



**AMİNO ASİT DUYARLI BİYOSENSÖRLERİN
SIVI KRAMOTOGRAFİDE
DETEKTÖR OLARAK KULLANILMASI
VE AMİNO ASİTLERİN TAYİNİ**

**GAZİ GÜNEŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**Prof. Dr. Ömer IŞILDAK
2015**

Her hakkı saklıdır

**T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AMİNO ASİT DUYARLI BİYOSENSÖRLERİN SIVI
KRAMOTOGRAFİDE DETEKTÖR OLARAK KULLANILMASI
VE AMİNO ASİTLERİN TAYİNİ**

Gazi GÜNEŞ

**TOKAT
2015**

Her hakkı saklıdır

Bu tez çalışması;

**Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından
2013/108 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Prof. Dr. Ömer IŞILDAK danışmanlığında, Gazi GÜNEŞ tarafından hazırlanan bu çalışma 16.06.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hayati SARI

İmza:



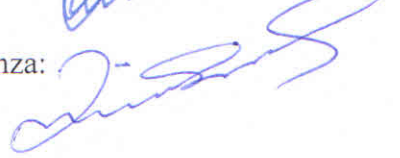
Üye: Prof. Dr. Ömer IŞILDAK

İmza:



Üye: Yrd. Doç. Dr. Osman ÇUBUK

İmza:



Yukarıdaki sonucu onaylarım



Prof. Dr. Mehmet Ali SAKİN

Enstitü Müdürü

01/07/2015

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Gazi GÜNEŞ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AMİNO ASİT DUYARLI BİYOSENSÖRLERİN SIVI KROMATOĞRAFİDE
DETEKTÖR OLARAK KULLANILMASI VE AMİNO ASİTLERİN TAYİNİ

Gazi GÜNEŞ

Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömer IŞILDAK

Bu çalışmada, mikro boyutlarda kompozit amino asit duyarlı biyosensörler hazırlanarak sıvı kromatografide detektör olarak kullanıldı. İlk aşamada temel sensör olarak kullanılmak üzere NH_4^+ -seçici sensörler hazırlandı ve potansiyometrik davranışları test edildi. NH_4^+ -seçici sensörlerin yüzeyine L-amino asit oksidaz (L-AAO) enzimi tek adımda glutaraldehit çapraz bağlayıcısı ile tutturuldu. Hazırlanan amino asit duyarlı biyosensörlerin farklı L-amino asitlere karşı potansiyometrik davranışları incelendi. Biyosensörler incelenen L-amino asitlerin bazılarına karşı doğrusal cevaplar vermiştir. İyi potansiyometrik davranış sergileyen biyosensörler laboratuvarında hazırlanan mikro litre ölü hacme sahip hareketli ortam akış hücresine minyatürize laboratuvar yapımı Ag/AgCl referans elektrotu ile birlikte yerleştirildi. Bu akış hücresi de Sıvı Kromatografik sistemde kolon çıkışına yerleştirilerek bir detektör gibi görev yapması sağlandı. Düzenlenen kromatografi-potansiyometrik hibrit sistemine serbest amino asitler enjekte edilerek kromatogramlar elde edildi. Elde edilen sonuçlar, hazırlanan biyosensörlerin kromatografide detektör gibi kullanılabileceğini ve serbest amino asitlerin tayinlerinde detektör gibi kullanılabileceğini göstermiştir.

2015, 98 sayfa

Anahtar Kelimeler: Biyosensör, L-amino asit, potansiyometri, kromatografi

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

DETERMINATION OF AMINO ACIDS TO USE AS DETECTOR OF AMINO ACID SENSITIVE BIOSENSORS IN LIQUID CHROMATOGRAPHY

Gazi GÜNEŞ

Gaziosmanpasa University

Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ömer İŞILDAK

In this work, composite micro sized amino acid selective biosensors were prepared and used as a detector in liquid chromatography. Firstly, NH_4^+ -selective sensors were prepared to be used as a basic sensor and their potentiometric characteristics were analyzed. L-amino acid oxidase enzyme was attached to NH_4^+ -selective sensor surface by cross linker glutar aldehyde in one step. Potentiometric characteristics of amino acid selective biosensors against different L-amino acids were analyzed. Biosensors were observed to be exhibited linear response against some L-amino acids examined. Biosensors which have a good potentiometric characteristic were placed into micro-liter dead volume flow cell which was prepared in laboratory together with micro Ag/AgCl reference electrode. This flow cell was provided to serve as a detector by placing the exit of column in liquid chromatography. Free amino acids were injected to the chromatography-potentiometric hybrid system and then chromatograms were obtained. Results showed that these biosensors can be used as detectors in chromatography as well as to detect free amino acids.

2015, 98 page

Key Words: Biosensor, L-amino acid, potentiometry, chromatography

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve katkılarıyla beni yönlendiren, tezimin her aşamasında desteğini eksik etmeyen değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Ömer IŞILDAK’a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmaların boyunca yardımlarını ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen değerli laboratuvar arkadaşlarım Ayşenur BİRİNCİ, Furkan EGELİ ve Emrullah CANTÜRK’e ve Gaziosmanpaşa Üniversitesi Kimya bölümü öğretim elemanlarına çok teşekkür ederim

Hayatımın her anında beni sabırla ve ilgiyle destekleyen, sevgi ve dualarını hiç eksik etmeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Gazi GÜNEŞ

Haziran 2015

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	2
2.1. Amino Asitler	2
2.2. Amino Asitlerin R Gruplarına Göre Sınıflandırılması	3
2.2.1. Polar Olmayan, Alifatik R Gruplarına Sahip Amino Asitler	3
2.2.2. Aromatik R Gruplarına Sahip Olan Amino Asitler	4
2.2.3. Polar, Yüksüz R Gruplarına Sahip Olan Amino Asitler	4
2.2.4. Pozitif yüklü R Gruplarına Sahip Amino Asitler	5
2.2.5. Negatif Yüklü R Gruplarına Sahip Amino Asitler	6
2.3. Amino Asitlerin Asitlik ve Bazlık Özellikleri	6
2.4. Amino Asitlerin Optik Özellikleri	7
2.5. L-Amino Asit Oksidaz	7
2. 6. Biyosensörler	8
2. 7. Biyosensörlerin Yapısı ve İşlevi	9
2. 7. 1. Biyokomponentler.....	10
2. 7. 2. Tranduserler	10
2. 8. Biyosensörlerin Kullanım Alanları	11
2. 9. Biyoreseptörlerin İmmobilizasyonu	13
2. 9. 1. Kovalent Bağlama	14
2. 9. 2. Tutuklama	16

Sayfa

2. 9. 3. Adsorpsiyon	17
2. 9. 4. Çapraz Bağlama	17
2. 10. Transducer Yüzeyinin Kaplanması	19
2. 10. 1. Daldırma Yöntemi.....	19
2. 10. 2. Direk Bağlama Yöntemi.....	19
2. 10. 3. Membran Kullanımı	20
2. 11. Potansiyometrik Sensörler.....	20
2. 12. Enzim Sensörleri.....	22
2. 12. 1. Genel Çalışma İlkesi.....	23
2. 12. 2. Enzim Sensörlerinin Sınıflandırılması.....	25
2. 12. 3. Potansiyometrik Esaslı Enzim Sensörleri.....	26
2. 12. 4. Amonyum Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotları.....	26
2. 12. 5. Amonyum Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotlarının Bazı Uygulamaları.....	27
2. 13. Enzim Sensörlerin Performansına Etki Eden Faktörler.....	28
2. 13. 1. Karalılık.....	28
2. 13. 2. Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı.....	29
2. 13. 3. Seçimlilik.....	31
2. 13. 4. Cevap Zamanı.....	31
2. 13. 5. Tekrarlanabilirlik	32
2. 14. Kromatografik Sistem.....	32
3. MATERYAL VE METOT.....	36
3. 1. Materyal.....	36
3. 1. 1. Kullanılan Kimyasallar.....	36
3. 1. 2. Kullanılan Cihazlar.....	36
3. 2. Metot.....	37
3. 2. 1. Çalışma Yöntemi.....	37
3. 2. 2. PVC-NH ₂ Sentezi.....	37
3. 2. 3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	38
3. 2. 4. NH ₄ ⁺ -seçici Sensörlerin Hazırlanması.....	38

	<u>Sayfa</u>
3. 2. 5. Amino Asit Duyarlı Biyosensörlerin Hazırlanması.....	39
3. 2. 6. Hareketli Ortam Akış Hücrelerinin Hazırlanması.....	40
3.2.7. İyon Kromatografik Çalışmalar	41
3.2.8. Potansiyometrik Tayin Prensibi	42
4. BULGULAR	44
4. 1. Durgun Ortam Ölçümleri.....	44
4. 1. 1. Kompozit NH_4^+ -seçici Elektrodun Potansiyometrik Performansı.....	44
4. 1. 2. Biyosensörün Deiyonize Suda Hazırlanan Amino Asit Çözeltilerine Karşı Potansiyel Davranışları	52
4. 1. 3. Biyosensörün pH' sı 7,02 Olan Fosfat Tamponunda Hazırlanan Amino Asit Çözeltilerine Karşı Potansiyel Davranışları	61
4. 2. Hareketli Ortam Potansiyometrik Ölçümleri.....	70
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	75
6. KAYNAKLAR.....	77
7. ÖZGEÇMİŞ.....	80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
w/w	ağırlıkça yüzdesi
r	korelasyon katsayısı
M	molar
mV	milivolt
μL	mikrolitre
n	mol
mM	milimolar
L	litre
s	saniye

Kısaltmalar	Açıklama
L-AAO	L-amino asit oksidaz
PVC	Polivinilklorür
KTpClPB	Potasyum tetrakis(4-klorofenil) borat
THF	Tetrahidrofuran
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1. α - amino asitlerin genel formülleri.....	3
Şekil 2. 2. İki molekül sisteinin oksidasyonla geri dönüşümlü disülfid bağı oluşturmaları. 5	
Şekil 2. 3. Herhangi bir amino asidin pH'a bağlı iyonlaşması.....	6
Şekil 2. 4. Bir amino asidin artan pH' ya göre ayrışma denge reaksiyonu.....	7
Şekil 2. 5. L-amino asit oksidaz tarafından katalizlenen oksidatif deaminasyon.....	8
Şekil 2. 6. Temel biyosensör ve çalışma prensibi.....	9
Şekil 2. 7. Enzimin (biyoreseptör) glutaraldehit ile çapraz bağlanması.....	16
Şekil 2. 8. Bazı çapraz bağlayıcıların kimyasal formülü.....	18
Şekil 2. 9. Direkt bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyonu.....	20
Şekil 2. 10. Bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi.....	23
Şekil 2. 11. Enzim sensörünün genel çalışma ilkesi.....	24
Şekil 2. 12. Bir potansiyometrik enzim sensör cevabı için kalibrasyon grafiği.....	30
Şekil 3. 1. Kompozit NH_4^+ -seçici sensör.....	39
Şekil 3. 2. Katı-hal NH_4^+ -seçici sensör yüzeyine L-AAO enziminin tek adımda tutturulması.....	40
Şekil 3.3. Mikrolitre ölçü hacme sahip, referans elektrot ve biyosensör yerleştirilmiş akış hücresi.....	41
Şekil 3. 4. Aminoasit tayininde kullanılan iyon kromatografi-potansiyometri hibrit sistemi.....	42
Şekil 4. 1. Çok kanallı potansiyometrik ölçüm sistemi.....	44
Şekil 4. 2. NH_4^+ -seçici elektrodun $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ ve $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ NH_4^+ çözeltisine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	46
Şekil 4. 3. NH_4^+ -seçici elektrodun kalibrasyon grafiği.....	47
Şekil 4. 4. NH_4^+ -seçici elektrodun $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ ve $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ K^+ iyonuna karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı.....	47
Şekil 4. 5. NH_4^+ -seçici elektrodun $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ ve $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ Na^+ iyonuna karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı.....	48

Şekil 4. 6. NH_4^+ -seçici elektrodun $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ ve $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ Ca^{2+} iyonuna karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı.....	48
Şekil 4. 7. NH_4^+ -seçici elektrodun NH_4^+ iyonu yanında Ca^{2+} , K^+ ve Na^+ iyonlarının $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ ve $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon derişimlerine karşı sergilediğı doğrusallık.....	49
Şekil 4. 8. NH_4^+ -seçici elektrodun 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} M NH_4^+ çözeltileri ölçülerek elde edilen potansiyometrik tekrarlanabilirliği.....	50
Şekil 4. 9. Enzim molekülü ile glutaraldehit molekülünün bağlanması.....	51
Şekil 4. 10. Amonyum elektrodunun yüzeyine, glutaraldehit ile bağlanmış enzim molekülünün (L-AAO) tutturulması.....	51
Şekil 4. 11. Biyosensörün şematik gösterimi.....	52
Şekil 4.12. Biyosensörün durgun ortamda alaninin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değışimine karşı sergilediğı potansiyometrik davranışı.....	52
Şekil 4. 13. Biyosensörün durgun ortamda arjinin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değışimine karşı sergilediğı potansiyometrik davranışı.....	53
Şekil 4. 14. Biyosensörün durgun ortamda aspartik asidin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değışimine karşı sergilediğı potansiyometrik davranışı.....	53
Şekil 4. 15. Biyosensörün durgun ortamda fenilalaninin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değışimine karşı sergilediğı potansiyometrik davranışı.....	54
Şekil 4. 16. Biyosensörün durgun ortamda glisinin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değışimine karşı sergilediğı potansiyometrik davranışı.....	54
Şekil 4. 17. Biyosensörün durgun ortamda glutamik asidin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değışimine karşı sergilediğı potansiyometrik davranışı.....	55
Şekil 4. 18. Biyosensörün durgun ortamda glutaminin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değışimine karşı sergilediğı potansiyometrik davranışı.....	55
Şekil 4. 19. Biyosensörün durgun ortamda histidinin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değışimine karşı sergilediğı potansiyometrik davranışı.....	56

Şekil 4. 20. Biyosensörün durgun ortamda izolösinin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	56
Şekil 4. 21. Biyosensörün durgun ortamda lizinin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	57
Şekil 4. 22. Biyosensörün durgun ortamda lösinin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	57
Şekil 4. 23. Biyosensörün durgun ortamda tirozinin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	58
Şekil 4. 24. Biyosensörün durgun ortamda valininin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	58
Şekil 4. 25. Deiyonize suda hazırlanan amino asitlerin değişik konsantrasyonlarda gösterdiği potansiyometrik davranışları.....	60
Şekil 4. 26. Biyosensörün alaninin fosfat tamponunda(pH: 7,02) $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	61
Şekil 4. 27. Biyosensörün arjininin fosfat tamponunda(pH: 7,02) $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	62
Şekil 4. 28. Biyosensörün aspartik asidin fosfat tamponunda(pH: 7,02) $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	62
Şekil 4. 29. Biyosensörün fenilalaninin fosfat tamponunda(pH: 7,02) $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	63
Şekil 4. 30. Biyosensörün glisinin fosfat tamponunda(pH: 7,02) $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	63

Şekil 4. 31. Biyosensörün glutamik asidin fosfat tamponunda (pH: 7,02) 1x10 ⁻¹ –1x10 ⁻⁵ M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	64
Şekil 4. 32. Biyosensörün glutaminin fosfat tamponunda(pH: 7,02)1x10 ⁻¹ –1x10 ⁻⁵ M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	64
Şekil 4. 33. Biyosensörün histidinin fosfat tamponunda (pH: 7,02) 1x10 ⁻¹ –1x10 ⁻⁵ M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	65
Şekil 4. 34. Biyosensörün izölösünün fosfat tamponunda(pH: 7,02) 1x10 ⁻¹ –1x10 ⁻⁵ M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	65
Şekil 4. 35. Biyosensörün lizinin fosfat tamponunda (pH: 7,02) 1x10 ⁻¹ –1x10 ⁻⁵ M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	66
Şekil 4. 36. Biyosensörün lösinin fosfat tamponunda (pH: 7,02) 1x10 ⁻¹ –1x10 ⁻⁵ M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	66
Şekil 4. 37. Biyosensörün tirozinin fosfat tamponunda (pH: 7,02) 1x10 ⁻¹ –1x10 ⁻⁵ M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	67
Şekil 4. 38. Biyosensörün valinin fosfat tamponunda (pH: 7,02) 1x10 ⁻¹ –1x10 ⁻⁵ M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı.....	67
Şekil 4. 39. pH' sı 7,02 olan fosfat tamponunda hazırlanan amino asitlerin değişik konsantrasyonlarda gösterdiği potansiyometrik davranışları.....	69
Şekil 4. 40. İyon kromatografi-potansiyometrik hibrit sistemi.....	71
Şekil 4. 41. 1x10 ⁻¹ –1x10 ⁻³ M alanin çözeltilerinin enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram.....	71
Şekil 4. 42. 1x10 ⁻¹ -1x10 ⁻³ M glisin çözeltilerinin enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram.....	72
Şekil 4. 43. 1x10 ⁻¹ -1x10 ⁻³ M glutamin çözeltilerinin enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram.....	72
Şekil 4. 44. 1x10 ⁻¹ -1x10 ⁻³ M izölösün çözeltilerinin enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram.....	73

Sayfa

Şekil 4. 45. 1×10^{-1} - 1×10^{-3} M lizin çözeltilerinin enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram.....	73
Şekil 4.46. 1×10^{-1} - 1×10^{-3} M valin çözeltilerinin enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram.....	74

ÇİZELGELER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2. 1. Esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler.....	2
Çizelge 2. 2. Biyosensörlerin kullanım alanları	11
Çizelge 2. 3. Biyosensörlerin grupları ve kapsadıkları analiz alanları.....	12
Çizelge 2. 4. Enzimlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonda bağ oluşumuna katılan amino asit reaktif grupları.....	15
Çizelge 2. 5. Çeşitli enzimlerin kullanıldığı potansiyometrik sensör örnekleri.....	22
Çizelge 2. 6. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması.....	25
Çizelge 4. 1. NH_4^+ -seçici membran için kimyasal bileşim oranları.....	45
Çizelge 4. 2. Amonyum elektrodunun, NH_4^+ ve diğer iyonların (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) 1×10^{-1} M ve 1×10^{-5} M konsantrasyon derişimlerine karşı sergilediği potansiyel değerleri	49
Çizelge 4. 3. Biyosensörün deiyonize suda hazırlanan amino asit çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarına karşı verdiği potansiyel değerleri (mV).....	59
Çizelge 4. 4. Biyosensörün deiyonize suda hazırlanan amino asit çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarına karşı verdiği potansiyel değerleri (mV).....	60
Çizelge 4. 5. Biyosensörün pH' sı 7,02 olan fosfat tamponunda hazırlanan amino asit çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarına karşı verdiği potansiyel değerleri (mV)	68
Çizelge 4. 6. Biyosensörün pH' sı 7,02 olan fosfat tamponunda hazırlanan amino asit çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarına karşı verdiği potansiyel değerleri (mV).....	69

1. GİRİŞ

Amino asitlerin tarihi, 1806'da aspartik asidin kuşkonmaz filizlerinde keşfiyle başlamıştır. Daha sonra 360'dan fazla aminoasit türü doğal olarak yaşam organizmalarından tespit edilmiştir. Amino asitlerin analizleri, ilk defa Moore ve Stein tarafından geliştirilen, kolon sonrası nihidrin türevlendirmesiyle uygulanmıştır (Moore ve Stein, 1954). 124 tane aminoasit tayin etmişlerdir ve 1972'de Nobel Kimya ödülüne layık görülmüşlerdir (Toyo'oka, 2013).

Biyoteknolojideki son gelişmelerle birlikte amino asitlerin kimyasal analizleri önemli bir hale gelmiştir. Son yıllarda amino asitlerin analizleri için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler genellikle spektrofotometrik ve spektroflorimetrik deteksiyon tekniklerinin uygulandığı kromatografik yöntemlerdir.

Genellikle amino asitlerin kromatografik ayırımı pre-kolon ve post-kolon türevlendirmeye dayanır. Amino asitlerin tayininde; iyon-değişim kromatografisi, ters-faz kromatografisi, gaz kromatografisi, kapilarelektroforez ve mikroçip elektroforez gibi çok çeşitli teknikler kullanılmıştır (Toyo'oka, 2013).

Ancak bu yöntemlerin pahalı oluşu, türevlendirme işlemleri, deneyimli personel eksikliği ve seçiciliklerinin düşük oluşu nedeniyle yeni yöntemlere ihtiyaç vardır.

Leland Clark'ın ilk enzim elektrodu üretmesinden beri biyosensörler üzerine çalışmalar artmış ve bununla birlikte biyosensörlerin kullanım alanları genişlemeye başlamıştır. Biyosensörler, algılayıcı tabakayla birleştirilmiş bir biyolojik unsurun fiziksel dönüştürücülerle komplike edilmesiyle oluşurlar. Yüksek duyarlılığı, mekanik basitliği, gerçek-zamanlı potansiyel kabileyeti ve saha analizlerine uygunluğu nedeniyle biyosensörler klinik araştırmalarda, çevresel tayinlerde, endüstriyel proseslerde sıklıkla uygulama alanı bulmuştur (Dong ve Chen, 2002).

Bu çalışmada; potansiyometrik performansları belirlenmiş amino asit duyarlı biyosensörler ve mikro-akış hücreleri hazırlandıktan sonra sıvı kromatografik sisteme entegre edildi ve hazırlanan amino asit duyarlı biyosensörler detektör gibi kullanılıp serbest amino asitlerin tayini gerçekleştirildi.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Amino Asitler

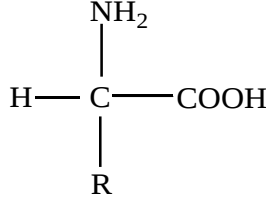
Aminoasitler biyolojik olarak aktif maddelerdir ve bunlardan bazıları insan yaşamı için esansiyeldir (Khan ve Faiz, 2008). Çizelge 2. 1’ de esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler gösterilmiştir.

Çizelge 2. 1. Esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler

Esansiyel olan amino asitler	Esansiyel olmayan amino asitler
Arjinin	Alanin
Histidin	Asparajin
İzolösin	Aspartat
Lösin	Sistein
Lizin	Glutamat
Metiyonin	Glutamin
Fenilalanin	Glisin
Treonin	Hidroksiprolin
Triptofan	Hidroksilizin
Valin	Prolin
	Serin
	Tirozin

Biyoteknolojideki son gelişmelerle birlikte, kimyasal yapılarına ilişkin analizler amino asitlerin fonksiyonlarının öneminin giderek artmasına neden olmuştur (Chen ve ark, 2003).

Proteinler asit ve alkalilerle ya da enzimlerle hidroliz edilirse amino asitlere parçalanmış olurlar. Amino asitlerin genel yapıları Şekil 2. 1.’ de görüldüğü gibidir.



Şekil 2. 1. α- amino asitlerin genel formülleri

Doğal olarak proteinler içinde bulunan amino asitler, α-amino asitler olarak adlandırılırlar. Bilindiği üzere α karbon atomu karboksil (–COOH) grubundan sonra gelen ilk karbon atomudur. α-aminoasitler, α-karbon atomuna bir amino grubu (–NH₂), bir karboksil grubu (–COOH), bir hidrojen atomu (–H) ve bir yan grubun (–R) bağlanmasıyla meydana gelirler. Buradaki R organik kimyadaki alkil grubu anlamında olmayıp, α atomuna bağlı herhangi bir gruptur (Bingöl, 1974; Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

2.2. Amino Asitlerin R Gruplarına Göre Sınıflandırılması

Amino asitler R gruplarının niteliklerine göre, özellikle polariteleri veya biyolojik pH’da (yaklaşık pH: 7.0) suyla tepkimeye girme isteklerine göre beş ana grupta sınıflandırılabilir. R gruplarının polaritesi, bütünüyle polar olmayan ya da hidrofobiklikten, yüksek miktarda polar ya da hidrofiliğe kadar çok çeşitlidir (Nelson ve Cox, 2005).

2.2.1. Polar Olmayan, Alifatik R Gruplarına Sahip Amino Asitler

Bu gruba ait amino asitlerin R grupları polar değildir ve hidrofobiktir. Glisin, Alanin, Valin, Lösin, Metiyonin, İzölösin bu gruba dahil amino asitlerdir. Proteinlerde

alanin, valin, lösin ve izolösinin yan grupları bir araya gelerek hidrofobik etkileşimlerle protein yapısını sabitler. Glisin, en basit yapıya sahip olanıdır, resmen polar olmamasına karşın, çok küçük yan zinciri hidrofobik reaksiyonlara gerçek anlamda katılmaz. Sülfür ihtiva eden iki amino asitten biri olan metiyonin ise yan zincirinde polar olmayan tiyo eter grubu içerir (Nelson ve Cox, 2005).

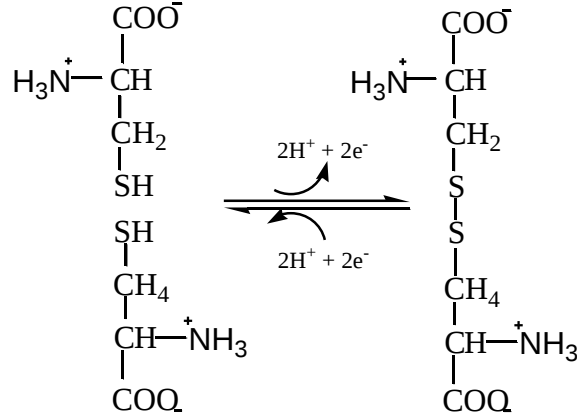
2.2.2. Aromatik R Gruplarına Sahip Olan Amino Asitler

Aromatik yan zincirlere sahip olan fenilalanin, tirozin ve triptofan göreceli polar olmayanlardır. Tümü hidrofobik etkileşimlere katılabilir. Tirozinin hidroksil grubu hidrojen bağı yapabilir ve bu bazı özel enzimler için önemli bir işlevsel gruptur. Triptofan da indol halkasındaki azottan ötürü, fenilalanine göre daha polardır (Nelson ve Cox, 2005).

2.2.3. Polar, Yüksüz R Gruplarına Sahip Olan Amino Asitler

Bu gruba ait amino asitler polar olmayan amino asitlere göre nispeten suda daha çözünebilir ve daha hidrofiliktir, bunun nedeni sahip oldukları grupların suyla hidrojen bağı yapmasıdır. Bu gruba dahil amino asitler serin, treonin, sistein, prolin, asparajin ve glutamin'dir.

Serin ve Treonin hidroksil gruplarıyla, sistein sülfidril grubuyla, asparajin ve glutamin ise amit gruplarıyla polariteye katkı yaparlar. Prolin ise farklı bir halka yapısı ihtiva eder ve sınırlı polardır. Asparajin ve glutamin, proteinlerde bulunan diğer amino asitlerden aspartat ve glutamatların amitleridir, bu yüzden asit ve bazlarla kolayca hidrolizlenip bu amino asitlere dönüştürebilir. Sistein ise kolaylıkla dimerik amino asit olan sistine oksitlenir. Sistin iki sistein molekülünün disülfid bağıyla bağlanmış hali Şekil 2. 2' de verilmiştir.



Şekil 2. 2. İki molekül sisteinin oksidasyonla geri dönüşümlü disülfid bağı oluşturma (Nelson ve Cox, 2005).

Disülfid bağları protein molekülünün bölümleri arasında veya farklı protein zincirleri arasında kovalent bağ yaparak birçok proteinin yapısı için son derece önemli rol oynar (Nelson ve Cox, 2005).

Prolinin ise yan zinciri ve α -amino grubu birleşerek halkalı bir yapı meydana gelir ve bu nedenle prolin diğer amino asitlerden farklı olarak amino grubu yerine imino grubuna sahiptir (Champe ve ark., 2007).

2.2.4. Pozitif yüklü R Gruplarına Sahip Amino Asitler

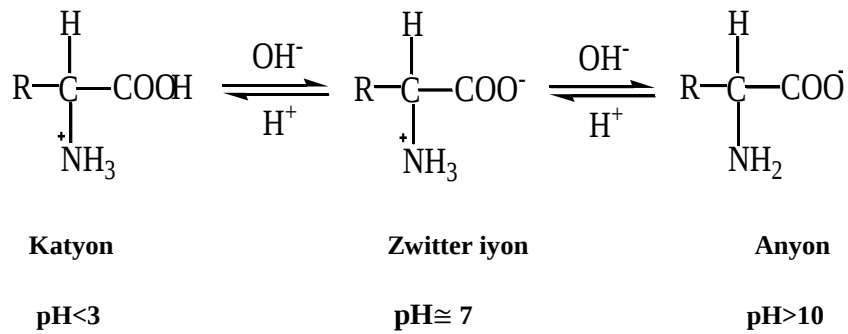
Bu grup amino asitlerin suda çözünebilen R gruplarının çoğu pozitif veya negatif yüklüdür ve yan zincirleri proton alıcısıdır, fizyolojik pH'da lizin ve arjinin'in yan zincirleri tamamen iyonize olarak pozitif yüklenirler. Bunun aksine, histidin zayıf bazıktır ve fizyolojik pH'da büyük ölçüde yüksüzdür. Histidin nötrale yakın pK_a değerine sahip tek amino asittir ve birçok enzim katalizli tepkimede proton alıcısı/vericisi olarak tepkimeyi kolaylaştırır (Nelson ve Cox, 2005; Champe ve ark., 2007).

2.2.5. Negatif Yüklü R Gruplarına Sahip Amino Asitler

Aspartat ve glutamat pH 7.0'de negatif yüke sahip R grubu içeren iki amino asittir (Lehninger). Fizyolojik pH'da negatif yüklü olduklarından dolayı asit isimlerinden çok tuz isimleriyle anılırlar: Aspartat ve glutamat gibi (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

2.3. Amino Asitlerin Asitlik ve Bazlık Özellikleri

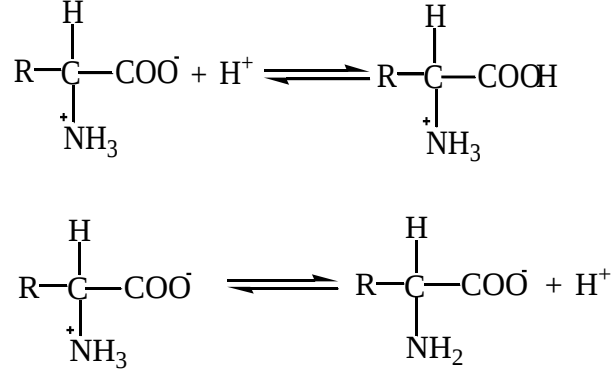
Kristal fazdaki amino asitlerin erime noktaları 200 °C ve daha fazladır. Sudaki çözünürlükleri, polarlığı daha düşük çözücülere göre nispeten daha fazladır. Bu özelliklerde amino asitlerin nötral sulu çözeltilerde dipolar iyonlar halinde, yani, zwitter iyon şeklinde kristallendiğini gösterir. Nötrallığe yakın çözeltilerde dipolar halinde olan amino asitlerin, düşük pH'larda katyon, yüksek pH'larda anyon şeklinde görülür. Herhangi bir amino asidin, pH'nın bir fonksiyonu olarak iyonlaşması Şekil 2. 3' de gösterilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).



Şekil 2. 3. Herhangi bir amino asidin pH'a bağlı iyonlaşması

Şekil 2. 3' de görüldüğü gibi bir amino asit, R grubundaki iyonlaşabilen kısımları dikkate alınmadan, iki proton yüklenebilir ve bunları iki eşdeğer bazla titre

edildiği zaman tamamen verebilir. Artan pH'ya göre bir amino asidin protonlarına ayrışma denge reaksiyonları Şekil 2. 4' de verilmiştir.



Şekil 2. 4. Bir amino asidin artan pH' ya göre ayrışma denge reaksiyonu

2.4. Amino Asitlerin Optik Özellikleri

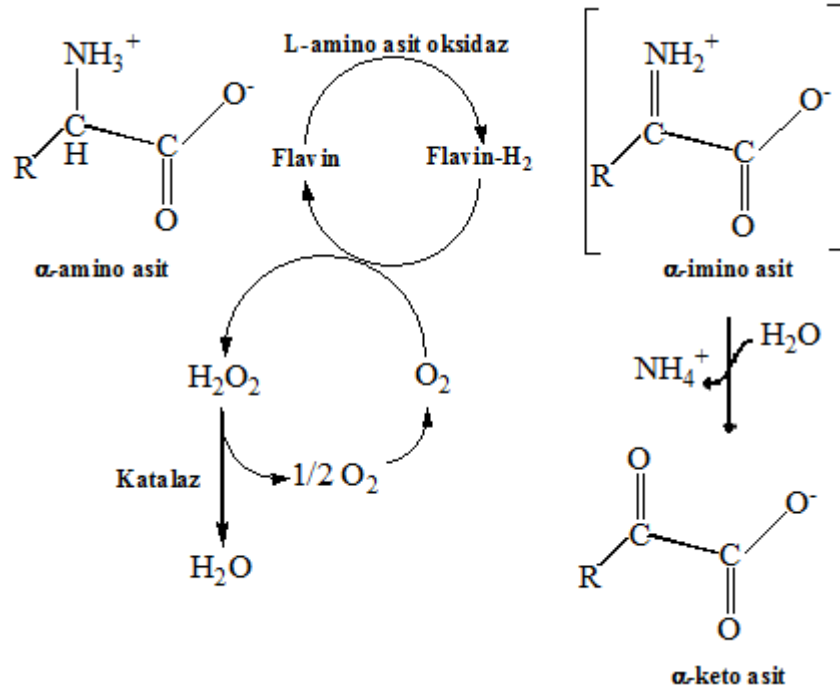
Her amino asidin alfa-karbonu dört farklı kimyasal gruba bağlıdır ve dolayısıyla kiral veya optikçe aktif karbon atomu olarak tanımlanır. Fakat glisin bir istisnadır, çünkü glisinin α karbonu iki hidrojenle kimyasal bağ yapmaktadır. α -karbonunda bir asimetrik merkeze sahip olan amino asitler D ve L olarak adlandırılan birbirinin ayna görüntüsü olan iki formdadır.

Her bir çiftteki formlar stereoizomerler, optik izomerler veya enantiyomerler olarak adlandırılırlar. Proteinlerde bulunan bütün amino asitler L konfigürasyonuna sahiptir. Fakat, bazı antibiyotiklerde ve bakteri hücre duvarında D-aminoasitler yer alabilirler (Champe ve ark., 2007).

2.5. L-Amino Asit Oksidaz

Fizyolojik rolü kesin olmamasına rağmen böbrek ve karaciğerdeki L-amino asit oksidazlar α -amino asitleri katalizleyerek α -ketoasit ve amonyum iyonuna dönüştürür

(Şekil 2. 5). İndirgenmiş flavin ise moleküler oksijen tarafından tekrar okside edilerek hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturulur. Daha sonra hidrojen peroksit (H_2O_2) katalizlenerek su (H_2O) ve moleküler oksijene (O_2) ayrışır (Murray ve ark., 2003).



Şekil 2. 5. L-amino asit oksidaz tarafından katalizlenen oksidatif deaminasyon

2. 6. Biyosensörler

Tüm canlılar yaşadıkları çevrede meydana gelen değişimleri algılayıp yaşamlarını devam ettirebilmek için değişimlere ayak uydurmalıdırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin *in vitro* (hücre dışı) kullanımı için temel oluşturmuştur.

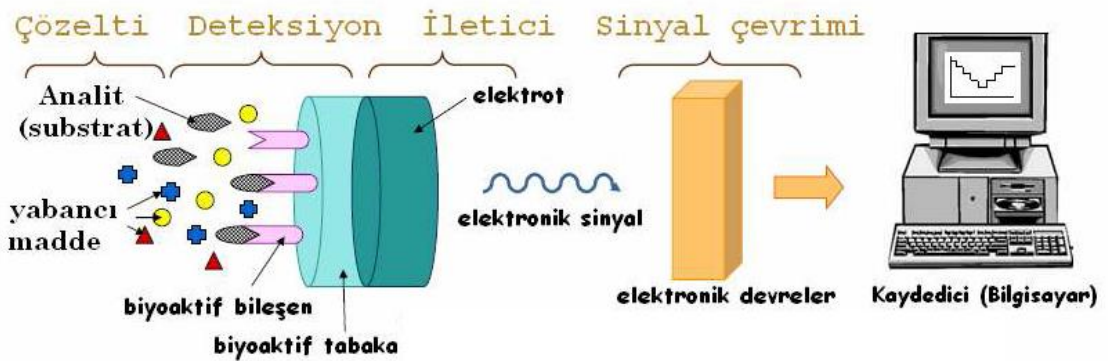
Canlılar, teknologların hayal bile edemeyeceği duyarlılık performansı gösterirler. Örneğin; köpeklerde koku alma hassasiyeti insanlardan 100.000 kat daha fazladır. Yılan balıkları tonlarca su içerisine eklenen birkaç damla yabancı maddeyi hemen algırlar. Kelebekler partnerlerinin yaydığı birkaç molekülü bile hissederler.

Canlılara bu uyarıları algılama imkanı veren biyolojik maddelerin analiz sistemler ile komplike edilmesiyle biyosensörler meydana gelmiştir.

Biyosensörlerin tarihi Clark'ın Cincinnati Hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kandaki O₂ miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons'un Glukozoksidad (GOD) enzimini O₂ elektronu ile birleştirerek kandaki glikoz miktarını ölçmeyi başardılar. Böylece yeni bir analitik sistem meydana geldi ve bu sistem bir yandan biyolojik kısmın yüksek spesifikliğini (enzim) diğer yandan fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı yaratmıştır. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları ölçen sensörler şimdi ise biyomateriyalin de katılması ile birçok maddenin tayinini mümkün kılmıştır (Telefoncu, 1999).

2. 7. Biyosensörlerin Yapısı ve İşlevi

Biyosensörler biyokomponentler (reseptör) ile fiziksel bileşenlerden (transducer) meydana gelirler. Biyosensörün görevi biyolojik bir reaksiyonun elektriksel sinyale dönüştürülmesidir. Şekil 2. 6' da bir biyosensörün çalışma prensibi verilmiştir (Telefoncu, 1999).



Şekil 2. 6. Temel biyosensör ve çalışma prensibi (Işıldak ve Işıldak, 2013)

2. 7. 1. Biyokomponentler

Doğadaki bütün canlıların, ister prokaryotik olsun ister ökaryotik olsunlar, ortak özellikleri canlı moleküller olan biyomoleküller ihtiva etmeleridir. Canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri bu biyomoleküllerin hücre, hücre organelleri, dokular ve organlardaki yapıcı ve yıkıcı reaksiyonları gerçekleştirmelerine bağlıdır. Bu da biyosensörlerin biyo- kısmında kullanılmalarını sağlar. Sensör kısım ise biyo- kısımdaki meydana gelen metabolik değişiklikleri optik, elektriksel ve kalorimetrik olarak algılanıp cevap verildiği yerdir. Biyosensörlerin yapısında yer alan bu biyokomponentler; enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar, nükleik asitler vb. çoğu kez biyoreseptör diye adlandırılırlar. Bunların içerisinde en yaygın kullanılanlar enzimler ve antikorlardır (Telefoncu, 1999; Enginün, 1999).

Biyoreseptörler analiz edilecek maddeyi dönüşüme uğratırlar ve bu dönüşüm sonucu oluşan değişiklikler transduser tarafından algılanır. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyokomponentlerdir. Uygun enzim bulunamaması, enzimin kararsız olması veya birden fazla madde tayin edilecekse tercihen hücre sistemleri veya mikroorganizmalar kullanılır. Mikroorganizmalar değişik reseptör tepkileri verirler ve biyolojik oksijen gereksinimi (BOD), toksisite ve mutajenite testlerinde başarıyla kullanılırlar. Enzimler ve hücreler küçük moleküllü maddelerin, antikorlar ve nükleik asitler ise makro moleküllerin ve patojenik mikroorganizmaların tayininde kullanılan biyoreseptörlerdir (Telefoncu, 1999).

2. 7. 2. Tranduserler

Tranduserler, reseptörlerde meydana gelen biyolojik reaksiyonu ölçülebilir bir elektrik sinyaline dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyonun türüne göre uygun tranduser seçilir. Elektrotlar potansiyometrik veya amperometrik ölçümlerde kullanılır ve burda

hedef maddedir (O_2^- elektrodunda çözülmüş O_2 , pH elektrodunda H^+ iyonu değişimi gibi). Optik sensörlerde amaç; ışık, piezoelektriksensörlerde ise amaç kristalin salınım rezonansının kütle yüklenimi sebebiyle değişmesidir. Bunların yanı sıra transistörler ve veterinerler de transduser olarak kullanılmaktadır (Telefoncu, 1999).

2. 8. Biyosensörlerin Kullanım Alanları

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrol, durum tespiti ve enerji muhafazasında son derece önemli rol oynarlar. Bugüne kadar 180'den fazla farklı madde için biyosensör üretilmiş ancak bunların sadece 25 kadarı ticari olarak başarı sağlamıştır. Biyosensörlerin kullanım alanları Çizelge 2. 2' de verilmiştir (Telefoncu, 1999).

Çizelge 2. 2. Biyosensörlerin kullanım alanları

Klinik diyagnostik, biyomedikal sektör
Proses kontrol
Biyoreaktör kontrolü
Gıda üretim ve Analizi
Tarla tarımı, bağ bahçe tarımı ve veterinerlik
Bakteriyel ve viral diyagnostik
İlaç analizi
Endüstriyel atık kontrolü
Çevre koruma ve kirlilik kontrolü
Maden işletmelerinde toksik gaz analizi
Askeri uygulamalar

Biyosensörler: gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler, bazı anorganik maddelerin yanı sıra enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar. Bunların dışında BOD, toksisite ve mutajenite testlerinde de kullanılırlar. Biyosensörler ve kapsadıkları analiz alanları Çizelge 2. 3’ de verilmiştir (Telefoncu, 1999).

Çizelge 2. 3. Biyosensörlerin grupları ve kapsadıkları analiz alanları (Telefoncu, 1999)

Biyosensör Grubu	Kapsadığı Analiz Alanı
Enzim sensörleri	Küçük molekülü organik ve anorganik maddeler (Metabolitler, ilaçlar, gıda maddeleri, vitaminler, antibiyotikler, pestisitler vb.)
Mikrobiyalsensörler	Enzim sensörlerin kapsadığı alanlar + BOD, Toksisite, Mutajenite
DNA- sensörleri	Virüsler, patojen mikroorganizmalar
İmmunosensörleri	Virüsler, patojen mikroorganizmalar + Ksenobiyotikler

Biyosensörlerin en çok kullanıldığı alan biyomedikal sektördür. Bu alanda ilk kullanılan biyosensörler enzim sensörleridir. Ticari amaç için dizayn edilen ilk biyosensör ise şeker hastalığı tanısı ve idrardaki glukoz miktarını ölçmeyi mümkün kılan glukoz oksidaz sensörüdür. Bunu renal fonksiyon testleri için üretilen üre ve kreatinin sensörleri ile kas gücünü ölçmeye yönelik laktat sensörü izlemiştir. İnsan vücuduna yerleştirilebilen biyosensörler de tasarlanmış olup biyolojik sıvılar vücut dışına alınmadan ve tüketilmeden önce analiz imkanı sağlarlar ve bu da özellikle ameliyat sırasında bu tip bilgilerin kesintisiz olarak sağlanması açısından çok önemlidir. Biyosensörlerin, ilaçların vücuttaki düzeyinin ayarlanması ve kontrolünde kullanılması önümüzdeki günlerde gerçekleştirilebilecektir.

Son yıllarda analizörlere monte edilen enzim sensörleri yoğun bakım ünitelerinde sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Biyosensörlerin gelecekteki önemli

uygulamalarından biri de süper oksit ve nitrik asit gibi kısa ömürlü ve hormonlar ve nöro transmitterler gibi düşük derişimli maddelerin *in vivo* tayinini sağlayacak olmasıdır.

Biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde başta glikoz gelmek üzere birçok maddenin: monosakkarit, amino asitler, organik asitler, üre ve alkol tayinlerinde enzim sensörleri kullanılmaktadır. Ayrıca gıdalardaki yabancı maddeler (pestisitler, toksinler ve yabancı hormonlar vb.) yanında aroma ve tazelik gibi parametreler için biyosensörler kullanılmaktadır.

İlaçların kötü amaçla kullanımı ve uyuşturucu ile mücadelede, uyuşturucu arayan köpeklerin yerini biyosensörler alabilecektir ve böylece karakollarda ve gümrükte zaman kazanılacaktır. Bunun yanı sıra; toprak, hava ve su kirliliğinin mikrobiyalsensörler ve enzim sensörleri sıklıkla kullanılmaktadır (Telefoncu, 1999).

2. 9. Biyoreseptörlerin İmmobilizasyonu

Daha öncede bahsedildiği gibi, biyosensörler farklı özellikteki iki ayrı elemanın transduser ve biyoreseptörün kombinasyonu ile meydana gelirler. Uygun biyoreseptör ve transduser bulunduktan sonra sıra bu iki elemanın birbirine en uygun şekilde bağlanmasına gelir. Bu bağlama işlemine biyoreseptör imibilizasyonu denir. Bağlama işleminde çok çeşitli yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen transduser ve biyoreseptörün özelliğine göre değişir.

İmmobilizasyon biyoreseptörün stabilizasyonu, verimliliği ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. Biyosensör imibilizasyonunda başlıca beş yöntem vardır;

1) Kovalent Bağlama: Biyoreseptörün transduser yüzeyine kimyasal reaksiyonlarla kovalent olarak bağlanmasıdır.

2) Tutuklama: Biyoreseptörün bir membran veya matriks (tabaka) içerisinde hapsedilerek immobilizasyonudur.

3) apraz Bağlama: Tutuklama yöntemi ile kimyasal bağlanmanın komplike edilmesidir. Tutuklanmış biyoreseptör glutaraldehit gibi reaktiflerle film veya tabakaya kovalent olarak bağlanır.

4) Adsorpsiyon: Biyoreseptörün hidrofobik, hidrofilik ve/veya iyonik etkileşim sonucu film veya tabaka ile assosiyasyonudur.

5) Biyolojik Bağlama: Biyoreseptörün film ve tabakaya spesifik biyokimyasal reaksiyon ile bağlanmasıdır.

Biyoreseptörlerin kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna göre uygun immobilizasyon yöntemi seçilir. Enzimler için uygulanan tüm immobilizasyon yöntemleri diğer protein yapısındaki biyoreseptreler için de uygulanabilir. İmmobilizasyon şekillerine göre biyosensörlerin ortalama ömürleri aşağıda verilmiştir (Telefoncu, 1999).

Adsorpsiyon: 1 gün,

Membranda tutuklama: 1 hafta

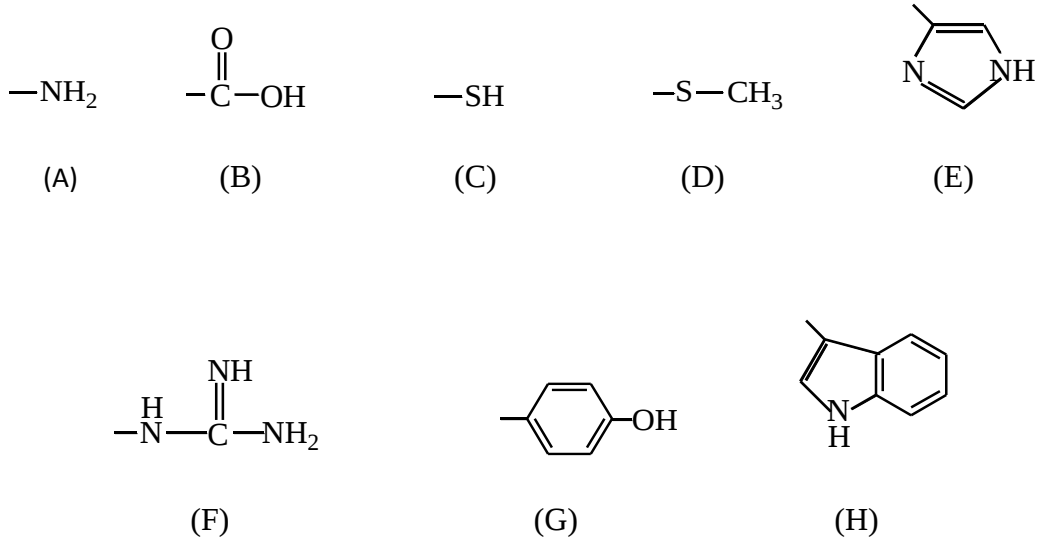
Fiziksel tutuklama: 3-4 hafta,

Kovalent bağlama: 4-14 ay

2. 9. 1. Kovalent Bağlama

Enzimler doğrudan transdusere ya da daha önceden bir film veya tabakayla kaplanmış transdusere kovalent olarak bağlanabilirler. Enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilecek faktör, bağlanmanın enzim aktivitesi için gerekli olan amino asitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların bağlanma esnasında sterik olarak rahatsız edilmemesidir. Kovalent bağlama enzim molekülünün fonksiyonel grupları tarafından gerçekleştirilir (izelge 2. 4).

Çizelge 2. 4. Enzimlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonda bağ oluşumuna katılan amino asit reaktif grupları (Taylor, 1991; Telefoncu, 1997; Telefoncu, 1999)



(A) : N-terminalamino asitlerin amino gurubu ve lizinin α - amino grubu,

(B): C-terminalamino asitlerin ve aspartik asit, glutamik asidin serbest karboksik grupları,

(C): Sistein sülfhidril grubu,

(D): Metiyoninin tiyoeter grubu,

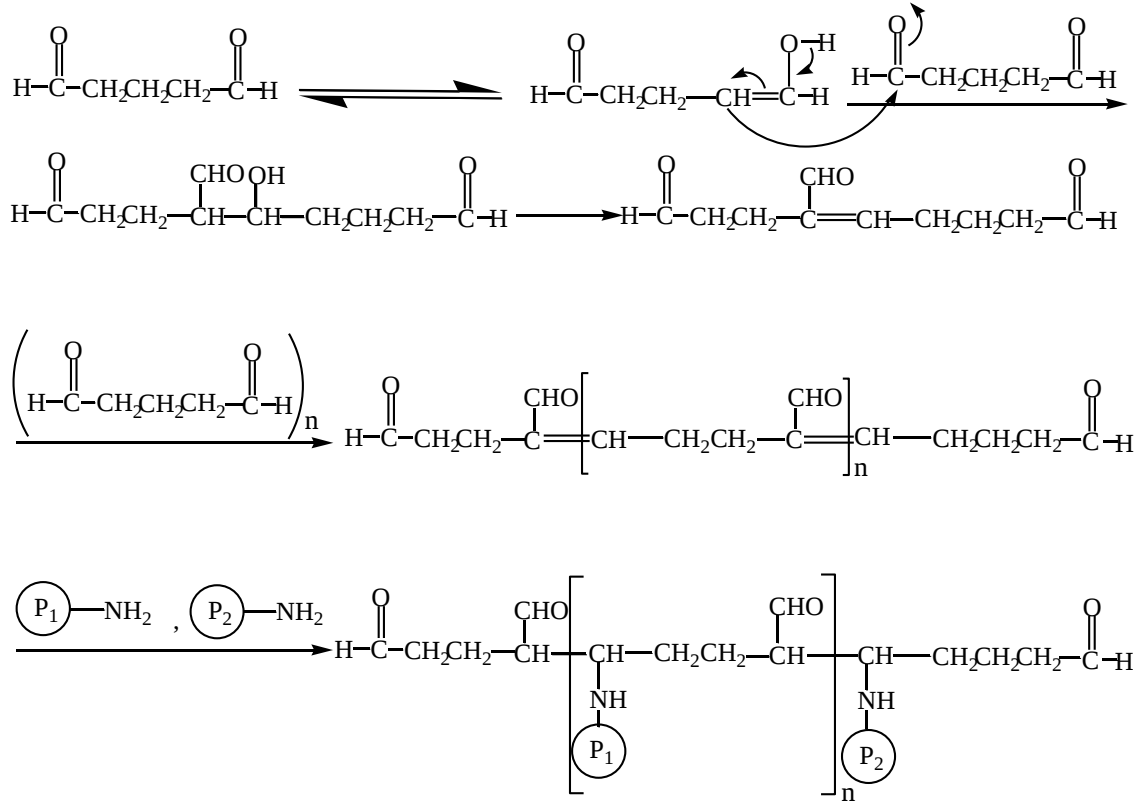
(E): Histidin imidazol grubu,

(F): Argininin guanidinil grubu,

(G): Tirozinin hidroksil grubu,

(H): Triptofanın indonil grubu.

Enzim immobilizasyonu çok yumuşak şartlarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) yapılmalıdır. Aşağıda glutaraldehitin immobilizasyon reaksiyonu verilmiştir (Şekil 2. 7).



P₁, P₂ : Prostetik gruplar

Şekil 2. 7. Enzimin (biyoreseptör) glutaraldehit ile çapraz bağlanması (Tran-Minh ve ark, 1975; Telefoncu, 1999)

Biyoreseptörlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonu biyosensöre pH, iyon şiddeti ve sıcaklık gibi parametrelere karşı yüksek bir mukavemet sağlamasının yanı sıra birçok kez kullanılmasına olanak sağlar (Taylor, 1991; Telefoncu, 1997; Telefoncu, 1999).

2. 9. 2. Tutuklama

Enzimler makromoleküler yapılar olduğu için polimer jel matrislerde ve daha basit olarak diyaliz membranlarında tutuklanabilirler. Bu yöntem aynı zamanda organeller, hücreler ve antikorlar içinde geçerlidir. Updike ve Hicks tarafından yapılan

ilk enzim elektrodunda glukoz oksidaz (GOD) poliakrillamid jelinde tutuklamıştı (Updike ve Hicks, 1967; Telefoncu, 1999). Guilbault ve arkadaşlarının tasarladığı üreaz elektrodunda ise üre süspansiyonu elektrot yüzeyinde diyaliz membranı tarafında çevrelenerek tutuklanmıştır (Guilbault ve Kauffman, 1987; Telefoncu, 1999). Çözeltide enzim aktivitesi hızla azaldığından dolayı fiziksel tutuklama yerine kovalent bağlama daha çok tercih edilir. Tutuklama için en fazla kullanılan film veya matriksler nişasta, poliakrilamid, silikon lastiği, polivinil klorür ve polivinil alkoldür (Telefoncu, 1999).

2. 9. 3. Adsorpsiyon

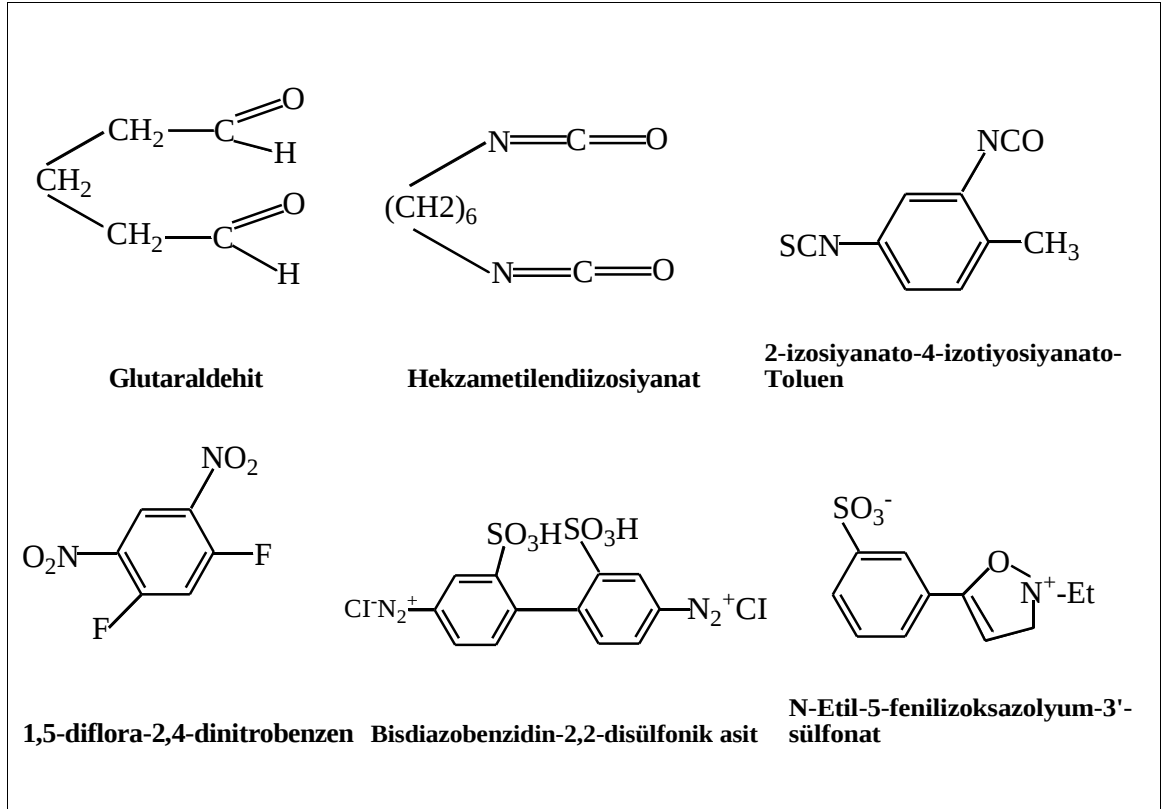
İmmobilizasyonda en eski yöntemdir ve en basit olanıdır. Örneğin; glukoz biyosensörü için 1962 yılında glukoz oksidaz absorplanmış polietilen membranı önerilmiştir (Clark ve Lyons, 1962; Telefoncu, 1999). Genelde enzim veya biyoreseptör çözeltisine yüzeyi membran veya film ile kaplanmış transduser daldırılır ve bir süre beklenir. Enzimin karakterine göre membran veya film hidrofilik veya hidrofobik yapıda seçilir. Enzimler için daha çok hidrofilik membranlar kullanılır. En yaygın kullanılan adsorbanlar; selülöz asetat membranları, polistiren, polivinil klorür ve silikadır (Telefoncu, 1999).

Sorpsiyon tersinir bir olay olduğu için immobilizasyonda adsorpsiyon yöntemini kullanmak pek güvenilir değildir ama buna rağmen biyosensörlerde başarılı uygulamaları vardır (Deng ve Enken, 1980; Aizawa ve ark, 1994; Telefoncu, 1999).

2. 9. 4. Çapraz Bağlama

Bu yöntem daha çok tutuklama ve kovalent bağlama metotlarının birleşiminden oluşur. Çapraz bağlayıcı olarak sık kullanılan reaktifler şunlardır: glutaraldehit, heksametilen diizosiyanat, difloro dinitrobenzen, bismaleimidohekzan, disüknilsüberat. Bifonksiyonel reaktifler enzimlerin yanı sıra organeller, hücreler ve antijenlerin

immobilizasyonunda da uygulanır (Telefoncu, 1999). Bazı çapraz bağlayıcı reaktiflerin kimyasal yapıları Şekil 2. 8 'de verilmiştir.



Şekil 2. 8. Bazı çapraz bağlayıcıların kimyasal formülü

Glutaraldehit en sık kullanılan çapraz bağlayıcıdır. Ortamdaki derişimi %2-5(w/w) olmalıdır (Watonabe, 1983; Tamiya, 1990; Dinçkaya ve ark, 1999; Telefoncu ve ark, 1999).

2. 10. Transduser Yüzeyinin Kaplanması

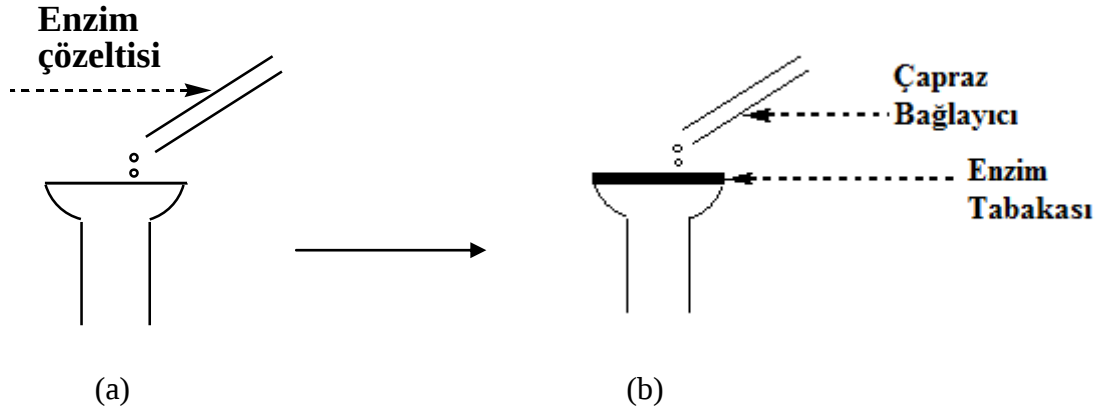
Bu işlem iki değişik şekilde uygulanabilir; ya polimerizasyon doğrudan transduser yüzeyinde gerçekleştirilerek bir film elde edilir ya da önceden polimer ile transduser yüzeyi kaplanır.

2. 10. 1. Daldırma Yöntemi

Elektrot önce enzim ve reaktif polimeri veya enzim, inert bir protein ve çapraz bağlayıcı içeren bir karışıma daldırılır. Daha sonra elektrot kendi eksenine etrafında homojen bir enzim tabakası olacak şekilde döndürülür. Elektrot üzerinde oluşan tabaka bir O-ring ile tutturulur. En son elektrot nötralleştirmek için glisin çözeltisine daldırılır ve fazla çapraz bağlayıcı uzaklaştırılır. Yöntem çok basit ve özellikle küçük transduserler için çok uygundur (Chan, 1993; Telefoncu, 1999).

2. 10. 2. Direk Bağlama Yöntemi

Daldırma yönteminde enzim ve transduser yüzeyinde tabaka oluşturacak maddenin bir çözeltisi hazırlanmaktadır. Ancak kullanılacak enzim çok pahalı ise bu durumda önce daldırma yöntemi ile transduser yüzeyinde bir membran oluşturulur ve sonra yaklaşık 10 µL enzim çözeltisi bir kapiler yardımı ile ince bir tabaka oluşturacak şekilde damlatılır (Şekil 2. 9 (a)). Daha sonra aynı şekilde çapraz bağlayıcı ilave edilir (Şekil 2. 9 (b)) (Beaux ve Tran-Minh, 1979; Telefoncu, 1999).



Şekil 2. 9. Direkt bağlama yöntemi ile enzim immobilizasyonu (Chan, 1993; Telefoncu, 1999)

2. 10. 3. Membran Kullanımı

Bu yöntemde ilk önce immobilize edilmiş enzim içeren membran hazırlanır ve bu membran transduser yüzeyi ile kaplanır. Böylece aynı özellikteki membrandan çok sayıda hazırlanabilir ve bu membranlar biyosensör fabrikasyonu için son derece uygundur (Mascini ve ark, 1989; Tran-Minh ve Kumaran, 1990; Telefoncu, 1999).

2. 11. Potansiyometrik Sensörler

Bir karşılaştırma elektrodu ile çalışma elektrodundan meydana getirilen bir elektrokimyasal hücrede ölçülen potansiyel değerleri yardımı ile hücre çözeltisindeki türlerin nicel analizine potansiyometri denir. Çalışma elektrodu, çözeltideki türlerden bazılarına seçimlilik gösteren iç kısmındaki bir başka karşılaştırma elektrodu ile nicel analizi yapılmak istenen türün belli derişimdeki çözeltisi bulunan ve bir membran ile analizi yapılacak çözeltiden ayrılmış elektrottur. Analizi yapılacak çözeltiye daldırılan bu elektrot ile aynı çözeltiyle temasta olan karşılaştırma elektrodu arasında oluşan bir potansiyel vardır ve bu gerilim ile analizi yapılan türün derişimi arasında logaritmik bir

ilişki vardır. Bu hücre geriliminin ölçümü esnasında iki elektrot arasında uygun bir devre yardımıyla bir akımın geçmemesi sağlanır. İçte ve dışta bulunan çözeltiler arasında analizi yapılacak tür arasında bir fark varsa membranın iç yüzeyi ve dış yüzeyi arasında bir gerilim farkı oluşur. Bu gerilimin farkının değeri analitin türüne ve derişimine bağlı olduğu gibi, membranın cinsine ve çözeltide bulunan diğer bileşenlerinin türüne ve miktarına da bağlıdır. İyon seçici elektrotlar olarak adlandırılan bu elektrotların en çok bilineni H^+ iyonlarına karşı seçimlilik gösteren ince bir cam zarın membran olarak kullanıldığı cam elektrottur. Bir iyon seçici elektrotla ölçülen gerilim değeri, elektrodun seçicilik gösterdiği türe ek olarak çözeltide bulunan öteki türlerden etkilenir. Bu etki,

$$E = \text{sabit} + \frac{0,059}{n} \log(c_i + \sum k_{ij} C_J)$$

Eşitliği ile gösterilir. Bu eşitlikte k_{ij} sabiti, elektrodun i iyonunu j iyonuna göre ne kadar bir seçicilikle ölçtüğünü gösteren seçimlilik katsayısıdır.

İyon seçici elektrot membranı, içinde belli bir tepkimeyi katalizleyen bir enzim tutan ikinci bir membran ile kaplanırsa, elektrodun seçiciliğine enzim seçiciliği de eklenmiş olur. Örneğin NH_4^+ iyonu için seçimlilik gösteren bir cam elektrodun cam membranı, içinde için de üreaz enziminin hapsedildiği poliakrilamid membranı ile kaplanırsa bu elektrot sisteminin daldırıldığı bir çözeltide,



Tepkimesine göre meydana gelen NH_4^+ iyonu iki membran arasındaki çözeltiye geçerek NH_4^+ elektrodu ile üre miktarının ölçülmesine olanak sağlar. Bu tür elektrotlar potansiyometrik biyosensör olarak da bilinir. Çeşitli enzimlerin katalizör olarak

kullanıldığı potansiyometrik biyosensör örnekleri Çizelge 2. 5 'de verilmiştir. Potansiyometrik sensörlerin duyarlı, kararlı, uzun ömürlü ve hızlı cevap üretmesi istenir (Yıldız, 1999; Telefoncu, 1999).

Çizelge 2. 5. Çeşitli enzimlerin kullanıldığı potansiyometrik sensör örnekleri (Yıldız, 1999; Telefoncu, 1999)

Enzim	Substrat (Tayin edilen madde)	Kullanılan elektrot
Peroksidaz	H ₂ O ₂	I ⁻ elektodu
Ürikaz	Ürik asit	I ⁻ elektodu
L-aminoasit oksidaz	L-amino asitler	NH ₄ ⁺ elektrodu
Arjinaz/ üreaz	L-arjinin	NH ₄ ⁺ elektrodu
β-glukosidaz	Amigdalın	CN ⁻ elektrodu
D-kimotripsin	Difenilkarbamilflorür	F ⁻ elektrodu
Asetilkolinesteraz	Asetilkolin	H ⁺ elektrodu
Glikozoksidaz	Glikoz	H ⁺ elektrodu
Penilisiaz	Penisilin	H ⁺ elektrodu
Aldehit dehidrojenaz	Asetilaldehit	H ⁺ elektrodu
Okzalatdekarboksilaz	Okzalat	CO ₂ elektrodu
L-tirozindekarboksilaz	L-tirozin	CO ₂ elektrodu
Fenilalaninamonyakliiaz	L-fenilalanin	NH ₃ elektrodu
Üreaz	Üre	NH ₄ , NH ₃ , CO ₂ veya H ⁺ elektrodu
Tavşan karaciğeri dokusu	Guanin	NH ₃ elektrodu
<i>Escherichiacoli</i> bakterisi	L-glutamik asit	CO ₂ elektrodu

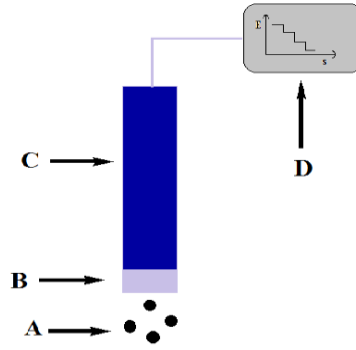
2. 12. Enzim Sensörleri

Biyosensör teknolojiinin tarihine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleriyle başladığı görülür. 1962'de Clark ve Lyons, 1967'de ise Updike ve Hick tarafından geliştirilen glikoz tayinine yönelik glikozoksidaz enzim elektrotları bu

konudaki ilk örneklerdir (Clark ve Lyons, 1962; Updike ve Hicks, 1967; Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999).

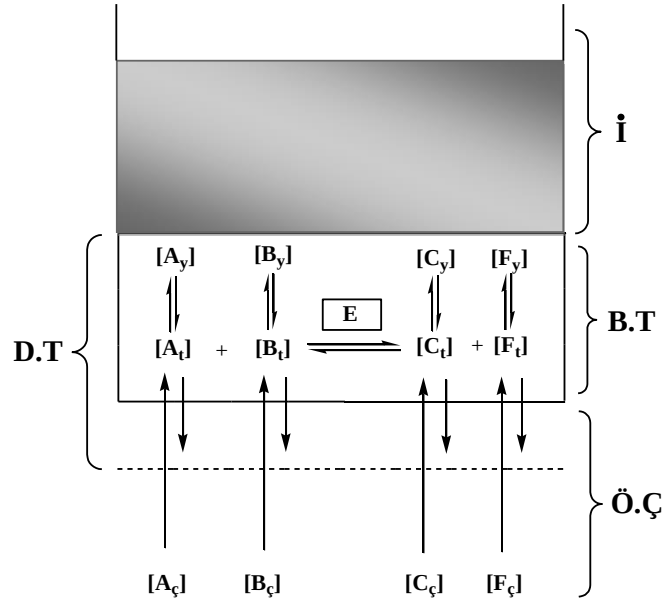
2. 12. 1. Genel Çalışma İlkesi

En genel anlamda bakıldığında enzim sensörleri diğer biyosensörlerle benzer olarak bir biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm sisteminden oluşur. Diğer biyosensörlerden tek farkı biyoaktif tabakada enzimlerin yer almasıdır. Bunun dışında diğer biyosensörlerde olduğu gibi biyoaktif tabakanın iç ve dış yüzeyinde membranlar, iletici ve ölçüm düzeneği arasında sinyal yükselticileri mikro işlemciler veya ölçüm düzeneğiyle bağlantılı kaydedici veya bilgisayar donanımları gereksinimlere göre eklenen bileşenlerdir (Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999). Bir enzim sensörünün genel şematik görünümü Şekil 2. 10' da verilmiştir.



Şekil 2. 10. Bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi (A: Analizlenecek madde, B: İmmobilize enzim tabakası, C: İletici, D: Ölçüm Sistemi) (Telefoncu, 1999; Dinçkaya, 1999; Turna, 2006)

Bir enzim sensörünün çalışma ilkesini daha yakından anlamak için enzim veya enzimlerin immobilize edildiği biyoaktif tabakadaki olayların incelenmesi gerekir. Şekil 2. 11' de biyoaktif tabakada gerçekleşen olaylar açısından bir enzim sensörünün genel çalışma ilkesi özetlenmiştir.



Şekil 2. 11. Enzim sensörünün genel çalışma ilkesi (A: Substrat, B: Kosubstrat veya Koenzim, C ve F: Ürünler, ç: Ölçüm çözeltisi içindeki, t: biyoaktif tabaka, ve y: elektrot yüzeyindeki konsantrasyonlar; D.T: Difüzyon tabakası, Ö.Ç: Ölçüm çözeltisi, B.T: Biyoaktif tabaka, İ: İletici) (Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999)

Şekil 2. 11' den görüldüğü gibi bir enzim sensöründe enzimin olduğu biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği reaksiyonla uyumlu bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir iletilici ile birleştirilmektedir. İletim sistemi biyoaktif tabakada meydana gelen enzimatik reaksiyonlar sonucu substrat, koenzim konsantrasyonundaki azalış ya da ürün konsantrasyonundaki artışı tespit edebilecek şekilde seçilmiştir. Konsantrasyonların hızlı bir şekilde dengeye gelmesi için biyoaktif tabakanın olabildiğince ince olması gerekmektedir. Bunun yanı sıra biyoaktif tabakada sabit bir substrat konsantrasyonu elde edebilmek için ölçüm çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması gerekmektedir. Doğal olarak analizi yapılacak türlerin ölçüm çözeltisindeki, biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka iletilici ara yüzeyindeki konsantrasyonları farklı olur. İletici mekanizmasının ölçeceği sinyal biyoaktif tabaka-iletilici ara yüzeyindeki konsantrasyonlarla ilişkilidir (Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999).

2. 12. 2. Enzim Sensörlerinin Sınıflandırılması

Enzim sensörlerinin büyük çoğunluğu enzimatik reaksiyon uyarınca oluşan sinyalin belirlenmesi ilkesine göre yapılmaktadır. Çizelge 2. 6’ da söz konusu sınıflandırma özetlenmektedir.

Çizelge 2. 6. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması (Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999)

Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensörleri;
Amperometrik Esaslı Enzim Sensörleri;
Birinci Nesil Amperometrik Enzim Elektrotları
İkinci Nesil Amperometrik Enzim Elektrotları
Üçüncü Nesil Amperometrik Enzim Elektrotları
Potansiyometrik Esaslı Enzim Sensörleri
Proton Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotları
Amonyum Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotları
Karbondioksit Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotları
Diğer İyon Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotları
Yarı İletkenleri Esas Alan Enzim Sensörleri
Enzim Alan Etki Transistörleri(ENFET)
Optik Esaslı Enzim Sensörleri;
Absorpsiyon Esaslı Optik Enzim Sensörleri
Flouresans Esaslı Optik Enzim Sensörleri
Biyoluminesans Esaslı Optik Enzim Sensörleri
Kalorimetrik Esaslı Enzim Sensörleri
Piezoelektrik Esaslı Enzim Sensörleri

2. 12. 3. Potansiyometrik Esaslı Enzim Sensörleri

Potansiyometrik enzim elektrotlarında kullanılan temel sensörler pH ya da tek yüklü iyonlara duyar, cam elektrotlar, anyon veya katyonlara hassas iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz duyar elektrotlardır. Potansiyometrik esaslı enzim elektrotlar söz konusu sensörler üzerine bir veya daha fazla enzimin uygun immobilizasyon yöntemleriyle monte edilmesiyle hazırlanır. Potansiyometrik esaslı enzim elektrotlarında genel olarak standart kalomel elektrot (SCE) referans elektrot olarak kullanılır. Referans elektrot, ölçümün yapıldığı çözeltinin içine enzimin üzerine immobilize edildiği çalışma elektrodunun yanına konulur. Bir cam elektrot kullanılması durumunda referans olarak Ag/AgCl, enzim elektrodun yanında kullanılabilir. Enzim elektrot ile referans elektrot arasındaki ilişki bir milivoltmetre ile sağlanır. Ancak günümüzde hazır kombine elektrotların kullanılmasıyla bu ayrıntılar en aza inmiştir. Hazır bir probun üzerine uygun bir enzim immobilizasyonu ile pratik bir şekilde ölçümler yapılabilmektedir (Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999).

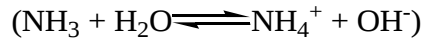
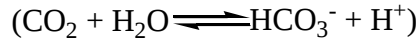
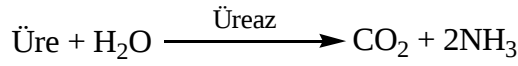
2. 12. 4. Amonyum Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotları

Amonyum iyonlarına duyar temel sensör ile enzimin birleştirilmesiyle yapılan bu elektrotlar genelde H^+ , K^+ ve Na^+ gibi tek yüklü katyonlara da duyarlılık gösterdiği için ölçüm ortamında benzer maddeler olması durumunda girişim yapabilirler (Tran-Minh, 1993; Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999).

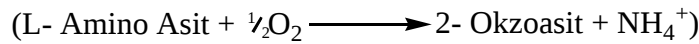
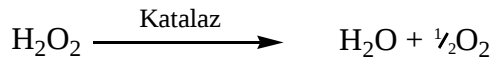
2. 12. 5. Amonyum Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotlarının Bazı Uygulamaları

Amonyum duyar potansiyometrik enzim elektrotlarına yönelik bazı örnekler aşağıda verilmiştir. Bu tür enzim sensörlerinde temel iletici olarak pNH_4 duyar elektrotlar kullanılır (Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999).

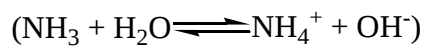
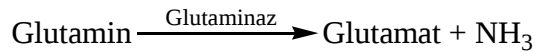
1) Üre tayini (Tran-Minh, 1975; Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999)



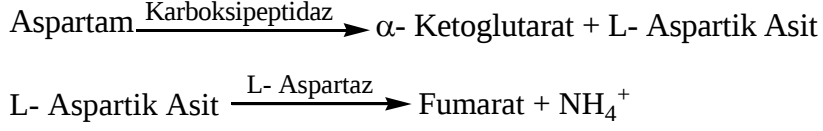
2) L-Amino Asit Tayini (Guilbault ve Hrabankova, 1971; Dinçkaya, 1999; Telefoncu,1999)



3) Glutamin Tayini (Guilbault ve Shu, 1971; Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999)



4) Aspartam Tayini (Fatibello-Filho ve ark, 1988; Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999)



2. 13. Enzim Sensörlerin Performansına Etki Eden Faktörler

Genel anlamda bir enzim sensörünü karakterize eden onun çalışma niteliklerini ve verimini belirleyen faktörler vardır. Çoğu zaman bir ölçüm sistemi, temel sensör ve biyolojik materyalin istediğimiz kısmını fraksiyonlayarak bize cevap verebilecek bir biyosensör elde etmemiz oldukça kolaydır. Ancak performans faktörlerini göz önüne almadığımız sürece bu cevap neyi ifade ettiği belli olmayan bir nitelik taşıyacaktır. Hazırlanan biyosensörün kullanabilir olup olmadığını anlamak için performans faktörlerini incelemek gerekir (Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999).

2. 13. 1. Kararlılık

Bir enzim sensörünün kararlılığı, diğer faktörlerde istenilen koşullar sağlandıktan sonra pratik kullanılabilirliğidir. Kararlılık biyosensör ömrünün uzunluğu hakkında bilgi verir. Uzun ömür aynı materyalle çok sayıda analiz yapılabilir demektir. Bu da işgücü ve maliyet açısından önemli bir avantaj sağlar.

Enzim sensörleri hibrit bir yapıya sahip olduklarından, hem sensör hem de enzim kararlılığı açısından durumun değerlendirilmesi gerekmektedir. Örneğin iyon seçici sensörler genelde yüksek kararlılığa sahipken gaz duyar olanların doldurma çözeltilerinin belirli aralıklarla değiştirilmesi gerekir. Amperometrik sensörlerde ise

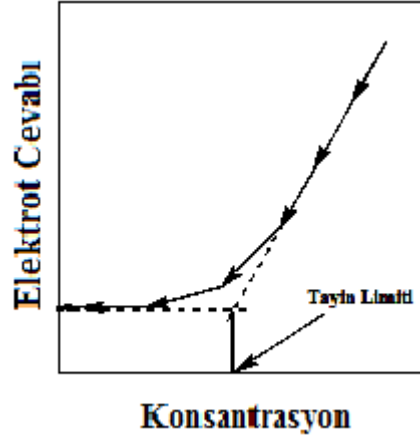
yüksek potansiyelde çalışıldığı zaman reaksiyon ürünleri tarafından yüzey bozunması problemi ile karşılaşılabilir.

Biyolojik madde bakımında enzim sensörünün kararlılığı incelendiği zaman enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi gibi faktörler önem taşır. Genelde fiziksel immobilizasyon yöntemlerinin kullanılması durumunda biyosensörün ömrü kimyasal immobilizasyon yöntemlerine göre daha kısadır. Enzimin saflık düzeyi arttıkça doğal ortamındaki bileşenlerinden uzaklaşıldığı için kararlılıkta azalma söz konusu olabilir. Ancak tam tersinde düşük enzim saflığında ise ortamda bulunabilecek ve ilgilenilen enzimatik reaksiyonla girişim yapacak unsurların diğer performans faktörlerini etkileyebileceği göz ardı edilmemelidir (Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999).

Çalışma koşulları açısından ise, analiz için yeterli koşullar varsa nispeten düşük sıcaklıklarda çalışmak biyosensör ömrünü uzatır. Saklama açısından bakıldığında zaman + 4° C’de mikrobiyal üremeye izin vermeyecek şekilde saklamak gerekebilmektedir (Kaufmann ve Guilbault, 1992; Eggins, 1996; Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999).

2. 13. 2. Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı

Kalibrasyon grafiğinde substrat konsantrasyonu ile elektrot cevabı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu kısma “doğrusal aralık” denir. Tayin sınırı kalibrasyon grafiğinin, doğrusal kısmının zemin ekstrapolasyonu ile kesiştiği nokta olarak tanımlanır (Şekil 2. 12.).



Şekil 2. 12. Bir potansiyometrik enzim sensör cevabı için kalibrasyon grafiği

Potansiyometrik enzim sensörler ile yapılan ölçümlerinde kalibrasyon grafiği substrat (ya da ürün) konsantrasyonunun logaritması ile ölçülen potansiyel arasında çizilir (Eggins, 1996; Dinçkaya, 1999).

Bir enzim sensöründe başlıca pH, sıcaklık ve girişimcilerin sensör cevabını etkileyerek tayin aralığını değiştirebilecekleri görülür. pH'ın etkisi, enzimin optimum pH'sından uzaklaşılmasıyla biyoaktif tabakadaki toplam enzim aktivitesindeki farklılaşma ve bu farklılaşmayla enzimatik reaksiyon uyarınca tüketilen ya da üretilen ve sinyal oluşumuna yol açan türlerin disosiyasyon dengelerinin değişmesidir.

Sıcaklığın etkisi, termal kararlılığı düşük enzimlerde optimum sıcaklıktan uzaklaşılması geri dönüşsüz bir denatürasyonla sonuçlanabilir ve buna karşılık çeşitli kimyasal türlerin sıcaklıkla difüzyon hızının artması enzim sensörünün cevabının artmasına sebep olur.

Herhangi bir girişimci madde ise enzim sensörünün cevabını başlıca üç şekilde etkileyebilir. Birincisi, girişimcinin etkisinin temel elektrot üzerinde, ikincisi biyoaktif tabakadaki enzim üzerinde, üçüncüsü ise enzimatik reaksiyonlardaki bileşikler üzerinde göstermesidir. Sırasıyla örneklenirse, katyon seçici temel elektrotların ortamdaki diğer katyonlardan etkilenmesi, inhibitör veya aktivatörlerin veya mutlak spesifik olmayan enzimler için benzer substratların biyoaktif tabakadaki enzim aktivitesini etkilemesi ve

ortamda bulunabilecek bazı indirgen veya yükseltgenlerin enzimatik reaksiyonun substrat veya ürünleriyle etkileşmesi verilebilir (Tran-Minh, 1993; Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999).

2. 13. 3. Seçimlilik

Seçimlilik biyosensörlerin varlık nedenlerinin en ön sıralarında gelmektedir. Enzimler genel anlamda seçimlilik sıralamasında antikor ve nükleik asitlerden sonra gelirler. Ancak bu genel yaklaşım mutlak spesifik enzimler söz konusu olduğunda geçersizdir. Yani mutlak spesifik bir enzim söz konusu olduğunda seçimlilik en üst seviyelere ulaşır. Bunun yanı sıra spesifikliği düşük enzimler, grup spesifik enzimler, kısmi saflaştırılmış enzim preparatları, dokular ve mikroorganizmalar seçimlilik açısından bazı dezavantajlara sahiptir. Bir biyosensörün seçimliliği üzerinde başlıca üç faktör etkili olmaktadır, bunlar; sensörler girişimler, biyokatalizörle girişimler ve pH'tır (Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999).

2. 13. 4. Cevap Zamanı

Biyosensörlerde cevap zamanı ile kastedilen, analizlenecek maddenin bulunduğu ortama temas ettiği andan itibaren ölçüm düzeneğinden sonucun okunduğu ana kadar geçen süredir. Bir biyosensörün cevap zamanını, substratın analiz yapılan ortamdan enzim membranının yüzeyine ne kadar hızlı difüzlendiği, biyokatalizatörün aktif merkezi ile ne kadar hızlı reaksiyon verdiği ve oluşan ürünün ölçümlendiği yer olan sensör yüzeyine ne kadar hızlı difüzlendiği etkiler. Biyosensörler için cevap zamanı genel olarak birkaç saniye veya birkaç dakika arasında değişir. 5 dakikaya kadar olan değerler genelde kabul edilebilir ancak 10 dakika gibi bir süre uzun kabul edilir (Kaufmann ve Guilbault, 1992; Eggins, 1996; Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999).

2. 13. 5. Tekrarlanabilirlik

Bir enzim sensöründe kullanılan enzim preparatının aktivitesi, kararlılığı, saflık düzeyi hazırlanacak enzim sensörü ile tekrarlanabilir sonuçlar almak için çok önemlidir. Ancak karakterisitik özellikleri çok iyi bilinen bir enzim preparatının kullanılması durumunda dahi sensör hazırlama aşamaları ve çalışma ortam ve koşulları açısından beklenen niteliklerde oldukça büyük sapmalar gözlenebilir. Bu nedenle hazırlanan biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik testleri yapılması büyük bir zorunluluktur (Dinçkaya, 1999; Telefoncu, 1999).

2. 14. Kromatografik Sistem

Bir kromatografik düzenekte hareketli faz çift pistonlu bir pompa ile kromatografik sisteme pompalanır. Pulssuz bir akış, pompanın elektronik kontrolü sayesinde gerçekleştirilir. Bu hem UV hem de amperometrik dedektörler için geçerlidir.

Kromatografide analitik kolon çok önemlidir. Uygun bir sabit faz seçiminin yanında uygun kromatografik parametrelerin seçimi de analizlerin kalitesinde önemli rol oynar. Kolon gövdeleri inert maddelerden yapılır ve genellikle oda sıcaklığında çalıştırılırlar. Karbonhidrat ve aminoasitlerin analizi gibi bazı durumlarda yüksek sıcaklıklarda kolonun sıcaklığının termostat ile kontrol edilmesi gerekmektedir.

Analitin miktarını ve türünü belirlemeye yarayan detektörün performansını artırmak amacıyla aşağıdaki parametreler göz önünde bulundurulmalıdır:

- Doğrusallık
- Ayrım
- Gürültü

Çözünen maddenin derişimine cevap veren bir dedektör, kolon çıkışına monte edilirse elde edilen sinyaller zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Elde edilen bu

veriler ile çözünen türlerin kalitatif ya da kantitatif analizleri yapılabilir. Kantitatif sonuçlar; analit pikinin yüksekliğinin veya pik alanının, standardın pik yüksekliği veya pik alanı ile karşılaştırılması sonucu elde edilir. Çünkü pik alanları ve pik yükseklikleri analitin derişimi ile doğru orantılıdır. Elde edilen verilerin sadeleştirilmesi dijital integratörler ya da bilgisayar sistemleri kullanılarak yapılmaktadır (Işıldak ve Işıldak, 2013).

Amino asitlerin tayinine yönelik literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda genellikle amino asitler kolon öncesi veya kolon sonrası türevlendirme işlemlerine tabi tutularak UV, floresans ve kütle spektroskopisi dedektörleriyle tayin edilmiştir. Bu çalışmalardan bazıları şunlardır;

Xu ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada, iyon kromatografik yöntemle çok katlı karbon nanotüpleri ile modifiye edilmiş amperometrik sensörleri kullanarak sistin, triptofan ve tirozinin eş zamanlı tayinini gerçekleştirmişlerdir. Optimum koşullar altında hareketli faz olarak 2×10^{-3} mol L⁻¹ sitrik asit tampon çözeltisini (pH: 6,5) kullanarak sistin, triptofan ve tirozinin tayinlerini başarıyla gerçekleştirmişlerdir.

2014’de yapılan bir çalışmada da yeni bir metot ile doğal sulardaki amino asitler katı-faz ekstraksiyonu sonrası sıvı kromatografi ve tandem kütle spektrometresi birleştirilerek tayin edilmiştir. Bu sulardaki ortalama amino asit içeriği 19 µg L⁻¹ olarak tespit edilmiştir ve 18 amino asit arasında en çok tirozin, izolösin ve lösin bulunmuştur (Tong How ve ark., 2014).

2010’da yapılan bir çalışmada yaklaşık 200 bal numunesindeki amino asitlerin tayini sıvı kromatografide kolon öncesi dietilenetoksimetilenmalonat ile türevlendirilerek ultraviyole ve kütle spektroskopisi dedektörleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen bu metot 200 bal numunesi içinden 23 amino asidin tayinine olanak sağlamıştır (Rebane ve Herodes, 2010).

Petiris ve arkadaşları iyon etkileşim reaktifi ve buharlaştırıcılı ışık saçılması dedektörü kullanarak sekiz adet türevlendirilmemiş amino asitin kantitatif tayinini sıvı kromatografik sistemde gerçekleştirmiş ve validasyonunu yapmıştır. Amino asitlerin

ayırımları ters faz C18 kolon kullanılarak gradient eluent yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Petritis ve ark., 2004).

Chen ve arkadaşları'da geliştirdikleri yeni metot ile insan serumunda amino asitlerin N-fosforil amino asitlerin negatif ve pozitif formlarını oluşturarak ters-faz sıvı kromatografide electrospray tandem kütle spektroskopisini (RP-LC/ESI-MS) kullanarak 20 doğal amino asidi tayin etmişlerdir. Amino asitlerin doğrusal bir çalışma aralığında ($r^2>0,99$) tayin limitinin 0,025-25 μM arasında olduğunu tespit etmişlerdir (Chen ve ark., 2014).

Jia ve arkadaşları gıda örneklerinde 23 amino asiti dansil klorür ile kolon öncesi türevlendirerek sıvı kromatografide dört kutuplu (quadrupole) time-of-flight kütle spektroskopisi ile eş zamanlı bir şekilde tayin etmişlerdir. Çalışmada her bir amino asit için geniş doğrusal aralık sağlanmıştır ($r^2>0,999$). Tayin limiti 0,005 ve 0,4 $\mu\text{g/mL}$ arasında olduğu bulunmuştur (Jia ve ark., 2011).

Şanlı ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada fare ve sıçanların omurilik dokusundaki amino asit nöro transmitterlerini 3-(4-karboksibenzoyl)-2-kinolinkarboksaldehit ile türevlendirerek sıvı kromatografide floresans detektörünün kullanılması ile tayin etmişlerdir. Optimum koşullar altında, 0,50 ve 50,00 μM konsantrasyonları arasında bir doğrusallık elde edilmiş ve tayin sınırı 0,003 μM -0,06 μM olarak tespit edilmiştir.

2008 yılında geliştirilen bir metot ile amino asitler o-fitaldehit ve etantiyol ile ön türevlendirme yapılarak ters-faz yüksek performanslı sıvı kromatografide UV dedektör kullanılarak tayin edilmiştir. Geliştirilen bu metot ile içki numunelerinde valin, metiyonin ve izolösün başarıyla tayin edilmiştir (Yokoyama ve ark., 2008).

Su ve arkadaşları 2009 yılında ünlü bir Tibet ilacı olan *Gentiana dahurica*'da 20 amino asidi kolon öncesi 1,2-benzo-3,4-dihidrakarbazol-9-etil kloroformat (BCEOC) ile türevlendirerek ters-faz yüksek performanslı sıvı kromatografide floresans detektör ile tayin etmişlerdir. Bu çalışmada tayin limiti 6,5-178,2 fmol olarak bulunmuştur ($r^2>0,999$). Çalışma sonucu medikal bitkilerde serbest amino asitlerin tayini için kullanılabileceği bir metot geliştirmişlerdir.

Dietzen ve arkadaşları 32 amino asidi türevlendirme yapmadan sıvı kromatografi ile tandem kütle spektroskopisini birleştirerek tayin etmişlerdir. Sonuçları klasik sıvı

kromatografi-nihidrin tayin yöntemine göre kıyasladıklarında amino asitlerin daha hızlı tayin zamanına sahip olduğunu ve nihidrin bileşiklerinin girişiminin neden olduğu hataların azaldığını gözlemlemişlerdir. (Dietzen ve ark., 2008).

Domingues ve arkadaşları şizofrenik hastalardan alınan plazma örneklerinde amino asit ve nöro transmitterleri birleştirilmiş hidrofolik etkileşim sıvı kromatografi ve tandem kütle spektroskopisinde kütle spektroskopi detektörü ile tayin etmişlerdir (Domingues ve ark., 2014).

Sun ve arkadaşları amino asitleri 6-aminokinolil ile ön türevlendirerek ultra performanslı sıvı kromatografide fotodiyot dizi detektörü ile tayin etmişlerdir. Çalışma amino asitlerin gerçek numunelerde iyi bir doğruluk ve tekrarlanabilirlikle kantitatif analizinin yapılabileceğini göstermiştir (Sun ve ark., 2012).

2011’ de geliştirilen bir metot ile kolon öncesi 2-[2-(7H-dibenzo [a, g] karbazol-7-il)-etoksi] etil kloroformat ile türevlendirilen amino asitler geleneksel bir yemek olan *Potentilla anserina* kökünde tayin edilmişlerdir. Bu çalışmada amino asitler sıvı kromatografide floresans detektör ile tespit edilmişlerdir. Her bir amino asit için tayin limiti 2,60-24,3 fmol olarak bulunmuştur ($r^2 > 0,999$). Metot ile amino asitlerin ayırımında yeterli duyarlılık ve kesinlik elde edilmiştir (Xia ve ark., 2011).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3. 1. Materyal

3. 1. 1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada katyon çözeltileri için kullanılan tuzlar (NaNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, NH_4NO_3 , KNO_3) analitik saflıkta olup Merck firmasından sağlanılmıştır. Amino asit standartları ise Fluka firmasından sağlanılmış olup hepsi kromatografik saflıktadır.

Elektrotların ve biyosensörlerin hazırlanmasında nonaktin (Merck), Bis(2-etilhekzil)sebakat (Sigma), Disiklo-hekzil-18-krown-6-KSCN (Aldrich), Potasyum tetrakis (klorofenil)borat (Fluka), Polivinil klorür (high moleküler weight) (Fluka), Tetrahidrofuran (Merck), L-amino asit oksidaz (Sigma), Glutaraldehit (Merck) kimyasalları kullanılmış olup hepsi analitik ve kromatografik saflıktadır.

PVC- NH_2 sentezinde kullanılan 1,4-diaminobütan, Trietilamin, Metanol kimyasalları Merck firmasından sağlanılmış olup analitik saflıktadır.

3. 1. 2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada potansiyometrik ölçümler, çok kanallı bilgisayar kontrollü potansiyometri (ISED Medikal Inst. Türkiye) vasıtasıyla gerçekleştirildi. Durgun ortam potansiyometrik ölçümlerinde referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot (Thermo-Orion) kullanıldı. Hareketli ortam çalışmalarında, laboratuvar yapımı akış hücreleri ve laboratuvar yapımı Ag/AgCl referans elektrot kullanıldı. Kromatografik ayırımlar için Dionex firmasının ICS-1100 model iyon kromatografi cihazı kullanılmıştır. Deiyonize su temin etmek için DI 800 model saf su cihazı kullanıldı.

3. 2. Metot

3. 2. 1. Çalışma Yöntemi

Amino asit biyosensörünün hazırlanması için ilk olarak, temel sensör olarak kullanılmak üzere, potansiyometrik kompozit katı-hal NH_4^+ -seçici elektrotlar hazırlandı. Hazırlanan kompozit katı-hal NH_4^+ -seçici elektrotlar, durgun ortamda test edilmeden önce ana iyon çözeltilerinde ($\text{NH}_4^+\text{NO}_3^-$), şartlanmaya (doyurulmaya) bırakıldı. Bu şekilde hazırlanan kompozit katı-hal NH_4^+ -seçici elektrotlar, NH_4^+ , K^+ , Na^+ , ve Ca^{+2} çözeltilerinde test edilerek karakteristik özellikleri incelendi. Uygun olarak çalıştığı tespit edilen elektrotlar üzerine enzim tabakası kaplandı (L-AAO). Enzim tabakasının kaplanmasıyla hazırlanan amino asit biyosensörlerinin yüzeyi kuruyuncaya kadar karanlıkta (yaklaşık 4-5 saat) saklandı. Kuruduktan sonra dolapta muhafaza edildi. Daha sonra bu elektrotlar, durgun ortamda değişik amino asit çözeltilerinde test edilerek karakteristik özellikleri incelendi. Ölçümler amino asitlerin 1×10^{-1} - 1×10^{-5} mol.L⁻¹ çözeltileri kullanılarak yapıldı. Her ölçümden önce indikatör elektrot ve referans elektrot çifti deiyonize su ile yıkandı. Bir biyosensör birden fazla ölçümde kullanıldı. Daha sonra hareketli ortam çalışmaları için mikrolitre ölü hacme sahip akış hücreleri hazırlandı ve iyon kromatografik sisteme monte edildi. Durgun ortamdaki ölçümler sonucu seçici ve doğrusal çalışma aralığına sahip ve en iyi potansiyel davranışı sergileyen biyosensörler seçilerek iyon kromatografi-potansiyometrik hibrit sistemine entegre edildi. Uygun hareketli faz ve akış hızı tespit edilerek 1×10^{-1} – 1×10^{-5} M standart amino asit çözeltileri sisteme enjekte edildi ve her bir amino asit için kromatogramlar elde edildi.

3. 2. 2. PVC-NH₂ Sentezi

PVC-NH₂ literatürde belirtildiği şekilde sentezlendi (Turna, 2006; Walcerz ve ark., 1995). Buna göre, 1,43 g PVC tartılıp 250 mL'lik bir balona konularak üzerine 6 gr 1,6-diamino hekzan ve 3,5 mL trietilamin ilave edildi. Sonra bu karışım üzerine 35

mL metil alkol ilave edilerek geri soğutucu altında, karıştırılarak, 3,5 saat reflaks işlemi yapıldı. Bu işlemten sonra oluşan sarımsı madde ilk önce metil alkol ile sonra sırasıyla suyla, derişik HCl ve suyla yıkandıktan sonra son olarak metil alkolle yıkanarak kurutuldu. Kurutulan madde THF’ de çözüldü. Çözünmeyen kısım süzülerek atıldı, çözünen kısım kurutuldu. Kurutulan sarımsı polimer madde PVC-NH₂ olarak kullanıldı.

3. 2. 3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

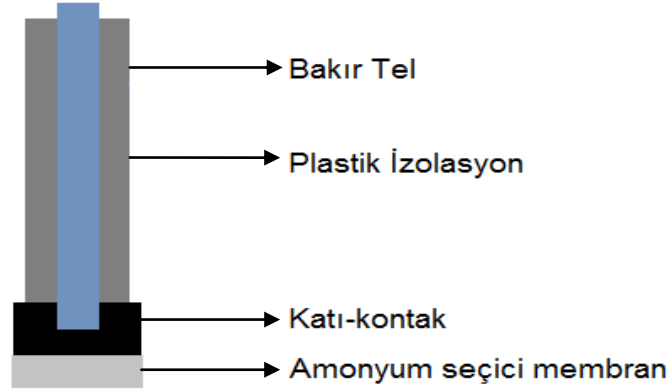
Standart katyon çözeltileri katyonların nitrat tuzları kullanılarak deiyonize su ile hazırlandı. İlk önce her bir katyonun 0,1 M konsantrasyonundaki stok standart çözeltisi hazırlanıp daha sonra bu standart çözeltilerden her bir katyonun istenilen konsantrasyonlardaki standart çözeltileri seyreltilerek hazırlandı.

Ölçümlerde kullanılan amino asitlerin 0,1 M derişimlerdeki stok çözeltileri, pH’ sı 7,02 olan 5x10⁻³ M fosfat tamponunda (H₂PO₄⁻/ HPO₄²⁻) ve deiyonize su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerinden istenilen konsantrasyonlarda (10⁻¹-10⁻⁵ M) seyreltme yapılarak standart amino asit çözeltileri hazırlandı.

3. 2. 4. NH₄⁺-seçici Sensörlerin Hazırlanması

Amino asitlerin potansiyometrik ölçümü için kullanılacak olan biyosensörlerin yapımında kullanılacak olan temel sensör potansiyometrik kompozit katı-hal NH₄⁺-seçici sensörler hazırlanmıştır. Bu katı-hal kompozit NH₄⁺-seçici sensörler aşağıda belirtilen yöntem ve denemeler takip edilerek hazırlandı; Kompozit katı-hal NH₄⁺-seçici sensörlerin hazırlanması için öncelikle, literatürdeki gibi PVC-NH₂ sentezlendi (Turna, 2006; Walcerz ve Ark., 1995). NH₄⁺-seçici PVC-NH₂ kokteyli hazırlandı. Bu aşamada, nonaktin, di-benzo 18 crown-6, potasyum tetrakis(4- klorofenil) borat (KTPClPB), bis(2-etilhekzil)sebakat ve PVC-NH₂ maddelerinin uygun kompozisyonları kullanılarak

elektrotlar hazırlandı. Şekil 3. 1’ de bu şekilde hazırlanan kompozit katı-hal NH_4^+ -seçici bir sensör şematik olarak gösterilmiştir.

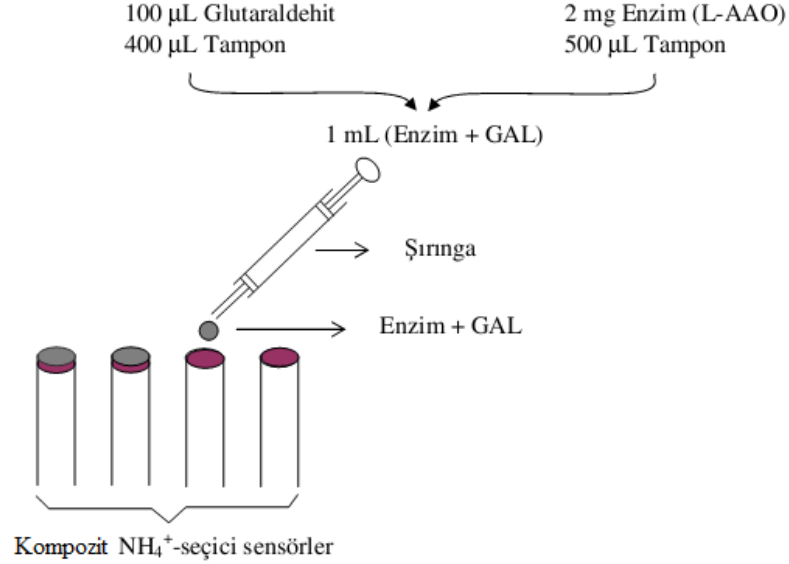


Şekil 3. 1. Kompozit NH_4^+ -seçici sensör

3. 2. 5. Amino Asit Duyarlı Biyosensörlerin Hazırlanması

Daha önce hazırlanan ve potansiyometrik performansı ölçülen kompozit NH_4^+ -seçici sensörlerin yüzeyine, L-amino asit oksidaz enzimi tek adımda enzim tutturma yöntemiyle bağlanarak amino asit biyosensörleri hazırlandı (Şekil 3. 2). Çapraz bağlayıcı görevi yapacak olan glutaraldehit çözeltisi % 2,5’ luk (w/w) 100 μL glutaraldehitin 5 mM, pH’sı 7,02 400 μL fosfat tamponunda ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) hazırlanması ile hazırlandı. Enzim çözeltisi de, 2.0 mg L-amino asit oksidaz enziminin, 5 mM pH’sı 7,02 500 μL fosfat tamponunda çözülmesi ile hazırlandı. Sonra glutaraldehit çözeltisi ile enzim çözeltisinin bir arada karıştırılmasıyla hazırlanan kokteyl, viskoz hale gelmesi için karanlıkta ve buzdolabında (4-5 C’ de) bekletildi. Daha sonra önceden potansiyometrik performansları belirlenmiş olan NH_4^+ -seçici sensörler hazırlanan glutaraldehit-enzim kokteyline birkaç defa daldırmak suretiyle elektrotların yüzeylerinin enzimle kaplanması sağlandı. Daha sonra kompozit amino asit biyosensörlerin yüzeyinde tutunmayan ve açıkta kalan glutaraldehit molekülünün

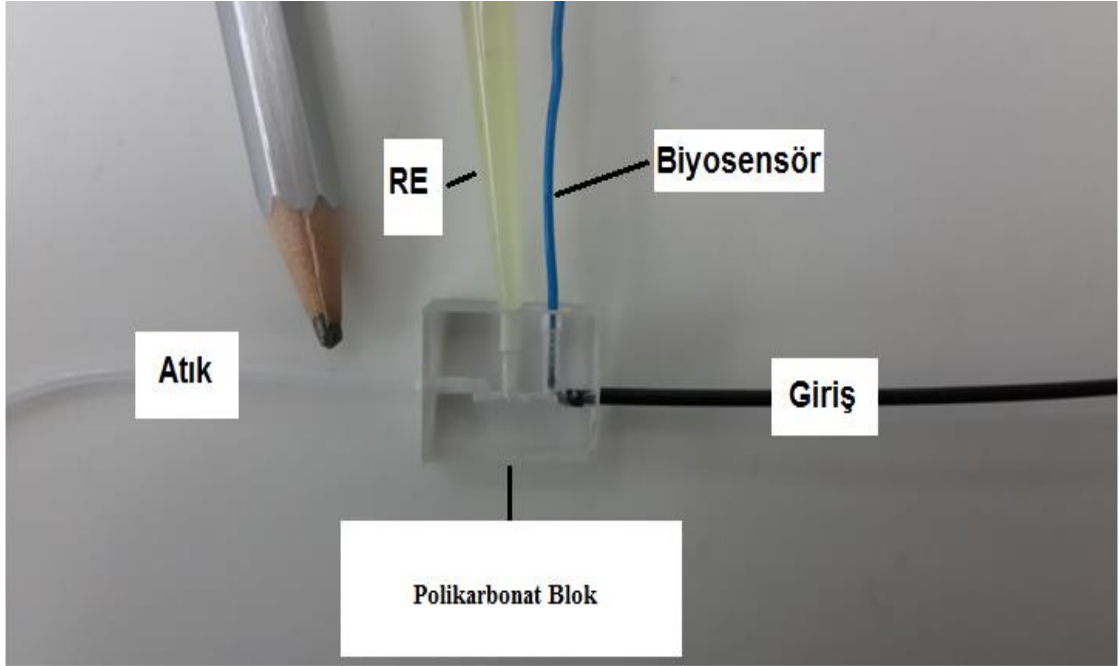
kalıntılarının uzaklaştırılması için sensör yüzeyleri fosfat tamponu ile yıkandı ve buzdolabında (4-5 C' de) muhafaza edildi.



Şekil 3. 2. Katı-hal NH₄⁺-seçici sensör yüzeyine L-AAO enziminin tek adımda tutturulması (Turna, 2006).

3. 2. 6. Hareketli Ortam Akış Hücrelerinin Hazırlanması

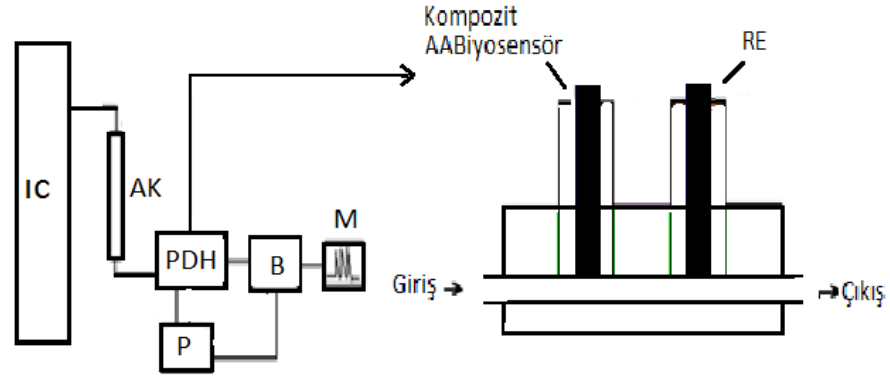
İyon Kromatografik sistemde dedektör olarak kullanılan minyatürize akış hücreleri (mikrolitre ölü hacime sahip) şekil 3. 3' te görüldüğü gibi 2 cm uzunluğunda, 1 cm genişliğinde ve 1 cm yüksekliğinde polikarbonat malzeme bloğundan oluşturuldu. Polikarbonat blok üzerine, amino asit duyarlı biyosensörle beraber, mikro boyutlarda Ag/AgCl referans elektrot yerleştirildi. Sensörlerin mikro boyutlarda olması akış hücresine entegre edilmesine izin vermektedir. Mikro boyutlarda Ag/AgCl referans elektrot laboratuvarımızda geliştirilmiştir. Kompozit yapıda sensor materyalin işlenebilmesi, bu şekilde mikrolitre ölü hacme sahip minyatürize akış hücrelerinin hazırlanmasına izin vermektedir.



Şekil 3. 3. Mikrolitre ölü hacme sahip, referans elektrot ve biyosensör yerleştirilmiş akış hücresi

3.2.7. İyon Kromatografik Çalışmalar

Kromatografik ayrımlar tek kolonlu iyon kromatografi cihazının suppresör kolonu kullanılmadan gerçekleştirildi. Yukarıda ifade edilen şekilde hazırlanan akış hücreleri (mikrolitre ölü hacme sahip) iyon kromatografik sistemde bir dedektör gibi ayırım kolonu çıkışına bağlanarak amino asitlerin tayini gerçekleştirildi. Şekil 3. 4' de çalışmada kullanılan iyon kromatografi-potansiyometri hibrit sistemi ve potansiyometrik ölçüm hücresi şematize edilmiştir. İyon kromatografik çalışmalarda C18 analitik kolon ve koruyucu kolon kullanıldı. Hareketli faz türü ve hareketli faz akış hızı gibi analitik parametreler ayrı ayrı test edilerek optimum çalışma şartları belirlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 3. 4. Aminoasit tayininde kullanılan iyon kromatografi-potansiyometri hibrit sistemi (IC: iyon kromatografik sistem; AK: analitik kolon; PDH: potansiyometrik dedektör hücresi; P: potansiyometre; B: bilgisayar; M: monitör; AA Biyosensör: aminoasit biyosensör; RE: referans elektrot) (Işıldak ve Işıldak, 2013)

3.2.8. Potansiyometrik Tayin Prensibi

İyon seçici elektrotta, iyon seçici membran iyonların iç standart ve test çözeltisini birbirinden ayırır. Elektronlar, iyonlar ve test edilen iyonun yüklü ya da nötral kompleksleri, membranın iç kısımlarına doğru iç standart çözeltinin kompozisyonuyla orantılı olarak taşınırlar. Böylece oluşan elektrostatik potansiyel (EMF), standart referans yarı hücresiyle membran yarı hücresi birleştirilerek ölçülür. Bir iyon seçici elektrot hücresindeki potansiyel değişimi şematik olarak aşağıdaki gibi gösterilebilir (Skoog and West, 1982).

İç referans elektrot / İç referans çözelti // İyon seçici elektrot membran // Test çözeltisi / Dış referans elektrot, veya;

İç referans elektrot (bakır tel gibi) / Katı-hal kontak // İyon seçici elektrot membran // Test çözeltisi / Dış referans elektrot

Bir elektrotun potansiyel farkı (E) Nernst Eşitliği ile verilmiştir;

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln a_i \quad (3.1)$$

Eşitlik 4. 1’de görüldüğü üzere E; İndikatör elektrot potansiyeli, E° ; standart elektrot potansiyeli, R, T ve F; sabit sayılar, a_i ; elektrotta hissedilen iyon aktivitesi, n; reaksiyonda alınıp verilen elektron sayısı veya membran elektrotta aktif iyon yüküdür.

Eğer iyon aktivitesi a_1 den a_2 ye değişiyorsa potansiyel değişimi aşağıdaki gibi olur;

$$E = E^{\circ}(\text{sbt}) + \left(\frac{RT}{nF} \right) \ln \frac{a_2}{a_1} \quad (3.2)$$

Eşitlik 3. 2’ de görüldüğü üzere çözeltide iyon aktivitesinin artması sonucu elektrodun cevabı logaritmik olarak gözlenmektedir.

Eğer ölçümler 25 °C de alınırsa Nernst eşitliği aşağıdaki gibi olur;

$$E = E^{\circ}(\text{sbt}) + \frac{0,0592}{n} \log \frac{a_2}{a_1} \quad (3.3)$$

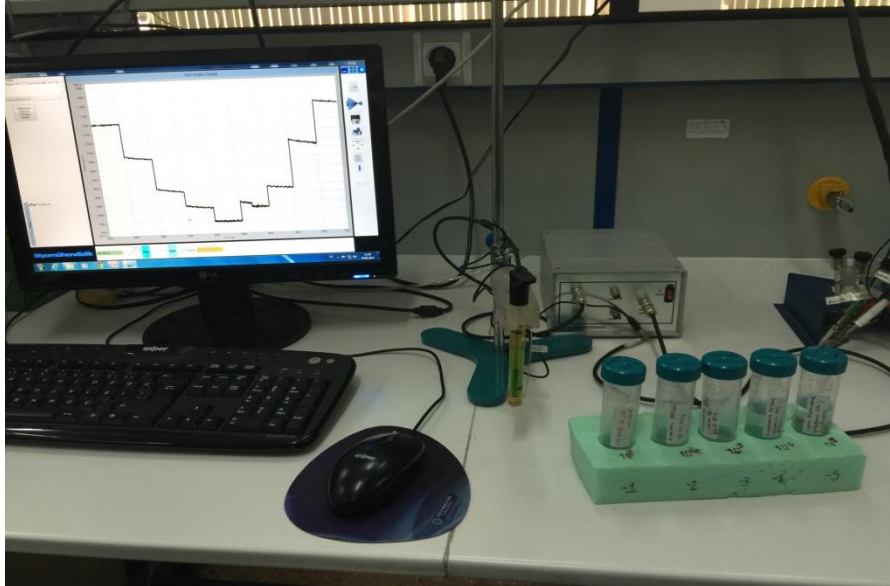
Buna göre Eşitlik 3. 3’ de, 25 °C de $E - \log a_i$ ilişkisinin teorik değişimi n yüklü iyonlar için 59.2/n mV dür. Bu değişim genel olarak katyonlar için pozitif anyonlar için negatiftir.

4. BULGULAR

4. 1. Durgun Ortam Ölçümleri

Kompozit potansiyometrik sensörler hazırlanarak durgun ortamda seçicilik, tekrarlanabilirlik, cevap zamanı, tayin limiti gibi potansiyometrik performansları incelendi.

Potansiyel ölçümlerin yapıldığı Potansiyometrik ölçüm sistemi Şekil 4. 1' de görülmektedir.



Şekil 4. 1. Çok kanallı potansiyometrik ölçüm sistemi

4. 1. 1. Kompozit NH_4^+ -seçici Elektrodun Potansiyometrik Performansı

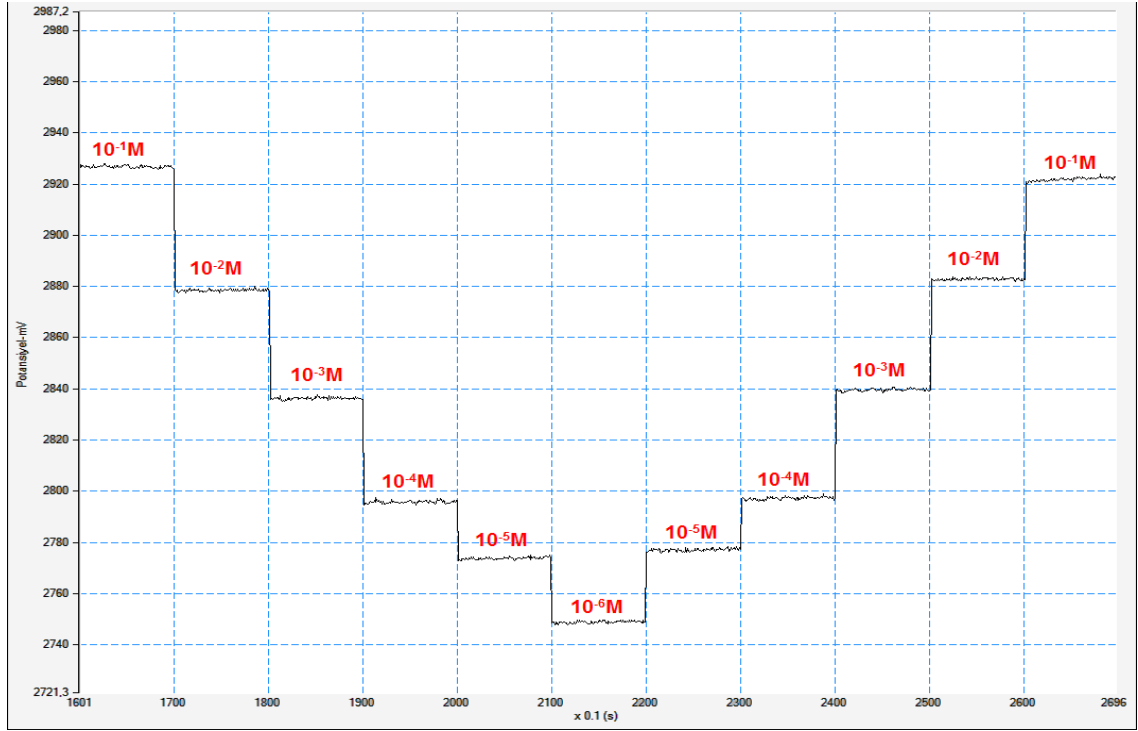
Biyosensörün seçicilik, cevap zamanı, kullanım süresi gibi önemli özelliklerini bileşimindeki iyon seçici elektrot etkiler. İyon seçici elektrodun, biyosensörün enzim tabakasındaki meydana gelen enzimatik reaksiyon sonucu oluşan iyonla karşı seçici

olması, cevap süresinin kısa olması, uzun süre kullanılması biyosensörün de performansının yüksek olmasını sağlar. Amino asit biyosensörünün hazırlanmasında, temel sensör (iyon seçici elektrot) olarak katı-hal NH_4^+ -seçici elektrot kullanıldı. Bu amaçla en uygun yöntemler kullanılarak katı-hal amonyum elektrotlar hazırlandı. Çizelge 4. 1' de amonyum elektrodun membran kompozisyonu verilmiştir.

Çizelge 4. 1. NH_4^+ -seçici membran için kimyasal bileşim oranları

% Bileşen	Kompozit (mg)
Bis(2etilhekzil)sebakat	60
PVC- NH_2	36
Nonaktin	2,5
KTClPB	0,5
Dibenzo-18-crown-6	1

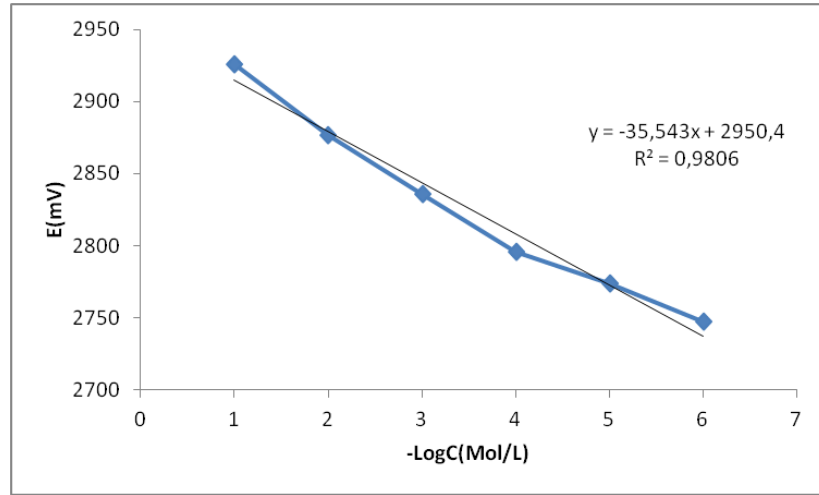
Hazırlanan kompozit katı-hal NH_4^+ -seçici elektrotlar, test edilmeden önce ana iyon çözeltilerinde ($\text{NH}_4^+\text{NO}_3^-$), şartlanmaya (doyurulmaya) bırakıldı. Daha sonra hazırlanan kompozit katı-hal NH_4^+ -seçici elektrotlar 1×10^{-1} M ve 1×10^{-6} M NH_4^+ konsantrasyonları arasında test edilerek karakteristik özellikleri incelendi. Ölçümler arasında elektrodun deiyonize su ile yıkanmasına dikkat edildi. Amonyum elektrodun zamana bağlı ve NH_4^+ konsantrasyonunun değişimine karşı elde edilen potansiyel değişimi Şekil 4. 2' de görülmektedir.



Şekil 4. 2. NH_4^+ -seçici elektrodun $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ ve $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ NH_4^+ çözeltisine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı

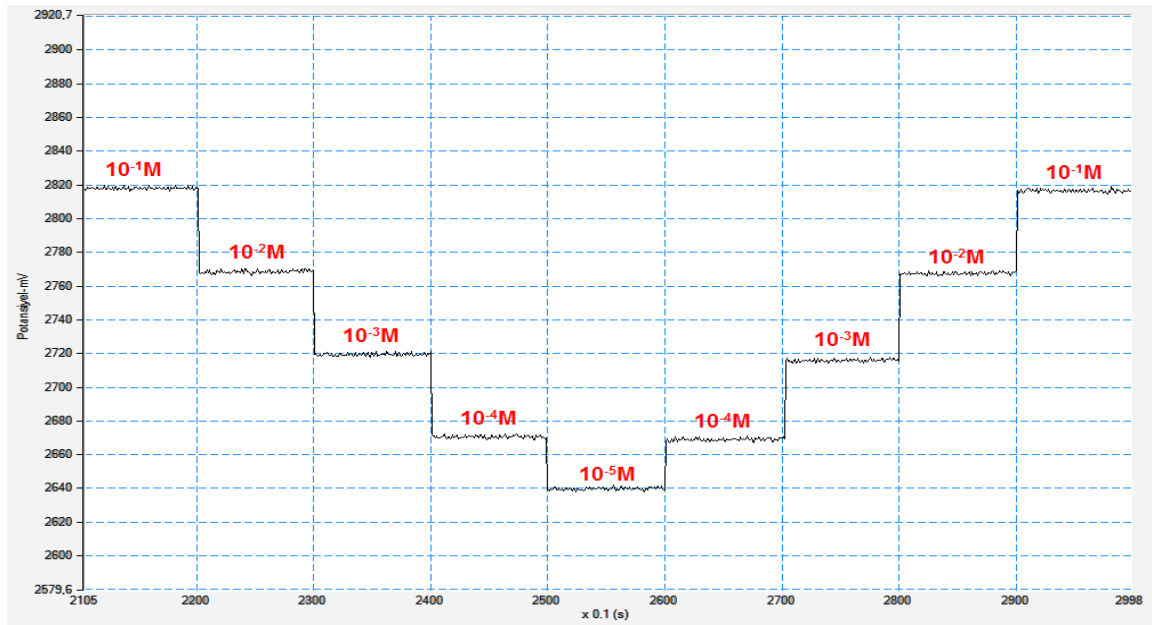
NH_4^+ konsantrasyonunun değişimine karşı ölçülen potansiyel değişimi incelediğimizde değerlerin Nernst denkleminde uygunluk gösterdiği görülmektedir. Elektrodun NH_4^+ iyonunun 1×10^{-1} - $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ aralığında konsantrasyon değişimlerine karşı doğrusal cevap sergilediği görülmektedir. Aynı zamanda elektrodun 5 saniyeden daha az cevap zamanı ve uzun süre kullanım ömrüne sahip olduğu gözlemlenmiştir.

NH_4^+ -seçici elektrodun değişen konsantrasyon değerlerine karşı gösterdiği doğrusallık Şekil 4. 3' de görülmektedir.

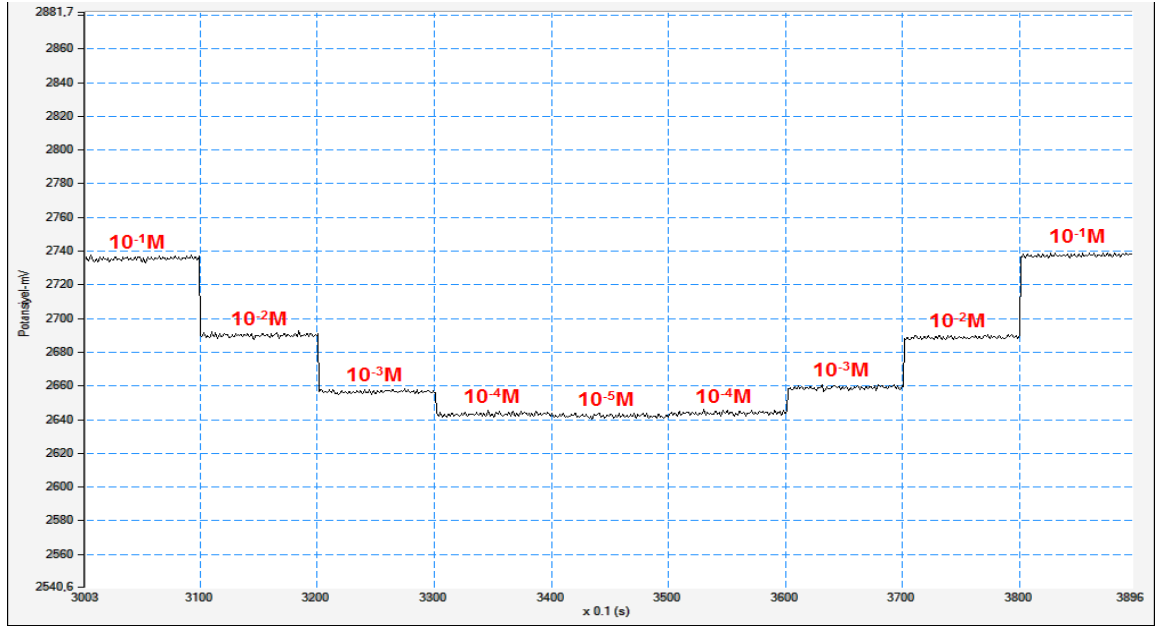


Şekil 4. 3. NH_4^+ -seçici elektrodun kalibrasyon grafiği

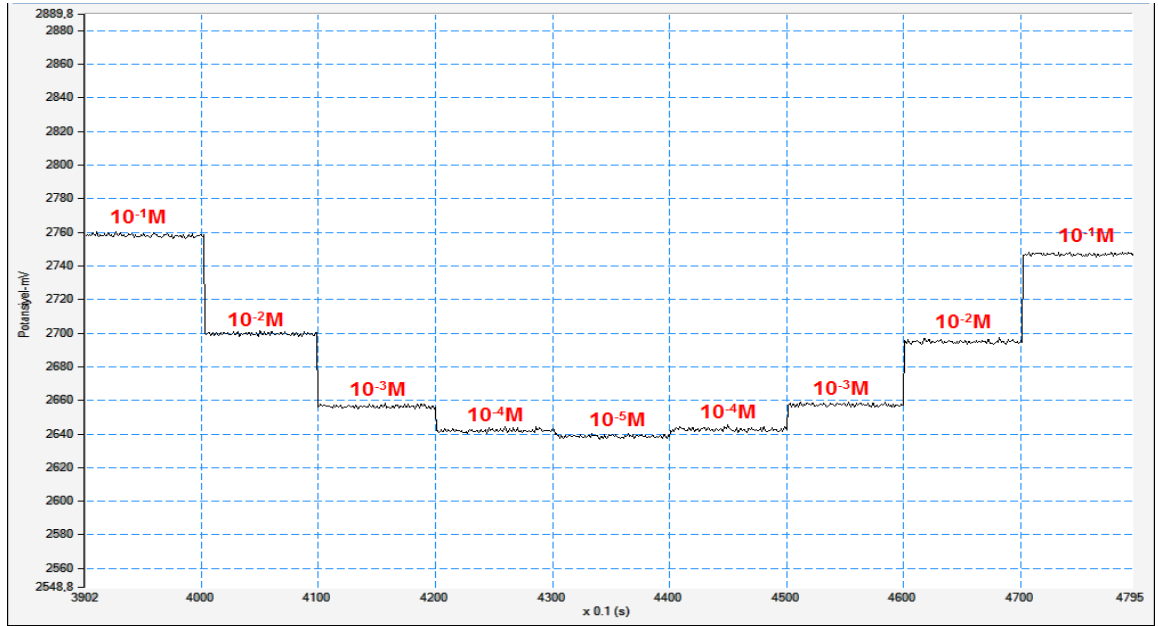
Kompozit amonyum elektrodun girişim yapma ihtimali yüksek olan K^+ , Na^+ ve Ca^{2+} iyonlarına karşı potansiyel değerleri ölçüldü. Amonyum elektrodun bu iyonlarının $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ ve $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ arası çözeltilerine verdiği potansiyometrik davranışlar Şekil 4. 4-6' de görülmektedir.



Şekil 4. 4. NH_4^+ -seçici elektrodun $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ ve $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ K^+ iyonuna karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı



Şekil 4. 5. NH_4^+ -seçici elektrodun $1 \times 10^{-1}\text{M}$ ve $1 \times 10^{-5}\text{M}$ Na^+ iyonuna karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı

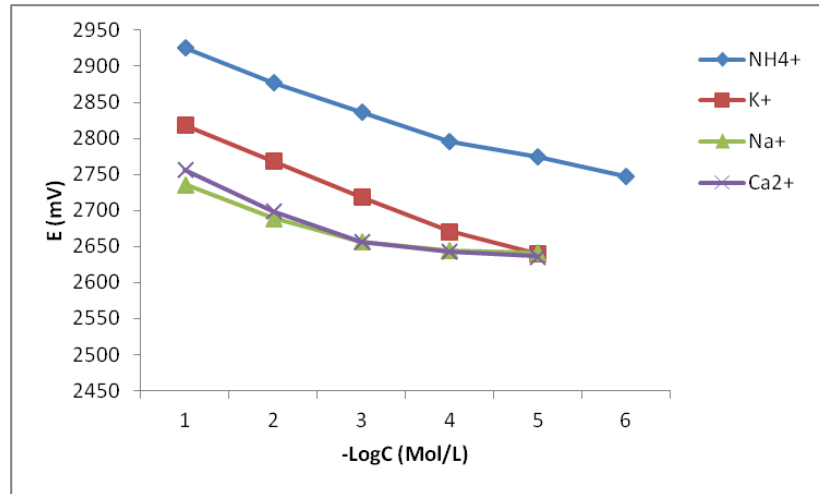


Şekil 4. 6. NH_4^+ -seçici elektrodun $1 \times 10^{-1}\text{M}$ ve $1 \times 10^{-5}\text{M}$ Ca^{2+} iyonuna karşı gösterdiği potansiyometrik davranışı

NH_4^+ -seçici elektrodun bu iyonlara karşı sergilediği potansiyel değerleri izelge 4. 2’ de ve bu değerlerin kalibrasyon grafikleri de şekil 4. 7’ de görülmektedir.

Çizelge 4. 2. Amonyum elektrodunun, NH_4^+ ve diğer iyonların (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) 1×10^{-1} M ve 1×10^{-5} M konsantrasyon derişimlerine karşı sergilediği potansiyel değerleri

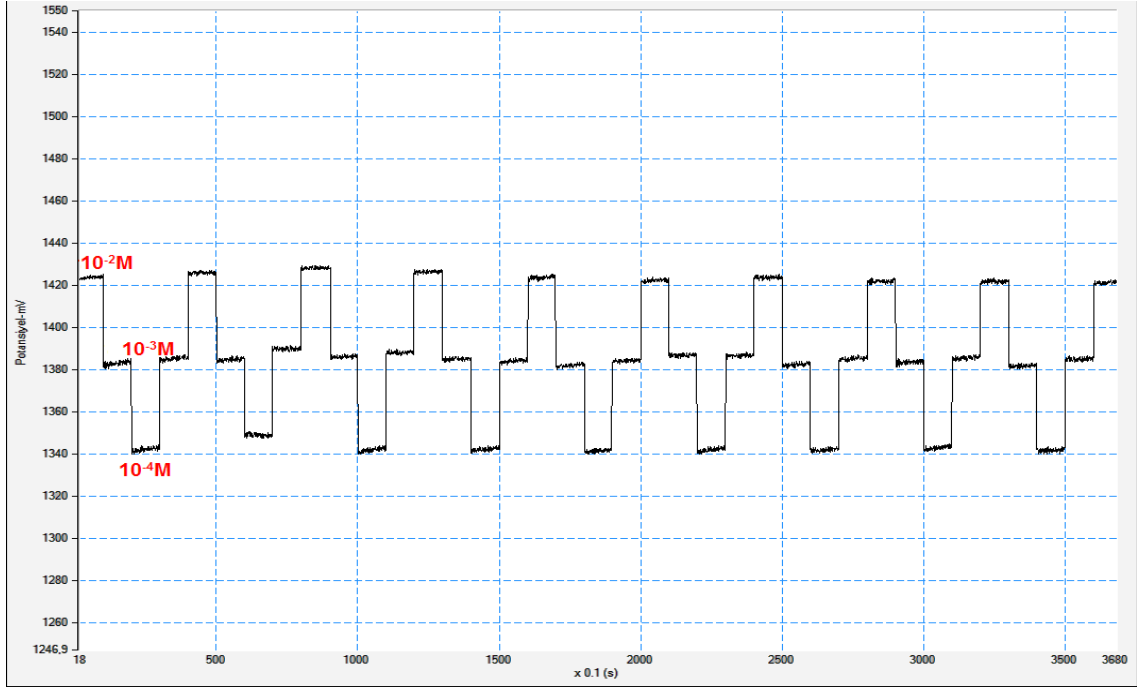
-LogC (mol/L)	NH_4^+	Ca^{2+}	K^+	Na^+
1	2926	2757	2818	2736
2	2877	2699	2768	2689
3	2836	2656	2719	2657
4	2796	2643	2671	2645
5	2774	2636	2640	2641
6	2747	-	-	-



şekil 4. 7. NH_4^+ -seçici elektrodun NH_4^+ iyonu yanında Ca^{2+} , K^+ ve Na^+ iyonlarının 1×10^{-1} M ve 1×10^{-5} M konsantrasyon derişimlerine karşı sergilediği doğrusallık

şekil 4. 7 incelendiğinde amonyum elektrodun K^+ iyonuna 1×10^{-1} M ile 1×10^{-5} M arasında, Na^+ ve Ca^{2+} iyonlarına 1×10^{-1} M ile 1×10^{-5} M arasında doğrusal çalışma aralığı göstermektedir. Ancak NH_4^+ elektrodun NH_4^+ iyonuna bu iyonlardan daha fazla seçici davrandığı görülmektedir.

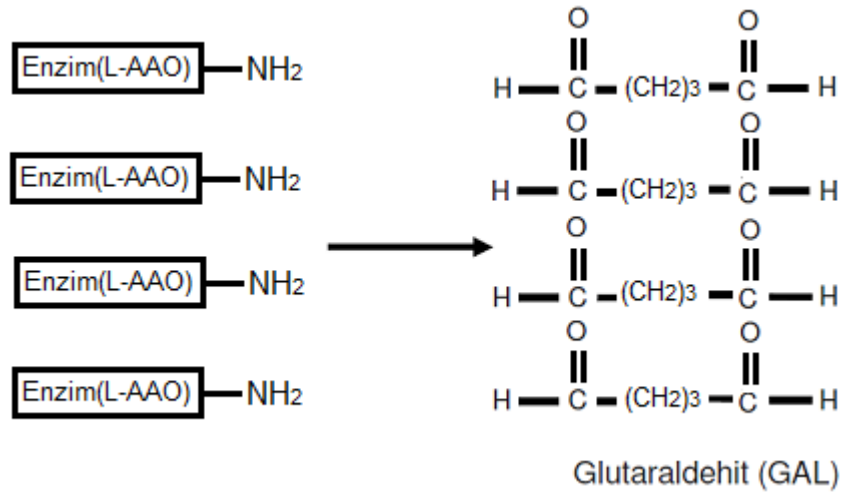
Şekil 4. 8 kompozit NH_4^+ -seçici elektrodun tekrarlanabilirliğini göstermektedir. 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} M NH_4^+ çözeltileri kullanılarak alınan ölçümlerde elde edilen ortalama potansiyel değerleri sırasıyla $1384,9 \pm 4,7$, $1349,4 \pm 5,4$ ve $1318,0 \pm 7,0$ mV olarak hesaplanmıştır.



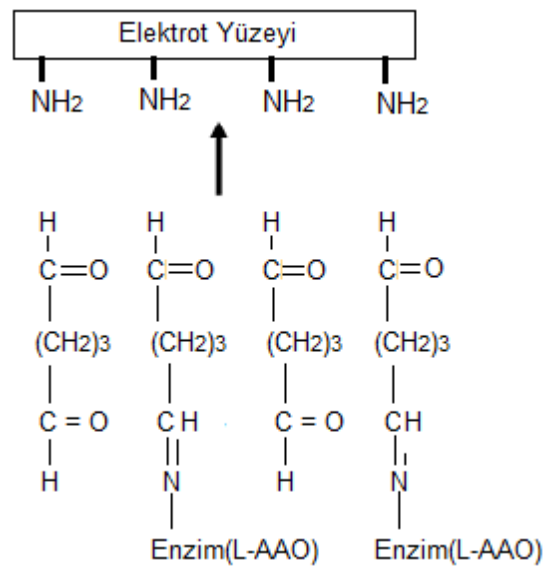
Şekil 4. 8. NH_4^+ -seçici elektrodun 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} M NH_4^+ çözeltileri ölçülerek elde edilen potansiyometrik tekrarlanabilirliği

Elde edilen sonuçlara göre NH_4^+ -seçici elektrodun biyosensör yapımında temel sensör olarak başarıyla uygulanabileceği tespit edilmiştir. Bu sebeble, performansları test edildikten sonra en uygun amonyum elektrot seçildi ve enzim molekülünün (L-AAO), çapraz bağlayıcı reaktif olan glutaraldehit ile amonyum elektroda bağlanması sağlandı.

Şekil 4 .9 ve Şekil 4. 10 'de, enzim molekülünün (L-AAO) glutaraldehit molekülüne bağlanması ve amonyum elektrodunun yüzeyine glutaraldehit ile bağlanmış enzim molekülünün tutturulması mekanizması görülmektedir.

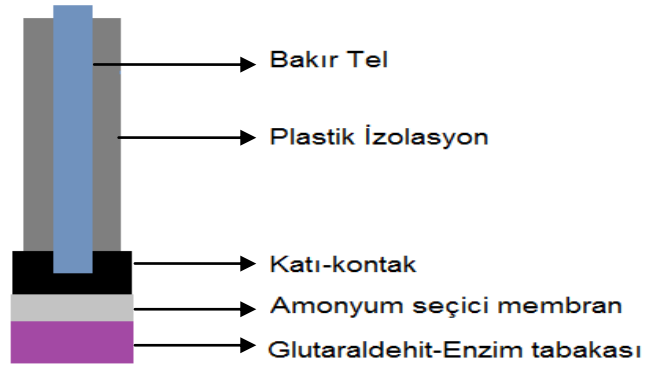


Şekil 4. 9. Enzim molekülü ile glutaraldehit molekülünün bağlanması (Işıldak ve Işıldak, 2013)



Şekil 4. 10. Amonyum elektrodunun yüzeyine, glutaraldehit ile bağlanmış enzim molekülünün (L-AAO) tutturulması (Işıldak ve Işıldak, 2013; Emrullah, 2013)

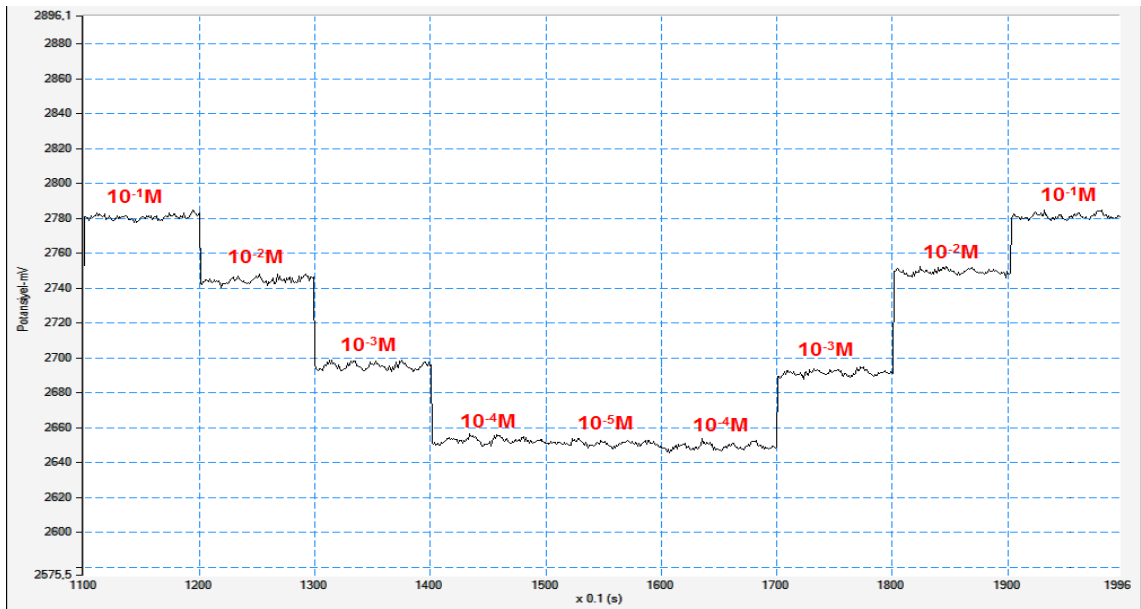
Son aşamada hazırlanan biyosensörün şematize edilmiş gösterimi Şekil 4. 11’ da verilmiştir.



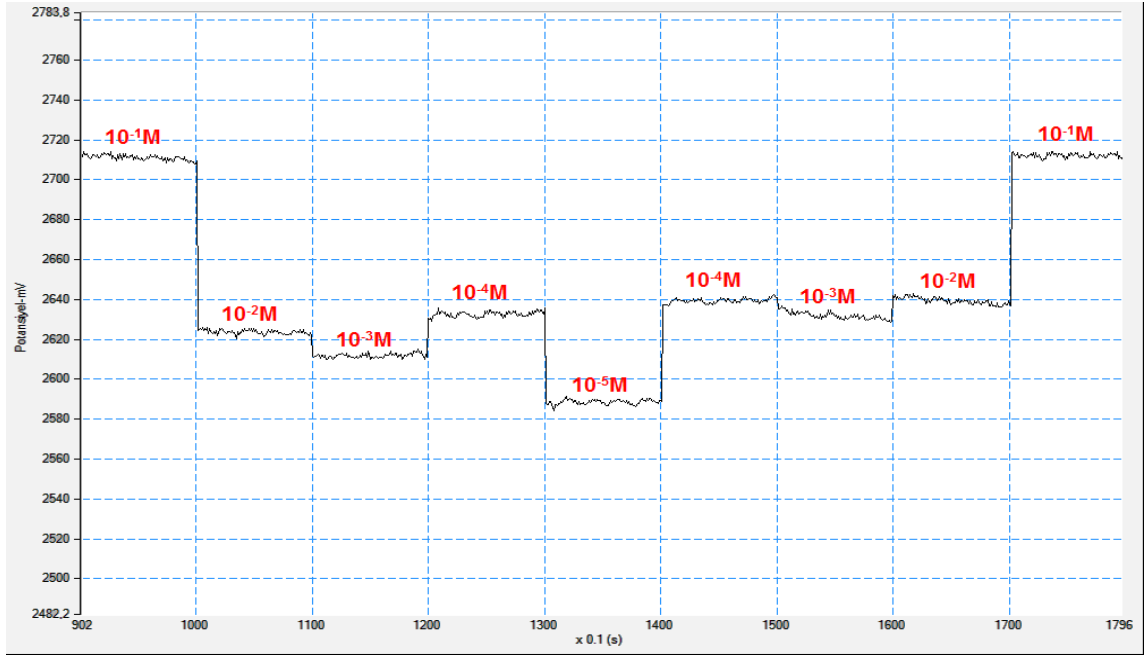
Şekil 4. 11. Biyosensörün şematik gösterimi

4. 1. 2. Biyosensörün Deiyonize Suda Hazırlanan Amino Asit Çözeltilerine Karşı Potansiyel Davranışları

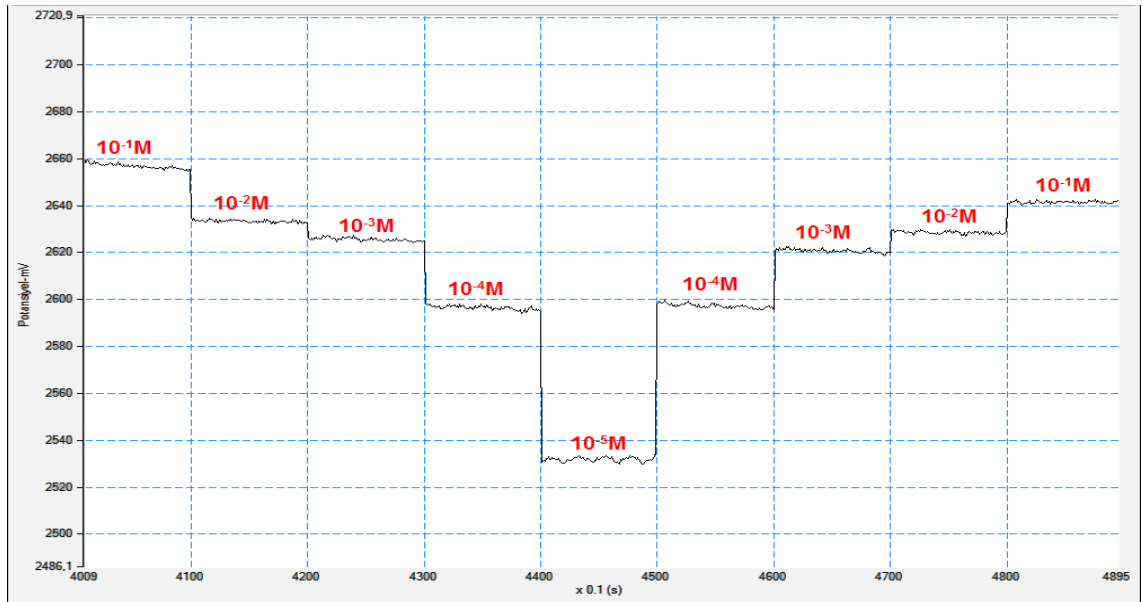
Hazırlanan biyosensörün durgun ortamda amino asit çözeltilerine karşı potansiyometrik davranışları incelendi. Ölçümler amino asitlerin $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ – $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ arası deiyonize suda çözünmüş çözeltileri kullanılarak yapıldı. Şekil 4. 12-24' de amino asitlerin zamana karşı potansiyometrik değişimlerinin olduğu grafikler görülmektedir.



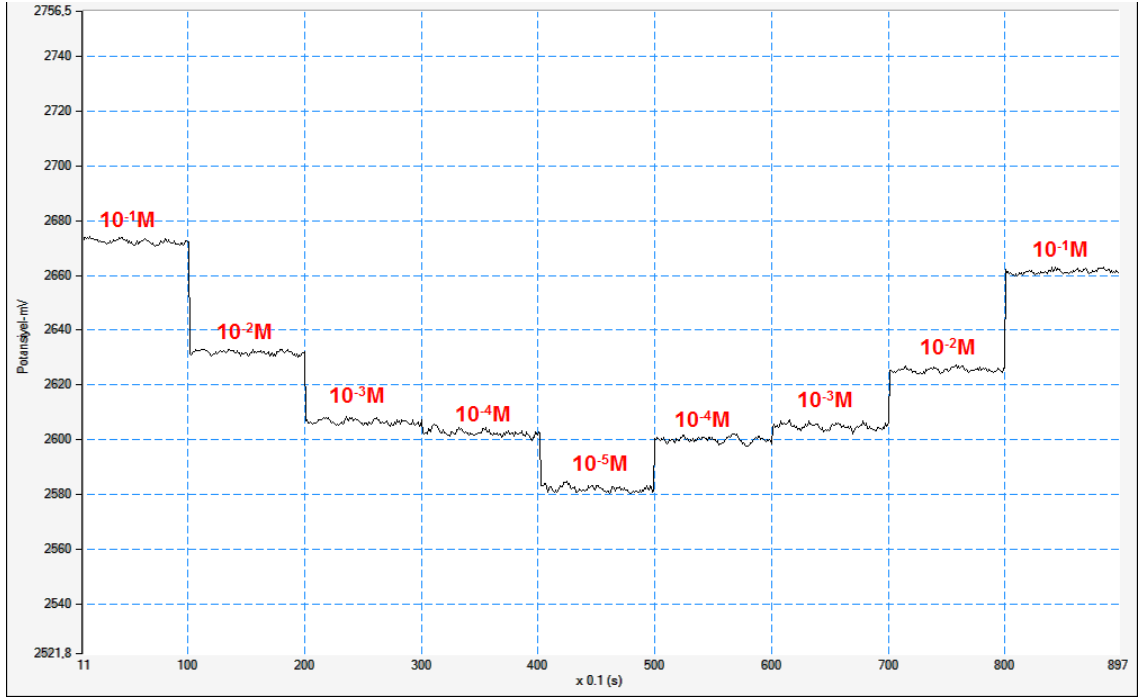
Şekil 4. 12. Biyosensörün durgun ortamda alaninin 1×10^{-1} – $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



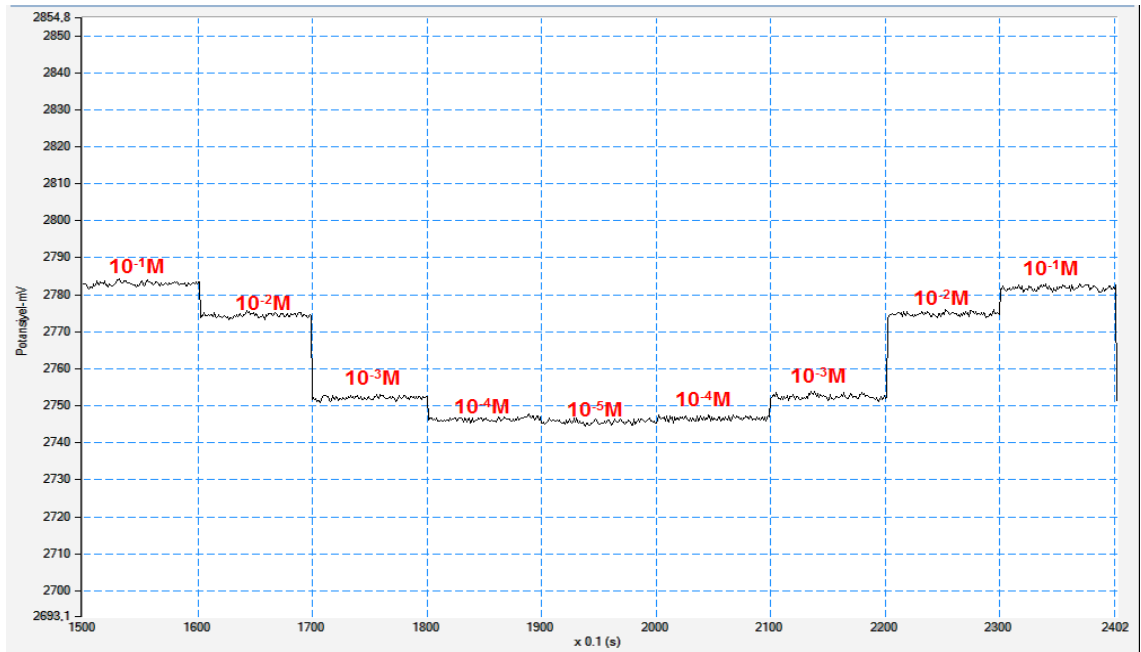
Şekil 4. 13. Biyosensörün durgun ortamda arjinin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} M$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



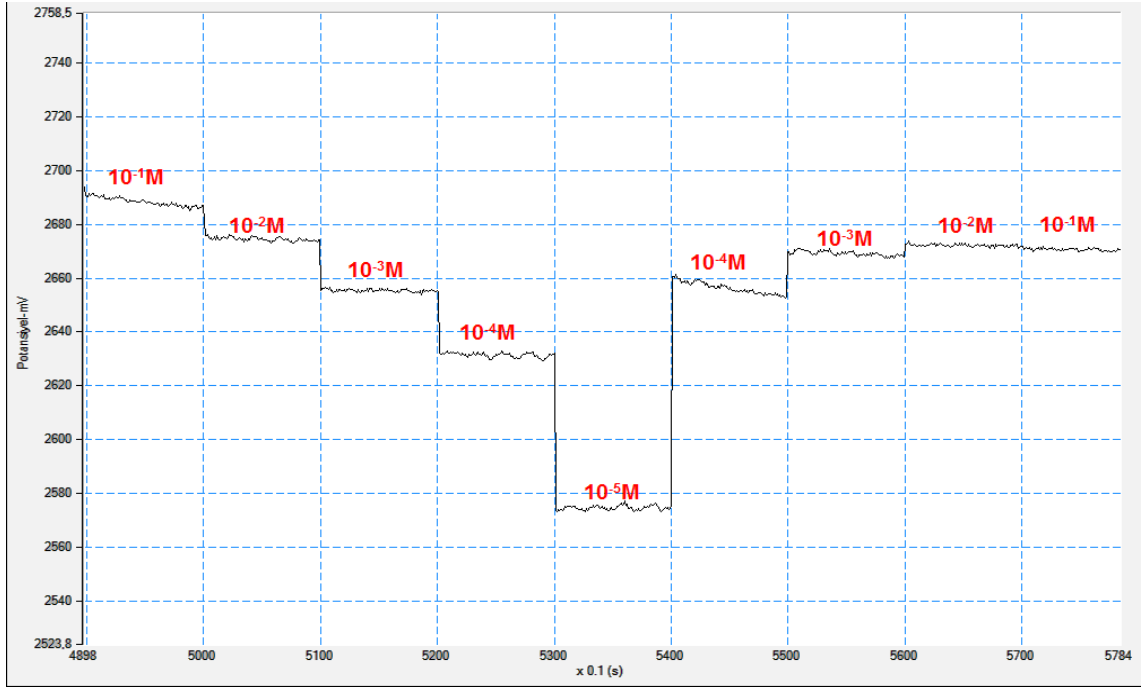
Şekil 4. 14. Biyosensörün durgun ortamda aspartik asidin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} M$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



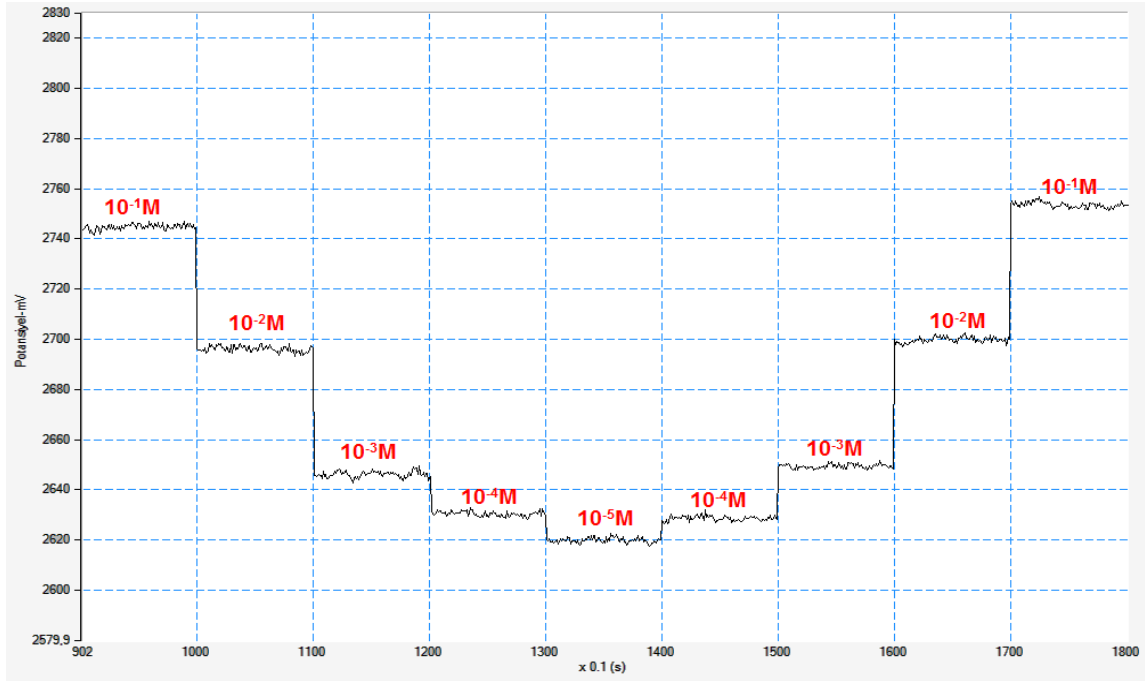
Şekil 4. 15. Biyosensörün durgun ortamda fenilalaninin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} M$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



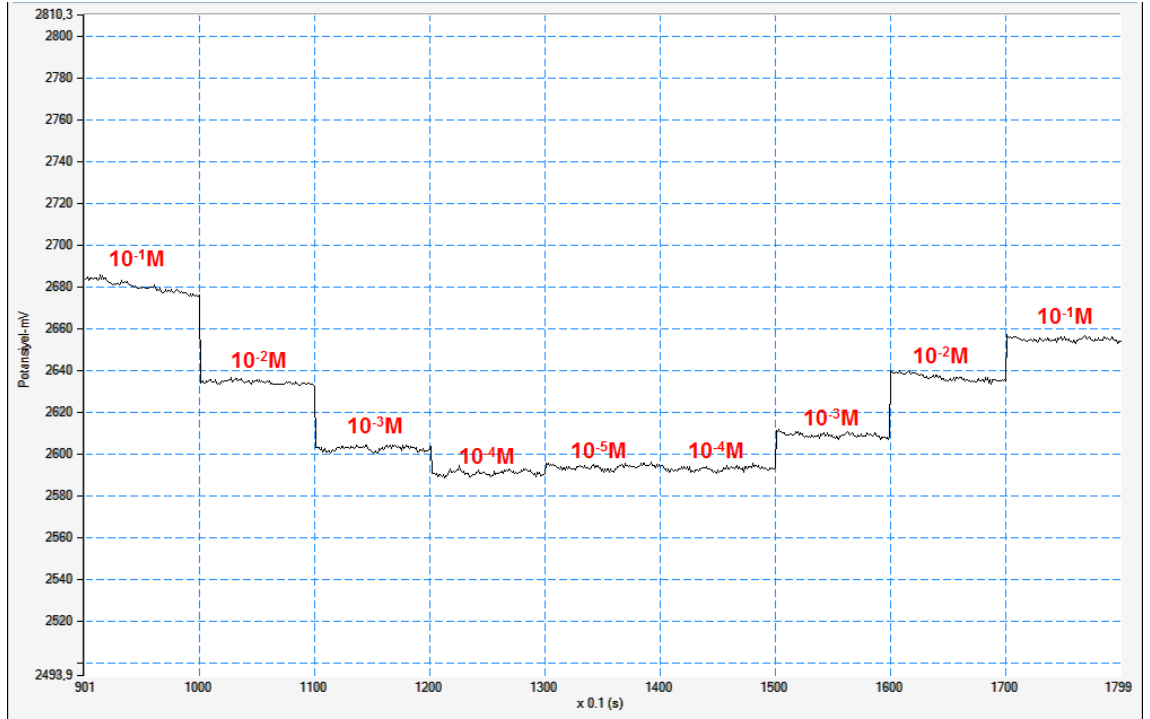
Şekil 4. 16. Biyosensörün durgun ortamda glisininin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} M$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



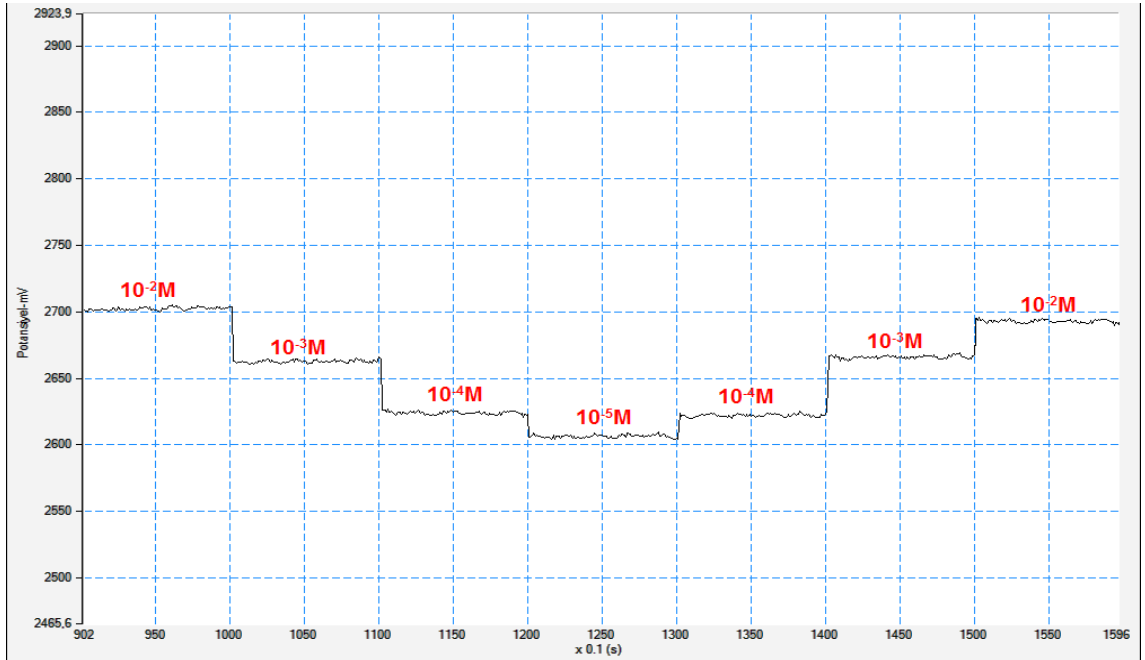
Şekil 4. 17. Biyosensörün durgun ortamda glutamik asidin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} M$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



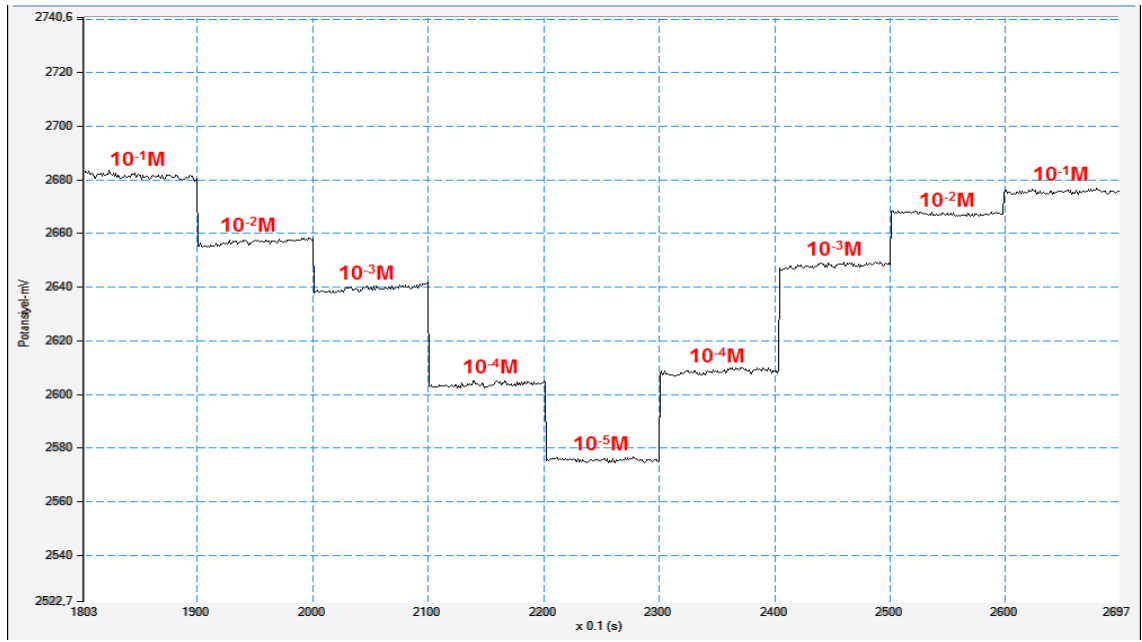
Şekil 4. 18. Biyosensörün durgun ortamda glutaminin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} M$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



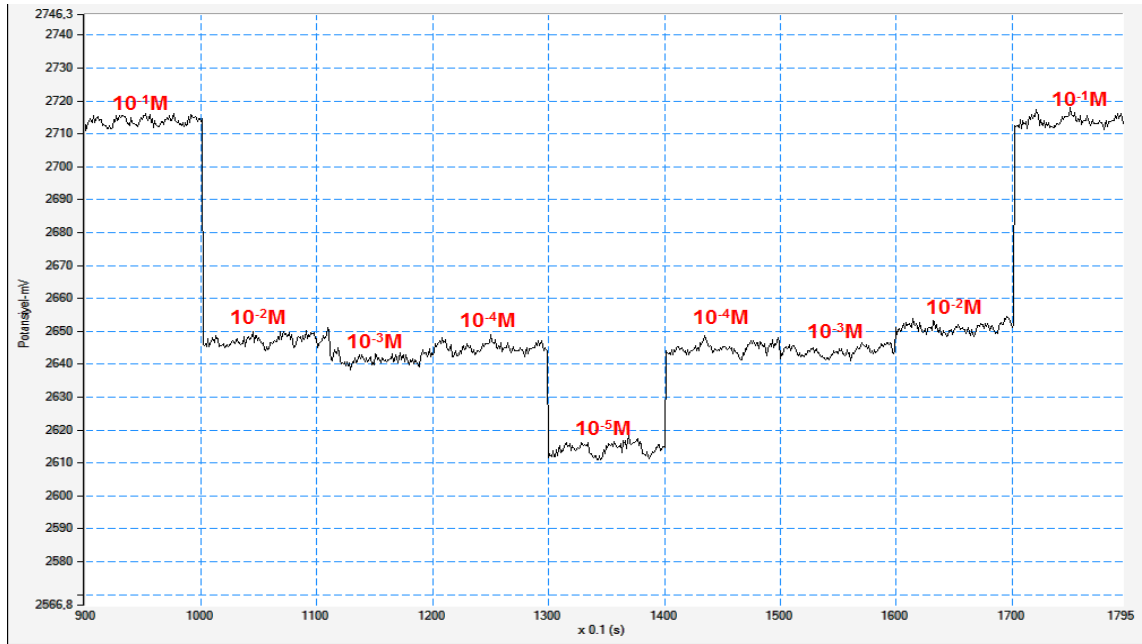
Şekil 4. 19. Biyosensörün durgun ortamda histidinin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



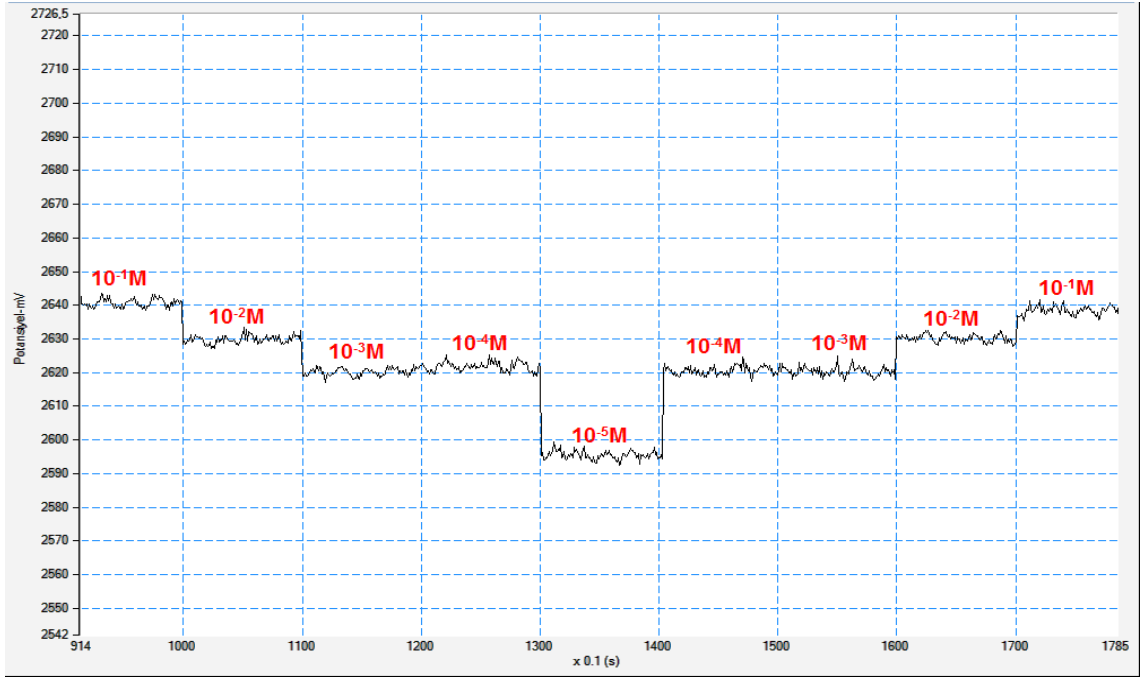
Şekil 4. 20. Biyosensörün durgun ortamda izolösinin $1 \times 10^{-2} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



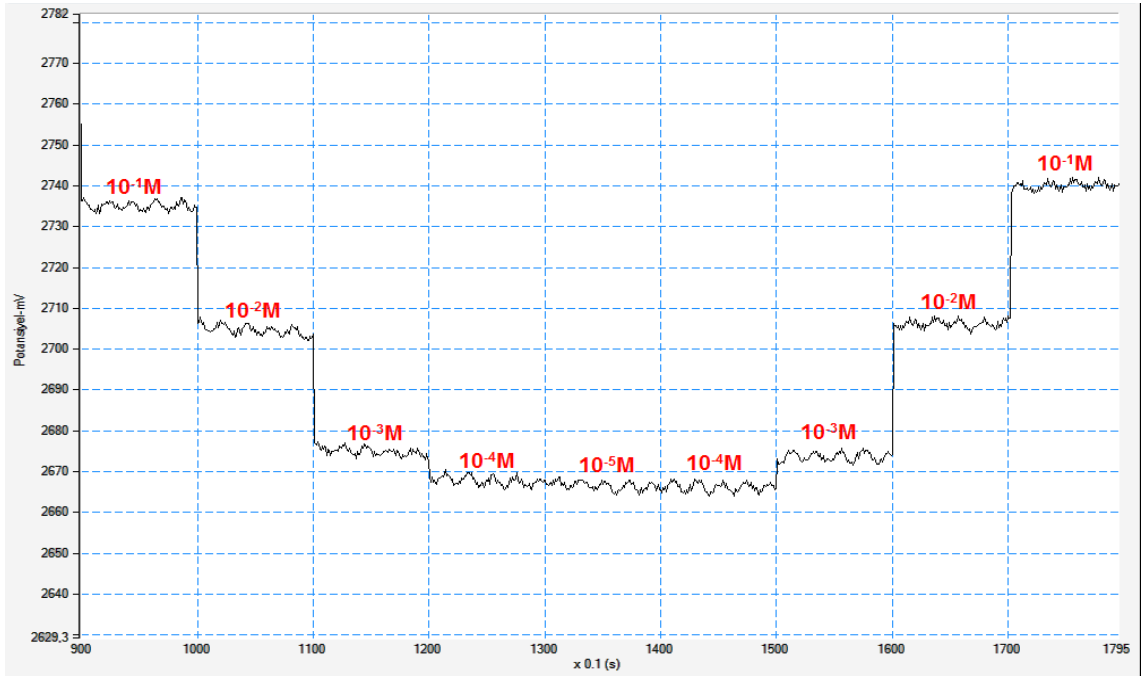
Şekil 4. 21. Biyosensörün durgun ortamda lizinin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} M$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



Şekil 4. 22. Biyosensörün durgun ortamda lösinin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} M$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



Şekil 4. 23. Biyosensörün durgun ortamda tirozinin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



Şekil 4. 24. Biyosensörün durgun ortamda valininin $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı

Biyosensörün deiyonize suda hazırlanan amino asitlere verdiği potansiyometrik cevapları incelediğinde glisine 1×10^{-1} M - 1×10^{-5} M konsantrasyon aralığında doğrusal çalışma aralığı göstermiş ancak 1×10^{-4} M ile 1×10^{-5} M arasında az potansiyel fark vermiştir. İzolösine 1×10^{-2} M - 1×10^{-5} M konsantrasyon aralığında doğrusal çalışma aralığı göstermektedir. Valin, alanin ve histidine 1×10^{-1} M - 1×10^{-4} M konsantrasyon aralığında doğrusal çalışma aralığı göstermektedir. Glutamin ve lizine 1×10^{-1} - 1×10^{-5} M konsantrasyon aralığında doğrusal çalışma aralığı göstermektedir. Fenilalanine 1×10^{-1} - 1×10^{-5} M konsantrasyon aralığında doğrusal çalışma aralığı göstermiş ancak 1×10^{-3} M ile 1×10^{-4} M arasında az bir potansiyel fark sergilemiştir. Aspartik asit için 1×10^{-5} M konsantrasyona geçişte potansiyel farkta artış gözlenmiştir. Glutamik asit için de benzer durum gözlenmiştir ve konsantrasyon artışına doğru potansiyel değişiminde bir düzensizlik bulunmaktadır. Elektrodun dengeye gelmesi gecikmektedir. Arjinin için elektrotun davranışı düzensizdir. Benzer durum lösinde de gözlemlenmiştir. Tirozin için elde edilen potansiyel değişimler az olmakta ancak bir doğrusal değişim göstermektedir. Elde edilen potansiyel değerler Çizelge 4. 3 ve Çizelge 4. 4' de verilmiştir

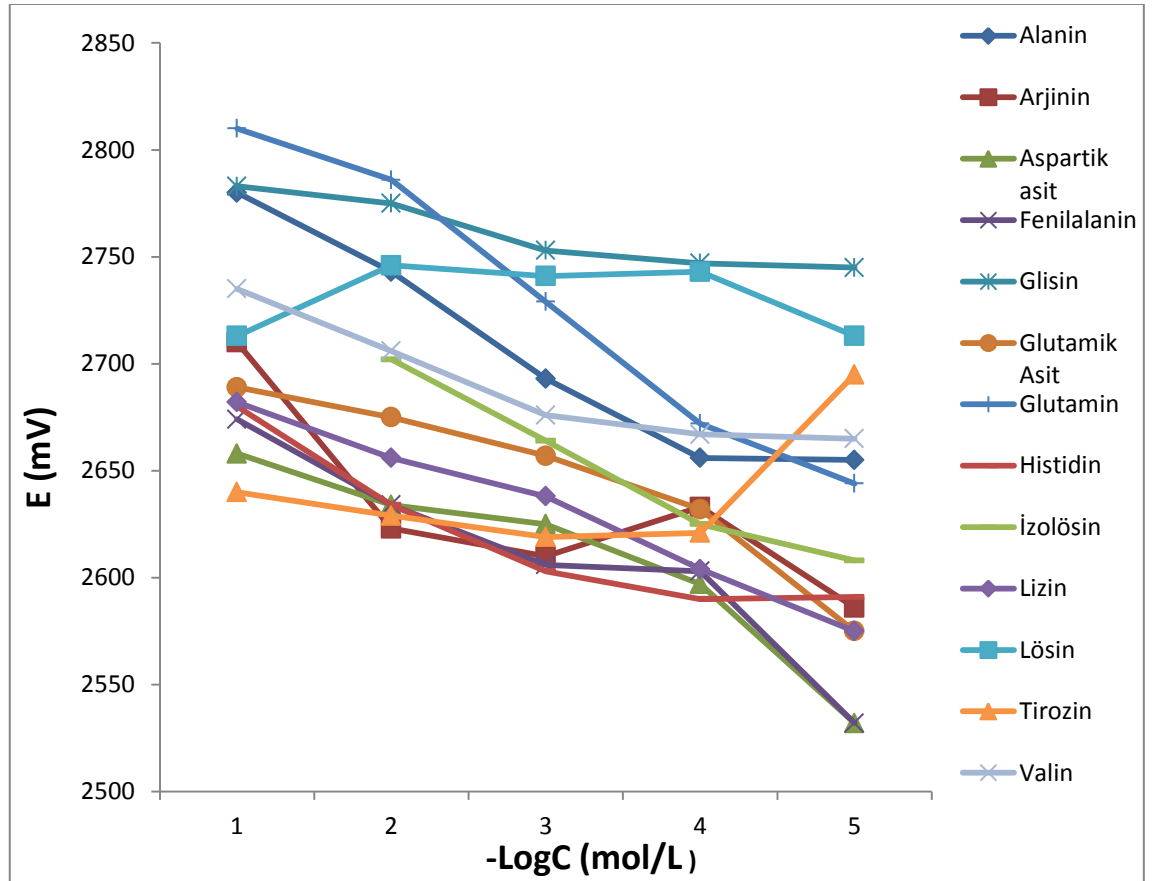
Çizelge 4. 3. Biyosensörün deiyonize suda hazırlanan amino asit çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarına karşı verdiği potansiyel değerleri (mV)

-LogC (mol/L)	Alanin	Arjinin	Aspartik Asit	Fenilalanin	Glisin	Glutamik Asit	Glutamin
1	2780	2710	2658	2674	2783	2689	2810
2	2743	2623	2634	2634	2775	2675	2786
3	2693	2610	2625	2606	2753	2657	2729
4	2656	2633	2597	2603	2747	2632	2672
5	2655	2586	2532	2582	2745	2575	2644

Çizelge 4. 4. Biyosensörün deiyonize suda hazırlanan amino asit çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarına karşı verdiği potansiyel değerleri (mV)

-LogC (mol/L)	Histidin	İzolösin	Lizin	Lösin	Tirozin	Valin
1	2680	-	2682	2713	2640	2735
2	2634	2702	2656	2746	2629	2706
3	2603	2664	2638	2741	2619	2676
4	2590	2625	2604	2743	2621	2667
5	2591	2608	2575	2713	2695	2665

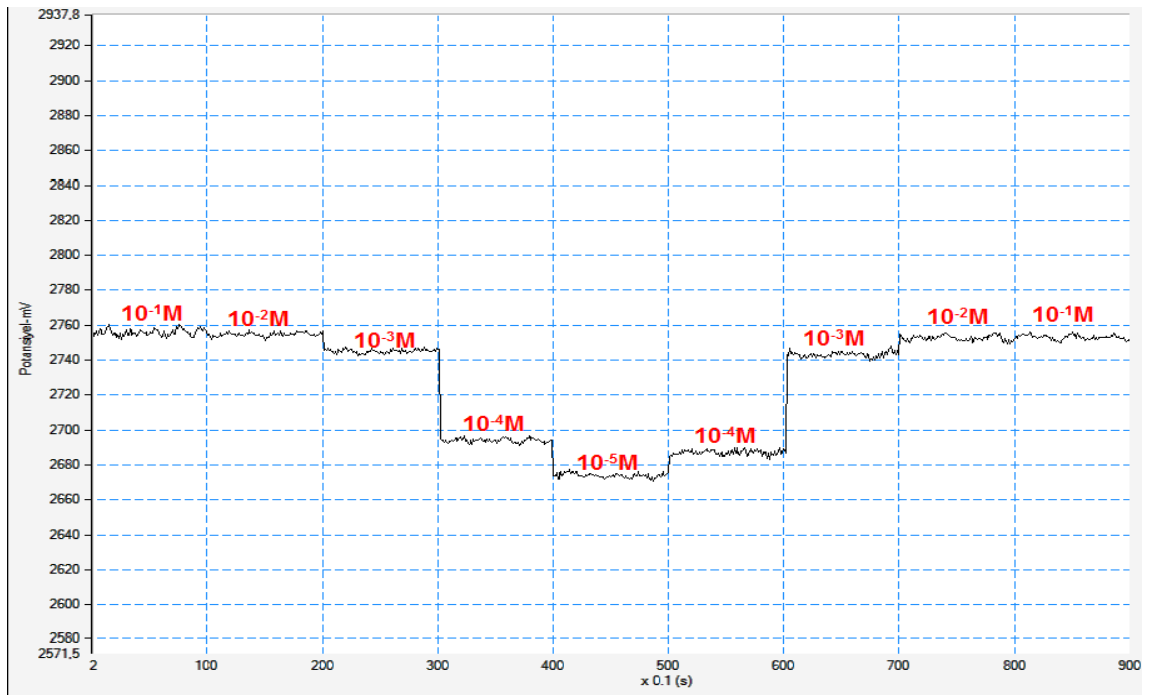
Amino asitlerin değişik konsantrasyonlara karşı gösterdiği potansiyel değişim Şekil 4. 25' de görülmektedir.



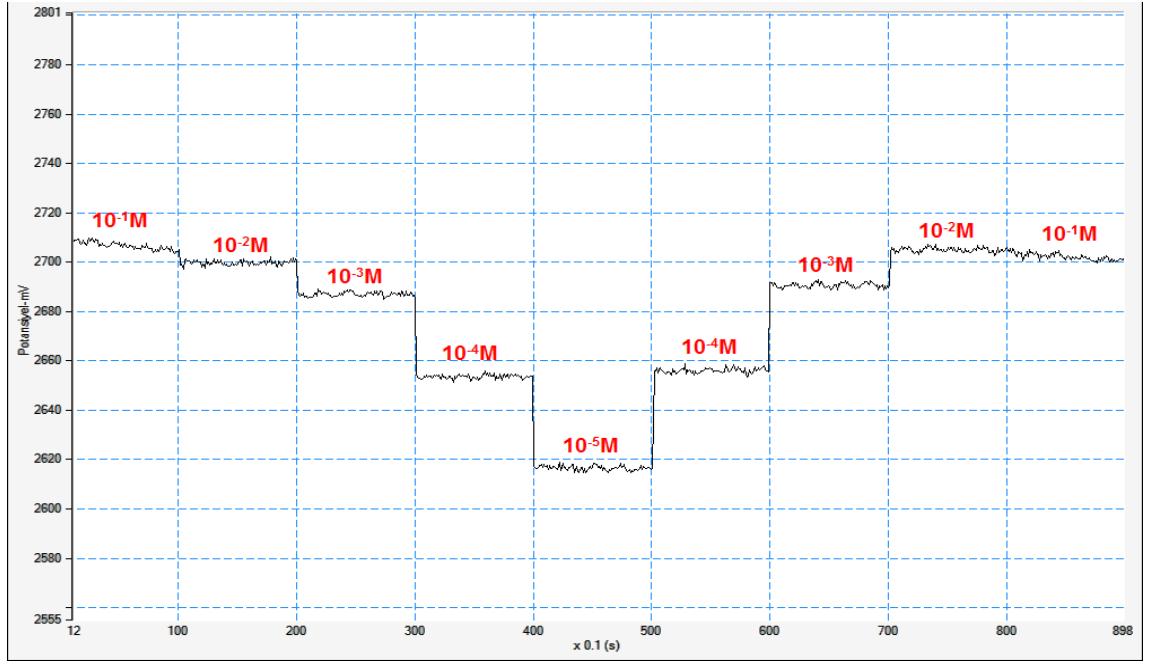
Şekil 4. 25. Deiyonize suda hazırlanan amino asitlerin değişik konsantrasyonlarda gösterdiği potansiyometrik davranışları

4. 1. 3. Biyosensörün pH' sı 7,02 Olan Fosfat Tamponunda Hazırlanan Amino Asit Çözeltilerine Karşı Potansiyel Davranışları

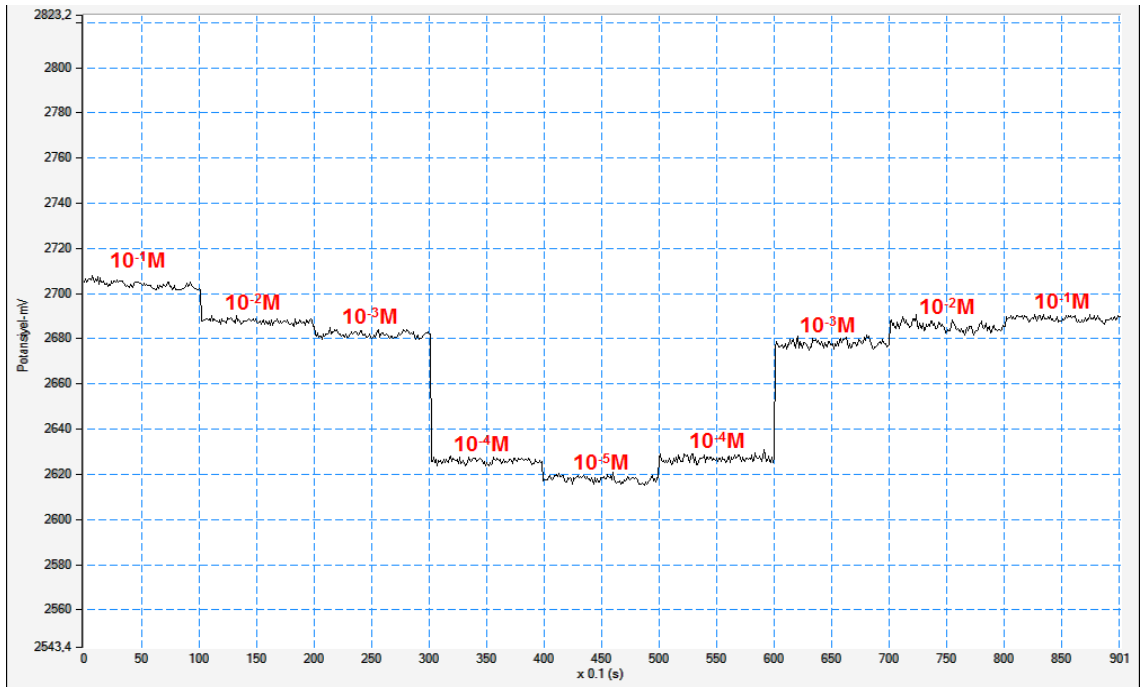
Hazırlanan biyosensörün pH'sı 7,02 ye ayarlanmış fosfat tamponu ile hazırlanan 1×10^{-1} - 1×10^{-5} M konsantrasyon aralığındaki amino asit çözeltilerine karşı sergiledikleri potansiyometrik davranışları incelendi. Aminoasitlerin konsantrasyon değişimlerine karşı biyosensörün sergilediği potansiyel değişimleri Şekil 4. 26-38' de görülmektedir.



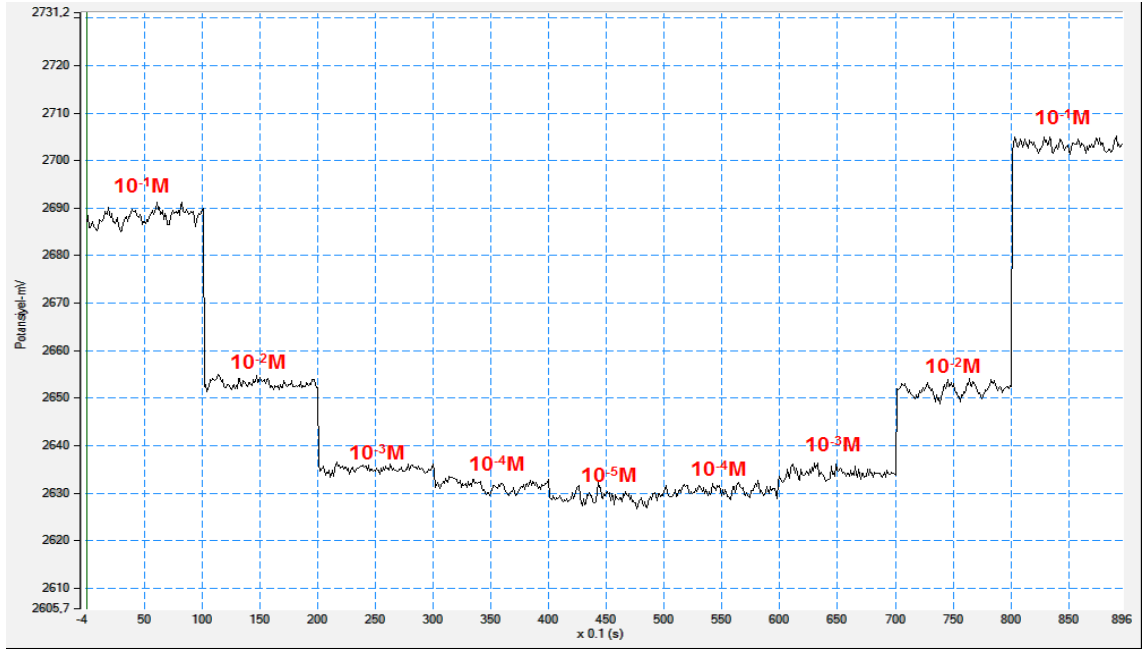
Şekil 4. 26. Biyosensörün alaninin fosfat tamponunda (pH: 7,02) 1×10^{-1} – 1×10^{-5} M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



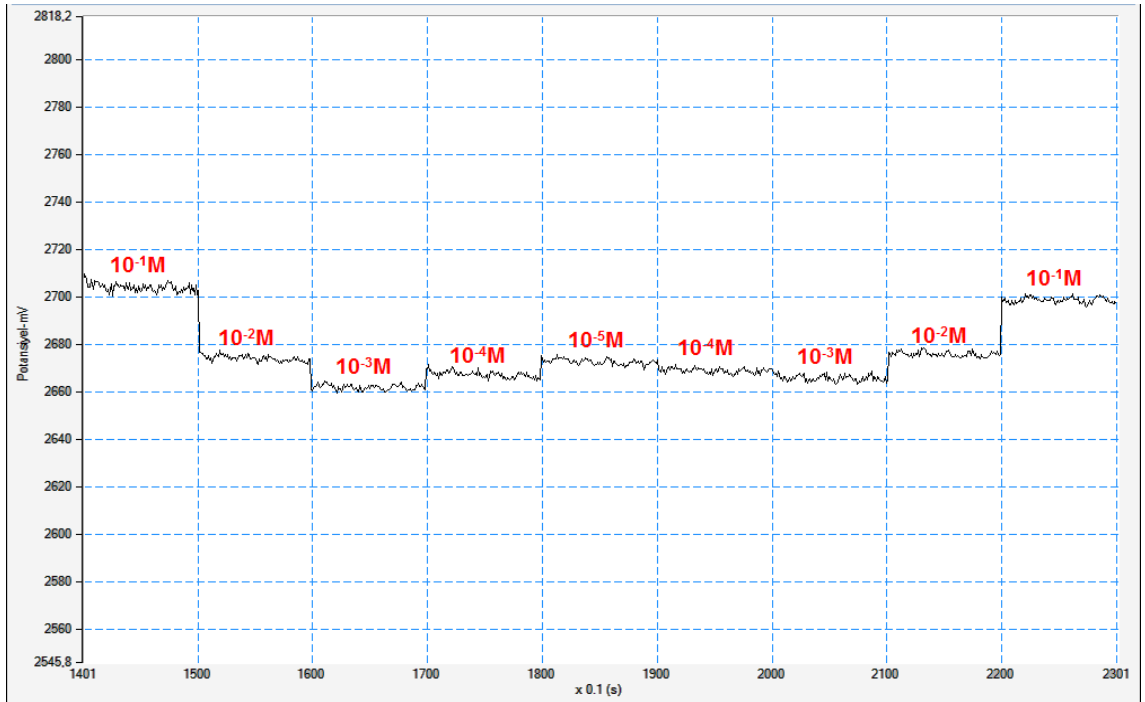
Şekil 4. 27. Biyosensörün arjininin fosfat tamponunda (pH: 7,02) 1×10^{-1} – 1×10^{-5} M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



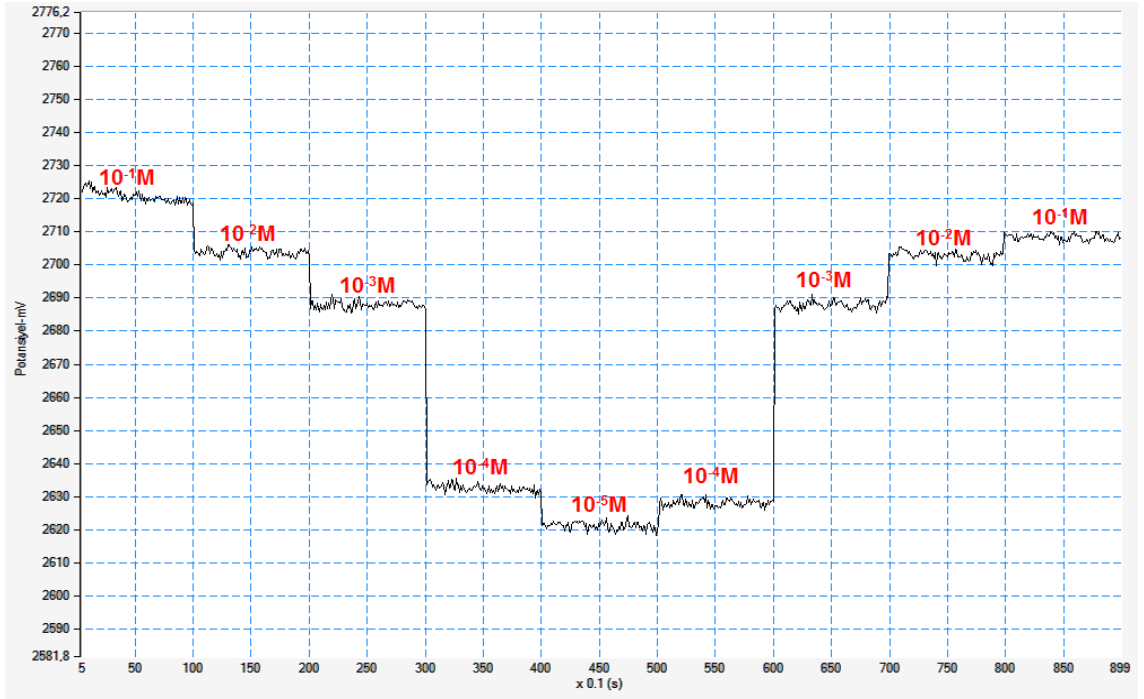
Şekil 4. 28. Biyosensörün aspartik asidin fosfat tamponunda (pH: 7,02) 1×10^{-1} – 1×10^{-5} M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



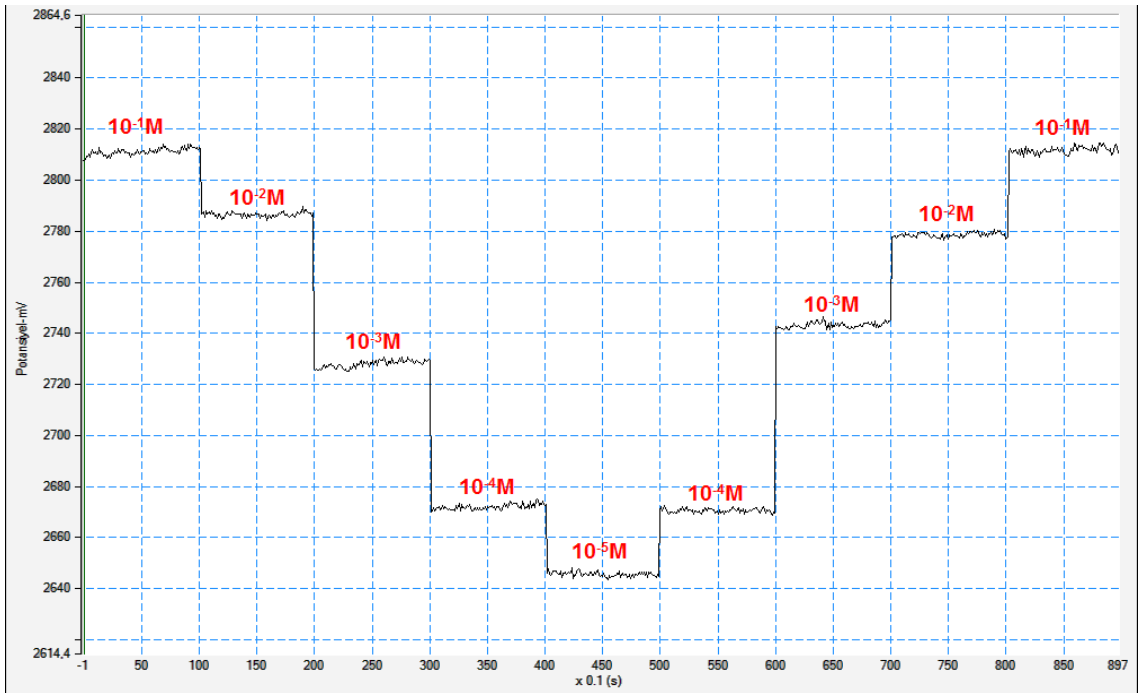
Şekil 4. 29. Biyosensörün fenilalaninin fosfat tamponunda (pH: 7,02) $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



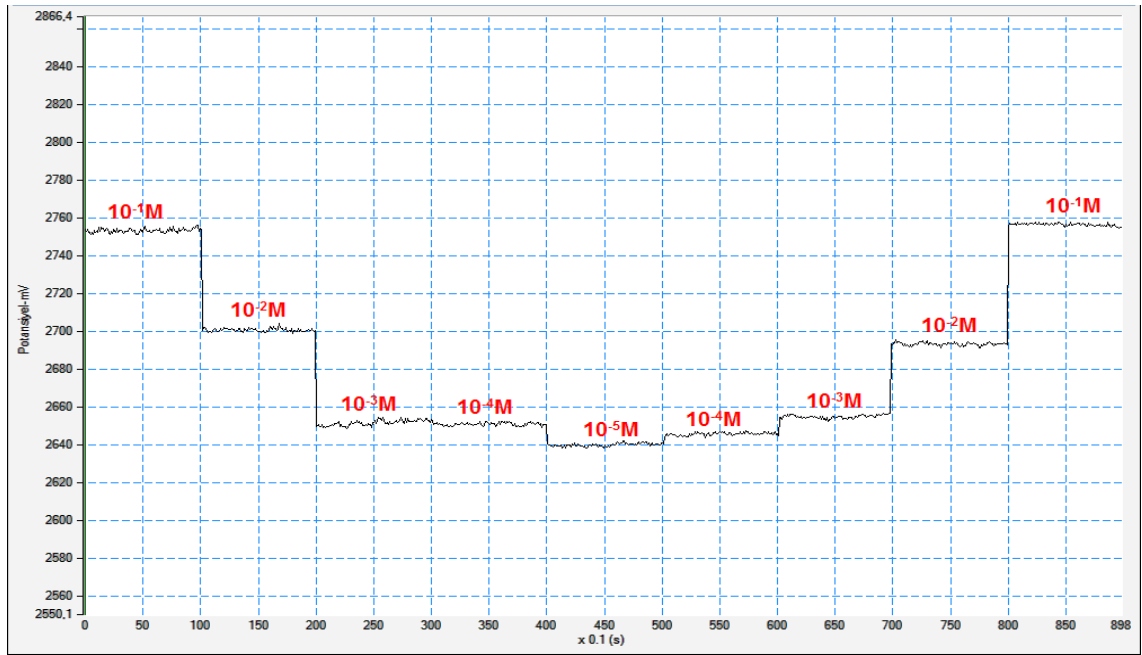
Şekil 4. 30. Biyosensörün glisinin fosfat tamponunda (pH: 7,02) $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



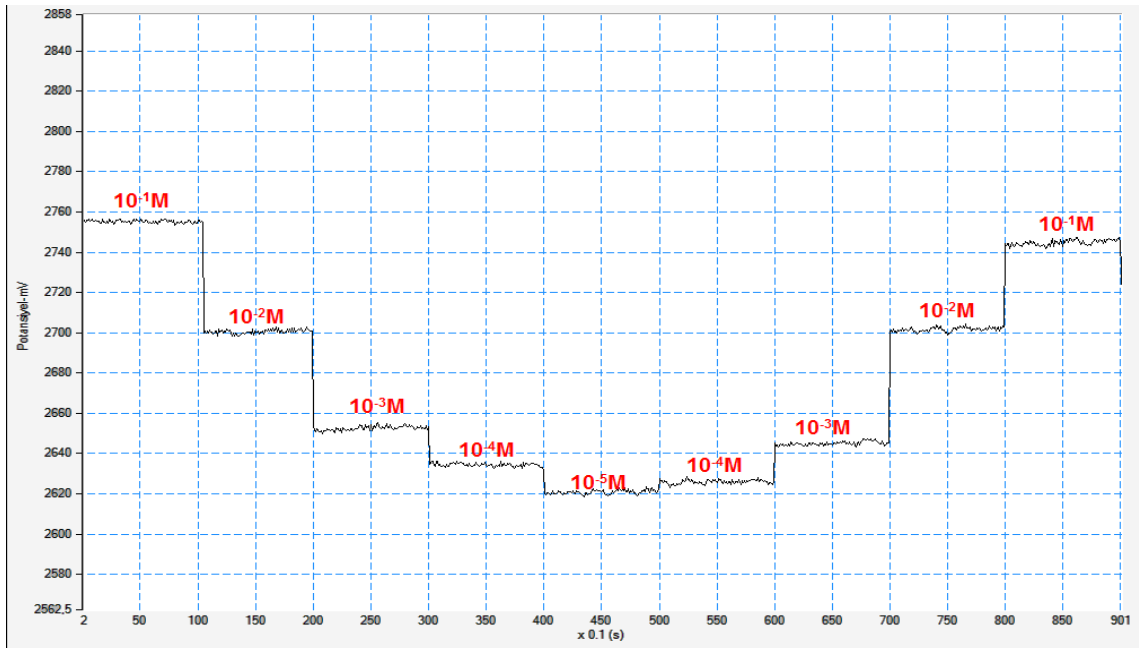
Şekil 4. 31. Biyosensörün glutamik asidin fosfat tamponunda (pH: 7,02) 1×10^{-1} – 1×10^{-5} M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



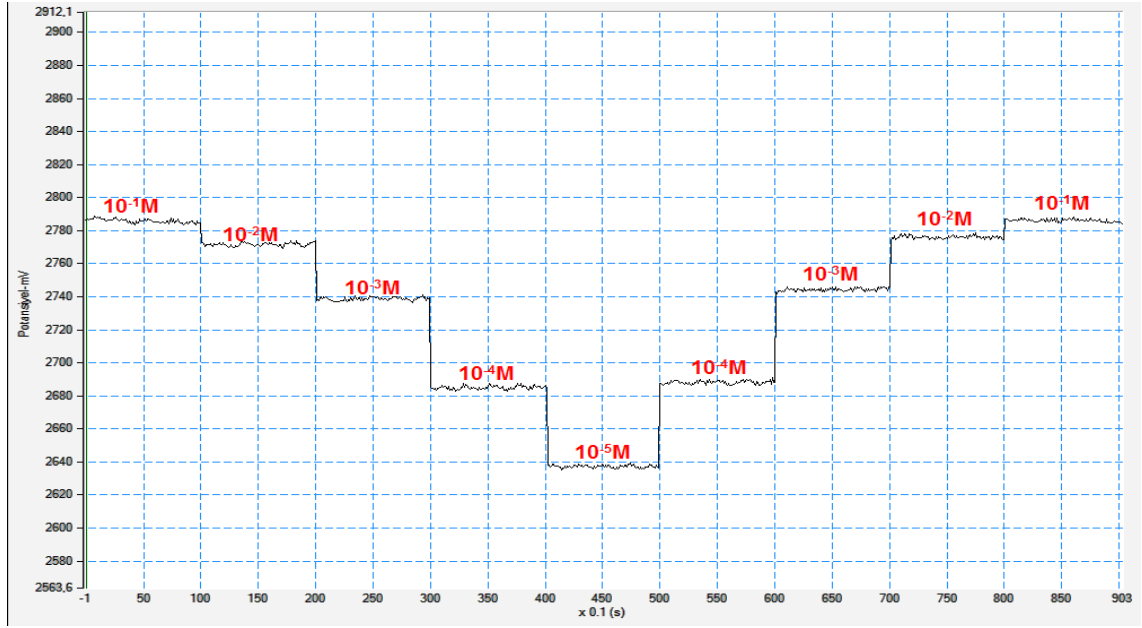
Şekil 4. 32. Biyosensörün glutaminin fosfat tamponunda (pH: 7,02) 1×10^{-1} – 1×10^{-5} M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



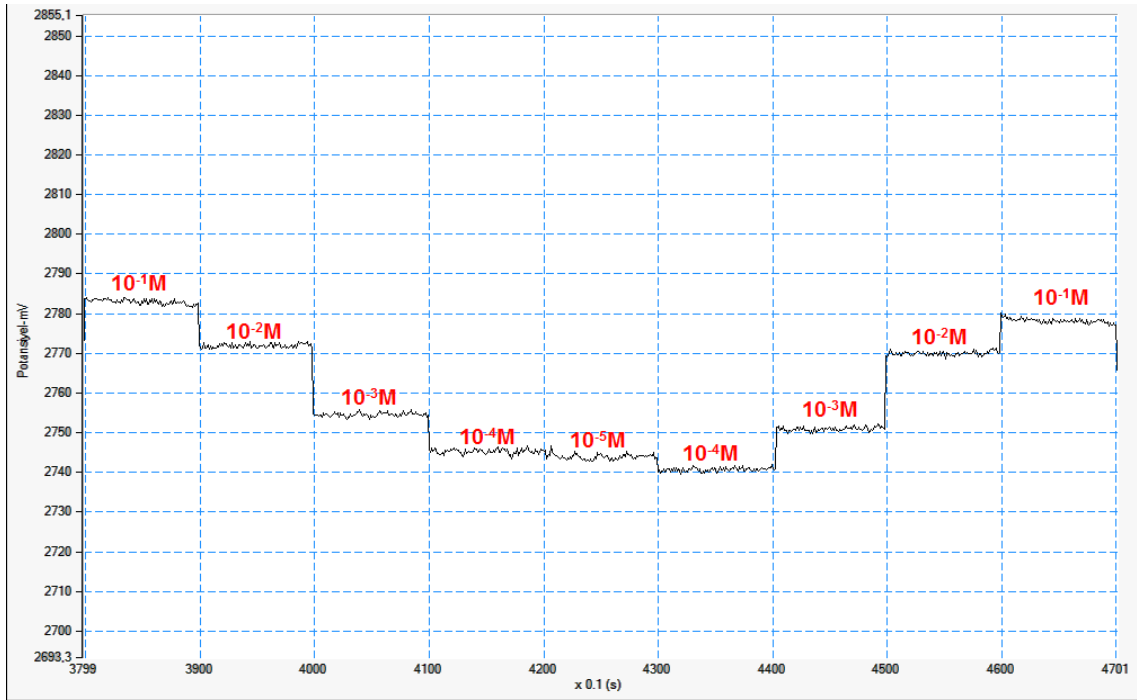
Şekil 4. 33. Biyosensörün histidinin fosfat tamponunda (pH: 7,02) $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} M$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



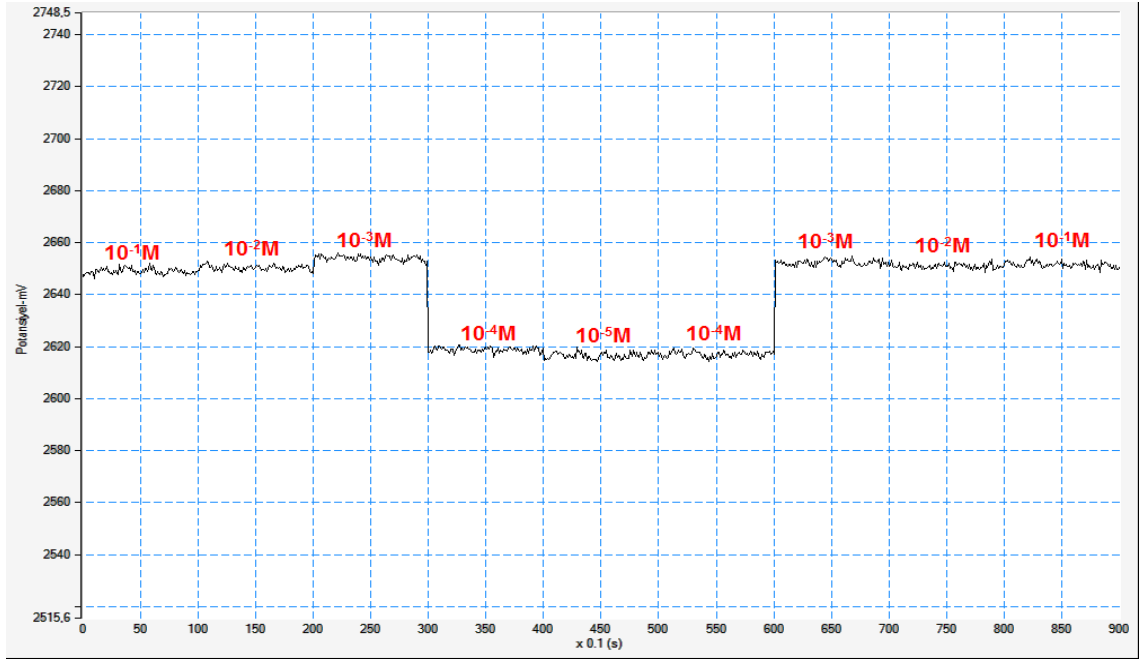
Şekil 4. 34. Biyosensörün izolösinin fosfat tamponunda (pH: 7,02) $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} M$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



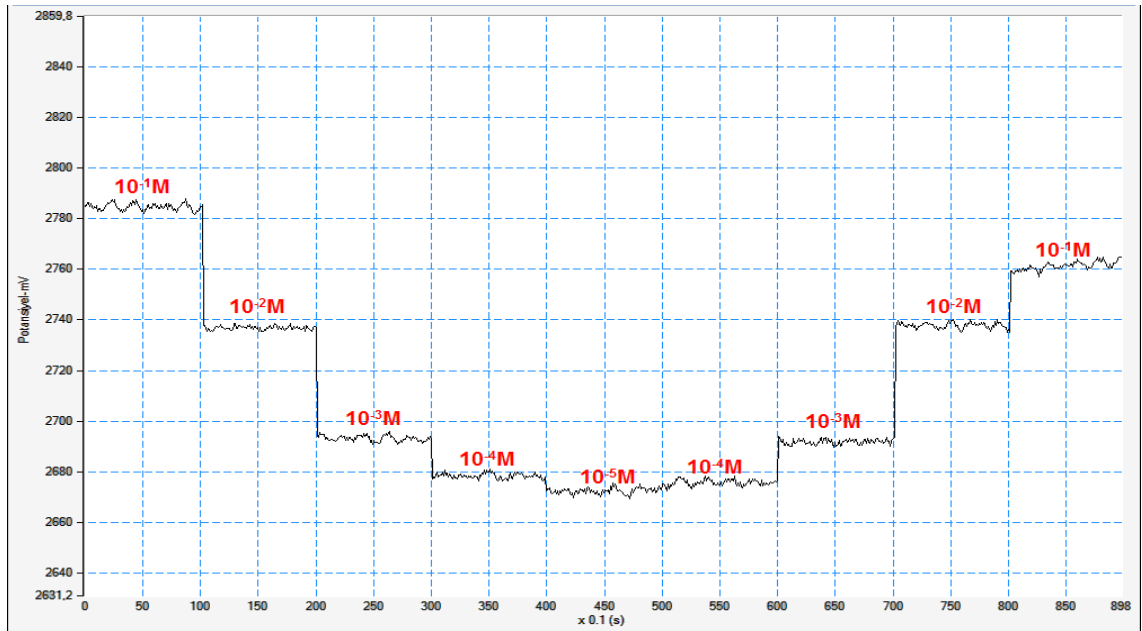
Şekil 4. 35. Biyosensörün lizin fosfat tamponunda (pH: 7,02) $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} M$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



Şekil 4. 36. Biyosensörün lizin fosfat tamponunda (pH: 7,02) $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-5} M$ konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



Şekil 4. 37. Biyosensörün tirozinin fosfat tamponunda (pH: 7,02) 1×10^{-1} – 1×10^{-5} M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı



Şekil 4. 38. Biyosensörün valinin fosfat tamponunda (pH: 7,02) 1×10^{-1} – 1×10^{-5} M konsantrasyon değişimine karşı sergilediği potansiyometrik davranışı

Biyosensörün amino asitlerin fosfat tamponunda hazırlanan çözeltilerine karşı verdiği potansiyometrik cevaplar incelediğinde Alanin ve arjinine 1×10^{-1} – 1×10^{-5} M konsantrasyonları arasında doğrusal bir çalışma aralığı göstermiş ancak her iki amino aside 1×10^{-1} M ile 1×10^{-2} M arasında az bir potansiyel fark göstermiştir. Fenilalanin, glutamin, lizin ve izolösine 1×10^{-1} – 1×10^{-5} M konsantrasyonları arasında doğrusal bir çalışma aralığı göstermiştir. Glisine 1×10^{-1} M ile 1×10^{-3} M konsantrasyonları arasında doğrusal, 1×10^{-4} M ve 1×10^{-5} M glisin çözeltilerine ters cevap vermiştir. Lösine 1×10^{-1} M – 1×10^{-4} M konsantrasyonları arasında doğrusal cevap göstermiştir. Valine 1×10^{-1} – 1×10^{-5} M konsantrasyonları arasında doğrusal bir çalışma aralığı göstermiş ancak 1×10^{-4} M ile 1×10^{-5} M konsantrasyonları arasında potansiyel değişim azdır. Elektrot aspartik aside karşı 1×10^{-3} – 1×10^{-4} M arasında daha fazla potansiyel fark oluşturmuş ve doğrusallığı bozmuştur. Glutamik asite karşı davranışı da aspartike karşı sergilediği değişime benzerdir. Elektrodun tirozine karşı davranışı iyi değildir. 1×10^{-1} – 1×10^{-3} M arasında ve 10^{-4} M ile 10^{-5} M arasında bir potansiyel değişim sergilememiştir. Sadece 1×10^{-3} – 1×10^{-4} M arasında bir potansiyel değişim göstermiştir. Elde edilen potansiyel değerler Çizelge 4. 5 ve Çizelge 4. 6’ da verilmiştir.

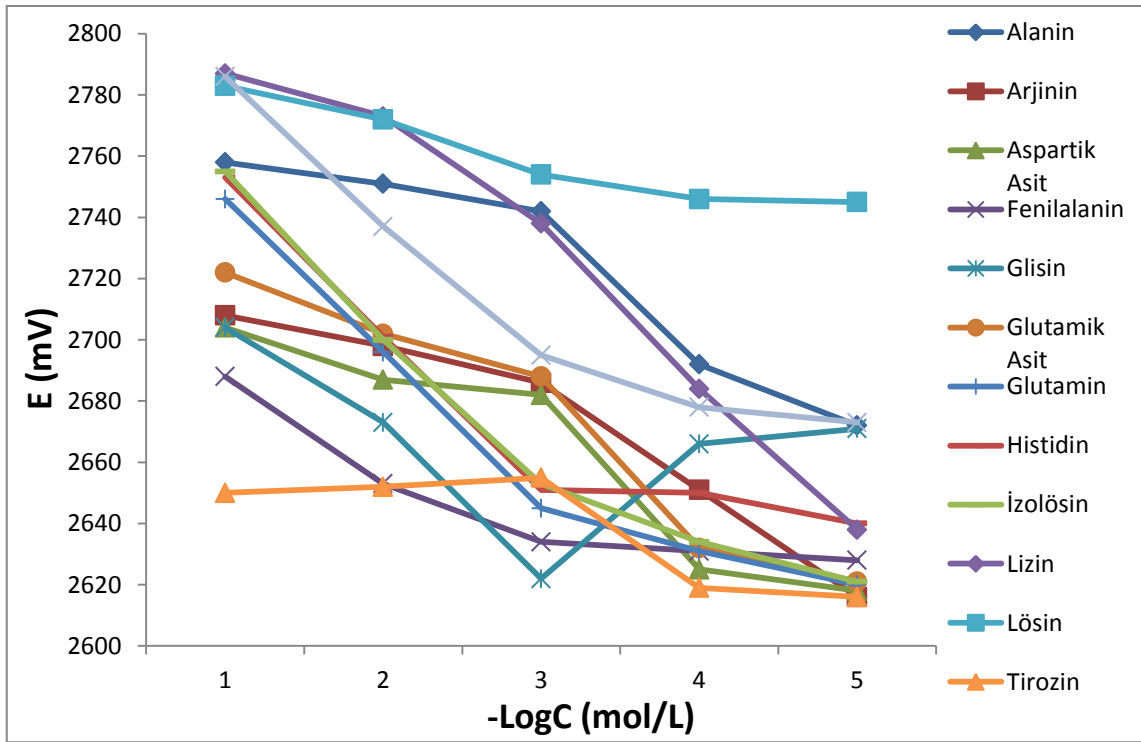
Çizelge 4. 5. Biyosensörün pH’ sı 7,02 olan fosfat tamponunda hazırlanan amino asit çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarına karşı verdiği potansiyel değerleri (mV)

-LogC (mol/L)	Alanin	Arjinin	Aspartik Asit	Fenilalanin	Glisin	Glutamik Asit	Glutamin
1	2758	2708	2704	2688	2704	2722	2746
2	2751	2698	2687	2653	2673	2702	2696
3	2742	2686	2682	2634	2622	2688	2645
4	2692	2651	2625	2631	2666	2632	2631
5	2672	2616	2618	2628	2671	2621	2620

Çizelge 4. 6. Biyosensörün pH' sı 7,02 olan fosfat tamponunda hazırlanan amino asit çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarına karşı verdiği potansiyel değerleri (mV)

-LogC (mol/L)	Histidin	İzolösin	Lizin	Lösin	Tirozin	Valin
1	2753	2755	2787	2783	2650	2786
2	2701	2700	2773	2772	2652	2737
3	2651	2653	2738	2754	2655	2695
4	2650	2634	2684	2746	2619	2678
5	2640	2621	2638	2745	2616	2673

Amino asitlerin değişik konsantrasyonlara karşı gösterdiği potansiyel değişim Şekil 4. 39' de görülmektedir.



Şekil 4. 39. pH' sı 7,02 olan fosfat tamponunda hazırlanan amino asitlerin değişik konsantrasyonlarda gösterdiği potansiyometrik davranışları

Biyosensörün amino asitlere karşı fosfat tamponunda deiyonize suya göre daha gürültülü ve derişimler arasında daha az potansiyel farklar gösterdiği görülmüştür. Bunun nedeni fosfat tamponunda girişim yapma olasılığı olan iyonlara bağlanabilir.

Amino asitlerin farklı R gruplarına sahip olmaları nedeniyle her bir amino asit için enzim-substrat verimliliği de farklı olmaktadır (Turna, 2006). Enzimlerin optimum çalışma koşullarına sahip olmaları pH, sıcaklık gibi enzimlerin deney ortamlarından etkilenecek aktifliğinin azalmasına sebep olmaktadır. Ayrıca amino asitlerin izoelektrik noktaları enzimlerin optimum çalışma pH'ı ile ilişkilidir (Işıldak ve Işıldak, 2013).

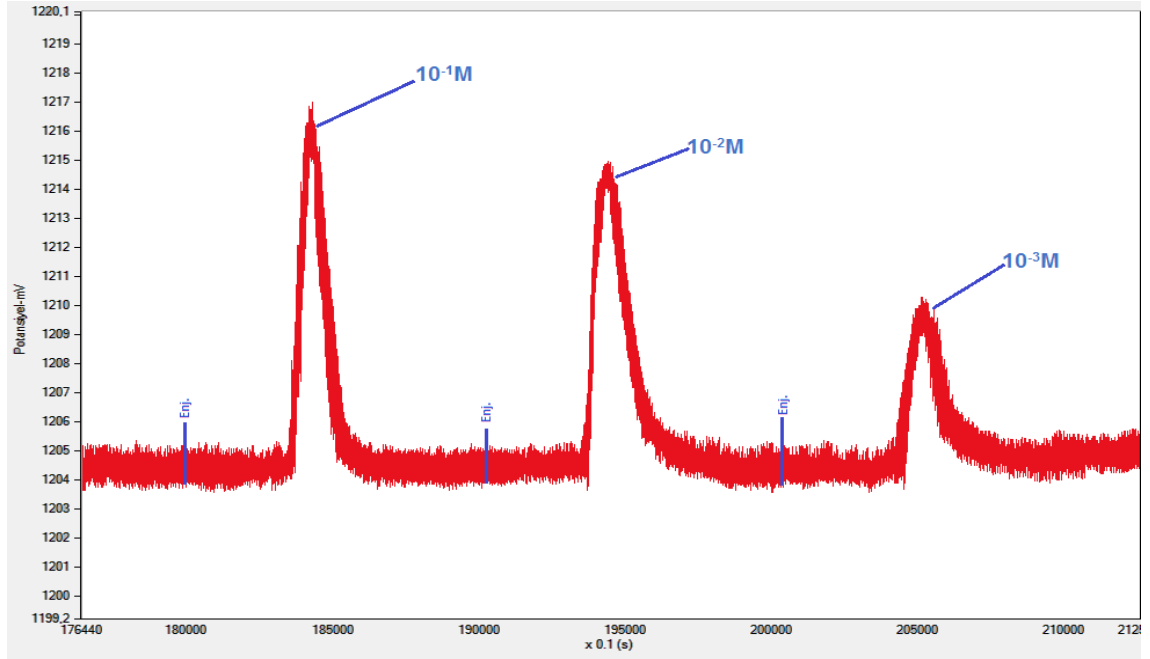
4. 2. Hareketli Ortam Potansiyometrik Ölçümleri

Kromatografik ayırımlar tek kolonlu iyon kromatografi (suppresor kolon kullanılmadan) modunda gerçekleştirildi. Daha önce hazırlanan akış hücreleri (mikrolitre ölü hacme sahip), iyon kromatografik sistemde bir dedektör gibi ayırım kolonu çıkışına bağlanarak serbest aminoasitlerin tayini gerçekleştirildi. Şekil 4. 40' de çalışmada kullanılan iyon kromatografi-potansiyometrik hibrit sistemi görülmektedir. Sistem için hareketli faz kompozisyonu ve akış hızı test edilerek en uygun akış parametreleri belirlendi. Bu amaçla yapılan çalışmalarda en uygun hareketli fazın, kromatografik ayırım ve literatürde yapılan çalışmalar dikkate alınarak, pH' ısı 6,9 olan $6,68 \times 10^{-3}$ M sodyum fosfat tamponu hareketli faz olarak kullanıldı. Yapılan testler sonucu en uygun akış hızı 1,00 mL/dk olarak belirlendi. Bu şartlar altında, $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M konsantrasyon aralığında standart aminoasit çözeltileri sisteme enjekte edilerek potansiyometrik kromatogramlar elde edildi.

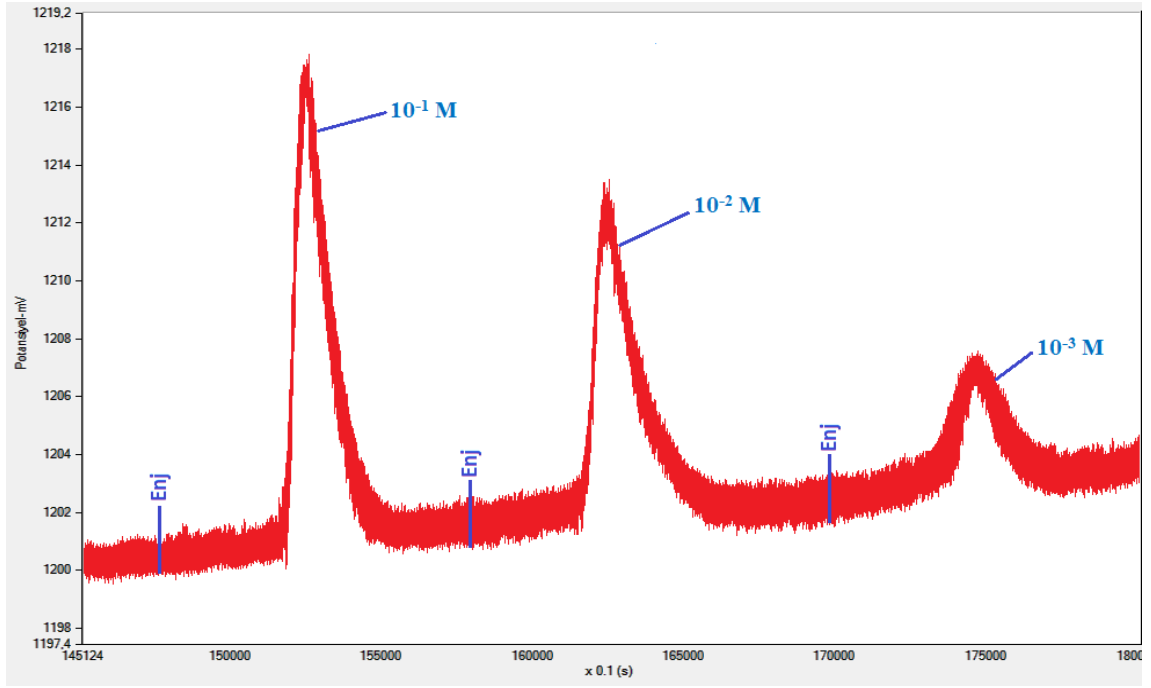


Şekil 4. 40. İyon kromatografi-potansiyometrik hibrit sistemi

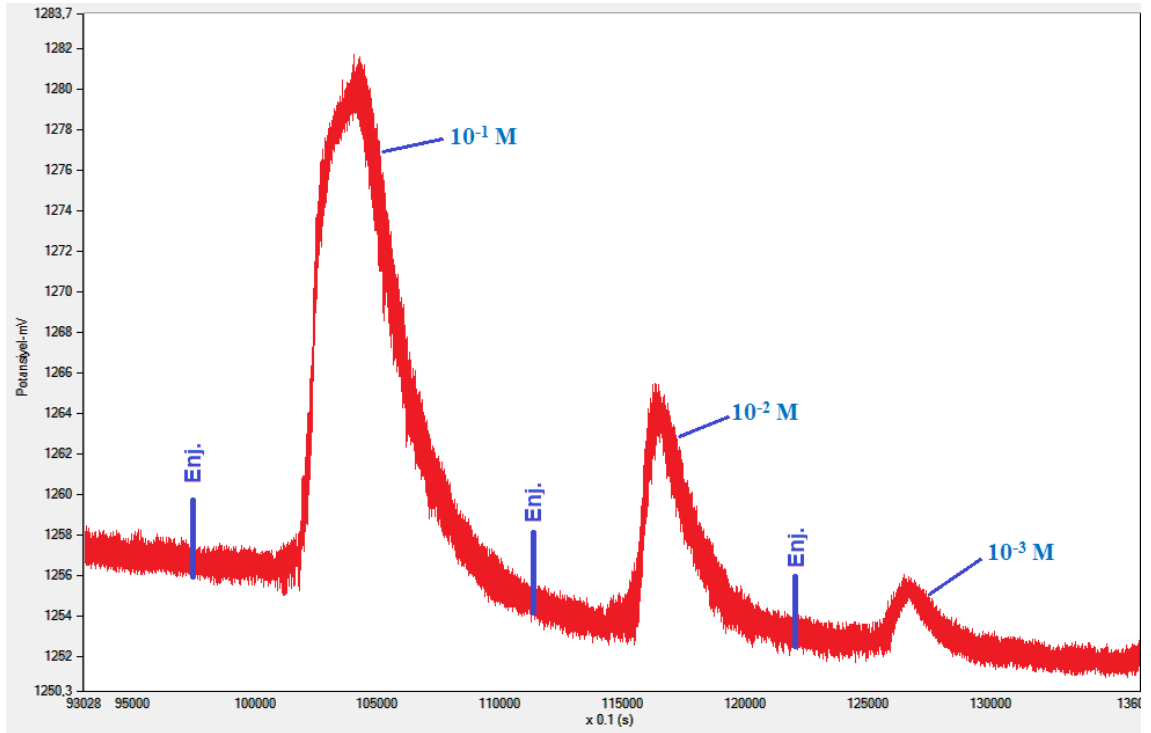
İyon kromatografik çalışmalardan elde edilen bazı kromatogramlar Şekil 4. 41-46 ' da görülmektedir.



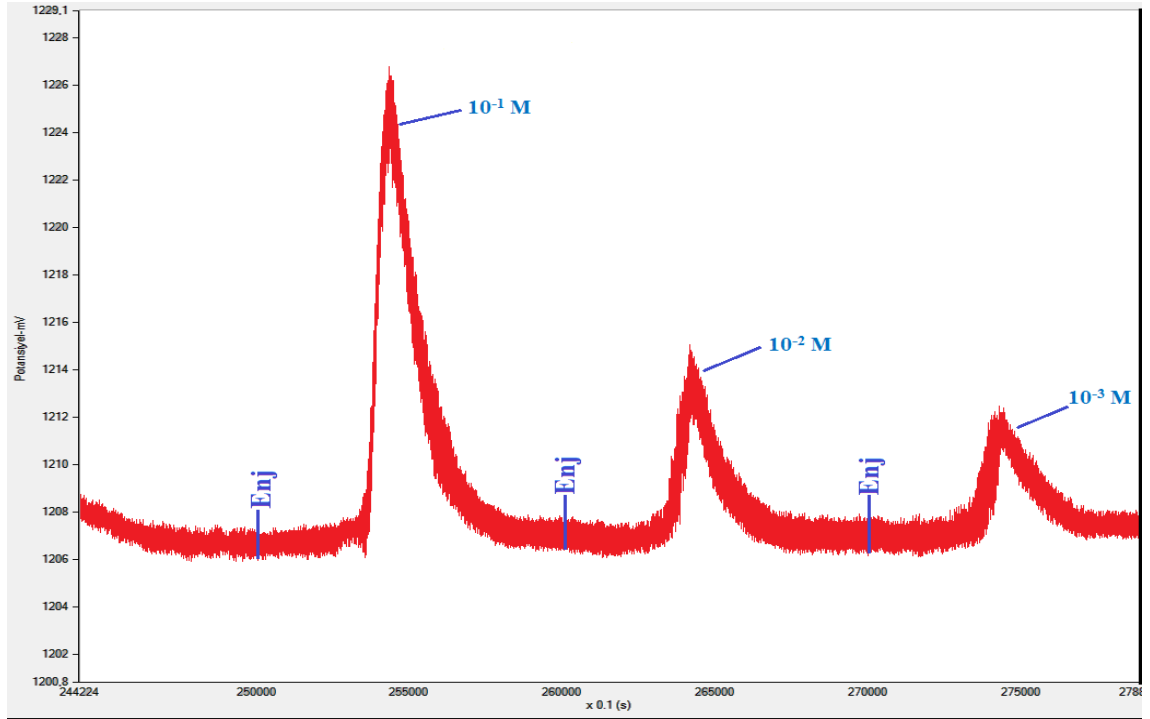
Şekil 4. 41. $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-3} M$ alanin çözeltilerinin enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram



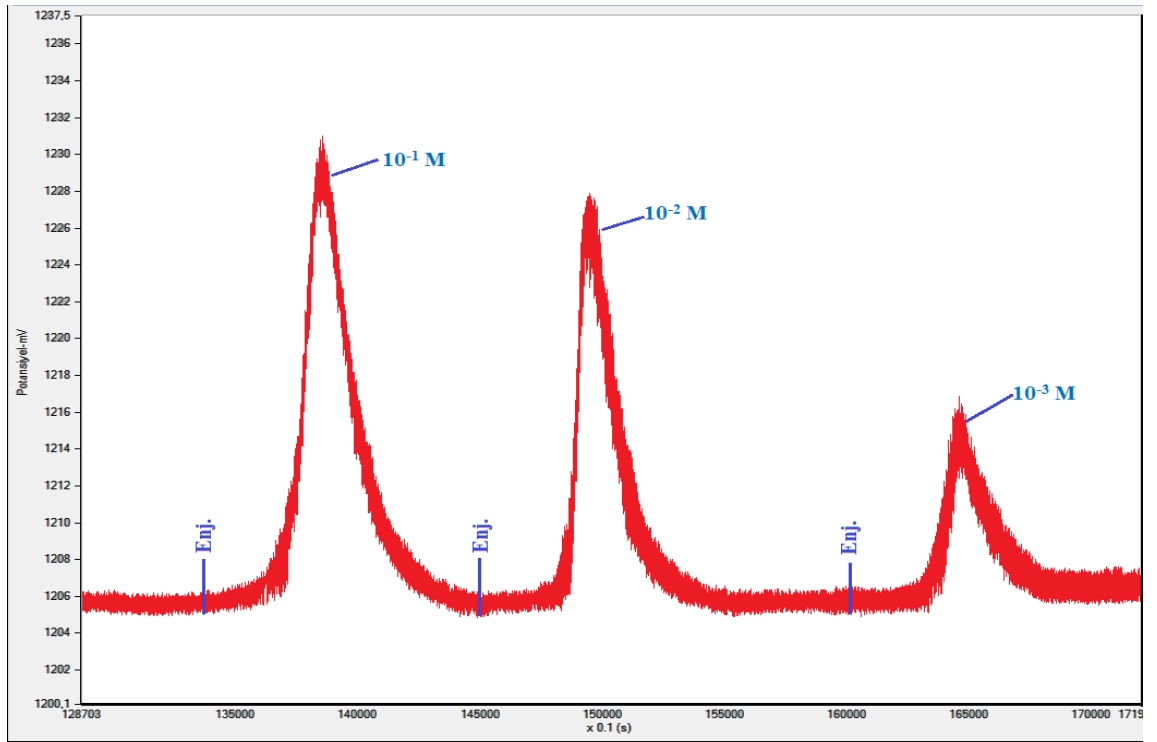
Şekil 4. 42. 1×10^{-1} - 1×10^{-3} M glisin çözeltilerinin enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram



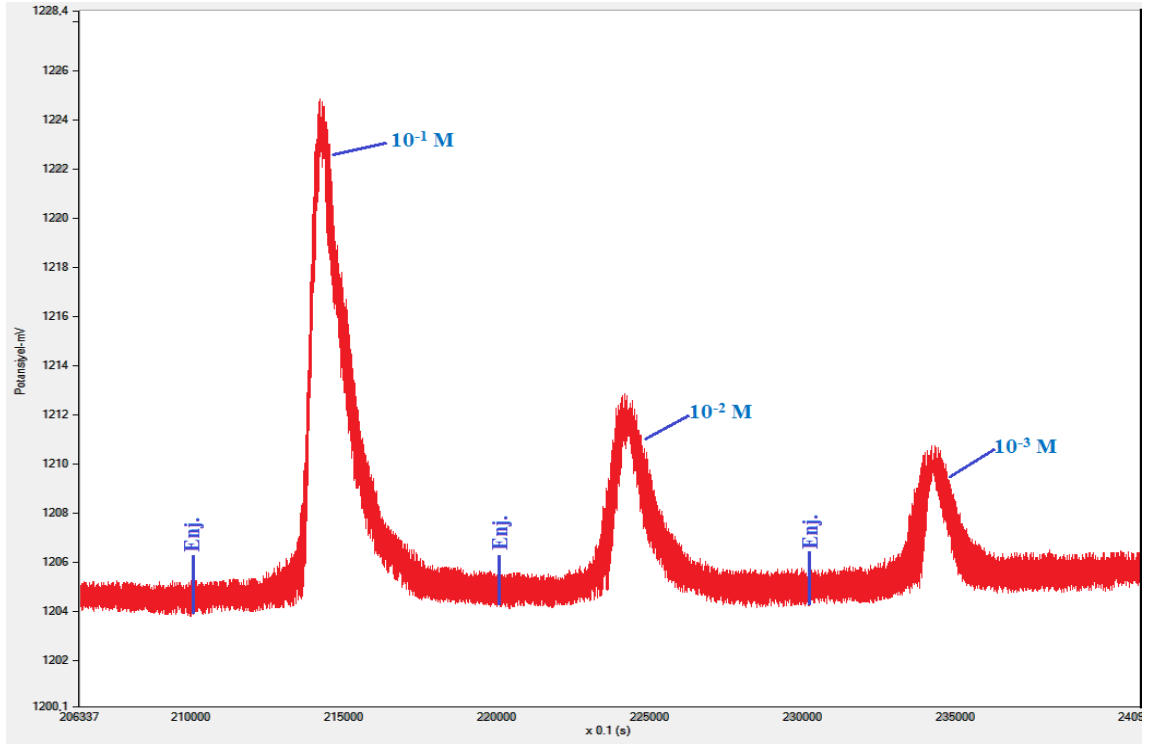
Şekil 4. 43. 1×10^{-1} - 1×10^{-3} M glutamin çözeltilerinin enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram



Şekil 4. 44. 1×10^{-1} - $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ izolösün çözeltilerinin enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram



Şekil 4. 45. 1×10^{-1} - $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ lizin çözeltilerinin enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram



Şekil 4. 46. 1×10^{-1} - $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ valin çözeltilerinin enjeksiyonu sonucu elde edilen kromatogram

Biyosensörün iyon kromatografi-potansiyometrik hibrit sisteminde bir detektör gibi kullanılarak elde edilen kromatogramlara bakıldığında biyosensörün alanin, glisin, glutamin, izolösin, lizin ve valine $1 \times 10^{-1} \text{ M}$ ve $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ konsantrasyonları arasında doğrusal bir çalışma aralığı gösterdiği görülmektedir. Kromatogramlarda azalan derişimlere karşı pik yüksekliklerinin düştüğü ve buna paralel olarak azalan derişimle pik alanlarının da azaldığı görülmektedir. Bu sonuçlardan anlaşıldığı gibi hazırladığımız biyosensörler amino asitlerin kromatografik analizlerinde bir detektör gibi kullanılabileceğini ve amino asitlerin tayinlerinin gerçekleştirilebileceğini göstermiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Serbest amino asitlerin biyolojik sıvı ve gıdalarda tayini çeşitli enstrümental yöntemler ile sağlanabilmektedir. Spektrofotometrik ve spektroflorimetrik tayin tekniklerinin uygulandığı kromatografik yöntemler amino asit analizlerinde önemli yer tutmaktadır. Ancak bu yöntemlerin pahalı oluşları, türevlendirme işlemleri ve deneyimli personel gereksinimleri veya seçiciliklerinin düşük oluşu yeni yöntemlerin gelişmesi ihtiyacını ortaya çıkarmaktadır. Ekonomik, seçici ve duyarlı olması nedeniyle biyosensörler üzerine çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Bunun bir sonucu olarak potansiyometrik ve voltametrik biyosensör teknolojisinde önemli gelişmeler sağlanmıştır. Özellikle potansiyometrik sensörlerin çalışma mekanizmasının sensör yüzey alanına bağlı olmaması, mikro boyutlarda sensör hazırlama teknolojisine yönelik çalışmaların artmasına neden olmuştur.

Bu çalışmamızda mikro boyutlarda amino asitlere duyarlı biyosensörler hazırlandı ve mikro-akış hücreleri geliştirilerek sıvı kromatografik sisteme uyarlandı. Hazırlanan biyosensörlerin bir Ag/AgCl referans elektrot ile birlikte akış hücrelerine yerleştirilerek serbest amino asitlerin tayinleri için detektör olarak kullanılması sağlandı.

Bu kapsamda, amino asit duyarlı biyosensörler de temel sensör olarak kullanılacak mikro boyutlarda kompozit amonyum sensörler hazırlandı. Hazırlanan amonyum elektrot $1 \times 10^{-1} \text{ M} - 1 \times 10^{-6} \text{ M NH}_4^+$ iyonu konsantrasyon aralığında doğrusal, hızlı cevap zamanı (5 saniye) ve tekrarlanabilir potansiyometrik cevaplar verdi. Aynı zamanda elektrot girişim yapma olasılığı olan Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} iyonlarına göre daha seçici davrandığı gözlemlendi. Bu sonuçlara dayanarak amonyum sensörün amino asit biyosensörü hazırlamak için temel sensör olarak kullanılabileceği öngörüldü.

Bu şekilde hazırlanan ve biyosensör yapımına uygun olduğu öngörülen amonyum elektrotlara L-amino asit oksidaz enzimi glutaraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılarak kovalent olarak bütünüyle katı-hal kontakt NH_4^+ seçici sensör yüzeyine tutturuldu. Hazırlanan amino asit duyarlı biyosensörlerin çok sayıda L-aminositlere

karşı potansiyometrik performansları belirlendi. Elde edilen sonuçlar amino asit biyosensörlerin çok sayıda amino aside karşı duyarlı, seçici olduğu ve doğrusal bir çalışma aralığında cevap verdiğini gösterdi. Sonuçlar geliştirilen L-amino asit biyosensörün kromatografik sistemde serbest amino asitlerin tayini için dedektör olabileceğini gösterdi.

Daha sonra kromatografik sistemde dedektör olarak kullanılacak mikrolitre ölü hacme sahip akış hücresi hazırlandı. Minyatürize akış hücre, 2 cm uzunluğu ve 1cm genişliğinde bir polikarbonat malzeme bloğunda oluşturuldu. Polikarbonat blok, mikro boyutlarda amino asit duyarlı biyosensörle beraber, mikro boyutlarda Ag/AgCl referans elektrot içeriyordu. Hazırlanan bu akış hücreleri sıvı kromatografik sistemde kolon çıkışına monte edildi ve bir dedektör görevi görmesi sağlandı. En uygun akış hızı ve hareketli faz türü yapılan çalışmalar sonucu belirlendi. Daha önce potansiyometrik özellikleri incelenen amino asit biyosensörler hazırlanan bu akış hücrelerine yerleştirilerek amino asitlerin enjeksiyonu sonucu kromatogramlar elde edildi. Kromatogramlardan elde edilen sonuçlara göre biyosensörün sıvı kromatografik sistemde dedektör gibi kullanılabileceği öngörüldü.

Bu çalışmada amino asitlerin kromatografik ayırım çalışmalarını yapmadık. Çünkü aminoasitlerin izokritik ayırımlarının gerçekleştirilebilmesi için gerekli ayırım maddi sebeplerden dolayı temin edilememiştir. Bu çalışma ileriki çalışmalarımıza ışık tutacaktır ve Dionex aminopac ayırım kolonu kullanılarak izokritik olarak aminoasitlerin ayırımını gerçekleştirerek yöntemin validasyon çalışmaları da gerçekleştirilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Aizawa, M., Khan, G.F., Kobatake, E., Haruyoma, T. ve İkariyama, Y., 1994. Interfacial Design and Chemical Sensing. Editörler: Mallouk, T.E. ve Harrison, D.J. American Chemical Society, Washington, 305-313.
- Beaux, J. ve Tran-Minh, C.R., 1979. Proceedings of the Academy of Sciences. 288, 545.
- Bingöl, G., 1974. Proteinler. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, 4s, Ankara.
- Cantürk, E., 2013. Amino asit duyarlı biyosensörlerin hazırlanması ve çalışma şartlarının belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Chan, T.M., 1993. Biosensors. Chapman and Hall, London.
- Champe, P.C., Harvey, R.A. ve Ferrier, D.R., 2007. Biyokimya, Çeviri Editörü: Ulukaya, E. Nobel Tıp Yayınları, s. 1-53, İstanbul.
- Chen, X., Gao, D., Liu, F., Gao, X., Wang, S., Zhao, Y., Liu, H. ve Jiang, Y., 2014. A novel quantification method for analysis of twenty natural amino acids in human serum based on N-phosphorylation labeling using reversed-phase liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 836, 61-71.
- Chen, Y., Shih, L., Liou, S. ve Chen, C., 2003. Analysis of Dabsyl-Cl Derivated Amino Acids by High Performance Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. *Food Science and Technology Research*, 9(3), 276-282.
- Clark, L.C. ve Lyons, L., 1962. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 102, 528.
- Deng, I. ve Enke, C., 1980. *Analytical Chemistry*. 52, 1937-1940.
- Dietzen, D. J., Weindel, A.L., Carayannopoulos, M.O., Landt, M., Normansell, E.T., Reimschisel, T.E. ve Smith, C.H., 2008. Rapid comprehensive amino acid analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: comparison to cation exchange with post-column ninhydrin detection. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 22, 3481–3488.
- Dinçkaya, E., Akyılmaz, E., Akgöl, S., Önal, S.T., Zihnioğlu, F. ve Telefoncu, A., 1998. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 62, 2098.
- Dinçkaya, E., 1999. Enzim Sensörleri. Biyosensörler, Editör: Telefoncu, A. Ege Üniversitesi, İzmir, 81-142.
- Domingues, D.S., Crevelin, E.J., Beraldo de Moraes, L.A., Hallak, J.E.C., Crippa, J.A.S. ve Queiroz, M.E.C., 2015. Simultaneous determination of amino acids and neurotransmitters in plasma samples from schizophrenic patients by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 38, 780–787.
- Dong, S. ve Chen, X., 2002. Some new aspects in biosensor. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82, 303-323.
- Eggins, B.R., 1996. Biosensors: an Introduction. John Wiley and Sons Ltd. and B.G. Teubner, West Sussex.

- Enginün, M., 1999. Biyoreseptörler. Biyosensörler, Editör: Telefoncu, A. Ege Üniversitesi, İzmir, 24-41.
- Filho, F.O., Suleiman, A.A., G.G., Guilbault. ve Lubrano, G.J., 1988. Bienzomatic Electrode for the Determination of Aspartame in Dietary Products Analytical Chemistry, 60, 2397.
- Guilbault, G.G. ve Hrabankova, E., 1971. Analytical Chemistry. 42,1779.
- Guilbault, G.G. ve Shu, F.R., 1971. Analytical Chemistry. 56, 333.
- Guilbault, G.G. ve Kauffman, J.M., 1987. Biotechnology and Applied Biochemistry. 9, 95.
- Işıldak, Ö. ve Işıldak, İ., 2013. Amino asitlerin Sıvı Kromatografi-Potansiyometri Hibrit Analiz Sistemi ile Basit, Hızlı ve Ekonomik Olarak Tayini, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu. Tokat.
- Jia, S., Kang, Y.P., Park, J.H., Lee, J. ve Kwon, S.W., 2011. Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1218, 9174-9182.
- Kaufmanni J.M. ve Guilbault, G.G., 1992. Bioanalytical Applications of Enzymes. 36, 63.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2010. Biyokimya. Aktif Yayınevi, s. 35-43, Erzurum.
- Khan, A.S. ve Faiz, F., 2008. Amino acid analysis using ion exchange resins. Journal of Natural Sciences and Mathematics, 48, (1ve2), 1-17.
- Kumaran, S., Meier, H., Danna, A.M. ve Tran-Minh, C., 1991. Analytical Chemistry. 63, 1914.
- Mascini, M., Iannillo, M., ve Polleschi, G., 1989. Analytica Chimica Acta. 146, 135-148.
- Moore, S., ve Stein, W.H., 1954. A modified ninhydrin reagent for the Photometric determination of amino acids and related compounds, The Journal of Biological Chemistry, 211, 907 – 913.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. ve Rodwell, V.W., 2003. Harper's Illustrated Biochemistry. The McGraw-Hill Companies, s. 237-270, United States.
- Nelson D. L. ve Cox, M. M., 2005. Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Çeviri Editörü: Kılıç, N. Palme yayıncılık, s. 116-126, Ankara.
- Petritis, K., Person, M.D., Elfakir, C. ve Dreux, M., 2004. Validation of an Ion-Interaction Chromatography Analysis of Underivatized Amino Acids in Commercial Preparation Using Evaporative Light Scattering Detection. Chromatographia, 60, 293-298.
- Rebane, R. ve Herodes, K., 2010. A sensitive method for free amino acids analysis by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection using precolumn derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate: Application to the honey analysis. Analytica Chimica Acta, 672, 79-84.
- Skoog D.A., West D.M. and Holler F.J., 1982. Fundamentals of Analytical Chemistry, Saunders College Publishing, Rinehart and Winston Incorporated.
- Sun, J., Li, F. Xu, W., Zhou, G., You, J. ve Chen, G., 2009. LC-ESI-MS Determination of 20 Free Amino Acids in Tibetan Medicine Gentiana dahurica with Pre-Column Fluorescence Derivatization. Chromatographia, 70, 1627-1633.

- Sun, Y., Xu, X., Mou, Z., Wang, J., Tan, Z. ve Wu, S., 2012. Analysis of free amino acids in Amur sturgeon by ultra-performance liquid chromatography using pre-column derivatization with 6-aminoquinolyl-carbamyl. *Journal of Separation Science*, 35, 3421–3426.
- Şanlı, N., Tague, S.E. ve Lunte, C., 2015. Analysis of amino acid neurotransmitters from rat and mouse spinalcords by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, 217-222.
- Taylor, R.F., 1991. Protein İmmobilization. Dekker, New York.
- Tamiya, E., Sugiura, Y., Akiyoma, A. ve Karube, I., 1990. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 619, 396.
- Telefoncu, A., 1999. Biyosensörlere Genel Bakış. *Biyosensörler*, Editör: Telefoncu, A. Ege Üniversitesi, İzmir, 1-9.
- Telefoncu, A., 1999. Biyoreseptörlerin İmmobilizasyonu. *Biyosensörler*, Editör: Telefoncu, A. Ege Üniversitesi, İzmir, 42-65
- Telefoncu, A., 1999. Enzimoloji, Editör: Telefoncu, A. Ege Üniversitesi, s. 193-248, İzmir.
- Tong How, Z., Buseti, T., Linge, K.L. ve Kristiana, I., 2014. Analysis of free amino acids in natural waters by liquidchromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1370, 135-146.
- Toyo’oka, T., 2013. Amino Acid Analysis: current topics and trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 7905-7906.
- Tran-Minh, C. ve Broun, G., 1975. *Analytical Chemistry*. 47, 1359-1364.
- Tran-Minh, C., 1993. *Biosensors*. Chapman and Hall, London.
- Turna, Ö., 2005. Aminoasit biyosensörlerin geliştirilmesi. (Y.Lisans Tezi), Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Updike, S.J. ve Hicks, G.P., 1967. *Nature*. 214, 986.
- Walcerz, I., Koncki, R., Leszczynska, E. ve Glab, S., 1995. Enzyme Biosensors for Urea Determination on an Ionophore Free pH Membrane Electrodes, *Analytica Chimica Acta*, 315, 289-296.
- Watonable, E., Ando, K., Korube, I., Matsuoka, H. Ve Suzuki, S., 1983. *Journal of Food Science*. 48, 496.
- Xia, L. ve You, J., 2011. The determination of amino acids composition of the traditional food *Potentilla anserina* L. root by high-performance liquid chromatography via fluorescent detection and mass spectrometry. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1164–1170.
- Xu, J., Wang, Y., Yuezhong, X., Litong, J. ve Tanaka, K., 2003. Preparation of multiwall carbon nanotubes film modified electrode and its application to simultaneous determination of oxidizable amino acids in ion chromatography. *Talanta*, 60, 1123-1130.
- Yıldız, A., 1999. Elektrokimyasal Biyosensörler. *Biyosensörler*, Editör: Telefoncu, A. Ege Üniversitesi, İzmir, 66-80.
- Yokoyama, T., Sakai, A. ve Zenki, M., 2008. RP-LC with On-Line Recycled Mobile Phasefor Analysis of Amino Acids Pre-Derivatized with o-Phthalaldehyde. *Chromatographia*, 67, 535-542.

7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Gazi GÜNEŞ
Doğum Tarihi ve Yer : 15.02.1990- ANKARA
Medeni Hali : Bekar
Yabancı dili : İngilizce
Telefon : 0 501 911 04 38
e-mail : gazigunes06@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	GOP Üniversitesi	06.2015
Lisans	GOP Üniversitesi	06.2012
Lise	Niğbolu Lisesi	06.2007