



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

**OKSİDAZ ENZİMLERİ ve SUBSTRATLARI için NANOSENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ**

Aslı Neslihan AVAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ

Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

Haziran, 2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Aslı Neslihan AVAN tarafından, Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ danışmanlığında hazırlanan " OKSİDAZ ENZİMLERİ ve SUBSTRATLARI için NANOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ " başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 19/06/2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Analitik Kimya Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Prof. Dr. Reşat APAK İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Analitik Kimya Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE Yıldız Teknik Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Prof. Dr. Aslı BAYSAL İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Doç. Dr. Saliha Esin ÇELİK İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Analitik Kimya Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Aslı Neslihan AVAN

BÜTÇE DESTEKLERİ

OKSİDAZ ENZİMLERİ ve SUBSTRATLARI için NANOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 24347

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini esirgemeyen, tüm içtenliğiyle bana yardımcı olan huzurlu ve keyifli bir çalışma ortamı sağlayan, çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ'e

Tez çalışmam süresince engin bilgi ve deneyimlerini paylaşan, daima yol gösteren, saygı değer hocam Prof. Dr. Reşat APAK'a

Tez çalışmam boyunca kıymetli zamanını ayıran, tez izleme komitesinde yer alan değerli hocam, Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE'ye

Çalışmalarım süresince her türlü laboratuvar imkanından yararlanmamı sağlayan Analitik Kimya Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma,

Eğitim sürecime neşe ve güzellik katan, her türlü yardım ve destekleriyle yanımda olan, laboratuvarda birlikte çalışmaktan zevk aldığım kıymetli arkadaşlarım Özge KARAKAŞ, Seda UZUNBOY ve Zainab Majid Salim Al-LAMI'ye, çalışma arkadaşım ve ikiz kardeşim Arş. Gör. Dr. Asiye Aslıhan AVAN'a

Hayatım boyunca koşulsuz sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim, sabır ve anlayışlarıyla hep yanımda olan AİLEM'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2023

Aslı Neslihan AVAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. GİRİŞ	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	4
2.1. NANOTEKNOLOJİ.....	4
2.2. NANOPARTİKÜLLERİN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ	5
2.3. MANYETİK NANOPARTİKÜLLER.....	5
2.3.1. Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerin Sentezlenmesi	7
2.4. ENZİMLER.....	9
2.4.1. Enzim Kinetiği.....	11
2.4.1.1. Michaelis-Menten Enzim Kinetiği	12
2.5. ENZİM İMMOBİLİZASYONU	14
2.5.1. Tersinir Olmayan İmmobilizasyon Yöntemleri.....	15
2.5.1.1. Kovalent Bağlanma	15
2.5.1.2. Tutuklama Yöntemi	16
2.5.1.3. Çapraz Bağlama	16
2.5.2. Tersinir İmmobilizasyon Yöntemleri	17
2.5.2.1. Adsorpsiyon	17
2.5.2.2. Disülfür Bağlarının Oluşumu	17
2.6. ÜRİK ASİT.....	17
2.7. GLUKOZ.....	19
2.8. KOLİN.....	20
2.9. CUPRAC (BAKIR(II) İYONU İNDİRGEYİCİ ANTİOKSİDAN KAPASİTE) YÖNTEMİ	22
2.10. LİTERATÜRDE YER ALAN ÇALIŞMALAR.....	22
3. YÖNTEM	27
3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR VE CİHAZLAR.....	27
3.2. ÇÖZELTİLERİNİN HAZIRLANMASI	27
3.3. FE ₃ O ₄ MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI.....	28
3.4. FE ₃ O ₄ /SİO ₂ / APTS/ GLA HAZIRLANMASI.....	29

3.5.	SENTEZLENEN MNPLERİN KARAKTERİZASYONU.....	30
3.6.	UOX'IN İMMOBİLİZASYONU VE UA TAYİNİ.....	30
3.6.1.	CUPRAC Yönteminin Uygulanışı.....	30
3.6.2.	UOx İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi	30
3.6.2.1.	<i>UOx'ın Optimum immobilizasyon pH'ının Belirlenmesi.....</i>	30
3.6.2.2.	<i>İmmobilize Edilen UOx Miktarının Optimizasyonu</i>	31
3.6.2.3.	<i>UOx İmmobilizasyon Süresinin Optimizasyonu</i>	31
3.6.3.	UA'in Fe ₃ O ₄ @UOx ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu.....	31
3.6.3.1.	<i>Optimum pH'ın Belirlenmesi.....</i>	31
3.6.3.2.	<i>Optimum Sürenin Belirlenmesi.....</i>	31
3.6.3.3.	<i>Optimum Fe₃O₄@UOx Miktarının Belirlenmesi.....</i>	31
3.6.3.4.	<i>Optimum Katalaz Miktarının Belirlenmesi.....</i>	32
3.6.4.	UA Kalibrasyonu.....	32
3.6.5.	Serbest ve İmmobilize Enzim Kinetiğinin İncelenmesi	32
3.6.6.	Antioksidan Karışımlarında UA Tayini	32
3.6.7.	HPLC Yöntemi ile UA Tayini.....	33
3.6.8.	Örnek Uygulaması ve HPLC Yöntemi ile Karşılaştırılması	33
3.6.9.	Fe ₃ O ₄ @UOx ile FBS'de TAC ve UA içermeyen TAC'nin belirlenmesi.....	33
3.7.	GOx İMMOBİLİZASYONU VE GLUKOZ TAYİNİ.....	33
3.7.1.	Yöntemin Uygulanışı.....	33
3.7.2.	Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ /APTS/GLA Üzerine GOx İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi	34
3.7.2.1.	<i>Optimum pH'ın Belirlenmesi:</i>	34
3.7.2.2.	<i>GOx Miktarının Optimizasyonu.....</i>	34
3.7.2.3.	<i>GOx İmmobilizasyon süresinin Optimizasyonu.....</i>	35
3.7.3.	Glukoz'un Fe ₃ O ₄ @GOx ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu.....	35
3.7.3.1.	<i>Optimum pH'ın Belirlenmesi.....</i>	35
3.7.3.2.	<i>Optimum Fe₃O₄@GOx Miktarının Belirlenmesi.....</i>	35
3.7.3.3.	<i>Optimum Sürenin Belirlenmesi.....</i>	35
3.7.4.	Glukoz Kalibrasyonu	35
3.7.5.	İmmobilize ve Serbest Enzim Kinetiğinin Karşılaştırılması	35
3.7.6.	Örnek Uygulaması.....	36
3.8.	ChOx'IN İMMOBİLİZASYONU VE KOLİN TAYİNİ	37
3.8.1.	Yöntemin Uygulanışı.....	37

3.8.2.	Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ /APTS/GLA Üzerine ChOx İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi	37
3.8.2.1.	<i>Optimum pH'in Belirlenmesi:</i>	37
3.8.2.2.	<i>ChOx Miktarının Optimizasyonu</i>	38
3.8.2.3.	<i>ChOx İmmobilizasyon Süresinin Optimizasyonu</i>	38
3.8.3.	ChCl'nin Fe ₃ O ₄ @ChOx ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu	38
3.8.3.1.	<i>Optimum pH'in Belirlenmesi</i>	38
3.8.3.2.	<i>Optimum Fe₃O₄@ChOx Miktarının Belirlenmesi</i>	38
3.8.3.3.	<i>Optimum Sürenin Belirlenmesi</i>	38
3.8.4.	ChCl Kalibrasyonu	39
3.8.5.	ChOx için İmmobilize ve Serbest Enzim Kinetiğinin Karşılaştırılması.....	39
3.8.6.	Örnek Uygulaması.....	39
3.9.	İMMOBİLİZE ENZİMLERİN STABİLİTESİ VE TEKRAR KULLANILABİLİRLİĞİ	40
4.	BULGULAR	41
4.1.	MNP'NİN KARAKTERİZASYONU	41
4.2.	UOx İMMOBİLİZASYONU VE UA TAYİNİ	47
4.2.1.	UOx İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi	47
4.2.1.1.	<i>Optimum pH'in Belirlenmesi</i>	47
4.2.1.2.	<i>UOx Miktarının Optimizasyonu</i>	47
4.2.1.3.	<i>İmmobilizasyon Süresinin Optimizasyonu</i>	48
4.2.2.	UA'in Fe ₃ O ₄ @UOx ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu.....	49
4.2.2.1.	<i>Optimum pH'in Belirlenmesi</i>	49
4.2.2.2.	<i>Optimum Sürenin Belirlenmesi</i>	49
4.2.2.3.	<i>Optimum Fe₃O₄@UOx Miktarının Belirlenmesi</i>	50
4.2.2.4.	<i>Optimum Katalaz Miktarının Belirlenmesi</i>	51
4.2.3.	UA Kalibrasyonu	51
4.2.4.	Serbest ve İmmobilize Enzim Kinetiğinin İncelenmesi	52
4.2.5.	Antioksidan Karışımlarında UA Tayini	53
4.2.6.	HPLC Yöntemi ile UA Tayini.....	55
4.2.7.	Fe ₃ O ₄ @UOx ile FBS'de TAC ve UA içermeyen TAC'nin belirlenmesi.....	57
4.3.	GOx İMMOBİLİZASYONU VE GLUKOZ TAYİNİ.....	58
4.3.1.	GOx İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi	58
4.3.1.1.	<i>Optimum pH'in Belirlenmesi</i>	58
4.3.1.2.	<i>GOx Miktarının Belirlenmesi</i>	58

4.3.1.3.	<i>GOx İmmobilizasyon Süresinin Belirlenmesi</i>	59
4.3.2.	Glukoz'un Fe ₃ O ₄ @GOx ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu.....	60
4.3.2.1.	<i>Optimum pH'in Belirlenmesi</i>	60
4.3.2.2.	<i>Optimum Fe₃O₄@GOx Miktarının Belirlenmesi</i>	60
4.3.2.3.	<i>Optimum Sürenin Belirlenmesi</i>	61
4.3.3.	Glukoz Kalibrasyonu.....	62
4.3.4.	Serbest ve İmmobilize Enzimin Kinetiğinin İncelenmesi.....	62
4.3.5.	Örnek Uygulaması.....	64
4.4.	ChOx İMMOBİLİZASYONU VE KOLİN TAYİNİ.....	65
4.4.1.	Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ /APTS/GLA Üzerine ChOx İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi.....	65
4.4.1.1.	<i>Optimum pH'in Belirlenmesi</i>	65
4.4.1.2.	<i>ChOx Miktarının Belirlenmesi</i>	65
4.4.1.3.	<i>ChOx İmmobilizasyon Süresinin Belirlenmesi</i>	66
4.4.2.	ChCl'nin Fe ₃ O ₄ @ChOx ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu.....	67
4.4.2.1.	<i>Optimum pH'in Belirlenmesi</i>	67
4.4.3.	Optimum Fe ₃ O ₄ @ChOx Miktarının Belirlenmesi.....	68
4.4.3.1.	<i>Optimum Sürenin Belirlenmesi</i>	68
4.4.4.	ChCl Kalibrasyonu.....	69
4.4.5.	İmmobilize ve Serbest Enzim Kinetiğinin İncelenmesi.....	70
4.4.6.	Örnek Uygulaması.....	71
4.5.	İMMOBİLİZE ENZİMLERİN STABİLİTESİ VE TEKRAR KULLANILABİLİRLİĞİ.....	72
5.	TARTIŞMA	74
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	81

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Enzim molekülünün aktif bölgesine substrat bağlanmasının temsili gösterimi.	10
Şekil 2.2: Bir enzimin, reaksiyonu başlatmak için gerekli aktivasyon enerjisini azaltmaya etkisi (a) katalizsiz ve (b) enzim katalizli reaksiyon.....	11
Şekil 2.3: Michaelis-Menten Kinetiği.....	12
Şekil 2.4: İlk hızın belirlenmesi.....	12
Şekil 2.5: Enzim immobilizasyonunda farklı yöntemlerin şematik gösterimi (E: Enzim).	15
Şekil 2.6: Pürin metabolizması.....	18
Şekil 2.7: Kolin ve kolinle ilgili bileşiklerin kimyasal yapıları.....	21
Şekil 3.1: Enzim immobilizasyon aşamalarının şematik gösterimi.....	29
Şekil 4.1: Fe_3O_4 , Fe_3O_4/SiO_2 ve $Fe_3O_4/SiO_2/APTS$ 'ye ait FTIR spektrumları.....	42
Şekil 4.2: Sentezlenen yalın Fe_3O_4 MNP'ler için alınan farklı STEM görüntüleri (A ve B)...	43
Şekil 4.3: Yalın Fe_3O_4 MNP'lerin (A,B) ve Fe_3O_4/SiO_2 'nin (C,D) EDS spektrumları ile renkli STEM görüntüleri.....	43
Şekil 4.4: UO_x immobilize edilmiş Fe_3O_4 MNP'ler ($Fe_3O_4@UO_x$) için alınan farklı STEM görüntüleri (A ve B).....	44
Şekil 4.5: (A) Farklı modifikasyon adımlarından sonra yalın/modifiye edilmiş Fe_3O_4 nanopartiküllerinin genel XPS spektrumları ve atomik içerikleri. (B) Fe_3O_4 'ün Fe 2p spektrumu, (C) Fe_3O_4/SiO_2 'nin Si 2p spektrumu, (D) Fe_3O_4/SiO_2 'nin O 1s spektrumu (E) $Fe_3O_4/SiO_2/APTS$ 'nin N 1s spektrumu (F) $Fe_3O_4/SiO_2/APTS/GLA$ 'nın N 1s spektrumu, (G) $Fe_3O_4/SiO_2/APTS/GLA$ 'nın C 1s spektrumu, (H) $Fe_3O_4/SiO_2/APTS/GLA/GOx$ 'in N 1s spektrumu, (I) $Fe_3O_4/SiO_2/APTS/GLA/GOx$ 'in C 1s spektrumu.....	45
Şekil 4.6: UO_x 'in $Fe_3O_4/SiO_2/APTS/GLA$ 'e immobilizasyonunda pH'ın etkisi.....	47
Şekil 4.7: $Fe_3O_4/SiO_2/APTS/GLA$ 'e immobilizasyonunda UO_x konsantrasyonunun etkisi...	48
Şekil 4.8: UA'ın $Fe_3O_4@UO_x$ ile farklı sürelerde inkübasyonu sonucu CUPRAC absorbans değerleri.....	50
Şekil 4.9: Farklı hacimlerde $Fe_3O_4@UO_x$ ilavesi ile absorbansda meydana gelen değişim. .	50

Şekil 4.10: UA standardına ait kalibrasyon grafiği.	52
Şekil 4.11: Serbest(a) ve immobilize(b) enzim için UA substratına ait Michaelis-Menten grafiği.	52
Şekil 4.12: Serbest (a) ve immobilize enzim (b) için UA substratına ait Lineweaver-Burk grafiği.	53
Şekil 4.13: UA standardı için HPLC yöntemine ait kalibrasyon grafiği.....	56
Şekil 4.14: FBS örneğine ait kromatogram (a) doğrudan (b) immobilize UOx ile muameleden sonra.	56
Şekil 4.15: FBS'nin tek başına (a) ve UA katkısı sonucu elde edilen kromatogram; (b) 10,9 µM ve (c) 21,7 µM.	57
Şekil 4.16: Farklı miktarlarda GOx'ın Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ /APTS/GLA üzerine immobilizasyonu sonucu uygulanan CUPRAC yöntemi absorbans değerleri.	59
Şekil 4.17: Glukozun Fe ₃ O ₄ @GOx ile farklı pH'larda reaksiyonu sonucu absorbansda meydana gelen değişim.	60
Şekil 4.18: Farklı hacimlerde Fe ₃ O ₄ @GOx ilavesi ile absorbansda meydana gelen değişim.	61
Şekil 4.19: Glukozun Fe ₃ O ₄ @GOx ile farklı sürelerde inkübasyonu sonucu okunan absorbans değerleri.....	61
Şekil 4.20: Değişen Glukoz konsantrasyonlarında elde edilen spektrum (A) ve kalibrasyon grafiği (B). (Glukoz son konsantrasyonları (µM) a: 11.1, b: 22.2, c: 33.3, d: 44.4, e: 55.6, f: 66.7, g: 77.8, h: 88.9, i: 100.0, j: 111.1. Artan renk yoğunluğu, B'nin alt kısmında da gösterilmiştir).....	62
Şekil 4.21: Serbest (a) ve immobilize (b) GOx enziminin glukoz substratına ait Michaelis-Menten Grafiği.	63
Şekil 4.22: Serbest (a) ve immobilize (b) GOx için glukoz substratına ait Lineweaver-Burk grafiği.	63
Şekil 4.23: ChOx'ın Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ /APTS/GLA üzerine immobilazasyonuna pH'ın etkisi.....	65
Şekil 4.24: Farklı miktarda ChOx'ın 0,01 g Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ /APTS/GLA'e immobilizasyonunun absorbansa etkisi.	66
Şekil 4.25: ChOx'ın Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ /APTS/GLA üzerine immobilizasyonuna sürenin etkisi.	67
Şekil 4.26: Fe ₃ O ₄ @ChOx 'ın ChCl ile farklı pH'larda reaksiyonu ile absorbansta meydana gelen değişim.	67
Şekil 4.27: Farklı hacimlerde Fe ₃ O ₄ @ChOx ilavesi ile absorbansta meydana gelen değişim.....	68
Şekil 4.28: ChCl'nin Fe ₃ O ₄ @ChOx ile farklı sürelerde inkübasyonu sonucu absorbansta meydana gelen değişim.	69

Şekil 4.29: ChCl standardına ait kalibrasyon grafiği.	69
Şekil 4.30: Serbest (a) ve immobilize (b) ChOx enziminin ChCl substratına ait Michaelis-Menten Grafiği.	70
Şekil 4.31: Serbest (a) ve immobilize (b) ChOx için ChCl substratına ait Lineweaver-Burk grafiği.	70
Şekil 4.32: İmmobilize enzimler kullanılarak 65,2 μM UA (a), 100 μM glukoz (b) ve 33.3 μM ChCl (c) varlığında farklı zamanlarda okunan absorbans (veya UA için ΔA) değerleri.....	72



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Temel demir oksitlerin kimyasal formülü ve renkleri.....	7
Tablo 4.1: UOx'ın farklı sürelerde immobilizasyonu sonucu 0,6 mL $5,0 \times 10^{-4}$ M UA varlığında uygulanan CUPRAC yöntemi absorbands değerleri.	48
Tablo 4.2: Farklı pH'larda UA'in tek başına ve Fe ₃ O ₄ @UOx ile reaksiyonu sonucu elde edilen CUPRAC absorbandsları.	49
Tablo 4.3: UA + Fe ₃ O ₄ @UOx karışımına 0,1 mg/mL katalazdan farklı hacimlerde ilave edildiğinde elde edilen CUPRAC absorbandsları.....	51
Tablo 4.4: Serbest ve immobilize enzime ait kinetik parametreler.	53
Tablo 4.5: UA'in fenolik ve tiyol grubu içeren antioksidanlar yanında tayini sonucunda elde edilen A_{CUPRAC} , $A_{UOX-CUPRAC}$, ΔA ve % hata değerleri.	54
Tablo 4.6: Bazı serum antioksidanları yanında UA tayini ve %hata değerleri.	55
Tablo 4.7: FBS'deki UA miktarı ve standart katkı sonucu bulunan geri kazanım değerleri...	57
Tablo 4.8: FBS'de TAC ve UA'siz TAC.	58
Tablo 4.9: Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ /APTS/GLA üzerine farklı pH'larda GOx immobilizasyonu sonucu uygulanan CUPRAC yöntemi absorbands değerleri.	58
Tablo 4.10: GOx'ın farklı sürelerde immobilizasyonu sonucu uygulanan CUPRAC yöntemi absorbands değerleri.	59
Tablo 4.11: Serbest ve İmmoblize GOx enzimine ait kinetik parametreler.	63
Tablo 4.12: FBS'deki glukoz miktarı.	64
Tablo 4.13: FBS örneğine standart katkı sonucu bulunan geri kazanım değerleri.....	64
Tablo 4.14: Devam sütündeki kolin miktarı.	71
Tablo 4.15: Devam sütüne standart katkı sonucu bulunan geri kazanım değerleri.	71
Tablo 4.16: Aynı immobilize enzimlerin beş kez art arda kullanılmasıyla uygulanan yöntem sonucunda elde edilen CUPRAC absorbands değerleri.....	73
Tablo 5.1: Geliştirilen yöntemin LOD ve lineer aralıklarının benzer literatür yöntemleriyle karşılaştırılması.	79

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
A	: Absorbans
K_M	: Michaelis sabiti
V_{max}	: Maksimum hız

Kısaltmalar	Açıklama
AA	: Askorbik asit
AOx	: Antioksidan
APTS	: (3-Aminopropil)trioksisilan
CAT	: Kateşin
CFA	: Kafeik asit
ChCl	: Kolin klorür
ChOx	: Kolin Oksidaz
CUPRAC	: Cupric Reducing Antioxidant Capacity
CYS	: Sistein
FA	: Ferulik asit
GA	: Gallik asit
GLA	: Glutaraldehit
GOx	: Glukoz oksidaz
GSH	: Glutasyon
MNP	: Manyetik nanopartikül
NAC	: N-Asetil sistein
NP	: Nanopartikül
QR	: Kuersetin
TAC	: Toplam antioksidan kapasite
TEOS	: Tetraetil ortosilikat
TR	: Trolox
UA	: Ürik asit
UOx	: Ürikaz

ÖZET

[DOKTORA TEZİ]

[OKSİDAZ ENZİMLERİ ve SUBSTRATLARI için NANOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

]

[Aslı Neslihan AVAN]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

[Danışman : Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ]

[Enzim katalizli reaksiyonlar genellikle ılımlı çevre koşulları gerektirir ve pratik uygulamalarda serbest enzimler kolaylıkla inaktive olmaktadır. Ayrıca bunların tekrar kullanımı zordur. Nanopartiküller üzerine immobilize edilen enzimler genellikle doğal enzimlere göre daha geniş çalışma pH'ı, daha fazla termal stabilite ve artan yeniden kullanılabilirlik gibi avantajlara sahiptir. Manyetik nanopartiküller (MNP'ler), enerji ve zaman harcayan santrifüj adımları gerektirmeden harici bir manyetik alanın uygulanmasıyla reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılarak enzimlerin tekrar kullanımlarına büyük ölçüde olanak sağladıkları için, destek materyali olarak kullanılmaktadır. Tez çalışmasında oksidaz enzimlerinden olan ürikaz (UOx), glukoz oksidaz (GOx) ve kolin oksidaz (ChOx)'ın fonksiyonalize Fe₃O₄ manyetik nanopartikül üzerine immobilizasyonu sağlanarak ürik asit (UA), glukoz ve kolin tayini için kolorimetrik sensörler geliştirilmiştir. Birlikte çöktürme yöntemiyle hazırlanan MNPlerin yüzeyi tetraetil ortosilikatın kullanıldığı Stöber metoduyla silanol gruplarıyla kaplanmıştır. Daha sonra -NH₂ fonksiyonalize MNP elde etmek için (3-Aminopropil)trioksolan ile muamele edilen MNPler glutaraldehit ile aktive edilip enzimlerin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

UA, insanda pürin metabolizmasının nihai ürünüdür. Anormal ürik asit seviyesi çeşitli hastalıklara neden olabildiğinden kanda veya idrarda ürik asidi izlemek hastalığın takibi ve teşhisi açısından çok önemlidir. UA, önemli bir antioksidan olmasına rağmen, nörodejeneratif hastalıklar varlığında oluşan kandaki yüksek UA seviyeleri gerçek antioksidan kapasiteyi yansıtmamaktadır. Geliştirilen yöntemle hem UA tayini yapılmış hem de UA içermeyen

gerçek antioksidan kapasite hesaplanabilmiştir. Bunun için, UA içeren örnek çözeltisine doğrudan CUPRAC yöntemi uygulanmıştır. Daha sonra aynı miktardaki örnek immobilize UOx ile inkübe edilip miktatis yardımıyla immobilize UOx uzaklaştırıldıktan sonra CUPRAC yöntemi uygulanmıştır. İki örnek arasındaki CUPRAC absorbans farkından UA miktarı belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemle çeşitli fenolik ve tiyol grubu içeren antioksidanlar yanında UA tayini %0,18 ila %4,87 hata ile gerçekleştirilmiştir. UA için dedeksiyon limiti 0,34 µM, linner aralık 5,43 – 65,22 µM olarak bulunmuştur. Yöntem ayrıca fetal bovine serum (FBS) örneğinde UA tayini ve UA içermeyen antioksidan kapasitenin belirlenmesi için uygulanmıştır. Yöntemin doğruluğu HPLC yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Standart katkı sonucu geliştirilen yöntemle % geri kazanım değerleri %98,07 ve %98,43 olarak bulunmuştur.

Tez çalışmasının ikinci kısmında, hazırlanan fonksiyonalize MNP'ler üzerine GOx immobilize edilerek glukoz tayini gerçekleştirilmiştir. Glukozun GOx katalizli reaksiyonu sonucu glukonik asit ve H₂O₂ meydana gelmektedir. Glukoz, CUPRAC reaktif bir bileşik değildir. Ancak, yöntemde enzimatik reaksiyon sonucu glukoz konsantrasyonuna eşdeğer miktarda oluşan H₂O₂'nin CUPRAC reaktif olmasından yararlanılmıştır. Geliştirilen yöntem ile lineer aralık 11,1 µM ila 111,1 µM, dedeksiyon limiti ise 0,59 µM olarak bulunmuştur. İmmobilize enzim ve serbest enzimin kinetiğini karşılaştırmak için enzimatik reaksiyon sonucu oluşan H₂O₂'in oluşum hızı takip edilmiştir. İmmobilize ve serbest enzim için K_M değerleri hesaplanmış ve her iki enzim için de aynı bulunduğu immobilizasyon sonucu substrata ilgisinde bir düşüş görülmemiştir. Hızında ise immobilizasyon sonrası %43'lük bir azalma görülmüştür. Geliştirilen yöntem ile FBS'de glukoz tayini gerçekleştirilmiş ve 141,0 ± 4,2 mg/dL olarak bulunmuştur. Sonucun firma tarafından belirtilen değer (139 mg/dL) ile uyumlu olduğu görülmüştür. FBS'ye standart katkı yapılmış ve geri kazanım değerleri %101 olarak bulunmuştur.

Kolin, fosfolipidlerin önemli bir bileşenidir, nörotransmitter asetilkolinin sentezi için gerekli olan bir amino alkoldür. Kolin eksikliği karaciğer fonksiyon bozukluğuna neden olabilir ayrıca kanser, Parkinson ve Alzheimer gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Pek çok gıda kolin ve kolin esterleri içerir. Özellikle bebek mamaları olmak üzere çeşitli gıdaların işlenmesi sırasında ilave edilir. Bu nedenle kolin tespiti ve tayini, gıda ve klinik analizler için önemlidir. Tezin üçüncü kısmında fonksiyonalize MNP üzerine ChOx enzimi immobilize edilerek kolin tayini gerçekleştirilmiştir. Yöntemde kolinden ChOx enzimi katalizliğinde betain ve H₂O₂ oluşmasından yararlanılmıştır. Kolin'e eşdeğer miktarda oluşan H₂O₂ CUPRAC yöntemiyle tayin edilmiştir. Kolin için lineer aralık 2,78 – 44,4 µM, LOD değeri 0,20 µM olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem bebek mamasında kolin tayininde kullanılmış ve elde edilen sonuçlar (16,1 ± 0,5 mg/100 mL) firmanın belirttiği kolin miktarı ile (15 mg/ 100 mL) uyumlu bulunmuştur.

]

Haziran 2023 , [111] sayfa.

Anahtar kelimeler: [Fe₃O₄-manyetik nanopartiküller, kolin oksidaz, glukoz oksidaz, ürikaz, ürik asit içermeyen antioksidan kapasite]

ABSTRACT

[Ph.D. THESIS]

**[DEVELOPMENT of NANOSENSOR for OXIDASE ENZYMES and THEIR
SUBSTRATES**

]

[Ash Neslihan AVAN]

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Analytical Chemistry Programme

[Supervisor : Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ]

[Enzyme catalyzed reactions usually require mild environmental conditions and free enzymes are easily inactivated in practical applications. Also, reusing free enzymes are difficult. Enzymes immobilized on nanoparticles generally have advantages such as a wide range of working pH, higher thermal stability and increased reusability than natural enzymes. Magnetic nanoparticles (MNPs) are used as support materials since they allow the enzymes to be reused by easily separating (MNPs) from the reaction medium by applying an external magnetic field without requiring energy and time-consuming centrifugation steps. In this thesis, uricase (UOx) glucose oxidase (GOx) and choline oxidase (ChOx) which are the oxidase enzymes, have been immobilized on functionalised Fe₃O₄ magnetic nanoparticle and colorimetric sensors have been developed for the determination of uric acid (UA), glucose and choline. The surface of the MNPs prepared by co-precipitation method which was covered with silanol groups with the Stöber method using tetraethyl orthosilicate. MNPs treated with (3-Aminopropyl) triethoxysilane to obtain –NH₂ functionalized MNPs, then they were activated with glutaraldehyde, and the enzymes were immobilized on them.

UA is the end product of purine metabolism in humans. Since abnormal uric acid level can cause various diseases, monitoring uric acid in blood or urine is very important for the follow-up and the diagnosis of certain diseases. Although UA is an important antioxidant, high UA levels in the blood, which occur in the presence of neurodegenerative diseases, do not reflect the true antioxidant capacity. With the developed method, both UA determination was made

and the real antioxidant capacity without UA could be calculated. For this purpose, CUPRAC method was applied directly to the sample solution containing UA. After that the same amount of the sample was incubated with immobilized UOx and the CUPRAC method was applied after the immobilized UOx was removed by using a magnet. The amount of UA was determined from the difference in CUPRAC absorbance in both samples. In the developed method, UA was determined with an error of 0.18% to 4.87% in the presense of various antioxidants containing phenolic and thiol groups. The detection limit for UA was found to be 0.34 μM , and the liner range was 5.43 – 65.22 μM . The method was also applied for the determination of UA and also to determine antioxidant capacity without UA in fetal bovine serum (FBS) sample. The accuracy of the developed method was compared with the HPLC method. In the developed method from the result of the standard additive, the % recovery values were found to be 98.07% and 98.43%.

In the second part of this thesis, glucose determination was performed by immobilizing GOx on the prepared functionalized MNPs. Gluconic acid and H_2O_2 are formed as a result of the GOx catalyzed reaction of glucose. Glucose is not a CUPRAC reactive compound. However, H_2O_2 , which is formed in an amount equivalent to the glucose concentration as a result of the enzymatic reaction, is CUPRAC reactive. The linear range was found to be 11.1 μM to 111.1 μM , and the detection limit was 0.59 μM . The rate of formation of H_2O_2 that was formed as a result of the enzymatic reaction was followed in order to compare the kinetics of the immobilized and the free enzyme. K_M values were calculated and found to be the same for both enzymes as there was no decrease in affinity for the substrate as a result of immobilization. On the other hand, there was a 43% decrease in velocity after immobilization. With the developed method, glucose determination in FBS was performed and it was found to be 141.0 ± 4.2 mg/dL. It has been observed that the result is compatible with the value (139 mg/dL) specified by the company. Glucose standard was added to FBS and the obtained recovery values were found to be 101%.

Choline is an essential component of phospholipids, which is an amino alcohol that is necessary for the synthesis of the neurotransmitter acetylcholine. Choline deficiency can cause liver dysfunction and has been associated with various diseases such as cancer, Parkinson's and Alzheimer's. Many foods contain choline and choline esters. It is added during the processing of various foods, especially infant formulas. Therefore, the detection and determination of choline is important for food and clinical analysis. In the third part of the thesis, ChOx enzyme was immobilized on the functionalized MNP and choline determination was performed. In this method, betaine and H_2O_2 formation from choline catalyzed by using ChOx enzyme. H_2O_2 , which was formed in an amount equivalent to choline, was determined by CUPRAC method. The linear range for choline was 2.78 – 44.4 μM , and the LOD value was found to be 0.20 μM . The developed method was used for the determination of choline in infant formula and the results obtained (16.1 ± 0.5 mg/100 mL) were found to be compatible with the choline amount declared by the company (15 mg/ 100 mL).]

June 2023, [111.]pages.

Keywords: [Fe_3O_4 - magnetic nanoparticles, choline oxidase, glucose oxidase, uricase, uric acid-free antioxidant capacity]

1. GİRİŞ

Yüksek katalitik aktivite ve substrat özgüllüğü nedeniyle, doğal enzimler endüstriyel alanlarda, biyolojik ve tıbbi analizlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Enzim aracılı reaksiyonlar genellikle uygun çevresel koşullar gerektirir. Serbest enzimlerin saflaştırılması için yüksek maliyet gerektirmesi, düşük operasyonel stabilite, katalitik aktivitenin çevresel koşullarla değişmesi, geri dönüşüm ve yeniden kullanımında zorluklar bulunması gibi bazı dezavantajlar içermektedir. Bu dezavantajlar enzimlerin gıda işleme, biyosensör, çevre koruma, biyotıp vb. alanlardaki uygulamalarını sınırlamaktadır. Nanopartiküller veya nanomalzemeler üzerine enzim immobilizasyonu ile bu sorunlar büyük ölçüde giderilebilmektedir. Nanopartiküllerin spesifik yüzey alanının fazla olması enzimler, proteinler ve antikolar gibi diğer birçok biyoaktif molekül için iyi bir immobilizasyon desteği olmasını sağlamaktadır.

Hareketi manyetik olarak indükleme, sinyal geliştirme yeteneğine sahip olduklarından manyetik nanopartiküller yeni analitik tekniklerde ve geleneksel yöntemlerin kullanımına entegre edilmeye başlanmıştır. Enzimlerin bir miktarla kolayca toplanarak tekrar kullanımına imkan verdikleri için, enzimatik immobilizasyonda destek materyali olarak manyetik nanopartiküller önemli bir avantaj sunmaktadırlar. (Chen ve diğ., 2017; Huang ve diğ., 2019).

Tez çalışmasında öncelikle, birlikte çöktürme yöntemiyle Fe_3O_4 MNP sentezlenerek yüzeyine silanol grupları bağlayabilmek için TEOS ile muamele edildikten sonra APTS ile reaksiyona sokulmuştur. Böylece MNPlerin yüzeyinin $-NH_2$ fonksiyonel gruplarına sahip olması sağlanmıştır. Ardından aktivasyonunu sağlamak için ortama GLA ilave edilip üzerine kovalent bağlanmayla oksidaz enzimleri olan ürikaz, glukoz oksidaz ve kolin oksidaz'ın ayrı ayrı immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Ürat oksidaz (ürikaz) enzimi (UOx), ürik asidi 5-hidroksi izoürat ve H_2O_2 'ye dönüştürerek allantoin oluşumuna yol açmaktadır. Kuşlar, sürüngenler ve birçok memeli, ürik asidin oksidasyonunu katalize eden ürikaz enzimine sahiptir. Eksik bir gen nedeniyle, insanlar ürikaz enziminden yoksundur. UOx, serum ürik asit konsantrasyonunun saptanmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır. UA, kan serumu, plazma, idrar ve tükürük gibi biyolojik sıvılarda bulunur. UA, insanda pürin metabolizmasının ana nihai ürünüdür. Böbrek ve metabolik

bozuklukların erken belirtilerinde bir gösterge olmasının yanında insan serumunda bulunan düşük molekül ağırlıklı önemli antioksidanlardan biridir. Bu yüzden UA seviyesinin kanda veya idrarda takibi önemlidir.

UA tayini için elektrokimyasal (Ahmad ve diğ, 2015; Ali ve diğ. 2011), florimetrik, (Azmi ve diğ, 2015), kolorimetrik (Domagk ve Schlicke, 1968; Trivedi ve diğ. 1978; Wang ve diğ, 2019) kromatografik yöntemler (Czuderna ve Kowalczyk, 2000; Dai ve diğ. 2007), gibi çeşitli teknikler bulunmaktadır. Bu yöntemler enzim esaslı olabildiği gibi nonenzimatik de olabilmektedir. UA tayini için enzim esaslı yöntemler ürik asidin, hidrojen peroksit, allantoin ve karbon dioksit oluşturarak oksijenle enzimatik olarak yükseltgenmesine dayanmaktadır. Direkt olarak ölçülecek maddeye dayanan, ürik asidin kendisinin 293 nm'deki absorpsiyonunun ölçümüne dayanan doğrudan yöntem ve ürikaz katalizli reaksiyon ürünü olan hidrojen peroksidin ölçümüne dayanan dolaylı yöntemler olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Dolaylı yöntemlerde H_2O_2 , elektrokimyasal olarak belirlenebileceği gibi kromojenik bir reaktif kullanılarak spektrofotometrik olarak da belirlenebilmektedir. (Zhao ve diğ., 2009)

Tez çalışmasının ilk kısmında UOx enzimi, Fe_3O_4 MNP'ler üzerine immobilize edilerek antioksidan kapasite tayin yöntemi olan CUPRAC yöntemiyle UA tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak enzim immobilizasyonunu etkileyen pH, süre, UOx miktarı gibi parametreler ve reaksiyon koşulları optimize edilmiştir. UA içeren örneğin başlangıçtaki CUPRAC absorpsiyonu ölçülüp ardından örnek manyetik nanopartikül üzerine immobilize UOx ile muamele edildiğinde açığa çıkan CUPRAC reaktif H_2O_2 katalazla parçalanarak CUPRAC yöntemi yeniden uygulanmıştır. Bu iki işlem arasındaki absorpsiyon farkı kullanılarak çeşitli fenolik ve tiyol grubu içeren antioksidanlar yanında ve fetal bovine serum örneğindeki UA tayin edilmiştir.

Tez çalışmasının ikinci kısmında glukoz tayini gerçekleştirilmiştir. Glukoz tayini, klinik ve mikrobiyoloji laboratuvarlarında, gıda endüstrisinde yaygın olarak gerçekleştirilmektedir. Diyabet, dünya çapında en sık görülen hastalıklardan biri olup bununla ilişkili komplikasyonlar, neredeyse her toplum için sakatlığın artması, yaşam beklentisinin azalması ve yüksek sağlık maliyetleriyle sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, diyabet tanısı için glukozun hızlı ve güvenilir bir şekilde takibi amacıyla çeşitli sensör geliştirme çabaları sürekli ilgi görmektedir.

Şekerler, tüm canlı varlıklar için ana enerji kaynaklarıdır. İnsanlar vücut ağırlıklarının izin verdiği kadar çok daha rafine şeker tüketmektedirler. İnsan vücudu büyük miktarda rafine karbonhidratı tolere edemez, bunun sonucunda hayati organlara zarar verir. Diyetteki fazla şeker kilo alımı dışında diyabet, kalp hastalığı ve hipertansiyon riskini artırır. Bu nedenle, yaygın olarak tüketilen gıda ürünlerindeki şeker miktarının belirlenmesi önemlidir (Ramasami ve diğ., 2004).

Tez çalışmasının ikinci kısmında aynı şekilde sentezlenip yüzey modifikasyonu yapılan MNPlar üzerine glukoz oksidaz enzimi immobilize edilerek CUPRAC yöntemiyle glukoz tayini gerçekleştirilmiştir. Glukoz molekülü CUPRAC reaktif değildir. Ancak glukozun, glukoz oksidaz katalizli reaksiyonu sonucu oluşan H_2O_2 , CUPRAC reaktifdir. Meydana gelen H_2O_2 'in konsantrasyonu glukozla eşdeğer olduğundan glukozun enzimatik tayininde kullanılmıştır. Geliştirilen sensör daha sonra FBS'de glukoz tayininde kullanılmıştır.

Kolin, lipid sentezi ve taşınması, hücrel metilasyon reaksiyonları, nöral tüp gelişimi, kök hücre çoğalması ve apoptozisde yer alan normal hücre fonksiyonlarında gerekli olan temel bir besindir. Kolin, memeli hücre zarlarındaki fosfolipid içeriğinin yarısından fazlasını oluşturan fosfatidilkolin için bir öncüdür ve fazla trigliseridlerin karaciğerden taşınmasında kritiktir. Sonuç olarak, kolin eksikliği, karaciğer yağlanması ile ilişkilendirilmiştir ve bilinen kanserojenlerin yokluğunda kansere neden olduğu bulunan tek beslenme eksikliğidir. Kolin ayrıca beyin, kalp, diğer birçok organ ve organ sisteminin işlevini etkileyen en yaygın nörotransmitterlerden biri olan asetilkolinin öncüsüdür. Bu nedenle kolin tespiti ve tayini, gıda ve klinik analizler için önemlidir. Genel olarak, günümüzde kullanılan analitik yöntemler, kolin oksidaz (ChOx) ile kolinin enzimatik oksidasyonu sonucunda açığa çıkan hidrojen peroksidin belirlenmesine dayanır. Gıdalardaki ve besin takviyelerindeki kolin ve kolin esterlerinin analizi, HPLC (Hefni ve diğ., 2015), GC (Holmes-McNary ve diğ., 1996), spektrofotometri (Nikzad ve Karami, 2018), ve elektrokimyasal (Langer ve diğ., 2004) çeşitli enstrümantal teknikler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasının üçüncü kısmında spektroskopik olarak kolin tayini gerçekleştirilmiştir. Bunun için MNP üzerine modifikasyon işlemlerinden sonra ChOx enzimi immobilize edilmiştir. Kolin'in ChOx enzimi katalizliğinde gerçekleşen reaksiyonu sonucunda H_2O_2 ve betain oluşmaktadır. Enzimatik reaksiyon sonucu koline eşdeğer olarak oluşan H_2O_2 , CUPRAC yöntemiyle tayin edilmiştir.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. NANOTEKNOLOJİ

Fizik Nobel ödüllü Richard P. Feynman, nanoteknolojinin kavramsal temellerine ilham veren ilk kişi olmuştur. Feynman tarafından Amerikan Fizik Derneği'nin Aralık 1959 tarihli toplantısında 'Alta çok yer var' başlıklı konferansında tanıtılmıştır. O zamandan beri, fizik, kimya ve biyolojide Feynman'ın maddeyi atomik ölçekte ele alma fikrini gösteren birçok yenilikçi gelişme olmuştur (Benelmekki, 2015).

Nanoteknoloji, 1 metrenin milyarda biri ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) ölçeğinde madde ile ilgilenen bilimdir. Genel olarak, nanopartikülün boyutu 1-100 nm arasında değişir. (Horikoshi ve Serpone, 2013). Bu tür malzemelerin özellikleri büyük ölçüde boyutlarına ve şekline bağlıdır.

Farklı boyutlarda küresel, silindirik, tübüler, konik, spiral, düz vb. yapılarda olabilirler. Nanomalzemelerin sentezinde kullanılan iki temel yaklaşım olan "aşağıdan yukarıya" ve "yukarıdan aşağıya" sentez yöntemleri aracılığıyla farklı boyut ve yapıdaki nanomalzemeler elde edilebilmektedir. Partikül boyutu moleküler boyutlara yaklaştıkça maddenin tüm özellikleri değiştiğinden, biyotıp, kataliz, güneş pilleri, yakıt hücreleri ve manyetik veri depolama gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmasına olanak veren benzersiz özelliklere sahip olmasına neden olmaktadır (Martin ve Mitchell, 1998).

Sentezdeki son gelişmeler, nanopartiküllerin boyutunu tam olarak kontrol etme kabiliyeti sunmaktadır. Bu özellik, taneciklerin boyutunun uygulamaya veya hedefe özgü olmasını sağlayabilmektedir. Bunların biyolojik türlerle entegrasyonu, bu nesnelerin göreceli boyutları nedeniyle özellikle caziptir. Nanomalzemelerin yeni özelliklerinden ve uygun boyutlarından yararlanmak, analiz süresinin azalması, büyük bir yüzey / hacim oranının ve küçük çevresel bozulmanın istendiği analitik tekniklerde özellikle anlamlıdır (Beveridge ve diğ., 2011).

2.2. NANOPARTİKÜLLERİN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Nano ölçekli malzemeler, moleküler düzeyde reaktivitenin katlanarak artmasına ve karşılık gelen yığın hallerinden farklı özellikler sergilemesine neden olmaktadır. Bu özelliklerden bazıları;

- sertlik, mukavemet artışı,
- erime noktasının azalması,
- ısı kapasitesinin artması,
- nanometaller için iletkenlik artışı,
- Curie sıcaklığının azalması,
- doğrusal olmayan optik özelliklerin başlaması,
- katalitik aktivitenin artması,
- çözünürlük değişimi,
- partikül büyüklüğünün bir fonksiyonu olarak renk değişimidir.

Aslında, nanomalzemelerin benzersiz özelliklerinin bir kısmı, azalan nesne boyutları ile mevcut yüzey alanındaki inanılmaz artışla açıklanmaktadır (Trotta ve Mele, 2019).

NP'lerin elektronik ve optik özellikleri büyük ölçüde birbiriyle ilişkilidir. Soy metal NP'ler boyutlarına bağlı olarak farklı optik özelliklere sahiptir ve yığın metal spektrumunda olmayan güçlü bir UV-görünür absorpsiyon bandı gösterirler. Altın, gümüş gibi soy metal nanopartiküllerin kolloidal süspansiyonlarının renkli olmalarına neden olan özgün optik özellik yüzey plazmon rezonansıdır (SPR). Örneğin, 20 nm'lik altın nanopartikül karakteristik şarap kırmızısı, gümüş NP'ler sarımsı, platin ve paladyum NP'ler ise siyah renge sahiptir (Horikoshi ve Serpone, 2013).

Nanopartiküllerin sahip olduğu benzersiz fiziksel özellikler onların yoğun bir şekilde araştırmalara konu olmasına neden olmuştur. Yığın malzeme ile nanomalzeme arasındaki farkın özellikle belirgin olduğu manyetik özellikler de bu araştırmalarda özel bir yer tutmaktadır.

2.3. MANYETİK NANOPARTİKÜLLER

Manyetik nanopartiküller (MNP), çok işlevli özellikleri nedeniyle, fizik, biyoloji, kimya, biyosensör ve nanotıp alanlarında etkili nanoteknoloji esaslı malzemeler grubundandır. Manyetik nanopartiküller, biyolojik yapıların manyetik olarak ayrılması ile teşhisin

geliştirilmesine, manyetik nano taşıyıcılar ile ilaç dağıtımına katkıda bulunulurken, radyo frekans kontrollü manyetik nanopartiküller ve manyetik rezonans görüntüleme uygulamaları ile kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni bir yaklaşım sağlamıştır (Kudr ve diğ., 2017).

MNP'ler, demir, kobalt ve nikel gibi saf metalleri içeren bir dizi farklı bileşim ile; Fe_3O_4 ve $\gamma-Fe_2O_3$ gibi metal oksitler; MFe_2O_4 gibi ferritler (M = Mg, Cu, Ni, Mn ve benzeri) ve metal alaşımları ile (FePt, CoPt) hazırlanabilmektedir. Co ve nikel gibi yüksek manyetik özellik gösteren malzemeler ise toksik ve oksidasyona eğilimli olduklarından fazla ilgi duyulmamaktadır (Majidi ve diğ., 2016).

Manyetik demir oksit nanopartiküller, öncelikle üretiminin ucuz olması, yeterli fiziksel ve kimyasal kararlılığa sahip olmasının yanı sıra biyouyumluluk sergilemesi ve çevre açısından güvenli olması gibi önemli avantajlara sahip olması nedeniyle biyomedikal uygulamalar için sıklıkla kullanılan manyetik nanopartiküllerdir (Kudr ve diğ., 2017).

Literatürde adı geçen demir içeren NP'ler genellikle üç ana demir okside dayanmaktadır. Bunlar temel olarak hematit($\alpha-Fe_2O_3$), maghemit($\gamma-Fe_2O_3$) ve manyetittir (Fe_3O_4 veya $FeO \cdot Fe_2O_3$). Bunlar aynı zamanda doğada da en yaygın bulunanlardır ve çoğunlukla volkanik patlamalar ve hava kirliliği nedeniyle toprak ve kayalarda bulunurlar.

Demir oksitler, renk bakımından önemli ölçüde değişerek bunların tanımlanmasına yardımcı olabilirler. Ayrıca oksidasyon basamakları, bileşimleri, kristalografik yapıları ve manyetik özellikleri bakımından da farklılık gösterirler. Bilinen en eski demir oksit hematittir ($\alpha-Fe_2O_3$); kinetik ve termodinamik olarak kararlıdır. Maghemit $\gamma-Fe_2O_3$ sadece kinetik olarak stabildir, bu da meta stabil anlamına gelir ve yavaşça sabit bir demir oksit formuna (hematit) dönüşerek ciddi bir mıknatıslanma düşüşüne yol açar. Manyetit Fe_3O_4 veya $FeO \cdot Fe_2O_3$, en güçlü manyetik davranışı gösteren, genellikle "herkül taşı" olarak adlandırılan siyah demir oksittir (Wallyn ve diğ., 2019).

Manyetitt tetrahedral ve oktahedral koordinasyon ile iki alt örgü bölgesinde Fe (II) ve Fe(III) iyonlarını bulunduran kübik ters spinel yapıdadır. Fe (III) iyonları, sekiz tetrahedral bölgeyi tamamen işgal eder ve Fe (II) iyonları ile oktahedral bölgelere rastgele dağılır. Aslında, tetrahedral bölgeler yalnızca Fe (III) iyonlarını içerirken, oktahedral bölgeler hem Fe(III) hem de Fe(II) iyonlarını içerir (Ghazanfari ve diğ., 2016).

Tablo 2.1: Temel demir oksitlerin kimyasal formülü ve renkleri.

Demir Oksit	Kimyasal Formül (Geçerli Adı)	Renk
Demir (II) oksit	FeO (Wüstit)	Siyah
Demir (II,III) oksit	Fe ₃ O ₄ veya FeO·Fe ₂ O ₃ (Manyetit)	Siyah
Demir (III) oksit	α-Fe ₂ O ₃ (Hematit) β-Fe ₂ O ₃ γ-Fe ₂ O ₃ (Maghemit) ε-Fe ₂ O ₃	Gri, kahverengi, kırmızı

Çapları ~30 nm'den az olduğunda, manyetik nanopartiküller genellikle süperparamanyetiktir, yani “manyetik hafıza”ları yoktur. Manyetik alan yokluğunda, süperparamanyetik nanopartiküllerin net manyetik dipolu yoktur, çünkü termal dalgalanmalar spinlerin rastgele yönlendirilmesine neden olur. Bununla birlikte, nanopartiküller manyetik alan etkisinde bırakıldıklarında, manyetik dipol indüklenir. Harici manyetik alan çıkarıldıktan sonra manyetik nanopartiküller rastgele yönlendirilir ve doğal manyetik olmayan durumlarına geri döner. Süperparamanyetik özellikler avantajlıdır, çünkü manyetik nanoparçacıklar, agregasyona neden olan çekici manyetik kuvvetler olmadan çözücü içinde kolayca disperse olabilir. Manyetik sensörlerde önemli olan, MNP'ler nedeniyle “artık manyetik alan” ın bulunmamasıdır. Nanopartiküllerdeki süperparamanyetizma, maddenin türü, yapıların kristallliği ve parçacığın büyüklüğü ile belirlenir. Bu nedenle, bir nanopartikülün manyetik özelliklerini öngören genel bir kural yoktur (Beveridge ve diğ., 2011).

2.3.1. Fe₃O₄ Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

MNP'lerin hazırlanması için günümüze kadar birlikte çöktürme, ısıl ayrışma, mikroemülsiyon, mikrodalga destekli, yanma, karbon ark ve lazer pirolizi gibi farklı yöntemler bildirilmiştir. Ek olarak, bu NP'ler elektrokimyasal ve bakteriyel sentez (manyetotaktik bakteriler, demir indirgeyici bakteriler) gibi diğer yöntemlerle de sentezlenebilmektedir.

NP'lerin hazırlanması için en eski tekniklerden biri, ürünleri çözeltilerden çöktürmedir. Çöktürme reaksiyonlarında, metal öncüleri bir çözücüyle çözülür ve çözünmeyen bir katı üretmek için bir çöktürücü madde ilave edilir. Çöktürme reaksiyonlarının en önemli avantajı, çok miktarlarda nanopartikül elde edilebilmesidir. Düzgün parçacıklar genellikle

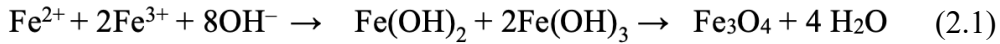
çekirdeklerin ayrılması ve çekirdeklerin büyümesini içeren bir işlem olan homojen çöktürme reaksiyonu ile sentezlenir. (Majidi ve diğ., 2016)

Birlikte Çöktürme; Kontrollü boyut ve manyetik özelliklerde MNP'lerin sentezinde en sık kullanılan ve en uygun yöntem birlikte çöktürmedir. Uygulama kolaylığı ve zararlı malzeme ve yöntemlere daha az ihtiyaç duyulması nedeniyle biyosensörlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemde MNP'ler, oksidasyonu engelleyecek inert bir atmosfer altında oda sıcaklığı veya daha yüksek sıcaklıklarda baz ilavesiyle sulu tuz çözeltilerinden hazırlanmaktadır.

Çözeltideki küresel MNP'lerin sentezi için iki ana yaklaşım vardır:

- (i) farklı oksitleyici maddelerle kısmen oksitlenen demir (II) hidroksit süspansiyonları
- (ii) sulu ortamdaki ferröz ve ferrik hidroksitlerin stokiyometrik karışımlarının olgunlaşması.

Aslında, (i) koşullarıyla gerçekleştirilen prosedürlerde Fe (2+) kısmen oksitlendiğinde, Fe (3+) meydana geldiğinden her iki demir tuzunun bir karışımını oluşturarak (ii) 'ye dönüşür ve homojen boyutta küresel manyetit partikülleri elde edilir. Genel reaksiyon prensibi aşağıdaki gibidir.



Demir oksit NP'lerin şekli ve boyutu, sentezde kullanılan demir tuzlarının türüne, Fe(II)/Fe(III) oranına, pH değeri, reaksiyon sıcaklığı, ortamın iyonik gücü ve diğer reaksiyon parametrelerine bağlıdır.

Oksitleyici olmayan ortamda 2/1 stokiyometrik oran ($\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$) ile pH 8 ila 14 arası tam çökelti oluşumu için gerekli aralıktır. Ek olarak, çöktürme ortamının pH'ını ve iyonik kuvvetini ayarlayarak, partiküllerin büyüklüğünün 2 ila 15 nm aralığında kontrol etmenin mümkün olduğu gösterilmiştir.

Fe_3O_4 MNP'lerin birlikte çöktürme ile sentezlenmesindeki en önemli sorunlar, spesifik yüzey alanı ve yüksek yüzey enerjisine sahip çok küçük partikül boyutu nedeniyle partiküllerin kümelenme eğilimi ve reaksiyon karışımının yüksek pH değeri nedeniyle hem sentez hem de saflaştırma aşamalarında pH'ın ayarlanmasının gerekmesidir (Majidi ve diğ., 2016).

Manyetik nanopartiküller, birçok analitin karmaşık matrislerden yakalanması, derişiklendirilmesi ve ayrılması için kullanışlı araçlardır. Manyetik nanopartiküller, büyük bir yüzey/hacim oranına sahip olma, boyut olarak ilgilenilen birçok analit ile benzer boyutlara sahip olma, çözelti içinde kolayca dağılabilme ve sinyali arttırmak için yararlı fiziksel özelliklere sahip olmaları nedeniyle analitik yöntemler için avantajlıdır. Bununla birlikte, analizlerde manyetik nanopartiküllerin kullanımı için iki zorluk vardır. İlk olarak, manyetik nanopartikülleri hareket ettirmek için yeterli manyetik kuvvet uygulanması gerekir ki bunun için de büyük manyetik alan değişimine ihtiyaç vardır. İkincisi ise analitlerin derişiklendirilmesi, ayrılması, miktar tayini gibi çeşitli analizleri mümkün kılan manyetik nanopartikül yüzeylerinin önce uygun kimyasallarla işlevselleştirilmesinin gerekmesidir. Manyetik nanopartiküller, kimyasal modifikasyonları gerçekleştirmek ve işlevselleştirme için ince bir altın, SiO₂ veya karbon tabakası gibi çeşitli malzemeler ile kaplanabilmektedir (Beveridge ve diğ., 2011).

2.4. ENZİMLER

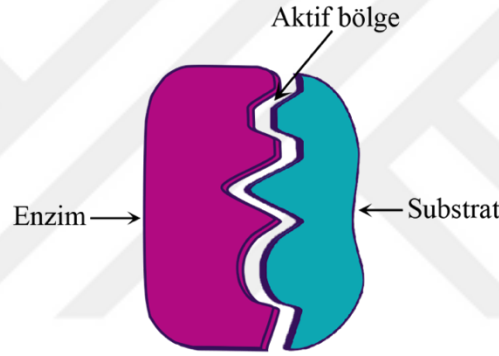
Enzimler, canlı organizmalardaki biyokimyasal reaksiyonların daha hızlı gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Karmaşık biyokatalitik süreçlere tek tek veya birlikte katılarak yaşamın devamlılığının sağlanmasında önemli roller oynarlar. Ayrıca hücrelerden ekstrakte edilerek ticari önemi bulunan bazı işlemleri katalize etmek için de kullanılabilirler. Örneğin, tatlandırıcıların ve temizlik ürünlerinin üretiminde, adli, tıbbi ve çevresel analizlerde anahtar rol oynarlar (Huang ve diğ., 2019; Robinson, 2015). Genel olarak, enzimatik katalizin enzimatik olmayan katalize göre iki ana avantajı vardır: 1) yüksek reaksiyon seçiciliği ve 2) nispeten ılımlı koşullar altında çok yüksek katalitik etkiye sahip olmasıdır.

'Enzim' kelimesini ilk kez 1878'de Alman fizyolog Wilhelm Kühne mayanın şekerlerden alkol üretebilmesini açıklarken kullanılmış ve Yunanca en ('içeride' anlamına gelir) ve zume ('maya' anlamına gelir) kelimelerinden türetilmiştir.

Katalizör olarak enzimlere çok düşük konsantrasyonlarda ihtiyaç duyulur ve reaksiyon esnasında tüketilmeden katıldıkları reaksiyonları hızlandırır. Enzimlerin, substrat moleküllerini ürün moleküllerine dönüşümünü katalize etmesi aşağıdaki şekilde tarif edilir (2.2):



Enzimler, oldukça güçlü katalizörler olmasının yanında genellikle sadece bir tip (veya en çok benzer tipte) substrat molekülünün ürün moleküllerine dönüşümünü katalize ettikleri için önemli bir özgünlüğe sahiptir. Bazı enzimler grup özgünlüğü gösterir. Örneğin, alkalın fosfataz enzimi, çeşitli substratlardan fosfat grubunu koparabilir. Diğer bazı enzimler mutlak özgünlük olarak tanımlanan çok daha yüksek özgünlüğe sahiptirler. Örneğin, GO_x, substratı olan β-D-glukoz için özgünlük gösterirken diğer monosakkaritlere karşı hiç aktivite göstermediği söylenebilir. Bu özgünlük, karmaşık bir karışımdaki (örneğin kan veya idrar örneği) belirli bir substratı (örn., glukoz) ölçen birçok analitik analizin ve cihazın geliştirilmesinde (biyosensör) büyük önem taşımaktadır.



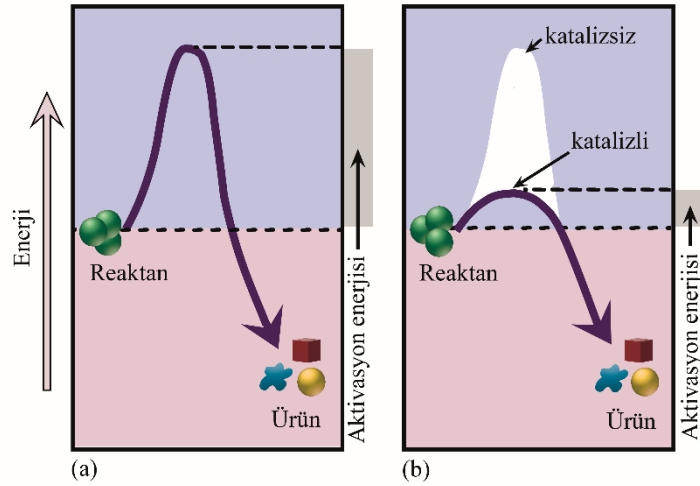
Şekil 2.1: Enzim molekülünün aktif bölgesine substrat bağlanmasının temsili gösterimi.

Aktif bölgenin tek tip substrat molekülüne bağlanmasını sağlayan şekil ve yük özellikleridir (Şekil 2.1). Böylece enzim katalitik aktivitede önemli bir özgünlük gösterebilmektedir. Substrata bağlanan kısım sadece aktif bölgedir, protein molekülünün geri kalanının rolü ise aktif bölgeyi stabilize etmek ve bu bölgenin substrat molekülü ile etkileşebilmesi için uygun ortam sağlamaktır (Robinson, 2015).

Çok sayıda enzim sadece proteinden oluşmasına rağmen, bazı enzimler katalitik aktivitesi için gerekli olan kofaktör olarak bilinen protein olmayan bir bileşen içermektedir. Kofaktör başka bir organik molekül olabileceği gibi demir, mangan veya çinko gibi metal iyonu da olabilir. Kofaktör organik bir molekül olduğunda koenzim olarak adlandırılır. Enzim aktivitesi için bir kofaktör gerektirdiğinde, inaktif protein bileşeni genellikle apoenzim olarak adlandırılır ve apoenzim – kofaktör (yani aktif enzim) yapısı holoenzim olarak adlandırılır.

2.4.1. Enzim Kinetiği

Enzim kinetiği, enzim kataliziyle gerçekleşen reaksiyonların hızını belirleyen faktörlerin incelenmesidir. Enzimin reaksiyon hızını arttırmak için gerçekleşen mekanizma bir reaksiyondan diğerine farklılık gösterir. Ancak, genel ilke, substratın enzime bağlanması ve reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürmesidir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Bir enzimin, reaksiyonu başlatmak için gerekli aktivasyon enerjisini azaltmaya etkisi (a) katalizsiz ve (b) enzim katalizli reaksiyon.

pH, sıcaklık gibi bazı çevresel faktörler, protein yapısındaki tersinir veya tersinmez değişiklikler yoluyla enzim katalizli reaksiyonların hızını etkileyebilir.

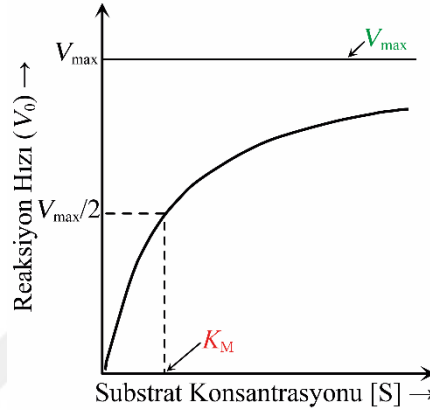
Çoğu enzim, reaksiyonun hızının maksimum olduğu ve bu değer üzerinde hızın düştüğü karakteristik bir pH'a sahiptir. pH profili bir dizi faktöre bağlıdır. pH değiştiğinde, hem enzimin aktif bölgesinde hem de substrat üzerindeki grupların iyonizasyonu değişebilir, bu da substratın aktif bölgeye bağlanma oranını etkileyebilmektedir. Bu etkiler genellikle geri dönüşümlüdür.

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkileri karmaşıktır. Aynı anda fakat zıt yönlere hareket eden iki etki mevcuttur. Sıcaklık yükseldikçe, moleküler hareket hızı ve dolayısıyla reaksiyon hızı artmakta, ancak aynı zamanda enzim proteininin denatürasyonundan kaynaklanan aşamalı bir inaktivasyon da gerçekleşmektedir. Termal denatürasyon zamana bağlıdır ve bir enzim için 'optimum sıcaklık' terimi, o sıcaklığa maruz kalma süresi kaydedilmediği sürece fazla anlam taşımamaktadır. Denatürasyonun önemli hale geldiği sıcaklık bir enzimden diğerine değişir. Normalde 30° C'nin altında ihmal edilebilirken 40 °C'nin üzerinde fark edilebilir olmaya başlamaktadır. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen

enzimler, memeli kaynaklarından elde edilenlerden çok daha yüksek termal stabiliteye sahiptirler (Robinson, 2015).

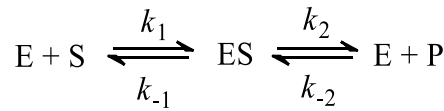
2.4.1.1. Michaelis-Menten Enzim Kinetiği

Enzimlerin birincil işlevi, reaksiyon hızını organizmanın ihtiyaçları ile uyumlu olacak şekilde arttırmaktır. Birçok enzim için, saniyede oluşan ürünün mol sayısı olarak tanımlanan kataliz hızı (V_0), Şekil 2.3’de gösterildiği gibi substrat konsantrasyonu $[S]$ ile değişir.

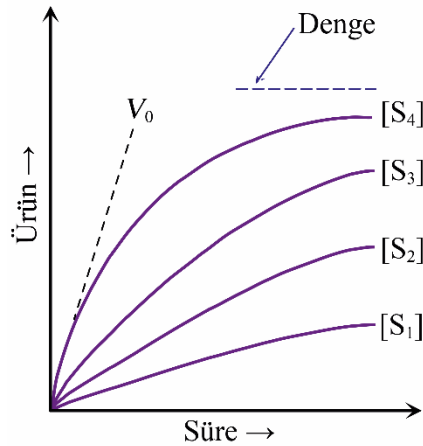


Şekil 2.3: Michaelis-Menten Kinetiği.

Kataliz hızı, substrat konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artar ve daha sonra, yüksek substrat konsantrasyonlarında düzleşmeye ve bir maksimuma yaklaşmaya başlar. Aşağıdaki yolla substratı (S) ürün (P)'e katalize eden bir enzim için:



(2.3)



Şekil 2.4: İlk hızın belirlenmesi.

Ürün oluşum miktarı, bir dizi substrat konsantrasyonu için zamana bağlı olarak belirlenir (Şekil 2.4). Beklendiği gibi, her durumda, oluşan ürün miktarı zamanla artar, ancak sonunda S veya P konsantrasyonunda net bir değişiklik olmadığı bir zamana ulaşılır. Enzim bu aşamada aktif olarak substratı hala ürüne dönüştürür ancak reaksiyon dengeye ulaşmıştır. Geri tepkime ihmal edilirse enzim kinetiğine daha kolay yaklaşılr. V_0 , [P] düşük olduğunda zamanla üründeki artış hızı olarak tanımlanır; yani sıfıra yakın zamanlarda. Dolayısıyla, V_0 , P birikmeden önceki erken zamanlarda ürün oluşum hızı ölçülerek her substrat konsantrasyonu için belirlenir.

Enzim aktivitesinin kinetik incelemesinde Şekil 2.4'de gösterilen grafik incelendiğinde, sabit bir enzim konsantrasyonunda, V_0 , [S] küçük olduğunda [S] ile neredeyse doğrusal olarak orantılıdır, ancak substrat konsantrasyonu büyük olduğunda substrat konsantrasyonundan ([S]) bağımsızdır. Leonor Michaelis ve Maud Menten, enzimlerin kinetik özelliklerini açıklamak için 1913'te bir model önermiştir. İşlemlerindeki kritik özellik, spesifik bir ES kompleksinin katalizde gerekli bir ara madde olmasıdır. Birçok enzimin kinetik özelliklerini açıklayan en basit model olan önerilen model reaksiyon (2.4) şeklindedir:



Bir enzim (E), hız sabiti k_1 olan bir ES kompleksi oluşturmak üzere substrat (S) ile birleşir. ES kompleksinin iki olası kaderi vardır. k_{-1} hız sabiti ile tekrar E ve S'ye dönüşebilir veya k_2 hız sabiti ile P ürününü oluşturmaya devam edebilir. Yine, hemen hemen hiçbir ürünün ilk substrata geri dönmediği varsayılır, bu durum ancak, ürün konsantrasyonu kayda değer hale gelmeden önce reaksiyonun ilk aşamasında gerçekleşen bir durumdur.

K_M , enzim ve substrat konsantrasyonlarından bağımsızdır ve Michaelis sabiti olarak adlandırılır.

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2.5)$$

Çok düşük substrat konsantrasyonunda, [S] K_M 'den çok daha az olduğunda, $V_0 = (V_{max} / K_M)$ [S]; yani hız, [S] ile doğru orantılıdır. Yüksek substrat konsantrasyonunda, [S] K_M 'den çok

daha büyük olduğunda, $V_0 = V_{max}$; yani hız, substrat konsantrasyonundan bağımsız olarak maksimumdur (2.5).

Michaelis sabiti (K_M) ve maksimum hız (V_{max}), çeşitli substrat konsantrasyonlarında ölçülen kataliz oranlarından kolayca bulunabilir. Enzimlerin K_M değerleri geniş bir aralıktadır. Çoğu enzim için K_M , 10^{-7} ila 10^{-1} M arasındadır. Bir enzimin K_M değeri, belirli substrata, sıcaklık, pH ve iyonik kuvvet gibi çevresel koşullara bağlıdır. Michaelis sabiti K_M , ES kompleksinin kararlılığının bir ölçüsüdür: yüksek K_M değeri zayıf bağlanmayı gösterir; düşük bir K_M , güçlü bağlanmayı gösterir.

K_M ve V_{max} değerlerini bulmak için Michaelis-Menten denkleminin lineerleştirilmiş halinden yararlanılır. En sık kullanılan lineerleştirme yöntemi Michaelis-Menten denkleminin tersine çevrilerek elde edilen eşitlik 2.6'da verilen Lineweaver–Burk eşitliğidir (Berg ve diğ., 2002).

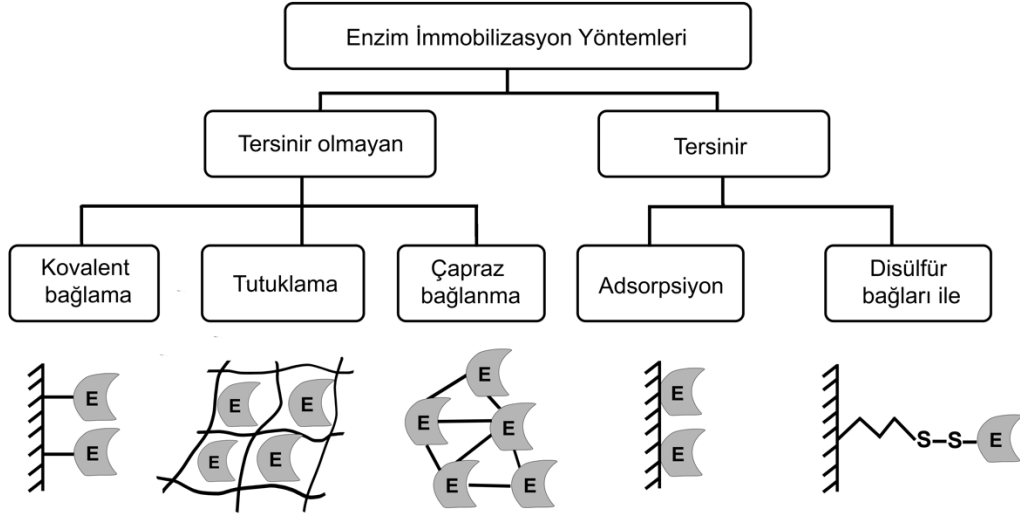
$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.6)$$

2.5. ENZİM İMMOBİLİZASYONU

Herhangi bir biyokimyasal reaksiyon sırasında enzimlerin yapısal stabilitelerinin korunması oldukça zordur. İşlevsel verimliliğe ve artırılmış tekrarlanabilirliğe sahip immobilize enzimler, pahalılıklarına rağmen kullanılmaktadır. Enzim immobilizasyonu; enzimin, substratlarından ve ürünlerden farklı bir faza (matris / destek) hapsedilmesidir. Destek materyali olarak genellikle inorganik malzemeler veya inert polimerler kullanılır. Uygun fiyatlı olmasının yanı sıra, ideal bir matris inertlik, fiziksel dayanıklılık, kararlılık, yenilenebilirlik, enzim özgünlüğünü / aktivitesini artırma ve ürün inhibisyonunu, adsorpsiyonu ve bakteriyel kontaminasyonu azaltma gibi özellikleri içermelidir. Enzim immobilizasyonu, otomasyon, yatırım / kapasite oranının yüksekliğini ve ürünün saf bir şekilde geri kazanımı sağlamaktadır. (Brena ve diğ., 2013)

Nanomalzemeler kısa yanıt süresi, yüksek hassasiyet ve kararlılık; küçük boyut, yüksek yüzey: hacim oranı, optik, elektriksel, kimyasal, mekanik, fiziksel çeşitli özellikleri nedeniyle enzim immobilizasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Fe_3O_4 nanopartiküller ve altın nanopartiküller enzimatik immobilizasyon için yaygın olarak kullanılan iki destek malzemesidir. Bunun dışında nanosilika, nano-ZnO, kobalt oksit nanoparçacıkları ve CdS nanoparçacıkları da enzimatik immobilizasyonda kullanılmaktadır (Chen ve diğ., 2017).

Enzimler destek materyallerine, geri dönüşümlü fiziksel adsorpsiyon, iyonik bağlar veya daha kararlı olan kovalent bağlar gibi farklı etkileşimlerle bağlanabilmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Enzim immobilizasyonunda farklı yöntemlerin şematik gösterimi (E: Enzim).

Enzimleri immobilize ederken kullanılan yöntemler tersinir olmayan ve tersinir yöntemler olarak sınıflandırılabilir. Tersinirlik bağ kuvveti ile ters orantılıdır. Bu iki çelişen amacı yani stabiliteyi ve tersinirliği aynı anda gerçekleştirmek zordur. Geleneksel yaklaşım, bağı mümkün olduğunca güçlü kılmak ve tersinirlikten fedakarlık etmektir. Ayrıca, immobilizasyon yöntemleri genellikle bağlanma için kullanılan kimyasal reaksiyon tipine göre sınıflandırılır. Enzim immobilizasyon yöntemleri bazen çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin karışımından da oluşabilmektedir. Her immobilizasyon yönteminin sahip olduğu avantaj ve dezavantajlar bulunmaktadır. En uygun yöntemin seçimi enzimin yapısına ve destek malzemeye (kimyasal özellikler, mekanik özellikler) bağlıdır. (Brena ve diğ., 2013)

2.5.1. Tersinir Olmayan İmmobilizasyon Yöntemleri

Tersinir olmayan (geri dönüşümsüz) immobilizasyon terimi, biyokatalizörün destek materyaline bağlandıktan sonra, enzimin aktivitesinin veya desteğin tahrip edilmeden enzimin ayrılacağı anlamı taşır. Tersinir olmayan enzim immobilizasyonunun en sık kullanılan uygulamaları, tutuklama, kovalent bağlanma ve çapraz bağlanmadır. (Brena ve diğ., 2013)

2.5.1.1. Kovalent Bağlanma

Kovalent bağ, enzim immobilizasyonunda en sık kullanılan tersinir olmayan yöntemlerdendir. Enzimin bağlanmasında genellikle lizin (amino grubu), sistein (tiyol grubu) aspartik asit ve

glutamik asitlerin yan zincirlerindeki fonksiyonel gruplar yoluyla gerçekleşir. Kovalent bağlı enzimin aktivitesi, destek malzemenin boyutuna ve şekline, bağlama yöntemine, destek malzemenin bileşimine bağlıdır. Enzimin destek materyaline kovalent olarak bağlanmasında, enzimin bağlanma yönü, kararlılığı belirleyen bir faktördür. Bununla beraber, yüksek düzeyde katalitik aktivite elde etmek için aktif bölgeye bağlanan amino asit kalıntılarının kovalent bağlanmada yer almaması gerekmektedir. Destekle bağlantı, hareketsiz hale getirilecek olan molekülde bulunan aktif gruplara göre iki farklı şekilde yapılabilir. Reaktif fonksiyonel gruplar, desteğe değişiklik yapılmadan eklenebilir veya destek materyali, fonksiyonel gruplar eklemek için modifiye edilebilir. Bu iki durumda da destek materyali üzerinde oluşturulan elektrofilik gruplar ile proteinlerin üzerindeki nükleofiller ile reaksiyona girmesi beklenmektedir. Bu yöntemlerin avantajı, enzim ve destek materyal arasında oluşan bağların kararlılığı nedeniyle, enzimin kullanımı sırasında çözeltiye salınmamasıdır (Brena ve diğ., 2013; Mohamad ve diğ., 2015).

2.5.1.2. Tutuklama Yöntemi

Tutuklama yönteminde, enzim polimerik bir ağ içinde tutulurken substrat ve ürünler bu ağdan geçebilmektedir. Bu yöntem, enzimin matrise veya membrana bağlı olmaması nedeniyle, diğer immobilizasyon yöntemlerinden farklıdır. Tutuklama, enzimlerin jeller veya lifler içindeki kovalent veya kovalent olmayan bağlarla hapsedilmesidir (Mohamad ve diğ., 2015). Tutuklama tekniklerinin önemli bir özelliği, enzimin aslında hiçbir şeye bağlı olmamasıdır. Yani, kovalent veya adsorpsiyon yöntemlerinde görülen sterik problemlerin hiçbiri yoktur (Robinson, 2015).

2.5.1.3. Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama da geri dönüşümsüz bir enzim immobilizasyon yöntemidir. Teknik olarak çapraz bağlanmada, iki veya daha fazla fonksiyonel gruba sahip reaktifler vasıtasıyla enzimler arasında çapraz bağların oluşturulmasıyla gerçekleştirilir. En sık kullanılan çapraz bağlama reaktifi, ekonomik olduğu ve fazla miktarlarda kolayca elde edilebildiği için glutaraldehidir (Mohamad ve diğ., 2015). Bu molekül (CH₂)₃ kısmının her iki ucunda iki aldehid grubu içermektedir ve nötr pH değerlerinde aldehid grupları, serbest amino gruplarıyla reaksiyona girmektedir. Dolayısıyla glutaraldehit molekülünün bir ucu desteğe, diğer ucu enzime eklenebilmektedir (Robinson, 2015).

2.5.2. Tersinir İmmobilizasyon Yöntemleri

Tersinir şekilde immobilize edilen enzimler ılımlı koşullar altında destek materyalden ayrılabilir. Enzim immobilizasyonu için geri dönüşümlü yöntemlerin kullanımı, çoğunlukla ekonomik nedenlerden ötürü oldukça caziptir ancak enzimatik aktivite bozulduğunda, destek materyalinin yenilenmesi ve taze enzim ile yeniden yüklenmesi gerekmektedir. Enzimlerin tersinir immobilizasyonu, kararsız olan enzimlerin immobilizasyonunda ve biyoanalitik sistemlerdeki uygulamalar için özellikle önemlidir. (Brena ve diğ., 2013)

2.5.2.1. Adsorpsiyon

İmmobilizasyon yöntemleri arasında en basiti olan adsorpsiyonda, destek üzerinde enzimi hareketsiz hale getiren bağlanma kuvvetleri H-bağları, van der Waals kuvvetleri, iyonik etkileşimler veya hidrofobik etkileşimlerdir. Bu tür kuvvetler, kovalent bağlarla karşılaştırıldığında genellikle zayıftır - örneğin, bir hidrojen bağı 20 kJ mol^{-1} iken bir kovalent bağ ise $200-500 \text{ kJ mol}^{-1}$ enerjiye sahiptir. Bu tür immobilizasyon prosedürlerinin gerçekleştirilmesi son derece kolaydır, adsorban ve enzimin bir süre karıştırılmasıyla hazırlanırlar. Bu yöntemlerde genellikle enzimin katalitik aktivitesi korunur, ekonomik açıdan caziptir. Adsorpsiyon yöntemleri kullanıldığında verimler (yani, adsorban birimi başına bağlı enzim miktarı) genellikle düşüktür. Kovalent olmayan immobilizasyonda bağlanmayı sağlayan kuvvetler, pH, sıcaklık gibi koşullar değiştirilerek kolaylıkla tersine çevrilebilmekte ve dolayısıyla destek materyalinden enzimin ayrılabilir. Selüloz, Sephadex, polistiren, kaolinit, kollajen, alümina, silika jel ve cam gibi çeşitli adsorbanlar kullanılmaktadır (Brena ve diğ., 2013) (Robinson, 2015).

2.5.2.2. Disülfür Bağlarının Oluşumu

Bu yöntemler destek materyali ve enzim arasında oluşan kararlı kovalent bağın ılımlı koşullarda ditiyotreitöl gibi uygun bir madde ile kırılabilmesi nedeniyle benzersizdir. Disülfür bağ oluşumu ile gerçekleşen yöntemlerin aktivite verimi genellikle yüksektir. (Brena ve diğ., 2013)

2.6. ÜRİK ASİT

Ürik asit (UA) (2,6,8-trihidroksipürin), insanlarda pürin metabolizmasının son ürünüdür (Şekil 2.6). UA, kan serumu, plazma, idrar ve tükürük gibi biyolojik sıvılarda bulunur. Biyokimyasal zincirde UA oluşumuna yol açan son iki reaksiyon, hipoksantin'den ksantin oluşumu ve ksantin oksidoredüktaz enzimi tarafından katalize edilen ksantin UA'ya

pürin miktarlarındaki değişikliklere bağlıdır. Ürat suda sınırlı çözüdüğünden, *in vivo* aşırı üretim, kristalleşerek birikmesine yol açabilmektedir.

Hiperürisemi ve hiperüremi çeşitli hastalıklarla ilişkili olabileceğinden, biyolojik numunelerde, özellikle serum ve idrarda UA'nın belirlenmesi klinik olarak önemlidir. Hiperürisemi, UA üretiminin artması veya UA'nın böbreklerden atılımının azalmasından kaynaklanır. Hiperürisemi; gut, Lesch-Nyhan sendromu ve glukoz-6-fosfat eksikliği ve dolayısıyla hiperürikozüri gibi hastalıklara yol açar. Hipöürisemi, protein sentezinin bozulmasından veya renal tübüler UA reabsorpsiyonundaki bir kusurdan kaynaklanabilmektedir. Anormal UA konsantrasyonları ayrıca hipertansiyon, pnömoni ve kardiyovasküler hastalıklarla da bağlantılıdır. Son zamanlarda, çalışmalar serum ve / veya beyin omurilik sıvısındaki düşük UA seviyesinin Parkinson hastalığının bir biyobelirteci olduğunu göstermiştir (Göçenoğlu Sarıkaya, 2017). Ayrıca, lösemi ve zatürre gibi birkaç hastalığın da UA ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Dolayısıyla, bu hastalıkların tanısı ve tedavisi için rutin olarak serum / idrar ürik asit ölçümü gereklidir (Chauhan ve diğ., 2014).

UA insan biyolojik sıvılarındaki en önemli düşük moleköl ağırlıklı antioksidanlarından biridir. Yapılan *in vitro* çalışmalar ile UA'in peroksil radikallerinin ($RO_2\bullet$), hidroksil radikallerinin ($\bullet OH$) ve singlet oksijenin güçlü bir süpürücüsü olduğu gösterilmiştir. UA, hem proteini / H_2O_2 sistemleri için yükseltgenebilir bir substrattır ve elektron vericisi olarak hareket ederek oksidatif hasara karşı koruma sağlayabilir. UA radikal süpürücü olmasının yanı sıra, Cu ve Fe gibi metal iyonlarını kelatlayarak serbest radikal reaksiyonlarını katalize edemeyen zayıf reaktif formlara dönüştürebilmektedir. Yapılan çalışmalar UA'nın, NO'nun süperoksit anyonu ile etkileşiminin ürünü olan peroksinitritin ($ONOO^-$) ayrışması sonucu oluşan radikallerin spesifik inhibitörü olduğunu göstermektedir. Peroksinitrit, hücre hasarına neden olan hemen hemen tüm önemli hücre bileşenleri ile etkileşime girebilen güçlü bir yükseltgeyici maddedir. ROS ve diğer yükseltgeyici maddelerle reaksiyonun ardından UA, allantoin ve diğer birkaç oksidasyon ürününe yükseltgenebilir. Bu nedenle, UA ve/veya allantoinin belirlenmesi, insanlarda oksidatif stres seviyesinin değerlendirilmesinde de yararlı bir araçtır. (Glantzounis ve diğ., 2005).

2.7. GLUKOZ

Glukoz, altı tane karbon atomu ve bir aldehid grubu içeren monosakkarittir. Aldoheksoz olarak da adlandırılır. Glukoz molekülü, açık zincirli veya halkalı formda bulunabilir. Halkalı

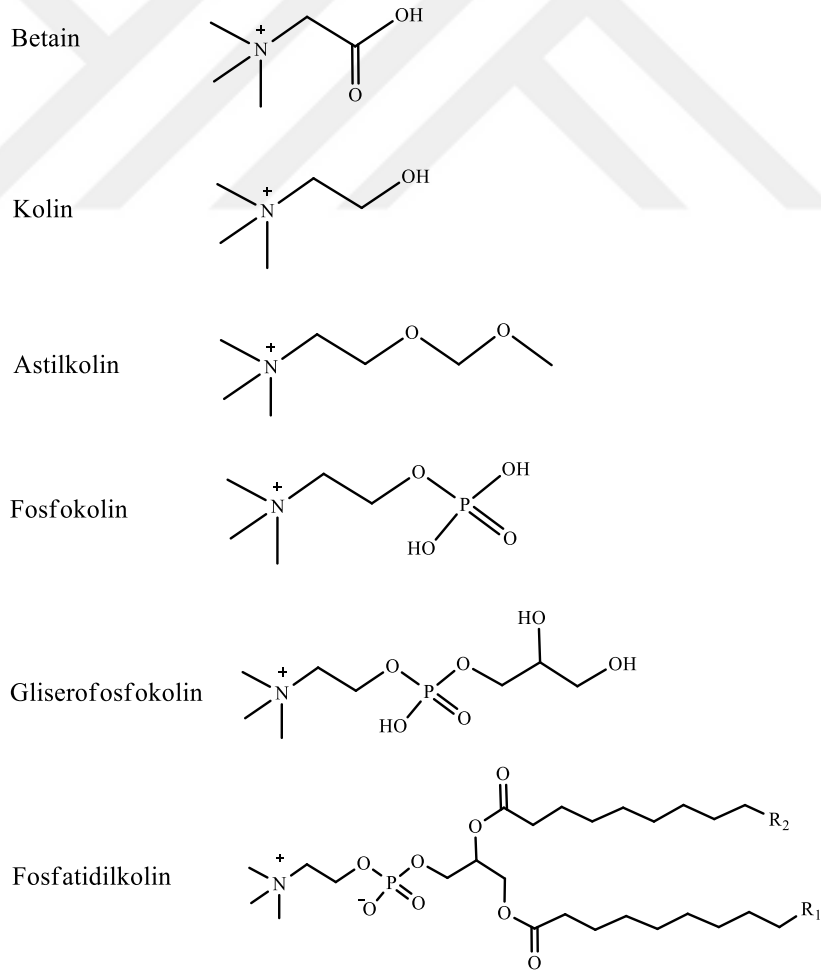
yapı, aldehitin C atomu ve C-5 hidroksil grubunun arasında molekül içi bir hemiasetal oluşumuyla gerçekleşir. Suda her iki form dengededir ve pH 7'de siklik olan formu baskındır. Glukoz, canlı organizmalar için birincil enerji kaynağıdır. Fotosentezin ana ürünü olarak meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunur. Karbonhidratların (sakkaroz, laktoz, nişasta) çoğu sindirim sırasında glukozla dönüştürülür ve kan dolaşımında bu şekilde taşınır. Hayvanlarda glukoz, glikojenoliz olarak bilinen bir işlemle glikojenin parçalanmasıyla meydana gelir. Glukoz, karaciğer ve böbreklerde, pirüvat ve gliserol gibi karbonhidrat olmayan ara maddelerden glukoneogenez olarak bilinen bir işlemle sentezlenir (Pisoschi, 2012). Glukoz, canlı organizmaların metabolizmasında besin sağlar ve oksidasyon reaksiyonu ile açığa çıkan ısı, insan yaşamı faaliyetleri için önemli bir enerji kaynağıdır.

Klinik ve mikrobiyoloji laboratuvarları, gıda endüstrisi, ekolojik yaklaşımlar gibi çeşitli alanlarda glukoz tespiti büyük önem taşımaktadır. Diyabet dünyadaki ölüm ve sakatlığa neden olan önemli hastalıklardan biridir. Bu metabolik bozukluk, insülin eksikliğinden ve hiperglisemiden kaynaklanmaktadır. Hiperglisemi, normalde yaklaşık 3.9-6.2 (aç) veya 3.9-7.8 (yemekten 2 saat sonra) mM olan kan şekeri konsantrasyonunun daha yüksek olmasıdır. Diyabetin neden olduğu kalp hastalığı, böbrek yetmezliği veya körlük risklerini büyük ölçüde azaltabilmek için kan şekerinin kantitatif izlenmesi büyük klinik öneme sahiptir (Chen ve diğ., 2013).

2.8. KOLİN

Kolin, insan organizmasında çok önemli işlevi olan bir amino alkoldür (Langer ve diğ. 2004). Genellikle "vitamin benzeri" olarak sınıflandırılan, suda çözünen önemli bir mikro besindir. İnsan vücudunda kolin, asetilkolin nörotransmitterinin (AcCho) öncüsüdür ve diyetteki metil gruplarının ana kaynağıdır; bunlar çeşitli hücrel metilasyon reaksiyonları için önemlidir. Kolin, hücre zarları içinde fosfatidilkolin (PtdCho) gibi fosfolipidlerin sentezi için de önemlidir. Folatta olduğu gibi, kolin de fetal gelişim sırasında nöral tüp gelişimini etkilemede kritik bir rol oynar ve ayrıca beyin yapısını ve yaşam boyu işlevi etkileyen kök hücre proliferasyonu ve apoptozunu etkiler. Kolin eksikliği karaciğer yağlanması ve hemorajik böbrek nekrozuna neden olabilir ve karaciğerde artan serbest radikal aktivitesine yol açarak karsinogeneze yol açabilir. Ek olarak, çalışmalar uzun süreli kolin eksikliğinin karaciğer, böbrek, pankreas, hafıza ve büyüme bozukluklarına neden olduğunu göstermiştir. Kolin insan vücudunda sentezlenir, ancak doğru işlevi sürdürmek için diyet takviyesi gereklidir. Yeterli

kolin alımı bebeklerde 125 mg / gün ile 14 yaş üstü erkeklerde ve emziren kadınlarda 550 mg / gün arasında değişmektedir. Besin alımının tek bir kaynakla sınırlı olduğu bebekler için, kolin takviyesi kritik öneme sahip olabilir. Anne sütüyle beslenen çocuklar için kolin, büyümeye ve beyin gelişimine destek olmak için anne kanından süte taşınır. Mama ile beslenen çocuklarda bu alımı eşleştirmek için kolin, birçok bebek mamasında gerekli bir katkı maddesidir. Yenidoğanların gelişimi ve genel sağlığı oldukça önemli olduğundan, gıdalarda ve gıda ürünlerinde kolin tayini için doğru analitik yöntemler gereklidir. Yetişkinler için bile kolin alımı kişiden kişiye iki kat farklılık gösterebilir. Kolin, serbest kolin olarak çeşitli gıdalarda bulunur, ancak aynı zamanda fosfokolin (PCho), PtdCho, gliserofosfokolin (GPCho) ve sfingomiyelin (SM) gibi esterleştirilmiş formlarda da bulunur. Çeşitli kolin formları Şekil 2.7'de verilmiştir. Yüksek düzeyde kolin içeren yiyecekler arasında et (karaciğer), süt ürünleri, balık, yumurta, tam tahıllar, buğday tohumu, yer fıstığı, soya fasulyesi ve Brüksel lahanası gibi sebzeler bulunmaktadır (Phillips, 2012).

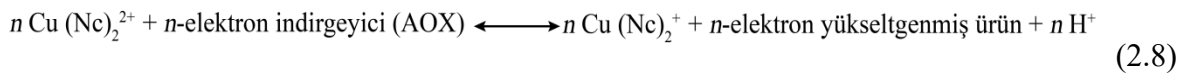


Şekil 2.7: Kolin ve kolinle ilgili bileşiklerin kimyasal yapıları.

2.9. CUPRAC (BAKIR(II) İYONU İNDİRGEYİCİ ANTİOKSİDAN KAPASİTE) YÖNTEMİ

CUPRAC yönteminde, kromojenik yükseltgeyici reaktif olarak bis(neocuproin) bakır(II)klorür [Cu (II) -Nc] kullanılmaktadır. Reaksiyonda, polifenollerin reaktif Ar-OH grupları karşılık gelen kinonlarına yükseltgenir ve Cu (II) -Nc kelatı, 450 nm'de maksimum absorpsiyona sahip Cu (I) -Nc kelatına indirgenir.

CUPRAC ilk olarak 2004 yılında Apak ve diğ. tarafından gıdalarda bulunan polifenoller, C ve E vitamininin toplam antioksidan kapasitesinin (TAC) belirlenmesinde kullanılmıştır (Apak ve diğ., 2004). Daha sonra insan serumunda TAC belirlenmesi (Apak ve diğ., 2005), hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidanların aynı anda tayin edilmesi (Özyürek ve diğ., 2008), H₂O₂ radikal süpürücü maddelerin tayinini gerçekleştirmek (Bektaşoğlu, 2006) gibi çeşitli amaçlarla modifiye edilmiştir. Ana yöntem, antioksidanların CUPRAC reaktifi, bis (neocuproine) bakır (II) katyonu ile redoks reaksiyonu sonucunda oluşan CUPRAC kromoforu, Cu (I) neocuproin (Nc) kelatının 450 nm'de maksimum absorpsiyon yaptığı dalgaboyundaki absorbansının ölçümüne dayanır. CUPRAC yönteminin kromojenik yükseltgeyici reaktifi, Cu (II)-Nc, aşağıdaki denkleme göre antioksidanlar (AOX) ile reaksiyona girer.



CUPRAC oksidasyonu sonucunda, reaktif fenolik Ar-OH grupları karşılık gelen kinonlarına (Ar = O), askorbik asit dehidroaskorbik aside ve tiyoller (RSH) karşılık gelen disülfürlerine (RSSR) yükseltgenir, Cu (II) -Nc ise yoğun renkli sarı turuncu Cu (Nc)₂²⁺ kelatına indirgenir. Gerçek oksidanın Cu²⁺ değil Cu (Nc)₂²⁺ türü olduğu unutulmamalıdır, çünkü Cu (II/I) -Nc'nin standart redüksiyon potansiyeli (0,6 V), kompleksiz halinden çok daha yüksektir (Cu²⁺ / Cu⁺ çifti (0,17 V)). Gıda ve biyolojik örneklerdeki antioksidanlar, Cu (II / I)-Nc redoks çiftininkine çok yakın olan 0,2-0,6V aralığında redoks potansiyeline sahiptir (Apak, 2017).

2.10. LİTERATÜRDE YER ALAN ÇALIŞMALAR

Chauhan ve diğ. (2014)'nin gerçekleştirdiği çalışmada ürikaz nanopartiküller hazırlanarak bunlar Au elektroda immobilize edilmiştir. Bunun için hazırlanan UOx nanopartiküller

içerisine önce çapraz bağlayıcı olarak GLA ilave edilmiş ardında sisteamin ilavesiyle –SH fonksiyonalize enzim nanopartiküller elde edilerek Au elektrot yüzeyine modifiye edilmiştir. Enzim elektrodu ile birlikte referans elektrot olarak Ag/AgCl'ün ve yardımcı elektrot olarak Pilatin elektrodun kullanıldığı amperometrik bir ürik asit biyosensörü geliştirilmiştir. Enzim elektrodunun karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskopisi, FTIR ve EIS ile yapılmıştır. Ürik asit için 0,005 ila 0,8 mM arasında doğrusal çalışma aralığı belirlenmiştir. Geliştirilen biyosensörle serum ve idrar örneğinde UA tayini yapılmıştır.

Wang ve diğ. (2018) tarafından ultra küçük CuS nanopartiküllerinin (NP'lerin) H₂O₂ varlığında 653 nm'de güçlü absorpsiyona sahip mavi yükseltgenmiş TMB (oxTMB) veren 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) substratına karşı peroksidaz benzeri aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir. H₂O₂, UA ve UOx arasındaki enzimatik reaksiyonla üretilerek CuS NP'lerin peroksidaz benzeri aktivitesiyle mavi oxTMB vermesinden yararlanılmıştır. Geliştirilen yöntemde $1,0 \times 10^{-6}$ M ila $1,0 \times 10^{-4}$ M lineer aralık ve $1,0 \times 10^{-7}$ M dedeksiyon limiti ile UA tayini için duyarlı kolorimetrik bir yöntem sağlanmıştır. Ayrıca, önerilen yöntem insan serum örneklerinde UA'nın belirlenmesine başarıyla uygulanmıştır ve klinik yöntemle benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Peroksidaz taklitleri olarak BSA stabilize Au nanokümelere (Au NC'ler) kullanılarak ürik asidin enzimatik spektrofotometrik analizi gerçekleştirilmiştir. Ürik asit tarafından üretilen H₂O₂'yi saptamak için yaygın olarak kullanılan doğal enzim HRP ile karşılaştırıldığında, peroksidaz mimetikleri olarak BSA stabilize Au NC'lerin hazırlanması kolay, düşük maliyetli ve stabil olduğu belirtilmiştir. Kinetik analizle, BSA-stabilize Au NC'lerin HRP'den daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Optimum koşullar altında ürik asit için tayin sınırı $3,6 \times 10^{-7}$ M olarak bulunmuştur. İnsan serumunda ürik asit analizi için geliştirilen yöntemin uygulanabilir olduğu görülmüştür (Zhao ve diğ, 2012).

UA tayini için, ürik asidin enzimatik reaksiyonundan üretilen H₂O₂ ile ligand kaplı CdTe nanopartiküllerinin floresans sönümüne dayanan enzimatik optik bir yöntem geliştirilmiştir. Farklı ligandlarla (glutasyon, 3-merkaptopropiyonik asit ve tiyogliserol) kaplanan CdTe nanopartikülleri ve H₂O₂ arasındaki etkileşimler araştırılmıştır. GSH kaplı CdTe nanopartiküllerinin H₂O₂ varlığında floresans sönümü göstermiştir. UA, UOx ve H₂O₂'nin CdTe nanoparçacıklarının floresans yoğunluğu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Optimize edilmiş deney koşulları altında ürik asidin tayin sınırının $0,10 \mu\text{M}$ ve doğrusal aralığın $0,22-6$

μM olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, CdTe nanoparçacıklarının ürik asit tayini için floresan prob olarak kullanılabilceğini göstermiştir. Geliştirilen prob ile idrar örneklerinde UA %86 ila %93 geri kazanım ile tayin edilmiştir (Jin ve diğ., 2016).

Amperometrik bir UA biyosensörü, ürikazın karbodiimid bağıyla Au elektrodu üzerinde biriktirilen altın nanopartiküller (AuNP) /çok duvarlı karbon nanotüp üzerine immobilize edilmesiyle üretilmiştir. UA tayini, enzimatik olarak üretilen H_2O_2 'nin 0,4 V'de oksidasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Sensör, pH 7,5 (50 mM) Tris-HCl tamponunda 40°C 'de 7 saniye içinde optimal tepki göstermiştir. Biyosensörün lineer çalışma aralığı 0,01-0,8 mM, LOD değeri 0,01 mM olarak bulunmuştur. Sensör, sağlıklı ve gut hastalığı olan kişilerin serumundaki UA düzeylerini ölçmek için kullanılmıştır. 10 ve 20 mgL^{-1} standart katkı yapıldığında UA'in analitik geri kazanımları sırasıyla %98,0 ve %96,5 olarak bulunmuştur. Serum ürik asit değerlerinde standart enzimatik kolorimetrik yöntem ile mevcut yöntem arasında $r = 0,998$ ile iyi bir korelasyon elde edilmiştir. Sensör, 200'den fazla deneyde kullanılmış ve 4°C 'de 120 gün saklanabilmiştir (Chauhan ve Pundir, 2011).

Wei ve Wang (2008) Fe_3O_4 MNP'lerin peroksidaz benzeri aktivitesinden yararlanarak glukoz tayini için bir yöntem geliştirmişlerdir. Bunun için Fe_3O_4 MNP'ler birlikte çöktürme yöntemi ile hazırlanarak H_2O_2 'nin kolorimetrik tayini için, peroksidaz substratı olan ABTS'nin, H_2O_2 ile renkli ürüne oksidasyonunu katalizlemek için kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemle 3×10^{-6} mol / L dedeksiyon limiti ve 5×10^{-6} ila 1×10^{-4} mol / L arasında doğrusal aralık ile H_2O_2 tayin edilebilmiştir. Aynı şekilde GOx ve hazırlanan Fe_3O_4 MNP'ler kullanılarak glukoz tayini için bir yöntem geliştirildiği bildirilmiştir (Wei ve Wang, 2008).

Su ve diğ. (2012) tarafından geliştirilen yöntemde, ZnFe_2O_4 MNP'lerinin peroksidaz benzeri aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. ZnFe_2O_4 MNP'leri, peroksidaz nanomimetikleri ve HRP'ye göre yüksek katalitik verimlilik, iyi stabilite ve hızlı ayırma gibi çeşitli avantajlar sergilemektedir. ZnFe_2O_4 MNP'leri idrar glukozunun saptanması için kolorimetrik bir biyosensör olarak kullanılmıştır. GOx ve ZnFe_2O_4 MNP'leri kullanarak glukoz tayini için basit, ucuz, hassas ve seçici bir yöntem geliştirilmiştir. $1,25 \times 10^{-6}$ ila $1,875 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} lineer aralık ve $3,0 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} dedeksiyon limiti ile glukoz tayini gerçekleştirilmiştir. TMB'in oksidasyonuna bağlı olarak çıplak gözle gözlemlenebilen renk değişimi, idrar glukoz seviyesinin algılanması için kullanılmıştır (Su ve diğ., 2012).

Rossi ve diğ. (2004) tarafından yapılan çalışmada 20 nm çapında manyetit (Fe_3O_4) nanoparçacıklar hazırlanarak amino gruplarıyla fonksiyonelleştirildikten sonra glukoz oksidaz enziminin yüzeye kovalent konjügasyonu sağlanmıştır. Manyetik nanoparçacık yüzeyinin amino gruplarla işlevselleştirilmesi, fiziksel adsorpsiyonla gerçekleştirilen immobilizasyon prosedürlerine kıyasla immobilize enzimin miktarını ve aktivitesini büyük ölçüde arttırmıştır. GOx kaplı manyetik nanoparçacıkların enzimatik aktivitesi, rutenyum fenantrolin floresan kompleksi kullanılarak glukozun enzimatik oksidasyonu sırasında oksijen tüketiminin izlenmesiyle incelenmiştir. Glukoz oksidaz kaplı manyetit nanopartiküller ile, 1 ila 20 mmol L^{-1} glukoz içeren çözeltilerde glikoz sensörleri olarak işlev görebileceği belirtilmiştir. Glukoz oksidazın nanopartiküller üzerinde immobilizasyonunun enzim stabilitesini arttırdığı, 4 °C'de saklandığında nanopartikül süspansiyonlarının biyoaktivitelerini 3 aya kadar koruduğu görülmüştür.

Langer ve diğ. (2004) tarafından bir kolin sensörü oluşturmak için ChOx, kontrollü bir gözenekliliğe ve mikrometre veya nanometre kalınlığına sahip nanoyapılı polianilin katmanları içerisine immobilize edilmiştir (polianilin-kolin oksidaz(PChO) biyosensörü). Belirli kalınlıkta polianilin filmleri hazırlamak ve enzim moleküllerini immobilize etmek için elektrokimyasal yöntemlerden yararlanılmıştır. PChO sensörünün elektriksel tepkisi kolin konsantrasyonuna bağlıdır ve hassasiyeti amperometrik modda 5 $\mu A / mM$ ve potansiyometrik ölçüm modunda 10 mV / mM değerine ulaşmıştır. Sabit +0,4 V potansiyelde ölçülen akım, kolin konsantrasyonuna karşı doğrusaldır. Geliştirilen sensörde askorbik asit ile hiçbir etkileşim bulunmamıştır. İncelenen sensörlerin, bir aylık saklamadan sonra da elektriksel tepkilerini değiştirmedeği bildirilmiştir.

Panfili ve diğ. (2000) tarafından mikrodalga hidroliz prosedürü bir $O_2 /$ kolin oksidaz esaslı elektrokimyasal biyosensör ile birleştirilerek, gıdalardaki kolinin tayini için hızlı bir prosedür geliştirilmiştir. Mikrodalga hidrolizi için zaman ve sıcaklık değiştirilerek en iyi koşullar belirlenmiştir. Sonuçlar, 70°C'de hidroliz ve ardından enzimatik kolorimetrik test ile oluşturulan geleneksel yöntemle bulunanlarla karşılaştırılmıştır. Biyosensör yöntemiyle elde edilen veriler, enzimatik kolorimetrik test ($R^2 = 0,998$) ile iyi bir korelasyon göstermiştir. Mikrodalga ve geleneksel hidroliz hem kolorimetrik hem de biyosensör prosedürleri ile %6'nın altında göreceli bir hata ile iyi bir korelasyon sağlamıştır. Yöntemin analiz süresini önemli ölçüde azaltarak çeşitli gıda maddeleri için kullanılacak kadar hassas ve seçici olduğu bildirilmiştir.

Nikzad ve Karami (2018) tarafından kolin tayini için DNAzim-kolin oksidaz bağlanmasına dayalı, basit ve hassas bir kolorimetrik biyosensör geliştirilmiştir. Bu yöntemde, ilk olarak kolin oksidaz ile, kolinden oksijen varlığında H_2O_2 ve betain oluşturularak, ardından DNAzim renksiz ABTS'yi yeşil $ABTS^+$ radikallerine dönüştürmektedir. Bu biyosensörün doğrusal aralığı ve tespit sınırı $0,1 - 25 \mu M$ ve 22 nM olarak bulunmuştur. Geliştirilen biyosensör ile tatmin edici seçicilik ve tekrarlanabilirlik elde edilmiştir. %96,9 – 103,7'lik geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Basitlik, düşük maliyet, çıplak göz, yüksek hassasiyet ve kesinlik, bu biyosensörün faydaları olarak belirtilmiştir.

Zhang ve diğ. (2011) Fe_3O_4 manyetik nanopartikülleri ve kolin oksidazla modifiye edilmiş altın elektrot kullanarak hassas bir kolin biyosensörü geliştirmiştir. Kolin biyosensöründe peroksidaz benzeri olarak kullanılan Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller, yalnızca yanıt sinyalinin hassasiyetini iyileştirmekle kalmayıp, aynı zamanda kararlılık, manyetik ayırma ve kolay hazırlama gibi olumlu özellikler de sağlamıştır. Tespit sinyalleri olarak kare dalga voltametrisinin indirgenme akımları kullanıldığında, AA ve UA'in girişimi etkili bir şekilde azaltılabilmektedir. Kare dalga voltametrisinin indirgenme akımları, kolin klorür konsantrasyonunun logaritma değerleri ile artmıştır (10^{-9} 'dan 10^{-2} M 'a), dedeksiyon limiti $0,1 \text{ nM}$ ($S/N = 3$) bulunmuştur. Kolin biyosensörünün kolin klorürün belirlenmesinde uygun seçicilik ve stabilite sergilediği belirtilmiştir.

3. YÖNTEM

3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR VE CİHAZLAR

Ürik asit, bakır (II) klorür dihidrat, glutardialdehit (% 25), tri-sodyum sitrat 5,5-hidrat, demir(III) klorür heksahidrat, demir(II) sülfat heptahidrat, etanol, disodyum hidrojen fosfat dihidrat, sodyum fosfat monobazik dihidrat, (+)-kateşin hidrat, bilirubin, kafeik asit, fetal bovine serum, kuersetin, katalaz (2000-5000 unite/mg), ürikaz (250UN), glisin, neokuproin hidroklorür hidrat, trizma®baz, (3-aminopropil)trietoksisilan (APTS), sulu amonyak, N-asetil-L-sistein, tetraetil ortosilikat (TEOS), üre, gallik asit monohidrat, indirgenmiş glutatyon (L-glutatyon), trans-ferulik asit, (R)-(+)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit, L-sistein, glukoz, glukoz oksidaz, kolin klorür, kolin oksidaz, 4-aminoantipirin, fenol, horse radish peroxidase (HRP)

Spektrofotometrik ölçümler için Varian Carry 100 UV-visible spektrofotometresi, HPLC tayinleri için ZORBAX eclipse C-18(250 x 4,6 mm, 5 µm) ters faz kolon, Waters 1525 binary HPLC pompa, In-Line degazer ve Waters 2998 PDA dedektöründen oluşan HPLC cihazı kullanıldı.

Sentezlenen nanoparçacıkların karakterizasyonu, Taramalı transmisyon elektron mikroskobu (STEM)-enerji dağılımlı X-ışını spektrometrisi (EDS) analizi (Thermo Scientific Quattro FEG SEM, ABD), Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) (Agilent Carry 630 FTIR-ATR, ABD) ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), tek renkli bir Al K α X-ışını kaynağı ($h\nu = 14,686.6$ eV) kullanan bir K-Alfa spektrometresi (Thermo Fisher, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. ÇÖZELTİLERİNİN HAZIRLANMASI

CuCl₂.2H₂O çözeltisi, $1,0 \times 10^{-2}$ M olacak şekilde uygun miktarda tartılarak destile su ile hazırlandı.

Neokuproin'in $7,5 \times 10^{-3}$ M'lık çözeltisi etanolla hazırlandı.

pH 7,0 üre tamponu: 0,086M Tris (hidroksimetil)aminometan, 4 mM trisodyum sitrat ve 0,09 M Glisinden oluşan karışım 8,0 M üre içerisinde çözüldü ve HCl ile pH'ı 7,0'a ayarlandı.

1,0 M pH 7,0 NH_4Ac tamponu: 19,27 g tartılarak destile suda çözüldü ve hacmi 250 mL'ye tamamlandı.

Ürik Asit: Stok çözeltisi $5,0 \times 10^{-3}$ M olacak şekilde 0,0210 g tartılıp 0,2 mL 1,0 M NaOH ve destile su ile çözüldükten sonra 25 mL'ye destile su ile tamamlandı. Denemelerde $5,0 \times 10^{-4}$ M'a seyreltilerek kullanıldı.

Katalaz: 2000-5000 U/mg katalazdan 1mg/mL olacak şekilde tartılıp 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu (PBS) ile çözüldükten sonra pH 7,0 fosfat tamponuyla 1:10 seyreltildi.

CAT, QR, TR, FA, CFA, GA'in $1,0 \times 10^{-2}$ M'lık stok çözeltileri etanol ile hazırlandı ve çalışılan konsantrasyonlara etanol ile seyreltilerek kullanıldı.

$1,0 \times 10^{-2}$ M 25 mL CYS çözeltisi hazırlamak için uygun miktarda tartılarak 0,5 mL 1M HCl ile çözüldü ve destile suyla hacmi 25 mL'ye tamamlandı. $1,0 \times 10^{-2}$ M'lık AA, GSH, NAC çözeltileri destile su ile hazırlandı. $1,0 \times 10^{-3}$ M Bilirubin çözeltisi 0,5 mL 1M NaOH içerisinde çözüldü ve 25 mL'ye destile su ile tamamlanarak hazırlandı. CYS, GSH, NAC, AA, Bilirubin çözeltileri uygun konsantrasyonlara su ile seyreltilerek kullanıldı.

Kolin klorür: $1,0 \times 10^{-2}$ M'lık stok çözeltisi için 0,0140 g tartılıp destile su ile çözüldü ve 10 mL'ye tamamlandı. Buradan destile suyla seyreltilerek kullanıldı.

0,1 M pH 8,5 ve pH 7,0 PBS hazırlamak için 0,1 M NaH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 çözeltilerinden uygun miktarlar karıştırıldı.

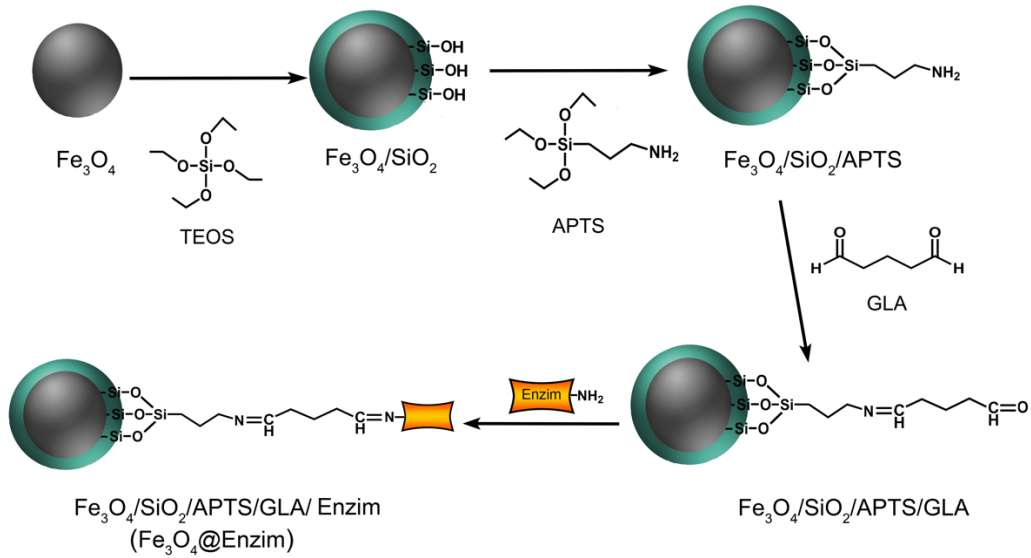
3.3. Fe_3O_4 MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI

Fe_3O_4 manyetik MNP'ler $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tuzları kullanılarak birlikte çöktürme yöntemiyle sentezlenmiştir. Bunun için 3,34 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 4,86 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 40 mL su içerisinde karıştırıldı ve 80°C 'ye ısıtıldı. Ardından azot akımı altında, karıştırarak 12 mL derişik amonyak çözeltisi hızla ilave edildi. Karıştırma işlemine 2 saat bu şekilde devam edildi. Miknatis yardımıyla Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller (MNP) toplanarak sulu kısım dekante edildi. Ardından destile su ile nötralleşinceye kadar yıkandı. Son olarak etanol ile de yıkandıktan sonra 60°C 'de kurutuldu (Chang vd., 2009)

3.4. Fe₃O₄/SiO₂/ APTS/ GLA HAZIRLANMASI

Elde edilen Fe₃O₄ MNP'lerin yüzeyi Stöber metodu kullanılarak silanol gruplarıyla kaplandı (Stöber vd, 1968). Bunun için 0,2 g Fe₃O₄, 20 mL su, 100 mL etanol, 1 mL derişik sulu NH₃ çözeltisi ve 0,2 mL tetraetil ortosilikat (TEOS) ile 6 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Birkaç kez suyla ve etanol ile yıkanıp 70°C'de kurutuldu. Bu aşamada Fe₃O₄ NP'lerin yüzeyindeki ferrik hidroksitler, hidrolize TEOS'un OH gruplarıyla eter bağları yapmaktadır. Hazırlanan Fe₃O₄/SiO₂'nin 0,5 g'ı üzerine 50 mL etanol ilave edildi. 1 saat ultrasonik banyoda disperse edildikten sonra üzerine 4,2 g 3-(aminopropil)trietoksisilan (APTS) ilave edilip oda sıcaklığında 20 saat karıştırıldı. Suyla birkaç kez yıkandıktan sonra 70°C'de kurutuldu (Mirzabe ve Keshtkar, 2015).

Hazırlanan Fe₃O₄/SiO₂/APTS'yi aktive etmek için 0,1 g Fe₃O₄/SiO₂/APTS üzerine 200 µL glutaraldehit (GLA) ve 4,8 mL pH 7,0 PBS ilave edilip 1,5 saat karıştırıldı. Nanopartiküller mıknatısla toplanıp birkaç kez suyla yıkandı.



Şekil 3.1: Enzim immobilizasyon aşamalarının şematik gösterimi.

Üç farklı oksidaz enzimi, yani glukoz oksidaz (GOx), kolin oksidaz (ChOx) ve ürikaz (UOx), modifiye edilmiş MNP'ler üzerine ayrı ayrı immobilize edildi. Bu amaçla, 0,1 M pH 8,5 fosfat tampon çözeltisinde hazırlanmış 0,4 mg mL⁻¹ UOx, 0,1 M pH 7,0 PBS'de hazırlanmış 2,0 mg mL⁻¹ GOx, 0,2 M pH 6,0 asetik asit/sodyum asetat tampon çözeltisinde (ABS) hazırlanmış 0,4

mg mL⁻¹ ChOx enzim çözeltilerinden 5,0'ar mL alınarak 0,1 g Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA üzerine ayrı ayrı ilave edildi. Enzimlerin immobilizasyonunu sağlamak için GOx+MNP'ler ve ChOx+MNP'ler oda sıcaklığında 30 dakika rotator yardımıyla karıştırıldı. UOx için MNP'ler ve enzim çözeltisi 4 °C'de 5 saat tutuldu. Enzim tutturulmuş MNP'ler (Fe₃O₄@UOx, Fe₃O₄@GOx ve Fe₃O₄@ChOx'lar) belirtilen tampon çözeltisi ve distile suyla birkaç kez yıkandı ve son olarak ilgili substratın (UA, Glukoz ve Ch) belirlenmesinde kullanılmak üzere 5,0 mL destile suda disperse edildi.

3.5. SENTEZLENEN MNPLERİN KARAKTERİZASYONU

Sentezlenen Fe₃O₄, Fe₃O₄/SiO₂ ve Fe₃O₄/SiO₂/APTS'nin karakterizasyonu için ATR-FTIR, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve XPS kullanıldı.

3.6. UOx'IN İMMOBİLİZASYONU VE UA TAYİNİ

3.6.1. CUPRAC Yönteminin Uygulanışı

0,5 mL pH 8,5 fosfat tamponu, 100 µL EtOH, x mL UA, (0,9-x) mL su, 50 µL (0,1mg/mL) katalaz ve 50 µL Fe₃O₄@UOx ilave edilip 37°C'de 15 dk inkübe edildi. Daha sonra UOx immobilize MNP'ler miknatis yardımıyla uzaklaştırıldı. İnkübasyon çözeltisi 1,0 mL CuCl₂, 1,0 mL Nc, 1,0 mL pH 7 üre tamponu içerisine koyuldu. 30 dk sonra 450 nm'de absorpsanları okundu.

3.6.2. UOx İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi

3.6.2.1. UOx'ın Optimum immobilizasyon pH'ının Belirlenmesi

UOx enziminin manyetik nanopartikül üzerine immobilizasyonunda pH'ın etkisini incelemek için 0,2 M pH 4,0 – 5,0 ABS, pH 6,0 – 7,0 – 8,5 PBS ve pH 10,0 NH₃ /NH₄Cl tamponu kullanıldı.

Hazırlanan 0,025 g Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA üzerine farklı tampon çözeltilerden 1,25'er mL koyulup 0,5 mg ürikaz ilave edilerek gece boyunca 4°C'de bekletildi. Birkaç kez su ve pH 8,5 fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra 1,25 mL su ile disperse edildi. 0,6 mL 5,0×10⁻⁴ M UA kullanılarak CUPRAC yöntemi bölüm 3.6.1'de anlatıldığı şekilde uygulandı.

3.6.2.2. *İmmobilize Edilen UOx Miktarının Optimizasyonu*

0,025 g Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA üzerine 1mg/mL'lik UOx'dan 0,05- 0,1- 0,3- 0,5 ve 0,8 mL koyulup pH 8,5 fosfat tamponu ile hacmi 1,25 mL'ye tamamlandı. Gece boyu 4°C'de bekletildikten sonra UOx immobilize MNP'ler mıknatıs yardımıyla toplanıp üst kısım ayrı bir yere alındı. Fe₃O₄@UOx birkaç kez suyla ve pH 8,5 fosfat tamponu ile yıkandı. 1,25 mL su ile disperse edilip 0,6 mL 5,0×10⁻⁴ M UA kullanılarak CUPRAC yöntemiyle optimum UOx miktarı belirlendi.

3.6.2.3. *UOx İmmobilizasyon Süresinin Optimizasyonu*

0,025 g Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA üzerine 0,5 mg UOx ve 1,25 mL pH 8,5 fosfat tamponu ilave edilip 0 ila 16 saat arası farklı sürelerde 4°C'de inkübe edildi. Daha sonra pH 8,5 fosfat tamponu ile yıkanıp 1,25 mL destile su ile disperse edildi. 0,6 mL 5,0×10⁻⁴ M UA ilavesiyle bölüm 3.6.1'de anlatılan şekliyle CUPRAC yöntemi uygulandı ve optimum immobilizasyon süresi belirlendi.

3.6.3. *UA'in Fe₃O₄@UOx ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu*

3.6.3.1. *Optimum pH'in Belirlenmesi*

Optimum pH'in belirlenmesi amacıyla pH 4,0 – 9,0 arasında bir dizi deneme yapıldı. Bu amaçla pH 4,0 – 5,0; 0,2 M asetik asit/sodyum asetat tamponu, pH 6,0 – 7,0 ve 8,5; fosfat tamponu kullanılarak elde edildi. pH 9,0 için ise NH₃/NH₄Cl tamponu kullanıldı. Denemeler aşağıda anlatılan şekilde gerçekleştirildi.

0,5 mL tampon + 0,6 mL 5×10⁻⁴ M UA + 0,4 mL su + 50 µL Fe₃O₄@UOx ve 50 µL (0,1mg/mL) katalaz enzimi belirtilen sıra ile karıştırıldı ve 37°C'de 15 dk inkübe edildikten sonra UOx immobilize MNPler mıknatıs yardımıyla uzaklaştırıldı. Kalan kısmın tamamı 1,0 mL CuCl₂ + 1,0 mL Nc + 1,0 mL pH7 üre tamponu içerisine aktarıldı. Reaksiyon karışımının absorbansı 30 dk sonra 450 nm'de okundu.

3.6.3.2. *Optimum Sürenin Belirlenmesi*

pH 8,5 fosfat tamponlu ortamda 0,6 mL 5,0×10⁻⁴ M UA üzerine 50 µL Fe₃O₄@UOx ve 50 µL katalaz enzimi ilave edilerek 0-30 dk arası farklı inkübasyon sürelerinde 37°C su banyosunda bekletildi. MNP'ler mıknatıs yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra CUPRAC yöntemi uygulandı ve 30 dk sonra 450 nm'de absorbansları okundu.

3.6.3.3. *Optimum Fe₃O₄@UOx Miktarının Belirlenmesi*

0,5 mL pH 8,5 fosfat tamponu, 0,6 mL 5,0×10⁻⁴ M UA, 0,3 mL su, 100 µL EtOH ve 50 µL katalaz üzerine 10-60 µL arası farklı miktarlarda Fe₃O₄@UOx ilave edilip 37°C'de 15 dk

inkübe edildikten sonra MNP'ler uzaklaştırıldı. İnkübasyon çözeltisi CUPRAC reaktifi çözeltisi içerisine koyuldu ve 30 dk sonra absorbanları okundu.

3.6.3.4. Optimum Katalaz Miktarının Belirlenmesi

UA ile UOx arasındaki reaksiyon sonucu açığa çıkan H₂O₂ CUPRAC reaktif olduğundan ortama katalaz ilave edilerek H₂O₂'in parçalanması sağlanmıştır. Optimum katalaz miktarını belirlemek amacıyla 0,5 mL pH 8,5 fosfat tamponu, 0,6 mL 5,0×10⁻⁴ M UA, 0,3 mL su, 100 µL EtOH ve 10-60 µL farklı miktarlarda 0,1 mg/mL katalaz üzerine 50 µL Fe₃O₄@UOx ilave edilip 37°C'de 15 dk inkübe edilerek MNP'ler uzaklaştırıldıktan sonra CUPRAC yöntemi uygulandı.

3.6.4. UA Kalibrasyonu

5,0×10⁻⁴ M standart UA çözeltisinden 50 µL ila 0,6 mL arası değişen farklı hacimler alınarak immobilize UOx ilave edilmeden ve immobilize UOx ile muamele edilerek yöntem bölüm 3.6.1'de anlatıldığı şekilde uygulandı.

3.6.5. Serbest ve İmmobilize Enzim Kinetiğinin İncelenmesi

Serbest haldeki ve immobilize haldeki enzimlerin K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek için 3,33×10⁻⁵ – 1,67×10⁻⁴ M arasında değişen substrat konsantrasyonları (UA) ve 20 µL (0,4 mg/mL) serbest ve immobilize haldeki UOx enzimi kullanılarak 5. dakika sonundaki 290 nm'deki UA absorbanındaki azalma incelendi.

3.6.6. Antioksidan Karışımlarında UA Tayini

5,0×10⁻⁴ M UA ile 1,0×10⁻³ M CFA, QR, GA, CAT, FA, NAC, CYS, GSH; 1,0×10⁻² M TR'un farklı konsantrasyonlarını içeren karışımlar hazırlandıktan sonra ilk olarak doğrudan CUPRAC yöntemi uygulandı. Ardından oluşturulan bu karışımlar aşağıda anlatılan şekilde immobilize haldeki UOx ile karıştırıldıktan sonra CUPRAC yöntemi uygulandı ve elde edilen iki absorban arasındaki farktan UA konsantrasyonu bulundu.

0,5 mL pH 8,5 fosfat tamponu + x mL (UA ve/veya tiyol içeren AOX) + (0,9-x) mL su + y mL fenolik AOX + (100 – y) µL EtOH + 50 µL katalaz + 50 µL Fe₃O₄@UOx ilave edilip 37°C'de 15 dk inkübe edildikten sonra UOX immobilize MNPlar mıkknatis yardımıyla uzaklaştırıldı. İnkübasyon çözeltisi 1mL CuCl₂ + 1mL Nc + 1mL pH 7 üre tamponu içerisine koyuldu. 30 dk sonra 450 nm'de absorbanları okundu.

3.6.7. HPLC Yöntemi ile UA Tayini

HPLC ile UA tayininde George ve diğ. (2006) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. C18 kolonu ile gerçekleştirilen ters faz HPLC’de mobil faz olarak pH 4,7 10 mM KH₂PO₄ kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 20 µL dir. 0,8 mL dk⁻¹ akış hızıyla 15 dakikalık izokratik elüsyon süresince kolon sıcaklığı 25 °C’de sabit tutuldu. Analizler 200-800 nm dalgaboyu aralığında PDA dedektörü kullanılarak gerçekleştirildi ve dedeksiyon dalgaboyu olarak 280 nm kullanıldı.

3.6.8. Örnek Uygulaması ve HPLC Yöntemi ile Karşılaştırılması

Örnek olarak fetal bovine serum (FBS) kullanıldı. Serum örneğine tek başına ve UA ilave edilerek doğrudan ve immobilize UOx ile muamele edildikten sonra CUPRAC yöntemi uygulandı. Aradaki absorpsiyon farkından FBS’deki UA konsantrasyonu hesaplandı.

Geliştirilen yöntemle UA tayini için, örnek seyreltilmeden kullanıldı ve 0,5 mL alınarak yöntem Bölüm 3.6.1’de anlatıldığı şekilde uygulandı.

Serum örneğindeki UA miktarını HPLC ile saptamak için serum örneğinden 0,5 mL alınarak spektrofotometrik analizlerdeki son hacim olan 4,6 mL’ ye destile suyla tamamlandıktan sonra enjeksiyon gerçekleştirildi. Daha sonra aynı miktarda serum örneği immobilize UOx ile muamele edilerek UA’in tamamının parçalanıp parçalanmadığı kontrol edildi. Bunun için, 0,5 mL pH 8,5 fosfat tamponu + 0,5 mL serum + 0,5 mL su + 50 µL katalaz + 50 µL Fe₃O₄@UOx ilave edilip 37°C’de 15 dk inkübe edildikten sonra UOx immobilize MNPler miknatis yardımıyla uzaklaştırılarak içerisine 3 mL su ilave edilip enjeksiyon gerçekleştirildi.

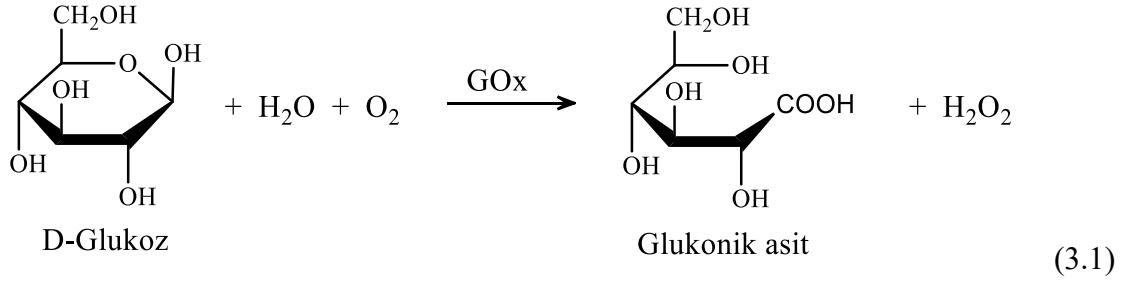
3.6.9. Fe₃O₄@UOx ile FBS’de TAC ve UA içermeyen TAC’nin belirlenmesi

Geliştirilen yöntemle TAC ve UA’siz TAC’yi belirlemek için gerçek örnek olarak FBS kullanıldı. Bunun için FBS’den hiçbir seyreltme veya ön işlem yapmadan 0,5 mL alınarak CUPRAC yöntemi uygulanmıştır. Ardından aynı miktardaki FBS Fe₃O₄@UOx’ler ile muamele edildikten sonra enzim immobilize MNP’ler miknatis yardımıyla uzaklaştırılıp CUPRAC yöntemi uygulandığında UA’siz TAC belirlenmiştir.

3.7. GOx İMMOBİLİZASYONU VE GLUKOZ TAYİNİ

3.7.1. Yöntemin Uygulanışı

Glukoz CUPRAC reaktif bir bileşik değildir. Ancak enzim katalizli reaksiyonla oluşan H₂O₂’in CUPRAC reaktif olmasından yararlanılmıştır. Oluşan H₂O₂ glukoz ekivalenttir.



Bu amaçla glukoz tayinin için; 0,5 mL pH 7,0 NH₄Ac tamponu + x mL glukoz + (0,8-x) mL destile su + 200 µL Fe₃O₄@GOx 15 dakika çalkalandıktan sonra mıknatıs yardımıyla manyetik nanopartiküller uzaklaştırıldı. Ardından çözelti 1,0 mL CuCl₂ + 1,0 mL Nc + 1,0 mL NH₄Ac içerisine ilave edildi. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrasında absorbanları okundu.

3.7.2. Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA Üzerine GOx İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi

3.7.2.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi:

GOx enziminin manyetik nanopartiküller üzerine immobilizasyonuna pH'ın etkisini incelemek için 0,2 M pH 4,0 –5,0–6,0 asetat tamponu, pH– 7,0 – 8,0 PBS tamponu kullanıldı.

Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA'den 0,02 g alınarak üzerine farklı tampon çözeltilerinden 0,8 mL koyulup 0,2 mL 10 mg/mL GOx ilave edilip 30 dakika karıştırılarak immobilizasyonu sağlandı. Birkaç kez su ile yıkanarak bağlanmadan kalmış olabilecek GOx uzaklaştırıldıktan sonra 1,0 mL su ile disperse edilip yöntem aşağıdaki gibi uygulandı.

0,5 mL pH 7,0 NH₄Ac tamponu + 0,4 mL 1×10⁻³ M glukoz + 0,5 mL destile su + 100 µL Fe₃O₄@GOx ilave edilerek 15 dakika çalkalandı. Daha sonra mıknatıs yardımıyla manyetik nanopartiküller uzaklaştırılıp 1,0 mL CuCl₂ + 1,0 mL Nc + 1,0 mL NH₄Ac içerisine ilave edildi. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrasında absorbanları okundu.

3.7.2.2. GOx Miktarının Optimizasyonu

0,02 g Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA üzerine 10 mg/mL'lik GOx'dan 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 mL koyulup pH 7,0 PBS tamponu ile 1,0 mL'ye tamamlandı. 30 dakika beklendikten sonra GOx immobilize MNP'ler mıknatıs yardımıyla toplanıp üst kısım ayrı bir yere alındı. Fe₃O₄@GOx birkaç kez suyla ve pH 7 PBS ile yıkandı. 1,0 mL su ile disperse edilip 3.7.1'de anlatıldığı şekilde CUPRAC yöntemiyle optimum GOx miktarı belirlendi.

3.7.2.3. *GOx İmmobilizasyon süresinin Optimizasyonu*

0,02 g Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA üzerine 2,0 mg GOx ve 0,8 mL pH 7,0 PBS ilave edilip 5 dakika ila 1 saat arası farklı sürelerde inkübe edildikten sonra su ve pH 7,0 PBS ile yıkandı. 1,0 mL su ile disperse edilerek 3.7.1’de anlatıldığı şekilde CUPRAC yöntemi uygulandı.

3.7.3. Glukoz’un Fe₃O₄@GOx ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu

3.7.3.1. *Optimum pH’in Belirlenmesi*

Optimum pH’in belirlenmesi amacıyla pH 4-9 arasında bir dizi deneme yapıldı. Bu amaçla pH 4,0–5,0–6,0 için 0,2 M ABS, pH 7,0 için NH₄Ac, pH 8,0 ve pH 9,0 için ise NH₃/NH₄Cl tamponu kullanıldı. Denemeler aşağıda anlatılan şekilde gerçekleştirildi.

0,5 mL tampon + 0,4 mL 1×10⁻³ M Glukoz + 0,4 mL su + 200 µL Fe₃O₄@GOx belirtilen sıra ile koyuldu ve 30 dk karıştırarak oda sıcaklığında bekletildikten sonra GOx immobilize MNPler mıknatıs yardımıyla uzaklaştırıldı. Kalan kısmın tamamı 1,0 mL CuCl₂ + 1,0 mL Nc + 1,0 mL pH7,0 NH₄Ac tamponu içerisine aktarıldı. Reaksiyon karışımının absorbanı 30 dk sonra 450 nm’de okundu.

3.7.3.2. *Optimum Fe₃O₄@GOx Miktarının Belirlenmesi*

0,5 mL pH 7,0 NH₄Ac tamponu ve 0,4 mL 1,0×10⁻³ M glukoz, üzerine 25-400 µL arası farklı miktarlarda Fe₃O₄@GOx ilave edilip son hacmi 1,5 mL olacak şekilde destile suyla tamamlandı. Oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilip MNP’ler uzaklaştırıldı. İnkübasyon çözeltisi CUPRAC reaktifi çözeltileri içerisine koyuldu ve 30 dk sonra absorbanları okundu.

3.7.3.3. *Optimum Sürenin Belirlenmesi*

pH 7,0 NH₄Ac tamponlu ortamda 0,4 mL 1,0×10⁻³ M glukoz, 0,4 mL su üzerine 200 µL Fe₃O₄@GOx enzimi ilave edilerek 0-60 dk arası farklı inkübasyon sürelerinde oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra MNP’ler mıknatıs yardımıyla uzaklaştırılıp CUPRAC yöntemi uygulandı ve 30 dk sonra 450 nm’de absorbanları okundu.

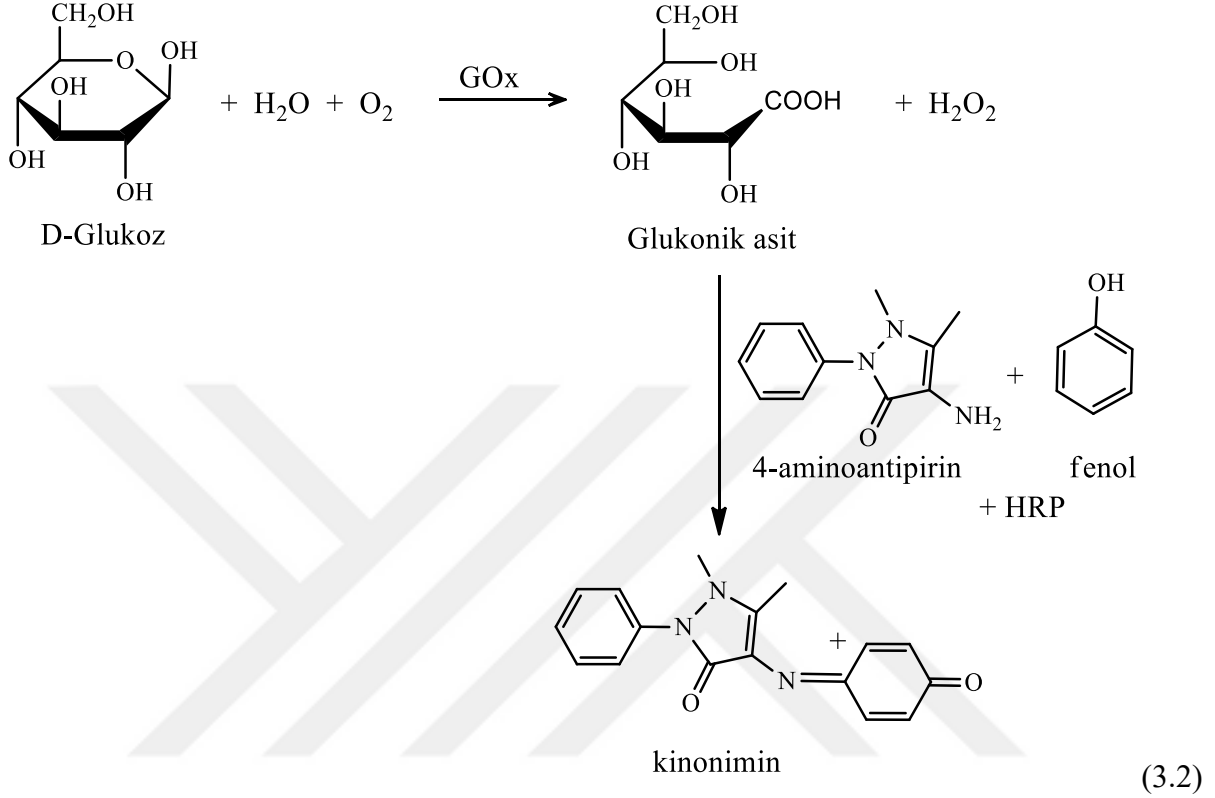
3.7.4. Glukoz Kalibrasyonu

1,0×10⁻³ M standart glukoz çözeltisinden 50 µL ila 0,5 mL arası değişen farklı hacimler alınarak yöntem bölüm 3.7.1’de anlatıldığı şekilde uygulandı.

3.7.5. İmmobilize ve Serbest Enzim Kinetiğinin Karşılaştırılması

Serbest ve immobilize enzimin aktivitesi oda sıcaklığında H₂O₂ oluşum hızı takip edilerek belirlendi. Bunun için glukozun, GOx tarafından glukonat ve H₂O₂'e oksitlenmesi sonucu

oluşan H_2O_2 'in, Fenol + 4-aminoantipirin (4-AAP), peroksidaz (HRP) varlığında, kırmızı kinonimin boyası oluşturmasından yararlanılmıştır. Oluşan kırmızı rengin absorbansı 506 nm'de okunmuştur. Reaksiyon aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir:



0,5 mL 0,25 M pH 7,4 PBS + 0,5 mL $1,2 \times 10^{-3}$ M 4-AAP + 0,5 mL $2,0 \times 10^{-3}$ M fenol + 100 μL HRP (37,5 U/mL) + x mL 0,1 M glukoz + (0,85-x) mL su + 50 μL GOx (0,2 mg/mL) karıştırılarak 10 dak oda sıcaklığında beklenip 506 nm'deki absorbansları okundu. İmmobilize enzimin aktivitesini belirlemek için nanopartikül üzerine immobilize edilen GOx konsantrasyonu serbest enzimle aynı olacak şekilde hazırlandı. Bunun için 0,02 g $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ üzerine 2,0 mg GOx ve 0,8 mL pH 7,0 PBS ilave edilip 30 dakika inkübe edildi. Destile su ve pH 7,0 PBS ile yıkandıktan sonra 2,0 mL su ile disperse edildi. Buradan 10 μL alınarak aktivitesi incelendi.

3.7.6. Örnek Uygulaması

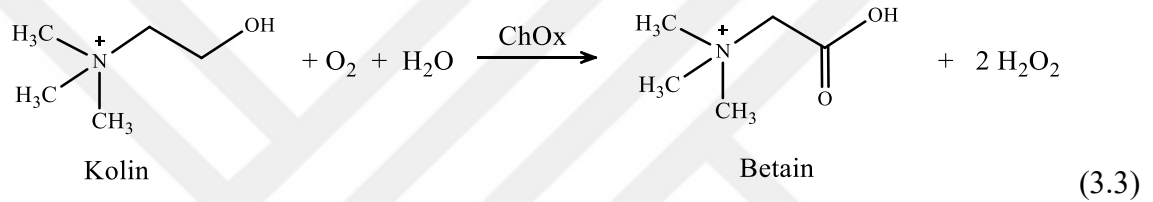
Örnek olarak FBS kullanıldı. Serum örneğine tek başına ve glukoz standardı ilave edilerek immobilize GOx ile muamele edildikten sonra CUPRAC yöntemi uygulandı. Elde edilen absorbanslardan FBS'daki glukoz konsantrasyonu hesaplandı.

Geliştirilen yöntemle glukoz tayini için, FBS'dan 2 mL alınarak içerisine %20 TCA'dan 1 mL ilave edilip proteinler çöktürüldü. Santrifüjün ardından süpernatanttan 2,3 mL alındı ve pH'ı 3M NaOH ile ayarlandı ve hacmi 2,5 mL'ye tamamlandı. Buradan alınan 0,05 mL ile ve içerisine $1,0 \times 10^{-3}$ M glukoz'dan 0,1 ve 0,15 mL ilave edilerek yöntem uygulandı.

3.8. ChOx'İN İMMOBİLİZASYONU VE KOLİN TAYİNİ

3.8.1. Yöntemin Uygulanışı

Kolin de glukoz gibi CUPRAC reaktif bir bileşik değildir. Ancak yöntemde ChOx enzimi katalizliğinde koline ekivalent miktarda oluşan CUPRAC reaktif H_2O_2 oluşmasından yararlanılmıştır.



Bu amaçla kolin tayini için; 0,5 mL pH 9,0 $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ tamponu + x mL ChCl + (0,85-x) mL destile su + 150 μL $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ChOx}$ 'dan oluşan karışım 20 dakika çalkalandıktan sonra mıknatıs yardımıyla manyetik nanopartiküller uzaklaştırılarak 1,0 mL CuCl_2 + 1,0 mL Nc + 1,0 mL NH_4Ac içerisine ilave edildi. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrasında absorbansları okundu.

3.8.2. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ Üzerine ChOx İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi

3.8.2.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi:

ChOx enziminin manyetik nanopartiküller üzerine immobilizasyonuna pH'ın etkisini incelemek için 0,2 M pH 4,0–5,0–6,0 asetat tamponu, pH– 7,0 NH_4Ac , pH 8,0 – pH 9,0 $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ tamponu kullanıldı.

Bölüm 3.3 ve 3.4'de anlatıldığı şekilde hazırlanan $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ 'den 0,01 g alınarak 0,1 mL 2 mg/mL ChOx ilave edilip üzerine farklı tampon çözeltilerinden 0,9 mL koyulup son hacmi 1 mL'ye tamamlandı. 1 saat karıştırılarak immobilizasyonu sağlandı. Süre sonunda birkaç kez su ile yıkanarak bağlanmadan kalmış olabilecek ChOx uzaklaştırıldı. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ChOx}$ 1,0 mL su ile disperse edilip yöntem 3.8.1'de anlatıldığı şekilde 5×10^{-4} M 0,3 mL ChCl kullanılarak uygulandı.

3.8.2.2. *ChOx Miktarının Optimizasyonu*

0,01 g Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA üzerine 2 mg/mL (24 U/mL) ChOx'dan 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 mg olacak şekilde koyulup pH 6,0 asetat tamponu ile 1,0 mL'ye tamamlandı. 1 saat beklendikten sonra ChOx immobilize MNP'ler mıknatis yardımıyla toplanıp üst kısım ayrı bir yere alındı. Fe₃O₄@ChOx birkaç kez suyla yıkandı. 1,0 mL su ile disperse edilip 3.7.1.'de anlatıldığı şekilde 5×10⁻⁴ M 0,3 mL ChCl kullanılarak CUPRAC yöntemiyle optimum ChOx miktarı belirlendi.

3.8.2.3. *ChOx İmmobilizasyon Süresinin Optimizasyonu*

0,01 g Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA üzerine 2,0 mg/mL ChOx'dan 0,1 mL ve 0,9 mL pH 6,0 asetat tamponu ilave edilip 5 dakika ila 1 saat arası farklı sürelerde inkübe edilerek su ile yıkandı. 1,0 mL su ile disperse edilerek 3.7.1.'de anlatıldığı şekilde CUPRAC yöntemi uygulandı.

3.8.3. *ChCl'nin Fe₃O₄@ChOx ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu*

3.8.3.1. *Optimum pH'in Belirlenmesi*

Optimum pH'in belirlenmesi amacıyla denemeler pH 4,0 – 10,0 arasında yapıldı. Bu amaçla pH 4,0 – 5,0 – 6,0 için 0,2 M ABS, pH 7,0 için NH₄Ac, pH 8,0 – 9,0 – 10,0 için ise NH₃/NH₄Cl tamponu kullanıldı. Denemeler aşağıda anlatılan şekilde gerçekleştirildi.

0,5 mL tampon + 0,3 mL 5×10⁻⁴ M ChCl + 0,55 mL su + 150 µL Fe₃O₄@ChOx koyuldu ve 20 dakika oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra ChOx immobilize MNPlar mıknatis yardımıyla uzaklaştırıldı. Kalan kısmın tamamı 1,0 mL CuCl₂ + 1,0 mL Nc + 1,0 mL pH7,0 NH₄Ac tamponu içerisine aktarıldı. Reaksiyon karışımının absorbansı 30 dk sonra 450 nm'de okundu.

3.8.3.2. *Optimum Fe₃O₄@ChOx Miktarının Belirlenmesi*

0,5 mL pH 9,0 NH₃/ NH₄Cl tamponu, 0,3 mL 5,0×10⁻⁴ M ChCl, üzerine 25-200 µL arası farklı miktarlarda Fe₃O₄@ChOx ilave edilip son hacmi destile suyla 1,5 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilip MNP'ler uzaklaştırıldı. İnkübasyon çözeltisi CUPRAC reaktifi çözeltileri içerisine koyuldu ve 30 dk sonra absorbansları okundu.

3.8.3.3. *Optimum Sürenin Belirlenmesi*

pH 9,0 NH₃/ NH₄Cl tamponlu ortamda 0,3 mL 5,0×10⁻⁴ M ChCl, 0,55 mL su üzerine 150 µL Fe₃O₄@ChOx enzimi ilave edilerek 5-40 dk arası farklı inkübasyon sürelerinde oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra MNP'ler mıknatis yardımıyla uzaklaştırıldı. CUPRAC yöntemi uygulanarak 30 dk sonra 450 nm'de absorbansları okundu.

3.8.4. ChCl Kalibrasyonu

$5,0 \times 10^{-4}$ M standart ChCl çözeltisinden 25 μ L ila 0,4 mL arası değişen farklı hacimler alınarak yöntem bölüm 3.7.1'de anlatıldığı şekilde uygulandı. Okunan absorbans değerleri ile konsantrasyon arasında grafik çizilerek kalibrasyon denklemi ve belirleme katsayısı bulundu.

3.8.5. ChOx için İmmobilize ve Serbest Enzim Kinetiğinin Karşılaştırılması

Serbest ve immobilize enzimin aktivitesi H_2O_2 oluşum hızı takip edilerek belirlendi. Bunun için ChCl'nin, ChOx tarafından betain ve H_2O_2 'e oksitlenmesi sonucu oluşan H_2O_2 'in, Fenol, 4-AAP ve HRP varlığında, 506 nm'de maksimum absorbansa sahip kırmızı kinonimin boyası oluşturmasından yararlanılmıştır.

0,5 mL 0,2 M pH 9,0 NH_3/NH_4Cl + 0,5 mL $1,2 \times 10^{-3}$ M 4-AAP + 0,5 mL $2,0 \times 10^{-3}$ M fenol + 100 μ L HRP (37,5 U/mL) + x mL ChCl + (0,85-x) mL su + 50 μ L ChOx (4,8 U/mL) karıştırılarak 5 dk oda sıcaklığında beklenip 506 nm'deki absorbansları okundu. İmmobilize enzimin aktivitesini belirlemek için nanopartikül üzerine immobilize edilen ChOx konsantrasyonu serbest enzimle aynı olacak şekilde hazırlandı. Bunun için 0,01 g $Fe_3O_4/SiO_2/APTS/GLA$ üzerine 0,1mL ChOx (24 U/mL) ve 0,9 mL pH 6,0 asetat tamponu eklenip 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında su ile yıkanarak 0,5 mL su ile disperse edildi. Buradan 50 μ L alınarak aktivitesi incelendi.

3.8.6. Örnek Uygulaması

Geliştirilen yöntemle 6-9 aylık bebekler için kullanılan devam sütünde kolin tayini gerçekleştirildi. Gıdalarda ve besin takviyelerinde toplam kolin tayinini gerçekleştirmek için esterlenmiş formlardan kolini serbest bırakılması amacıyla kullanılan en yaygın yaklaşım asit ve/veya enzimle yapılan hidroliz adıdır. Bunun için 5 g örnek alınarak üzerine 30 mL 1 M HCl eklendi. İyi karıştırıldıktan sonra 70°C su banyosunda 3 saat karıştırılarak inkübe edildi. Süre sonunda alınan örnek santrifüj edildi ve süpernatanttan alınan 10 mL'lik kısım 3M NaOH ile nötrleştirildi. Destile suyla 15 mL'ye tamamlandıktan sonra geliştirilen yöntemle tek başına ve standart ChCl katkısı yapılarak tayin edildi.

3.9. İMMOBİLİZE ENZİMLERİN STABİLİTESİ VE TEKRAR KULLANILABİLİRLİĞİ

İmmobilize enzimler 4° C'de ağzı kapalı bir şişede tutuldu ve stabilitelerini araştırmak için substratlarının tayini 1 ile 60 gün arasında farklı zamanlarda tekrarlandı. Bu amaçla 65,2 µM UA, 100 µM Glu ve 33,3 µM ChCl kullanıldı.

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için iki farklı konsantrasyonda substratı kullanılarak yöntem uygulandıktan sonra mıknatıs yardımıyla uzaklaştırılan immobilize enzimler destile suyla birkaç kez yıkandı. Aynı immobilize enzimler kullanılarak yöntem tekrar uygulandı. Aynı işlem beş kez tekrarlandı. Gün içi tekrarlanabilirlik ve günler arası tekrarlanabilirlik deneyleri için ilgili yöntemler 65,2 µM UA, 88,9 µM Glu ve 33,3 µM ChCl'e günde beş kez ve birbirini takip eden beş gün uygulanarak % RSD değerleri hesaplandı.]

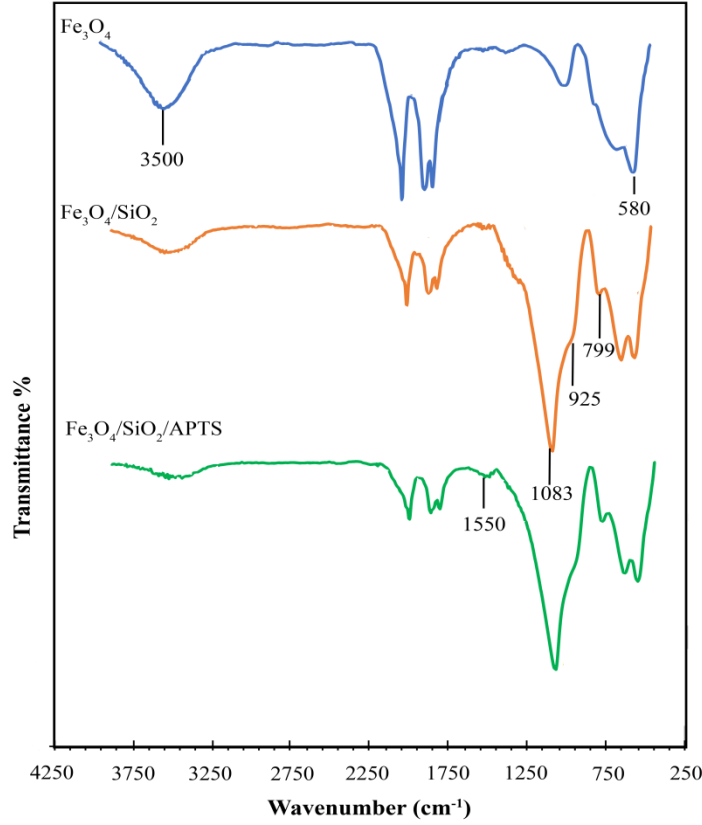
4. BULGULAR

4.1. MNP'İN KARAKTERİZASYONU

Chang ve diğ. (2009)'nin yöntemine göre sentezlenen Fe_3O_4 -MNP'lerin yüzeyi, tetraetilortosilikat (TEOS) kullanılarak silanol grupları ile kaplanmıştır. Daha sonra, APTS'nin eklenmesiyle, hidrolize APTS'nin hidroksil gruplarının silanol gruplarıyla reaksiyona girmesiyle organosilan katmanı elde edilmiştir. Sonuç olarak, silika yüzeyinin hidrofilik doğası, organo-işlevselleştirmeden sonra hafif hidrofobik hale gelmiştir. APTS ile modifikasyondan sonra silisin spesifik yüzey alanı azalmasına rağmen, $Fe_3O_4/SiO_2/APTS$ yüzeyindeki NH_2 grupları organik kısımlar için bir bağlayıcı görevi görmektedir (Jafarzadeh ve diğ, 2015). Son olarak enzimin kovalent bağlanması, GLA'nın terminal -COH grubu ile enzimlerin NH_2 grupları arasındaki reaksiyon sonucu -CH=N- oluşumu ile sağlanmıştır.

Sentezlenmiş ve modifiye edilmiş MNP'lerin yapısını araştırmak için FTIR ve STEM-EDS kullanılmıştır.

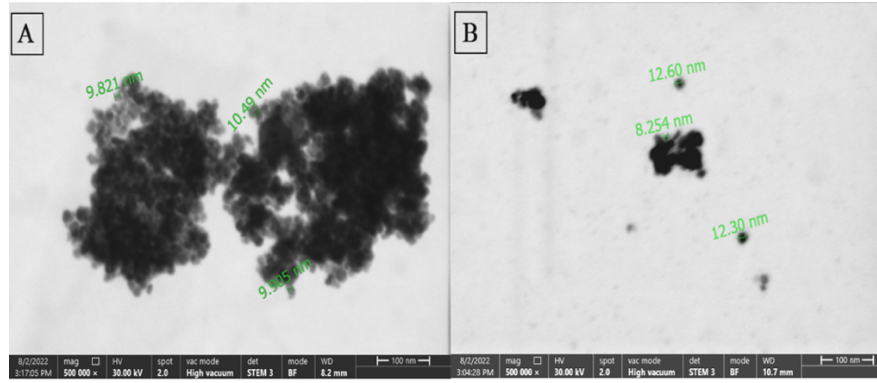
Burada Fe_3O_4 -MNP'ler ve UOx immobilize MNP'ler (sentezlenen nanobiyosensörün son hali ($Fe_3O_4@UOx$)) için STEM görüntüleri alınırken, nanobiyosensör sentezinin farklı aşamaları için FTIR analizi yapılmıştır. Bu aşamalar: modifiye edilmemiş Fe_3O_4 -MNP'ler, SiO_2 ile modifiye edilmiş MNP'ler (Fe_3O_4/SiO_2) ve APTS ile modifiye edilmiş Fe_3O_4/SiO_2 ($Fe_3O_4/SiO_2/APTS$) dir.



Şekil 4.1: Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}$ 'ye ait FTIR spektrumları.

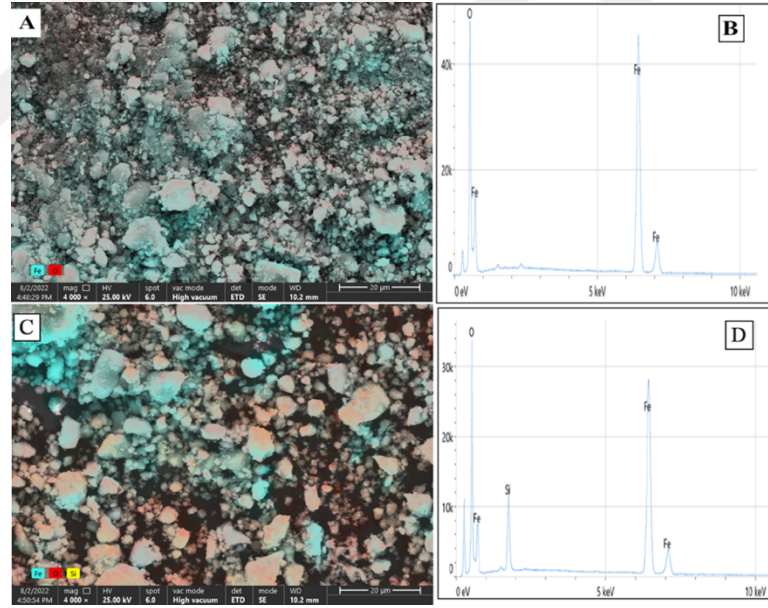
Şekil 4.1'de, kullanılan üç alt tabaka için FTIR spektrumları görülmektedir. Fe_3O_4 'e ait spektrumda 580 cm^{-1} ve 3500 cm^{-1} civarında görülen absorpsiyon pikleri sırasıyla Fe-O ve O-H gerilme titreşimlerine aittir. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ nanopartiküllerine ait spektrumda 1083 cm^{-1} ve 799 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikler Si-O-Si bağının simetrik olmayan ve simetrik doğrusal gerilme titreşimleriyle ilişkilendirilebilir. Si-OH'nin eğilme titreşimine ait absorpsiyon piki ise 925 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}$ eğrisinde serbest NH_2 grubunun N-H titreşim absorpsiyon pikinin 1550 cm^{-1} 'de görülmesi SiO_2 yüzeyine APTS'nin bağlandığını göstermektedir.

Sentezlenen MNP'lerin morfolojisi STEM analizi ile karakterize edilmiştir. Yalın Fe_3O_4 MNP'lerin farklı STEM görüntüleri Şekil 4.2(A ve B)'de gösterilmiştir. Ayrıca Şekil 4.3'de modifiye edilmemiş (yalın) ve SiO_2 ile modifiye edilmiş Fe_3O_4 MNP'ler için renkli STEM görüntüleri (Şekil 4.3 (A ve C)) ve EDS spektrumları (Şekil 4.3 (B ve D)) verilmiştir. STEM analizi sırasında $500.000\times$ büyütme yakınlaştırma seviyesi uygulanmıştır.



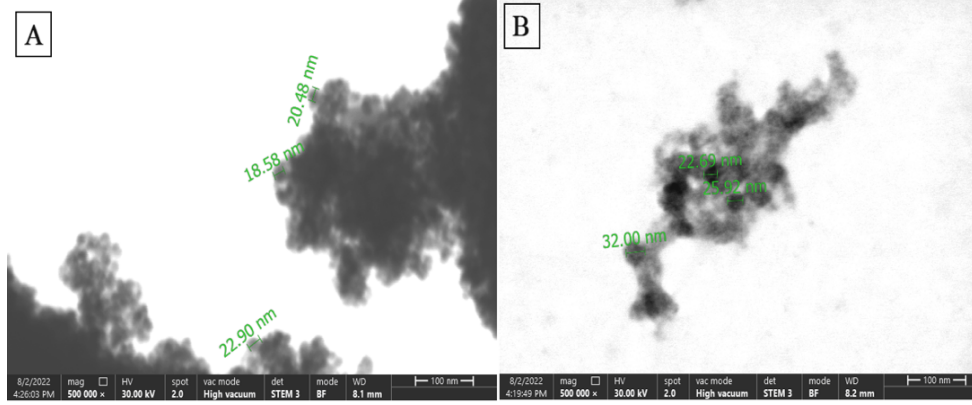
Şekil 4.2: Sentezlenen yalın Fe_3O_4 MNP'ler için alınan farklı STEM görüntüleri (A ve B).

Şekil 4.2'deki Fe_3O_4 MNP'lerin STEM görüntüleri, MNP'lerin çapları yaklaşık 8-12 nm arasında değişen küresel yapısını göstermektedir. Benzer şekilde daha önce aynı yöntemle Fe_3O_4 sentezleyen Chang ve diğ. (2009) elde ettikleri MNP'lerin çaplarının 10-15 nm arasında değişen küreler olduğunu bildirmişlerdir. Şekil 4.2'de Fe_3O_4 tanecikleri arasında manyetik çekimden kaynaklanan bir yığılma görülmektedir.



Şekil 4.3: Yalın Fe_3O_4 MNP'lerin (A,B) ve $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ 'nin (C,D) EDS spektrumları ile renkli STEM görüntüleri.

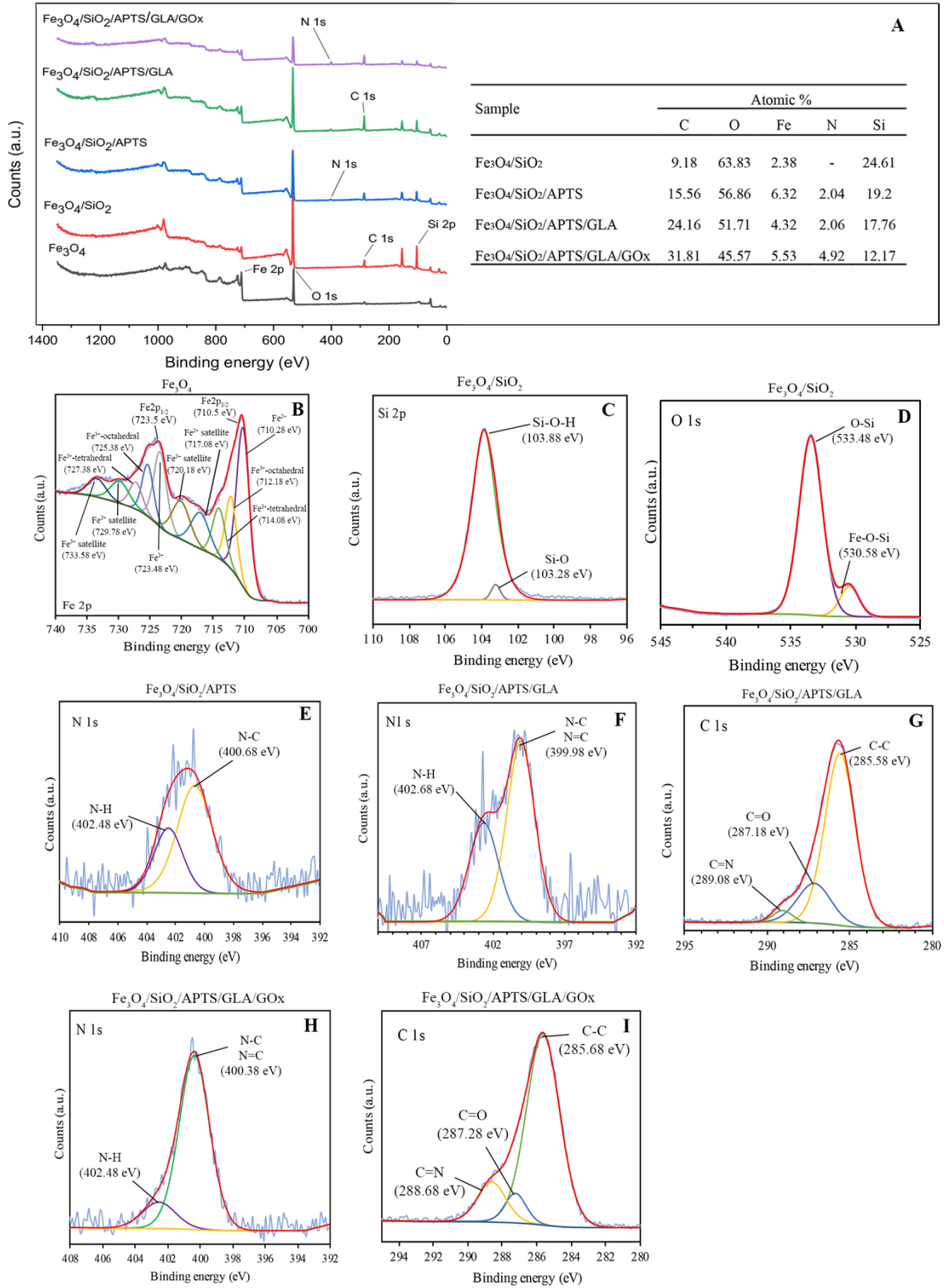
Analiz sonuçları, MNP'lerin TEOS reaksiyonu ile yapılan SiO_2 modifikasyonlarının başarıyla gerçekleştirildiğini göstermiştir. Son olarak, Şekil 4.4(A ve B)'de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{UOx}$ gösterilmiştir.



Şekil 4.4: UOx immobilize edilmiş Fe_3O_4 MNP'ler ($Fe_3O_4@UOx$) için alınan farklı STEM görüntüleri (A ve B).

Şekil 4.4, ortalama partikül boyutu yaklaşık 10nm olan Fe_3O_4 NP'lerin, TEOS ve APTS modifikasyonlarının ardından enzim immobilizasyonu sonucunda yaklaşık 18-25 nm'ye çıktığını göstermektedir. Bu bulgular, MNP'ler için başarılı sentez ve modifikasyonun bir göstergesi olarak yorumlanabilir; MNP'ler üzerinde enzim (UOx) immobilizasyonu, MNP'leri çevreleyen yüzey filmi ile de doğrulanmıştır.

Fe_3O_4 MNP ve her bir modifikasyon adımı sonrası elde edilen MNP'lerin yüzey kimyasal bileşimleri, XPS kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.5: (A) Farklı modifikasyon adımlarından sonra yalnız/modifiye edilmiş Fe₃O₄ nanopartiküllerinin genel XPS spektrumları ve atomik içerikleri. (B) Fe₃O₄'ün Fe 2p spektrumu, (C) Fe₃O₄/SiO₂'nin Si 2p spektrumu, (D) Fe₃O₄/SiO₂'nin O 1s spektrumu (E) Fe₃O₄/SiO₂/APTS'nin N 1s spektrumu (F) Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA'nın N 1s spektrumu, (G) Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA'nın C 1s spektrumu, (H) Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA/GOx'in N 1s spektrumu, (I) Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA/GOx'in C 1s spektrumu.

Şekil 4.5(A), farklı modifikasyon adımlarından sonra yalın/modifiye edilmiş Fe_3O_4 nanopartiküllerinin XPS genel spektrumlarını ve atomik içeriklerini göstermektedir. Fe_3O_4 'te görülen baskın pikler Fe 2p (723,48 ve 710,48 eV) ve O 1s (529,98 eV)'dir. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ 'de ilk adımda görülmeyen Si 2p'nin (103.88 eV) varlığı TEOS'un Fe_3O_4 yüzeyine bağlandığını gösterir. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}$ 'de görülen %2,04 azot içeriği, APTS'nin yapısındaki $-\text{NH}_2$ grubundan kaynaklanmaktadır. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ basamağında spektrumundaki C 1s pik şiddetinin artması da GLA'nın $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ 'ye bağlandığını kanıtlar. Son aşamada enzimin immobilizasyonu sonucunda enzim yapısındaki $-\text{NH}_2$ gruplarından dolayı N 1s pikinin şiddeti artmıştır. Şekil 4.5 (B – D), ters evrişim piklerini göstermektedir. Şekil 4.5 (B)'de, 710.5 ve 723.5 eV'deki pikler, sırasıyla Fe 2p_{3/2} ve Fe 2p_{1/2}'ye aittir. 710.3 eV'deki bağlanma enerjisindeki pik, 717.08 eV'de karşılık gelen bir uydu piki ile Fe^{2+} iyonlarına aittir. 712.18 ve 714.08 eV'deki pikler, sırasıyla oktahedral ve tetrahedral Fe^{3+} iyonlarına atfedilmiştir. 720.18 eV'deki uydu piki, Fe^{3+} iyonları ile ilişkilendirilmiştir. 2p_{1/2} bölgesinde 723.48, 725.38, 727.38, 729.78 ve 733.58 eV'de görülen pikler sırasıyla Fe^{2+} iyonlarına, oktahedral Fe^{3+} iyonlarına, tetrahedral Fe^{3+} iyonlarına, Fe^{2+} uydu ve Fe^{3+} uydu piklerine bağlanabilir. Şekil 4.5 (C), $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ 'nin Si 2p'nin ayrıntılı XPS spektrumunu göstermektedir. Burada 103.88 eV'de görülen pik Si-OH'a atfedilebilirken, 103.28 eV'de görülen pik Si-O ile ilişkilendirilmiştir. Aynı modifikasyon için O 1s spektrumu incelendiğinde, sırasıyla 530,58 ve 533,48 eV'de Fe-O-Si ve O-Si bağlarıyla ilişkili iki pik görülmüştür (Şekil 4.5(D)). Şekil 4.5(E)'de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}$ 'nin N1s spektrumundaki 400.68 ve 402.48 eV'deki pikler, sırasıyla N-C ve N-H bağları ile ilişkilendirilmiştir. Bu bağlar, APTS ile aminasyon işleminin silika tabakasının üzerinde gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ 'nın N 1s ve C 1s spektrumları sırasıyla Şekil 4.5 (F) ve (G)'de gösterilmektedir. N 1s spektrumunda 399,98 eV'de görülen N=C/N-C'ye atfedilen pik ve C 1s spektrumunda sırasıyla 287,18 ve 289,08 eV'de görülen C=O ve C=N bağıyla ilişkili pikler (Şekil 4.5 (G)), GLA'nın amin fonksiyonize nanopartikül üzerine bağlandığını doğrulamaktadır. Enzim immobilizasyonunu kanıtlamak için $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}/\text{GOx}$ 'ın N 1s (Şekil 4.5. (H)) ve C 1s (Şekil 4.5 (I)) spektrumları incelenmiştir. Enzim yapısındaki $-\text{NH}_2$ gruplarının GLA yoluyla nanopartiküle bağlanması sonucu N 1s pikinin şiddetinin arttığı görülmektedir. Spektrumda 400.38 eV ve 402.48 eV'deki pikler, N-C/N=C ve N-H bağları ile ilişkilendirilmiştir. Şekil 4.5 (G)'de, C=O bağının pik şiddeti C=N bağınınkinden daha yüksek iken, enzim immobilizasyonundan sonraki nanopartikülün C1s spektrumunda (Şekil 4.5 (I)) görülen C=N (288,68 eV) bağının pik şiddetinin, C=O (287.28 eV) bağınınkinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu da

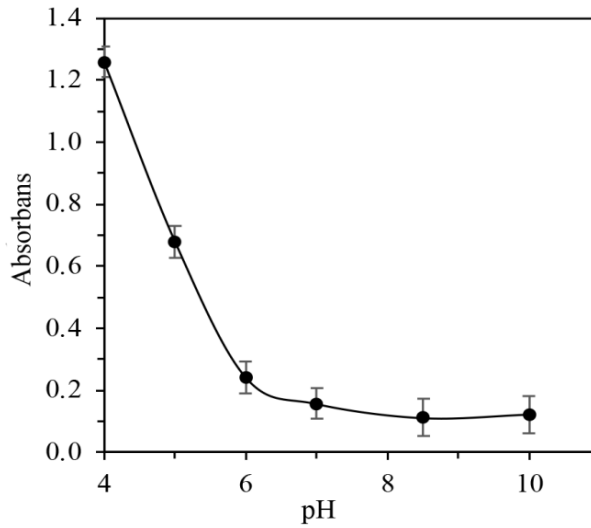
enzimin $-NH_2$ grubu aracılığıyla GLA'ya bağlanarak $-HC=N-$ bağıını oluşturduğunu kanıtlamaktadır.

4.2. UOx İMMOBİLİZASYONU VE UA TAYİNİ

4.2.1. UOx İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi

4.2.1.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi

$Fe_3O_4/SiO_2/APTS/GLA$ üzerine UOx enziminin immobilizasyonunda pH'ın etkisini incelemek için 3.6.2.1'de anlatılan şekilde yöntem uygulandı. pH'a karşı okunan absorbans değerleri ile çizilen grafikten (Şekil 4.6) absorbansın en düşük olduğu pH belirlendi.

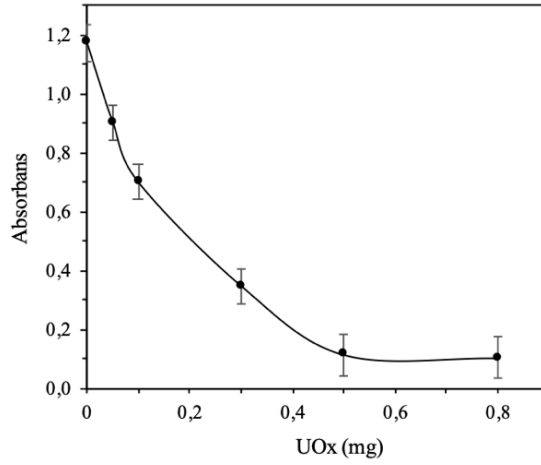


Şekil 4.6: UOx'ın $Fe_3O_4/SiO_2/APTS/GLA$ 'e immobilizasyonunda pH'ın etkisi.

Elde edilen sonuçlardan pH 4'de okunan absorbansın UOx immobilize MNP olmaksızın tek başına UA'in absorbansına yakın olduğu dolayısıyla UOx'ın $Fe_3O_4/SiO_2/APTS/GLA$ üzerine tutunmadığı görülürken pH 8,5'deki absorbansın azalmasından UA'in UOx ile reaksiyonu ile neredeyse tamamının bozunduğu görüldü. Bu yüzden UOx enziminin immobilizasyonu için optimum pH, 8,5 olarak seçildi.

4.2.1.2. UOx Miktarının Optimizasyonu

Bölüm 3.6.2.2.'de anlatıldığı şekilde immobilize UOx ile denemeler yapıldı. İmmobilize UOx'ın hazırlanmasında kullanılan UOx miktarı (mg) ile okunan absorbans değerleri arasında çizilen grafik Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.7: $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ 'e immobilizasyonunda UOx konsantrasyonunun etkisi.

0,025 g $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ için 0,5 mg UOx'ın optimum enzim miktarı olduğu görülmüştür. Daha yüksek UOx miktarlarında üst faz ile yapılan denemelerde absorbandsaki düşüşten UOx enziminin $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ üzerine tutunmadan kaldığı görülmüştür.

4.2.1.3. *İmmobilizasyon Süresinin Optimizasyonu*

0,025 g $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ üzerine UOx enziminin immobilizasyonu için gerekli optimum süreyi belirlemek için yöntem bölüm 3.6.2.3'de anlatıldığı gibi uygulandı.

Tablo 4.1: UOx'ın farklı sürelerde immobilizasyonu sonucu 0,6 mL $5,0 \times 10^{-4}$ M UA varlığında uygulanan CUPRAC yöntemi absorbands değerleri.

Süre	Absorbans
UA (UOx ile muamele edilmemiş)	1,1432
0	0,6061
10 dk	0,5743
20 dk	0,5619
30 dk	0,4060
1 h	0,2946
3h	0,2774
5h	0,0342
12h	0,0321
16h	0,0309

Tablo 4.1'deki farklı inkübasyon sürelerinde okunan absorbans değerleri incelendiğinde 5 saatten sonra absorbansın sabit kaldığı görüldüğünden 5 saatlik inkübasyon süresi optimum süre olarak belirlendi.

4.2.2. UA'in $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{UOx}$ ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu

4.2.2.1. Optimum pH'in Belirlenmesi

UA'in immobilize UOx ile reaksiyonun gerçekleştiği optimum pH'ı belirlemek için bölüm 3.6.3.1'de anlatıldığı şekilde yöntem uygulandıktan sonra elde edilen sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiştir.

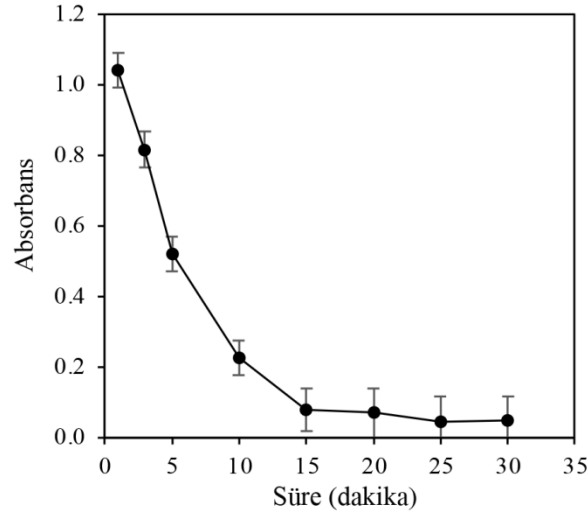
Tablo 4.2: Farklı pH'larda UA'in tek başına ve $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{UOx}$ ile reaksiyonu sonucu elde edilen CUPRAC absorbansları.

pH	UA	UA+ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{UOx}$
pH 4	1,1051	1,0724
pH 5	1,0977	0,3445
pH 6	1,0188	0,2021
pH 7	1,0312	0,1506
pH 8,0	1,0943	0,0731
pH 8,5	1,1187	0,0426
pH 9	1,0621	0,0412

Elde edilen sonuçlardan pH 4'de UA'in immobilize UOx ile muamelesi sonucu elde edilen absorbans değerinin neredeyse UA absorbansına eşit olduğu yani reaksiyon vermediği görülürken MNP üzerine immobilize haldeki UOx enziminin aktivitesinin pH 8,5'da maksimuma ulaştığı UA'in tamamının parçalandığı belirlendi.

4.2.2.2. Optimum Sürenin Belirlenmesi

UA'in immobilize UOx ile reaksiyon süresinin belirlenmesi için yöntem bölüm 3.6.3.2'de anlatıldığı şekilde uygulandı. Süre ve okunan absorbans değerleri arasında çizilen grafik Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

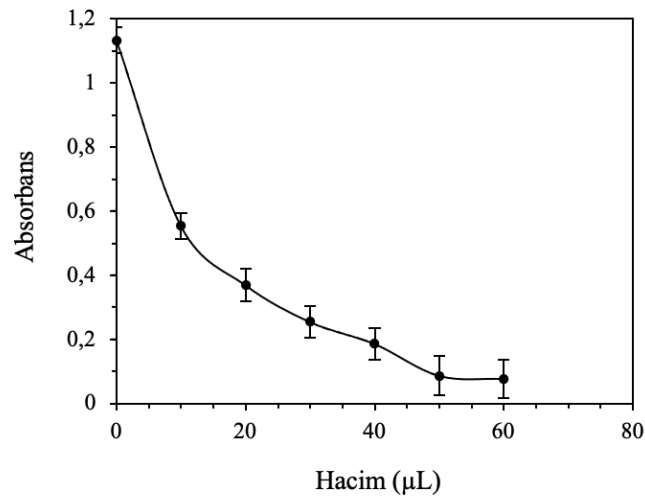


Şekil 4.8: UA'nın $Fe_3O_4@UOx$ ile farklı sürelerde inkübasyonu sonucu CUPRAC absorbans değerleri.

Elde edilen grafikten 15 dk'ya kadar absorbansın azaldığı ancak UA'nın tamamının parçalanmadığı görülürken 15. dakika ve sonrasında absorbansın neredeyse sabit kaldığı ve UA'nın tamamının parçalandığı görülmektedir. Bu yüzden optimum reaksiyon süresi 15 dakika olarak belirlenmiştir.

4.2.2.3. Optimum $Fe_3O_4@UOx$ Miktarının Belirlenmesi

UA üzerine ilave edilecek immobilize UOx miktarının belirlenmesi için yöntem Bölüm 3.6.3.3'de anlatıldığı şekilde uygulandı. Absorbans değerleri ve ilave edilen immobilize UOx hacmi arasında çizilen grafik Şekil 4.9'de verilmiştir.



Şekil 4.9: Farklı hacimlerde $Fe_3O_4@UOx$ ilavesi ile absorbansda meydana gelen değişim.

Elde edilen sonuçlardan, ilave edilen immobilize enzim miktarı arttıkça absorbansın düştüğü görülmektedir. UA'in tamamen parçalanması için 50 μL $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{UOX}$ süspansiyonunun yeterli olduğu görülmüştür. Yani CUPRAC absorbansı veren çözelti ana bileşeni UA olduğuna göre immobilize UOX'in artan miktarları UA'in daha fazla parçalanmasını sağlamıştır.

4.2.2.4. Optimum Katalaz Miktarının Belirlenmesi

UA'in UOX ile reaksiyonu sonucu açığa çıkan CUPRAC reaktif H_2O_2 , katalaz enzimi ile H_2O ve O_2 'e dönüştürüldü ve bu şekilde UA kaynaklı CUPRAC absorbansının tamamen giderilmesi sağlandı. Bunun için yöntem Bölüm 3.6.4.3'de anlatıldığı şekilde uygulandı.

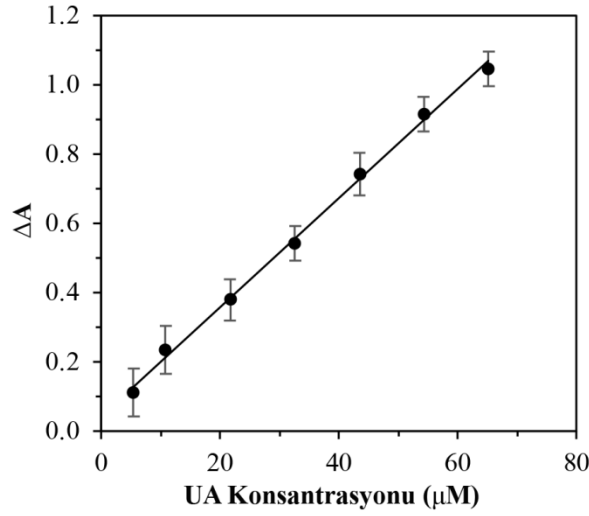
Tablo 4.3: UA + $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{UOX}$ karışımına 0,1 mg/mL katalazdan farklı hacimlerde ilave edildiğinde elde edilen CUPRAC absorbansları.

Katalaz Hacmi (μL)	Absorbans
5	0,4581
10	0,2184
20	0,0993
30	0,0572
40	0,0220
50	0,0150
60	0,0148

Elde edilen sonuçlardan (Tablo 4.3) 50 μL katalaz ilavesinin UA ile immobilize UOX arasındaki reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 'i parçalamak için yeterli olduğu görülmüştür.

4.2.3. UA Kalibrasyonu

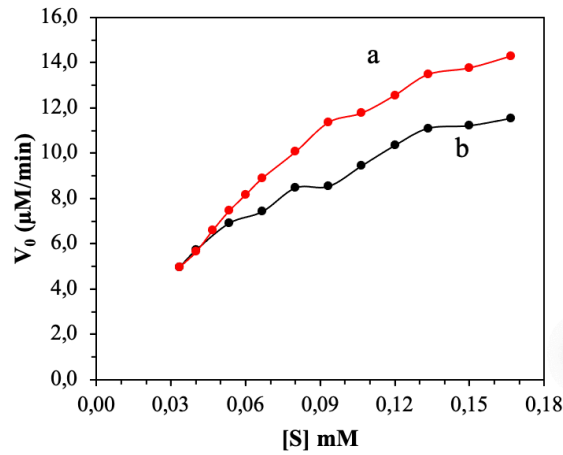
UA standardının çözeltideki son konsantrasyonu ile UOX ilave edilmeden ve immobilize UOX ile muameleden sonra okunan absorbans farkları (ΔA) arasında çizilen grafikten (Şekil 4.10) 5,43 μM ila 65,22 μM UA varlığında lineer bir ilişki görülmüştür. Dedeksiyon limiti 0,34 μM , kalibrasyon denklemi $\Delta A = 1,57 \times 10^4 C + 0,043$, belirleme katsayısı da $R^2 = 0,9975$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10: UA standardına ait kalibrasyon grafiği.

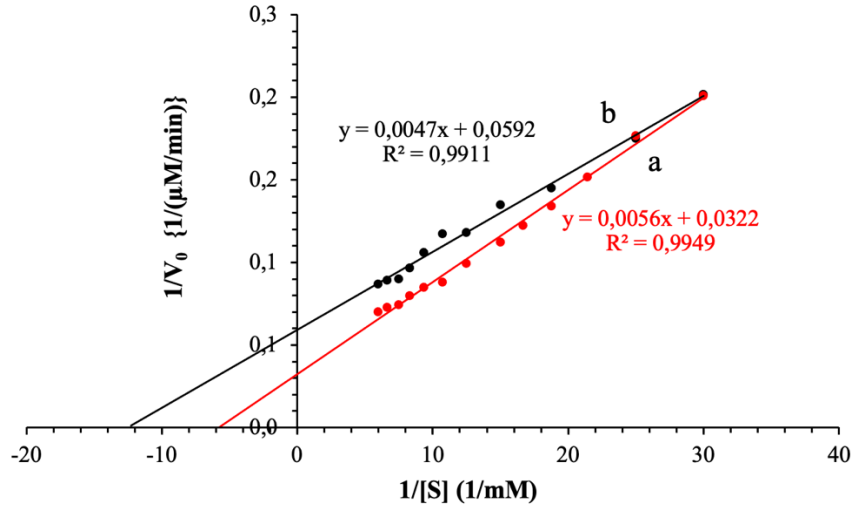
4.2.4. Serbest ve İmmobilize Enzim Kinetiğinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize enzim kullanılarak bölüm 3.6.5'de belirtildiği şekilde farklı konsantrasyonlardaki substrata karşı V_0 'ın grafiğe geçirilmesiyle elde edilen Michaelis-Menten grafikleri Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11: Serbest(a) ve immobilize(b) enzim için UA substratına ait Michaelis-Menten grafiği.

Serbest ve immobilize enzime ait Michaelis-Menten denkleminin lineerleştirilmesiyle elde edilen Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12: Serbest (a) ve immobilize enzim (b) için UA substratına ait Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 4.4: Serbest ve immobilize enzime ait kinetik parametreler.

	K_M (μM)	V_{\max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)
serbest enzim	174	31.06
immobilize enzim	79	16.89

Şekil 4.12'deki serbest enzime ait grafik denkleminde K_M ve V_{\max} değerleri sırasıyla 174 μM 31,06 ($\mu\text{M}/\text{min}$), immobilize enzime ait grafik denkleminde K_M ve V_{\max} değerleri sırasıyla 79 μM 16,89 ($\mu\text{M}/\text{min}$) olarak bulunmuştur. Immobilize enzimin K_M değeri, serbest haldeki enzimin K_M değerinden daha küçük bulunmuştur. Bir enzim küçük K_M 'ye sahipse, düşük substrat konsantrasyonunda maksimum hıza (V_{\max}) ulaşır (Tablo 4.4). K_M değerinin düşük olması substrata olan ilgisinin daha fazla olduğunu ve daha çabuk doygunluğa ulaştığını göstermektedir. Immobilize enzimin hızındaki azalma bir katı yüzeyinde esnekliğinin azalmasıyla açıklanabilmektedir.

4.2.5. Antioksidan Karışımlarında UA Tayini

Farklı konsantrasyonlarda UA içeren çözeltiliye seçilen bazı fenolik ve tiyol grubu içeren antioksidanlar eklenerek CUPRAC yöntemi doğrudan ve bölüm 3.6.6'de anlatıldığı şekilde uygulandı. Elde edilen absorbans değerlerinden hesaplanan deneysel UA konsantrasyonu ile teorik UA konsantrasyonundan hesaplanan % hata değerleri Tablo 4.5'de verilmiştir. Tablo 4.5'deki sonuçlar incelendiğinde % hata değerlerinin 0,18 ila 4,87 arasında değiştiği görülmektedir.

Tablo 4.5: UA'in fenolik ve tiyol grubu içeren antioksidanlar yanında tayini sonucunda elde edilen A_{CUPRAC} , $A_{UOX-CUPRAC}$, ΔA ve % hata değerleri.

AOX / Karışım	A_{CUPRAC}	* $A_{UOX-CUPRAC}$	ΔA	μM UA (deneysel)	μM UA (teorik)	% Hata
21.7 μM UA	0.4054	0.0003	0.4051	22.34	21.70	2.93
32.6 μM UA	0.5933	0.0108	0.5825	32.64	32.60	0.12
4.35 μM CFA	0.1738	-	-	-	-	-
6.52 μM CFA	0.2719	-	-	-	-	-
4.35 μM QR	0.2333	-	-	-	-	-
6.52 μM QR	0.3836	-	-	-	-	-
6.52 μM GA	0.2147	-	-	-	-	-
8.70 μM GA	0.3063	-	-	-	-	-
4.35 μM CAT	0.2267	-	-	-	-	-
6.52 μM CAT	0.3452	-	-	-	-	-
6.52 μM FA	0.1486	-	-	-	-	-
10.9 μM FA	0.2545	-	-	-	-	-
2.17 μM TR	0.2979	-	-	-	-	-
4.35 μM TR	0.5979	-	-	-	-	-
43.5 μM CYS	0.3098	-	-	-	-	-
43.5 μM NAC	0.3075	-	-	-	-	-
43.5 μM GSH	0.4930	-	-	-	-	-
21.7 μM UA + 4.35 μM CFA	0.5672	0.1821	0.3851	21.17	21.70	-2.43
21.7 μM UA + 6.52 μM CFA	0.6548	0.2701	0.3847	21.15	21.70	-2.53
21.7 μM UA + 4.35 μM QR	0.6601	0.2840	0.3761	20.65	21.70	-4.84
21.7 μM UA + 6.52 μM QR	0.7994	0.4010	0.3984	21.95	21.70	1.13
21.7 μM UA + 6.52 μM GA	0.6294	0.2450	0.3844	21.13	21.70	-2.61
21.7 μM UA + 8.70 μM GA	0.7252	0.3477	0.3775	20.73	21.70	-4.46
21.7 μM UA + 4.35 μM CAT	0.6444	0.2619	0.3825	21.02	21.70	-3.12
21.7 μM UA + 6.52 μM CAT	0.7705	0.3734	0.3971	21.87	21.70	0.79
32.6 μM UA + 4.35 μM CAT	0.8012	0.2467	0.5545	31.01	32.60	-4.87
32.6 μM UA + 6.52 μM CAT	0.9227	0.3655	0.5572	31.17	32.60	-4.38
21.7 μM UA + 6.52 μM FA	0.5688	0.1915	0.3773	20.72	21.70	-4.51
21.7 μM UA + 10.9 μM FA	0.6487	0.2684	0.3803	20.89	21.70	-3.71
21.7 μM UA + 2.17 μM TR	0.6965	0.3030	0.3935	21.66	21.70	-0.18

Tablo 4.5 (devam):

AOX / Karışım	A _{CUPRAC}	*A _{UOX-CUPRAC}	ΔA	μM UA (deneysel)	μM UA (teorik)	% Hata
21.7 μM UA + 4.35 μM TR	0.9832	0.5955	0.3877	21.32	21.70	-1.73
21.7 μM UA + 43.5 μM CYS	0.7290	0.3241	0.4049	22.32	21.70	2.87
32.6 μM UA + 43.5 μM CYS	0.8854	0.2969	0.5885	32.99	32.60	1.19
21.7 μM UA + 43.5 μM NAC	0.7149	0.3134	0.4015	22.13	21.70	1.96
21.7 μM UA + 43.5 μM GSH	0.9010	0.5055	0.3955	21.78	21.70	0.36

*Yalnız fenolik ve tiyol grubu içeren antioksidanlara immobilize UOX varlığında CUPRAC yöntemi uygulandığında elde edilen absorban değerleri (A_{UOX-CUPRAC}) doğrudan CUPRAC uygulanmasıyla elde edilen absorban (A_{CUPRAC}) değerleriyle neredeyse aynı olduğundan tabloda verilmemiştir.

UA'in fenolik ve tiyol grubu antioksidanlar yanında tayini dışında serum antioksidanları ile oluşturulan karışımlarda da tayini gerçekleştirilmiştir. Bunun için 5×10^{-4} M (0,1 mL) UA ile $1,0 \times 10^{-3}$ M (0,1 mL) GSH, $4,0 \times 10^{-4}$ M (0,2 mL) AA ve $1,0 \times 10^{-4}$ M (0,2 mL) bilirubin karışım çözeltisi kullanıldı. Bu çözeltilere ilk olarak doğrudan daha sonra da immobilize UOX ile muamele edildikten sonra CUPRAC yöntemi uygulandı. Elde edilen absorban değerlerinden (Tablo 4.6) hesaplanan UA konsantrasyonu ile teorik UA konsantrasyonundan hesaplanan % hata değerleri %5'in altındadır. Bu da UA'in AA, GSH, Bilirubin gibi serum antioksidanları yanında tayin edilebileceğini göstermektedir.

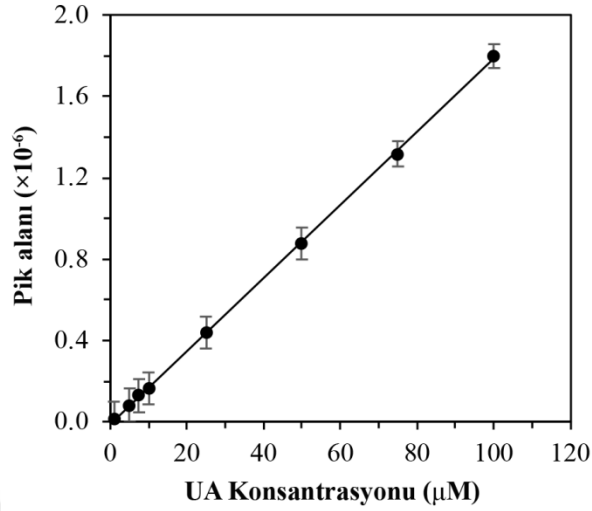
Tablo 4.6: Bazı serum antioksidanları yanında UA tayini ve %hata değerleri.

Serum AOX	A _{CUPRAC}	A _{UOX-CUPRAC}	ΔA	μM UA (deneysel)	μM UA (teorik)	% Hata
21.7 μM UA	0.4087	0.0401	0.3686	20.73	21.70	-4.47
4.35 μM Bilirubin	0.3077	-	-	-	-	-
17.4 μM AA	0.2721	-	-	-	-	-
21.7 μM GSH	0.2672	-	-	-	-	-
21.7 μM UA + 4.35 μM Bilirubin	0.6999	0.3309	0.3690	20.76	21.70	-4.35
21.7 μM UA + 4.35 μM Bilirubin + 17.4 μM AA + 21.7 μM GSH	1.2654	0.8573	0.4081	23.24	22.70	2.40

4.2.6. HPLC Yöntemi ile UA Tayini

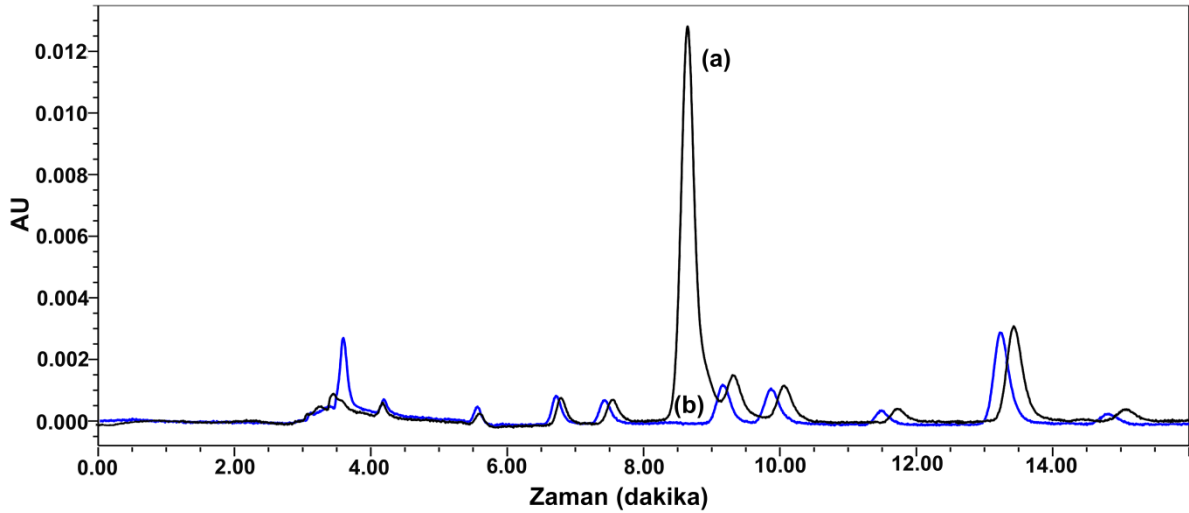
$1,0 \times 10^{-6}$ ve $1,0 \times 10^{-4}$ M arasında farklı konsantrasyonlarda UA standardı ile enjeksiyon gerçekleştirilerek bölüm 3.6.8'de anlatıldığı şekilde uygulanan yöntem sonucunda elde edilen pik alanları ve konsantrasyonlar arasında kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.13).

Grafikten elde edilen UA standardına ait kalibrasyon denklemi ve belirleme katsayısı; $A=2,0 \times 10^{10} C - 9,9 \times 10^3$, $R^2=0,9997$ dir.



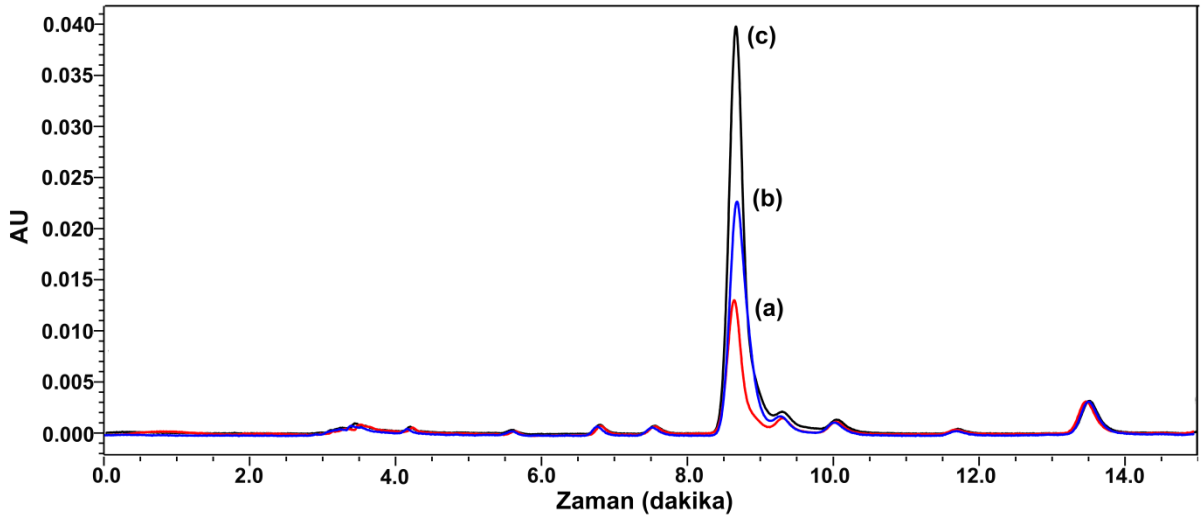
Şekil 4.13: UA standardı için HPLC yöntemine ait kalibrasyon grafiği.

Serum örneğine bölüm 3.6.8’de anlatıldığı şekilde doğrudan ve geliştirilen yöntem uygulandıktan sonra elde edilen kromatogramlar şekil 4.14’de verilmiştir. Burada immobilize UOx ilavesinden sonra (şekil 4.14 b) çözelti içerisinde UA’in tamamen parçalandığı görülmektedir.



Şekil 4.14: FBS örneğine ait kromatogram (a) doğrudan (b) immobilize UOx ile muameleden sonra.

0,5 mL FBS örneğine 10,9 µM ve 21,7 µM olacak şekilde UA standardı ilave edilerek HPLC yöntemi ve geliştirilen yöntem uygulandı. HPLC yöntemiyle elde edilen kromatogram Şekil 4.15’de gösterilmiştir.



Şekil 4.15: FBS'nin tek başına (a) ve UA katkısı sonucu elde edilen kromatogram; (b) 10,9 μM ve (c) 21,7 μM .

Tablo 4.7'deki % geri kazanım değerleri incelendiğinde geliştirilen yöntemin serum örneklerinde UA tayini için kullanılabilir olduğu görülmektedir.

Tablo 4.7: FBS'deki UA miktarı ve standart katkı sonucu bulunan geri kazanım değerleri.

Örnek	Katkı (μM)	Geliştirilen Yöntem		HPLC	
		Bulunan (μM)	% Geri kazanım*	Bulunan (μM)	% Geri kazanım*
0,5 mL FBS	-	10,42 \pm 0,9	-	10,84 \pm 0,76	-
	10,9	21,11 \pm 1,03	98,07	21,97 \pm 1,18	102,11
	21,7	31,78 \pm 1,16	98,43	33,31 \pm 1,03	103,55

*(bulunan-katkısız olarak bulunan)/ katkı*100

4.2.7. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{UOx}$ ile FBS'de TAC ve UA içermeyen TAC'nin belirlenmesi

TAC, FBS ve UA eklenmiş numunelere CUPRAC yöntemi uygulanarak AA eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır. Ayrıca, UA içermeyen TAC için, numuneler $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{UOx}$ 'ler ile muamele edildikten sonra CUPRAC yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8: FBS'de TAC ve UA'siz TAC.

Örnek	TAC (AA Ekv.) μM	UA'siz TAC (AA Ekv.) μM
0,5 mL FBS	40,19 \pm 0,5	27,20 \pm 0,8
10,9 μM UA	13,14 \pm 0,3	-
21,7 μM UA	25,38 \pm 0,2	-
0,5 mL FBS + 10,9 μM UA	51,14 \pm 0,5	27,49 \pm 0,6
0,5 mL FBS + 21,7 μM UA	62,38 \pm 0,4	27,98 \pm 0,7

4.3. GOx İMMOBİLİZASYONU VE GLUKOZ TAYİNİ

4.3.1. GOx İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi

4.3.1.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ üzerine GOx enziminin immobilizasyonunda pH'ın etkisini incelemek için 3.7.2.1'de anlatılan şekilde yöntem uygulandı. Farklı pH larda okunan absorbands değerleri Tablo 4.9'da verilmiştir.

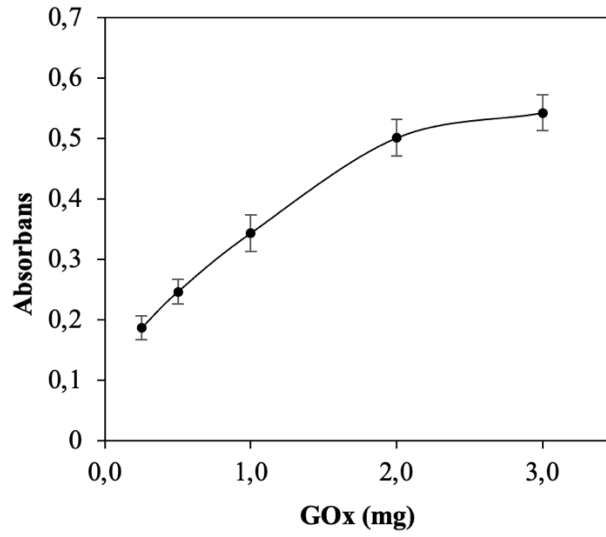
Tablo 4.9: $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ üzerine farklı pH'larda GOx immobilizasyonu sonucu uygulanan CUPRAC yöntemi absorbands değerleri.

pH	Absorbans
pH 4,0	0,2769
pH 5,0	0,4480
pH 6,0	0,4783
pH 7,0	0,5129
pH 8,0	0,5181

Elde edilen sonuçlardan pH 7,0 ve üzerinde absorbands nerdeyse sabit kaldığından GOx'ın immobilizasyonu için pH 7,0 olarak seçilmiştir.

4.3.1.2. GOx Miktarının Belirlenmesi

Bölüm 3.7.2.2.'de anlatıldığı şekilde immobilize GOx ile denemeler yapıldı. GOx immobilizasyonunda kullanılan enzim miktarı (mg) ile okunan absorbands değerleri arasında çizilen grafik Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16: Farklı miktarlarda GOx'ın $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ üzerine immobilizasyonu sonucu uygulanan CUPRAC yöntemi absorbans değerleri.

Elde edilen sonuçlardan 2,0 mg ve üzeri GOx ilavesinde absorbansın neredeyse sabit kaldığı ve daha yüksek GOx miktarlarında üst faz ile yapılan denemelerde GOx'ın Fe_3O_4 MNP üzerine tutunmadan kaldığı görülmüştür.

4.3.1.3. GOx Immobilizasyon Süresinin Belirlenmesi

0,02 g $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ üzerine GOx enziminin immobilizasyonu için gerekli optimum süreyi belirlemek için yöntem bölüm 3.7.2.3'de anlatıldığı gibi uygulandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.10: GOx'ın farklı sürelerde immobilizasyonu sonucu uygulanan CUPRAC yöntemi absorbans değerleri.

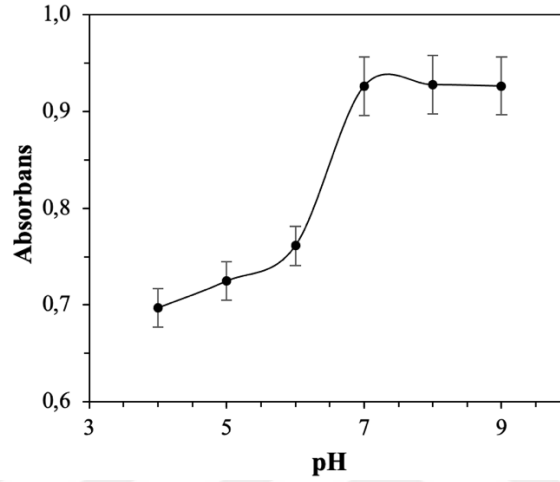
Süre	Absorbans
5 dk	0,4692
10 dk	0,4800
20 dk	0,5081
30 dk	0,5364
40 dk	0,5412
60 dk	0,5428

Farklı inkübasyon süreleri incelendiğinde 30 dakikadan sonra absorbansın neredeyse sabit kaldığı görüldüğünden analitik işlem süresini kısaltmak adına 30 dakikalık inkübasyon süresi optimum süre olarak belirlenmiştir.

4.3.2. Glukoz'un $Fe_3O_4@GOx$ ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu

4.3.2.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi

Glukozun immobilize GOx ile reaksiyonun gerçekleştiği optimum pH'ı belirlemek için bölüm 3.7.3.1'de anlatıldığı şekilde yöntem uygulandıktan sonra elde edilen sonuçlar Şekil 4.17'de verilmiştir.

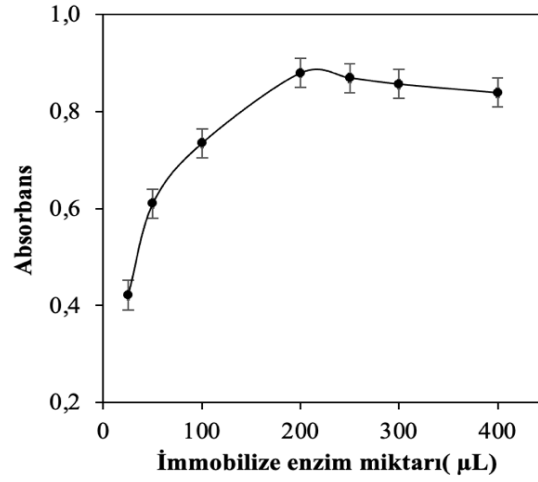


Şekil 4.17: Glukozun $Fe_3O_4@GOx$ ile farklı pH'larda reaksiyonu sonucu absorbandsa meydana gelen değişim.

Glukozun immobilize GOx ile muamelesi sonucu elde edilen absorbanda değerinden enzimin aktivitesinin pH 7,0'da maksimuma ulaştığı görüldüğünden çalışma pH'ı olarak seçilmiştir.

4.3.2.2. Optimum $Fe_3O_4@GOx$ Miktarının Belirlenmesi

Reaksiyon ortamına ilave edilecek immobilize enzim miktarını belirlemek için, 0,4 mL $1,0 \times 10^{-3}M$ glukoz, üzerine 25-400 μL arası farklı miktarlarda $Fe_3O_4@GOx$ bölüm 3.7.3.2'de anlatıldığı şekilde ilave edilip yöntem uygulandığında Şekil 4.18'deki immobilize enzim miktarı ile absorbanda arasındaki değişim grafiği elde edilmiştir.

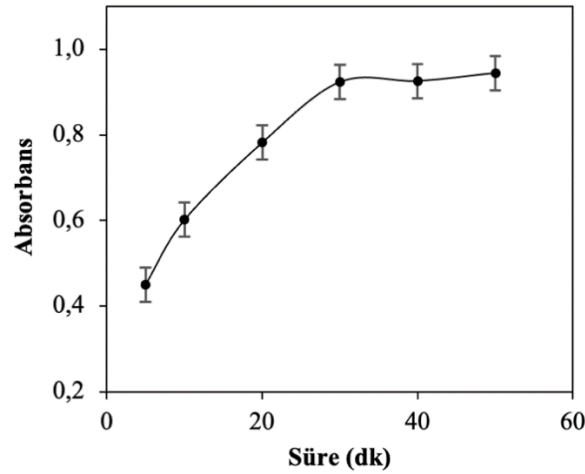


Şekil 4.18: Farklı hacimlerde $Fe_3O_4@GOx$ ilavesi ile absorbandsa meydana gelen değişim.

Elde edilen sonuçlardan ilave edilen immobilize enzim miktarı arttıkça absorbandsın arttığı görülmektedir. Glukozun tamamen parçalanması için 200 μL $Fe_3O_4@GOx$ süspansiyonunun yeterli olduğu görülmüştür.

4.3.2.3. Optimum Sürenin Belirlenmesi

Glukozun immobilize GOx ile reaksiyon süresinin belirlenmesi için yöntem bölüm 3.7.3.3'de anlatıldığı şekilde uygulandı. Süre ve okunan absorbands değerleri arasında çizilen grafik Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

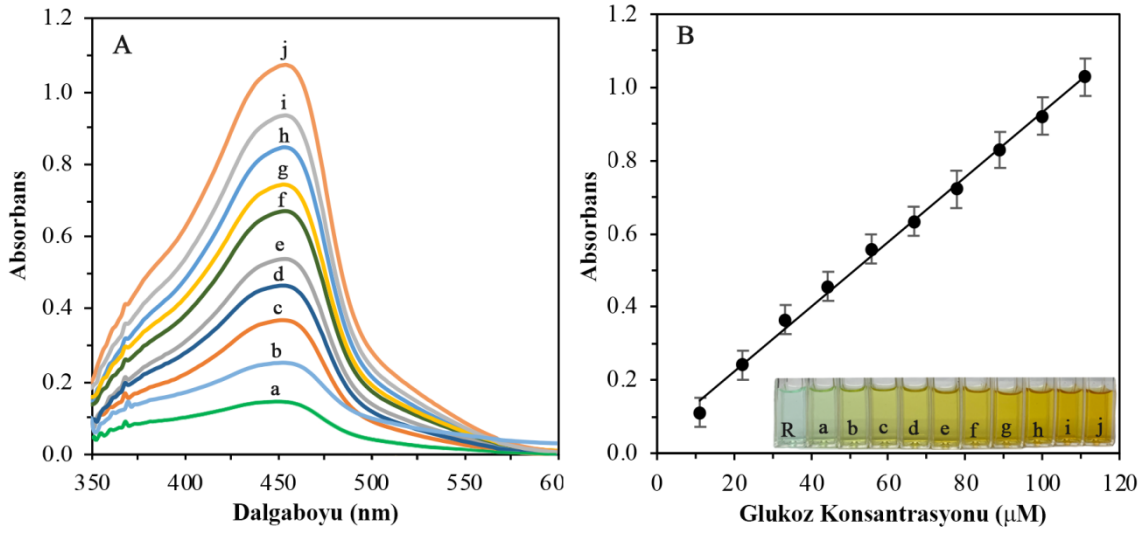


Şekil 4.19: Glukozun $Fe_3O_4@GOx$ ile farklı sürelerde inkübasyonu sonucu okunan absorbands değerleri.

Elde edilen grafikten 30 dk'ya kadar absorbandsın arttığı ve sonrasında absorbandsın neredeyse sabit kaldığı görülmektedir. Bu yüzden optimum reaksiyon süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir.

4.3.3. Glukoz Kalibrasyonu

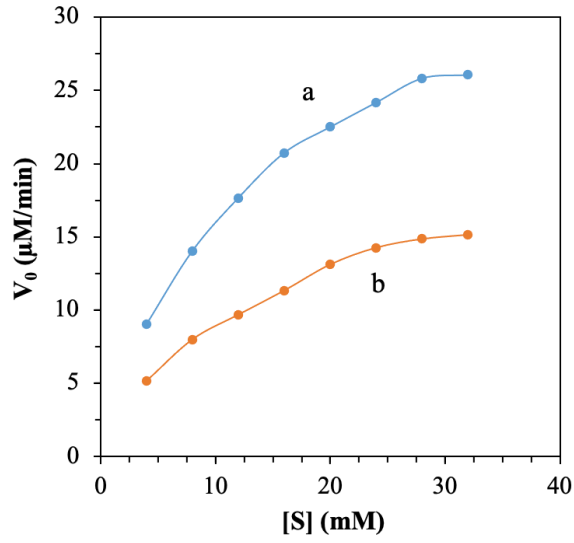
Glukoz standardının çözeltideki son konsantrasyonu ile okunan absorbans değerleri arasında çizilen grafikten (Şekil 4.20 (B)) 11,1 μM ile 111,1 μM arası lineer bir ilişki görülmüştür. Kalibrasyon denklemi $A=8,8 \times 10^3 C + 0,046$, belirleme katsayısı da $R^2=0,9968$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.20: Değişen Glukoz konsantrasyonlarında elde edilen spektrum (A) ve kalibrasyon grafiği (B). (Glukoz son konsantrasyonları (μM) a: 11.1, b: 22.2, c: 33.3, d: 44.4, e: 55.6, f: 66.7, g: 77.8, h: 88.9, i: 100.0, j: 111.1. Artan renk yoğunluğu, B'nin alt kısmında da gösterilmiştir).

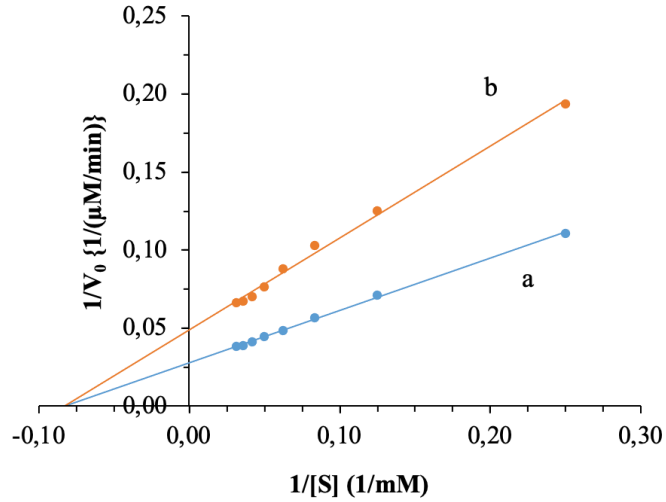
4.3.4. Serbest ve İmmobilize Enzimin Kinetiğinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize enzim kullanılarak bölüm 3.7.5'de belirtildiği şekilde farklı konsantrasyonlardaki substrata karşı V_0 'ın grafiğe geçirilmesiyle elde edilen Michaelis-Menten grafikleri Şekil 4.21'de verilmiştir.



Şekil 4.21: Serbest (a) ve immobilize (b) GOx enziminin glukoz substratına ait Michaelis-Menten Grafiği.

Serbest ve immobilize enzime ait Michaelis-Menten denkleminin lineerleştirilmesiyle elde edilen Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.22: Serbest (a) ve immobilize (b) GOx için glukoz substratına ait Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 4.11: Serbest ve İmmobilize GOx enzimine ait kinetik parametreler.

	K_M (mM)	V_{max} (μM/min)
serbest enzim	12,1	36,1
immobilize enzim	12,1	20,6

Şekil 4.22'deki serbest enzime ait grafik denkleminde ($y = 0,3359x + 0,0277$, $R^2 = 0,9988$) K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 12,1 mM ve 36,1 ($\mu\text{M}/\text{min}$), immobilize enzime ait grafik denkleminde ($y = 0,5896x + 0,0486$, $R^2 = 0,9948$) K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 12,1 mM ve 20,6 ($\mu\text{M}/\text{min}$) olarak bulunmuştur. İmmobilize enzimin K_M değeri ile serbest enzimin K_M değeri aynı bulunmuştur. Bu da immobilizasyondan sonra enzimin substrata olan ilgisinde değişme görülmediğini göstermektedir. V_{max} değerine bakıldığında ise serbest enzimle kıyaslandığında immobilize enzimin V_{max} değerinin %43 azaldığı bulunmuştur (Tablo 4.11).

4.3.5. Örnek Uygulaması

FBS örneğine geliştirilen yöntem Bölüm 3.7.6'da anlatıldığı gibi uygulandığında FBS içerisinde bulunan glukoz miktarı Tablo 4.12'de verilmiştir. Elde edilen sonuç firma tarafından FBS içeriğinde belirtilen glukoz miktarı ile uyumlu bulunmuştur.

Tablo 4.12: FBS'deki glukoz miktarı.

	Geliştirilen yöntem (mg/dL)	Firma tarafından belirtilen (mg/dL)
FBS	141,0 ± 4,2	139

FBS örneği hazırlandıktan sonra içerisinden 50 μL alınarak doğrudan ve 22,2 ile 33,3 μM glukoz katkısı yapılmış ve %geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.13'de verilmiştir.

Tablo 4.13: FBS örneğine standart katkı sonucu bulunan geri kazanım değerleri.

Örnek	Katkı (μM)	Bulunan (μM)	% Geri kazanım
50 μL FBS	-	48.5	-
	22.2	71.0	101.4
	33.3	82.2	101.2

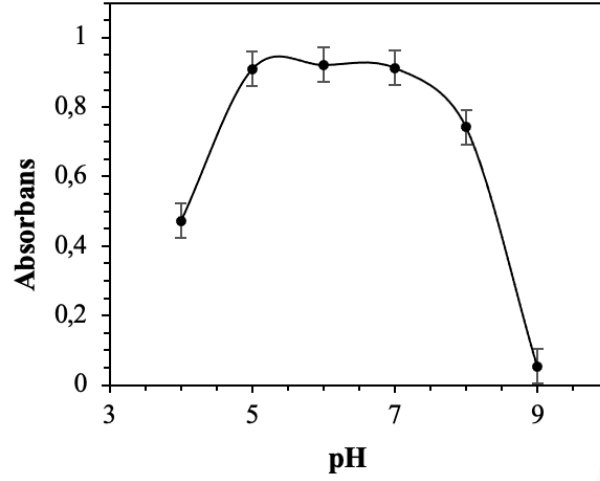
Tablo 4.13'deki sonuçlar incelendiğinde geliştirilen yöntemin serum içerisindeki bileşenlerle herhangi bir girişime neden olmaksızın serumda glukoz tayini için kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

4.4. ChOx İMMOBİLİZASYONU VE KOLİN TAYİNİ

4.4.1. Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA Üzerine ChOx İmmobilizasyon Koşullarının Belirlenmesi

4.4.1.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi

3.8.2.1'de anlatıldığı şekilde yöntem uygulanarak pH'ın immobilizasyona etkisi incelendi. pH ile okunan CUPRAC absorbansları arasında çizilen grafik Şekil 4.23'de verilmiştir.

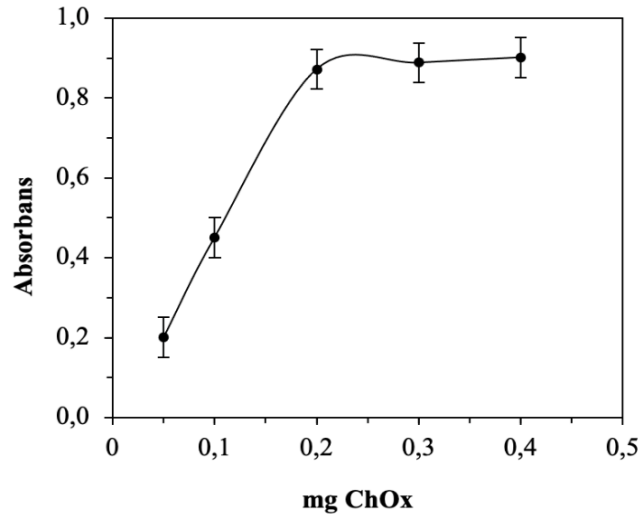


Şekil 4.23: ChOx'ın Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA üzerine immobilizasyonuna pH'ın etkisi.

Elde edilen sonuçlardan pH 6'ya kadar pH'ın artmasıyla immobilize olan enzim miktarının arttığı görülürken pH 7'den sonra immobilize olan enzim miktarının azaldığı ve pH 9'da ise ChOx'ın Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA üzerine neredeyse hiç tutunmadığı görülmüştür. Bu yüzden immobilizasyon için pH 6 olarak belirlenmiştir.

4.4.1.2. ChOx Miktarının Belirlenmesi

0,01 g Fe₃O₄/SiO₂/APTS/GLA üzerine immobilize olan ChOx miktarını belirlemek için yöntem 3.8.2.2'de anlatıldığı şekilde uygulandı.

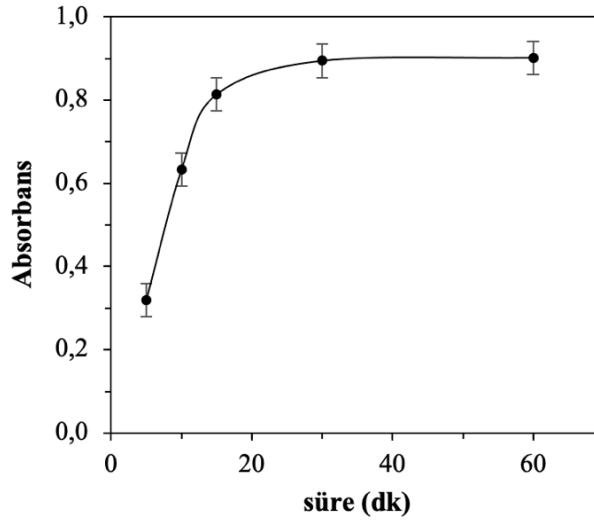


Şekil 4.24: Farklı miktarda ChOx'ın 0,01 g $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ 'e immobilizasyonunun absorbansa etkisi.

Elde edilen sonuçlardan 0,3 mg ChOx ilavesinde absorbansın maksimuma ulaştığı daha yüksek miktarlarda absorbansın değişmediği görülmektedir (Şekil 4.24). Aynı zamanda immobilizasyon sonucu üst kısımdan alınan 0,5 mL'ye de yöntem uygulanmış ve immobilize olmadan ChOx kalıp kalmadığı kontrol edilmiştir. Bunun sonucunda 0,3 mg'dan fazla ChOx ilavesinde üst kısımda $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ 'e bağlanmadan kalan enzimin fazla olması nedeniyle optimum ChOx miktarı 0,3 mg olarak belirlenmiştir.

4.4.1.3. ChOx İmmobilizasyon Süresinin Belirlenmesi

0,01 g $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ üzerine ChOx enziminin immobilizasyonu için gerekli optimum süreyi belirlemek için yöntem bölüm 3.8.2.3'de anlatıldığı gibi uygulandı. Farklı immobilizasyon süreleri ile okunan CUPRAC absorbansları arasında çizilen grafik Şekil 4.25'de verilmiştir.



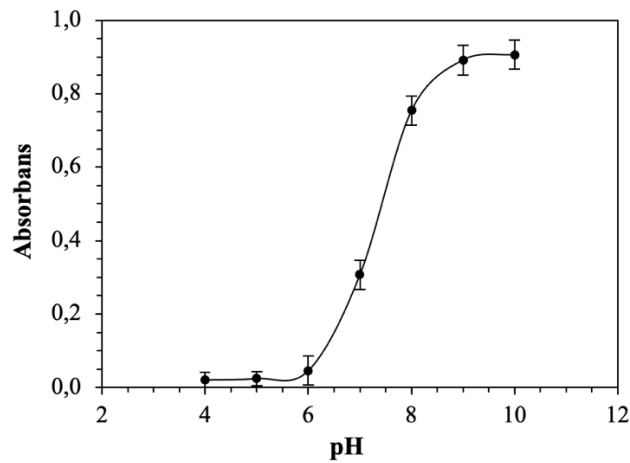
Şekil 4.25: ChOx'ın $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{APTS}/\text{GLA}$ üzerine immobilizasyonuna sürenin etkisi.

Şekil 4.25'deki grafik incelendiğinde immobilizasyonun 30. dk'ya kadar arttığı sonrasında ise önemli bir değişiklik olmadığı görüldüğünden optimum immobilizasyon süresi 30 dk olarak belirlenmiştir.

4.4.2. ChCl'nin $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ChOx}$ ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu

4.4.2.1. Optimum pH'ın Belirlenmesi

ChCl'nin immobilize ChOx ile reaksiyonun gerçekleştiği optimum pH'ı belirlemek için bölüm 3.8.3.1'de anlatıldığı şekilde yöntem uygulandıktan sonra elde edilen sonuçlardan pH ile absorbans arasında grafik (Şekil 4.26) çizilmiştir.

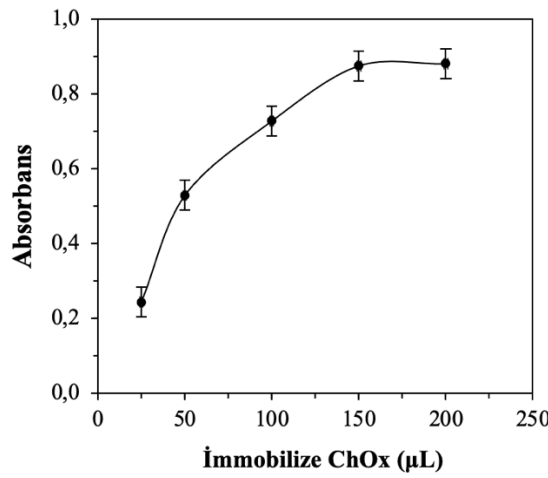


Şekil 4.26: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ChOx}$ 'ın ChCl ile farklı pH'larda reaksiyonu ile absorbansta meydana gelen değişim.

ChCl'nin farklı pH'larda immobilize ChOx ile muamelesi sonucu elde edilen absorban değerinden pH 4,0 ila 6,0 arasında reaksiyonun neredeyse hiç gerçekleşmediği görülürken enzimin aktivitesinin pH 9,0'da maksimuma ulaştığı ve sonrasında sabit kaldığı görüldüğünden çalışma pH'ı olarak pH 9,0 seçilmiştir.

4.4.3. Optimum $Fe_3O_4@ChOx$ Miktarının Belirlenmesi

ChCl üzerine ilave edilecek immobilize ChOx miktarının belirlenmesi için yöntem bölüm 3.8.3.2'de anlatıldığı şekilde uygulandı. Absorbans değerleri ve ilave edilen immobilize ChOx hacmi arasında çizilen grafik Şekil 4.27'de verilmiştir.

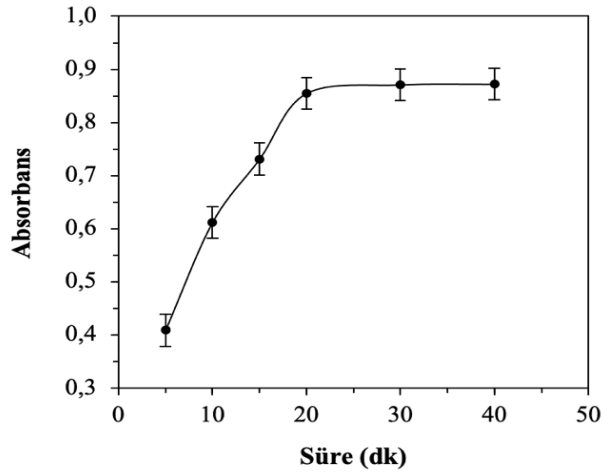


Şekil 4.27: Farklı hacimlerde $Fe_3O_4@ChOx$ ilavesi ile absorbansta meydana gelen değişim.

Elde edilen sonuçlardan ilave edilen immobilize enzim miktarı arttıkça absorbanın arttığı görülmektedir. ChCl'nin tamamen parçalanması için 150 µL $Fe_3O_4@ChOx$ süspansiyonunun yeterli olduğu görüldüğünden denemelerde 150 µL immobilize enzim kullanılmıştır.

4.4.3.1. Optimum Sürenin Belirlenmesi

ChCl'nin immobilize ChOx ile betain ve H_2O_2 'ye parçalanması için gerekli olan reaksiyon süresinin belirlenmesinde yöntem, 3.8.3.3'de anlatıldığı şekilde uygulandı. Süre ile absorban değerleri arasında çizilen grafik şekil 4.28'de verilmiştir.

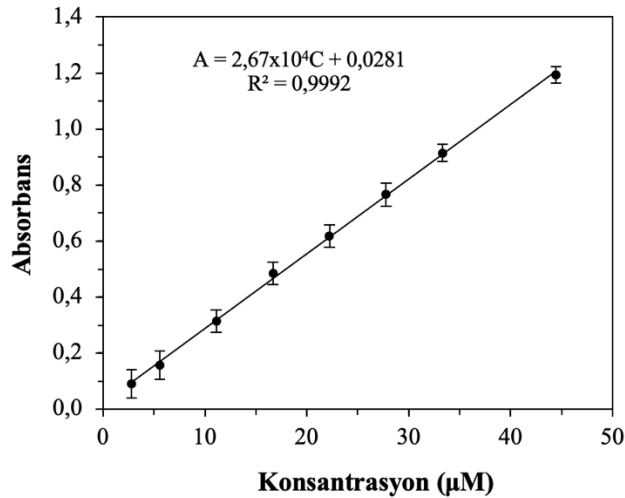


Şekil 4.28: ChCl'nin $Fe_3O_4@ChOx$ ile farklı sürelerde inkübasyonu sonucu absorbansta meydana gelen değişim.

Elde edilen grafikten 20 dk'ya kadar absorbansın arttığı ancak ChCl'nin tamamının parçalanmadığı görülürken 20. dakika ve sonrasında absorbansın neredeyse sabit kaldığı yani ChCl'nin tamamının parçalandığı görülmektedir. Bu yüzden optimum reaksiyon süresi 20 dakika olarak belirlenmiştir.

4.4.4. ChCl Kalibrasyonu

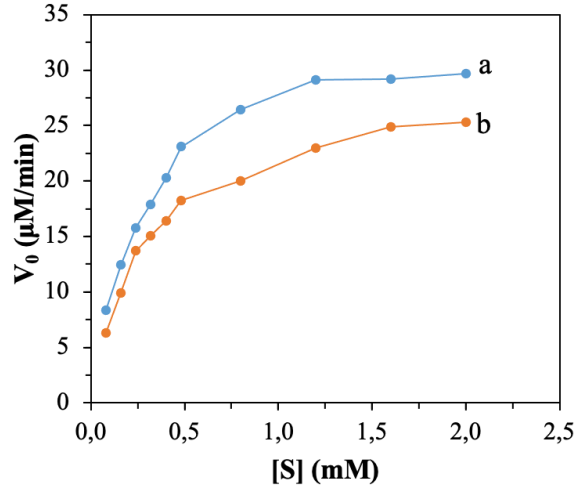
ChCl standardının çözeltideki son konsantrasyonları ile okunan absorbans değerleri arasında çizilen grafikten (Şekil 4.29) 2,78 μM ile 44,4 μM arası lineer bir ilişki görülürken LOD değeri 0,20 μM olarak bulunmuştur. Elde edilen kalibrasyon denklemi $A=2,67 \times 10^4 C + 0,0281$, belirleme katsayısı da $R^2=0,9992$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.29: ChCl standardına ait kalibrasyon grafiği.

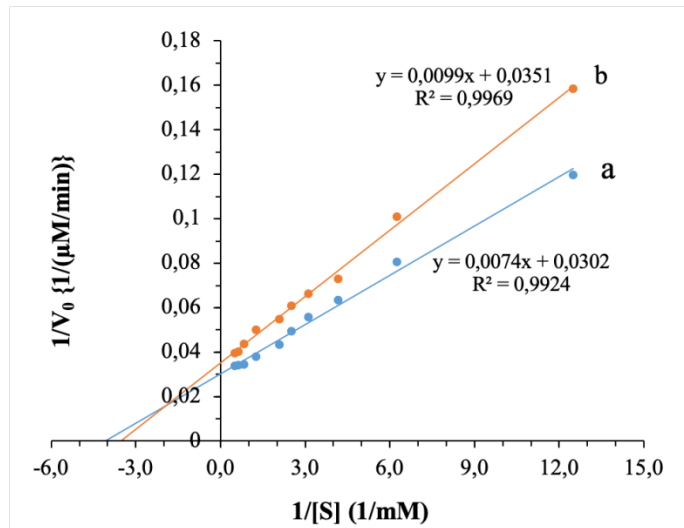
4.4.5. İmmobilize ve Serbest Enzim Kinetiğinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize enzim kullanılarak bölüm 3.8.5’de belirtildiği şekilde farklı konsantrasyonlardaki substrata karşı V_0 ’ın grafiğe geçirilmesiyle elde edilen Michaelis-Menten grafikleri Şekil 4.30’da verilmiştir.



Şekil 4.30: Serbest (a) ve immobilize (b) ChOx enziminin ChCl substratına ait Michaelis-Menten Grafiği.

Serbest ve immobilize enzime ait Michaelis-Menten denkleminin lineerleştirilmesiyle elde edilen Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.31’de verilmiştir.



Şekil 4.31: Serbest (a) ve immobilize (b) ChOx için ChCl substratına ait Lineweaver-Burk grafiği.

Şekil 4.31’deki serbest enzime ait grafik denkleminde ($y = 0,0074x + 0,0302$, $R^2 = 0,9924$) K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,28 mM ve 33,1 ($\mu\text{M}/\text{min}$), immobilize enzime ait grafik

denkleminde ($y = 0,0099x + 0,0351$, $R^2 = 0,9969$) K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,25 mM ve 28,5 ($\mu\text{M}/\text{min}$) olarak bulunmuştur. İmmobilize enzimin K_M değeri ile serbest enzimin K_M değerinin birbirine çok yakın bulunması immobilizasyondan sonra enzimin substrata olan ilgisinde önemli bir değişme olmadığını göstermektedir. Serbest enzimle kıyaslandığında hızı %14 daha düşük bulunmuştur. Bu da katı bir yüzeye bağlı olan enzimin hareketine sınırlama getirmesi nedeniyle beklenen bir durumdur.

4.4.6. Örnek Uygulaması

Bölüm 3.8.6’da anlatıldığı şekilde geliştirilen yöntem devam sütü örneğine uygulandı ve elde edilen değer firma tarafından belirtilen miktar ile uyumlu bulunmuştur. Sonuçlar Tablo 4.14’de verilmiştir.

Tablo 4.14: Devam sütündeki kolin miktarı.

	Önerilen yöntem (mg/ 100mL)	Firma tarafından belirtilen (mg/100 mL)
Devam sütü	16,1 ± 0,5	15

Devam sütü örneği hazırlandıktan sonra içerisinden 50 μL alınarak doğrudan ve 11,1 – 16,7 – 22,2 μM ChCl katkısı yapılmış ve %geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.15’de verilmiştir.

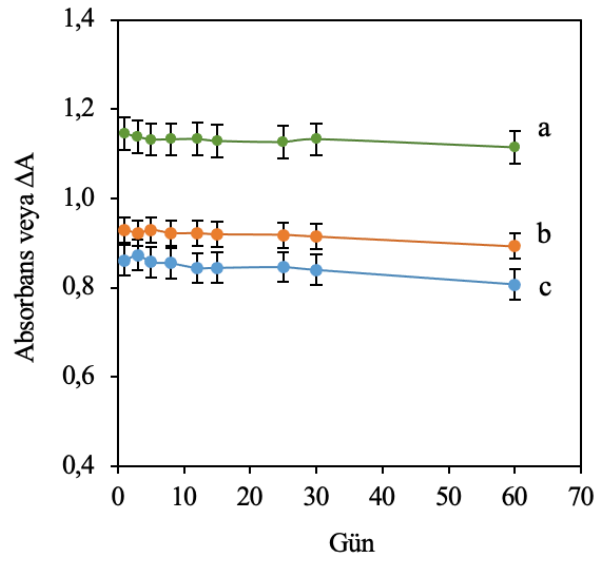
Tablo 4.15: Devam sütüne standart katkı sonucu bulunan geri kazanım değerleri.

Örnek	Katkı (μM)	Bulunan (μM)	% Geri kazanım
50 μL devam sütü	-	9,7	-
	11,1	21,5	106,3
	16,7	27,2	104,8
	22,2	32,9	104,5

Tablo 4.15’de verilen sonuçlar incelendiğinde %104 ila %106 geri kazanımla kolin tayinin gerçekleştirilebildiği görülmüştür.

4.5. İMMOBİLİZE ENZİMLERİN STABİLİTESİ VE TEKRAR KULLANILABİLİRLİĞİ

Literatürde enzimatik özelliklere sahip nanopartiküller (nanozimler) doğal enzimlere alternatif olarak gösterilmiştir. Nanozimler, doğal enzimler için daha ucuz alternatifler olmalarına rağmen, seçicilik açısından doğal enzimlerle karşılaştırılmazlar. Aynı enzimin birkaç kez kullanılması maliyetleri önemli ölçüde azaltabilir. Bu nokta dikkate alınarak, MNP'ler üzerine immobilize edilen enzimin stabilitesi, tekrar kullanılabilirliği gün içi tekrarlanabilirliği ve günler arası tekrar üretilebilirliği Bölüm 3.9'da açıklandığı gibi uygulanarak belirlenmiştir.



Şekil 4.32: İmmobilize enzimler kullanılarak 65,2 μM UA (a), 100 μM glukoz (b) ve 33.3 μM ChCl (c) varlığında farklı zamanlarda okunan absorbans (veya UA için ΔA) değerleri.

4°C'de saklanan immobilize enzimlerin stabilitesini incelemek için farklı zamanlarda sabit konsantrasyonda substratlar kullanılarak yöntem uygulanmıştır. 60 gün sonra UA, Glu ve ChCl için absorbans (veya UA için ΔA) değerlerinde sırasıyla %3, %4 ve %6 'lık bir azalma meydana gelmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.32'de verilmiştir.

İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliğini incelemek için her bir substrat için Tablo 4.16'de belirtildiği şekilde iki farklı konsantrasyonu için yöntem uygulandı. Elde edilen sonuçlar, immobilize enzimler ile %10'un altında bağıl standart sapma (%RSD) ile en az beş kez kullanılabilirliğini göstermiştir. Seyreltik analitler için % RSD değerleri daha düşük bulunurken aynı zamanda yeniden kullanılabilirliğin 5 kereden daha fazla olabileceği görülmüştür.

Tablo 4.16: Aynı immobilize enzimlerin beş kez art arda kullanılmasıyla uygulanan yöntem sonucunda elde edilen CUPRAC absorbanans değerleri.

Yeniden kullanım sayısı	Farklı UA konsantrasyonları için ölçülen ACUPRAC		Farklı Glukoz konsantrasyonları için ölçülen ACUPRAC		Farklı ChCl konsantrasyonları için ölçülen ACUPRAC	
	32,6 µM UA	65,2 µM UA	33,3 µM Glu	88,9 µM Glu	11,1 µM ChCl	33,3 µM ChCl
1	0,0212	0,0300	0,3423	0,8284	0,3296	0,9688
2	0,0238	0,0477	0,3412	0,8246	0,3281	0,9595
3	0,0250	0,0533	0,3408	0,8220	0,3194	0,9417
4	0,0250	0,0849	0,3383	0,8097	0,3068	0,8917
5	0,0252	0,1073	0,3257	0,7879	0,3016	0,8681

Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik deneyleri sonucunda UA, Glu ve ChCl için % RSD değerleri sırasıyla 3,12; 4,61 ve 3,84, gün içi sonuçlar ise aynı sırayla 3,61; 5,32 ve 4,28.

5. TARTIŞMA

Biyosensörler, enzimler, DNA ve antikolar gibi biyomoleküller için tanıma bölgelerine sahiptir. Bu yüzden farklı hastalıkların teşhisinde belirteç olarak kullanılabilen biyomoleküllerin seçici ve hassas tayinine imkan verirler. Farklı biyotanıma unsurları arasında enzimler, tayin edilen analite benzersiz bir seçicilik sunar. Son yıllarda keşfedilen nanozimler, düşük özgüllükleri ve turn-over oranları nedeniyle enzimlerle zorlukla rekabet edebilir. Ancak enzimlerin stabilitesi zayıftır ve *in vitro* çalışmalarda kullanımları ve ayrılmaları sırasında karşılaşılan komplikasyonlar kullanımlarını kısıtlamakta ve maliyeti artırmaktadır. Bu yüzden enzimlerin katı destekler üzerine sabitlenmesi bu dezavantajların üstesinden gelinmesine yardımcı olmaktadır (Nemiwal ve diğ., 2022). Ancak immobilize enzimlerin reaksiyon ortamından ayrılması amacıyla yapılan santrifüjleme işlemi, NP'lerin küçük boyutlarından dolayı sorunlara neden olabilmektedir (Liu ve diğ., 2018). Ayırma için kullanılacak farklı katı destekler arasında, MNP'ler, harici bir manyetik alan vasıtasıyla kolayca ayrılmalarına imkan verdiği için özel bir yere sahiptir. Kolay ayrılmalarına ek olarak, MNP'ler aynı zamanda yüksek spesifik yüzey alanı (Bilal ve diğ., 2018) ve problemleri bağlamak için elektrostatik yetenek gibi başka avantajlara da sahiptir, böylece Fe₃O₄ MNP'ler enzim immobilizasyonu için uygun katı destek materyali haline gelir (Liu ve diğ. 2018).

Bu tez çalışmasında, üç oksidaz substratı olan biyolojik olarak önemli bileşiklerden UA, glukoz ve ChCl'ün tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla UOx, GOx ve ChOx'ın Fe₃O₄ manyetik nanopartikül üzerine immobilizasyonu sağlanmıştır. Bunun için ilk olarak FeCl₃.6H₂O ve FeSO₄.7H₂O kullanılarak birlikte çöktürme yöntemiyle Fe₃O₄ MNP'ler sentezlenmiştir. Yalın Fe₃O₄ MNP'ler, atmosferik havada kolayca oksitlenerek manyetik özelliklerini ve disperse edilebilirliklerini kaybedebilirler. Bu yüzden yüzeyleri işlevselleştirilerek MNP'lerin kararlılıkları iyileştirilebilmektedir. Silika, süper paramanyetik çekirdeğin agregasyonunu önleyerek stabiliteyi arttıran ve toksisiteyi minimum seviyeye indirdiği bilinen bir kaplama malzemesidir. Ayrıca silika tabakası, organosilan bileşikleriyle kolayca reaksiyona girebilen enzimler ile etkin bir şekilde bağlanan zengin silanol grupları sağlamaktadır (Thangaraj ve diğ, 2019). Sentezlenen Fe₃O₄ nanopartiküller nötralleşinceye kadar yıkanıp kurutulduktan sonra buradan alınan MNPlerin yüzeyi silika ile kaplanmıştır.

Ardından APTS kullanılarak $-NH_2$ fonksiyonize hale getirilen nanopartiküller GLA ile aktive edildikten sonra immobilize edilecek enzim ile belirlenen uygun pH ortamında ve sürede inkübe edilmiştir. Sonrasında hazırlanan immobilize enzimler kullanılarak kolorimetrik olarak substratlarının tayinleri gerçekleştirilmiştir. Kolorimetrik biyosensörler, işlem kolaylığı, hızlı tepki vermeleri ve cihazlarının nispeten düşük maliyeti nedeniyle diğer yöntemler arasında özel bir öneme sahiptir. Ayrıca oluşan renkli ürün çıplak gözle dahi gözlenebilmektedir (Liang ve diğ., 2013). Bununla birlikte, özellikle biyolojik numuneler gibi karmaşık matrislerde, kolorimetrik yöntemleri olumsuz yönde etkileyebilecek çok fazla girişim olabilir. Bu bağlamda, enzim kullanımı seçiciliği arttırmaktadır. Literatürdeki diğer birçok çalışmanın aksine tez çalışmasında sunulan enzimatik kolorimetrik yöntemde HRP gibi bir H_2O_2 aktivatörü gerektirmeksizin CUPRAC reaktifi kullanılarak net stokiometrik reaksiyonla H_2O_2 'yi O_2 'ye oksitlemek için kromojenik ajan olarak kullanılmış, böylece Beer Kanunu'na uyulması sağlanmıştır.

Tezin ilk kısmında tayini gerçekleştirilen UA, insanlarda pürin metabolizmasının nihai ürünüdür, ksantin oksidaz enzimi ile birkaç adımda ksantinden oluşur ve idrarla atılır. UA, insan plazmasında bulunan önemli bir antioksidandır ve plazmadaki serbest radikal temizleme kapasitesinin \sim %60'ını sağlamaktadır. UA'nın antioksidan etkisi terapötik etkileri olabileceğini düşündürse de yüksek serum UA konsantrasyonu oksidatif stres ile ilişkilendirilen obezite, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıkların gelişimi ile ilişkilendirilmektedir (Fabbrini ve diğ., 2014; Sautin ve Johnson, 2008). Ürik asit, diğer oksidanlarla reaksiyonlarda radikaller oluşturarak bir pro-oksidan haline gelebilir ve bu radikaller, diğer hücresel bileşenlerden ziyade baskın olarak lipidleri (LDL ve membranlar) hedef almaktadır. Aynı zamanda, lipidlerin oluşturduğu hidrofobik ortam ürik asidin antioksidan etkileri için elverişsizdir ve oksitlenmiş lipidler ürik asidi bir oksidana dönüştürebilmektedir (Sautin ve Johnson, 2008). Bu yüzden serumda UA içermeyen toplam antioksidan kapasitenin tayini de gerçek antioksidan kapasiteyi göstermesi açısından önemlidir. Geliştirilen yöntemde CUPRAC yöntemi kullanıldığından doğrudan uygulanan yöntem ile immobilize UOx ile muameleden sonra uygulanan absorban arasındaki farktan UA miktarı tayin edilebildiği gibi immobilize UOx ile muameleden sonra elde edilen absorbandan UA içermeyen antioksidan kapasite de belirlenebilmektedir.

Klinik analizde UA'yı belirlemek için kullanılan geleneksel yöntemler, ultraviyole spektrofotometri ile doğrudan izlemeye veya üratin ürikaz enzimi ile allantoin, CO_2 ve H_2O_2 'e

enzimatik dönüşümünün birleştirilmesine dayanır. Buna alternatif bir yöntem ise, fosfotungstik asidin UA tarafından tungsten mavisine indirgenmesine dayanmaktadır. Ancak, bu yöntemler pahalı ve kararsız reaktifler gerektirir ve ayrıca biyolojik sıvılardaki dopamin ve askorbik asit gibi diğer girişim yapan bileşenlerin uzaklaştırılması için karmaşık örnek hazırlama adımları gerektirir. UA'yı saptamak için kullanılan kromatografik yöntemlerin büyük çoğunluğunda en önemli sorun, analizden önce serum örneklerinin deproteinizasyonuna olan ihtiyaç olup, çoklu reaksiyon adımları, çeşitli numune hazırlama adımları, pahalı ekipman, operasyonel maliyetler ve toksik atık üretebilmek gibi dezavantajları bulunmaktadır (Göçenoğlu Sarıkaya ve diğ, 2017).

Çalışmanın birinci kısmında ilk olarak UOx enzimini immobilize etmek için pH, süre ve enzim miktarı optimize edilmiştir. Belirlenen optimum koşullar olan pH 8,5 ortamında 0,5 mg UOx varlığında 5 saatlik bir inkübasyon süresi sonucunda bağlanmadan kalmış olabilecek enzimi uzaklaştırmak için MNP'ler harici bir manyetik alan ile toplanıp üst kısım dekante edilerek yıkanmıştır. $Fe_3O_4@UOx$ su ile disperse edilerek kullanılmıştır. Buradan alınan immobilize enzim antioksidan kapasite tayini için kullanılan CUPRAC yöntemiyle UA'in tayini için kullanılmıştır. Bunun için, ilk olarak CUPRAC yöntemi doğrudan uygulanmış ardından UA tayini yapılacak örnek içerisine immobilize enzim ilave edilip 15 dakikalık inkübasyon sonucunda immobilize enzim uzaklaştırılarak CUPRAC yöntemi uygulanmıştır. Aradaki absorbans azalmasından örnekteki UA konsantrasyonu hesaplanmıştır. Yöntemde UA için lineer aralık $5,43 \mu M - 65,2 \mu M$ iken LOD değeri $0,34 \mu M$ olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemle hem GA, CFA, QR, CAT, FA gibi fenolik antioksidanlar yanında hem de bilirubin, AA, GSH gibi çeşitli serum antioksidanları yanında UA'in tayini %5'in altında hata ile gerçekleştirilmiştir. FBS örneğindeki UA miktarı hem geliştirilen yöntemle hem de George ve diğ. (2006) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek HPLC yöntemiyle tayin edilmiştir. FBS'deki UA miktarı bulunmuş ve standart katkı yapılarak %geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. $10,9 \mu M$ ve $21,7 \mu M$ UA katkısı için geri kazanım değerleri geliştirilen yöntemle sırasıyla %98,07 ile %98,43 olarak bulunurken HPLC yönteminde geri kazanım değerleri %102,11 ve %103,55 olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemle aynı zamanda UA'siz TAC belirlenmiştir. Bunun için 0,5 mL FBS ve UA katkılı örneklere CUPRAC yöntemi uygulanarak TAC AA eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır. Ayrıca UA içermeyen TAC için örnekler $Fe_3O_4@UOx$ ile muamele edildikten sonra CUPRAC uygulanmıştır. Buradan UA içermeyen TAC belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında tayini gerçekleştirilen glukoz, hem gıda endüstrisi hem de biyokimya için önemli bir bileşiktir. Kan şekerinin hassas ve doğru ölçümü, komplikasyonlarını en aza indirmek için diyabet hastalığını teşhis etmeye ve yönetmeye yardımcı olmaktadır (Cash ve diğ., 2010). Literatürde glukoz tayini ile ilgili olarak, kolorimetrik, florometrik, kemilüminesans ve elektrokimyasal yöntemler mevcuttur ve yakın zamanda nanosensing teknolojileriyle tamamlanmıştır (Wang ve diğ., 2022). Günümüzde hala etkili olan glukozun enzimatik olarak belirlenmesi fikri 1960'ların başlarına kadar uzanmaktadır (Hjelm ve diğ., 1963; Washko ve diğ., 1961).

Sentezlenen manyetik nanopartikül üzerine GOx immobilizasyonu pH 7,0 fosfat tamponlu ortamda 0,02 g Fe₃O₄/SiO₂/APTS kullanılarak 2 mg GOx ile 30 dakikalık belirlenen optimum koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan immobilize enzimler kullanılarak CUPRAC yöntemiyle glukoz tayini gerçekleştirilmiştir. Glukoz, nötral koşullarda CUPRAC reaktif bir bileşik değildir. Ancak GOx katalizli reaksiyon sonucu açığa çıkan H₂O₂ CUPRAC reaktif olduğundan glukozun tayininde kullanılmıştır. Bunun için glukoz standardı veya tayini yapılacak örnek çözeltisi içerisine pH 7,0 NH₄Ac'lı ortamda 200 µL immobilize enzim ilave edilerek 30 dk karıştırma işleminin ardından mıknatıs yardımıyla immobilize enzimler uzaklaştırılıp inkübasyon çözeltisi CUPRAC reaktifi çözeltisi içerisine koyulmuştur. Okunan absorbans değerlerinin 11,1 µM ila 111,1 µM arası lineer olduğu görülmüştür. Kalibrasyon denklemi $A=8,8 \times 10^3 C + 0,046$, belirleme katsayısı da $R^2=0,9968$ olarak bulunmuştur.

İmmobilize enzim ile serbest enzimin kinetiğini karşılaştırmak için enzim katalizli reaksiyon sonucu oluşan H₂O₂'in peroksidaz, 4-aminoantipirin ve fenol varlığında kırmızı kinonimin boyası oluşturmasından yararlanılmıştır. İmmobilize ve serbest enzim için çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinden K_M değerleri hesaplanmış ve her iki enzim için de aynı bulunduğu immobilizasyon sonucu substrata ilgisinde bir düşüş görülmemiştir. Hızında ise immobilizasyon sonrası %43'lük bir azalma görülmüştür. Geliştirilen yöntemle FBS örneğinde glukoz tayini gerçekleştirilmiştir. Firma tarafından belirtilen değer 139 mg/dL iken geliştirilen yöntem ile 141,0 mg/dL olarak bulunmuştur. FBS içerisine glukoz katkısı yapıldığında %101.2 ve %101.4 geri kazanım ile serum içerisindeki bileşenlerin girişimine neden olmadan tayin edilebildiği görülmüştür.

Tezde tayini gerçekleştirilen üçüncü analit olan kolin, yalnızca memelilerdeki ana fizyolojik bileşenlerden biri değil, aynı zamanda nörotransmitter asetilkolin sentezine katılımı nedeniyle

günlük alımı şiddetle tavsiye edilen temel bir besin maddesidir (Rahimi ve Joseph, 2019). Özellikle besin alımının tek bir kaynakla sınırlı olduğu bebekler için, kolin takviyesi kritik öneme sahip olabilir. Anne sütüyle beslenen çocuklar için kolin, büyümeye ve beyin gelişimine yardımcı olması için anne kanından süte taşınır. Mama ile beslenen çocuklarda ise bu alımı eşleştirmek için kolin, birçok bebek mamasında gerekli bir katkı maddesidir. Yenidoğanların gelişimi ve sağlığı oldukça önemli olduğundan, gıdalarda kolin tayini için doğru analitik yöntemler gereklidir.

Sentezlenen manyetik nanopartikül üzerine ChOx immobilizasyonu, pH 6,0 asetat tamponlu ortamda 0,01 g $Fe_3O_4/SiO_2/APTS$ kullanılarak 0,3 mg ChOx ile 30 dakikalık belirlenen optimum koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan immobilize enzimler kullanılarak CUPRAC yöntemiyle kolin tayini gerçekleştirilmiştir. Kolin, CUPRAC reaktif bir bileşik değildir. Ancak ChOx katalizli reaksiyon sonucu açığa çıkan H_2O_2 kolinin tayininde kullanılmıştır. Bunun için ChCl veya tayini yapılacak örnek çözeltisi içerisine pH 9,0 NH_3/NH_4Cl 'lü ortamda 150 μL immobilize enzim ilave edilerek 20 dk karıştırma işleminin ardından mıknatıs yardımıyla immobilize enzimler uzaklaştırılıp inkübasyon çözeltisi CUPRAC reaktifi çözeltisi içerisine koyulmuştur. Okunan absorbans değerlerinin 2,78 μM ile 44,4 μM arası lineer olduğu görülmüştür. Kalibrasyon denklemi $A=2,67 \times 10^4 C + 0,0281$, belirleme katsayısı da $R^2=0,9992$ olarak bulunmuştur.

İmmobilize enzim ile serbest enzimin kinetiğini karşılaştırmak için GOx enzim kinetiğinin incelenmesinde kullanılan yöntem kullanılmıştır. İmmobilize ve serbest enzim için çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinden K_M değerleri hesaplanmış serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 0,28 mM ve 0,25 mM olarak bulunduğundan immobilizasyon sonucu substrata ilgisinde bir düşüş görülmemiştir. Hızında ise immobilizasyon sonrası %14'lük bir azalma görülmüştür.

Geliştirilen yöntemle devam sütünde kolin tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar firma tarafından belirtilen değer ile uyumlu bulunmuştur. Ayrıca devam sütü içerisine farklı miktarlarda kolin katkısı yapılmış ve %104,5 – %106,3 geri kazanımla kolinin tayini gerçekleştirilmiştir. Her üç immobilize enzimin stabilitesi incelendiğinde 60 gün sonunda UA, Glu ve ChCl için absorbans (veya UA için ΔA) değerlerinde sırasıyla %3, %4 ve %6 'lık bir azalma ile tayinlerin gerçekleştirilebildiği görülmüştür. İmmobilize enzimlerin tekrar

kullanılabilirlikleri incelendiğinde ise %10'un altında %RSD ile en az beş kere kullanılabilirliği görülmüştür.

Glu, ChCl ve UA'nın belirlenmesi için kullanılan benzer bir mekanizmaya sahip diğer literatür çalışmalarının bulguları, Tablo 5.1'de gösterilmiştir.

Tablo 5.1: Geliştirilen yöntemin LOD ve lineer aralıklarının benzer literatür yöntemleriyle karşılaştırılması.

Substrat	Kullanılan teknik	Mekanizma	Lineer aralık (μM)	LOD (μM)	Ref.
Glukoz	Kolorimetri	Fe_3O_4 MNP'ler, ABTS ile enzimatik olarak üretilen H_2O_2 arasındaki reaksiyonu katalize etmiştir.	5-100	3,0	Wei ve Wang, 2008
	Kolorimetri	ZnFe_2O_4 MNP'lerin peroksidaz benzeri aktivitesi. Enzimatik olarak üretilen H_2O_2 TMB'i renklendirmek için ZnFe_2O_4 ler ile reaksiyona sokulmuştur.	1,25-18,75	0,3	Su ve diğ., 2012
	Kolorimetri ve akıllı telefon uygulaması	HRP-GOx enzimleri ile birleştirilmiş poli(anilin-co-antranilik asit) (ANI-co-AA) kompozit film kullanılarak biyosensör geliştirilmiştir.	25-200 (iki kalibrasyon eğrisi)	27,7 (akıllı tlf uygulaması-49,4)	Hosu ve diğ., 2019
	Kolorimetri (akıllı telefon uygulaması)	GOx- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ hibrit mikroçiçekler, Glu ve TMB ile reaksiyona girerek renkli bir ürün üretmiştir.	1,0-1000	0,3	Zhang ve diğ., 2022
	Kolorimetri	Yükseltgenmiş pirogallol ve PEI arasında Schiff bazı ve/veya Michael katılma reaksiyonları yoluyla çapraz bağlı kaplamalar oluşturularak GOx immobilize edilmiştir.	22,2- 6250	22,2	Sunoqrot ve diğ., 2021
	CUPRAC Kolorimetri	GOx immobilize MNP'ler ve Glu arasındaki reaksiyon ile enzimatik olarak üretilen H_2O_2 CUPRAC yöntemi ile belirlenmiştir.	11,1 – 111,1	0,59	Bu çalışma
	Kolin	Kolorimetri	ChOx ile Ch'den oluşturulan H_2O_2 , DNAzim varlığında renksiz ABTS'yi yeşil ABTS ⁺ 'ye dönüştürmüştür.	0,1–25	0,022
Kolorimetri		MoS_2 nanotabakalarının H_2O_2 varlığında TMB'in oksidasyonunu katalize etmesinden yararlanılmıştır.	1-180	0,4	Nirala ve diğ., 2018

Tablo 5.1 (devam):

Substrat	Kullanılan teknik	Mekanizma	Lineer aralık (μM)	LOD (μM)	Ref.
Kolin	CUPRAC Kolorimetri	ChOx immobilize MNP'ler ve ChCl arasındaki reaksiyon ile enzimatik olarak üretilen H_2O_2 CUPRAC yöntemi ile belirlenmiştir.	2,78 – 44,4	0,2	Bu çalışma
Ürik asit	Kolorimetri	Bir şişe üzerine immobilize edilmiş UOx ile 4-aminofenazon, p-hidroksibenzoik asit ve HRP'den oluşan bir renk reaktifi kullanılmıştır.	10-1200	10	Chauhan ve diğ., 2014
	Kolorimetri	4-aminoantipirin varlığında bakır nanozime gömülü UOx'in peroksidaz benzeri aktivitesi	1–50	0,6	Chi ve diğ., 2022
	Kolorimetri	Enzimatik olarak üretilen H_2O_2 varlığında ultra küçük CuS NP'lerin TMB'ye karşı peroksidaz benzeri aktivitesi	1-100	0,1	Wang ve diğ., 2018
	Kolorimetri	BSA ile stabilize edilmiş Au nanokümlerinin (Au NC'ler) peroksidaz mimetik aktivitesi; enzimatik olarak üretilen H_2O_2 , BSA-Au NC'lerin varlığında TMB ile reaksiyona sokulmuştur.	2,0–200	0,36	Zhao ve diğ., 2012
	Kolorimetri (akıllı telefon uygulaması)	Poli(vinil alkol) bazlı mikroıgnelere gömülü UOx ile peroksidaz benzeri aktiviteye sahip polipirol nanopartiküller ve TMB kullanılarak giyilebilir sensör geliştirilmiştir.	200-1000	65	Zhang ve diğ., 2022
	CUPRAC Kolorimetri	UOx immobilize MNP'ler ve UA arasındaki reaksiyon ile enzimatik olarak üretilen H_2O_2 CUPRAC yöntemi ile belirlenmiştir.	5,43-65,22	0,34	Bu çalışma

Tablodaki literatürde yer alan kolorimetrik çalışmalar incelendiğinde çoğunun TMB ve ABTS ile gerçekleştirildiği görülmektedir. Bunlar da HRP gibi ilave bir enzim veya peroksidaz aktivitesine sahip bir katalizöre ihtiyaç duymaktadır. Yapılan çalışmada ise CUPRAC yöntemi kullanıldığından bir H_2O_2 aktivatörü gerektirmeden net bir stokiyometri ile reaksiyon gerçekleşmektedir. Ayrıca yapılan çalışmada immobilize enzimlerin kullanılması, enzimlerin birden çok kullanılmasına imkan verdiğiinden literatürdeki spektrofotometrik UA, glukoz ve Ch tayinlerine üstünlük sağlamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan tez çalışmasında, üç farklı doğal oksidaz enzimi; GOx, ChOx ve UOx, MNP'lere ayrı ayrı immobilize edilip ilgili enzim substratlarını (sırasıyla Glu, ChCl ve UA) belirlemek için enzimatik-kolorimetrik bir yöntem geliştirilmiştir. İncelenen her üç madde de biyoloji, insan sağlığı ve gıda endüstrisi için oldukça önemlidir. Biyolojik enzimler, substratları için benzersiz bir seçiciliğe sahiptir ve bu özellikleri, karmaşık matrislerde substratlarının belirlenmesine izin verir. Enzim benzeri aktivitelere (nanozimler olarak da bilinir) sahip bazı nanopartiküller, doğal enzimler için ekonomik alternatifler olarak sunulsa da nanozimler, düşük substrat seçicilikleri ve dönüşüm oranları açısından biyolojik enzimlerle etkili bir şekilde rekabet edemezler. Genel olarak, enzimlerin katı bir destek üzerinde immobilizasyonu, onları tekrar kullanılabilir hale getirmekte ve maliyeti düşürmektedir. Bu çalışmada, GOx, ChOx ve UOx, MNP'lere kovalent olarak bağlanmış, böylece tekrarlanan kullanımlarda enzim kaybı en aza indirilmiştir. Genel anlamda, geliştirilen yöntem enzimatik olarak üretilen H₂O₂'nin CUPRAC kolorimetrik yöntemiyle belirlenmesine dayanmaktadır. Burada açık mavi renkli CUPRAC reaktifi, Cu(II)-Nc kompleksi, güçlü yük transferi absorpsiyonu gösteren kararlı sarı/turuncu renkli Cu(I)-Nc kelatına indirgenmektedir. Reaksiyon mekanizması, net bir stokiyometri ile basit bir elektron transferini içermektedir, çünkü Cu(II)-Nc, bir H₂O₂ aktivatörü gerektirmeden hidrojen peroksidi moleküler oksijene dönüştürebilen nadir oksidanlardan biridir ve bu 2e⁻ oksidasyonu, indirgenmiş bakır-neokuproin kelatının absorpsiyonu okunarak dolaylı biçimde H₂O₂ için yüksek bir molar absorptivite sağlamaktadır. Diğer taraftan, H₂O₂ yoluyla enzimatik kolorimetrik tayinler için yapılan çalışmaların çoğu, bir katalizör varlığında TMB, ABTS ve 4-AAP gibi kromojenik bir peroksidaz substratının oksidasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca bazen bu katalizör HRP gibi başka bir enzimdir ve analizlerde enzim inhibisyonu riskini de beraberinde getirir. Çoğunlukla nanozimlerin kullanıldığı bu tür reaksiyonlar, çoğu zaman stokiyometrik olmayan şekilde yürüyebilmektedir, çünkü katalitik belirleme sırasında TMB benzeri peroksidaz substratlarını oksitleyen H₂O₂ çeşitli reaktif oksijen türlerine (ROS) ayrışabilir, aynı zamanda oluşan ürünler H₂O₂ ile redoks döngüsüne girebilmektedir. Bu olgular, peroksidaz substratları üzerinden yapılan hidrojen peroksit tayinlerinin stokiyometrisini karmaşık kılar. Buna karşılık, bu çalışmada kullanılan basit redoks reaksiyonu tek ürün oluşumuna (yani Cu(I)-Nc)

bağlı olduğundan çok daha az karmaşık ve daha net stokiyometrilidir. Tek ürün oluşumu da Beer kanununa mükemmel bir şekilde uymaktadır, çünkü çoklu ürün oluşumuyla ortaya çıkan Beer kanunundan kimyasal sapmalar en az düzeye inmektedir. Aynı zamanda, CUPRAC yöntemi başlangıçta TAC tayini için geliştirildiğinden, bir diğer önemli parametre olan UA'sız TAC de aynı yöntem kullanılarak belirlenebilmiştir. Ek olarak, immobilizasyondan sonra, immobilizasyon ile enzim afinitesinin azalma olasılığı kinetik deneylerle araştırılmıştır. Kinetik çalışmalar sayesinde serbest ve immobilize enzimlerin afiniteleri karşılaştırılmış ve immobilizasyondan sonra enzimlerin substratlarına afinitesinde hiçbir değişiklik olmadığı (veya çok az) sonucuna varılmıştır. Ancak immobilize enzimler için belirlenen V_{max} değerleri, serbest enzimler için hesaplananlara göre, muhtemelen aktif bölgelerin erişilebilirlik kısıtından dolayı düşüş göstermiştir. Son olarak geliştirilen yöntem, kompleks matrise sahip gerçek numunelerde Glu, Ch ve UA tayini için uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, sağlam analizlerle desteklenen ve biyolojik sıvılarda seçiciliği yüksek olan oksidaz enzim-substrat reaksiyonlarını araştıran daha ileri biyokimyasal çalışmaların yolunu açabilir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, R., Tripathy, N., Jang, N. K., Khang, G., Hahn, Y.-B. 2015, Fabrication of highly sensitive uric acid biosensor based on directly grown ZnO nanosheets on electrode surface. *Sensors Actuators B: Chem.* 206, 146–151.
- Ali, S. M. U., Alvi, N.H., Ibupoto, Z., Nur, O., Willander, M., Danielsson, B., 2011, Selective potentiometric determination of uric acid with uricase immobilized on ZnO nanowires, *Sensors and Actuators B*, 152, 241–247.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7970–7981.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., Altun, M., 2005, Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method, *Free Radical Research*, 39 (9), 949-961.
- Apak, R., 2017, *Electron transfer-based antioxidant capacity assays and the cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay*, In: Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications, Apak, R., Capanoglu, E., Shahidi F. (Eds.), Chapter 4, John Wiley & Sons Ltd., UK, 57-75.
- Azmi, N. E., Ramli, N. I., Abdullah, J., Hamid, M. A. A., Sidek, H., Abd Rahman, S., Ariffin, N., Yusof, N. A., 2015, A simple and sensitive fluorescence based biosensor for the determination of uric acid using H₂O₂-sensitive quantum dots/dual enzymes. *Biosens. Bioelectron.* 67, 129–133.
- Bektaşoğlu, B., Çelik, S. E., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2006, Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 1194–1200.
- Benelmekki, M., 2015, Designing Hybrid Nanoparticles, *Morgan & Claypool Publishers*, 1-14.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Biochemistry, 2002, 5th Edition, The Michaelis-Menten model accounts for the kinetic properties of many enzymes.
- Beveridge, J. S., Stephens J. R., Williams, M. E., 2011, The use of magnetic nanoparticles in analytical chemistry, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 4, 251–73.
- Bhargava, A. K., Lal, H., Pundir, C. S., 1999, Discrete analysis of serum uric acid with immobilized uricase and peroxidase, *J. Biochem. Biophys. Methods* , 39 (3), 125–136.

- Bilal, M., Zhao, Y., Rasheed, T., Iqbal, H. M. N., 2018, Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. *Int. J. Biol. Macromol.*, 120, 2530–2544.
- Brena, B., González-Pombo, P., Batista-Viera, F., 2013, *Immobilization of Enzymes: A Literature Survey*, In: Immobilization of Enzymes and Cells, Guisan J. M. (ed.), Chapter 2, Springer Science+Business Media, New York, 15-31.
- Cash, K. J.; Clark, H. A., 2010, Nanosensors and nanomaterials for monitoring glucose in diabetes. *Trends Mol. Med.*, 16 (12), 584–593.
- Chang Q., Deng K., Zhu L., Jiang G., Yu C, Tang H., 2009, Determination of hydrogen peroxide with the aid of peroxidase-like Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as the catalyst, *Microchim Acta*, 165, 299–305.
- Chauhan, N., Kumar, A., Pundir, C. S., 2014, Construction of an uricase nanoparticles modified Au electrode for amperometric determination of uric acid, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 174, 1683–1694.
- Chauhan, N., Pundir, C. S., 2011, An amperometric uric acid biosensor based on multiwalled carbon nanotube–gold nanoparticle composite, *Analytical Biochemistry*, 413, 97–103.
- Chauhan, N.; Preeti; Pinky; Pundir, C. S., 2014, Covalent immobilization of uricase inside a plastic vial for uric acid determination in serum and urine. *Anal. Sci.*, 30 (4), 501–506.
- Chen, C., Xie, Q., Yang, D., Xiao, H., Fu, Y., Tan, Y., Yao, S., 2013, Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review, *RSC Advances*, 3, 4473–4491.
- Chen, M., Zeng, G., Xu, P., Lai, C., Tang, L., 2017, How do enzymes ‘meet’ nanoparticles and nanomaterials?, *Trends in Biochemical Sciences*, 42 (11), 914-930.
- Chi, X., Cheng, Q., Yang, K., Geng, X., Liang, Y., Tao, J., Wang, Z., 2022, Fabrication of a novel nano-biosensor for efficient colorimetric determination of uric acid. *Appl. Nanosci.*, 12 (7), 2255–2264.
- Czauderna, M., Kowalczyk, J., 2000, Quantification of allantoin, uric acid, xanthine and hypoxanthine in ovine urine by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection, *Journal of Chromatography B*, 744, 129–138.
- Dai, X., Fang, X., Zhang, C., Xu, R., Xu, B., 2007, Determination of serum uric acid using high-performance liquid chromatography (HPLC)/isotope dilution mass spectrometry (ID-MS) as a candidate reference method, *Journal of Chromatography B*, 857, 287–295.
- Domagk, G.F., Schlicke, H.H., 1968, A colorimetric method using uricase and peroxidase for the determination of uric acid, *Analytical Biochemistry*, 22, 219-224.
- Fabbrini E., Serafini M., Baric I. C., Hazen, S. L., Klein S., 2014, Effect of plasma uric acid on antioxidant capacity, oxidative stress, and insulin sensitivity in obese subjects, *Diabetes*, 63, 976–981.

- George, S.K., Dipu, M.T., Mehra, U.R., Singh, P., Verma, A.K., Ramgaokar, J.S., 2006, Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine, *Journal of Chromatography B*, 832, 134–137.
- Ghazanfari, M. R., Kashefi, M., Shams, S. F., Jaafari, M. R., 2016, Perspective of Fe₃O₄ nanoparticles role in biomedical applications, *Biochemistry Research International*, 2016, Article ID 7840161.
- Glantzounis, G.K., Tsimoyiannis, E.C., Kappas, A.M., Galaris D.A., 2005, Uric Acid and Oxidative Stress, *Current Pharmaceutical Design*, 11, 4145-4151.
- Göçenoğlu Sarıkaya, A., Osman, B., Çam, T., Denizli A., 2017, Molecularly imprinted surface plasmon resonance (SPR) sensor for uric acid determination, *Sensors and Actuators B*, 251, 763–772.
- Hefni, M., McEntyre, C., Lever, M., Slow, S., 2015, A Simple HPLC method with fluorescence detection for choline quantification in foods, *Food Anal. Methods*, 8, 2401–2408.
- Hjelm, M., Verdier, C. H. D., 1963, A Methodological study of the enzymatic determination of glucose in blood, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 15 (4), 415–428.
- Holmes-McNary, M. Q., Cheng, W. L., Mar, M. H., Fussell, S., Zeisel, S. H., 1996, Choline and choline esters in human and rat milk and in infant formulas, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 64, 572–576.
- Horikoshi, S., Serpone, N., 2013, *Introduction to Nanoparticles*. In: *Microwaves in Nanoparticle Synthesis*, Horikoshi, S., Serpone, N. (Eds.), Chapter 1, Wiley VCH., 1–24.
- Hosu, O., Lettieri, M., Papara, N., Ravalli, A., Sandulescu, R., Cristea, C., Marrazza, G., 2019, Colorimetric multienzymatic smart sensors for hydrogen peroxide, glucose and catechol screening analysis, *Talanta*, 204, 525-532.
- Huang, Y., Ren, J., Qu, X., 2019, Nanozymes: classification, catalytic mechanisms, activity regulation, and applications, *Chem. Rev.* 119, 4357–4412.
- Jafarzadeh, M., Soleimani, E., Norouzi, P., Adnan, R., Sepahvand, H., 2015, Preparation of trifluoroacetic acid-immobilized Fe₃O₄@SiO₂-APTES nanocatalyst for synthesis of quinolines, *Journal of Fluorine Chemistry*, 178, 219–224.
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., Danquah, M. K., 2018, Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9, 1050–1074.
- Jin, D., Seo, M. H., Huy, B. T., Pham, Q. T., Conte, M. L., Thangadurai, D., Lee, Y. I., 2016, Quantitative determination of uric acid using CdTe nanoparticles as Fluorescence probes. *Biosens. Bioelectron.*, 77, 359–365.

- Kudr, J., Haddad, Y., Richtera, L., Heger, Z., Cernak, M., Adam, V., Zitka, O., 2017, Magnetic nanoparticles: from design and synthesis to real world applications, *Nanomaterials*, 7, 243.
- Langer, J.J., Filipiak, M., Kęcińska, J., Jasnowska J., Włodarczak J., Buładowski, B., 2004, Polyaniline biosensor for choline determination, *Surface Science*, 573, 140–145.
- Liang, M., Fan, K., Pan, Y., Jiang, H., Wang, F., Yang, D., Lu, D., Feng, J., Zhao, J., Yang, L., Yan, X., 2013, Fe₃O₄ magnetic nanoparticle peroxidase mimetic-based colorimetric assay for the rapid detection of organophosphorus pesticide and nerve agent. *Anal. Chem.*, 85 (1), 308–312.
- Liu, D. M., Chen, J., Shi, Y. P., 2018, Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends Anal. Chem.* 102, 332–342.
- Majidi, S., Sehrig, F. Z., Farkhani, S. M., Goloujeh, M. S., Akbarzadeh, A., 2016, Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44: 722–734.
- Martin, C.R., Mitchell, D.T., 1998, Peer Reviewed: Nanomaterials in Analytical Chemistry, *Analytical Chemistry News & Features*, 70, 9, 322A-327A.
- Mirzabe, G. H., Keshtkar, A.R., 2015, Application of response surface methodology for thorium adsorption on PVA/Fe₃O₄/SiO₂/APTES nanohybrid adsorbent, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 26, 277–285.
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., Wahab, R. A., 2015, An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29 (2), 205-220.
- Nemiwal, M., Zhang, T. C., Kumar, D. 2022, Enzyme immobilized nanomaterials as electrochemical biosensors for detection of biomolecules. *Enzyme Microb. Technol.* 156, 110006.
- Nikzad, N., Karami, Z., 2018, Label-free colorimetric sensor for sensitive detection of choline based on DNAzyme-choline oxidase coupling, *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 1241–1248.
- Nirala, N. R., Vinita, Prakash, R., 2018, Quick colorimetric determination of choline in milk and serum based on the use of MoS₂ nanosheets as a highly active enzyme mimetic, *Microchimica Acta*, 185, 224.
- Özyürek M., Bektaşoğlu B., Güçlü K., Güngör N., Apak R., 2008, Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone–water solution containing 2% methyl-β-cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method, *Analytica Chimica Acta*, 630, 28–39.
- Panfili, G., Manzi, P., Compagnone, D., Scarciglia, L., Palleschi, G., 2000, Rapid Assay of Choline in Foods Using Microwave Hydrolysis and a Choline Biosensor, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3403–3407.

- Phillips, M. M., 2012, Analytical approaches to determination of total choline in foods and dietary supplements, *Anal. Bioanal. Chem.*, 403, 2103–2112.
- Pisoschi, A. M., 2012, Glucose Determination by Biosensors, *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 1-6.
- Rahimi, P., Joseph, Y., 2019, Enzyme-Based Biosensors for choline analysis: A review. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 110, 367–374.
- Ramasami, P., Jhaumeer-Laulloo, S., Rondeau, P., Cadet, F., Seepujak, H., Seeruttun A., 2004, Quantification of sugars in soft drinks and fruit juices by density, refractometry, infrared spectroscopy and statistical methods, *S. Afr. J. Chem.*, 57, 24–27.
- Robinson, P. K., 2015, Enzymes: principles and biotechnological applications, *Essays Biochem.*, 59, 1–41.
- Rossi, L. M., Quach, A. D., Rosenzweig, Z., 2004, Glucose oxidase–magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing, *Anal Bioanal Chem*, 380, 606–613.
- Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. 1968, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.*, 26 (1), 62–69.
- Su, L., Feng, J., Zhou, X., Ren, C., Li, H., Chen, X., 2012, Colorimetric detection of urine glucose based ZnFe₂O₄ magnetic nanoparticles, *Analytical Chemistry*, 84, 5753–5758.
- Sunoqrot, S., Al-Hadid, A., Manasrah, A., Khnouf, R., Ibrahim, L. H., 2021, Immobilization of glucose oxidase on bioinspired polyphenol coatings as a high-throughput glucose assay platform, *RSC Advances*, 11,39582.
- Thangaraj, B., Jia, Z., Dai, L., Liu, D., Du, W., 2019, Effect of silica coating on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for lipase immobilization and their application for biodiesel production, *Arabian Journal of Chemistry*, 12, 4694-4706.
- Trivedi, R.C., Rebar, L., Berta, E., Stong, L., 1978, New enzymatic method for serum uric acid at 500 nm, *Clinical Chemistry*, 24, 1908-1911.
- Trotta, F., A. Mele, 2019, Nanosponges: Synthesis and Applications, First Edition, Wiley-VCH
- Wallyn, J., Anton, N., Vandamme, T. F., 2019, Synthesis, Principles, and Properties of Magnetite Nanoparticles for In Vivo Imaging Applications—A Review, *Pharmaceutics*, 11, 601.
- Wang, T.-T.; Huang, X.-F.; Huang, H.; Luo, P.; Qing, L.-S. 2022, Nanomaterial-based optical- and electrochemical-biosensors for urine glucose detection: A Comprehensive review. *Adv. Sens. Energy Mater*, 1 (3), 100016.

- Wang, X., Tang, C.L, Liu, J. J., Zhang, H. Z., Wang, J., 2018, Ultra-small CuS nanoparticles as peroxidase mimetics for sensitive and colorimetric detection of uric acid in human serum, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 46(5), e1825–e1831.
- Wang, X.; Yao, Q.; Tang, X. M.; Zhong, H. P.; Qiu, P.; Wang, X. L., 2019, A Highly Selective and Sensitive Colorimetric Detection of Uric Acid in Human Serum Based on MoS₂-Catalyzed Oxidation TMB. *Anal. Bioanal. Chem.* 411, 943–952.
- Washko, M. E.; Rice, E. W., 1961, Determination of glucose by an improved enzymatic procedure, *Clin. Chem.* 7, 542–545.
- Wei, H., Wang, E., 2008, Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles as Peroxidase Mimetics and Their Applications in H₂O₂ and Glucose Detection, *Analytical Chemistry*, 80, 2250-2254.
- Zhang, Y., Zhang, Y., Yang, C., Ma, C., Zhang, M., Tang, J., 2022, Facile Immobilization of glucose oxidase with Cu₃(PO₄)₂·3H₂O for glucose biosensing via smartphone. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 210, 112259.
- Zhang, P., Wu X., Xue H., Wang, Y., Luo, X., Wang, L., 2022, Wearable transdermal colorimetric microneedle patch for Uric acid monitoring based on peroxidase-like polypyrrole nanoparticles, *Analytica Chimica Acta*, 1212, 339911.
- Zhang, Z., Wang, X., Yang, X., 2011, A sensitive choline biosensor using Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as peroxidase mimics, *Analyst*, 136, 4960.
- Zhao, H., Wang, Z., Jiao, X., Zhang, L., Lv, Y., 2012, Uricase-Based Highly Sensitive and Selective Spectrophotometric Determination of Uric Acid Using BSA-Stabilized Au Nanoclusters as Artificial Enzyme, *Spectroscopy Letters*, 45, 511–519.
- Zhao, Y., Yang, X., Lu, W., Liao, H., Liao, F., 2009, Uricase based methods for determination of uric acid in serum, *Microchim Acta*, 164:1–6.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

Aslı Neslihan Avan

ORJİNALLİK RAPORU

% 11	% 8	% 2	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 2
3	Submitted to Çankırı Karatekin University Öğrenci Ödevi	% 1
4	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	% 1
5	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
6	dspace.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to CSU, San Jose State University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	libratez.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

- Etik Kurul izni gerekmektedir.
- Etik Kurul izni gerekmemektedir.

Aslı Neslihan AVAN
(İmza)



KURUM İZİNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

- Kurum izni gerekmektedir.
- Kurum izni gerekmemektedir.

Aslı Neslihan AVAN
(İmza)

