-PVS/KO-U Enzim Elektrodunun Artan Hipoksantin Derişimine Karşı Davranışı	72
4.9. Pt/PPy-PVS/KOU Enzim Elektrodu İçin Kalibrasyon Grafiği Çizilmesi	74
4.10. Pt/PPy-PVS/KO-U Enzim Elektrodunun Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi.....	75
4.11. Enzim Elektrodun Raf Ömrünün Tayin Edilmesi	76
4.12. Biyosensörün Gerçek Numunelere Karşı Davranışının İncelenmesi.	77
4.12.1. Balık ölümü gerçekleştiği anda alınan ölçüm	78
4.12.2. Derin dondurucuda bekletilmiş balık numunesinde hipoksantin artışlarının gözlenmesi	79
4.12.3. Buzdolabında bekletilmiş balık numunesinde hipoksantin artışlarının gözlenmesi	80
4.12.4. Oda sıcaklığında bekletilmiş balık numunesinde hipoksantin artışlarının gözlenmesi	81
4.12.5. Derin dondurucuda, buzdolabında ve oda sıcaklığında bekletilen balık numuneleri için alınan hipoksantin ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması	82
4.13. Sonuç.....	83
KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ.....	91

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Mikrobiyal kaynaklı Ksantin oksidaz enziminin optimum koşulları, K_m değeri ve molekül kütlesi	7
Çizelge 2.2. Mikrobiyal kaynaklı ürikaz enziminin optimum koşulları, K_m değeri ve molekül kütlesi.....	11
Çizelge 2.3. Enzimin bağlanmasını sağlayan fonksiyonel gruplar	18
Çizelge 2.4. İletken polimerler ve iletkenlikleri	29
Çizelge 2.5. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması	35
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar	50

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Enzimatk rekaksiyonlar sonucu oluşan hipoksantin, ksantin ve ürik asitin halkalı yapıları	3
Şekil 2.1. Pürin bazlarının yıkımı.....	6
Şekil 2.2 KO enziminin bir alt ünitesinde bulunan FAD, Fe-S ve molibdenin birbirlerine göre konumu	8
Şekil 2.3. KO'nun molibden merkezinde meydana gelen ksantin oksidasyonunun mekanizması	9
Şekil 2.4. KO'ın yapısında bulunan kofaktörler	10
Şekil 2.5. Bir biyosensörün şematik yapısı.....	13
Şekil 2.6. Enzim immobilizasyon yöntemleri	16
Şekil 2.7. Kovalent Bağlama	18
Şekil 2.8. Adsorpsiyon	20
Şekil 2.9. İyonik bağlama	20
Şekil 2.10. Çapraz bağlama.....	22
Şekil 2.11. Polimer matrikste tutuklama	25
Şekil 2.12. Mikrokapsülleme	25
Şekil 2.13. Pirolün Polimerleşmesi.....	28
Şekil 2.14. Pirol molekülü	31
Şekil 2.15. Pirolün polimerizasyonuna ait mekanizma	32
Şekil 2.16. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal sıralamasında enzimlerin yeri	33
Şekil 2.17. Enzim sensörlerinin genel şematik gösterimi	34

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Kaplama ve ölçümde kullanılan hücre sistemi	48
Şekil 4.1. Elektrot yüzeyi ve hücre sistemi içerisinde elektron aktarımlarının ve indirgenen-yükseltgenen türlerin temsili şekli	62
Şekil 4.2. Hazırlanan film elektrodun artan hidrojen peroksit derişimine karşı cevap akımları	64
Şekil 4.3. Pt/PPy-PVS film elektrodun serbest enzimli ortamda hipoksantine cevabı	65
Şekil 4.4. Serbest enzimli ortamda, ksantin oksidaz ve ürikaz enzimlerinin birbirlerine göre oranlarının hipoksantine duyarlılığına etkisi	66
Şekil 4.5. Pt/PPy-PVS film elektrodun serbest enzimli ortamda farklı potansiyellerdeki akım değerleri.....	67
Şekil 4.6. Enzim immobilizasyon şeklinin akımlar üzerine etkisi	69
Şekil 4.7. Pt/PPy-PVS/KO-U enzim elektrot sisteminin farklı pH ortamlarındaki cevap akımları	70
Şekil 4.8. Pt/PPy-PVS/KO-U enzim elektrodun sıcaklık değışimine karşı duyarlılığı	71
Şekil 4.9. Pt/PPy-PVS/KO-U enzim elektrodunun artan hipoksantin derişimine karşı davranışı	72
Şekil 4.10. Enzim elektrot sisteminin Lineweaver-Burk grafiğı	73
Şekil 4.11. Pt/PPy-PVS/KO-U enzim elektrodunun kalibrasyon grafiğı	74
Şekil 4.12. Pt/PPy-PVS/KO-U enzim elektrodunun tekrar kullanılabilirliği ...	76
Şekil 4.13. Enzim elektrodun raf ömrü	77
Şekil 4.14. Balık ölümü gerçekleştiğı anda proteini çöktürölerek hazırlanmış numune için standart ekleme metodu ile hazırlanmış kalibrasyon grafiğı	78
Şekil 4.15. Derin dondurucuda bekletilen numune için peryodik aralıklarla alınan hipoksantin ölçüm sonuçlarının, bekletilen gün sayısına karşı grafiğı	79

Şekil	Sayfa
Şekil 4.16. Buzdolabında bekletilen numune için periyodik aralıklarla alınan hipoksantin ölçüm sonuçlarının, bekletilen gün sayısına karşı grafiği	80
Şekil 4.17. Oda sıcaklığında bekletilen numune için periyodik aralıklarla alınan hipoksantin ölçüm sonuçlarının, bekletilen gün sayısına karşı grafiği	81
Şekil 4.18. Her üç durum için alınan sonuçların karşılaştırılması	82

1. GİRİŞ

Hipoksantin($C_5N_4OH_4$), (M_A : 136,11); nükleik asit metabolizmasının ara ürünlerinden azotlu bir pürin bazıdır[1]. Hipoksantin biyolojik materyallerde adenin nükleotidinin yıkımının ana ürünü olarak biyolojik dokularda birikir. Bir balık öldüğü ya da yakalandığı anda bozulma başlar. Balık kasındaki nükleotidler balık ölünce yıkıma başlar ve sonrasında da devam eder. Başlangıçta balık kasında adenozin-5-trifosfat (ATP) parçalanır. Sonuçta adenozin-di-fosfat (ADP) oluşur, sonra bu ürün adenozin-5-mono fosfat (AMP), inosin-5-monofosfat (IMP), inosin (HxR), hipoksantin (Hx), ksantin (X) ve ürik asite parçalanır. Balıktaki hoş tatta inosin mono fosfat önemli bir faktörken, depolama esnasında biriken hipoksantin/ksantin ise balıktaki kötü tatta önemli bir faktördür.

Ksantin oksidaz enziminin katalizlediği, hipoksantin oksijenli ortamda ksantin ve hidrojen perokside dönüşmesi tepkimesi, balık kasındaki genel tepkimede oran belirleyici adım olarak tespit edilmiştir. Bu yüzden inosin ve/veya hipoksantin konsantrasyonu balık tazeliği belirleyicisi olarak kullanılabilmektedir. Mevcut hipoksantin miktarı tayini gıda endüstrisinde et tazeliği tespitinde ve insan vücudunda bazı patolojik proseslerde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yüzden hipoksantin miktar tayini gıda endüstrisinde balık ve diğer balık ürünlerinin kalite kontrolü için önem taşımaktadır.

Hipoksantin miktarını ölçebilmek için spektrofotometri, kromatografi ve elektroforez gibi yöntemler mevcuttur. Bu metotların bazıları analiz öncesi hazırlık süreci, bazıları karmaşık olması ve bazıları da uzun sürmesi nedeniyle zahmetli metodlardır. Elektrokimyasal biyosensörler, Hipoksantin miktar tayininin daha basit ve daha hızlı yapılmasına olanak sağlamak için geliştirilmiştir[2].

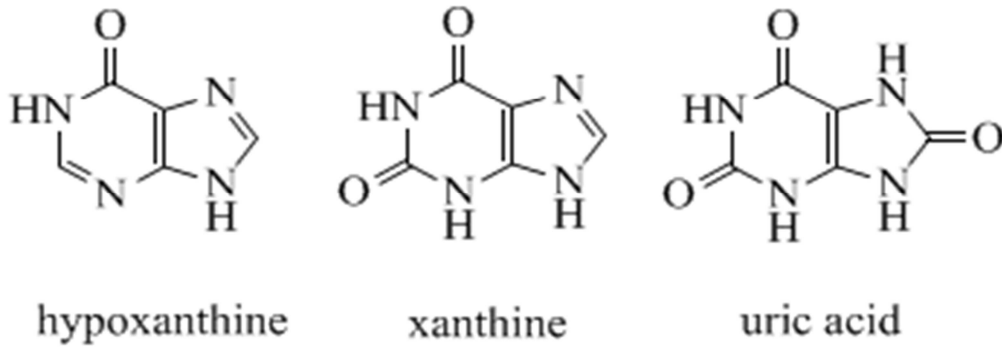
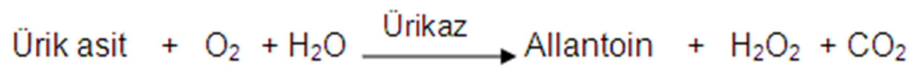
Her ne kadar biyolojik örneklerde bulunan elektrokimyasal aktif interferansların oksidasyonu bir akım meydana gelse de; elektrokimyasal

enzim sensörlerinde, enzimlerin hedef molekülleri spesifik olarak tanımasıyla reaksiyon oranında bir akım oluşmasına yol açarlar. Bu yüzden bu tip biyosensörler substrat tespitini etkin ve seçici bir şekilde yaparlar. Bir çok elektrokimyasal sensörde enzim, substratın oksidasyonunu katalizleyen bir oksidazdır. Algılama prosesinde elektron alıcı, katalitik bölgeden elektroda gidip- gelen elektronları kullanır. Bir çok enzimin doğal elektron akseptörü olduğu için, elektron alıcı olarak genellikle oksijen kullanılır[3].

Çalışmamızda balık tazeliği tespiti için, hipoksantine duyarlı, amperometrik esaslı yeni bir biyosensör hazırlandı. Bu amaçla platin levha üzerine polipirol/polivinilsülfonat (PPy/PVS) kompozit filmi pirolün elektropolimerleştirilmesiyle hazırlandı. Ksantin oksidaz (KO) ve ürikaz (U) enzimleri hapsedme yöntemiyle elektrod yüzeyine immobilize edilerek, PPy-PVS-KO-U enzim elektrodu hazırlandı.

Hipoksantin tayini, hipoksantin enzimatik tepkimeler sonucu allantoina yükseltgenmesi sonucu oluşan hidrojen peroksit moleküllerinin, +0,4 V'da yükseltgenmesi esasına dayanılarak yapıldı. Enzim elektrodu için en iyi çalışma koşulları araştırıldı ve performansını etkileyen faktörler araştırıldı. Enzim elektrodun tekrarlanabilirliği ve raf ömrü incelendi. Gerçek numune karşısındaki davranışına bakıldı. Bu amaçla balık numuneleri hazırlanarak, numunedeki hipoksantin miktarı tayin edildi. Balık numunesinin oda sıcaklığında, +6 °C sıcaklıktaki buzdolabı ortamında ve -18 °C 'de derin dondurucu ortamında belirli sürede bekletilmesi sonucu dokudaki hipoksantin miktarı değişimleri gözlemlendi ve karşılaştırıldı.

Hazırlanan PPy-PVS-KO-U enzim elektrodu üzerinde meydana gelen tepkime aşağıda verilmiştir:



Şekil 1.1. Enzimatik tepkimeler sonucu oluşan hipoksantin, ksantin ve ürik asitin halkalı yapıları

Bu çalışma immobilizasyon yöntemi ve çift enzimli elektrod sistemi olması bakımından diğer çalışmalardan farklıdır ve orjinaldir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Enzimler canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları katalize eden ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden yüzde 100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler. Canlıları oluşturan moleküller, yani biyomoleküller, kinetik yönden oldukça kararlı olup kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler. Bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Biyomoleküllerin kararlılığı şu önemli sonucu sağlamaktadır: Hücre içinde enzim olmayan reaksiyon hemen hemen vuku bulmaz, kendiliğinden meydana gelmez. Bunun anlamı, enzimler protein yapısında olduğu ve DNA seviyesinde düzenlenip, kontrol edilmektedir demektir. Buradan, enzimleri sadece katalizör özelliği ile nitelemenin eksik bir tanımlama olacağı anlaşılmaktadır. Gerçekten bu moleküller, bir hücreyi diğerlerinden farklı kılan özelliklere ait bilgilerin DNA'dan aktarılmasının en önemli araçlarıdır. Biyokimya tarihinde araştırmaların büyük çoğunluğunu enzimler üzerindeki çalışmalar oluşturmuştur.

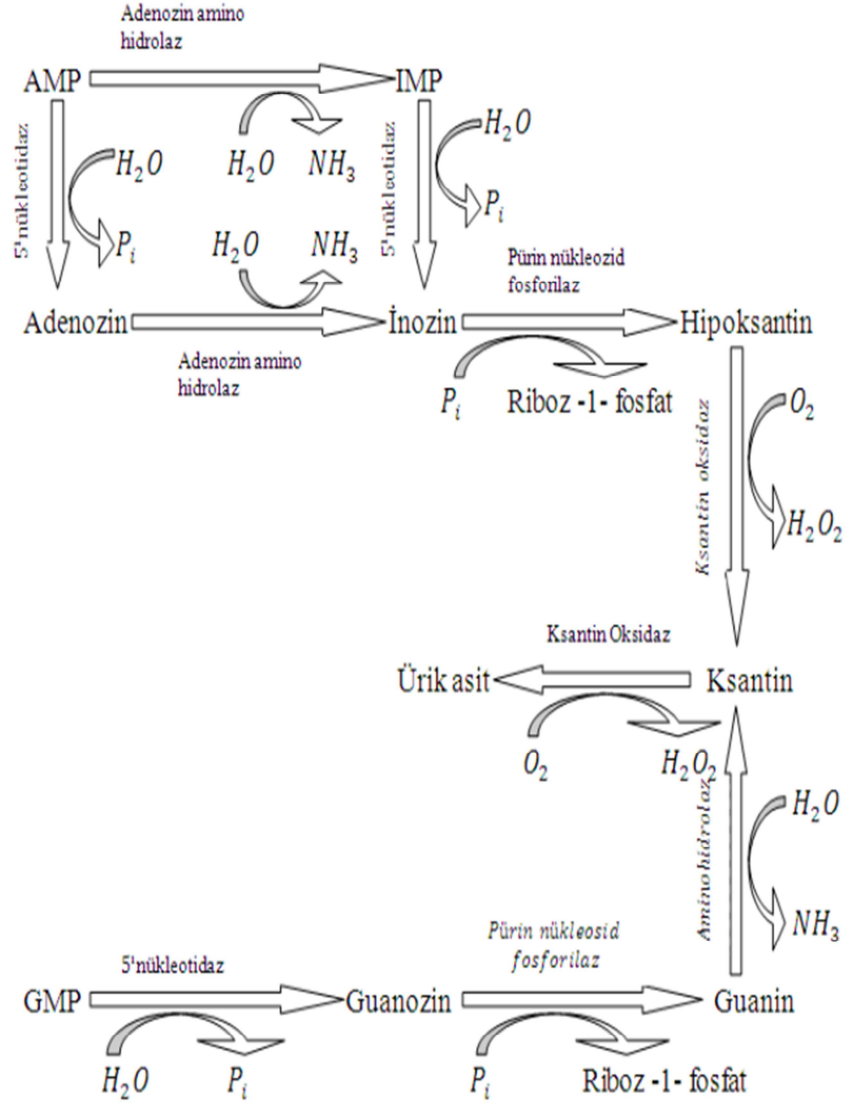
Kataliz olayı ile ilgili önemli ilk denemeler 1760-1825 yılları arasında midedeki enzimatik sindirim üzerinde yapılmıştır. Belirli bir enzim üzerindeki ilk çalışmayı 1835 yılında İsveçli bir kimyager olan S.S. Berzelius gerçekleştirmiş, diastazın nişastayı in vivo olarak sülfürik asitten daha yüksek verimle hidrolizlediğini göstermiştir. 1860 yılında L. Pasteur fermantasyon olayının enzimlerce yürütüldüğünü deneylerle isbat etmiş, bu yüzden enzimler için ferment terimi kullanılmaya başlanmıştır. Fakat Pasteur enzimlerin yalnız canlı hücre yapısı içerisinde görev yapabildiklerini zannetmiştir. Enzimoloji alanında şüphesiz en önemli gelişme 1926 yılında, J.B. Summer'ın üreaz enzimini "Jack Beané" bitkisinden elde edip

kristallendirdikten sonra protein yapısında bir bileşik olduğunu ortaya koymasındır. Önceleri şüphe ile karşılanan bir sonuç, 1930-1936 yılları arasında J. Northrop'un pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimlerini kristallendirmesi ve protein yapısında olduklarını kesin olarak ortaya koymasıyla doğrulanmıştır. Bugün yaklaşık olarak 2000 kadar enzim tanımlanmış, birçoğu saf halde elde edilip kinetikleri incelenmiş ve 200'den fazlası da kristallendirilmiştir. Ancak yapılan genetik çalışmalar daha tespit edilmemiş bir çok enzim varlığını göstermektedir[4].

Enzimler diğer proteinler gibi, yaklaşık 12 000'den 1 milyona değişen molekül ağırlığına sahiptir. Bazı enzimler amino asit kalıntıları dışında aktivite için kimyasal gruplara gereksinmez. Bazıları is kofaktör olarak adlandırılan Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , veya Zn^{+2} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon veya koenzim olarak adlandırılan kompleks organik ve metaloorganik moleküllere gereksinir. Enzim proteinine çok sıkı olarak veya hatta kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal iyonu bir prostetik grup olarak adlandırılır[5].

2.2. Ksantin Oksidoredüktaz (KOR) Enzimi ve Özellikleri

Ksantin oksidoredüktaz (KOR) molibden içeren bir flavoenzimdir. KOR her biri 290 kDa molekül kütlesine sahip iki homodimerden oluşur. Herbir homodimer bir Mo kofaktör, iki $[2Fe-2S]$ merkezi ve bir FAD molekülü içerir[6]. KOR insanlarda DNA, RNA'nın yanı sıra ATP, GTP ve cAMP gibi yüksek enerjili fosfatların katabolizmasının son ürünlerinden olan hipoksantin ve ksantine, ve ksantin ürik aside oksidasyonunu katalizler.



Şekil 2.1. Pürin bazlarının yıkımı

KOR demir merkezli bir metaloflavoproteinidir ve insanda 2p22 kromozomunda yer alan tekli bir gen tarafından kodlanmıştır[7]. Bilinen tüm KOR enzimleri yaklaşık 1330 aminoasit içerir. Yalnız tavuktan alınan KOR enziminin 1358 aminoasit içerdiği görülmüştür. Aminoasit dizilimi, farklı türlerden elde edilen enzimlere göre farklılıklar göstermektedir[8]. Memeli kaynaklı enzim birbirine dönüşebilen iki form içerir. Bunlar Ksantin dehidrojenaz (KDH) ve ksantin oksidoredüktazdır. Bu iki form sülfid reaktifleri tarafından birbirine tersinir olarak dönüşebildiği gibi, proteolizler tarafından da tersinmez bir şekilde birbirlerine dönüşebilirler. Kuşlardan alınan enzim ise

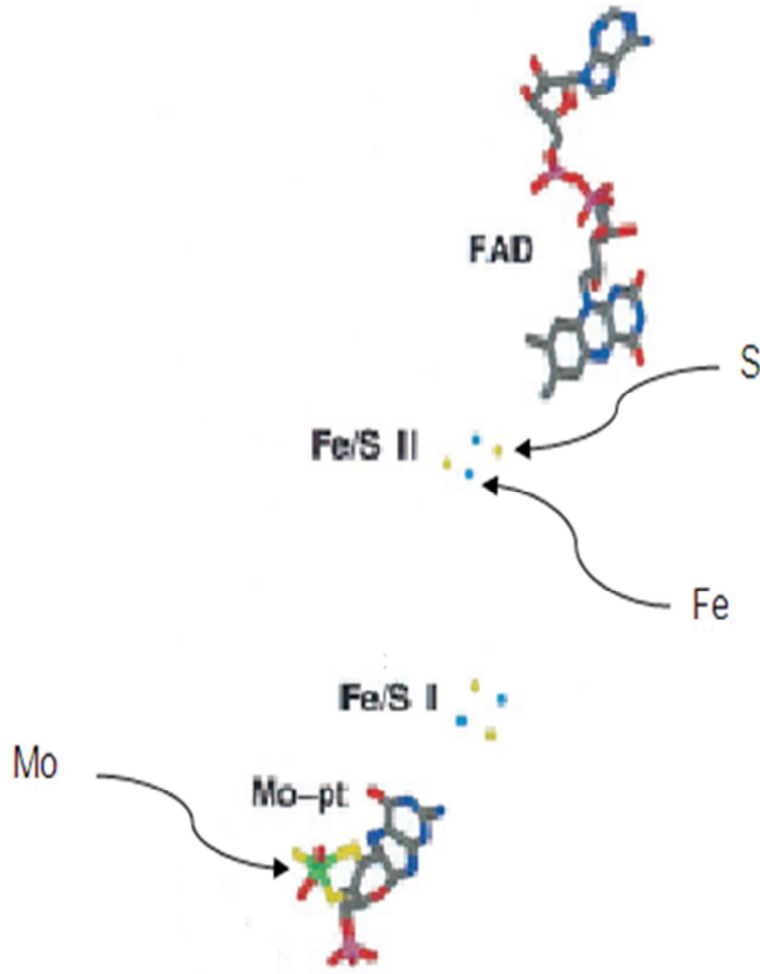
yalnızca KDH formu bulunur. KDH NAD^+ indirger, fakat KOR NAD^+ yerine moleküler oksijeni kullanır[9].

KOR enzimine enzim komisyonunca verilen kod numarası E.C. 1.1.3.22'dir. Bu kodlamada E.C.1. enzim sınıflandırmasında oksidoredüktazlar sınıfını, E.C.1.1. oksidoredüktazlar sınıfının CHOH grubunu katalizleyen enzimlerini, E.C.1.1.3. bu sınıftaki enzimlerin elektron alıcı olarak moleküler oksijeni kullanan enzimleri, E.C.1.1.3.22 ise bu enzime enzim komisyonu tarafından verilen numarayı göstermektedir.

Çizelge 2.1. Mikrobiyal kaynaklı KOR enziminin optimum koşullar, K_m ve molekül kütlesi[10]

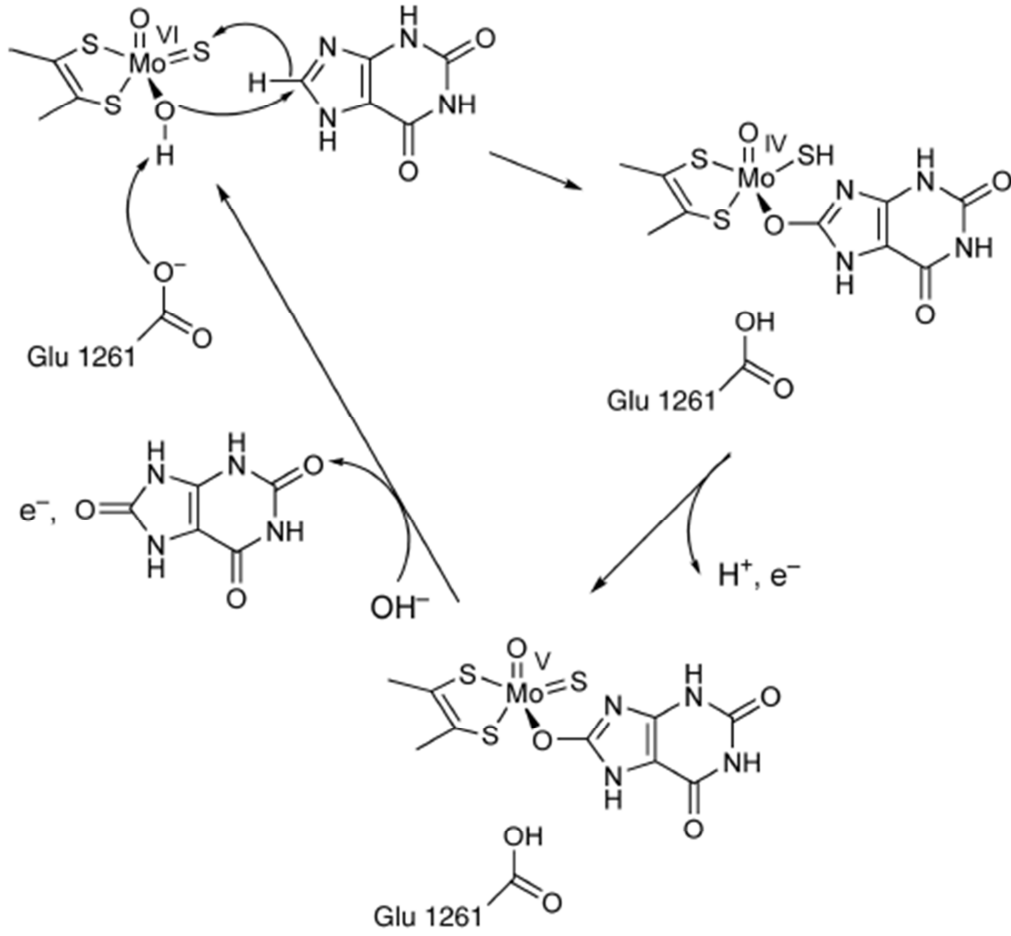
Optimum pH	7,5 – 8,0
Optimum pl	4,0
Optimum Sıcaklık	65 °C
Molekül Kütlesi	160 kDa
Km	76 μM [Hipoksantin], 45 μM [Ksantin]

Ksantin/hipoksantin oksidasyonu molibden merkezinde meydana gelir ve burada oluşan elektronlar kendi göreceli redoks potansiyellerine göre diğer merkezlere ayrılırlar. Substrat oksidasyonu ile indirgenmiş olan enzimin tekrar eski haline dönmesi ise Fe-S aracılığı ile FAD merkezinde gerçekleşir[8].



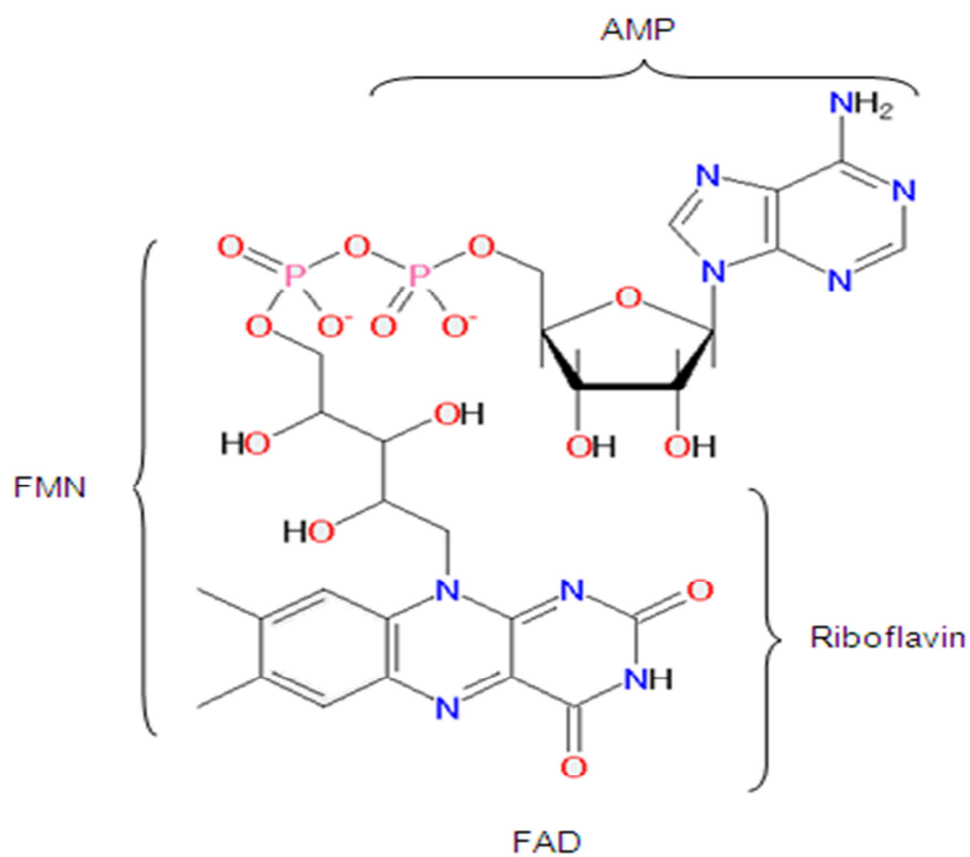
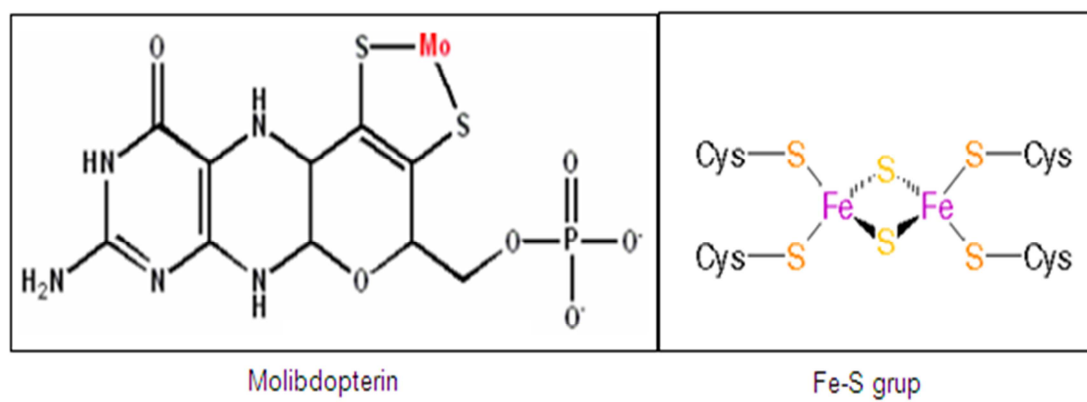
Şekil 2.2. KOR enziminin bir alt ünitesinde bulunan FAD, Fe-S ve molibdenin birbirlerine göre konumu[9].

Şekil 2.2’de gösterilen Mo-pt, molibdopterinin kısaltmasıdır. Mo kofaktörü Mo ve pterin tarafından oluşturulan organik kompleks bir yapıdır ve molibdopterin olarak bilinir[11].



Şekil 2.3. KO'nın molibden merkezinde meydana gelen ksantin oksidasyonunun mekanizması[12]

Aktif bölgedeki aminoasit Mo-OH grubundaki protonu alır. Ardından oksijen substratın C-8 pozisyonuna nükleofilik olarak saldırır. Bu sırada bir hidrojen atomu Mo=S bölgesine transfer olur. Ve şekilde görüldüğü gibi bir LMO^{IV}O(SH)(OR) türü oluşur (L ile temsil edilen molibdopterin kompleksidir). OR ile metal koordineli ürün üzerinden yeni bir hidroksil grubu oluşur. Bu ara ürün enzimin diğer redoks aktif merkezlerine elektron transferi ile parçalanır. Bu arada Elektron Paramanyetik Rezonans spektroskopisi (EPR) tarafından tespit edilebilen geçici bir Mo(V) ara formu oluşur. Ürünün kopmasını takiben çözücünden bir hidroksil gurubu bağlanarak başlangıçtaki LMO^{VI}OS(OH) durumuna geri döner[13].



Şekil 2.4. KOR'un yapısında bulunan kofaktörler

2.3. Ürikaz (U) Enzimi ve Özellikleri

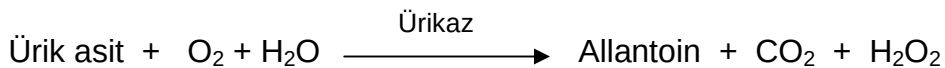
Ürikaz enzimi 120 kDa molekül ağırlığına sahip 4 alt birimli bir proteindir. Her bir alt birim 30 kDa molekül ağırlığına sahiptir[14]. Ürikaz (E.C. 1.7.3.3) ürik asidin 5-hidroksiüreata oksidasyonunu katalizler. Bu katalizleme esnasında oksijeni de hidrojen peroksite indirger. 5-hidroksiüreat yarı kararlı bir üründür ve hem doğal olarak hem de enzimatik olarak allantoin dönüşür. Allantoin ürik aside göre daha iyi çözünür ve atılması daha kolaydır. Ürat oksidaz ya da diğer adıyla ürikaz birçok canlı organizmada bulunur. Pürin bazlarının yıkımında ve kanda ürik asidin birikmesini önlemede görev alır.

Çizelge 2.2. Mikrobiyal kaynaklı ürikaz enziminin optimum koşulları, K_m değeri ve molekül kütlesi

Optimum pH	9,2
Optimum pl	4,64
Optimum Sıcaklık	40 °C
Molekül Kütlesi	120 kDa
K_m	25 μ M [ürik asit]

İnsanda ürik asitin birikmesinin avantajı ve dezavantajı vardır. Ürik asit kuvvetli bir antioksidandır ve hücrelerde bulunan serbest radikallerin dönüştürülmesine yardımcı olur. Fakat yüksek konsantrasyonlarda plazmada birikir ve ölümcül olabilen hasarlara yol açabilir[14,15].

Ürikazın katalizlediği reaksiyon:



Bu enzim memelilerin birçoğunda mevcut olup çoğunlukla onların karaciğerinde bulunmaktadır. İnsan ve maymunlarda ise bu enzim yoktur.

Biyolojik sıvılarda ürik asitin miktarı bazı hastalıkların teşhisinde önem taşımaktadır. Bu hastalıklar: gut hastalığı, böbrek hastalığı, Lesch-Nyhan sendromu ve organik asidemi gibi hastalıklardır. Ayrıca biyolojik sıvılardaki ürik asitin artan miktarı sonucu oluşan hiperüriseminin, böbrek hastalıkları, hipertansiyon ve kalp damar hastalığı (kardiyovasküler) türü rahatsızlıklarla ilgisi olduğu bazı makalelerde belirtilmektedir. Ürikazın insanlarda olmayışının avantajlı sayılacak bir yönü ise ürik asitin kuvvetli bir antioksidant oluşudur. Bu özelliği sayesinde ürik asit, radikalik oksijen türlerini yok eder ve başta lipid peroksidasyonu olmak üzere doku hasarlarını önlemede önemli rol oynar[16].

2.4. Biyosensörler

Sensörler, fiziksel olguları elektrik sinyaline dönüştüren cihazlardır. Mekanik duyu organları diyebileceğimiz bu cihazlar, çalışma şekillerine göre ve dönüştürücü adı verilen yapılarına göre çeşitlere ayrılmaktadır. Termal, mekanik, kimyasal, akustik, radyoaktif biyosensörler bunlardan bazılarıdır.

2.4.1. Biyosensörlerin tarihçesi

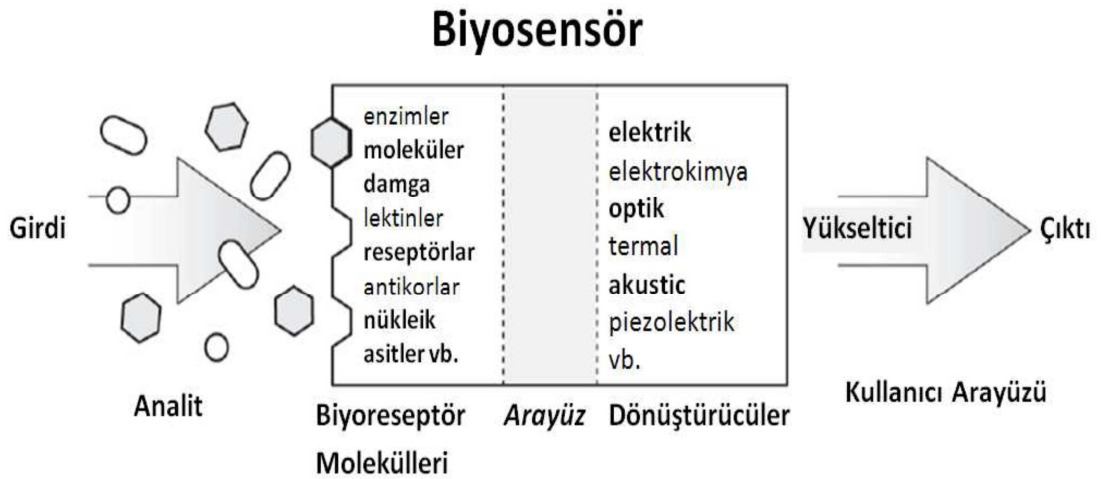
Clark ve Lyons (1962) ilk defa biyosensör terimini ifade etmişlerdir. Enzim-elektrot kompleksini imal eden ikili, bu kompleksi glukoz sensörü olarak kullanmışlardır. Sensör, oksido-redüktaz enzim olan glukoz oksidazın platin elektroda immobilize olmasından ibarettir. Platin elektrod enzim tarafından üretilen H_2O_2 tarafından +0,6 V'da polarize olur. İşte basitçe bu prensibe göre çalışan tarihin ilk biyosensörü 1974 yılında piyasada *Yellow Springs Instrument* (YSI) olarak görülmüştür.

YSI sensörünün geliştirilmesinde ana özellik yeni membranlardır. Clark burada sandviç membran kullanmıştır. Enzim nükleopor polikarbonat membran ve selluloz asetat membran arasına hapsolmuştur. Bu membranlar normalde ortamın potansiyel yapısını etkileyecek olan diğer faktörleri elimine etmekte ve cihazın duyarlılığını ve özgünlüğünü artırmaktadır. Mesela,

Clark'ın kullandığı membran H_2O_2 'ı diffüze ederken askorbat ve diğer parazitik kimyasalların geçişini engellemektedir.

2.4.2. Biyosensörün ana gövdesini oluşturan yapılar

Biyosensörler bir çok sensör gibi reseptör ve dönüştürücü olmak üzere iki ana yapıdan ibarettir. Eğer reseptör biyomoleküler yapıda ise buna biyoreseptör adı verilir. Biyoreseptörler analiti fark edebilen biyomoleküllerdir. Dönüştürücüler ise biyoreseptörün analiti fark ettiği esnada ürettiği kimyasal ya da fiziksel sinyali elektrik sinyaline dönüştüren yapılardır. Biyosensörler sayesinde normalde uzun tahliller gerektiren analizler daha kısa sürede yapılabilmektedir[17]. Kısa sürede sonuca ulaştırması, yüksek seçiciliği, tekrar kullanılabilirliği ve analiz masraflarının az olması biyosensörlerin en önemli avantajlarından[18].



Şekil 2.5. Bir biyosensörün şematik yapısı

2.4.3 Biyoreseptörler

Biyoreseptör olarak değişik biyomoleküller kullanılabilir. Bu biyomoleküllerden en çok kullanılan enzimlerdir. Enzimler hedef moleküllere oldukça özgüdür. Binlerce farklı analit içinden hedef analiti seçip reaksiyon oluşturabilen bu biyokatalizörlerin dönüştürücülere bir şekilde immobilize edilmesi gerekmektedir.

Matrikse fiziksel hapsedme veya kimyasal bağlama yöntemleri analiti tanıyan biyomoleküllerin dönüştürücülere immobilizasyonunda kullanılan stratejilerdir. Kimyasal bağlama yönteminde biyomolekül dönüştürücü yüzeyine uygun bir reaktif tarafından kovalent olarak bağlanır. Çok az sayıda biyomolekülün bağlanması bile biyosensörün etkili çalışması için yeterli olabilir.

2.4.4. Dönüştürücüler

Biyoreseptörün analiti tanıdıktan sonra ortamda oluşan fiziksel veya kimyasal değişimi algılayıp bunu ölçülebilir dijital sinyallere dönüştüren cihazlardır.

2.4.5. Biyosensör dizaynında dikkat edilmesi gerekenler

Biyosensör tasarımlarında önce biyosensörün hangi analiti tanıyacağı tespit edilmelidir. Sonrasında ise aşağıdaki maddeler dikkate alınarak biyosensörler dizayn edilmelidir. Bunlar sırasıyla;

- i) Analite uygun biyoreseptörün seçimi,
- ii) Biyoreseptörü dönüştürücüye sabitlemede kullanılacak uygun ve verimli immobilizasyon metodunun seçimi,
- iii) Biyoreseptörün analiti tanımasıyla oluşan kimyasal veya fiziksel sinyali anlaşılabilir sinyal formuna dönüştürecek olan dönüştürücünün seçimi ve dizaynı, olarak sıralanabilir[17].

2.4.6. Biyosensörlerde kullanılan biyoaktif yapılar

Biyosensörlerde kullanılan ve analizlenecek madde ile spesifik bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bileşenler, komplekslik sıralamasına göre basitten karmaşığa doğru bir sıralama yapıldığında; iyonoforlar, antikörler, enzimler, nükleik asitler, lipozomlar, biyomembranlar (örneğin; membran reseptörleri), hücre organelleri, tüm hücreler, doku kesitleri ve homojenatları ve organlar olarak sınıflandırılabilirler. Biyosensörlerde, biyoaktif bileşenin tayin edilecek madde ile etkileştiğinde oluşan sinyalin iletim ve ölçümünde, genel olarak, elektrokimyasal, optik, kalorimetrik, ve piezoelektrik esaslı sistemler kullanılır.

2.4.7. Biyosensörlerde biyoaktif bileşen immobilizasyon yöntemleri

Biyoaktif bileşen ile iletici unsurun birleştirilmesinde oldukça farklı immobilizasyon yöntemlerinden yararlanılabilir. Biyoaktif bileşen sensör olarak da adlandırabileceğimiz temel unsur üzerinde fiziksel olarak, jel içinde veya polimer matrikste tutuklanabilir, elektrot yüzeyinde biriktirilebilir, kovalent veya çapraz bağlanarak immobilize edilebilir.

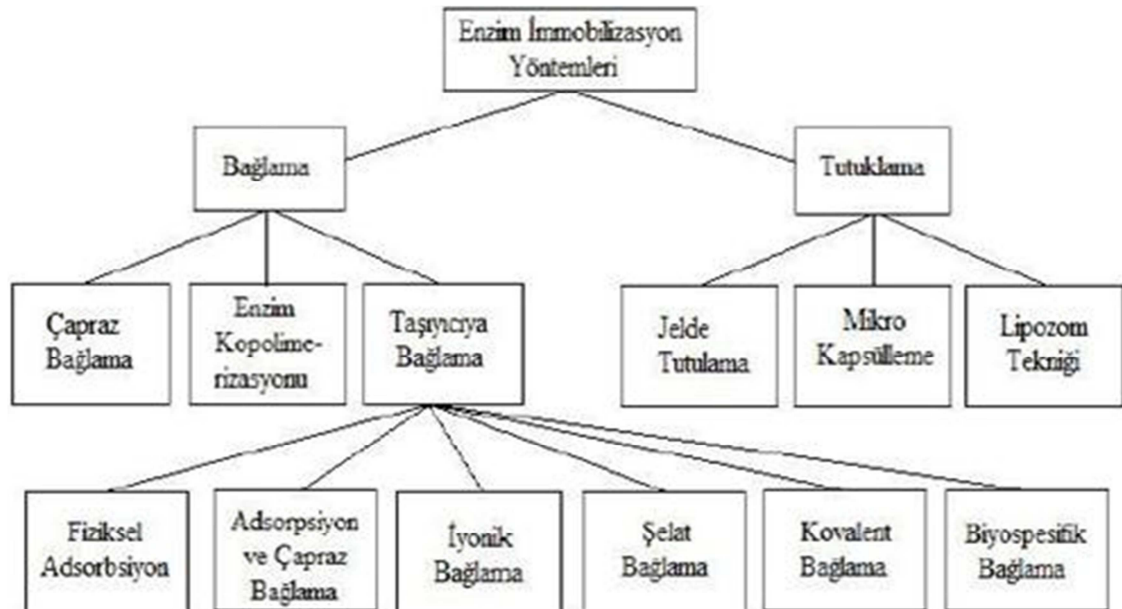
2.4.8. Enzim immobilizasyon metotları

Enzimin elektrot yüzeyine yüksek aktivite ile ince tabaka içerisinde fiziksel olarak yerleştirilmesi kovalent ve kovalent olmayan metotlarla gerçekleştirilir. Basitçe immobilizasyon, serbest haldeki enzimi elektrot yüzeyinde yarı geçirgen bir membran kullanarak tutmak suretiyle gerçekleştirilir. Elde edilen prob, çoğunlukla kötü stabilite gösterir ve fazla miktarda enzime gereksinim duyar.

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere üstünlükleri şöyle sıralanabilir;

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Çevre koşullarında(pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Serbest enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda, serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.
- Mekanistik çalışmalar için uygundur.

Şekil 2.6'da enzim immobilizasyon yöntemleri şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Fiziksel ya da kimyasal olarak immobilize edilen enzimler, daha iyi bir stabilite gösterir ve diğer maddelerle etkileşimi daha azdır. Tercih edilen immobilizasyon metotları aşağıdaki gibidir;

Taşıyıcıya bağlama yöntemleri

Taşıyıcıya bağlamada bir protein olan enzim molekülünün yapısından yararlanılır. Molekül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler bu bağlamada rol alırlar.

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekir. Immobilizasyon, çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde, enzim-taşıyıcı bağının aktive için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında, taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilir.

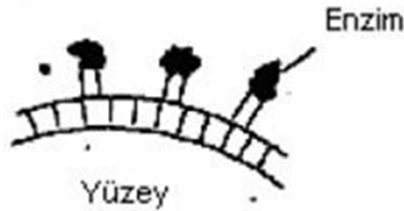
Kovalent bağlama

Enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması genelde sulu ortamda gerçekleştirilir. Reaktif taşıyıcıda ve enzimde bulunup enzimin bağlanmasını sağlayan fonksiyonel gruplar aşağıdaki gibidir;

Çizelge 2.3. Enzimin bağlanmasını sağlayan fonksiyonel gruplar

Reaktif Gruplar	
Taşıyıcı	Enzim
OH	NH ₂
COOH	NH ₂
NH ₂	COOH, NH ₂
COOH	NH ₂
COOH	NH ₂
CH ₂ COOH	CH ₂ CON ₃
CHO	NH ₂

Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Taşıyıcıya kovalent bağlanma enzimin zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir.



Şekil 2.7. Kovalent bağlama

Adsorpsiyon

Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Proteinler ve özellikle enzimlerin katı yüzeylerde adsorpsiyonu detaylıca araştırılmıştır. Adsorpsiyonun asıl amacı enzim immobilizasyonu olmayıp, enzim saflaştırmaktır. Fakat suda çözünmeyen taşıyıcılarda adsorpsiyon yönteminin enzim immobilizasyonunda oldukça sık kullanıldığını görmekteyiz.

Yöntem, yüzey aktif suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Taşıyıcıya bağlanmada etkin olan Van der Waals kuvvetleridir. Adsorbanlar çok değişik türde olmakla birlikte iyi bir adsorpsiyon sağlayabilmek için genellikle adsorbanın bir ön işleminden geçirilmesi gerekir.

Enzim immobilizasyonunda en sık kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, CaCO_3 , kül, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır.

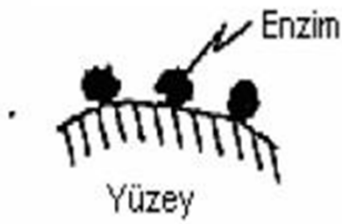
Bir enzimin suda çözünmeyen taşıyıcıda adsorpsiyonu pH, çözücü, iyon şiddeti, enzim-adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlere bağlıdır. Bu faktörlerin araştırılması, adsorpsiyon ve aktivitenin önemli ölçüde geri kazanılması için optimal koşulların saptanması çok önemlidir. Adsorpsiyon mekanizması genellikle çok karışık olup, birçok olasılıktan hangisinin gerçekleşeceğinin önceden saptanması güçtür.

Prensip olarak, bir proteinin aktif yüzeylerde adsorpsiyonu tersinir bir işlem olmalıdır. Ancak bazı durumlarda (örneğin; kolenitte adsorplanmış üreaz) tersinir olmayan adsorpsiyon söz konusu olabilmektedir. Eğer aktivite sabit kalıyor ve immobilize enzim sürekli işlemlerde kullanılabiliyorsa, bu tür adsorpsiyon enzim immobilizasyonu için idealdir. Desorpsiyon, reaksiyon ürünlerinin kirlenmesine ve aktivitede sürekli bir değişmeye neden olur. Tersinir adsorpsiyonlar enzim immobilizasyonu için pek uygun değildir.

Bazı adsorbanlar bir enzimin farklı biçimlerini, aktif veya inaktif biçimlerinden birini adsorbe ederken, diğerini desorbe etmektedir. Eğer enzimin aktif şekli desorbe edilirse bazı durumlarda immobilize enzimin bağıl aktivitesi yüzde 100'den büyük değerler alır, tersi durumda bağıl aktivite sıfır olur, yani immobilizasyon ürünü hiç aktivite göstermemektedir.

Yöntemin yararları; enzimin immobilizasyon işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve bir yandan

immobilizasyonu gerçekleştirirken diğer yandan enzim saflaştırılmasına olanak sağlamasıdır. Yöntemin sakıncaları; her ne kadar immobilizasyon işlemi kolaysa da optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzimle taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa, bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçer ve ürünlerin kirlenmesine neden olur.

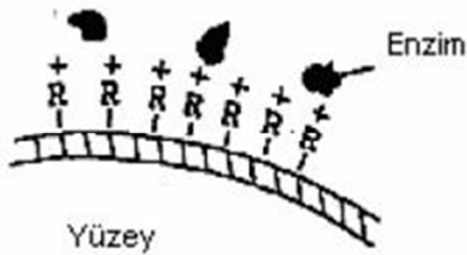


Şekil 2.8. Adsorpsiyon

İyonik bağlama

Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlama yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır.

İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden, enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak; enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçıışı söz konusudur.



Şekil 2.9. İyonik bağlama

Şelat bağlama

Bazı transizyon metallerinin şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması mümkündür. Yöntem ilk kez 1971 yılında uygulanmış olup, daha sonra da kullanılmaya devam edilmiştir.

Biyospesifik bağlama

Enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanılarak enzim immobilize edilebilir. Lektinler, spesifik karbonhidrat atıklarını içeren enzimlere kuvvetlice bağlanırlar. Örneğin bu yöntemle immobilize edilen invertaz, sakkarozun kesiksiz inversiyonunda kullanılmıştır. Spesifik monoklonal antikorları suda çözünmeyen materyale bağlayarak hazırlanan taşıyıcılar enzim immobilizasyonunda başarılı biçimde kullanılmaktadır.

Çapraz bağlama yöntemleri

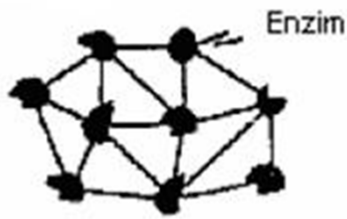
Küçük molekül, bi veya multi fonksiyonel reaktiller enzim molekülleri arasında kovalent bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH ya da immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır. İntermoleküler bağlanmalar yanında, intramoleküler bağlanmalar da söz konusudur.

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu 4 farklı şekilde gerçekleşir:

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

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; gluteraldehit, kloroformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, p-benzokinon, transizyon metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir.

Çapraz bağlama reaksiyonu çok yumuşak koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur. Enzimler bu şekilde birbirlerine bağlandıklarında jelatinimsi bir yapı oluştururlar, bu nedenle mekanik bakımdan çok kararsızlardır. Çok sayıda enzimin diğer enzimler için matriks olarak davranmasından dolayı bu metot iyi bir immobilizasyon metodu değildir. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifi gluteraldehitdir.



Şekil 2.10. Çapraz bağlama

Kopolimerizasyon yöntemleri

Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranır ve böylelikle polimer matrikse bağlanmış olur. Yöntem, polimer matrikse tutuklamaya benzetmekle birlikte enzim kaçışının önlenmiş olması gibi üstünlüğü vardır.

Tutuklama yöntemleri

Prensip olarak tutuklama enzim molekülünü belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem, polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen

membranlar içinde mikrokapsülleme ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik; enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

Polimer matrikste tutuklama

Polimerizasyon ve çapraz bağlamanın olduğu ortamda enzim de bulunduğu takdirde enzim, çapraz bağlanma sonucu oluşan odacıklarda(kafes) tutuklanmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer; N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir.

Yöntem, yüksek derece çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir.

Çapraz bağ yüzdesi öyle ayarlanmalıdır ki, enzim molekülleri tutuklanabilsin ama substratın enzimlere ulaşmasına engel olunmasın. Çapraz bağ yüzdesinin aşırı olması substratın enzim aktif merkezlerine ulaşmasını engellemekle kalmayıp enzimin zincir yapısını da zorlayıp aktivite kaybına veya tamamen inaktif olmasına neden olabilir. Bu nedenle optimal bir çapraz bağ yüzdesi saptanması önemlidir. Bu oran, enzime ve taşıyıcıya bağlı olarak değişir.

Uygun çaplı substrat molekülleri polimer kafes içinde tutuklanmış enzim moleküllerine ulaşır ve reaksiyon ürünleri de dışarı çıkar. Bu yöntemde kullanılacak substratın küçük molekül olması gerekir. Bu tip immobilizasyon, ilk kez 1963 yılında tripsin, kimotripsin ve diğer enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmıştır.

Molekül kütlesi 15000'den fazla olan enzimlerin bu yöntemle immobilizasyonları oldukça kolaydır. Bu tür immobilizasyon işleminde en çok kullanılan taşıyıcılar; hidrofilik temele dayalı poliakrilamid jeli ve jel oluşturan polisakkaritlerdir. Ayrıca silikon lastiği ve silikajel de kullanılmaktadır. Tutuklama yanında özellikle yüklü polimerlerde fiziksel adsorpsiyonun da etkin olduğu saptanmıştır.

Polimer zincirleri arasındaki çapraz bağlama değişik bifonksiyonel veya multi-fonksiyonel reaktiflerle sağlanmaktadır. Örneğin, bu yöntemle enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan taşıyıcı olan poliakrilamidin çapraşık bağlanması N,N'-metilenbisakrilamid ile gerçekleştirilir.

Çapraz bağlı taşıyıcıların hazırlanmasında, monomer ve çapraz bağlayıcı reaktiflerin mol oranları çok önemlidir. Bu durum bir yandan enzim moleküllerinin tutuklanacağı hücrelerin çapına etki ederken, diğer yandan taşıyıcının fiziksel özelliklerinde önemli değişmelere de neden olacaktır.

Bu yöntemle immobilize edilen enzimin asıl özelliklerinde bir değişme beklenmez. Ancak taşıyıcının tipi ve enzimatik reaksiyonlar bölgesel mikro çevre etkilerinin oluşmasına neden olurlar. Örneğin, taşıyıcının yüklü olması önemli bir etkindir. Taşıyıcının yüklü olması immobilize enzimin özelliklerinde doğal enzime kıyasla çok önemli değişmelere neden olmaktadır.

Bu yöntemin yararları; çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem olması ve çok az miktarlarda enzim kullanılarak gerçekleştirilmesidir. Nötral, suda çözünmeyen taşıyıcılarla da immobilizasyon gerçekleştirilmekte ve kimyasal bir bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcıya gerek duyulmamaktadır.

Yöntemin sakıncaları ise; immobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun deney koşullarına çok sıkı bağımlı oluşu ve immobilize enzimin ancak küçük moleküllü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir.



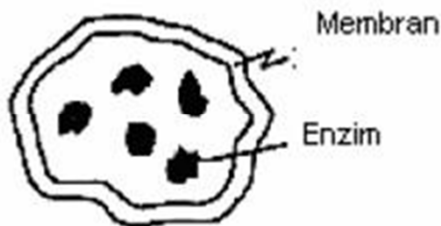
Şekil 2.11. Polimer matrikste tutuklama

Mikrokapsülleme

Bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasından ibarettir. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 μm arasında değişir.

Enzimler daha çok kimyasal mikrokapsüllemeye immobilize edilir. Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu; sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen membran mikrokapsüllerde tutuklama olmak üzere iki grupta incelenebilir.

Sürekli mikrokapsüllerde çerçeve membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde lipozomlar ise bir sıvı tabakadır. İmmobilizasyonda kullanılan çerçeve maddesinin(membran) yarı geçirgen olması zorunludur. Ayrıca bu yarı geçirgen membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntemle immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır[19].

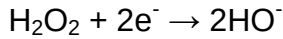
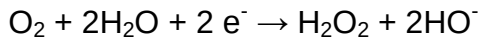


Şekil 2.12. Mikrokapsülleme

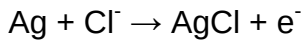
2.4.9. Elektrokimyasal esaslı biyosensörler

-Amperometri esaslı biyosensörler: Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. Kalibrasyondan sonra , akım yoğunluklarından ilgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde yararlanılır. İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark, ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir. Oksijen tüketimine ilişkin reaksiyonlar aşağıda verilmiştir:

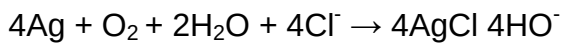
Katodik reaksiyon:



Anodik reaksiyon:



Toplam reaksiyon:



Bir biyosensörün biyoaktif tabakasındaki reaksiyonlar oldukça kompleks bir kinetiğe sahiptirler.

-Potansiyometri esaslı biyosensörler: Potansiyometri bilindiği gibi en genel anlamda bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlar. Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörler pH ya da tek değerlikli iyonlara duyar cam elektrotlar; anyon ya da katyonlara duyar iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz duyar elektrotlardır.

Bunların dışında, yarı iletken esaslı, optik esaslı, kalorimetri esaslı, piazoelektrik esaslı, kuru rektif kimyası esaslı biyosensörler de hazırlanıp kullanılmaktadır[20].

2.5. İletken Polimerler

İletken polimerlerin kimyasal, biyosensör teknolojisi, enerji korunumu ve depolanması, ilaç ve enzim faaliyetlerinde önemli bir yeri vardır.

2.5.1. İletken polimerlerin tarihsel gelişimi

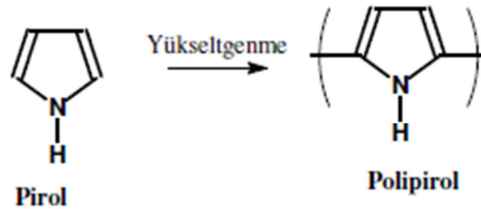
İlk olarak elektrokimyasal polimerizasyon metodu 190 yılında Szarvasy tarafından yapıldı. Fakat Szarvasy çalışmasıyla ilgili bir çalışma yapılamadı. Rambold'un metilmetakrilatın elektrokimyasal polimerizasyonunu 1947'de tezinde ele almasına kadar polimerizasyon hakkında önemli bir çalışma yapılamadı. Bu zamandan sonra 1950-1970 arasında bu alanda birçok çalışma yapıldı. Chiang poliasetilenin iletkenliğini yükseltgen dopantlarla artırmayı başardı.

Önemli bir çalışma ise polipirol (PPy) üzerinde yapıldı. Pirolün ilk elektrokimyasal polimerizasyonu Bocchi tarafından 1968 yılında gerçekleştirildi. Bocchi "siyah pirolü" adlı maddeyi 8 S/cm elektrik iletkenliğinde elde etti. 1979 yılında havanın neminden etkilenmeyen iletkenliği 100 S/cm olan free standing filmler hazırladı. Günümüzde PPy filmleri oda koşullarında 1000 S/cm iletkenliğine sahip olarak hazırlanabilmektedir. Polimerlerin mekanik özelliklerinin geliştirilmesinin bir diğer yolu da kopolimerizasyondur. Stake polimetilmetakrilat üzerine pirolün grafitini yayınladı. Metilmetakrilat ve 2-(-pirol) etilmetakrilat komonomerlerini pirol üzerine $FeCl_3$ yükseltgenini kullanarak grafit kopolimerini sentezlemeyi başardılar. Mc. Diamid iletken polimerler konusunda önemli bir çalışmasıyla Nobel ödülü almıştır.

2.5.2. İletken polimerler

Polimerik malzemeleri metallerden ayıran en önemli özellik yalıtkan olmalarıdır. Bu özellik polimerik malzemelerin kullanımında birçok üstünlükler sağlar. Fakat son yıllarda, elektrik akımını iletebilen yeni bir organik polimer sınıfı geliştirildi. Asetilen, pirol, tiyofen gibi çeşitli benzen türevlerinden sentezlenen ve “organik metaller” olarak da bilinen bu polimer korozyon önleyici kaplama olarak, pillerde ve kararlılıklarına bağlı olarak mikroelettronikte önemli bir potansiyele sahiptirler. Bu polimerler arasında polipirol ve türevleri, elektriksel özelliği, çevresel kararlılığı, kimyasal ve elektrokimyasal sentezinin kolaylığı nedeniyle en yoğun şekilde incelenmeye alınmış grubu oluşturmaktadır.

Polipirol ve türevleri genellikle pirolün kimyasal ve elektrokimyasal oksidasyonu ile hazırlanırlar.

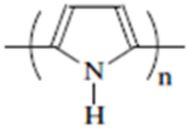
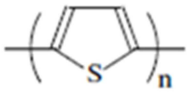
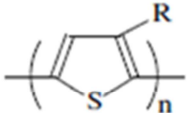
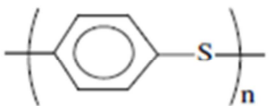
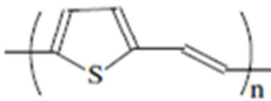
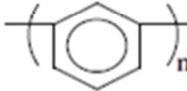
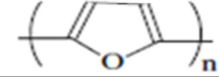
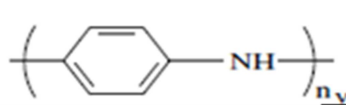


Şekil 2.13. Pirolün Polimerleşmesi

Pirolün kimyasal sentezi yanı sıra elektrokimyasal sentezi de uzun yıllardan beri bilinen bir yöntemdir. Sulu ya da susuz ortmada elektrokimyasal çalışma olasılığı kimyasal olarak sentezlenen polipirolde daha yüksek iletkenlik gösteren filmler sentezlenebilmesi ve elde edilen polimer filmin yarı iletkenlerin korozyonunu azaltma avantajı elektrokimyasal senteze ilgiyi artırmıştır. Yalnız elde edilen polipirol sert ve kırılgandır ve bu zayıf mekanik özellikler onun uygulama alanlarında kullanım potansiyelini de düşürür. Polimerlerin iletkenliği Çizelge 2.5’de toplanmıştır. Poliasetilen yüksek

iletkenliğe sahip olmasına rağmen hava ve nem içerebilmesinden dolayı ticari bir iletken polimer değildir. Polipirol ve politiyofen poliasetilenе göre hava ortamında oldukça stabildir.

Çizelge 2.4. İletken polimerler ve iletkenlikleri

Polimer	Yapısı	Doplanan Yapılar	Yaklaşık İletker değerleri (Siemens/cm)
Poliasetilen	$\text{---}(\text{CH})_n\text{---}$	$\text{I}_2, \text{Br}_2, \text{Li}, \text{Na}, \text{AsF}_3$	10000^a
Polipirol		$\text{BF}_4^-, \text{ClO}_4^-, \text{tosilet}^b,$	500-7500
Politiofen		$\text{FeCl}_4, \text{ClO}_4^-, \text{BF}_4^-$	1000
Poli(3-alkiltiofen)		$\text{BF}_4^-, \text{ClO}_4^-, \text{FeCl}_4$	$1000-10000^a$
Polifenilen sülfid		AsF_5	500
Politienil enevinilen		AsF_5	2700^a
Polifenilen		$\text{AsF}_5, \text{Li}, \text{K}$	1000
Polifuran		$\text{BF}_4^-, \text{ClO}_4^-$	100
Polianilin		HCl	200^{aII}

İletken polimerlerin en önemli problemlerinden biri herhangi bir çözücüde çözüneme problemleridir. Son yıllarda bu çözünme problemi de bilinerek yapısal modifikasyon olmadan polipirolün çözüneme problemini çözmek için sulu demirklorür, çözeltisi, suda çözünabilen polimerizasyon sistemleri araştırılmıştır. Fakat bu sistemlerde, metilselüloz, polivinilalkol, polivinil pirolidon veya poliakrilamit gibi nötral polimerler kullanılarak polipirolün kolloidal çözeltileri elde edilmiştir.

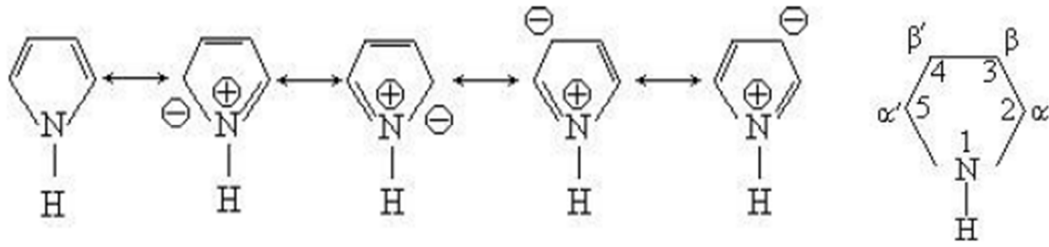
İletken polimerlerin çözünme zorluğu onların antielektrostatik filmler, elektronik pencereler, kimyasal sensörler, şarj edilebilir piller gibi uygulamalar için gerekli elektronik ve optik özelliklerini veren moleküler karakteristikleri olan π -elektronik yapılarının delokalize π -elektronik yapı onların yüksek elektronik polimerizasyonuna dolayısıyla zincir içinde yüksek π - π etkileşmesine yol açar. Bu da polimerin çözünme yerine agregasyonuna neden olur.

Polipirolün çözünmeme probleminin orjini bilindiğinden hemen akla gelen çözüm, polimerinin elektronik polarizabilitesini azaltmaktır. Bunu yapısal modifikasyonla yaparsak polimer çözünabilir ama aynı zamanda tüm yararlı optik ve elektronik özelliklerini kaybedebilir. Bu yüzden son zamanlarda üzerinde çalışılan çözüm, polimerin başka bir polimer ile interpolimer kompleksini oluşturmaktadır.

Lineer polimerlerin intermoleküler kompleksleri zıt yüklerin etkileşmesi hidrojen ve hidrofobik bağların oluşumu ya da metal iyonlar yoluyla etkileşerek çözünen veya çözünmeyen polikompleks oluşturmak üzere sentez edilebilirler.

2.5.3. Pirol

Pirol kaynama noktası 130°C, yoğunluğu 0,948 g/mL olan kokulu renksiz bir sıvıdır. Mineral asitleri ile çabucak polimerleşir. Pirol aromatik bileşiktir ve deneysel rezonans enerjisi 22-27 kcal/mol'dür.

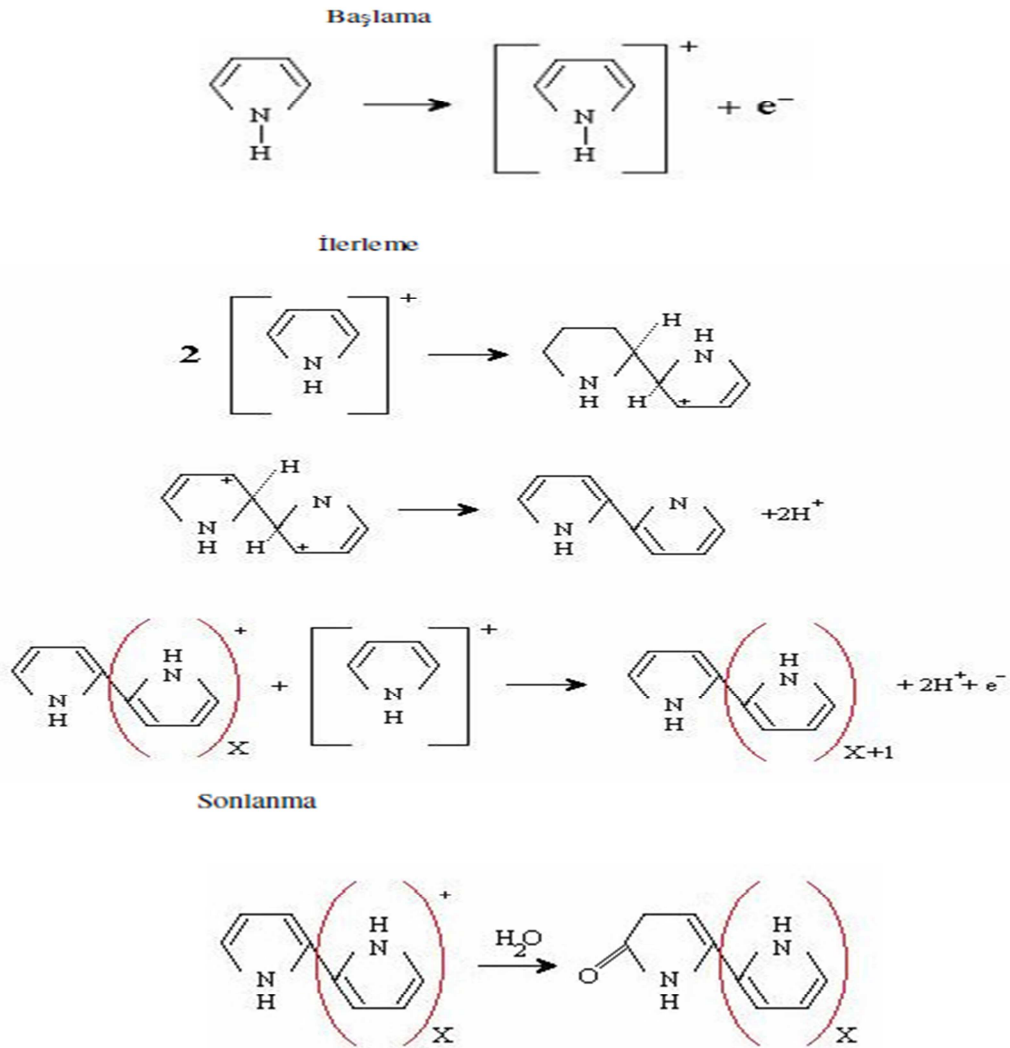


Şekil 2.14. Pirol molekülü

Pirol 2 veya 5 pozisyonuna gruplar atak yapabilir. Pirolün heterosiklik azot grubu zayıf bazik özelliktedir. Pirol suda az çözünür. Fakat organik çözücülerde çok miktarda çözünür. Pirol alkali iyonlarla çözünmez polimerizasyonla birlikte asit içinde yavaş çözünür.

2.5.4. Pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu

Elektronik iletken polipirol filmlerinin oluşumu anodik olarak asetonitrilin yükseltgenmesiyle ilk olarak Diaz tarafından yapılmıştır. Çözücü, elektrolit, fonksiyonel gruplar, elektrot potansiyeli, ve diğer özelliklerin değiştirilmesiyle literatürde oldukça fazla miktarda çalışma bilinmektedir. Fakat polimerizasyon mekanizmasını anlamak uzun sürmüştür[21].



Şekil 2.15. Pirolün polimerizasyonuna ait mekanizma[21]

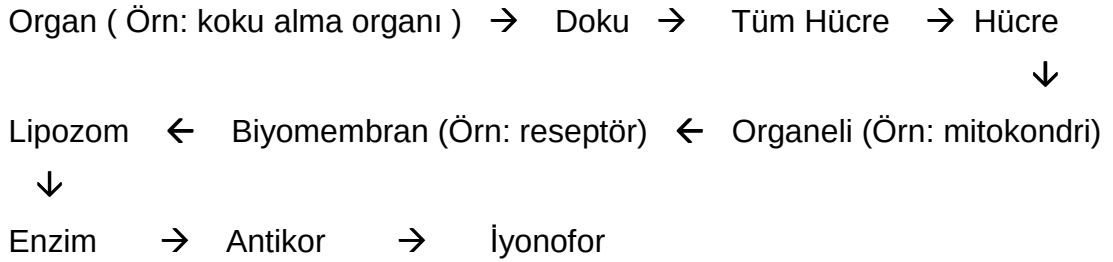
Elektrokimyasal sentez, basitliği ve yeniden üretilebilirliğinden dolayı, elektrik iletken polimerlerin sentezi için hızla genel bir metod olarak kabul görmeye başlamıştır. Elektrokimyasal sentezin oda sıcaklığında gerçekleşebilmesi de onun önemli bir avantajıdır. Hem potansiyel hem de akım zamanla değiştirilerek film kalınlığı da kontrol edilebilir. İletken polimerlerin elektrokimyasal polimerizasyonu genellikle şu metodlarla yapılır: (1) Akıma karşı (galvanostatik), (2) Potansiyele karşı (potansiyostatik) ya da (3) potansiyel taraması. Standart elektrokimyasal teknikte (hücre içerisinde çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrotdan oluşan üçlü elektrod sistemi) genellikle en iyi filmler elde edilmektedir. Elektrokimyasal sentez

homojen bir monomerle yapılabildiği gibi, kopolimerizasyonla da yapılabilmektedir. Poliazulen, politiyofen, polianilin, polipirol gibi bazı filmler bu yolla senetezenebilmiştir[22].

2.6. Enzim Sensörleri

Kullanıldıkları reaksiyonda, yapısında bir değişim olmadan reaksiyon hızını arttıran maddelere katalizör denir. Enzimlerde bir çeşit katalizördür. Biyosensör teknolojisindeki ilk örnekler amperometrik ve potansiyometrik esaslı enzim elektrotlar şeklinde ortaya çıkmıştır.

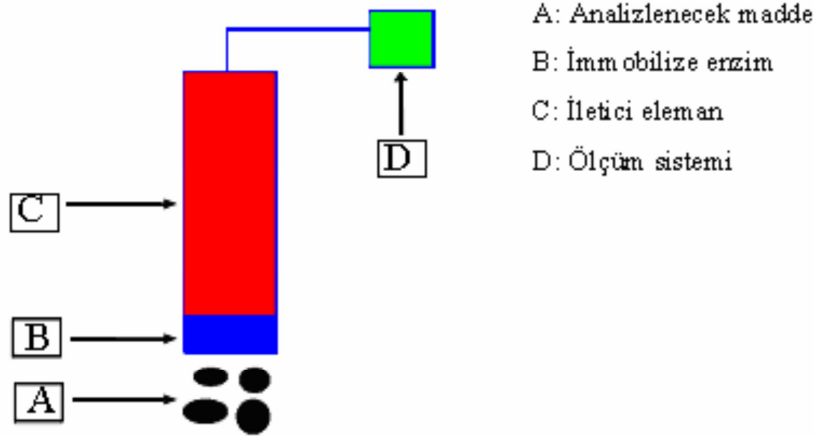
Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyolojik materyaller artan kompleksliklerine göre sıralandıklarında; iyonoforlar, antikorlar, enzimler, lipozomlar, biyomembran parçaları (örn: reseptör), hücre organelleri (örn: mitokondri), doku veya tüm hücreler ve organlar (örn: görme ve koklama organları) şeklinde sınıflandırılabilirler.



Şekil 2.16. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal sıralamasında enzimlerin yeri

2.6.1. Enzim sensörlerinin genel çalışma ilkesi

En genel anlamda bakıldığında bir enzim sensörü; iletici, ince bir enzim tabakası ve ölçüm kombinasyonundan oluşmaktadır. Diğer biyosensörlerden tek fark biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimler bulunmaktadır. Enzim sensörlerinin genel şematik gösterimi Şekil 2.12'de gösterilmiştir.



Şekil 2.17. Enzim sensörlerinin genel şematik gösterimi

Bir enzim elektrodunda enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği tepkimeye uygun bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir iletili ile birleştirilmektedir. İletim sistemi biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan ürünün miktarındaki artışı tespit edebilecek şekilde seçilmelidir. Biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka iletili ara yüzeyindeki derişimlerin 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 ölçme çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması gerekmektedir. İletici sistemin ölçme sistemine gönderdiği sinyal biyoaktif tabaka ile iletili ara yüzeyindeki derişimlerdeki değişikliğe bağlıdır. Ancak söz konusu derişimler denge halinde ölçme çözeltisindeki derişimlerle orantılı olduğu için çoğu zaman kalibrasyon grafiğı çizilerek sonuca varılır.

2.6.2. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

Enzim sensörlerinin sınıflandırılması en yaygın şekilde, enzimatik reaksiyon uyarınca oluşan sinyalin ölçüm yöntemine göre yapılmaktadır. Çizelge 2.5’de bu sınıflandırma gösterilmektedir.

Çizelge 2.5. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

1- Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensörleri;
Amperometrik Enzim Sensörleri;
Birincil nesil,
İkincil nesil,
Üçüncü nesil.
Potansiyometrik Enzim Sensörleri;
Proton duyar,
Amonyak duyar,
Karbondiyoksit duyar,
Diğer iyon duyar.
Yarı İletkenleri Esas Alan Enzim Sensörleri;
Enzim Alan Etki Transistörler (ENFET)
2- Optik Enzim Sensörleri;
Absorpsiyon esaslı,
Flouresans esaslı,
Biyoluminesans esaslı.
3- Kalorimetrik Enzim Sensörleri
4- Piezoelektrik Enzim Sensörleri

2.7. Performans Faktörleri

2.7.1. Seçicilik

Biyosensörün kompleks bir matriks içerisinde tek başına analitik bir ölçüm cihazı olarak kullanılabilmesini sağlar. Seçiciliğin yeterli olmadığı durumlarda çalışma prosedürüne bu eksiği giderecek ek işlemler eklenmesi gerekir. Seçiciliğin zayıf olmasından kaynaklanan sorunlar biyosensörün kullanımını zor hale getirmektedir.

2.7.2. Kullanım ömrü

Biyolojik çevirici olarak enzim kullanıldığı durumlarda enzim aktivitesindeki azalma kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktördür. Enzimin yaşam süresi, biyosensörün kullanım ömrü yanı sıra kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi parametreleri de etkilemektedir.

2.7.3. Kalibrasyon gereksinmesi

İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Ama teorikte planlanan bu özellik pratikte günümüzde gerçekleştirilememiştir. Biyosensörlerin kullanım ömürleri boyunca sıkça ya da belirli aralıklarla kalibre edilerek duyarlılıklarından bir şey kaybedip kaybetmedikleri araştırılır.

2.7.4. Tekrarlanabilirlik

İdeal bir biyosensör elektrodunun aynı derişimde ya da aynı özelliklere sahip birden fazla örneğe daldırılmasıyla yapılan deneylerde aynı sonuçların okunması gerekir. Tekrarlanabilirlik değeri ne denli iyi olursa o biyosensör uygulaması da o denli iyi olur.

.2.7.5. Kararlılık

Elektrot kararlılığının yüksek olduğu durumlar ideal biyosensörler için gereklidir. Kararlılık, kullanılan enzimin fiziksel dayanıklılığından etkilendiği gibi; pH, ısı, nem, ortam O₂ derişimi, enzimi immobilize etmede kullanılan polimerin kimyasal ve fiziksel karakteri gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

2.7.6. Yüksek duyarlılık

Hazırlanan elektroda immobilize edilmiş olan enzim; sadece belirli maddelere (substratlara) karşı duyarlı olmalıdır. Duyarlılık, akım-derişim eğrisinin eğimi ile orantılıdır. Eğim değeri büyüdükçe duyarlılıkta da artış gözlenir. Kullanılan enzimin substratları dışında biyosensörlerin girişim yapan maddelerden etkilenmemesi istenir.

2.7.7. Yeterli düzeyde tayin sınırı

Tasarlanan biyosensörün ideal tanımına uyması için tayin sınırının belirli bir derişim değerin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu tayin sınırı elektrot yüzeyinin büyüklüğü, enzimin tayin edilecek maddeye karşı olan afinitesi, immobilize edilen enzim miktarı, enzimin immobilizasyonunda kullanılan polimer tabakasının kalınlığı gibi faktörlerden etkilenir.

2.7.8. Geniş ölçüm aralığı

Ölçüm aralığı denen bölge, biyosensörden alınan akım-derişim eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır. Tüm biyosensör uygulamalarında çalışma ortamında belirli bir derişim değerine ulaşıldıktan sonra akım-derişim eğrilerinde lineerlikten sapma gözlenmeye başlar. Bu durum enzimatik eğrilerin en önemli ve de karakteristik özelliğidir. Lineerlikten sapmanın nedeni yanıt olarak okunan akım değerlerindeki değışimin azalmasından

kaynaklanır. Bunun nedeniyse ortamda artan analizlenecek madde miktarının fazlasıyla reaksiyona girecek enzim olmamasıdır.

2.7.9. Hızlı cevap zamanı

Amperometrik uygulamalarda analizlenecek bir madde örneğini çalışma ortamına enjekte etmeden önce elektrot yüzeyinde oluşan akımın sabit kalması istenir. Akım sabit kaldıktan sonra analizlenecek madde ortama enjekte edilir ve akımdaki değişim kaydedilir. İkinci bir enjeksiyondan önce akım değerinin yine sabit kalması beklenir. İşte ilk enjeksiyondan sonra akımın tekrar sabit kalmasına kadar geçen zamana 'cevap zamanı' denir. Cevap zamanının kısa ya da hızlı olması ideal sensörlerin özelliklerindendir.

2.7.10. Basitlik ve ucuzluk

Kullanımı, tasarımı basit ve ucuz biyosensörler hazırlamak biyosensör yapımında her zaman hedef alınmış bir düşüncedir. Biyosensör yapılarının basitleştirilmesine en iyi örnek ikinci kuşak biyosensörlerin yapılarında bulunan mediyatörlerin daha gelişmiş modeller olan üçüncü kuşak biyosensörlerde ortadan kaldırılmasıdır[23].

2.8. Kaynak Araştırması

A.T. Lawal ve S.B Adeloji 2010 yılında hipoksantine duyarlı bir biyosensör geliştirdiler. Ksantin oksidaz (KO) ve potasyum ferrosiyaniür mediyatörü de kullanılarak galvanostatik polipirol (PPy) film hazırlandı. Hazırlanan PPy-KO- $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ filminin optimum şartları incelenmiştir. Film 0,4 M pirol, 6,2 U/mL KO ve 40 mM potasyum ferrosiyaniür ortamında $0,5 \text{ mA/cm}^2$ akımda 200 saniyede hazırlanmıştır. Potansiyometrik ve amperometrik ölçüm modları incelenmiştir. Amperometrik sensör için optimum potansiyel Ag/AgCl referans elektrot ve 0,05 M fosfat tamponunda 800 mV olarak tespit edilmiştir.

Amperometrik ve potansiyometrik modlar karşılaştırıldığında potansiyometrik sensör daha hassas, amperometrik sensör ise daha geniş bir ölçüm aralığına sahip olduğu görülmüştür. PPy-KO filmi balık tazeliği tespitinde de başarılıydı[2].

S. Gosh arkadaşları tarafından balık tazeliğinin tespiti için bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Sistem balık dokusunda ATP'nin yıkımı ile oluşan Hipoksantin (Hx), İnozin (INO), ve inozinmonofosfat (IMP) metabolitlerinin kantitatif tayini esas alınarak geliştirilmiştir. Tazelik derecesi, balık dokusunda ATP'nin yıkımıyla oluşan ürün miktarına bağlı olan K_1 ve H değerinin indeksine bakılarak belirlenmiştir. Ferrosenkarboksilik asit (FCA) medyatörü kullanılarak hazırlanan polipirol filme ksantin oksidaz, nükleosid fosforilaz ve nükleotidaz enzimleri immobilize edilmiştir. Hazırlanan enzim elektrodla Hx, INO, ve IMP'nin amperometrik ölçümleri etkili bir şekilde yapılmıştır. Bu basit, hızlı ve kullanıma hazır biyosensör ile bekletilmiş Catla Catla tatlı su balığının H değeri ölçülmüştür. Sonuçlar gösterdi ki bozulma 7 gün sonunda -12 °C'da bile çok hızlı gerçekleşmektedir[24].

Lourdes Agui ve çalışma grubu, altın nanoparçacıkların (nAu) elektroddepozisyonu ile modifiye edilmiş karbon pasta elektroda (CPE) ksantin oksidaz (KO) immobilize ederek yeni bir biyosensör hazırlamışlar ve performansını incelemişlerdir. Biyosensörün hipoksantine (Hx) cevabını rapor etmişlerdir. Farklı KO biyosensör konfigürasyonları, ki bunlar: modifiye edilmiş CPE üzerine KO, camı karbon elektrot biyosensörü ve elektroddepozite olmuş altın disk elektrod, denenmiş ve karşılaştırılmıştır. Glutaraldehit (GA) ve BSA kullanılarak enzimin çapraz bağlanmasıyla oluşturulan KO/nAu-CPE elektrodu en yüksek amperometrik cevabı vermiştir. Hx ölçümleri Ag/AgCl referans elektrodu ile genellikle +0,60 V'da gerçekleştirilmesine rağmen, GA-BSA-KO/nAu-CPE elektrodu ile 0,00 V'da çalışılmıştır. Bunun sebebi askorbik asit gibi elektroaktif türlerin muhtemel girişimlerini minimuma indirmektedir. +0,6 V ve 0,00 V'da kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Ölçüm limiti $2,2 \times 10^{-7}$ mol/L olarak bulundu. Bu değer daha yüksek

potansiyellerde çalışılan literatürdeki diğer biyosensörlerin ölçüm limitleri ile örtüşmektedir. Biyosensörün tavuk ve balık eti gibi gerçek numunelere karşı da kullanılabilir olduğu gözlenmiştir[25].

Meliha Çubukçu ve arkadaşları altın nano parçacıkları (Au-nps) camı karbon elektroda modifiye ettiler ve bu elektroda ksantin oksidaz (KO) enzimini immobilize etmişlerdir. Hazırlanan elektrotla ksantin (X) ve hipoksantin (Hx) ölçümleri yapılmıştır. Biyosensör X ve Hx için karakterize edilmiştir. Biyosensörün doğrusal ölçüm aralığı X için $5,0 \times 10^{-7}$ M – $1,0 \times 10^{-5}$ M ve denklemi $y = 0,44x + 0,712$ bulunmuştur. Hx için ise ölçüm aralığı $5,0 \times 10^{-6}$ M – $1,5 \times 10^{-4}$ M ve denklemi $y = 0,014x + 0,575$ olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar X ve Hx için karşılaştırılmıştır. Geliştirilen sistem ile konserve tuna balığında Hx tayini yapılmıştır. Sonuçlar umut vericiydi[26].

Rooma Devi ve arkadaşları herhangi bir yakma gereksinimi duymadan 55°C sıcaklıkta basit ve etkili bir metodla çinkonitrattan çinkooksit nanoparçacıklarını (ZnO-NPs) sentezlemişlerdir. Bu ZnO nanoparçacıklarını pirolle birlikte platin elektrot yüzeyine elektropolimerizasyon yöntemi ile ZnO-NPs/polipirol kompozit filmini elde etmişlerdir. Ksantin oksidaz (KO) enzimi bu nanokompozit filme tutuklama yöntemi ile hapsedilmiştir. ZnO-NPs/Pt elektrodun enzim immobilizasyonu öncesinde ve sonrasında, FTIR, dönüşümlü voltametri (CV), X-Ray kırınımı, elektron tarama mikroskobu (SEM), elektron geçirgen mikroskop (TEM) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ile ayrı ayrı karakterize edilmiştir. KO/ZnO-NPs/PPy/Pt; çalışma elektrodu, Ag/AgCl referans elektrot ve Pt karşıt elektrottan oluşan hücrede ksantin (X) biyosensörü olarak oluşturuldu. Biyosensörün optimum koşulları pH 7,0 ve 35°C olarak gözlenmiştir. Doğrusal cevap aralığı $0,8 \mu\text{M}$ – $40 \mu\text{M}$ ksantin olduğu görülmüştür. KO için Michaelis-Menten grafiği çizilmiş ve K_m : $13,51 \mu\text{M}$, I_{max} : $0,071 \mu\text{A}$ olarak tespit edilmiştir. Biyosensör ile balık etinde ölçümler yapılmıştır. 200 kullanım sonrası aktivitede %40 azalma görülmüştür. Raf ömrü ise 100 gün[27].

Ülkü Anık Kırköz ve arkadaşları camı karbon elektroda ksantin oksidaz (KO) enzimini immobilize ederek yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensörün amperometrik ölçümü, KO enziminin katalitik aktivitesi sonucu oluşan hidrojen peroksitin elektrot yüzeyinde yükseltgenmesi sonucu oluşan akım değişimini esas almaktadır. Biyosensör için optimum koşullar araştırılmış ve hipoksantin (Hx) ve ksantin (X) için kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Biyosensörün doğrusal çalışma aralığı ksantin için $5,0 \times 10^{-7} \text{ M} - 4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ve hipoksantin için $2,0 \times 10^{-5} \text{ M} - 8,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ olarak görülmüştür. Biyosensörün ölçüm limiti ise ksantin için $1,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ ve hipoksantin için $5,3 \times 10^{-6} \text{ M}$ 'dir. Ayrıca enzim miktarı, optimizasyon, örnek numune uygulamaları ve kesinlik de çalışılmıştır[28].

Yansheng Gao ve arkadaşları multi-wall karbon nanotüp (CNTs) ile modifiye edilmiş camı karbon elektrot (GC) yüzeyine ksantin oksidaz (KO) enzimini immobilize ederek amperometrik ksantin (X) biyosensörü hazırlamışlardır. KO'nin direkt elektron alış-verişi $-0,465 \text{ V}$ 'da başarılı olmuştur. Heterojen elektron transfer oranı yaklaşık olarak $2,0 \pm 0,3 \text{ s}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Ksantin biyosensör sol-jel (SG) ince filme tutuklanmış KO enziminin CNTs-GC elektrot üzerine alınması ile hazırlanmış ve incelenmiştir. KO'nin ksantine karşı aktivitesi devam etmiştir. Biyosensörün amperometrik cevabı $0,2 \mu\text{M}$ 'dan $10 \mu\text{M}$ 'a kadar artan ksantin konsantrasyonu ile doğrusal olarak artış göstermiştir. Ölçüm limiti $0,1 \mu\text{M}$. Enzim elektrot 90 gün sonunda aktivitesinin %95'ini korumuştur. Biyosensör yüksek seçicilik, hızlı cevap ve iyi bir raf ömrü süresi göstermiştir[29].

Tomonori Hoshi ve grubu platin (Pt) disk elektrot üzerine ksantin oksidaz enzimini (KO) immobilize ederek ksantine duyarlı amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Ksantin oksidaz enzimi, ksantini ürik asite yükseltger ve bu ürün platin yüzeyinde indirgenerek girişime neden olur. Ürik asitin platin yüzeyde yapmış olduğu girişimi engellemek için platin yüzeye, poli(vinilsülfonat) (PVS) ve poli(allilamidhidroklorid)'den (PAH) oluşan polielektrolit multi katmanlı (PEM) bir yüzey oluşturulmuştur. Oluşturulan

PEM film platin yüzey ve KO bağlanmış poli(dimetildiallilamonyumklorid) (PDDA) kompozit film ile modifiye edilmiştir. Bu şekilde 3-300 μM ksantin konsantrasyon aralığını başarılı bir şekilde ölçebilen amperometrik bir biyosensör hazırlanmıştır. Çıkış akımı film yüzeyindeki KO/PDDA katmanının sayısına bağlı olarak değişmiştir. PAH/PVS film ürik asit girişimini engellemekte oldukça etkili olduğu görülmüştür[30].

Jianhong Pei ve Xiao Yuan Li ksantin oksidaz enzimini CuPtCl_6 /camsı karbon elektrot üzerine immobilize ederek bir biyosensör hazırlamışlardır. Hazırlanan enzim elektrodun ksantin ve hipoksantine karşı hızlı ve duyarlı cevap verdiği görülmüştür. Gözlenen kararlı akım, enzim elektrot yüzeyinde meydana gelen reaksiyon süresince oluşan hidrojen peroksitin yükseltgenmesinden kaynaklanmaktadır. Enzim çalışması üzerine pH, sıcaklık ve uygulanan potansiyelin etkisi tartışılmıştır. Ksantin ve hipoksantin ölçümü için karakterize edilen enzim elektrodun ölçüm aralığı: ksantin için, $6 \times 10^{-7} \text{ M} - 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ve hipoksantin için, $5 \times 10^{-7} \text{ M} - 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ olarak tespit edildi. Ölçüm limiti: $1 \times 10^{-7} \text{ M}$. Sıvı kromatografide hipoksantin-ksantin karışımının ayrımı yapılmış ve hazırlanan enzim elektrot kimyasal dedektör olarak kullanılmıştır[31].

V. Venugopal balık üretimi ve kalite kontrolü için kullanılan biyosensörleri araştırmış ve bu konuda bir makale hazırlamıştır. Balık eti üretimi yalnızca yiyecek bakımından değil, uluslar arası ticaret ve ihracat geliri bakımından da ülkeler için önemlidir. Balık ve balık ürünleri dayanıksızdır ve balık türlerinin, çevresel koşullarının ve beslenme şekillerininin farklı olmasından dolayı, kalite kontrolü de çok geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Ayrıca bu ürünler, bazı mikrobiyal ve diğer yaşamsal tehlikeler için taşıyıcı olarak da fonksiyon gösterebilirler. Bu yüzden kalite kontrolü balık üretim ve ticaretinde büyük bir öneme sahiptir. Mevcut kalite kontrol teknikleri kullanışsız ve zaman alıcıdır. Deniz ürünleri incelenmesinde biyosensör uygulamaları çok hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedir. Bu makalede deniz ürünleri endüstrisinde biyosensör uygulamalarının faaliyet alanı tartışılmıştır[32].

Jianjun Niu ve Jim Yang Lee balık tazeliğini tespit edebilmek amacıyla hipoksantine duyarlı grafit-seramik amperometrik bir biyosensör hazırlamışlar ve üretmişlerdir. Üretim prosesi sol-gel teknikleri kullanılarak bir silika grafit matrikse ksantin oksidaz enziminin immobilizasyonu ve enzimle modifiye edilmiş matriksin basit bir mekanik cila ile kolaylıkla yenilenebilmesine imkan sağlayan yüzeye sahip bir disk elektrotla dönüştürülüp cam bir tüpe montajı ile yapılmaktadır. Michaelis-Menten değerleri, medyatörsüz olarak hidrojen peroksitin indirgenmesine dayalı sistem, medyatörsüz direkt sistem ve benzil violojen medyatörlü sistem için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Sonuçlar sırası ile 0,45 , 0,64 , 0,35 mM olarak bulunmuştur. Sensör 1×10^{-6} M – 1×10^{-3} M derişim aralıklarında düzgün ve doğrusal bir akım artışı göstermiştir. pH=7,6 0,05M fosfat tamponu ortamında her üç sistem için ölçüm sınırı sırasıyla; $1,3 \times 10^{-6}$ M , $5,6 \times 10^{-6}$ M ve $3,8 \times 10^{-7}$ M olarak tespit edilmiştir. Enzim immobilize edilmiş bölgenin kullanılması ve bu yüzeyin kolayca yenilenebilmesi, sensörün kullanımını kolaylaştırmış ve raf ömrünü uzatmıştır. Çeşitli şartlarda bekletilmiş balık numuneleri ile yapılmış denemelerden elde edilen sonuçlar memnuniyet verici[33].

M.A. Carsol ve arkadaşları karbon esaslı baskılanmış elektrot ile ürik asite duyarlı yeni bir biyosensör hazırlamışlardır. Ksantin oksidaz (KO) enzimini hem elektrot yüzeyine hem de CPG aminopropilsilanlı bir reaktöre direkt olarak immobilize edilmiştir. Reaktörün sensörün tekrar kullanılabilirliğini ve raf ömrünü artırdığı gözlenmiştir. Hipoksantin (Hx), İnozin (HxR) ve İnozinmonofosfat (IMP) ölçümleri için optimum koşullar belirlenmiştir. IMP, Hx ve HxR için kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve her üç molekül için 50 µL'lik enjeksiyonlarda 1-50 µM arasında doğrusal bir artış gözlenmiştir. Bir ölçüm 30 sn içerisinde tamamlanmıştır. 20 µM Hx derişimlerinde tekrarlanabilirlik ölçülmüştür[34].

Shengshui Hu ve çalışma grubu sodyummontmorillonit-metilviyolin ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot ile hipoksantine duyarlı yeni bir

biyosensör geliştirmişlerdir. Elektrod yüzeyine elektropolimerizasyonla polianilin filmi oluşturulup ksantin oksidaz enzimi (KO) bu film üzerine immobilize edilmiştir. Hipoksantin ölçümü için KO enziminin katalitik aktivitesi sonucu harcanan oksijen esas alınmıştır. Oksijenin elektrokatalitik indirgenmesi ve sensörün cevabı dönüşümlü voltametri tekniği ile incelenmiştir. Sensör 1 μM – 0,4 mM arasında doğrusal akım artışı göstermiş ve minimum ölçüm limiti 0,8 μM olarak tespit edilmiştir. Hazırlanan biyosensör ile balık etinde hipoksantin miktarı çalışılmış ve girişimlerin elimine edilmesi için çalışmalar yapılmıştır[35].

Servet Çete ürik asit tayini için amperometrik esaslı yeni bir biyosensör geliştirmiştir. Bu amaçla asetonitril ortamında pirolün elektropolimerleşmesiyle platin/polipirol–ferrosenyum elektrot hazırlanmıştır. Bu elektrot kullanılarak serbest ürikaz enziminin aktivitesine pH'nın sıcaklığın, tampon derişiminin ve enzim miktarının etkisi incelenmiştir. Daha sonra, ürikaz enzimi hazırlanan platin/polipirol–ferrosen elektrot üzerine immobilize edilmiştir. Ürik asit tayini, enzim elektrodun yüzeyindeki enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksidin +0,70 V'da yükseltgenmesine dayanarak yapılmıştır. Ürik asit biyosensörünün cevabına pH'nın, tampon derişiminin, sıcaklığın ve yüzeye immobilize edilen enzim miktarının etkisi incelenmiştir. Biyosensörün ürik asit için doğrusal çalışma aralığı $1,0 \cdot 10^{-6}$ – $5 \cdot 10^{-5}$ M tesbit edilmiştir. Serbest ve İmmobilize enzimin K_M , V_{maks} değerleri hesaplanmıştır. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü tayin edilmiştir. Hazırlanan biyosensörle kan ve idrar gibi biyolojik sıvılarda ürik asit tayini yapılmıştır. Biyolojik ortamlarda olabilecek girişimlerin biyosensör cevabı üzerine etkileri incelenmiştir[16].

Arslan F. ve arkadaşları ksantin ölçümü için yeni bir biyosensör hazırlamışlardır. Platin yüzeyine asetonitril ortamında ferrosen (elektron medyatörü olarak) ve tetrabütilamonyumtetrafloroborat bulunan hücrede pirolün elektrokimyasal polimerleşmesi ile bir elektrot hazırlanmıştır. Film 0,0 -0,9 V arasında 50 m/sn tarama hızında dönüşümlü voltametri ile

oluşturulmuştur. Ksantin oksidaz enzimi (KO), glutaraldehit (GA) ve sığır serum albümin (BSA) kullanılarak elektropolimerizasyon sonrasında çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edilmiştir. Biyosensörün +0,7 V'da ksantine karşı cevabı ölçülmüştür. Amperometrik cevap ksantin enzimatik reaksiyonu sonucu oluşan hidrojen

peroksitin elektrokimyasal ölçümüne göre yapılmıştır. Farklı koşullar altında biyosensörün performansı incelenmiştir. Biyosensör için çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-6}$ M – $4,0 \times 10^{-4}$ M olarak tespit edilmiştir. Raf ömrü 45 gün[36].

Xiao-Hua Li ve grubu hipoksantine (Hx) duyarlı elektrokimyasal bir biyosensör hazırlamışlar ve performansını incelemişlerdir. Bu çalışmada demir-3mezo-tetrafenilporfirin (FeTPP) nanoparçacıkları (NPs) esas alınmıştır. FeTPPNPs filmi çapları 25-45 nm olacak şekilde çözelti karışım teknikleri kullanılarak hazırlanmış ve medyatör olarak kullanılmıştır. Ksantin oksidaz (KO)/FeTPPNPs/camsı karbon (GC) elektrot hipoksantine karşı oldukça iyi amperometrik sinyal vermiştir. Immobilize KO enziminin katalitik aktivitesi sonucu, hipoksantin yıkımı süresince çözünmüş oksijenin harcanmasına bağlı olarak, biyosensör $1,0 \mu\text{M}$ – $0,34 \mu\text{M}$ arası Hx derişimlerini ölçebilmektedir. Biyosensörün gerçek numunelerde kullanılabilirliği, mikrodializle süzülen fare beyin sıvısındaki Hx ölçülerek kanıtlanmıştır[37].

Nezaket Dolmacı ve çalışma grubu balıkta ksantin ve hipoksantin tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirmiştir. Ksantin oksidaz, pirol ve polivinilsülfonat ile birlikte platin elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Ksantin ve hipoksantin tayini, enzim yüzeyindeki enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ürik asidin +0,30V'da yükseltgenmesine dayanılarak yapılmıştır. Ksantin ve hipoksantin biyosensörünün cevabına pH'nın, sıcaklığın ve substrat derişiminin etkisi incelenmiştir. Enzim elektrodun hipoksantin için doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-7}$ M - $1,0 \times 10^{-3}$ M, tayin sınırı $1,0 \times 10^{-7}$ M olarak tespit edilmiştir. Immobilize edilen ksantin oksidazın K_m gözlenen ve V_{max} gözlenen değerleri sırasıyla 0,0154 mM ve 1,202 $\mu\text{A/dakika}$ olarak

bulunmuştur. Enzim elektrodun en iyi çalışma pH'sı 7,75 ve sıcaklığın 25 °C olarak belirlenmiştir. 30 gün sonundaki amperometrik cevabın başlangıç değerinin %49'u olduğu görülmüştür. Balık numunelerinde, balık eti tazeliğini yitirdikçe hipoksantin miktarının arttığı gösterilmiştir[38].

Reynaldo Villalonga ve arkadaşları, ksantin oksidaz enzimini β -siklodekstrin-karboksimetilselüloz ile modifiye ederek, önceden 1-adamantanil ile kapladıkları altın elektrot yüzeyine immobilize etmişlerdir. Elektrot, amperometrik bir biyosensör olacak şekilde tasarlanmıştır. Elektrot ile 700 mV'da 300 μ M'dan 10,4 mM'a artan konsantrasyonlarda doğrusal bir cevap akımı gözlenmiştir. Elektrot yaklaşık 14 s'de 8,2 mA/cm² duyarlılıkta %95 denge akımına ulaşmıştır. Elektrot pH=7,0 50 mM fosfat tamponunda 4 °C'da 3 hafta sonrasında aktivitesinin % 93'ünü korumuştur[39].

Fatma Arslan ürik asit tayini için amperometrik esaslı yeni bir biyosensör hazırlamıştır. Platin elektrot yüzeyine polianilin-polipirol (pani-ppy) film oluşturulmuş ve ürikaz enzimi glutaraldehit kullanılarak film yüzeyine çapraz bağlama ile immobilize edilmiştir. Ürik asit ölçümü enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksitin 0,4 V'da ölçümüne dayanılarak yapılmıştır. Biyosensör için doğrusal çalışma aralığı $2,5 \times 10^{-6}$ M – $8,5 \times 10^{-5}$ M olarak ölçülmüş ve cevap süresinin yaklaşık 70 s olduğu gözlenmiştir. Biyosensör için optimum parametreler pH=9,0 ve sıcaklık 55 °C olarak bulunmuştur. Enzim elektrodu için tekrarlanabilirlik ve raf ömrü de çalışılmıştır[40].

Cheng Qiong ve arkadaşları ksantin oksidaz içeren çift yüzeyli bir elektrot hazırlamışlar ve balık tazeliğinin tespitini rapor etmişlerdir. Modifiye edilen elektrot yüzeyine iki adet membran yapılmıştır; biri enzim immobilize edilmiş fibroin esaslı membran, diğeri; proteinler gibi yüksek molekül kütlesine sahip bileşiklerden kaynaklanabilecek girişimleri engelleyen selüloz asetat membran. Biyosensör, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksitin ölçümünü esas almaktadır. Sensör yüksek hassasiyet ve balık numunelerine karşı yüksek tekrarlanabilirlik göstermiştir. Sensörün tespit edebildiği

minimum hipoksantin miktarı, 1×10^{-7} M. Selüloz asetat membranının enzimi muhafaza etmesinden dolayı, enzim elektrot 6 haftalık bir raf ömrü ve gerçek numunelere karşı 400 ölçümlük bir tekrarlanabilirlik göstermiştir. Sonuçlar oldukça iyi ve biyosensör bazı nehir balık türlerinin tazeliğinin tespiti için ticari öneme haiz[41].

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Cihazlar ve Malzemeler

3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

Amperometrik ölçme işlemlerinde BAS Epsilon-EC-Ver 1.40.67 NT elektrokimyasal analiz cihazı kullanıldı.

3.1.2. Hücre ve elektrotlar

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



Şekil 3.1. Kaplama ve ölçümde kullanılan hücre sistemi

3.1.3. pH metre

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

3.1.4. Su banyosu

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

3.1.5. Mikro pipet

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

3.1.6. Argon gazı

Çözeltide çözünmüş halde bulunan oksijeni uzaklaştırmak için Kargaz firmasından temin edilen yüksek saflıktaki (% 99,99) argon gazı kullanıldı.

3.1.7. Saf su

Çözeltinin hazırlanmasında kullanılan saf su; GFL marka saf su cihazından sağlandı.

3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri

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

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

Kimyasal Madde	Saflık Derecesi	Temin Edildiği Firma
Pirol	%98 $\delta=0,967$	Aldrich
Polivinilsülfonat (PVS)	%25 $\delta=1,18$	Aldrich
Hipoksantin	%99	Sigma
Lityumperklorat (LiClO_4)	%98	Aldrich
Sodyumperklorat (NaClO_4)	%98	Sigma-Aldrich
Monosodyumhidrojenfosfat (NaH_2PO_4)	%99	Carlo Erba
Disodyumhidrojenfosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	%99	Merck
Sodyumhidroksit (NaOH)	%99	Carlo Erba
Hidroklorik Asit	%36,5	BDH
Hidrojenperoksit (H_2O_2)	%35 $\delta=1,13 \text{ kg/L}$	Merck
Trikloroasetik Asit (TCA)	%99	Carlo Erba

3.2.1. Kullanılan çözeltiler

Hidrojen peroksit: % 35'lik $\delta=1,13 \text{ kg/L}$ olan hidrojen peroksitten belirli bir miktar alınarak derişimi 0,1 M olacak şekilde 25 mL stok çözelti hazırlandı. 25'er mL $1,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ve $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ hidrojen peroksit çözeltileri de suyla seyreltilerek hazırlandı.

Fosfat tamponu: Monosodyum hidrojen fosfat ve disodyum hidrojen fosfat belli miktarlarda tartılarak saf suda çözüldü, hazırlanan çözeltinin pH' sı 1,0 M NaOH ve 1,0 M HCl ile 7,5'a ayarlandı ve çözeltideki analitik derişimi 0,1 M olacak şekilde seyreltilti. Farklı pH ve derişimlerdeki tampon çözeltileri hazırlamak için aynı yol izlendi. Tampon çözelti buzdolabında $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

Enzim çözeltisi: Toplam aktivitesi 100 ünite olan ksantin oksidaz enzimi alındı ve saf suda çözüldükten sonra hacmi ölçülü balonda 20 mL'ye tamamlandı (5 ünite/mL). Çözelti, her birinde 2 mL enzim çözeltisi ihtiva edecek şekilde 10 adet deney tüpüne alındı. Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında bekletildi. Uzun süre kullanılmayan enzim çözeltileri derin dondurucuda saklandı.

Toplam aktivitesi 100 ünite olan ürikaz enzimi alındı ve saf suda çözüldükten sonra hacmi, ölçülü balonda 10 mL'ye tamamlandı (10 ünite/mL). Çözelti, her biri 1 mL enzim çözeltisi ihtiva edecek şekilde 10 adet deney tüpüne alındı. Kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında saklanırken, diğerleri derin dondurucuda bekletildi.

Hipoksantin çözeltisi: Belirli bir miktar tartılan hipoksantin, bir miktar 0,1 M NaOH'da çözüldü. Daha sonra pH'sı 8,2 olan 0,1 M fosfat tamponuyla 25 mL'ye tamamlandı. Bu şekilde 25'er mL 1×10^{-3} M ve 1×10^{-2} M'lık stok çözeltiler hazırlandı. Farklı pH'larda stok çözeltiler hazırlamak için, 0,1 M fosfat tamponu seyreltik HCL ve NaOH kullanılarak istenilen pH'ya getirildi ve çözelti hazırlamak için kullanıldı. Çözeltiler oda sıcaklığında karanlık ortamda muhafaza edildi. Bir haftayı dolduran stok çözeltiler tekrar hazırlandı.

Sodyum perklorat: Katı sodyum perklorattan belirli bir miktar tartılıp saf suda çözüldü. Ardından hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlanarak 1 M 250 mL NaClO_4 çözeltisi hazırlandı.

Lityum perklorat: Katı lityum perklorattan belirli bir miktar tartılıp saf suda çözüldü. Ardından hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlanarak 1 M 250 mL LiClO_4 çözeltisi hazırlandı.

Sodyum hidroksit çözeltisi: Katı sodyum hidroksitten belli bir miktar alınıp saf suda çözülerek 0,1 M 100 mL çözeltisi hazırlandı.

Hidroklorik asit çözeltisi: Derişik HCl' den belli bir miktar alınıp uygun şekilde seyreltilerek 0,1 M 100 mL HCl çözeltisi hazırlandı.

TCA Çözeltisi: Katı TCA'dan 10 g alınıp bir miktar saf suda çözüldükten sonra hacmi ölçülü balonda 100 mL'ye tamamlanarak % 10'luk TCA çözeltisi elde edildi.

3.3. Platin Yüzeye Polipirol-polivinilsülfonat Kaplanması

Elektrot yüzeyinin temizlenmesi: Kaplama işleminden önce platin levhanın yüzeyi mekanik, kimyasal ve elektrokimyasal olarak temizlendi. İlk olarak platin elektrod yüzeyi sıfır numara zımpara ile parlatıldı, daha sonra aleve tutuldu. 5 dakika süre ile aseton, etil alkol, derişik HCl ve derişik nitrik asit içerisinde bekletildi. Tekrar saf su ile yıkandı, kurutuldu ve yüzeydeki su uzaklaştırıldı. Her kaplama işleminden önce yüzey bu şekilde temizlendi[41].

Temizlenmiş Pt levha elektrodunun yüzeyi polipirol-polivinilsülfonat film ile kaplandı. Polipirol, elektrot yüzeyine pirolün elektropolimerleşmesi ile biriktirildi. Elektropolimerleşmede üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Çalışma elektrodu olarak platin levha (0,5 cm²), karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak da Ag/AgCl elektrot kullanıldı. Polipirol-polivinilsülfonat film elde etmek amacıyla, pirolün hücre içi derişimi 0,1 M olacak şekilde 71 µL pirol, 2,5 mL polivinilsülfonat (%25), 7,43 mL saf su eklenmesiyle toplam 10 mL'lik bir çözelti hazırlandı. Bu çözeltiye temizlenmiş platin elektrot daldırıldı ve 10 dakika argon gazı geçirilerek çözeltideki oksijen uzaklaştırıldı. Elektropolimerizasyon işlemi dönüşümlü voltametri tekniği ile -1,0V – +2,0V potansiyelleri arasında 50 mV/s tarama hızında 6 dönüşümde yapıldı[44]. Kaplama işleminden sonra elektrot yüzeyi saf su ile yıkanarak yüzeye bağlanmayan monomerlerden ve kirliliklerden arındırıldı[2]. Böylece platin/polipirol-polivinilsülfonat (Pt/PPy-PVS) elektrot hazırlandı. Çalışmalarda kullanılmak üzere tampon çözelti içerisinde bekletildi.

3.4. Platin/Polipirol-Polivinilsülfonat Elektrodun Hidrojen Peroksite Duyarlılığının Belirlenmesi

Bölüm 3.3’de belirtildiği gibi hazırlanan Pt/Polipirol-Polivinilsülfonat elektrot, Ag/AgCl referans elektrodu ve platin tel; 9 mL 0,1 M fosfat tamponu, 1 mL 1 M LiClO₄ çözeltisinin içine daldırıldı. 400 mV sabit potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Denge akımına ulaşan elektrot ile hücre içi 5 µM ile 500 µM arasında değişen hidrojen peroksit konsantrasyonlarında ilaveler yapıldı. Her ilave sonunda hücre içerisi 300 s karıştırılıp, karıştırmanın bitiminden itibaren 200 s sonrasındaki akım ölçüldü. Okunan akımlar ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için Δi değerleri hesaplandı ve kaydedilerek grafiğe geçirildi (Şekil 4.2.)

3.5. Platin/Polipirol-Polivinilsülfonat Elektrodunun Serbest Enzimin Bulunduğu Çözeltide Hipoksantine Duyarlılığının Belirlenmesi

Hazırlanan çalışma elektrodu 8,875 mL tampon çözeltisi 1 mL Lityum perklorat (LiClO₄) bulunan çözeltiye daldırılarak +0,4 V sabit potansiyelde dengeye getirildi. Ardından 100 µL Ksantin Oksidaz (KO) ve 50 µL Ürikaz (U) enzim çözeltilerinden ilave edilerek, enzimli ortamda dengeye gelmesi beklendi ve denge akımı kaydedildi. Ardından 1 µM – 7,5 µM arası artan derişimlerde hipoksantin ilaveleri yapıldı. Her ilave sonrasında reaksiyonun tamamlanabilmesi için 900 saniye karıştırılmıştır. Karıştırmanın bitiminden itibaren 200 saniye sonrasındaki difüzyon akımı okundu. Elde edilen Δi değerleri grafiğe geçirildi(Şekil 4.3.).

3.6. Platin/Polipirol-polivinilsülfonat Elektrodunun, Serbest Enzimli Ortamda İki Enzimin Birbirlerine Karşı Oranlarının Cevap Akımlarına Etkisinin İncelenmesi

Hazırlanan Pt/Polipirol-polivinilsülfonat elektrodunun yüzeyi saf su ile yıkandıktan sonra içerisinde tampon çözelti ve destek elektrolitin bulunduğu hücreye daldırılarak +400 mV'da dengeye getirildi. Dengeye gelen sisteme hücre içi üniteleri sırasıyla; KO ve U enzimlerinin hücre içi üniteleri birbirlerine eşit, KO enzim miktarı U enzim miktarının iki katı, U enzim miktarı KO enzim miktarının iki katı ve U enzim miktarı KO enzim miktarının dört katı olacak şekilde enzim ilaveleri yapılarak ayrı ayrı dengeye getirildi. Her dört ortam için de 2,5 μ M – 1 mM arasında artan derişimlerde hipoksantin ilaveleri yapıldı. İlaveler sonrası 900 s karıştırılıp, karıştırmanın ardından 200 s sonundaki difüzyon akımı okundu. Elde edilen Δi değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.4.).

3.7. Platin/Polipirol-Polivinil Sülfonat Elektrodunun, Serbest Enzimli Ortamda Potansiyel Değişimine Karşı Cevap Akımlarındaki Değişimin İncelenmesi

Pt/PPy-PVS elektrot, Ag/AgCl referans elektrot ve platin tel pH'sı 7,5 olan fosfat tamponu, 1 M lityumperklorat, 100 μ L KO, 50 μ L U enzimleri bulunan hücreye daldırıldı. +0,3 mV sabit potansiyel uygulanarak dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra artan derişimlerde hipoksantin ilaveleri yapıldı. Her ilavede çözelti 900 saniye karıştırıldı, karıştırmanın ardından 200 saniye sonrasındaki difüzyon akımı okundu. Okunan akımlar ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için Δi değerleri hesaplandı. Aynı şlemler sırasıyla +0,4 mV, +0,5 mV, + 0,6 mV, +0,7 mV potansiyelleri için uygulandı. Hipoksantin derişimlerine karşı Δi değerleri ortak bir grafikte toplandı(Şekil 4.5.)

3.8. Platin/Polipirol-Polivinilsülfonat Film Üzerine Ksantin Oksidaz ve Ürikaz Enzimlerinin Çapraz Bağlama Yöntemi ile İmmobilizasyonu

Hazırlanan Pt/PPy-PVS elektrodunun yüzeyi saf su ile yıkandıktan sonra, 7,5 μ L Glutaraldehit (GA), 1 mg BSA, 100 μ L KO ve 50 μ L U enzimlerini ihtiva eden çözeltiden elektrodun her iki yüzeyine de eşit miktarda ilave edilerek kuruyana kadar bekletildi[24]. Kuruyan Pt/PPy-PVS/GA-KO-U enzim elektrodu saf su ile yıkanıp tampon çözeltide bir süre bekledildikten sonra, tampon çözeltisi ve destek elektrolit ihtiva eden hücre içerisine daldırılıp 400 mV'da dengeye getirildi. Denge akımı kaydedildi. Ardından 1 μ M – 10 μ M arasında artan konsantrasyonlarda hipoksantin ilaveleri yapıldı. Her ilave sonunda 900 s karıştırılıp 200 s sonundaki difüzyon akımı okundu. Okunan akımlar denge akımından çıkarılarak elde edilen Δi değerleri kaydedilerek grafiğe geçirildi (Şekil 4.6.).

3.9. Enzim İmmobilizasyonu Sırasında Kullanılan Glutaraldehit Miktarının Platin/Polipirol-Polivinil Sülfonat/GA-KO-U Enzim Elektrodun Cevabı Üzerine Etkisi

Literatür araştırmalarında çapraz bağlayıcı reaktif olarak kullanılan Glutaraldehitin bazı enzimlerin katalitik merkezlerine bağlanarak onları inhibe ettiği görülmüştür. Bu bilgiye dayanılarak immobilizasyon işlemi sırasında kullanılan glutaraldehit miktarı artırılarak cevap akımları karşılaştırılmıştır. Bu amaçla bölüm 3.8'de anlatıldığı gibi hazırlanan enzim BSA ve glutaraldehit içeren çözeltideki glutaraldehit miktarı iki katına çıkarılmış ve aynı işlemler tekrar edilmiştir. Elde edilen sonuçlar bölüm 3.8'deki sonuçlarla birlikte grafik edilerek karşılaştırılması yapılmıştır (Şekil 4.6)

3.10. KO ve U Enzimlerini Tutuklama Yöntemi ile İmmobilize Ederek Pt/Polipirol-Polivinil Sülfonat-KO-U Enzim Elektrodunun Hazırlanması ve Bu Elektrodun Hipoksantine Duyarlılığının İncelenmesi

Platin elektrot yakma ve asitte bekletme işlemlerinden sonra zımparalanıp saf su ile temizlendi. Ardından hücre içerisine 2,21 μL saf su 31,5 μL pirol, 1,25 mL polivinilsülfonat, 1 mL KO, 0,5 mL ürikaz enzimi ilave edilerek 5 mL'lik bir hücre hazırlandı. Hücreden 10 dk. Argon gazı geçirilerek oksijen uzaklaştırıldı. Daha sonra dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak -1,0V – +2,0 V arasında 50 mV/s tarama hızında 6 döngüde CV taraması yapıldı. Kaplanan elektrot saf suyla yıkandı ve tampon çözelti içerisinde bir süre bekletildi. Tampon çözelti ve destek elektrolit ihtiva eden hücre sisteminde dengeye getirildi. 1 μM – 10 μM arasında artan hipoksantin konsantrasyonlarında ölçümler alındı. Elde edilen akımlar 3.8 ve 3.9'da elde edilen değerlerle birlikte grafiğe geçirilerek karşılaştırıldı (Şekil 4.6).

3.11. Platin/Polipirol-Polivinilsülfonat/Ksantin Oksidaz-Ürikaz Enzim Elektrodunun Optimum Koşullarının Belirlenmesi

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

3.11.1. pH'nın etkisi

Her enzim belirli bir pH ortamında maksimum performans göstermektedir. Hazırladığımız enzim elektrotta çift enzim bulunduğundan bu çift enzimli elektrot sisteminin optimum pH'sı, her bir enzimin kendisine ait optimum pH'dan farklı olacağı beklenmektedir. Sistemin optimum pH'sının belirlenmesi için, farklı pH ortamlarında denemeler yapılmıştır. Bu amaçla Bölüm 3.10'da

anlatıldığı gibi hazırlanan enzim elektrodun 6-10 arası değişen pH'larda hipoksantine karşı duyarlılığı incelendi ve karşılaştırıldı. Bu işlem için pH'sı 6, 7, 8, 9 ve 10 olan 0,1 M fosfat tamponları hazırlandı. Her bir pH ortamı için mevcut pH koşullarında ayrı ayrı hipoksantin çözeltileri hazırlandı. Her bir pH ortamında ölçüm alınırken enzim elektrodun, o pH ortamına uyum sağlaması için ölçüm yapılacak pH ortamında bir süre bekletildi ve her bir pH ortamı için denge akımına gelmesi bekletildi. Ölçüm işlemi için hipoksantin ilavesi, hücre içi derişimi 0,1 mM olacak şekilde yapıldı. Hipoksantin ilavesinden sonra hücre ortamı 900 s karıştırıldı ve 200 s sonundaki difüzyon akımı okundu. Okunan akımlar denge akımından çıkarılarak her bir pH ortamı için Δi değerleri hesaplandı ve grafiğe geçirildi (Şekil 4.7).

3.11.2. Sıcaklığın etkisi

Hazırlanan ve dengeye getirilen biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine, sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C ve 60 °C sıcaklıktaki ortamlarda biyosensörün amperometrik cevabı ölçüldü. Hücre içine pH'sı 8,2 olan 0,1 M 9 mL tampon çözeltisi ve 1 mL 1 M sodyum perklorat çözeltisi konuldu ve enzim elektrot hücreye daldırıldı. Grant W14 marka termostatlı dolaşım su banyosu kullanılarak, hücre içindeki çözeltinin sıcaklığı 20 °C olacak şekilde ayarlandı. 400 mV sabit potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Her bir sıcaklık ortamında hücre içi derişimi 0,1 mM olacak şekilde hipoksantin ilavesi yapıldı. İlave sonrasında 900 s karıştırılıp, 200 s sonundaki difüzyon akımı okundu. Aynı işlemler diğer sıcaklık değerlerinde de yapılarak okunan akımlar kaydedildi. Okunan akımlardan elde edilen Δi değerleri grafik edildi (Şekil 4.8).

3.11.3. Substrat derişiminin etkisi

Bölüm 3.10'daki gibi hazırlanan enzim elektrot; içerisinde, pH'sı 8,2 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu ve 1 mL 1 M sodyum perklorat bulunan çözeltiye daldırıldı. 400 mV sabit potansiyelde dengeye getirilerek denge akımı

kaydedildi. Daha sonra $1\mu\text{M} - 0,75\text{ mM}$ derişim aralığında hipoksantin ilaveleri yapıldı. Her ilavede çözelti 900 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki difüzyon akımı okundu ve denge akımı ile arasındaki farklar alınarak her bir hipoksantin derişimi için Δi değerleri belirlendi. Hipoksantin derişimlerine karşı Δi grafiğı çizildi (Michaelis-Menten eğrisi)(Şekil 4.9). Çizilen bu grafikten yararlanılarak biyosensörün çalışma aralığı ve tayin sınırı belirlendi. Ayrıca elde edilen verilerden Lineweaver-burk grafiğı çizildi ve bu grafikten yararlanarak ksantin oksidaz ve ürikaz enziminin bulunduğu çift enzimli sistemin $K_{M(\text{gözlenen})}$ ve $I_{\text{maks}(\text{gözlenen})}$ değerleri[42,43] belirlendi (Şekil 4.10).

3.11.4. Enzim elektrodunun tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

Bölüm 3.10'da anlatılan şekilde hazırlanan enzim elektrodun optimum koşullar altında tekrar kullanılabilirliğini ölçmek amacıyla, ardı ardına sabit hipoksantin derişiminde ölçümler alındı. Bu amaçla; hazırlanan enzim elektrod optimum olarak belirlenen pH'daki tampon çözeltisi ve destek elektrolitin bulunduğu hücre içerisine alınarak dengeye getirildi ve 0,1 mM hipoksantin ilave edildi. Hücre ortamı 900 s karıştırıldı ve 200 s sonundaki difüzyon akımı okundu. Hemen ardından aynı şekilde hazırlanan hücre ile tekrar ölçüm alındı. Bu işlem 20 defa tekrar edilerek okunan Δi akımları grafiğı geçirildi (Şekil 4.12)

3.11.5. Enzim elektrodunun raf ömrünün belirlenmesi

Hazırlazırlanan biyosensörün raf ömrünün tespit edilebilmesi için 33 gün boyunca üç günlük periyotlarda ölçümler alınmış ve biyosensörün ilk gün verdiği cevap ile son gün verdiği cevap kıyaslanmıştır. Bu amaçla tampon çözelti ve destek elektrolit içeren hücre sistemine daldırılan enzim elektrot 400 mV potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Ardından hücre içi derişimi 0,1 mM olacak şekilde hipoksantin ilave edildi ve 900 s karıştırılıp 200 s sonundaki difüzyona akımı okundu. Ölçüm işlemi

tamamlanan enzim elektrot, bir sonraki ölçüm işlemine kadar tampon çözelti içerisinde +6 °C'a ayarlanmış buzdolabında bekletildi. Aynı işlemler her ölçüm için tekrarlandı. Elde edilen Δi değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.13)

3.12. Biyosensör Gerçek Numuneler Üzerindeki Performansının İncelenmesi

3.12.1. Numune Hazırlanması

Alınan balık numunesinin ölçüme hazır hale getirilmesi için, balık kas dokusundan 5 g örnek alınıp parçalayıcı yardımı ile parçalandı. Üzerine bir miktar saf su eklenerek bir süre karıştırılarak bekletildi. Bekletilen karışım su trompu yardımı ile mavi band süzgeç kağıdından süzüldü ve saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu işlem bir kez yapıldı. Diğer işlemler için protein çöktürmesi yapıldı. Bu amaçla, parçalanmış balık numunesi üzerine bir miktar su ilavesi yapıldıktan sonra %10'luk TCA çözeltisinden 5 – 10 damla (çökmenin tamamlandığı gözle görülmeye kadar) ilave edildi. Daha sonra su trompu yardımı ile mavi bant süzgeç kağıdından geçirildi. Süzüntü alınarak 100 mL'ye saf su ile tamamlanarak ölçüm için hazır hale getirildi.

3.12.2. Balık numunesi ile ölçüm alınması

Hazırlanan biyosensör ile gerçek numunelere karşı çalışmalar yapılmış ve performansı incelenmiştir. Bu amaçla canlı olarak elde edilen alabalık türü balık ile denemeler yapıldı. Balığın ölümünden hemen sonra balık numunesi bölüm 3.11.1'de anlatıldığı şekilde ölçüme hazırlandı. Enzim elektrot tampon çözelti ve destek elektrolit bulunan hücre sistemine daldırılıp +400 mV'da dengeye getirilerek ölçüm işlemine hazır hale getirildi. Hazırlanan balık numunesinden 1 mL alınarak hücre içerisine ilave edilip 900 s karıştırıldı ve 200 s sonundaki difüzyona akımı okundu. Ardından standart ilave yöntemiyle bir kalibrasyon grafiği hazırlandı. Bu amaçla tampon çözelti destek elektrolit ve balık numunesinin bulunduğu, ölçüm alınmış hücre sistemi

değiştirilmeden, 10 μM – 50 μM arasında artan konsantrasyonlarda hipoksantin ilaveleri yapılarak akım değerleri okundu. Elde edilen Δi değerleri hipoksantin derişimine karşı grafik edildi (Şekil 4.14). Ölçümü alınan balık numunelerindeki hipoksantin miktarı, bu grafiğe bakılarak tespit edildi.

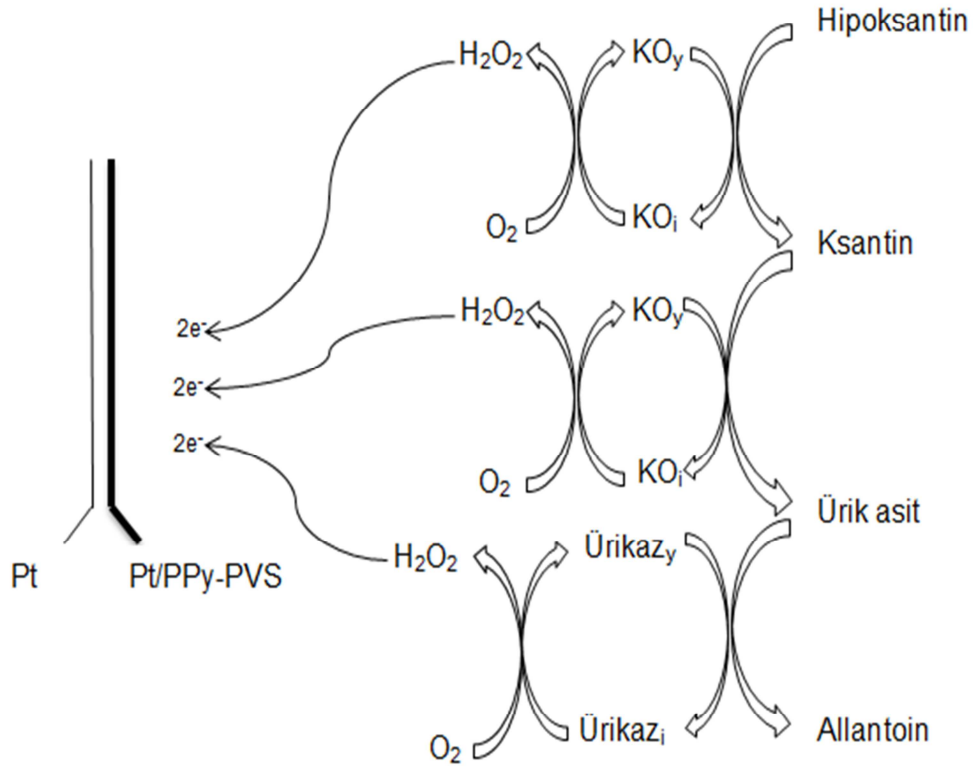
Ölümü henüz gerçekleşen balık eşit parçalara bölündü. Parçaların bir kısmı -18 $^{\circ}\text{C}$ 'a ayarlanmış derin dondurucuda, bir kısmı +6 $^{\circ}\text{C}$ 'a ayarlı buzdolabında ve bir kısmı da oda sıcaklığında bekletilerek üç günlük aralıklarla ölçümler alındı. Alınan ölçümler sonunda elde edilen akımlar, ilk günkü balık numunesinden alınan ölçüm sonucu referans alınarak, her üç ortamdaki numune için karşılaştırma yapılmak üzere grafik edildi (Şekil 4.18).

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Hipoksantin tayini yapabilmek amacıyla, ksantin oksidaz enziminin katalitik aktivitesi ile hipoksantin oksidasyonu sırasında oluşan hidrojen peroksitin ölçümü esas alındı. Fakat enzimatik reaksiyon dizisi sonucu oluşan ürik asit, hidrojen peroksitle birlikte yükseltgenerek girişim yapmaktadır. Bu çalışmada, çift enzim kullanılarak, ürik asitin girişimini engellemek amacı ile, ksantin oksidaz enzimi ile birlikte ürikaz enzimi de kullanılarak oluşan ürik asitin ortamdaki uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca hipoksantin ürik asite oksidasyonu sonunda oluşan iki hidrojen peroksit ilave olarak, ürikaz enziminin katalitik aktivitesi ile ürik asitin allantoin oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit oluşacaktır ve bu da okunan sinyali güçlendirici etki yapacaktır.

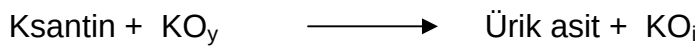
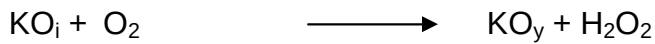
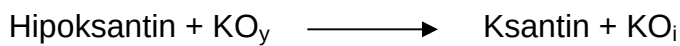
İlk olarak platin levha elektrot enzimsiz olarak kaplandı ve elektrot yüzeyine hazırlanan filmin duyarlılığını test edebilmek amacıyla, artan hidrojen peroksit derişimlerinde ölçümler alındı. Ardından hazırlanan film elektrodun, hipoksantin oksidasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksit karşısında duyarlılığını tespit edebilmek için serbest enzimli ortamda ölçümler alındı. Daha sonra her iki enzimin birbirlerine göre en doğru oranını tespit etmek amacıyla serbest enzim ortamında her iki enzimin birbirlerine göre oranları değiştirilerek en iyi oran belirlendi. Elektrodun en iyi çalışma potansiyeli belirlendi. Çalışma potansiyeli olarak +400 mV, enzim oranı da “her iki enzim birbirlerine göre eşit miktarda” olarak tespit edildi ve çalışmalara bu yönde devam edildi. Enzimler elektrot yüzeyine tutuklama yöntemi ile immobilize edildi. Hazırlanan enzim elektrodun çalışma koşullarının tespit edilebilmesi için değişen sıcaklık ve pH koşulları altında ölçümler alınarak enzim elektrodun optimum çalışma koşullarına bakıldı. Enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliği incelendi ve raf ömrü tayin edildi. Son olarak da gerçek numuneler üzerindeki analitik performansı test edildi.

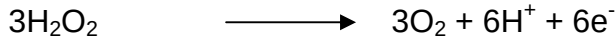
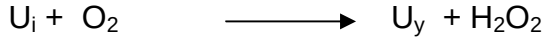
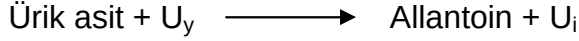
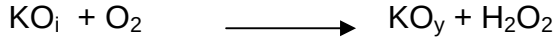
Pt/PPy-PVS/KO-U enzim elektrot ile hipoksantin miktarı tespit edilirken elektrot yüzeyinde ve hücre sistemi içerisinde meydana gelen olaylar Şekil 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Elektrot yüzeyi ve hücre sistemi içerisinde elektron aktarımlarının ve indirgenen-yükseltgenen türlerin temsili şekli

Ksantin oksidaz ve ürikaz enzimlerinin immobilize edildiği elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyon dizisi aşağıda gösterildiği gibidir;



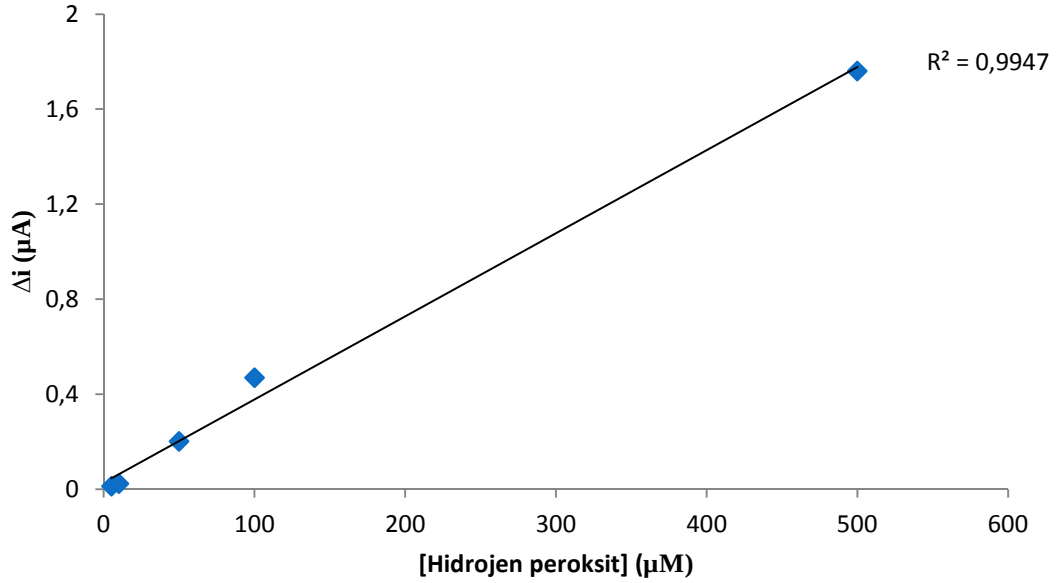


Enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan hidrojen peroksit molekülleri elektrot yüzeyinde yükseltgenir. Bu yükseltgenme esnasında sabit potansiyel altında anodik bir akım oluşur. Oluşan anodik akım büyüklüğü hipoksantin derişimi ile orantılı olarak değişir.

Pt/PPy-PVS film elektrot üzerine ksantin oksidaz ve ürikaz enzimleri hapsetme yöntemi ile immobilize edildi. Hazırlanan enzim elektrodun biyokimyasal özellikleri ve analitik performansı incelendi. Sonuçlara ilişkin değerlendirmeler yapılarak yorumlandı.

4.1. Hazırlanan Pt/PPy-PVS Film Elektrodunun Duyarlılığının Test Edilmesi

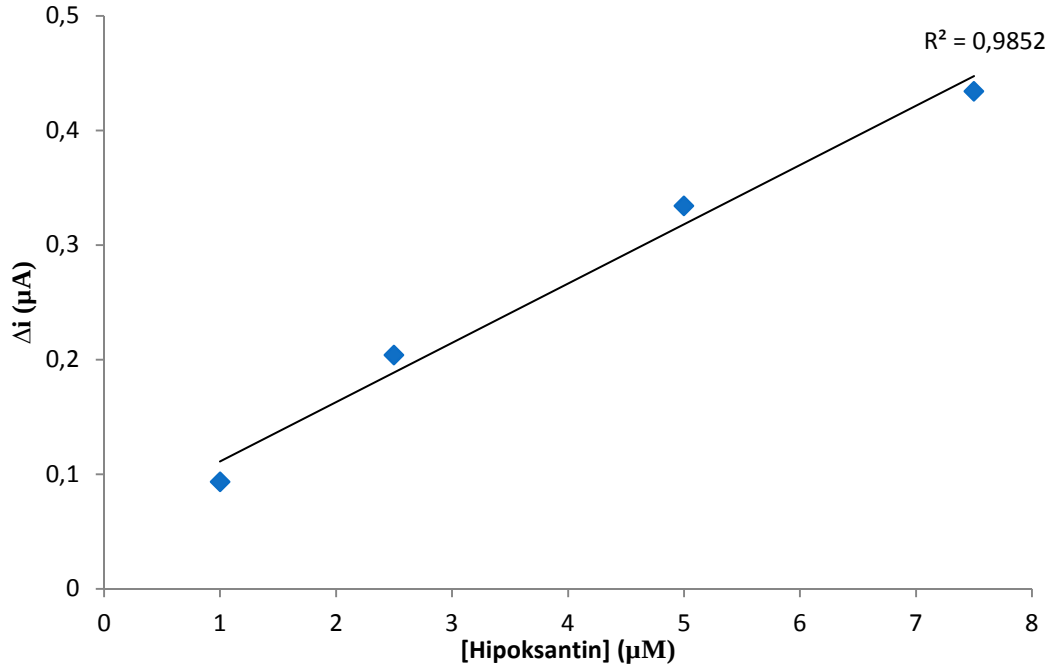
Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan film elektrodun duyarlılığının tespit edilebilmesi için artan hidrojen peroksit derişimlerine karşı cevap akımlarındaki değişimlere bakıldı. Teorik olarak artan hidrojen peroksit derişimi ile orantılı anodik akım cevapları beklenmektedir. Deneysel sonuçlar da bu yönde olmuştur. 5 µM – 500 µM arasında artan hidrojen peroksit derişimlerinde doğrusal bir akım artışı gözlemlendi. Sonuçlar grafiğe geçirildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Hazırlanan film elektrodun artan hidrojen peroksit derişimine karşı cevap akımları

4.2. Pt/PPy-PVS film Elektrodun Serbest Enzimli Ortamda Hipoksantine Duyarlılığının İncelenmesi

Hidrojen peroksit artışına, doğrusal cevap veren film elektrodun serbest enzimli ortamda hipoksantine duyarlılığına bakıldı. Ortama hipoksantin ilaveleri ile bölüm şekil 4.1'deki reaksiyonlar hücre sisteminde çözeltide gerçekleşmiş, oluşan hidrojen peroksit, çözeltden platin elektroda difüzlenererek platin yüzeyde yükseltgenmiştir. Bu sırada oluşan anodik akım kaydedilerek grafiğe geçirildi (Şekil 4.3).



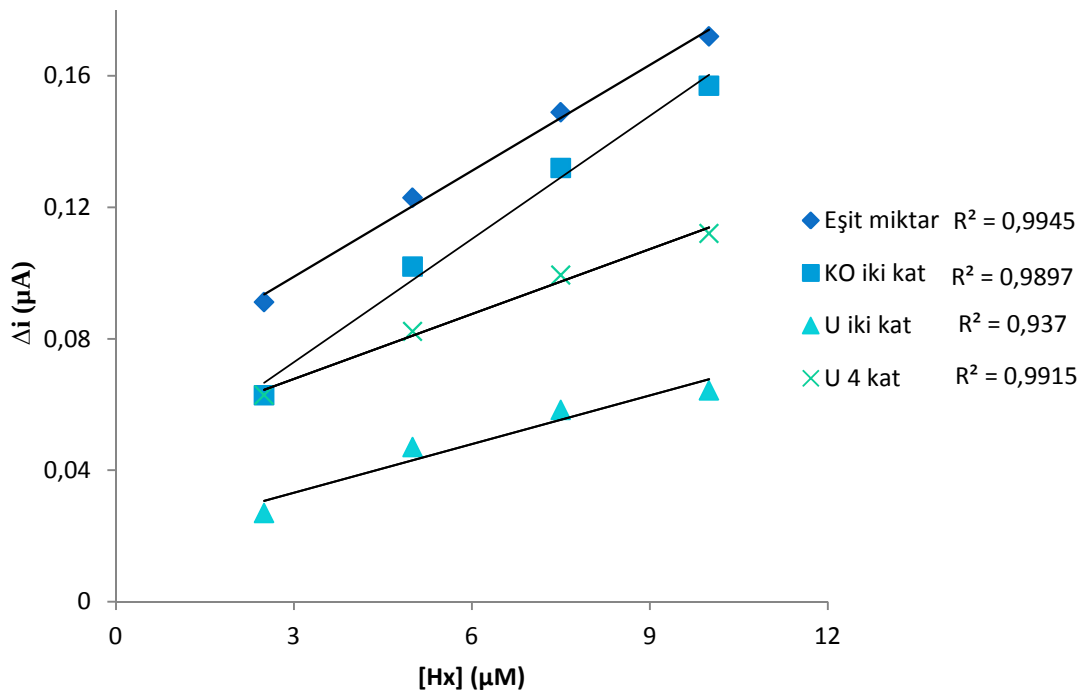
Şekil 4.3. Pt/PPy-PVS film elektrodun serbest enzimli ortamda hipoksantine cevabı

Grafikte de görüldüğü gibi hipoksantin derişiminin artışına paralel olarak akımlarda da bir artış gözlenmiştir. Bu sonuç, hipoksantin enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşturduğu ürünlerin elektrokimyasal olarak tespit edilebileceğinin bir göstergesidir.

4.3. Platin/Polipirol-Polivinil Sülfonat Elektrodunun, Serbest Enzimli Ortamda, İki Enzimin Birbirlerine Karşı Oranlarının Cevap Akımlarına Etkisinin İncelenmesi

Hipoksantin allantoine kadar olan reaksiyonu, bir seri reaksiyondur. Yani birbirine bağlı üç adımlı bir reaksiyon dizisidir (Şekil 2.1). Bu reaksiyon dizisinin ilk iki basamağını ksantin oksidaz enzimi katalizlerken, son basamağını ise ürikaz enzimi katalizlemektedir. Bu yüzden bu iki enzimin birlikte kullanılacağı analitik ölçüm ortamında, enzimlerin birbirlerine göre

oranları önemli bir parametredir. Çünkü ürikaz enziminin kullanım amacı; ürik asitin girişimini engellemek maksadıyla, oksidasyonunun sağlanarak ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Bu yüzden enzim oranları ortamda ürik asit kalmayacak şekilde ayarlanmalıdır. Bu amaçla serbest enzimli ortamda enzimlerin oranı bölüm 3.6'da anlatıldığı gibi yapıldı ve sonuçlar ortak bir grafikte gösterildi (Şekil 4.4).



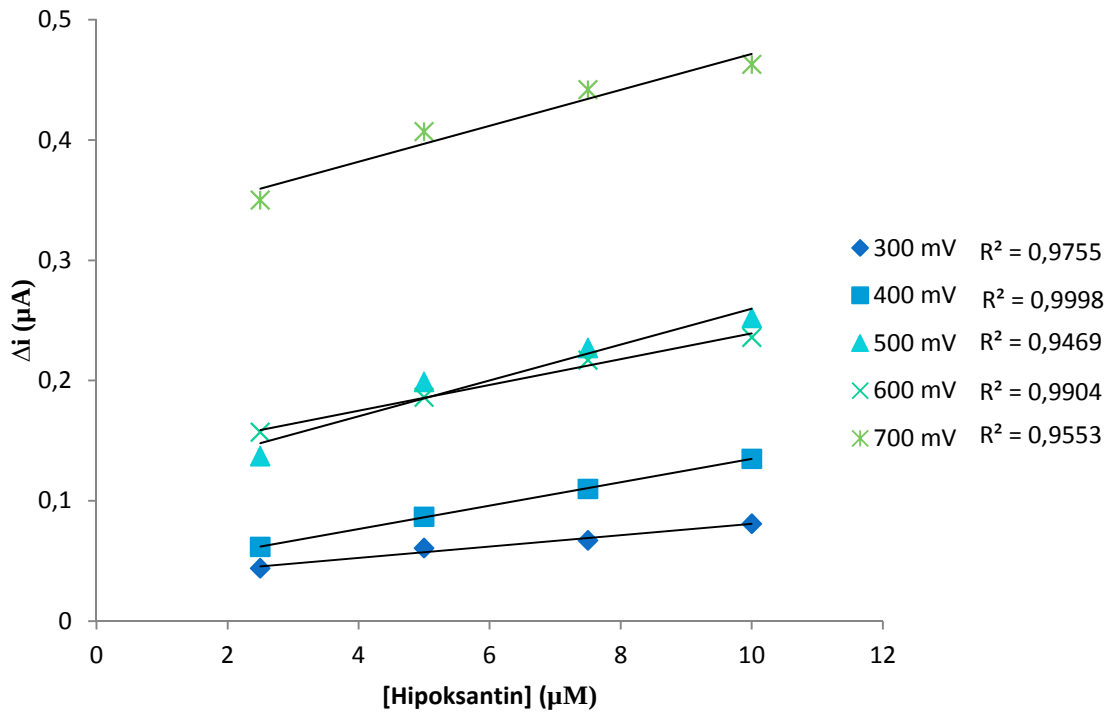
Şekil 4.4. Serbest enzimli ortamda, ksantin oksidaz ve ürikaz enzimlerinin birbirlerine göre oranlarının hipoksantine duyarlılığına etkisi

Grafikte en yüksek ve en doğrusal akımları enzimlerin birbirlerine göre eşit oranlarda alındığı durum verdiğinden bu oranlarda enzim alınarak çalışmalara devam edildi. Ksantin oksidaz enziminin iki reaksiyonu katalizlediğinden dolayı, bir reaksiyon dzisinin aynı anda tamamlanabilmesi için iki ksantin oksidaz enzimine karşılık bir ürikaz enzimi gerekecektir. Bu sebeple bu enzimlerin eşit miktarda alınması durumunda ürikaz enzimi ortamda ksantin oksidaz enziminin iki katı kadarmış gibi bir durum ortaya çıkacaktır. Bu da ortamda ürik asit birikimini engelleyecektir. Ürikaz enziminin

iki kat ve dört kat alındığı durumlara bakıldığında, akımların düştüğü gözlenmektedir. Bu yüzden çalışmalara, her iki enzim birlerine göre eşit miktarda olacak şekilde ayarlanarak devam edildi.

4.4. Platin/Polipirol-Polivinil Sülfonat Elektrodunun, Serbest Enzimli Ortamda Potansiyel Değişimine Karşı Cevap Akımlarındaki Değişimin İncelenmesi

Enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan hidrojen peroksitin +300 V - +700 mV arasında yükseltgendiği bilinmektedir. En iyi çalışma potansiyelinin bulunabilmesi için serbest enzimli ortamda belirtilen potansiyel aralığında değişen değerlerde ölçümler alınarak en iyi çalışma potansiyeli belirlendi. Bu amaçla bölüm 3.7'de anlatıldığı gibi ölçümler alınarak okunan akım değerleri tek bir grafikte toplandı (Şekil 4.5).

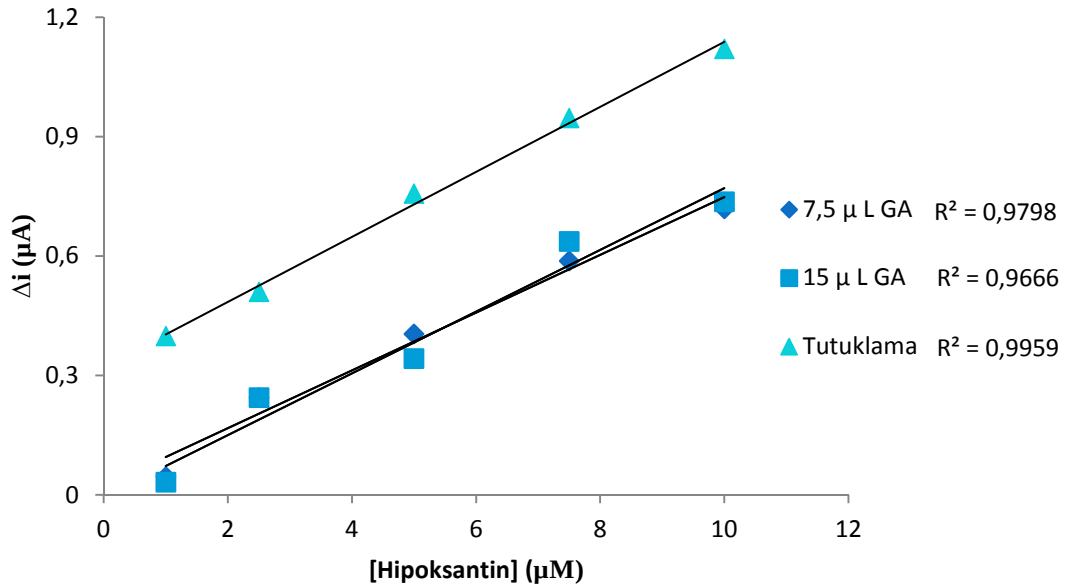


Şekil 4.5. Pt/PPy-PVS film elektrodun serbest enzimli ortamda farklı potansiyellerdeki akım değerleri

Grafiğe bakıldığında en yüksek akımların +700 mV'da alındığı görülmektedir. Fakat muhtemel girişimleri en aza indirmek için mümkün olan en düşük potansiyelin seçilmesi analitik seçicilik açısından daha olumlu sonuçlar vereceğinden, +300 mV ile +400 mV potansiyel değerleri daha uygun görülmüştür. Bu iki potansiyel değeri karşılaştırıldığında +400 mV, hem akım değeri olarak daha yüksek olması, hem de R^2 yani doğrusallık değerinin daha yüksek olması sebebiyle tercih edildi ve çalışmalara +400 mV'luk sabit potansiyel altında devam edildi.

4.5. Platin/Polipirrol-Polivinil Sülfonat Film Üzerine Ksantin Oksidaz ve Ürikaz Enzimlerinin Çapraz Bağlama ve Tutuklama Yöntemi ile İmmobilize Edilerek Sonuçların Değerlendirilmesi

Ksantin oksidaz ve ürikaz enziminin immobilizasyonu ilk olarak çapraz bağlama yöntemi ile denendi. Bu amaçla BSA ve glutaraldehit kullanılarak Bölüm 3.8'de anlatıldığı şekilde Pt/PPy-PVS/KO-U enzim elektrodu hazırlandı ve bu elektrot ile ölçümler alındı. Ardından çapraz bağlamada kullanılan glutaraldehit miktarının akım üzerine etkisini incelemek için glutaraldehit miktarı iki katına çıkarılarak yeni bir enzim elektrot hazırlandı ve ölçüm alındı. Daha sonra enzim immobilizasyonu Bölüm 3.10'da anlatıldığı gibi tutuklama yöntemi ile yapıldı. Bu işlemlerin hepsinde, ksantin oksidaz ve ürikaz enzimlerinin üniteleri eşit olacak şekilde ayarlanarak immobilizasyon yapıldı. Her üç durum için alınan ölçümler tek bir grafikte toplandı (Şekil 4.6).

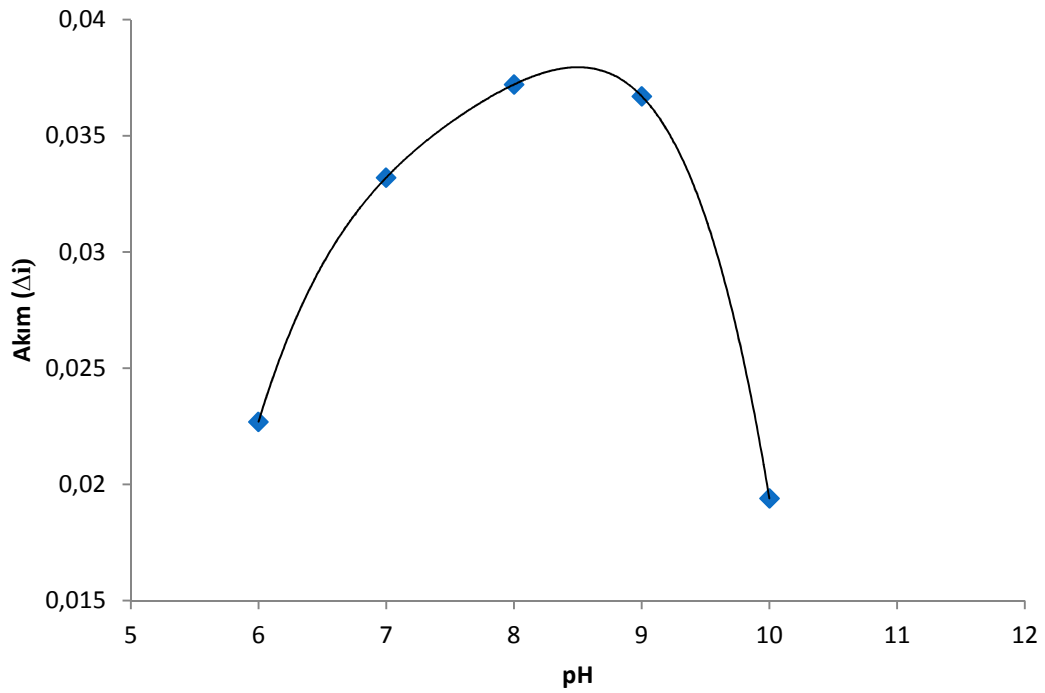


Şekil 4.6. Enzim immobilizasyon şeklinin akımlar üzerine etkisi

Grafikte görüldüğü gibi tutuklama ile immobilizasyon yapıldığında daha yüksek ve daha doğrusal akımlar elde edildi. Çapraz bağlama ile immobilizasyon yapıldığında akımlar düşmüştür. Glutaraldehit miktarının değiştirilmesi de herhangi farklılık göstermemiş ve hemen hemen aynı akım değerleri elde edilmiştir. Elde edilen akımların tutuklama yönteminde elde edilen akımlardan daha düşük olmasının sebebi; çapraz bağlama esnasında glutaraldehitin bazı enzimlerin aktif merkezine bağlanarak, enzimi inhibe etmesidir. Tutuklama esnasında enzim bağlanması olmadığından enzim aktif merkezi serbest, elektrot yüzeyine de daha yakın olacaktır. Bu sebeple enzim immobilizasyonu tutuklama yöntemi ile yapıldı ve çalışmalara bu yönde devam edildi.

4.6. Pt/PPy-PVS/KO-U Enzim Elektrodu Üzerine pH'nın Etkisinin İncelenmesi ve Enzim Elektrot İçin Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Çift enzimli elektrot sistem için optimum çalışma pH'sını belirlemek amacı ile Bölüm 3.11.1'deki işlemler yapılarak sonuçlar grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.7).

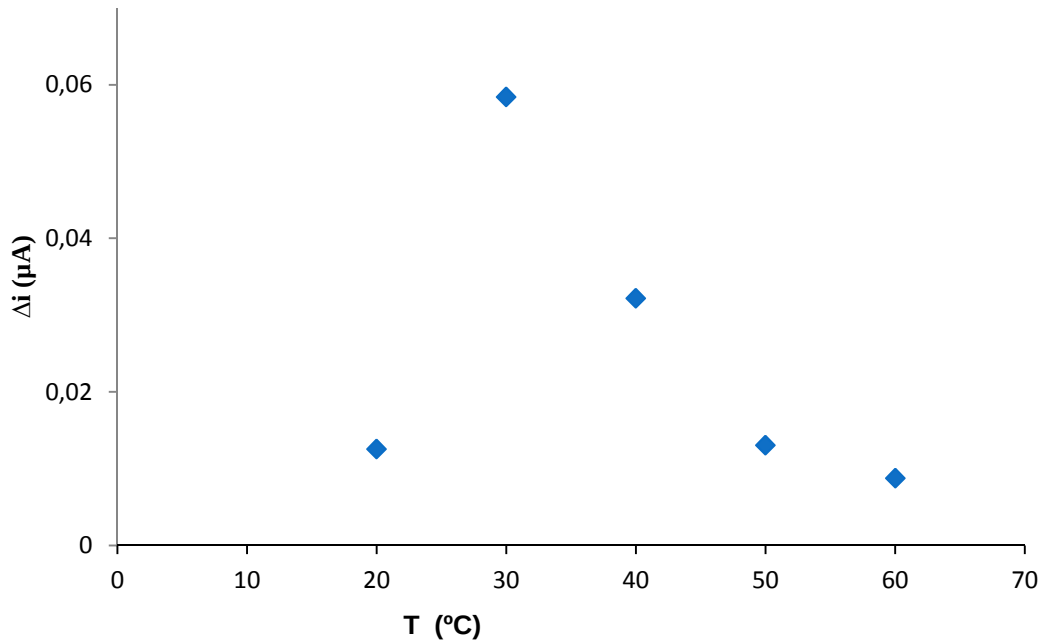


Şekil 4.7. Pt/PPy-PVS/KO-U enzim elektrot sisteminin farklı pH ortamlarındaki cevap akımları

Ölçümler pH: 6, 7, 8, 9 ve 10 ortamlarında alınmıştır. En yüksek akımlar pH:8 ortamında elde edilmiştir. Fakat çift enzimli elektrot sisteminde çalıştığımız için grafiğin tepe noktasına karşılık gelen pH'nın optimum pH olarak alınması daha uygun olacaktır. Çünkü her iki enzimin optimum pH'ları birbirlerinden farklıdır (Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2). Tepe noktasının x eksenini kestiği nokta 8,2'dir. Çalışmalara pH:8,2 ile devam edildi.

4.7. Pt/PPyPVS/KO-U Enzim Elektrodun Değişen Sıcaklık Ortamlarında Cevap Akımlarının Ölçülmesi ve Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Hazırlanan enzim elektrot sistemi için en iyi çalışma aralığının belirlenebilmesi için Bölüm 3.11.2’de anlatıldığı şekilde ölçümler alındı ve sonuçlar grafiğe geçirildi (Şekil 4.8).

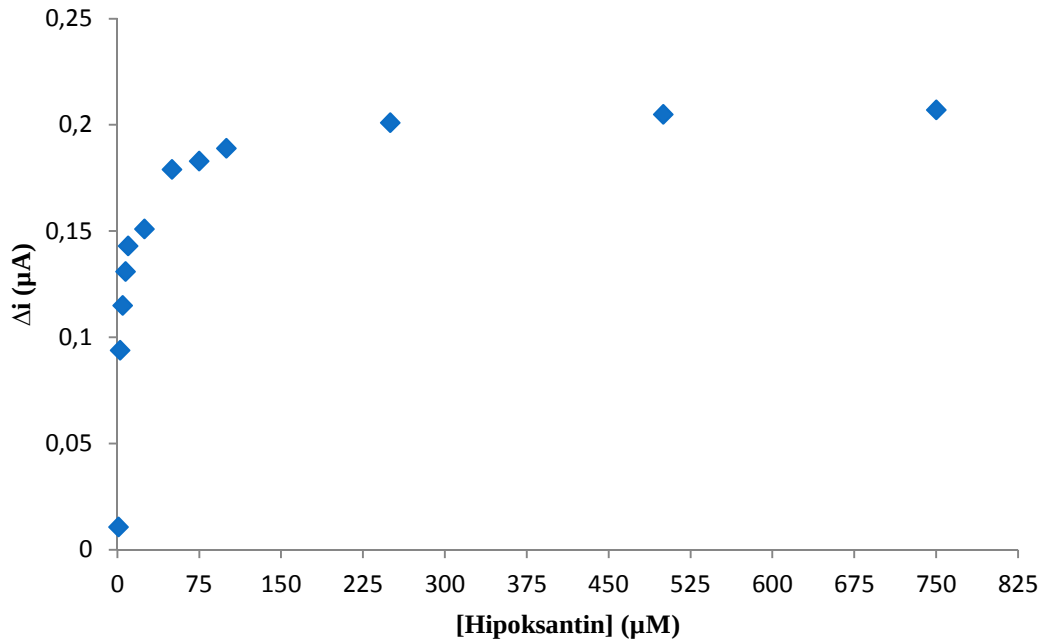


Şekil 4.8. Pt/PPy-PVS/KO-U enzim elektrodun sıcaklık değişimine karşı duyarlılığı

En yüksek akım değerleri 30 °C’da elde edilmiştir. Grafiğin tepe noktasının x eksenini kestiği nokta da 30 °C olduğundan, optimum sıcaklık değeri olarak 30 °C kabul edildi.

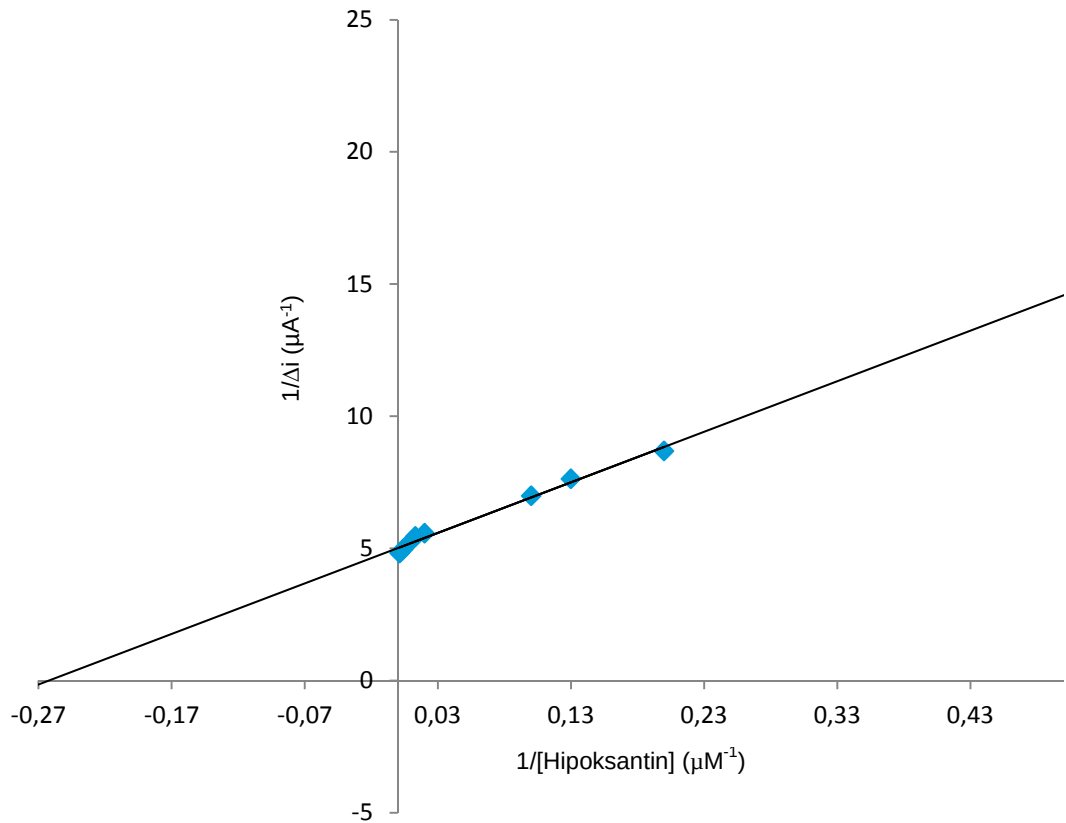
4.8. Pt/PPy-PVS/KO-U Enzim Elektrodunun Artan Hipoksantin Derişimine Karşı Davranışı

Enzimler artan substrat konsantrasyonlarında sürekli olarak aynı şekilde davranmazlar. Başlangıçta ilave edilen substrat anında ürüne dönüşür. Fakat belli bir substrat derişimine gelindiğinde, artık enzimin aktif merkezi substrata doygun hale gelir ve oluşan ürün miktarı artan substrat konsantrasyonuna rağmen sabit kalır. Hazırlanan biyosensör sisteminde reaksiyonu gerçekleştiren ana etken enzim olduğu için, biyosensörün genel davranışında, enzimlerin davranışlarının en büyük rol oynayacağı bilinmektedir. Artan substrat konsantrasyonlarında da biyosensörün cevabı enzimlerin karakteristikleri ile benzer olacaktır. Yani artan substrat derişimine karşı başlangıçta artan bir akım sergileyecek sonrasında da enzim aktif merkezi substrata doygun hale geleceğinden akım değerleri sabitlenecektir. Bu bölümde enzim elektrot sisteminin artan hipoksantin derişimine karşı davranışı incelendi. Bu amaçla Bölüm 3.11.3'de anlatılan işlemler yapılarak elde edilen akımlar grafiğe geçirildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Pt/PPy-PVS/KO-U enzim elektrodunun artan hipoksantin derişimine karşı davranışı

Grafikte de görüldüğü üzere, enzim elektrot sistemi beklendiği gibi Michaelis-Menten grafiğine benzer bir tutum sergilemiştir. Artan hipoksantin derişimlerine karşı başlangıçta doğrusal bir artış göstermiş, ardından enzim aktif merkezinin substrata doyduğu anda, artan hipoksantin derişimine karşılık cevap akımı sabitlenmiştir. Ancak bu grafiğe bakarak sistemin karakteristiğini tespit etmek zordur, çünkü grafik doğrusal değildir. Doğrusallığı sağlamak için Michaelis-Menten denklemi ters çevrilip gerekli düzenlemeler yapılarak Lineweaver-Burk denklemi elde edildi. Bu denklemdeki doğrusallığı sağlayan değerler grafiğe geçirilerek Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 4.10).

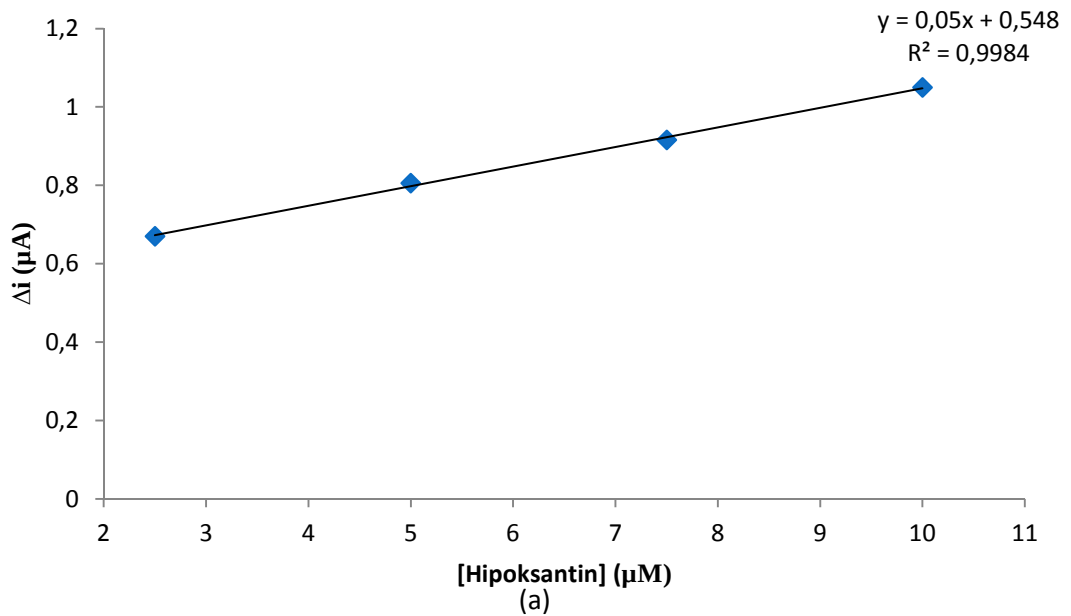


Şekil 4.10. Enzim elektrot sisteminin Lineweaver-Burk grafiği

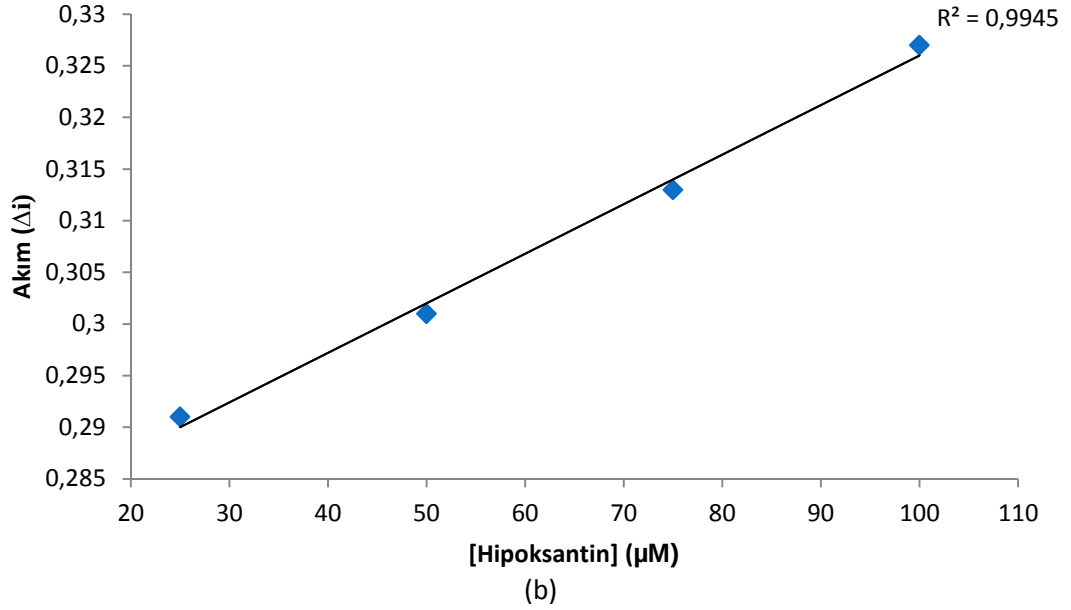
Bu grafikten yararlanılarak çift enzimli elektrot sistemi için $K_{M(gözl)}$ değeri 3,7 μM olarak tespit edilmiştir. Enzim elektrot sistemi için $I_{maks(gözl)}$ değeri ise 0,19 $\mu\text{A/dk}$ olarak bulunmuştur. Enzim elektrodun tespit edebildiği minimum hipoksantin derişimi 2,5 μM , maksimum hipoksantin derişimi ise 10 mM olarak gözlenmektedir. Sonuç olarak hazırlanan enzim elektrodun çalışma aralığı 1 μM – 10mM hipoksantin derişimleri arasındadır.

4.9. Pt/PPy-PVS/KOU Enzim Elektrodu İçin Kalibrasyon Grafiği Çizilmesi

Enzim Elektrodun ölçüm aralığının tespitinden sonra, içeriği bilinmeyen numunede hipoksantin miktarının yapılabilmesi için kalibrasyon grafiği çizildi. Bu işlem için Şekil 4.9 grafiğindeki doğrusal olan noktalar baz alınarak 2,5 μM ile 10 μM ve 25 μM ile 0,1 mM arasında artan konsantrasyonlarda hipoksantin ilaveleri ile dört noktalı düşük ve yüksek konsantrasyonda doğrusal iki kalibrasyon grafiği elde edildi(Şekil 4.11).



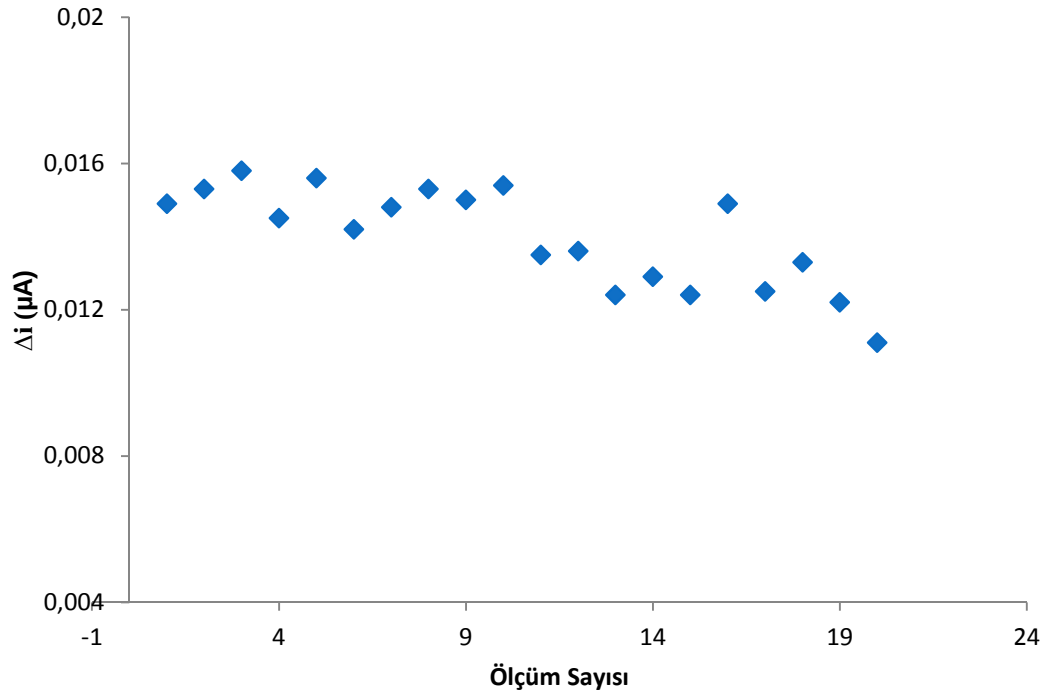
Şekil 4.11. Pt/PPy-PVS/KO-U enzim elektrodun (a) düşük derişimlerde kalibrasyon grafiği



Şekil 4.11.(Devam) (b) Pt/PPy-PVS/KO-U enzim elektrodunun yüksek derişilerde kalibrasyon grafiğı

4.10. Pt/PPy-PVS/KO-U Enzim Elektrodunun Tekrar Kullanılabilirliğıinin İncelenmesi

Enzim elektrodunun tekrar kullanılabilirliğıinin tespit edilebilmesi için Bölüm 3.11.4'de anlatılan işlemler uygulanılarak elde edilen akımlar grafiğıe geçirildi (Şekil 4.12). Birinci ölçümde alınan akım değeri ile yirminci ölçümde alınan akım değeri karşılaştırılıp enzim elektrodun art arda yirmi kullanım sonundaki performans kaybı incelenip, bağıl standart sapması hesaplandı.

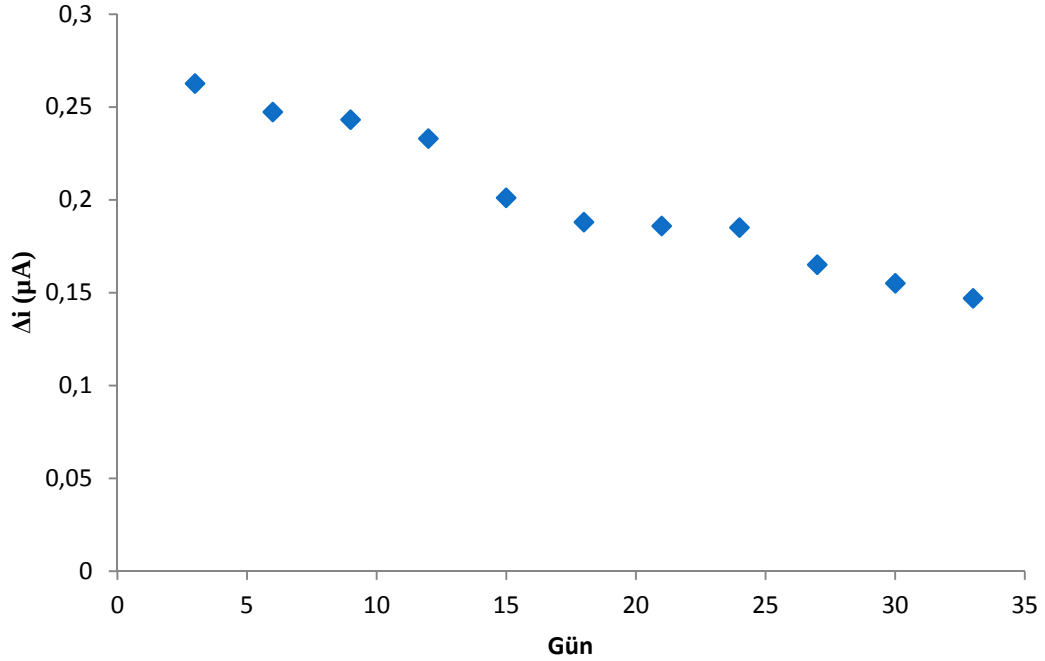


Şekil 4.12. Pt/PPy-PVS/KO-U enzim elektrodunun tekrar kullanılabilirliği

Ölçümler alınırken, her bir ölçümde koşulların aynı olmasına özen gösterilmiştir. Sonuç olarak enzim elektrodun 20 ölçüm sonrasında performansının %74,5'ini koruduğu gözlenmiştir. Bağlı standart sapma 0,1 mM hipoksantin derişimi için %9,78 olarak bulunmuştur.

4.11. Enzim Elektrodun Raf Ömrünün Tayin Edilmesi

Hazırlanan enzim elektrodun raf ömrünün belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.11.5'de anlatılan işlemler uygulanarak elde edilen değerler grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.13). Periyodik aralıklarla alınan 33 günlük çalışma sonunda; birinci gün alınan akım değeri ile 33. gün alınan akım değeri karşılaştırılıp enzim elektrodun performans kaybı ve sonuçların bağlı standart sapması hesaplandı.



Şekil 4.13. Enzim elektrodun raf ömrü

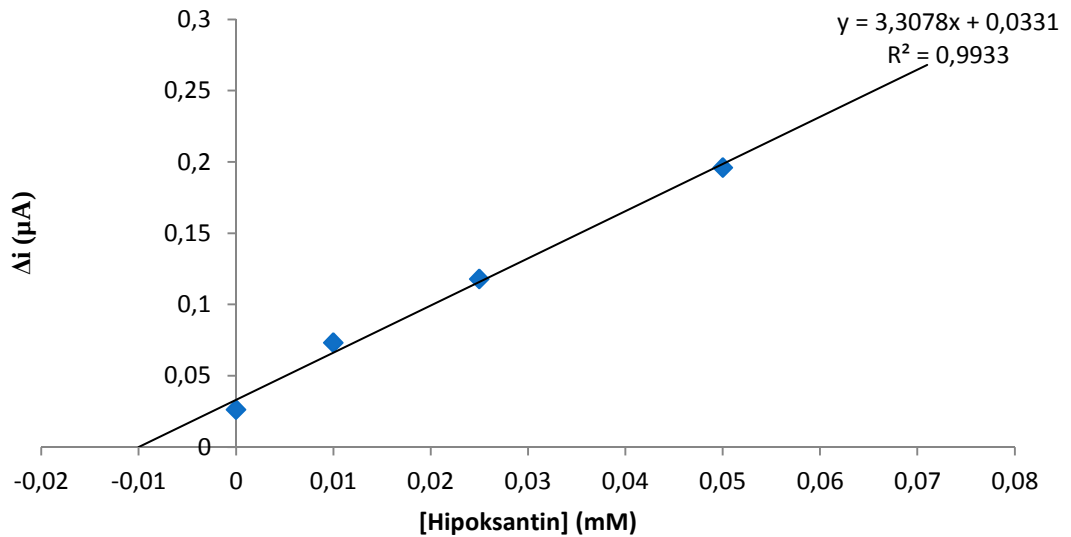
33 günün sonunda enzim elektrodun performansında % 44'lük bir azalma meydana gelmiştir. Bağıl standart sapma değeri %19,7.

4.12. Biyosensörün Gerçek Numunelere Karşı Davranışının İncelenmesi

Biyosensörün gerçek numunelere karşı performansının incelenmesi için Alabalık balık türü tercih edildi. Balık canlı iken alınıp, ölümünden hemen sonra hipoksantin miktarına, hazırlanan biyosensör ile bakıldı. Ardından balıktaki hipoksantin artışlarını izlemek ve bu artışları hazırlanan biyosensörün tespit edip edemeyeceğini gözlemleyebilmek için, balık numunesi çeşitli ortamlarda bekletildikten sonra ölçümler alındı. Bu amaçla Bölüm 3.12.1 ve Bölüm 3.12.2'deki işlemler sırasıyla yapıldı.

4.12.1. Balık ölümü gerçekleştiği anda alınan ölçüm

Balık ölümü gerçekleştiği anda numune Bölüm 3.12.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanarak ölçüm alındı. Burada protein çöktürme ile çöktürmeme arasındaki akım değerlerindeki değişimi gözlemleyebilmek için ilk numune hazırlamada protein çöktürmesi yapılmadı. Aynı numune proteini çöktürülerek de hazırlandı ve ikisinin akımları karşılaştırıldı. Ardından standart ekleme metoduyla kalibrasyon grafiği çizildi. Bu grafiğin denkleminde, okunan akım değeri yerine yazılarak x ekseninde karşılık gelen değer numunedeki hipoksantin miktarı olarak okundu (Şekil 4.14).



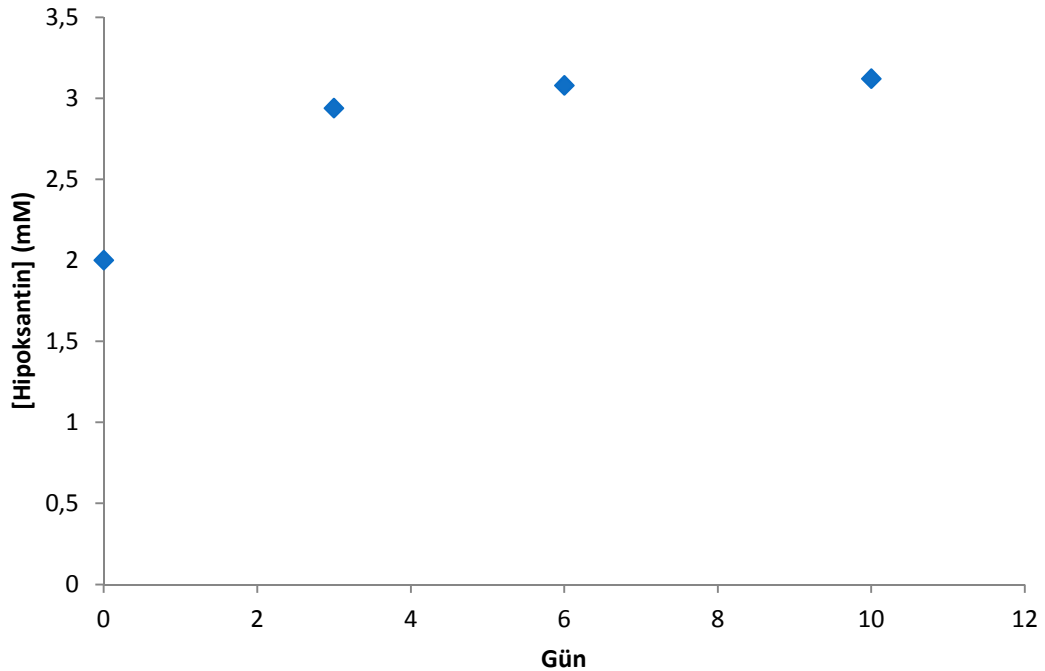
Şekil 4.14. Balık ölümü gerçekleştiği anda proteini çöktürülerek hazırlanmış numune için standart ekleme metodu ile hazırlanmış kalibrasyon grafiği

Numune için okunan akım değeri grafikteki yerine yazıldığında elde edilen değer: 0,010'dur. Gerekli seyreltme faktörleri yapıldığında numunedeki hipoksantin miktarı 2,0 mM olarak bulundu. Proteini çöktürülmemiş numune için yapılan ölçümlerde daha yüksek bir akım değeri elde edildi. Bu akıma karşılık gelen hipoksantin derişimi ise 2,65 mM olduğu gözlemlendi. Bu değer

bize numunede bulunan proteinlerin girişim etkisi yapabileceğini göstermiştir. Bu yüzden bundan sonraki gerçek numune çalışmalarında protein çöktürülmesi yapıldı.

4.12.2. Derin dondurucuda bekletilmiş balık numunesinde hipoksantin artışlarının gözlenmesi

İlk ölçümü alınan balık numunesi parçalara ayrılarak bir kısmı -18°C 'a ayarlanmış derin dondurucuda bekletilip 3 günlük periyotlarda ölçümler alınarak hipoksantin artışı hazırlanan biyosensörle gözlemlenmek istenmiştir. Bu amaçla Bölüm 3.12.1'de anlatıldığı şekilde numune hazırlandı ve Bölüm 3.12.2'de anlatıldığı şekilde ölçümler alındı. Ölçüm sonuçları kalibrasyon grafiğinden okundu. Okunan değerler bekletilen gün sayısına karşı grafik edildi (Şekil 4.15).

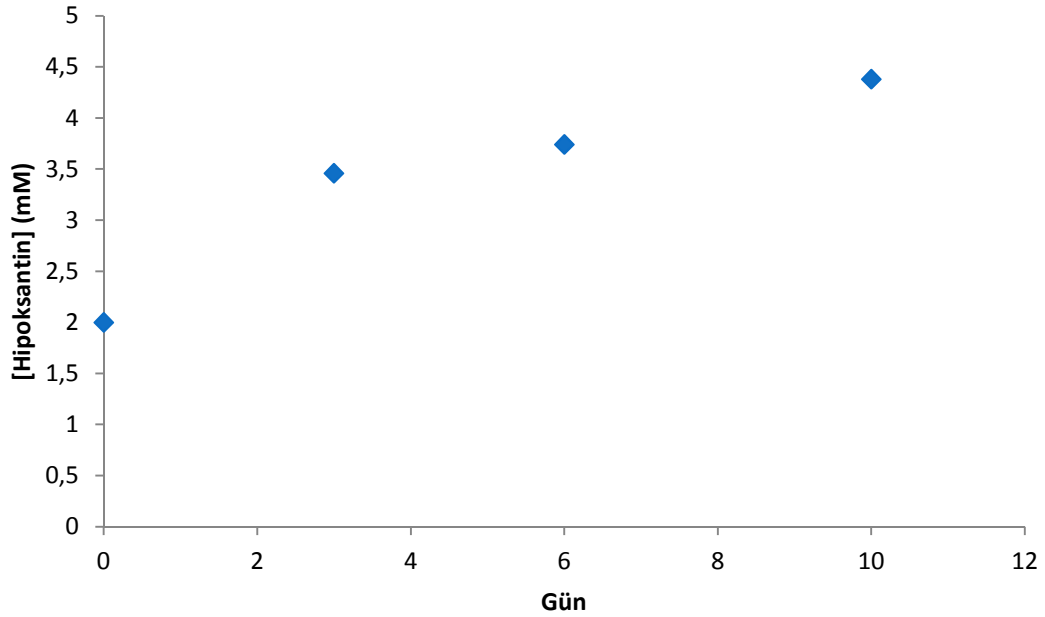


Şekil 4.15. Derin dondurucuda bekletilen numune için periyodik aralıklarla alınan hipoksantin ölçüm sonuçlarının, bekletilen gün sayısına karşı grafiği

Garfiğe bakıldığında derin dondurucuda bekletilen balık numunesinde hipoksantin miktarının ilk güne göre biraz yükseldiği fakat bu yükselmenin derin dondurucuda ilerleyen zamanlarda sabitlendiği görülmektedir.

4.12.3. Buzdolabında bekletilmiş balık numunesinde hipoksantin artışlarının gözlenmesi

İlk ölçümü alınan balık numunesi parçalara ayrıldı, parçaların bir kısmı da +6 °C'a ayarlanmış buzdolabında bekletildi. Üç günlük peryotlarla ölçümler alındı ve alınan ölçümlerden elde edilen sonuçlar gün sayısına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.16).

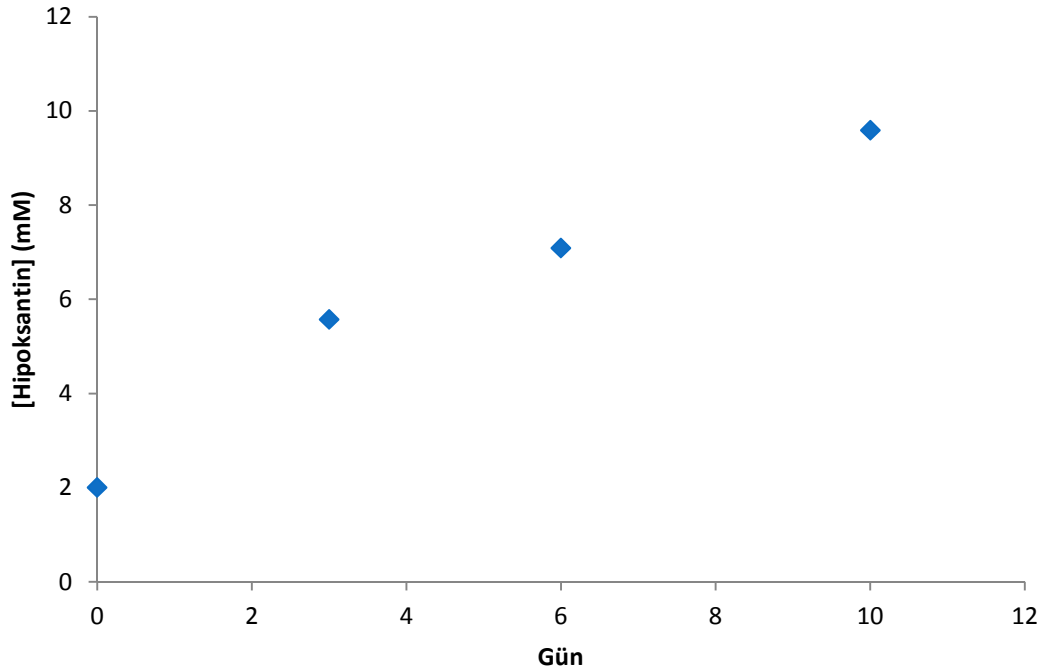


Şekil 4.16. Buzdolabında bekletilen numune için periyodik aralıklarla alınan hipoksantin ölçüm sonuçlarının, bekletilen gün sayısına karşı grafiği

Dolapta bekletilen balık numunesinde hipoksantin artışı ilk güne göre yükselmiştir. Dolapta bekletilmesi, balık numunesinde hipoksantin artışını her ne kadar yavaşlatsa da durdurucu etki gösterememiştir.

4.12.4. Oda sıcaklığında bekletilmiş balık numunesinde hipoksantin artışlarının gözlenmesi

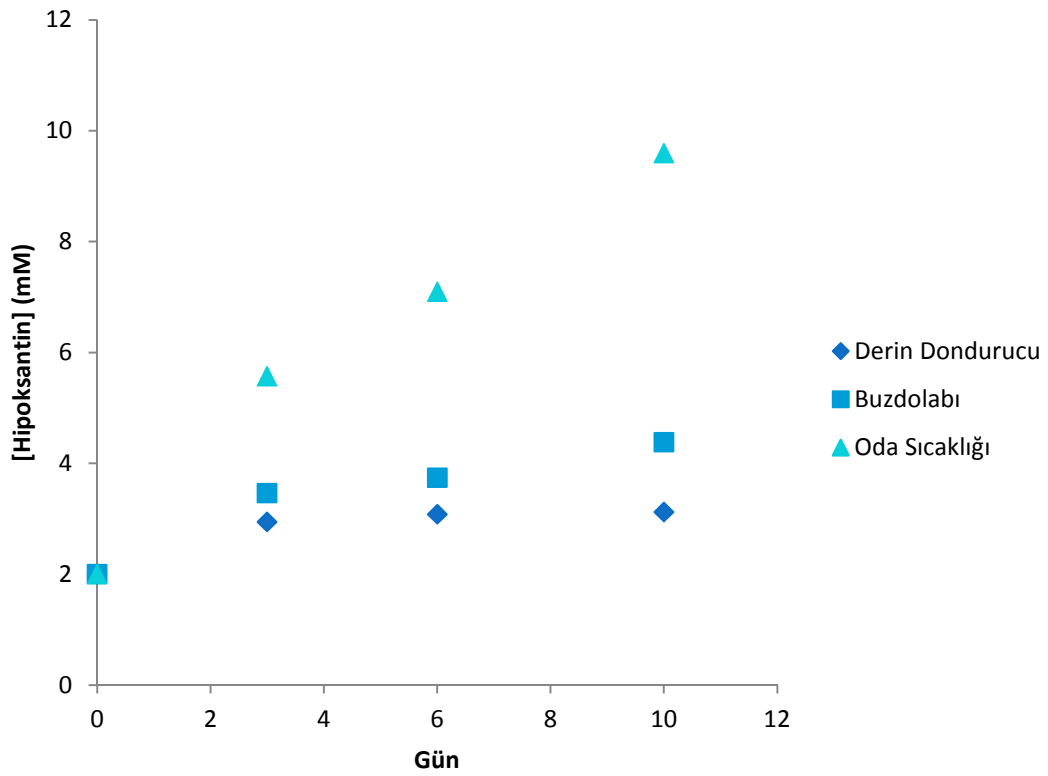
İlk ölçümü alınan balık numunesi parçalara ayrılmış, parçaların bir kısmı da oda sıcaklığında bekletildi. Üç günlük periyotlarla ölçümler alındı ve alınan ölçümlerden elde edilen sonuçlar gün sayısına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Oda sıcaklığında bekletilen numune için periyodik aralıklarla alınan hipoksantin ölçüm sonuçlarının, bekletilen gün sayısına karşı grafiği

4.12.5. Derin dondurucuda, buzdolabında ve oda sıcaklığında bekletilen balık numuneleri için alınan hipoksantin ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması

Derin dondurucuda, buzdolabında ve oda sıcaklığında bekletilen balık numuneleri için alınan sonuçların tamamı tek bir grafikte toplandı (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Her üç durum için alınan sonuçların karşılaştırılması

Grafiğe bakıldığında balık numunesinde hipoksantin artışının en yüksek olduğu durum balık numunesinin oda sıcaklığında bekletildiği durumdur. Balık, derin dondurucuda bekletildiğinde hipoksantin artışı çok düşük seviyelerdedir.

4.13. Sonuç

Hazırlanan hipoksantin duyarlı biyosensörün;

- Doğrusal çalışma aralığı: 2,5 μM – 10 μM ve 25 μM – 0,1 mM arasındır.
- Ölçüm limiti 2,5 μM 'dir
- Cevap süresi 200 sn'dir.
- 20 ölçüm sonunda performansının %74,5'ini korumuştur.
- 33 günün sonunda performansının % 44'ünü kaybetmiştir.
- Ksantin oksidaz ve ürikaz enzimleri immobilize edilerek hazırlanan Pt/PPy-PVS/KO-U enzim elektrot sistemi için $K_{M(\text{göz})}$ değeri 3,7 μM ve $I_{\text{maks}(\text{göz})}$ değeri ise 0,19 $\mu\text{A/dk}$ olarak bulunmuştur.
- Enzim elektrot sistemi için optimum pH değeri 8,2 olarak bulunmuştur.
- Optimum sıcaklık değeri 30 $^{\circ}\text{C}$ olarak tespit edildi.
- Gerçek numunelere karşı davranışı incelenmiş ve balık numunelerindeki hipoksantin miktarı tespit edilmiştir. Bekletilen balık numunesindeki hipoksantin artışı da doğrusal bir şekilde gözlenmiştir.

Hazırlanan biyosensörün literatürdeki diğer çalışmalarla kıyaslandığında avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır:

A.T. Lawal ve S.B. Adeloju tarafından balık dokusunda hipoksantin tayini için PPy-XOD-Fe(CN) $_6^{4-}$ biyosensörü hazırlanmıştır[2]. Hazırlanan biyosensörde;

- Hipoksantin tayini enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksitin +800 mV'da yükseltgenmesi esasına dayanılarak yapılmıştır. Bu potansiyel değerinde ürik asitin girişimini engellemek amacıyla nafion kullanılmıştır. Çalışmamızda daha düşük bir potansiyel değeri (+400 mV) kullanılmıştır ve ürik asitin girişimini engellemek için oluşan ürik asiti uzaklaştırmak amacıyla ürikaz enzimi kullanılmıştır.
- Minimum ölçüm sınırı 6,0 μM 'dır. Çalışmamızda bu değer 2,5 μM 'dır.
- 0-50 ve 50-130 μM olmak üzere iki ayrı doğrusal çalışma aralığı vardır. Çalışmamızda 2,5 - 10 μM ve 25 μM – 0,1 mM olmak üzere iki doğrusal çalışma aralığı bulunmaktadır.
- 60 saat sonunda performansında %77'lik bir düşüş gözlenmiştir. Çalışmamızda bu değer 33 gün sonunda %44'dür.
- Her iki biyosensörde de gerçek numunelerdeki hipoksantin artışları gözlemlenebilmiştir.

N. Dolmacı ve çalışma grubu balıkta hipoksantin tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirmiştir[38]. Hazırlanan biyosensörde;

- Hipoksantin tayini medyatör kullanarak oksijensiz ortamda yapılmıştır. Çalışmamızda ise oksijenli ortamda çalışıldığından daha pratik kullanışlı bir sistemdir.
- Enzim elektrodun doğrusal çalışma aralığı 0,1 μM – 1 mM olarak saptanmıştır. Çalışmamızda ise 1 μM – 10 μM ve 25 μM – 0,1 mM olmak üzere iki ayrı doğrusal çalışma aralığı bulunmaktadır.
- 30 gün sonunda cevap akımlarında % 51'lik bir düşüş gözlenmiştir. Çalışmamızda 33 gün sonunda akımlarda % 44'lük bir azalma gözlenmiştir.

Hua, S., Xua, C., Luob, J, Luoc, J, Cuid, D. Balık tazeliği tespiti için hipoksantine duyarlı amperometrik esaslı yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir[3]. Hazırlanan biyosensörde;

- Doğrusal çalışma aralığı $1\mu\text{M}$ – $0,4\text{ mM}$ olarak gözlemlenmiştir. Çalışmamızda ise $1\mu\text{M}$ – $10\mu\text{M}$ ve $25\mu\text{M}$ – $0,1\text{ mM}$ olmak üzere iki ayrı doğrusal çalışma aralığı bulunmaktadır.
- Tespit edebildiği minimum hipoksantin miktarı $0,8\mu\text{M}$ 'dir. Çalışmamızda bu sınır $2,5\mu\text{M}$ 'dir.
- 5 hafta sonunda performansında %60'lık bir düşüş gözlenmiştir. Çalışmamızda 33 gün sonunda %44'lük bir azalma gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Fernandez-Quejo, M., de la Fuente, M., Navarro, R., "Theoretical calculations and vibrational study of hypoxanthine in aqueous solution", **Journal of Molecular Structure**, 744–747, 749–757(2005).
2. Lawal, A.T., Adeloju, S.B., "Comparison of polypyrrole-based xanthine oxidase amperometric and potentiometric biosensors for hypoxanthine", **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 66:270–275 (2010).
3. Hua, S., Xua, C., Luob, J., Luoc, J., Cuid, D., "Biosensor for detection of hypoxanthine based on xanthine oxidase immobilized on chemically modified carbon paste electrode", **Analytica Chimica Acta**, 412:55–61 (2000).
4. Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., "Biyokimya", **Aktif Yayınevi**, 91-139 (2009).
5. Nelson D.L., Cox, M.M., "Lehninger Biyokimyanın İlkeleri 3. Cilt'den çeviri", Kılıç N., **Palme Yayınevi**, 244-261 (2009).
6. Okamoto K., Kawaguchi Y., Eger, B.T., Emil F., Nishino, P., Takeshi "Crystal Structures of Urate Bound Form of Xanthine Oxidoreductase: Substrate Orientation and Structure of the Key Reaction Intermediate", **University of California**, United States, 92521-0122 (2010).
7. Lindera, N., Martelinb, E., Lundina, M., Louhimod, J., Nordlinge, S., Haglundd, C., Lundina, J., "Xanthine oxidoreductase Clinical significance in colorectal cancer and in vitro expression of the protein in human colon cancer cells", **European Journal of Cancer**, 45:648–655(2009).
8. Nishino, T., Okamoto, K., "The role of the [2Fe–2S] cluster centers in xanthine oxidoreductase", **Journal of Inorganic Biochemistry**, 82:43–49 (2000).
9. Harrison, R., "Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?", **Free Radical Biology & Medicine**, PII S0891-5849(02)00956-5 (2002).
10. White, J.S., White D.C., "Source Book Enzyme", **CRC Press**, 85-82, 129-132.
11. Karademir, B., "Molibden ve hayvanlar için enzimsel fonksiyonları", **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıklar Ana Bilim DalıKars Türkiye**, (2006/18-D).

12. Beedham, C., "Xanthine oxidoreductase and aldehyde oxidase", **University of Bradford, Bradford, West Yorkshire, UK**, K.V. Rajagopalan, 3:165-178 (2010).
13. Choi, E.Y., Stockert, A.L., Leimkühler, S., Hille, R., "Studies on the mechanism of action of xanthine oxidase", **Journal of Inorganic Biochemistry**, 98:841–848 (2004).
14. Tana, Q.Y., Wang, N., Yangc, H., Zhangd, L.K., Liub, S., Chen, L., Liub, J., Zhang, L., Hub, N.N., Zhaoe, C.J., Zhang, J.Q., "Characterization, stabilization and activity of uricase loaded in lipid vesicles", **International Journal of Pharmaceutics**, 384:165–172 (2010).
15. Altarsha, M., Castro, B., Monard, G., "Intrinsic reactivity of uric acid with dioxygen: Towards the elucidation of the catalytic mechanism of urate oxidase", **Bioorganic Chemistry**, 37:111–125 (2009).
16. Çete, S., "Ürik asit tayini için biyosensör hazırlanması", **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi**, Ankara, 1-7, (2005).
17. Abasıyanık, M.F., Şakalar, E., Şenel, M., "Biyosensörlere genel bir bakış ve biyosavunmada kullanılan biyosensörler", **Fatih Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Biyoloji Bölümü, Kimya Bölümü**, 1-6 (2010).
18. Dzyadevych, S.V., Arkhypova, V.N. , Soldatkin, A.P., El'skaya, A.V., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., "Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future", **ITBM-RBM**, 29:171–180 (2008).
19. Beskan, U., "Glukoz tayini için polianilin-polivinilsülfonat filme glukoz oksidaz enzimi immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması", **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi**, Ankara, 25-45 (2011).
20. İnternet: Ege Üniversitesi, "Biosensor in Turkish"Bornova, İzmir, <http://www.pharm.ege.edu.tr/pp/ozsozs/biosensor.pdf> .(2011).
21. Ateş, M. "Polimerizasyon ve polimerler hakkında genel bilgi", **Orta Doğu Teknik Üniversitesi**, Ankara, 7-18 (1998).
22. Gerard, M., Chaubey, A., Malhotra, B.D., "Application of conducting polymers to biosensors" , **Biosensors & Bioelectronics**, 17:345–359 (2002).

23. Ustabaş, S., "Glukoz tayini için yeni bir biyosensör hazırlanması", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 1-35 (2010).
24. Ghosh, S., Sarker, D., Misra, T.N., "Development of an amperometric enzyme electrode biosensor for" fish freshness detection", **Sensors and Actuators B**, 53:58–62 (1998).
25. Agui, L., Manso, J., Yanez-Sedeno, P., Pingarron, J.M., "Amperometric biosensor for hypoxanthine based on immobilized xanthine oxidase on nanocrystal gold–carbon paste electrodes", **Sensors and Actuators B**, 113:272–280 (2006).
26. Çubukçu, M., Timur, S., Anık, 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).
27. Devi, R., Thakur, M., Pundir, C.S., "Construction and application of an amperometric xanthine biosensor based on Zinc oxide nanoparticles-polypyrrole composite film", **Biosensors and Bioelectronics**, BIOS: 4313, (2011).
28. Kirgöz, Ü.A., Timur, S., Wang, J., Telefoncu, A., "Xanthine oxidase modified glassy carbon paste electrode", **Electrochemistry Communications**, 6:913–916 (2004).
29. Gao, Y., Shen, C., Di, J., Tu, Y., "Fabrication of amperometric xanthine biosensors based on direct chemistry of xanthine oxidase", **Materials Science and Engineering**, C 29:2213–2216 (2009).
30. Hoshi, T., Noguchi, T., Anzai, J., "The preparation of amperometric xanthine sensors based on multilayer thin films containing xanthine oxidase", **Materials Science and Engineering**, C 26:100 – 103 (2006).
31. Pei, J., 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).
32. Venugopal, V., "Biosensors in fish production and quality control", **Biosensors & Bioelectronics**, 17:147–157 (2002).
33. Niu, J., Lee, J.Y., "Bulk-modified amperometric biosensors for hypoxanthine based on sol–gel technique", **Sensors and Actuators**, B 62:190–198 (2000).

34. Carsol, M.A., Volpe, G., Mascini, M., “ Amperometric dedection of uric acid and hypoxanthine with Xanthine Oxidase immobilized and carbon based screen-printed electrode. Application of fish freshness determination”, **Talanta**, 44:2151-2159 (1997).
35. Hua, S., Xua, C., Luob. J., Luoc, J., 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).
36. Arslan, F., Yaşar, A., Kılıç, E., “An amperometric biosensor for xanthine determination prepared from xanthine oxidase immobilized in polypyrrole film”, **Department of Chemistry, Faculty of Arts and Sciences, Gazi University, Ankara, Turkey**, 1-2 (2006).
37. Lia, X.H., Xiea, Z.H., Mina, H., Xiana, Y.Z., Jina, L.T., “Amperometric Biosensor for Hypoxanthine Based on Immobilized Xanthine Oxidase on Iron (III) Meso-tetraphenylporphyrin Nanoparticles Modified Glassy Carbon Electrode”, **Analytical Letters**, 41:456–468, (2008).
38. Dolmacı, N., “Balık eti tazeliği tespiti için ksantin oksidaz enziminin polipirrol-polivinilsülfonat filme immobilizasyonu ile amperometrik biyosensör hazırlanması”, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 1-6 (2009).
39. Villalonga, R., Matos, M., Cao, R., “Construction of an amperometric biosensor for xanthine via supramolecular associations”, **Electrochemistry Communications**, 9:454–458 (2007).
40. Arslan, F., “An Amperometric Biosensor for Uric Acid Determination Prepared From Uricase Immobilized in Polyaniline-PolypyrroleFilm”, **Sensors**, 8: 5492-5500, (2008).
41. Qiong, C., Tuzhi, P., “Silk fibroin/cellulose asetate membrane electrodes incorporating xanthine oxidase for the determination or fish freshness”, **Analytica Chimica Acta.**, 369:245-251(1998).
42. Singh, S., Singhal, R., Malhotra, B.D., “Immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase onto sol–gel films for application to cholesterol biosensor”, **Analytica Chimica Acta**, 582:335–343 (2007).
43. Mousty, C., Cosnier, S., Shan, D., Mu, S., “Trienzymatic biosensor for the determination of inorganic phosphate”, **Analytica Chimica Acta**, 443:1–8 (2001).
44. Chubey, A., Gerard, M., Singhal, R., Singh, V.S., Malhotra, B. D.,

“Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole-polivibylsulphonate somposite films for application to lactate biosensors”, ***Electrochemica Acta*** 46:723-729 (2000).

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : GÖRGÜLÜ, Mustafa
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 15.07.1985 / ANKARA
Medeni hali : Bekar
e-mail : kserfiraz@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Atatürk Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2007
Lise	Fatih Sultan Mehmet Lisesi	2002

Yabancı Dil

İngilizce