

**KREATİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR
HAZIRLANMASI**

Süleyman ÇALIŞKAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Aralık 2012
ANKARA**

Süleyman ÇALIŞKAN tarafından hazırlanan “KREATİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Servet ÇETE
Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

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

Yrd. Doç. Dr. Bekir Sıtkı ÇEVİRİMLİ
Kimya Teknolojileri Bölümü, Gazi Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Servet ÇETE
Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Ahmet YAŞAR
Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

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

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Süleyman ÇALIŞKAN

KREATİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR AMPEROMETRİK BİYOSENSÖR**HAZIRLANMASI****(Yüksek Lisans Tezi)****Süleyman ÇALIŞKAN****GAZİ ÜNİVERSİTESİ****FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****Aralık 2012****ÖZET**

Bu çalışmada, kreatin tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Bu amaçla, platin levha üzerinde pirolün polivinilsülfonatlı ortamda elektropolimerleşmesi ile polipirol-polivinilsülfonat filmi hazırlandı. Kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimleri, polipirol-polivinilsülfonat film üzerine glutaraldehit ile çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edildi. Kreatin tayini, hazırlanan biyosensörün yüzeyinde gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksitin 0,4 V 'da yükseltgenmesine dayanarak yapıldı. Kreatin biyosensörün cevabına pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu, enzim oranı ve enzim miktarının etkisi araştırıldı. Biyosensörün kreatin için doğrusal çalışma aralığı tayin edildi. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü belirlendi. Hazırlanan biyosensörle biyolojik sıvıda (kan) kreatin tayini yapıldı. Biyolojik ortamlarda olabilecek girişimlerin biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.

Bilim Kodu : 201.1.020**Anahtar Kelimeler : Kreatin, kreatinaz, sarkozin oksidaz, biyosensör, polivinilsülfonat, polipirol, biyolojik sıvı****Sayfa adedi : 97****Tez yöneticisi :Yrd. Doç. Dr. Servet ÇETE**

**THE PREPARATION OF A NEW AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR
DETERMINATION OF CREATINE**

(M. Sc. Thesis)

Süleyman ÇALIŞKAN

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
December 2012**

ABSTRACT

In this study, a new amperometric biosensor for determination of creatine was developed. For this reason, polypyrrole-polyvinylsulphonat films have been prepared on the platinum electrode by the electropolymerization of pyrrole was carried out in the presence of polyvinylsulphonate. Creatinase and sarcosine oxidase enzymes have been immobilized on polypyrrole-polyvinylsulphonat film crosslinking method via glutaraldehyde. Creatine detection is based on the oxidation of hydrogen peroxide at 0,4 V produced by the enzymatic reaction on the biosensor surface. The effect of creatine biosensor response of pH, temperature, substrate concentration, enzyme ratio and enzyme amount were investigated. The linear working range of biosensor for creatine was determined. Reproducibility and storage stability were determined of the biosensor. Determination of creatine was carried out in biological fluid (in blood) by biosensor. interference effects were investigated on the amperometric response of the biosensor.

Science Code : 201.1.020

Key Words : Creatine, creatinase, sarcosine oxidase, biosensor, polyvinylsulphonate, polypyrrole, biological fluid

Page Number : 97

Adviser : Assist. Prof. Dr. Servet ÇETE

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince benden bilimsel ve manevi desteğini hiç esirgemeyen, her türlü imkanı bana sağlayan saygıdeğer danışmanım Yrd.Doç.Dr. Servet ÇETE'ye gösterdiği sabır ve iyi niyeti için çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bilgisi ve tecrübesi ile desteğini esirgemeyen çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Ahmet YAŞAR'a ; hiçbir yardımı benden esirgemeyen sadece tez değil her konuda çok büyük destek gördüğüm sayın hocam Doç. Dr. Fatma ARSLAN'a ; sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi her zaman beni destekleyen, yanımda olan sevgili dostlarıma ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Enzimler	5
2.1.1. Enzimlerin yapısı ve özellikleri.....	6
2.1.2. Enzimatik reaksiyon hızını etkileyen faktörler.....	7
2.1.3. Kreatinaz enziminin özellikleri	8
2.1.4. Sarkozin oksidaz enziminin özellikleri	8
2.2. Biyosensörler.....	9
2.2.1. Biyobileşenler	12
2.2.2. Dönüştürücüler (Transduserler).....	12
2.2.3. Biyosensör hazırlanmasında dikkat edilmesi gerekenler	13
2.2.4. Biyosensörde kullanılan biyoaktif yapılar	13
2.2.5. Sensör ve biyosensörlerin uygulama alanları	13
2.3. İletken Polimerlerle Dönüştürücü Hazırlanması.....	15

Sayfa

2.3.1. İletken polimerler	15
2.4. Elektrokimyasal Polimerizasyon	17
2.4.1. Pirl��n elektrokimyasal polimerizasyonu	18
2.5. İletken Polimerlerle Enzim İmmobilizasyonu	19
2.5.1. Biyobileşen immobilizasyonu	20
2.5.2. Enzim immobilizasyon metotları	20
2.6. Enzim Sensörleri	30
2.6.1. Genel ��alı��ma ilkesi	31
2.6.2. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması	32
2.6.3. Amperometrik enzim elektrotlar	33
2.6.4. Enzim sensörlerinin performans faktörleri.....	37
2.7. Kaynak Ara��tması	39
3. DENEYSEL KISIM.....	49
3.1. Cihazlar ve Malzemeler	49
3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı	49
3.1.2. Hücre ve elektrotlar.....	49
3.1.3. pH metre	50
3.1.4. Su banyosu.....	50
3.1.5. Mikro pipet	50
3.1.6. Argon gazı	50
3.1.7. Saf su.....	50

Sayfa

3.1.8. SEM cihazı.....	50
3.1.9. AFM cihazı.....	51
3.1.10. FTIR cihazı.....	51
3.1.11. Temas açısı cihazı	51
3.1.12. Elipsometre cihazı (Film kalınlığının ölçülmesi)	51
3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri	51
3.2.1. Kullanılan çözeltiler.....	52
3.3. Platin yüzeye Polipirol-polivinilsülfonat (PPy-PVS) Kaplanması.....	54
3.3.1. Pt/PPy-PVS film elektrodun SEM analizi	56
3.3.2. Pt/PPy-PVS film elektrodun AFM analizi.....	56
3.3.3. Pt/PPy-PVS film elektrodun temas açısı analizi	56
3.3.4. Pt/PPy-PVS film elektrodun film kalınlığı ölçülmesi	56
3.3.5. Pt/PPy-PVS film elektrodun FTIR analizi	56
3.4. Platin/Polipirol-polivinilsülfonat(Pt/PPy-PVS) Elektrodunun Hidrojen Peroksite Duyarlılığının Belirlenmesi.....	56
3.5. Platin/Polipirol-polivinilsülfonat(Pt/PPy-PVS) Elektrodunun Serbest Enzimin Bulunduğu Çözeltide Kreatine Duyarlılığının Belirlenmesi....	57
3.6. Tutuklama Yöntemi ile Pt/PPy-PVS-CI-SO Biyosensörünün Hazırlanması	57
3.7. Çapraz Bağlama Yöntemi ile Pt/PPy-PVS-CI-SO Biyosensörünün Hazırlanması	58
3.8. Pt/PPy-PVS-CI-SO Biyosensöründe Cevap Akımları Üzerine Enzim Oranlarının Etkisi	58
3.9. Pt/PPy-PVS-CI-SO Biyosensöründe Cevap Akımları Üzerine Enzim Miktarlarının Etkisi	59
3.9.1. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün SEM analizi	59

Sayfa

3.9.2. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün AFM analizi	59
3.9.3. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün temas açısı analizi	59
3.9.4. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün film kalınlığı ölçülmesi ..	60
3.9.5. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün FTIR analizi	60
3.10. Biyosensörün Kreatine Duyarlılığının Belirlenmesi	60
3.11. Biyosensörün En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi	60
3.11.1. pH'nın etkisi	61
3.11.2. Sıcaklığın etkisi	61
3.11.3. Substrat derişiminin etkisi	62
3.11.4. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi	62
3.11.5. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi	63
3.12. Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler	63
3.13. Biyolojik Sıvıda (Kanda) Kreatin Tayini	66
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	68
4.1. Hazırlanan Pt/PPy-PVS Film Elektrodunun Hidrojen Peroksit Duyarlılığının Belirlenmesi	69
4.2. Pt/PPy-PVS Film Elektrodunun Serbest Enzimli Ortamda Kreatine Duyarlılığının İncelenmesi	70
4.3. Pt/PPy-PVS Filme Kreatinaz ve Sarkozin Oksidaz Enzimlerinin Farklı İmmobilizasyon Yöntemleri	71
4.4. Pt/PPy-PVS-CI-SO Biyosensöründe Cevap Akımları Üzerine Enzim Oranının Etkisi	73
4.5. Pt/PPy-PVS-CI-SO Biyosensöründe Cevap Akımları Üzerine Enzim Miktarının Etkisi	74
4.5.1. SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu) analizi	75

Sayfa

4.5.2. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) analizi	77
4.5.3. Temas açısı analizi	78
4.5.4. Elipsometre (Film kalınlığı ölçülmesi).....	80
4.5.5. FTIR analizi.....	80
4.6. Biyosensörün En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi	81
4.6.1. pH'nın etkisi	81
4.6.2. Sıcaklığın etkisi	82
4.6.3. Substrat derişiminin etkisi	83
4.6.4. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi	86
4.6.5. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi.....	87
4.7. Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler.....	88
4.8. Biyolojik Sıvıda (Kanda) Kreatin Tayini	89
4.9. Sonuçlar	90
KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ	97

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Biyosensörlerle tayin edilebilen maddeler	10
Çizelge 2.2. Biyosensörler için uygulama alanları	14
Çizelge 2.3. Yaygın olarak kullanılan bazı iletken polimerler	16
Çizelge 2.4. İletken polimerlerin kullanıldığı biyosensörler	19
Çizelge 2.5. Enzim immobilizasyon yöntemleri	21
Çizelge 2.6. Enzimin bağlanmasını sağlayan fonksiyonel gruplar	22
Çizelge 2.7. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması	33
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar	52
Çizelge 4.1. Biyosensör üzerine ($1,0 \times 10^{-5}$ M kreatin derişiminde) girişim yapan maddeler ve girişim etkileri	89
Çizelge 4.2. Kalibrasyon grafiğı yöntemiyle kan numunelerinde kreatin derişimleri	90

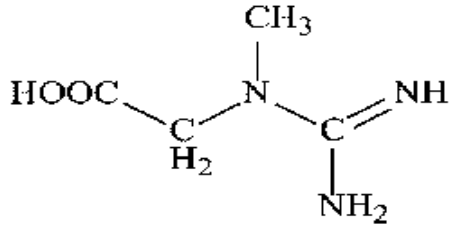
ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Kreatinin kimyasal formülü	1
Şekil 1.2. Kreatinin kreatinine dönüşüm tepkimesi	2
Şekil 1.3. Metabolizmada kreatin'in sentez basamakları.....	2
Şekil 2.1. Bir substrat molekülünü bağlayan enzimin şematik olarak gösterilmesi.....	7
Şekil 2.2. Bir biyosensörün şematik gösterimi	11
Şekil 2.3. Pirel molekülü.....	17
Şekil 2.4. Pirelün polimerizasyonuna ait mekanizması	18
Şekil 2.5. Kovalent bağlama.....	22
Şekil 2.6. Adsorpsiyon	24
Şekil 2.7. İyonik bağlama	25
Şekil 2.8. Çapraz bağlama	26
Şekil 2.9. Polimer matrikste tutuklama	29
Şekil 2.10. Mikrokapsülleme	30
Şekil 2.11. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal sıralamasında enzimlerin yeri	31
Şekil 2.12. Bir enzim sensörünün genel gösterimi	32
Şekil 2.13. Amperometrik esaslı bir enzim sensörünün şematik gösterimi...	34
Şekil 3.1. Kaplama ve ölçmede kullanılan hücre sistemi.....	49
Şekil 3.2. Pt/PPy-PVS film elektrodunun voltamogramı	55
Şekil 4.1. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron aktarımı	69
Şekil 4.2. Pt/PPy-PVS elektrodun H ₂ O ₂ ' ye duyarlılığı	70

Şekil	Sayfa
Şekil 4.3. Pt/PPy-PVS film elektrodun serbest enzimli ortamda kreatine cevabı	71
Şekil 4.4. Farklı immobilizasyon tekniklerinin amperometrik akımı cevabı üzerine etkisi	72
Şekil 4.5. Kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerinin birbirlerine göre oranlarının kreatine duyarlılığına etkisi.....	74
Şekil 4.6. Kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzim miktarlarının karşılaştırılması	75
Şekil 4.7. Pt/PPy-PVS filminin SEM fotoğrafı	76
Şekil 4.8. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün SEM fotoğrafı	76
Şekil 4.9. Pt/PPy-PVS filminin AFM fotoğrafı	77
Şekil 4.10. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün AFM fotoğrafı	78
Şekil 4.11. Pt/PPy-PVS filminin temas açısı fotoğrafı	79
Şekil 4.12. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün temas açısı fotoğrafı	79
Şekil 4.13. Pt/PPy-PVS filminin FTIR spektrumu	80
Şekil 4.14. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün FTIR spektrumu	81
Şekil 4.15. Biyosensörün pH değişimine karşı duyarlılığı.....	82
Şekil 4.16. Biyosensörün sıcaklık değişimine karşı duyarlılığı	83
Şekil 4.17. Biyosensörün amperometrik cevabına kreatin derişimi etkisi	84
Şekil 4.18. Biyosensörün kreatine duyarlılığını gösteren Lineweaver-Burk Grafiği	85
Şekil 4.19. Biyosensörün kalibrasyon grafiği.....	86
Şekil 4.20. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.....	87
Şekil 4.21. Biyosensörün raf ömrünün incelenmesi	88

1. GİRİŞ

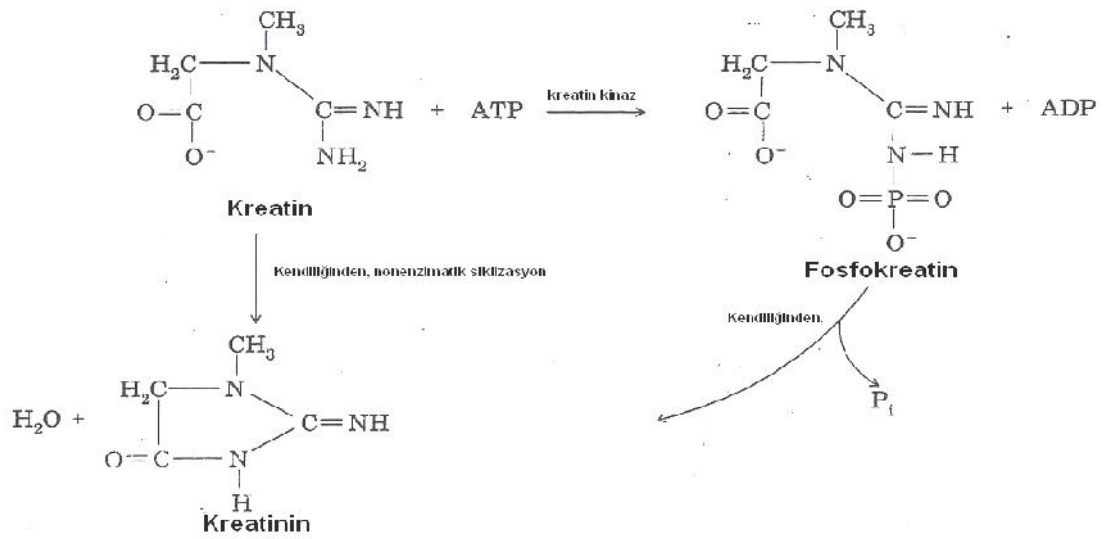
Kreatin; L-Arjinin, Glisin ve S-Adenosilmetiyoninden sentezlenen bir aminoasit türevidir [1].



Şekil 1.1. Kreatin'in kimyasal formülü

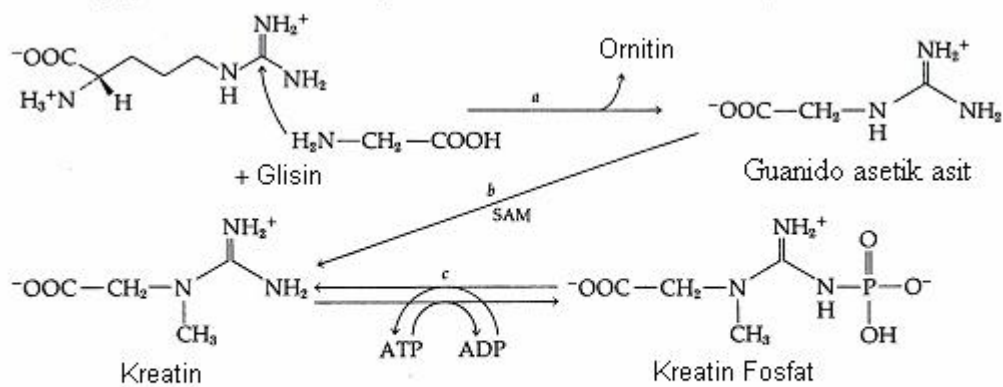
Kreatin aminoasit metabolizmasının bir yan ürünü ve kas dokuları için enerji kaynağıdır. Kanda dehidrojenize formu olan kreatinin şeklinde taşınır. Kandaki normal değeri 44-106 μ M arasındadır. Konsantrasyonu 1000 μ M geçtiğinde kesin patolojik bir durumu gösterir [2,3].

Kreatin karaciğer, böbrek ve pankreasta sentezlenir ve kan yoluyla kas ve beyin gibi organlara taşınır, fosforillenir ve fosfokreatin şeklini alır. Fosfokreatin yüksek enerjili bir bileşiktir. Kreatinfosfatın ve kreatinin molekül içi değişimi bu bileşiklerin kas derişiminin metabolik yolunun bir özelliğidir. Kasdaki kreatin'in bir kısmı anhidrat formu olan kreatinine dönüşür. Bu oran günde %1-2 civarlarındadır. Endojenik kreatinin üretim oranı kas kütlesiyle yaş ve cinsiyetle doğrudan orantılıdır. Erkeklerde idrarla atılan kreatinin miktarı 1,5g/dl iken kadınlarda bu oran 1,2g / dl'dir [4]. Kreatinin son zamanlarda ayrıca popüler bir ergojenik yardımcılığı vardır [5].



Şekil 1.2. Kreatin'in kreatinin'e dönüşüm tepkimesi

Argininin terminal amidino grubunun glisine transferi sonucunda guanidino asetik asit sentezlenir. S-Adenozilmetyoninden guanido asetik aside transfer edilen metil grubu ile kaslar için önemli bir bileşik olan kreatin sentezlenir. Kreatin kinaz enzimi ATP'deki fosforil grubunu kreatine geri dönüşümlü olarak transfer eder [6].



Şekil 1.3. Metabolizmada kreatin'in sentez basamakları

Kreatin karaciğer ve böbreklerde koordine bir yol ile arginin, glisin ve metiyoninden sentezlenebilir. Kreatin düşük derişimlerde kan yolu ile kaslara taşınır [7]. Kreatin, genel olarak kırmızı etten günde yaklaşık olarak 1,2 g

alınır. Kırmızı etteki kreatin içeriği yaklaşık 4g/kg'dır [8]. Tamamen kreatin yokluğunda vücut besinlerle alınan kreatin içeriğinin yalnızca %70 ile %80'ini alır [9].

Hem amatör hem de profesyonel atletler bir dizi performans artırıcı tekniklerle kendilerini zorlayarak fiziksel kondisyonlarını yükseltebilirler. Anabolik steroidler ile kas protein miktarını ve kan dopingleri ile alyuvarların kaslara oksijen transferini artırır. Ancak her iki yöntem de sağlık açısından riskler taşır. Bu yüzden bunların uygulamaları birçok spor dalında yasaklanmıştır. Bu günlerde popüler bir hile olarak kas performansını arttırmak amaçlı kreatin katkı diyeti sporcular tarafından kullanılmaktadır. Burada amaçlanan dokulardaki fosfokreatin değerini büyük oranda arttırmak ve ATP nin rejenarasyonunu hızlandırmak ve bu yolla kas aktivitesinde bir patlama yaratmaktadır [9].

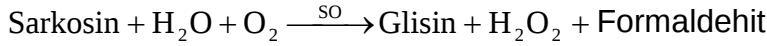
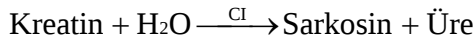
Bir çok çalışma göstermiştir ki kreatin yüklemesi yükleme öncesi duruma göre maksimum güç egzersizlerini veya tekrarlanan egzersizlerdeki kas gücünü ve performansını arttırmıştır [10]. Bu nedenle halterciler, kısa mesafe koşucuları ve yüzücüler oral kreatin desteğinin gösterdiği faydalardan faydalanmıştır [11].

Kreatin tayini için; yüksek performanslı sıvı kromatografisi [12], kütle spektroskopisi [13], IR spektroskopisi [14], kapiler zone elektroforez [15,16] ve UV/Vis spektrometresi [17], yöntemleri kullanılmıştır. Ancak kreatin genellikle Jaffe yöntemi ile ya da enzimatik reaksiyona dayanan yöntemle tayin edilir. Bu iki yöntem de çeşitli reaktiflerle reaksiyon sonucu oluşan renkli bileşiklerin absorpsiyonunun ölçümüne dayanır [18].

Bu yöntemlere bir alternatif de, numunedeki analitlerin doğrudan tayinini sağlayan enzim sensörleri kullanmaktır. Enzim sensörleri zaman tasarrufu sağlar ve klinik analizlerde maliyeti düşürür. Literatürde kreatin tayini için geliştirilmiş potansiyometrik ve amperometrik enzim sensörlerine

rastlanmaktadır [5,18,19]. Bu çalışmalarda enzim immobilizasyonu için gerekli matriks ortamı olarak PVC, karboksilli PVC, polipirrol, polianilin gibi polimerler kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında kreatine duyarlı yeni bir amperometrik biyosensör hazırlandı. Bunun için Platin/Polipirrol-polivinilsülfonat (Pt/PPy-PVS) elektrotları pirolün elektropolimerleşmesiyle hazırlandı. Daha sonra kreatinaz (CI) ve sarkozin oksidaz (SO) enzimleri çarpaz bağlama yöntemiyle immobilize edilerek Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörü hazırlandı. Enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar şöyledir.



Kreatin tayini, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 'in 0,4 V elektrot potansiyelinde yükseltgenmesi esasına dayanılarak yapıldı. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşulları belirlendi ve performansını etkileyen faktörler incelendi. Daha sonra biyolojik sıvılardaki olabilecek muhtemel girişimler incelendi.

Bu çalışma Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün hazırlanma koşulları; immobilizasyon tekniği ve tayin yöntemi açısından diğer çalışmalardan farklıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Enzimler, biyolojik sistemlerdeki reaksiyonların canlılığa zarar vermeyecek ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan biyokatalizörler olarak tanımlanırlar. Bununla beraber yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları enzimlerden doğal ortamların dışındaki pek çok alanda da yararlanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle enzimlere ilişkin tüm nitelik ve özellikleri bir bütün olarak inceleyen enzimoloji bilim dalı, başta biyokimya ve moleküler biyoloji olmak üzere fizyokimya, bakteriyoloji, mikrobiyoloji, genetik, botanik, tarım, farmakoloji, toksikoloji, patoloji, fizyoloji, tıp, mühendislik ve biyoteknoloji gibi bilim dalları ile çeşitli endüstriyel alanlar için büyük önem taşımaktadır.

Enzimler hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü yapısı değişikliğe uğramadan düzenleyebilirler. Her metabolik reaksiyon enzimler tarafından kontrol edilip hızlandırılır. Reaksiyonun başlangıç aşamasında enzimin etki ettiği madde substrat, reaksiyon sonucu miktarında artış görülen ve açığa çıkan madde ise ürün olarak adlandırılır. Enzimler çok yüksek sıcaklıklarda protein yapısı bozunduğu için etkilerini kaybederler [20,21].

Enzimlerin en önemli özelliklerinden birincisi, katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifik olmalarıdır. Bundan dolayı enzimler hücre içinde reaksiyonların hatasız ve hiçbir yan ürün oluşturmada yürümelerini sağlarlar. İkincisi ise laboratuvar şartlarında gerçekleşmesi çok zaman alan ve birçok basamağa ihtiyaç duyan, bazen de yüksek sıcaklık, yüksek basınç, aşırı bazik ve asidik ortam gerektiren reaksiyonların, enzimler sayesinde hücre içi şartlarda birkaç saniye gibi çok kısa bir zamanda meydana gelmesini sağlayan katalizleme güçleridir. Örneğin üreaz enziminin, üreyi NH_3 ve CO_2 'e parçaladığı

reaksiyonun hız sabiti $3,0 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ iken enzim varlığında bu hız $3,0 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ 'dir. Buradan da anlaşılacağı gibi üreaz enzimi bu reaksiyonu 10^{14} kat hızlandırmıştır [22-24].

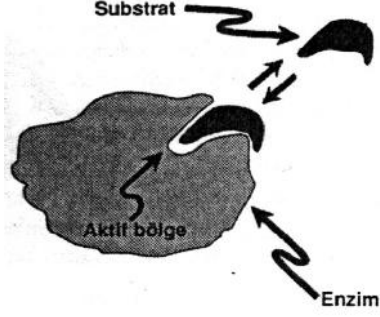
Enzim miktarlarını saptamak zor olduğundan ve birçok enzimin saf örnekleri olmadığından, enzim miktarı yerine enzim ünitesi kullanılmaktadır. Enzim aktivitesi turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı, enzim molekülü tarafından bir saniyede ürüne çevirilen substrat molekülü sayısıdır. Birçok enzimin turnover sayısı $1,0 \times 10^4$ 'tür. Bazı enzimler $1,0 \times 10^5$ turnover sayısına sahiptir. Bilinen en yüksek turnover sayısı 4×10^7 'lik değerle katalaza aittir. İkinci olarak en yüksek değere 4×10^5 ile karbonik anhidraz sahiptir. Turnover sayısı sadece saf enzim için ifade edildiğinden enzim aktivitesi, spesifik aktivite ile belirtilir. Spesifik aktivite 1 mg protein başına enzim ünitesi (EÜ/mg protein) olarak tarif edilir. Klinikte, biyolojik sıvılarda ölçülen enzim aktiviteleri optimum şartlarda 1 saniyede 1 mol substratın ürüne dönüşümünü katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanır. Bu birim, uluslararası birim (katal) olarak kabul edilir [23].

2.1.1. Enzimlerin yapısı ve özellikleri

Enzimler genellikle protein yapısında moleküllerdir. Enzimin protein yapısının yanında ona aktiflik kazandıran gruplar vardır. Enzimin protein kısmına "apoenzim", protein olmayan parçasına ise "kofaktör" denir. Apoenzim ve kofaktörün oluşturduğu aktif yapıya da "holoenzim" denir [25].

Sıklıkla karşılaşılan kofaktörler arasında metal iyonları (Zn^{2+} , Fe^{2+} gibi) ve organik yapıda olan (NAD^+ , FAD gibi) koenzimler yer alır. Enzimler genellikle bir tek substratı ürüne dönüştürür. Enzim moleküllerinde aktif merkez denilen özel bir cep ya da yuva bulunur. Aktif merkez substrata uyumlu olan üç-boyutlu bir yüzey oluşturan amino asit yan zincirleri içerir (Şekil 2.1.). Aktif merkez substratı bağlayarak bir enzim – substrat (ES) kompleksi meydana

getirir. ES kompleksi, enzim-ürün (EÜ) kompleksine dönüşür ve enzim üründen ayrılır.



Şekil 2.1. Bir substrat molekülünü bağlayan enzimin şematik olarak gösterilmesi

2.1.2. Enzimatik reaksiyon hızını etkileyen faktörler

pH

Enzim, substrat ve koenzim moleküllerinde asidik veya bazik gruplar vardır. “ES” kompleksinin en kararlı bir şekilde oluşması, yani oluşma hızının maksimum olması için bu grupların belirli bir iyonik formda olması gereklidir. Bunun dışındaki formlarda “ES” kompleksi zayıflar ve reaksiyon hızı düşer. Bu, optimum bir pH’da reaksiyon hızının en yüksek olması demektir. Kuvvetli asidik ve kuvvetli bazik ortamlarda enzim molekülü denatüre olacağından reaksiyon hızı tersinmez olarak sıfıra düşer. pH-hız grafiği çan eğrisi şeklindedir [25].

Sıcaklık

Sıcaklık moleküllerin hareketini arttırdığından tüm kimyasal reaksiyonların ve biyokimyasal reaksiyonların hızlarını artırır. Enzimler protein yapısında olduklarından, belirli bir sıcaklıktan sonra denatüre olmaya başlar. Bu önce enzim molekülünün tersiyer yapısının ve sıcaklık arttıkça sekonder yapısının

bozulması demektir. Yapının bozulmasından enzimin aktif merkezi de etkilenir, reaksiyon hızı keskin bir şekilde düşer [25].

Substrat derişimi

Enzimatik bir reaksiyonun hızı substrat derişimi arttıkça artar ve belirli bir substrat derişiminde hız maksimum olur. Bu noktada enzim substrata tamamen doymuştur, bu noktadan sonra hız değişmez [25].

2.1.3. Kreatinaz enziminin özellikleri

Kaynak: Pseudomonas türleri recombinant E.Coli

İsimlendirme: Kreatin amidinohidrolaz, EC 3.5.3.3

Moleküler Ağırlık: 94 000 kDa (jel filtrasyonu)

İzoelektrik pH: 4,8

Optimum pH: 8,0

Optimum Sıcaklık: 35°C

İnhibitörler: Hg^{+2} , Zn^{+2} , Ag^{+1} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Pb^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} ve Mg^{+2}

Termal Kararlılık: 30°C'nin altında

pH Kararlılığı: 6,0 – 9,0

Kararlılık: Kuru koşullarda 4 °C'de 12 ay [26].

2.1.4. Sarkozin oksidaz enziminin özellikleri

Kaynak: Mikroorganizma recombinant E.Coli

İsimlendirme: Sarkosin oksidaz, EC 3.5.3.3

Moleküler Ağırlık: 65 000 kDa (jel filtrasyonu)

İzoelektrik pH: 5,3

Optimum pH: 8,0

Optimum Sıcaklık: 40°C

İnhibitörler: Hg^{+2} , Ag^{+1} , Cu^{+2} , NaN_3 , ZnCl_2 ve monoiyodoasetat

Termal Kararlılık: 55°C'nin altında

pH Kararlılığı: 7,0 – 10,0

Kararlılık: Kuru koşullarda -20 °C'de 12 ay [26].

2.2. Biyosensörler

Biyosensör immobilize olmuş biyolojik ya da biyokimyasal bir bileşenin analit ile etkileşimi sonucu uygun bir dönüştürücü aracılığıyla analitin miktarı ile orantılı bir sinyal oluşmasını sağlayan analitik bir sistem olarak tanımlanır. Biyosensörlerin ilk örneklerini amperometrik enzim elektrotlar oluşturur.

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

YSI sensörünün geliştirilmesinde ana özellik yeni membranlardır. Clark burada sandviç membran kullanmıştır. Enzim nükleopor polikarbonat membran ve selüloz asetat membran arasına hapsolmüştür. Bu membranlar normalde ortamın potansiyel yapısını etkileyecek olan diğer faktörleri elimine etmekte ve cihazın duyarlılığını ve özgünlüğünü artırmaktadır. Mesela, Clark'ın kullandığı membran H_2O_2 'ı diffüze ederken askorbat ve diğer kimyasalların geçişini engellemektedir.

Biyosensörler klinik tıpta teşhis ve tayin amacıyla, fermantasyon analizi ve kontrolünde, biyoloji, kimya, gıda endüstrisi, ziraat ve veterinerlikteki çeşitli analizlerde, endüstriyel gaz ve sıvıların analizinde, çevre kirlenmesinin izlenmesinde, patlayıcılar ve diğer askeri alanda kullanılmaktadır. En basit tanımıyla biyolojik katalizör taşıyan sensörler olarak tanımlanır. Biyosensörler canlılardaki çeşitli maddelerin algılanmasını mümkün kılan biyolojik

maddelerin birleştirilmesiyle ortaya çıkmıştır. Bu sistemler bir yandan biyolojik sistemin yüksek seçiciliğini diğer yandan sensörlerin tayin duyarlılığını birleştirmiş ve çok geniş uygulama alanı bulmuştur. 1962 yılında Clark ve Lyons'un ilk enzim elektrot fikrini ortaya atmasıyla başlayan, sonraki yıllarda gelişen biyosensör teknolojisinin ürünleri günümüzde çok değişik alanlarda çok sayıda maddenin tayin ve izlemesinde yaygın olarak kullanılır hale gelmiştir. Çizelge 2.1'de biyosensörlerle tayin edilebilen maddeler verilmektedir [27].

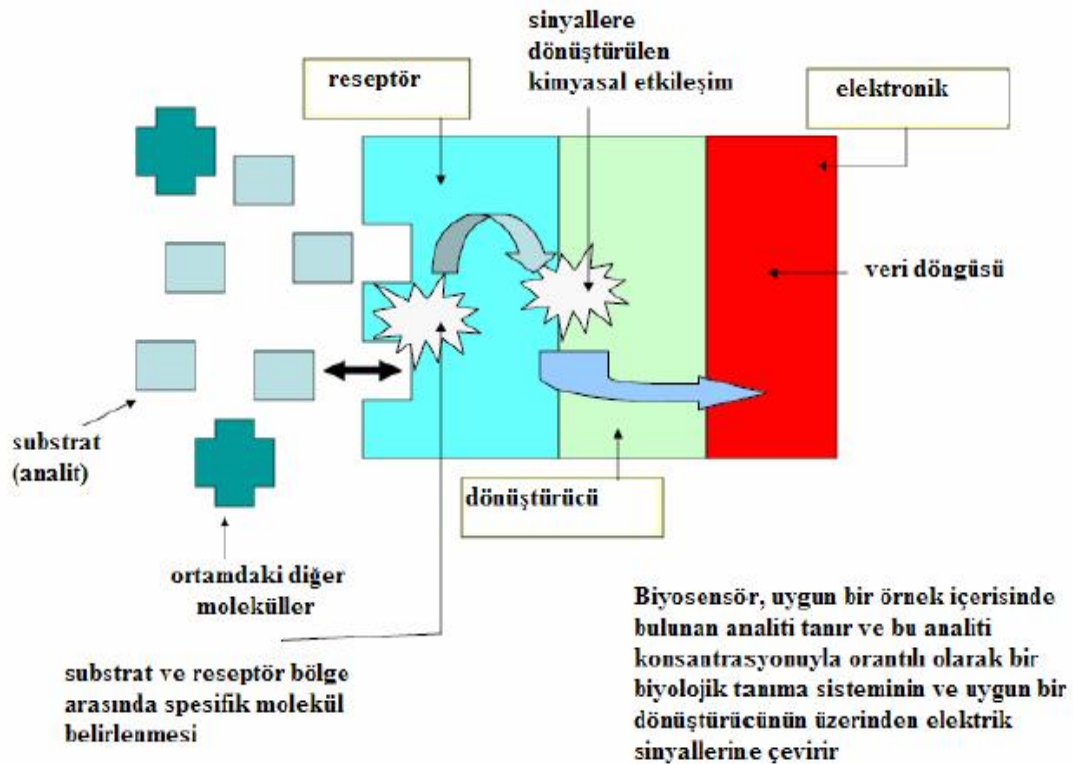
Çizelge 2.1. Biyosensörlerle tayin edilebilen maddeler [27,28].

<u>Analizi Yapılan Maddeler</u>	<u>Örnekler</u>
Aminoasitler	Alanin, arginin, asparjin, aspartik asit, sistin, glutamin, glutamik asit, glutatyon histidin, lisin, metiyonin, fenil alanin, sarkozin, serin, valin
Gazlar	NH ₃ , H ₂ , CH ₄ , SO ₂ , NO
Kofaktörler	AMPT, ATP, NAD(P)H
Amidler ve aminler	Aminopirin, anilin, aromatik aminler, asetil kolin, kreatin, kreatinin, guanidin, guanosin, penisilin, spermin, ürik asit, üre
Karboksilik asitler	Asetik asit, formik asit, glukonik asit, izositrik asit, askorbik asit, laktik asit, malik asit, okzalik asit, piruvik asit, süksinik asit
Kompleks maddeler	Antibiyotikler, mutajenler, vitaminler
İnorganik iyonlar	F ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₃ ⁻² , SO ₃ ⁻² , SO ₄ ⁻² , Hg ⁺² , Zn ⁺²

Bir biyosensör algılayıcı ile bütünleşmiş veya tamamen birleştirilmiş hassas biyolojik molekül içeren bir analitik cihazdır. Biyosensörler esas olarak üç temel bileşenden ibarettir. Birinci kısım biyolojik olarak duyarlı materyal yani biyokatalizör tabakası, ikinci kısım kovalent bağlı biyolojik bileşenlerle temas

edecek şekilde olan algılayıcıdır (transduser, sensör). Bu kısım kovalent bağlı aktif biyolojik bileşenlerin absorpsiyonuna ve eliminasyonuna izin veren yarı geçirgen bir zar içerir. Biyosensörün üçüncü kısmı ise doğrudan biyokatalizör tabakasına bağlı elektronik aygıttır.

Bir biyosensörde; biyokatalizör ile tayin edilecek maddenin teması sonucu ortaya çıkan biyokimyasal reaksiyon sonucu oluşan akım uygun bir dönüştürücü ile kantitatif olarak elektrik sinyaline dönüştürülür [27].



Şekil 2.2. Bir biyosensörün şematik gösterimi [29].

Biyosensörlerin çalışması sırasında ilk önce substratın çözelti içerisinde biyosensör yüzeyine taşınması gerçekleşir. Substratın taşınması difüzyon, karıştırma vb. gibi çeşitli şekillerde olabilir. Substrat biyobileşenin aktif bölgesine difüzlenir. Biyobileşen polimerik gözenekli membrana (selülozik diyaliz membranı gibi) emdirilmiş veya algılayıcı ile polimerik membran (selofan, selüloz, asetat/nitrat, polivinil alkol, poliüretan vb.) arasına sandviç

edilmiş veya polimerik bir jel içinde hapsedilmiş olabilir. Bu hapsetme işlemi için akrilamid, jelatin, agaroz vb. gibi doğal veya sentetik polimerler kullanılabilir. Biyobileşen ve substrat arasında reaksiyon meydana gelir. Bu etkileşme sonucu gaz molekülleri (O_2 , CO_2 , NH_3 , vb.) salınabilir veya kullanılabilir, seçimli iyonlar oluşabilir (H^+ , NH_4^+ , diğer tek değerlikli anyon ve katyonlar), ısı ortaya çıkar veya kaybolur, optik yoğunluk değişebilir, elektron salınabilir veya kullanılabilir. Biyobileşenler ve substrat reaksiyonu sonucu oluşan ürün algılayıcı yüzeyine taşınır. Algılayıcı yüzeyinde yukarıda bahsedilen değişimler algılanıp elektriksel devrelerle ölçülebilecek bir boyuta dönüştürülür. Ölçülen elektriksel sinyal analit derişimiyle orantılıdır [27].

2.2.1. Biyobileşenler

Biyosensörlerin yapısında görev alan biyobileşenler çoğu kez biyoreseptör olarak da adlandırılırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılanlar enzimler ve antikorlardır [30].

Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar, nükleik asitler ve biyolojik zarlar içine yerleştirilmiş kimyasal reseptörler, sensörlerde biyobileşen olarak kullanılırlar. Biyoreseptörler analiz edilecek maddeyi dönüşüme uğratar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler dönüştürücü tarafından algılanır. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyomateryallerdir. Uygun bir enzimin bulunamaması veya enzimin kararsız olması ve birden çok sayıda maddenin tayini durumlarında hücre sistemleri ve tercihen mikroorganizmalar kullanılır [30].

2.2.2. Dönüştürücüler (Transduserler)

Transduserler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyona göre transduser seçilir. Elektrodlar amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde kullanılır ve burada hedef; analitdir. (O^{2-} elektrodunda çözünmüş O_2 , pH elektrodunda H^+ iyonu

gibi). Optik sensörlerde hedef; ışık, piezoelektrik sensörlerde ise kristalin salınım rezonansının kütle yüklenimi sebebiyle değişmesidir [30].

2.2.3. Biyosensör hazırlanmasında dikkat edilmesi gerekenler

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

- i) Analite uygun biyoreseptörün seçimi,
- ii) Biyoreseptörü dönüştürücüye sabitlemede kullanılacak uygun ve verimli immobilizasyon metodunun seçimi,
- iii) Biyoreseptörün analiti tanınmasıyla oluşan kimyasal veya fiziksel sinyali anlaşılabilir sinyal formuna dönüştürecek olan dönüştürücünün seçimi ve dizaynı, olarak sıralanabilir [31].

2.2.4. Biyosensörlerde kullanılan biyoaktif yapılar

Biyosensörlerde kullanılan ve analizlenecek madde ile spesifik bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bileşenler, etkileşim mekanizmalarına göre basitten karmaşığa doğru bir sıralama yapıldığında; iyonoforlar, antikorlar, enzimler, nükleik asitler, lipozomlar, biyomembranlar, hücre organelleri (örneğin; mitokondri), tüm hücreler, doku kesitleri ve homojenatları ile organlar (örneğin; koku alma organı) olarak sınıflandırılabilirler. Biyoaktif maddeler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler dönüştürücü (transduser) tarafından algılanır. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoaktif yapılardır [30].

2.2.5. Sensör ve biyosensörlerin uygulama alanları

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tesbiti ve

enerji saklanması çok önemli rol oynarlar. Bugüne kadar 180'den fazla farklı madde için sensör hazırlanmış olup bunlardan ancak 25 kadarı ticari olarak üretilmektedir. Biyosensörler için mümkün uygulama alanları Çizelge 2.2'de gösterilmiştir [30].

Çizelge 2.2. Biyosensörler için uygulama alanları

Klinik teşhis, biyomedikal sektör Proses kontrolü Biyoreaktör kontrolü Gıda üretim ve analizi Tarım ve veterinerlik Bakteri ve virüs teşhisinde	İlaç analizi Endüstriyel atık su kontrolü Çevre koruma ve kirlilik kontrolü Maden işletmelerinde zehirli gaz analizleri Askeri uygulamalar
--	--

Hiç kuşkusuz biyomedikal sektör biyosensörler için en iyi pazardır. Bu alanda uygulama olanağı bulan ilk biyosensörler enzim sensörleridir. Ticari olarak üretilen ilk biyosensör ise şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayinini mümkün kılan glukoz oksidaz elektrodudur [30].

Biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde başta glukoz olmak üzere birçok monosakkarit, amino asitler, organik asitler (laktik asit) üre ve alkol tayinlerinde enzim sensörleri kullanılmaktadır. Ayrıca gıdalardaki yabancı maddeler (pestisidler, toksinler ve yabancı hormonlar vb.) yanında aroma ve tazelik gibi kompleks parametreler için de biyosensörler hazırlanabilir [30].

İlaçların kötü amaçla kullanımı ve uyuşturucu ile mücadelede biyosensörler kullanılabilecektir. Uyuşturucu arayan köpeklerin yerini biyosensörler alabilir. Böylece özellikle gümrüklerde, karakollarda zaman kazanılacaktır. Toprak, hava ve su kirliliğinin kontrolünde mikrobiyal sensörler ve enzim sensörleri kullanılmaktadır [30].

2.3. İletken Polimerlerle Dönüştürücü Hazırlanması

2.3.1. İletken polimerler

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

İletken polimerlerle ilgili ilk önemli çalışma, Shirakawa'nın poliasetileni (PA) sentezleyerek katkılama yoluyla iletkenliğinin büyük ölçüde arttığını belirlemesidir [32,33].

Önemli bir çalışma ise polipirol (PPy) üzerinde yapılmıştır. Pirolün ilk elektrokimyasal polimerizasyonu Bocchi tarafından 1968 yılında gerçekleştirildi. Bocchi "siyah pirolü" adlı maddeyi 8 S/cm elektrik iletkenliğinde elde etti. 1979 yılında havanın neminden etkilenmeyen iletkenliği 100 S/cm olan free standing filmler hazırladı. Günümüzde PPy filmleri oda koşullarında 1000 S/cm iletkenliğine sahip olarak hazırlanabilmektedir. Polimerlerin mekanik özelliklerinin geliştirilmesinin bir diğer yolu da kopolimerizasyondur. Stake polimetilmetakrilat üzerine pirolün grafitini yayınladı. Metilmetakrilat ve 2-(-pirol) etilmetakrilat komonomerlerini pirol üzerine $FeCl_3$ yükseltgenini kullanarak grafit kopolimerini sentezlemeyi başardılar. Mc. Diamid iletken polimerler konusunda önemli bir çalışmasıyla Nobel ödülü almıştır [42].

Anatilik kimya ve biyosensör alanlarında iletken polimerler ile çalışan pek çok araştırmacı vardır. Yeni ve ilginç özellikler sunan bu maddelerle yaygın olarak kullanılan elektronların yüzey modifikasyonları için farklı imkanlar oluşmakta ve elektrokataliz, membran ayırmaları ve kromatografi alanlarında uygulanmaktadır. Aynı zamanda kimyasal ve biyokimyasal sensör üretiminde de yeni teknolojik imkanlar oluşmaktadır [34,35]. Çizege 2.3, bu ve benzeri alanlarda yaygın olarak kullanılan iletken polimerleri göstermektedir.

Çizelge 2.3. Yaygın olarak kullanılan bazı iletken polimerler

İletken Polimer (İletkenlik S/cm)	Yapı	İletken Polimer (İletkenlik S/cm)	Yapı
Poliasetilen (1000)		Polianilin (1-100)	
Polipirol (40-100)		Polikarbazol (10-100)	
Politiyofen (10-100)		Poli(parafenilen)vinilen (3)	
Poli(parafenilen) (100-500)		Poli(parafenilen)sülfür (1-100)	

İletken polimerlerin en önemli problemlerinden biri herhangi bir çözücüde çözüneme problemleridir. Son yıllarda bu çözünme problemi de bilinerek yapısal modifikasyon olmadan polipirolün çözüneme problemini çözmek için sulu demirklorür, çözeltisi, suda çözünabilen polimerizasyon sistemleri araştırılmıştır. Bu sistemlerde, metilselüloz, polivinilalkol, polivinil pirolidon veya poliakrilamit gibi nötral polimerler kullanılarak polipirolün koloidal çözeltileri elde edilmiştir [42].

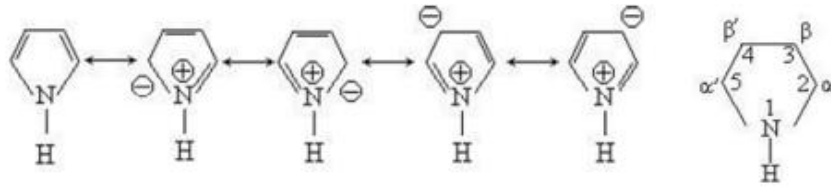
İletken polimerlerin çözünme zorluğu onların antielektrostatik filmler, elektronik pencereler, kimyasal sensörler, sarj edilebilen piller gibi uygulamalar için gerekli elektronik ve optik özelliklerini veren moleküler karakteristikleri olan π -elektronik yapılarının delokalize π -elektronik yapı onların yüksek elektronik polimerizasyonuna dolayısıyla zincir içinde yüksek π - π etkilesmesine yol açar. Bu da polimerin çözünme yerine agregasyonuna neden olur [42].

Polipirolün çözünmeme probleminin orjini bilindiğinden hemen akla gelen çözüm, polimerinin elektronik polarizibilitesini azaltmaktır. Bunu yapısal

modifikasyonla yaparsak polimer çözünebilir ama aynı zamanda tüm yararlı optik ve elektronik özelliklerini kaybedebilir. Bu yüzden son zamanlarda üzerinde çalışılan çözüm, polimerin başka bir polimer ile interpolimer kompleksini oluşturmaktadır [42].

Pirol

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



Şekil 2.3. Pirol molekülü

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

2.4. Elektrokimyasal Polimerizasyon

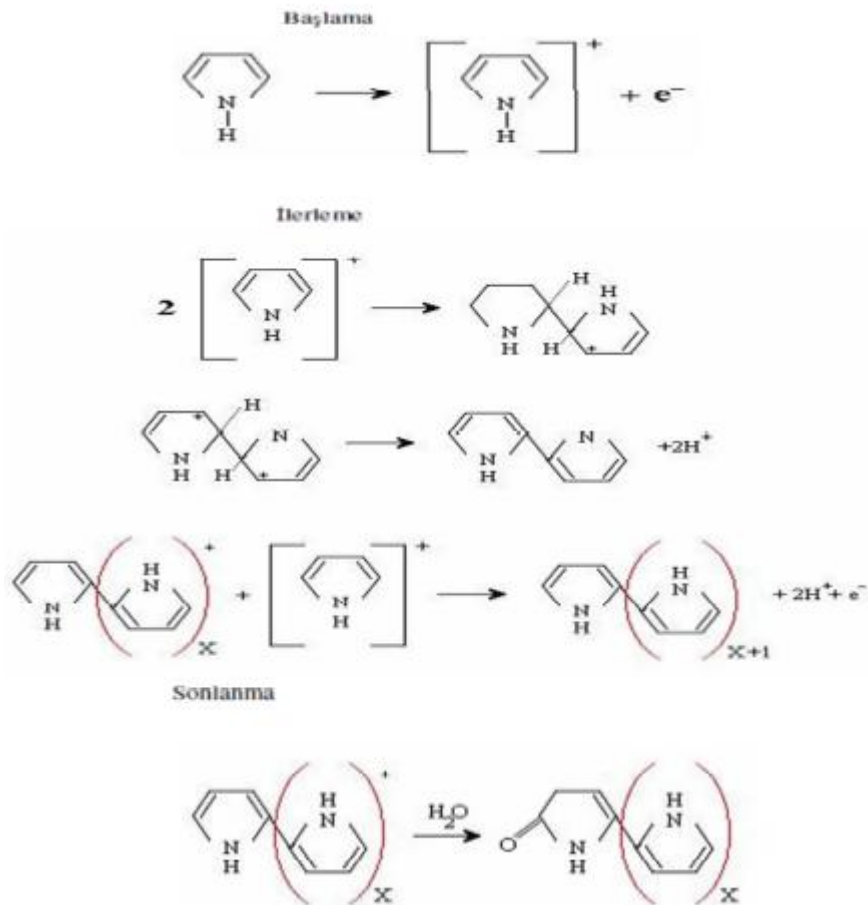
Elektrokimyasal polimerizasyon iletken polimerin sentezinde kullanılan en yaygın yöntemlerden birisidir.

Basit ve genellikle tek basamakta uygulanabilen elektropolimerizasyon yöntemiyle oluşturulan film kalınlığı, morfolojisi, iletkenliği ve seçilen iyonların daha kontrollü birleştirilmesi söz konusudur. Bunların yanında tepkimenin oda sıcaklığında gerçekleştirilebilmesi, elektrot yüzeyinde polimer filmlerin oluşturulabilmesi, homojen film elde edilebilmesi, polimer katkılanmasının

film oluşumu ile aynı zamanda gerçekleştirilebilmesi, kopolimerlerin elde edilebilmesi yöntemin diğer avantajları olarak sıralanabilir [36].

2.4.1. Pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu

Elektronik iletken polipirol filmlerinin oluşumu anodik olarak asetonitrilin yükseltgenmesiyle ilk olarak Diaz tarafından yapılmıştır. Çözücü, elektrolit, fonksiyonel gruplar, elektrot potansiyeli, ve diğer özelliklerin değiştirilmesiyle literatürde oldukça fazla miktarda çalışma bilinmektedir. Fakat polimerizasyon mekanizmasını anlamak uzun sürmüştür [37].



Şekil 2.4. Pirolün polimerizasyonuna ait mekanizması [37]

2.5. İletken Polimerlerle Enzim İmmobilizasyonu

Son on yıldan bu yana polimerler, biyosensörlerin yapımında ve geliştirilmesinde artan bir şekilde yer almaktadır. Enzimler tek başlarına iken zayıf iletkendir, çünkü redoks merkezleri kalın bir protein tabakası ile çevrelenerek yalıtılmıştır. İletken polimerler ise bu tabakadan işleyerek redoks merkezleri ile elektrot yüzeyi arasında direkt bir elektriksel iletkenlik sağlayabilirler. Bu olay iletken polimer grup serilerinin redoks yüklerinin delokalizasyonu ile başılır ve iletken polimerler burada elektron transfer ortamları olarak davranırlar. Sonuç olarak elektron transferinin gerçekleşmesi için herhangi bir ek difüzyon ortamına ihtiyaç duyulmaz. Burada sensörlerin uzun süreli kararlılığı açısından bazı avantajlar vardır; çünkü membranın kirlenmesi önlenmiştir. Bu durum bu tip biyosensörlerin kullanımını kolaylaştırmaktadır [43].

Çizelge 2.4. İletken polimerlerin kullanıldığı biyosensörler

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

2.5.1. Biyobileşen İmmobilizasyonu

Biyosensörler farklı özellikteki iki elemanın (dönüştürücü ve biyobileşen) kombinasyonu ile oluşurlar. Uygun biyoreseptör ve dönüştürücü seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması aşılması gereken en önemli sorundur. Bu bağlama işlemi biyoreseptör immobilizasyonu olarak tanımlanır. Bağlama işleminde çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen dönüştürücü ve biyoreseptöre göre belirlenir. İmmobilizasyon biyoreseptörün kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar [30].

2.5.2. Enzim immobilizasyon yöntemleri

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

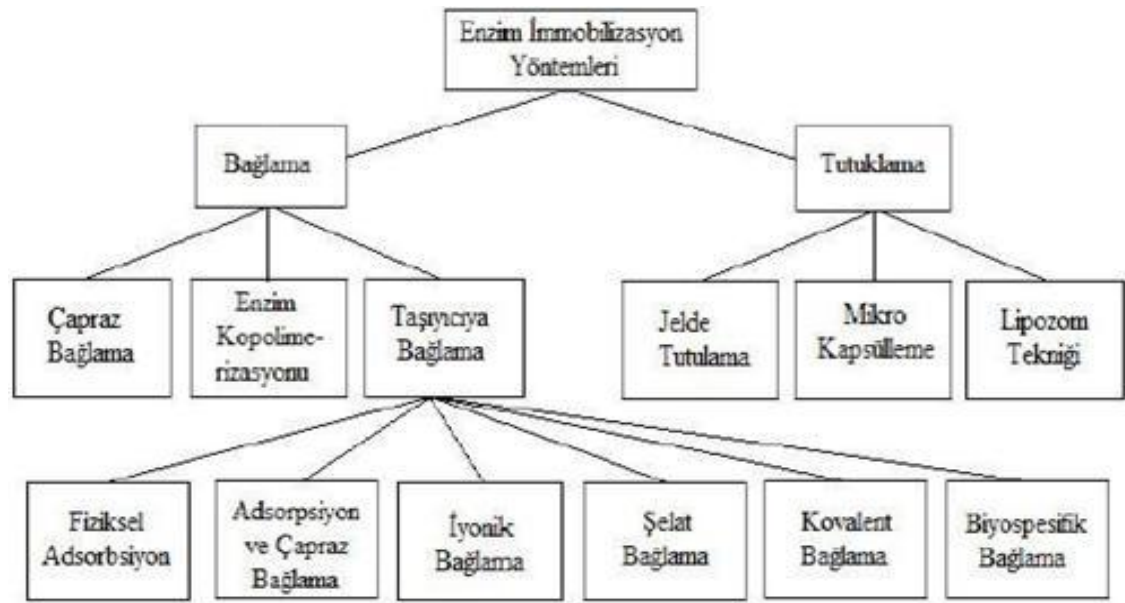
İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere üstünlükleri şöyle sıralanabilir;

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

- Enzimin kendi kendini parçalaması olasılığı azalır.
- Mekanistik çalışmalar için uygundur.

Çizelge 2.5'de enzim immobilizasyon yöntemleri şematik olarak gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Enzim immobilizasyon yöntemleri



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

Taşıyıcıya bağlama yöntemleri

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

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri gerekir. Immobilizasyon, çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) gerçekleştirilmelidir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde hidrofobik karakterli de olmamalı, suda

ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlı olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde, enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında, taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilir.

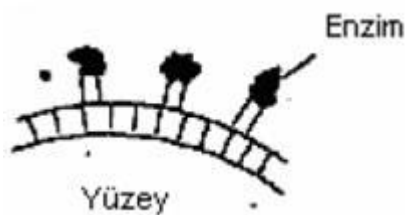
Kovalent bağlama

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

Çizelge 2.6. Enzimin bağlanmasını sağlayan fonksiyonel gruplar

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

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



Şekil 2.5. Kovalent bağlama

Adsorpsiyon

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

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

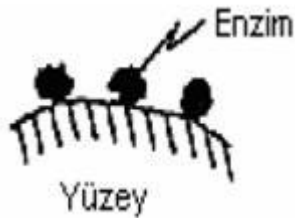
Enzim immobilizasyonunda en sık kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, CaCO_3 , kül, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır.

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

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

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

Yöntemin yararları; enzimin immobilizasyon işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve bir yandan immobilizasyonu gerçekleştirirken diğer yandan enzim saflaştırılmasına olanak sağlamasıdır. Yöntemin sakıncaları; her ne kadar immobilizasyon işlemi kolaysa da optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzimle taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa, bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest halde reaksiyon ortamına geçer ve ürünlerin kirlenmesine neden olur.

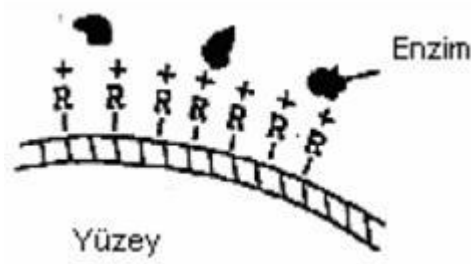


Şekil 2.6. Adsorpsiyon

İyonik bağlama

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

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



Şekil 2.7. İyonik bağlama

Şelat bağlama

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

Biyospesifik bağlama

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

Çapraz bağlama yöntemleri

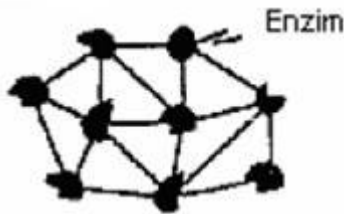
Küçük moleküllü, bi veya multi fonksiyonel reaktiller enzim molekülleri arasında kovalent bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlarlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif derişimine, pH ya da immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır. İntermoleküler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

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu 4 farklı şekilde gerçekleşir:

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

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

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



Şekil 2.8. Çapraz bağlama

Kopolimerizasyon yöntemleri

Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranır ve böylelikle polimer matrikse bağlanmış olur. Yöntem, polimer

matrikse tutuklamaya benzetmekle birlikte enzim kaçıışının önlenmiş olması gibi üstünlüğü vardır.

Tutuklama yöntemleri

Prensip olarak tutuklama enzim molekülünü belirli bir mekanda durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem, polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik; enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

Polimer matrikste tutuklama

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

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

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

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

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

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

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

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

Bu yöntemin yararları; çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem olması ve çok az miktarlarda enzim kullanılarak gerçekleştirilmesidir. Nötral, suda çözünmeyen taşıyıcılarla da immobilizasyon gerçekleştirilmekte ve

kimyasal bir bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcıya gerek duyulmamaktadır.

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



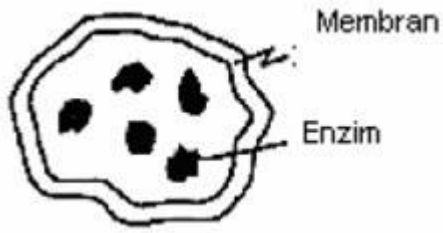
Şekil 2.9. Polimer matrikste tutuklama

Mikrokapsülleme

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

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

Sürekli mikrokapsüllerde çerçeve membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde lipozomlar ise bir sıvı tabakadır. Immobilizasyonda kullanılan çerçeve maddesinin(membran) yarı geçirgen olması zorunludur. Ayrıca bu yarı geçirgen membranın gözenek çapları; substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntemle immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır [32].

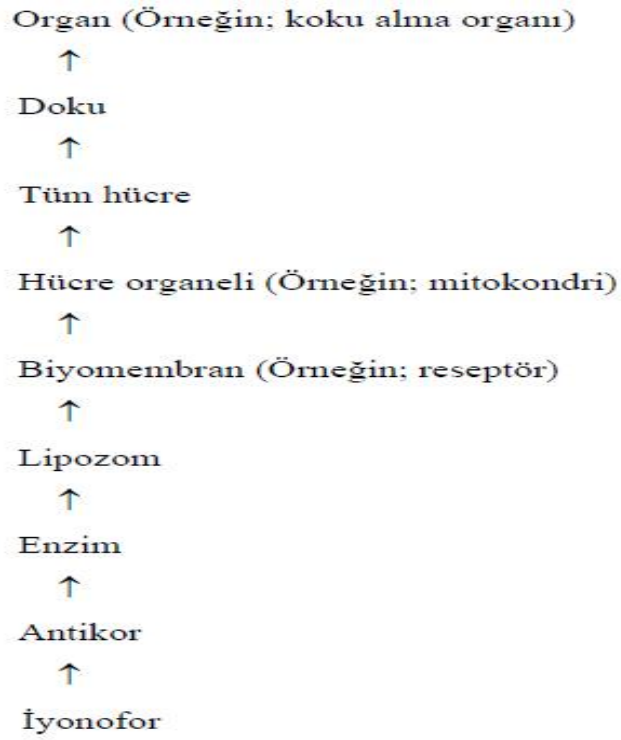


Şekil 2.10. Mikrokapsülleme

2.6. Enzim Sensörleri

Biyosensör teknolojisinde elektrokimyasal esaslı enzim sensörlerinin tartışılmaz bir üstünlüğü vardır. Bunun en önemli nedeni canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin tayininde doğrudan ya da dolaylı olarak kullanılabilecek binlerce enzimin varlığıdır. Diğer biyosensörlerde olduğu gibi enzim sensörleri de biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm sisteminden oluşur. Diğer biyosensörlerden tek farkı biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimlerin yer almasıdır [30].

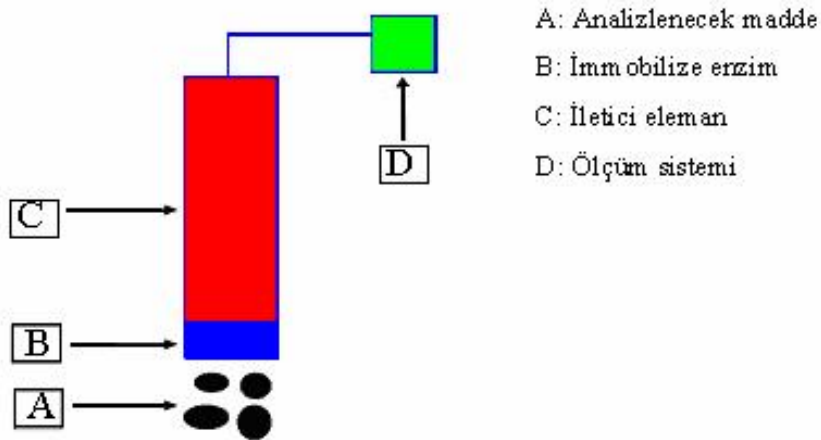
Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyolojik materyaller artan kompleksliklerine göre sıralandıklarında; iyonoforlar, antikorlar, enzimler, lipozomlar, biyomembran parçaları (örn: reseptör), hücre organelleri (örn: mitokondri), doku veya tüm hücreler ve organlar (örn: görme ve koklama organları) şeklinde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



Şekil 2.11. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal sıralamasında enzimlerin yeri

2.6.1. Genel çalışma ilkesi

Enzim sensörleri, biyobileşen olarak enzimin kullanıldığı iletici ve ölçme sisteminden oluşur. Diğer biyosensörlerde olduğu gibi enzim sensörlerinde de aktif tabakanın iç ve dış yüzeylerinde zarlar, sinyali yükselticiler, mikro işlemciler, kaydedici veya bilgisayar sistemleri amaca yönelik olarak kullanılabilir. Bir enzim sensörünün genel gösterimi Şekil 2.13’de verilmiştir [38].



Şekil 2.12. Enzim sensörlerinin genel şematik gösterimi

Bir enzim elektrodunda enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği tepkime uygun bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir iletici ile birleştirilmektedir. İletim sistemi biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan ürünün miktarındaki artışı tespit edebilecek şekilde seçilmelidir. Biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka iletici ara yüzeyindeki derişimlerin hızlı bir şekilde dengeye ulaşabilmesi için difüzyon engelini en aza indirmek amacıyla biyoaktif tabaka kalınlığının mümkün olduğunca ince olması gerekmektedir. İletici sistemin ölçme sistemine gönderdiği sinyal, biyoaktif tabaka ile iletici ara yüzeyindeki derişimlerde meydana gelen değişikliğe bağlıdır. Ancak söz konusu derişimler, denge halinde ölçme çözeltisindeki derişimlerle orantılı olduğu için çoğu zaman kalibrasyon grafiği çizilerek sonuca varılır [38].

2.6.2. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

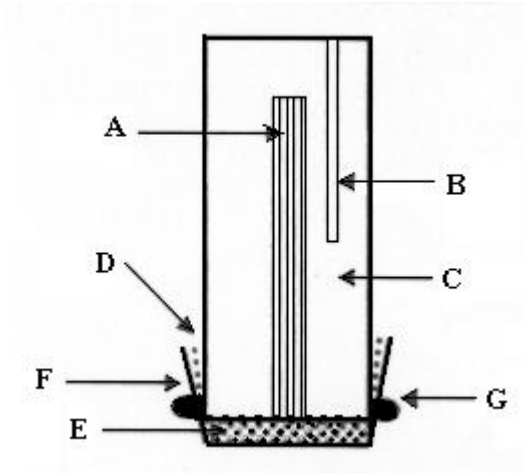
Enzim sensörleri enzimatik reaksiyon sonucu ortaya çıkan sinyalin iletilmesi ilkesine göre sınıflandırılır. Çizelge 2.6.'da enzim sensörlerinin sınıflandırılması verilmiştir.

Çizelge 2.7. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması [38]

1. Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensörleri
a. Amperometrik esaslı enzim sensörleri
Birinci nesil amperometrik enzim elektrotları
İkinci nesil amperometrik enzim elektrotları
Üçüncü nesil amperometrik enzim elektrotları
b. Potansiyometrik esaslı enzim sensörleri
Protona duyarlı potansiyometrik enzim elektrotları
Amonyuma duyarlı potansiyometrik enzim elektrotları
Karbondioksite duyarlı potansiyometrik enzim elektrotları
Diğer iyonlara duyarlı potansiyometrik enzim elektrotları
c. Yarı iletkenleri esas alan enzim sensörleri
Enzim alan etki transistörleri (ENFET)
2. Optik Esaslı Enzim Sensörleri
Absorpsiyon esaslı optik enzim sensörleri
Floresans esaslı optik enzim sensörleri
Biyoluminesans esaslı optik enzim sensörleri
3. Kalorimetrik Esaslı Enzim Sensörleri
4. Piezoelektrik Esaslı Enzim Sensörleri

2.6.3. Amperometrik enzim elektrotlar

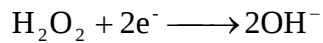
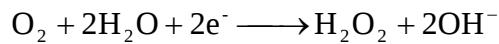
Amperometri sabit bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Sinyal, elektrot yüzeyine kütle aktarım hızına bağlıdır. Elektroaktif bir ürünün salınıvermesi ya da reaktifin biyokatalitik reaksiyona bağlı olarak tüketimi platin gibi inert bir çalışma elektrodunda doğrudan izlenebilir. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. Şekil 2.14.'de amperometrik esaslı bir enzim sensörünün şeması verilmiştir.



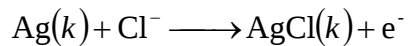
Şekil 2.13. Amperometrik esaslı bir enzim sensörünün şematik gösterimi
 (A)Çalışma elektrodu(Pt), (B)Referans elektrot(Ag/AgCl), (C)Elektrolit çözelti(KCl), (D)İç gaz geçirgen membran(Teflon), (E)İmmobilize enzimi içeren biyoaktif tabaka, (F)Dış koruyucu membran(Selüloz asetat), (G)O-ring

İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörden en büyük fark, ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir. Oksijen tüketimine ilişkin reaksiyonlar aşağıda verilmiştir:

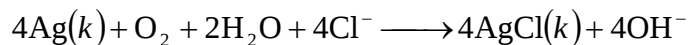
Katodik reaksiyon;



Anodik reaksiyon;



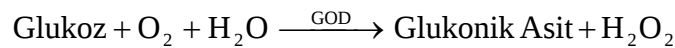
Toplam reaksiyon;



Sinyal oluşturan türün sensör yüzeyinde tüketilmesi nedeniyle, iletici ile biyoaktif tabaka ara yüzeyindeki ürün derişiminin sıfır olduğu varsayılır. Bu nedenlerden dolayı, amperometrik enzim sensörlerinde denge durumundaki reaksiyon hızı, enzim içeren biyoaktif tabakanın bir yarı geçirgen membranla çevrelenmiş olduğu koşulda, substratın söz konusu membrandan difüzyon hızına eşittir [30].

Birinci nesil enzim elektrotlar

Birinci nesil enzim elektrotların en klasik örneğini Clark ve Lyons tarafından tanımlanan ve aşağıdaki reaksiyonu esas alan sistem oluşturur.

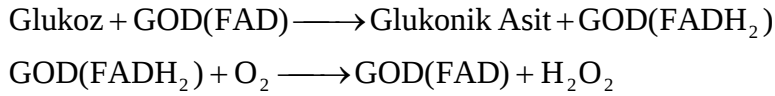


Bu sistemde reaksiyon sonucu ölçülen akım platin elektrot üzerinde oksijenin indirgenmesinden kaynaklanır ve oksijen derişiminin bir fonksiyonudur. Birincil nesil enzim elektrotlarının diğeri bir uygulaması da reaksiyon ürünü hidrojen peroksitin +0,6 V'luk sabit potansiyelde yükseltgenmesini esas alır. Bu türün en önemli avantajı diğeri nazararı değışen oksijen derişimlerinin analizde önemli bir problem yaratmaması ve daha duyarlı sonuçlar alınmasına imkan vermesidir. Buna karşılık sistemin özellikle biyolojik örneklerde askorbik asit gibi aynı potansiyelde yükseltgenebilecek türlerin girişimine açık olması önemli bir dezavantajdır. Halbuki gaz geçirgen bir membranla çevrelenmiş ve oksijenin indirgenmesini esas alan bir önceki sistemde girişim olasılığı yok denecek kadar azaltılmıştır. Son yıllarda glukoz tayinine yönelik ticari analizörlerin büyük çoğunluğu bu iki tür sistemi esas almaktadır [30].

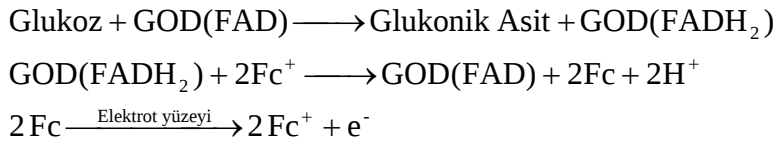
İkinci nesil enzim elektrotlar

İkinci nesil diğeri bir deyişle aracılı enzim elektrotları enzimatik reaksiyonda elektron aktarım reaktifi olarak oksijen yerine diğeri oksitleyici reaktiflerin

kullanılmasını esas alır. Buna, yine en iyi örnek olarak, glukozun glukoz oksidaz varlığında tayini verilebilir:



Glukoz oksidaz (GOD) prostetik grup olarak FAD içerir ve glukozun glukonik aside yükseltgenmesi sırasında substrattan FAD'ye elektronların transferi gerçekleşir. FADH₂'nin tekrar FAD'ye yükseltgenmesi ile rejenerasyonu elektronların oksijene aktarımıyla gerçekleşir. Aracısız sistemlerde reaksiyon oksijene bağımlıdır. Aracılı sistemlerde ise oksijen yerine başka bir elektron alıcısı kullanılarak reaksiyonun oksijene bağımlılığına son verilir. Aracı molekül olarak yaygın bir medyatör olan ferrosenin kullanılması durumunda gerçekleşen reaksiyon aşağıdaki şekildedir:



Üçüncü nesil enzim elektrotlar

Üçüncü nesil enzim elektrotlarının temelini, enzimin redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında doğrudan bir ilişki kurulması oluşturur. Bu ilişki ortam sıcaklığında metalik nitelikler gösteren organik iletken tuzlar sayesinde kurulur. N-metilfenotiyazin (NMP), tetrasiyanokinodimetan (TCN ϕ) ve tetratiofulvalen (TTP)'den hazırlanan organik iletken tuzlar sıklıkla kullanılır. Bu organik tuzlar genelde kristal olarak pellet şeklinde sıkıştırılarak veya grafit tozu ile pasta şeklinde elektrot ile kombine edilebilirler [30].

2.6.4. Enzim sensörlerinin performans faktörleri

Bir enzim sensörünü karakterize eden, onun çalışma niteliklerini ve verimini belirleyen beş temel performans faktörü vardır;

- Kararlılık
- Duyarlılık
- Seçicilik
- Yanıt süresi
- Tekrarlanabilirlik

Kararlılık

Kararlılık, biyosensörün kullanım ömrü hakkında bilgi verir. Aynı bir sensör ile çok sayıda ölçüm yapılabilmesi, iş gücü ve maliyet açısından çok önemli avantajlar sağlar. Biyosensörün ömrü, onların saklanma ve çalışma koşullarına bağlıdır.

Hibrit bir yapıya sahip olmaları nedeniyle enzim sensörlerini, hem sensör hem de enzim kararlılığı açısından değerlendirmek gerekir. Amperometrik sensörlerde özellikle yüksek potansiyelde çalışıldığında, reaksiyon ürünleri tarafından yüzeyin bozulması problemi ile karşılaşılabilir.

Enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi enzim sensörünün kararlılığını önemli ölçüde etkilemektedir. Saflık düzeyi ile kararlılık arasında doğrusal bir ilişki yoktur. Safsızlığın artması durumunda ise ilgilenilen enzimatik reaksiyonla girişim yapacak türler arası olumsuz reaksiyonların olabileceği düşünülmelidir.

Hazırlanan bir biyosensör ile rutin uygulamara geçmeden önce çalışma ve depolama kararlılığının spesifik olarak belirlenmesi gereklidir.

Duyarlılık

Kalibrasyon grafiğinde substrat derişimi ile sensör yanıtı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu bölgeye “doğrusal aralık” denir. Bu doğrusal aralığın en alt sınırı da tayin sınırı olarak tanımlanır. Potansiyometrik enzim sensörlerinde kalibrasyon grafiği, ürün derişimin logaritması ile potansiyel arasında çizilir. Amperometrik esaslı enzim sensörlerinde ise ürün derişimiyle akım arasında doğrusal grafikler elde edilir. Genelde tayin sınırının 10^{-5} M'dan daha düşük olması istenir [38].

Biyosensör yanıtını etkileyen parametrelerin sensör kalibrasyonunu etkileyeceği unutulmamalıdır. pH, sıcaklık ve girişim yapıcı türler, sensörün yanıtını bunun da tayin sınırını değiştireceği kesindir. Örneğin sıcaklık, optimum koşuldan uzaklaştığında enzim sensörünün yanıtı olumsuz yönde etkilerken, bazı kimyasal türlerin difüzyon hızlarının sıcaklıkla artması enzim sensörü yanıtında artışa sebep olur.

Aynı analit derişime karşılık ne kadar büyük yanıt elde edilirse duyarlılığın o kadar iyi olduğu söylenir.

Seçicilik

Diğer analiz sistemleri ile kıyaslandığında biyosensörler için en önemli özelliktir. Enzimler, spesifik enzimler hariç seçicilik sırasında antikor ve nükleik asitlerden sonra gelmektedir.

Seçiciliği etkileyen bazı parametreler vardır. Bunlar; sensörle girişimler, biyokatalizörle girişimler ve pH'dır. Sensörde meydana gelebilecek girişimleri önlemenin en iyi yolu örnekteki diğer maddelere yanıt vermeyen, sadece ilgili reaksiyonu izleyebilecek bir sensör kullanmaktır [39]. Amperometrik sensörler sabit bir potansiyelde çalışmalarına rağmen potansiyometrik olanlara nazaran daha spesifiktir.

Yanıt süresi

Bir biyosensör ile pratik bir işlem sonucunda kısa sürede sonuç alınabilmesi biyosensörlerin yaygınlaşmasını sağlamıştır. Bir biyosensörün yanıt süresini aşağıda belirtilen üç aşama etkilemektedir;

- Substratın analiz ortamından membran yüzeyine difüzyon hızı
- Substratın membran içine difüzyon hızı ve biyokatalizörün aktif merkezi ile ne kadar hızlı reaksiyon verdiği
- Elde edilen ürünün sensör yüzeyine ne kadar hızlı difüzyon hızıdır.

Çözeltinin karıştırılma hızı, substrat derişimi, enzim derişimi, pH, sıcaklık ve sensör yüzeyinde herhangi bir membranın kullanılıp kullanılmadığı ve kullanılıyorsa membranın niteliği ile kalınlığı ve morfolojisi yanıt süresini etkileyen başlıca unsurlardır [40].

Tekrarlanabilirlik

Enzim aktivitesi, kararlılığı ve saflık düzeyi hazırlanacak olan enzim sensörü ile tekrarlanabilir sonuçlar alınmasında oldukça önemlidir.

En basit anlamıyla tekrarlanabilirlik, aynı örnekte ard arda ölçüm yapılması ile elde edilen değerlerden sapma ve korelasyon katsayısının hesaplanmasıyla ifade edilir [41].

2.7. Kaynak Araştırması

Stefan ve arkadaşları kreatin için kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerini, kreatinin için kreatininaz, kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerini kullanarak iki enzimli ve üç enzimli amperometrik biyosensörler geliştirmişlerdir. Enzimler karbon pastaya fiziksel olarak immobilize edilmişlerdir. Biyosensör için tüm enzim çözeltileri 0,1M pH=7,6' da fosfat tamponunda hazırlanmıştır. Kreatin için en iyi cevap karakteristikleri 240 mV' da kreatinin için ise 650 mV'

da alınmıştır. Biyosensörler bir haftadan daha uzun süre hergün yapılan testlerde iyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik göstermişlerdir. Her iki biyosensörün seçiciliği, ayrı çözelti yöntemi ve karışık çözelti yöntemi kullanılarak doğrulanmıştır. Karışık çözelti yöntemi ile kreatin için amperometrik seçicilik katsayısı (pK_{amp}); ölçümler 240 mV' da yapılınc 2,09; ölçümler 650 mV' da yapılınc 2,75 bulunmuştur [5].

Yadav ve arkadaşları amperometrik kreatinin biyosensörü için keatininaz, kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerini platin elektrot yüzeyi üzerinde polianilin/karboksilatlı çok duvarlı karbon nanotüpleri (C-MWCNT / PANi) ile kaplanmış bileşik film üzerine immobilize etmişlerdir. Kreatinin biyosensörü enzim/C-MWCNT/PANi/Pt çalışma elektrodu olarak kullanılarak oluşturulmuştur. Ag/AgCl referans elektrot ve Pt tel karşıt elektrot olarak kullanılmıştır. Enzim elektrot taramalı elektron mikroskopu (SEM), FTIR ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) tarafından karakterize edilmiştir. Biyosensörün tayin seviyesi 0,1 μ M kadar düşük bulunmuştur. Optimize biyosensörün doğrusal tayin aralığı 10–750 μ M bulunmuştur. İnsan serumunda kreatinin belirlenmesi için çalışılmış ve oluşturulan biyosensör başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Biyosensör +4 °C'de saklandığı zaman 180 günün sonunda başlangıç cevabının sadece %15'ini kaybettiğini görmüşlerdir [44].

Joe Ha Shin ve arkadaşları düzlemsel mikroçip temelli amperometrik kreatinin biyosensörü geliştirmişlerdir. Hazırlanan üç tabakalı kreatinin mikrosensörü (enzim tabakası, koruyucu tabaka ve oksitleyici tabaka) cevap süresi, tayin sınırı, doğrusal aralık ve biyosensör ömrü gibi parametrelerde iyi bir performans göstermiştir. Kreatininaz, kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerinin immobilizasyonu için hidrojel içine fiziksel hapsedme, çapraz bağlama, elektropolimer filme hapsedme ve yüzeye topolojik işleme yöntemleri kullanılmıştır. Bunların arasından hidrojel içine fiziksel tutuklama yöntemi seçilmiştir. Redoks aktif interferans maddeleri redoks inaktif ürünlere dönüştürerek girişimlerin üstesinden gelmek için koruyucu membran

üzerinden ek bir oksitleyici tabaka konulmuştur. PbO_2 , CeO_2 ve MnO_2-PbO_2 gibi çözünmez oksitleyici ajanlardan PbO_2 'nin girişimleri gidermede en iyi performansı gösterdiği bulunmuştur. Biyosensörün cevap süresi 98 saniye, tayin sınırı $0,8\mu M$ olarak bulunmuştur. Doğrusal cevap aralığı $1-1000\mu M$ arası bulunmuştur. Biyosensör ömrünün yaklaşık 35 gün olduğuda belirtilmiştir [45].

Erden ve arkadaşları kreatin tayini için yeni biri enzim elektrot hazırlamışlardır. Platin / Polivinilferrosen çalışma elektroda kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerini immobilize etmişlerdir. Enzimlerin immobilizasyonu için adsorpsiyon, glutaraldehite daldırma ve çapraz bağlama olmak üzere üç farklı yöntem denemişlerdir. En iyi immobilizasyon yönteminin çapraz bağlama olduğuna karar vermişlerdir. Kreatin tayini enzimatik olarak oluşan hidrojen peroksitin $0,7\text{ V'}$ da yükseltgenmesine dayanmaktadır. Enzim elektrodun cevabına pH, sıcaklık, enzim oranı ve tampon derişiminin etkisini araştırmışlardır. Enzim elektrodun doğrusal çalışma aralığını $2,0 \times 10^{-5}\text{ M} - 3,2 \times 10^{-4}\text{ M}$, cevap süresini 30-50 saniye olarak belirlemişlerdir. Enzim elektrot için pH, sıcaklık, enzim oranı ve tampon derişimini sırasıyla 7,5; $37^\circ C$; 1:3 (SO/Cl) ve 0,05M olarak bulmuşlardır. Elektrodun raf ömrünü yaklaşık olarak 15 gün bulmuşlardır [46].

Khan ve arkadaşları üç enzimin adsorpsiyonuna dayanan yüksek duyarlıklı amperometrik kreatinin sensör geliştirmişlerdir. Elektrotlar platin siyahının geçirgen bir elektroiletken polimer film (polianyon uyuşmuş polipirol) üzerinde elde edilmiştir. Çoklu enzim (kreatininaz, kreatinaz ve sarkozin oksidaz) sistemi platin siyahı matriksine adsorbe edilmiştir. Enzim adsorbe edilmiş film kurutulduktan sonra 90 saniye glutaraldehite daldırarak çapraz bağlama gerçekleştirilmiştir. Sensör performansı $25^\circ C$ 'de Ag/AgCl elektroda karşı $0,4\text{ V'}$ luk sabit polarize potansiyel sağlanarak batch analiz ve stop flow analiz yöntemleri kullanılarak ölçülmüştür. Geliştirilen sensörlerin duyarlılığı sarkozin oksidazın kaynağına, hazırlama koşullarına, üç enzimin oranına ve platin

siyahın yüklemesine bağlı olduğu bulunmuştur. Çalışmada 1-2 μM 'lık tayin sınırıyla 5 mM seviyesine kadar doğrusal aralık elde edilmiştir [47].

Yamoto ve arkadaşları kreatinin tayini için kreatininaz , kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerini aktif bir polipirol matrikse immobilize ederek bir enzim elektrot yapmışlardır. Ayrıca platin, sülfatlanmış fenoksi reçine (S-PHE) ile uyuşmuş polipirol ile birlikte bir çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır. Enzim tabakasının hazırlanması için fosfat tamponu, pirol ve enzimlerden oluşan elektrolit çözelti kullanılmış ve enzim immobilizasyonu + 800 mV' da karıştırılmış çözeltide potansiyostatik olarak gerçekleştirilmiştir. Sensör hazırlamak için PPy / S-PHE temel elektrot olarak kullanıldığında + 400 mV' da Ag / AgCl elektroda karşı temel elektrot olarak platin elektrodun kullanıldığı çalışmalara göre daha yüksek cevaplar elde edilmiştir. Deneylerde polianyonik dopantlar arasında kullanılan, poli(stiren sülfonat) (PSS) , kısmen sülfatlanmış poli(hidroksi metakrilat) ve vinil alkol ile vinil asetatın kısmen sülfatlanmış kopolimeri (S-VA-VAC) 'den daha üstün kılınmıştır. Yani PSS kreatinine en yüksek cevabı vermiştir. Enzim çözeltilerdeki sarkozin oksidaz derişiminin sensör cevabına etkisi araştırılmış ve 5 mg/mL 'lik sarkozin oksidaz derişimi optimum değer olarak bulunmuştur [48].

Madaras ve arkadaşları serumdaki kreatin ve kreatinin belirlenmesi için amperometrik minyatür enzim elektrotlar geliştirmişlerdir. Kreatin sensörü kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerini içerir. Kreatinin sensörü ise ek olarak kreatininaz enziminide içerir. Enzimatik tabakaya enzimlerin bovine serum albumin (BSA) varlığında glutaraldehit ile çapraz bağlaması ile elde etmişler ve iki diyaliz membran arasına yerleştirmişlerdir. Ayrıca enzim yüklemelerinin optimizasyonu için çeşitli büyüklükteki makro elektrotlarda geliştirmişlerdir. Tüm çalışmaları pH=7,3 fosfat tamponunda $25 \pm 0,2$ °C' de gerçekleştirmişlerdir. Biyosensörlerin 2mM'lık derişime kadar doğrusal bir aralık gösterdiğini, duyarlılıklarının iyi olduğunu ve biyosensörlerin en az 3 ay kararlı olduklarını bulmuşlardır. Kreatin ve kreatinin biyosensörlerinin

kontrolünü insan serumlarında test etmişler ve tayin sınırlarının sırası ile 20 μM ve 30 μM olduğunu görmüşlerdir [49].

Tiwari ve arkadaşları kreatin biyosensörü için çitozan - g – polianilin filme bir kreatinaz enzimi immobilize etmişlerdir. Kreatinazın immobilizasyonunu araştırmak için çitosan–aşı–polianilin (CHIT-g-PANİ)'in yeni bir matrikse bileşimini elektrokimyasal olarak hazırlamışlardır. Kreatinaz enzimini CHIT-g-PANİ matriks yüzeye glutaraldehiti bir bağlayıcı olarak kullanarak kovalent olarak immobilize etmiştir. Daha sonra CA/CHIT-g-PANİ biyomatrikisi atomik kuvvet mikroskopisi (AFM), temas açısı, FTIR ve dönüşümlü volatmetri (CV) gibi yüzey analizleri tarafından karakterize edilmiştir. Matriks içinde kreatinaz enzim aktivitesinde çeşitli parametrelerin (pH, sıcaklık ve zaman) etkileri araştırılmıştır. Çalışmalar sonucu optimum pH=7,0; optimum sıcaklık ise 30 – 32 °C arası bulunmuştur. CA/CHIT-g-PANİ enzim elektrodu + 4 °C' de 300 gün kadar saklandığı bulunmuştur. Kreatinaz enzimi için Micheal Menten sabiti $K_m = 0,51 \text{ mM}$ olarak hesaplanmıştır [50].

Kim ve arkadaşları kalın film karbon elektrodu kullanarak amperometrik kreatinin sensörü geliştirmişlerdir. %10 platin tozu içeren karbon pasta kalın film, karbon elektrotların aktivasyonu için saf oksijen atmosferinde UV ışınları ile ışınlanmıştır. Çalışmada hidrojen peroksitin kalın film elektrotlarda yükseltgenmesi incelenmiş ve 500 mV' dan daha yüksek potansiyellerde çalışıldığı zaman akımların yüksek olduğu görülmüştür. Bu yüzden çalışma potansiyeli olarak 500 mV seçilmiştir. Oksijen ile muamele edilmiş elektrotların hidrojen peroksit duyarlılığının oksijen ile muamele edilmemiş elektrotlardan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Kreatininaz, kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerinden oluşan ince tabaka, enzimlerin kalın film karbon elektrodunun üzerine dökülmesiyle elde edilmiştir. Sensör 0,1 M pH= 7,5 fosfat tamponunda kreatinin için 0,2 – 2 mM arasında yüksek duyarlıklı doğrusal cevap verdiği gözlenmiştir. Oksijen plazma tedavisinde kalın film elektrotlarının etkili geliştirici voltametrik davranışı bulunmuştur [51].

Hsiue ve arkadaşları bir immobilize çoklu enzimli membranın ince katmanı ile birlikte bir platin / gümüş kaplı elektrotundan oluşturulan amperometrik kreatinin biyosensörü çalışılmıştır. Poliakrilik asit aşırı kopolimerizasyonu tarafından gözenekli polipirrolün membran yüzeyinde tedavi organ plazma üzerine koyulmuştur. Daha sonra kreatininaz, kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimleri bu yeni aşırı membran yüzeye immobilize edilmiştir. Bu çoklu enzim membran 4 °C'de saklanmıştır. Sensörün performansı biyokimyasal analizler ile birlikte değerlendirilmiştir. Ayrıca bu reaksiyonların ilerleyişini teyit etmek için ATR / FTIR, kimyasal analizler için elektron spektroskopisi (ESCA) ve taramalı elektron mikroskopisi (SEM) gibi yüzey özelliklerinin analizleri yapılmıştır. Geliştirilen biyosensör 0,1 M pH=7,4 fosfat tamponunda kreatinin için doğrusal tayin aralığı 3,2 – 320 µM bulunmuştur. Immobilize enzim membranı en az 3 hafta kullanılmıştır [52].

Ramanavicius yaptığı çalışmada kreatinin belirlenmesi için bir amperometrik biyosensör geliştirmiştir. Karbon çubuk elektrot yüzeyine kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerini glutaraldehitin buharı altında çapraz bağlama ile kaplamıştır. 400 mV potansiyelde analitik sinyalin amperometrik belirlenmesinde $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ medyatörü kullanılmıştır. Biyosensörün cevap süresi 1 dakikadan daha az bulunmuştur. Biyosensör fizyolojik kreatin konsantrasyon seviyelerinde kreatin konsantrasyonunun sinyal doğrusallığını göstermiştir. 3,5 mM' dan daha yukarda bir doğrusallık bulunmuştur. Optimum pH, 0,1 M Tris-HCl tamponunda 8 olarak bulunmuştur. Biyosensörün yarı ömrü 20 °C' de pH=8' de 0,1 M Tris-HCl tamponunda 8 gün olarak bulunmuştur [53].

Karakuş ve arkadaşları kreatinin belirlenmesi için palmitik asit içeren polivinilklorür (PVC) membrana potansiyometrik yöntemle iki enzimli biyosensör yapmışlardır. Üreaz ve kreatinaz enzimlerini palmitik asit içeren PVC amonyum membran elektroda immobilize ederek kreatin biyosensörünü hazırlamışlardır. Karboksilatlı PVC kullanılarak hazırlanan biyosensör ile karşılaştırılması yapılmıştır. Elektrodun analitik karakteristikleri

araştırılmıştır. Biyosensörün kreatine verdiği cevapta enzim immobilizasyon prosedürleri, pH, tampon konsantrasyonu, sıcaklık, enzim oranı ve karıştırma hızının etkisi araştırılmıştır. Ayrıca biyosensörün doğrusal çalışma aralığı ve duyarlılığı belirlenmiştir. Palmitik asit içeren PVC membran kullanılarak hazırlanan biyosensörün daha etkili bir performans gösterdiği bulunmuştur. Ek olarak serumda kreatin deneyleri standart ekleme yöntemi kullanılarak başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Bu sonuçlar % 95 güven düzeyinde jaffe yöntemiyle bulunan sonuçlar ile uyum içerisinde olduğu bulunmuştur [54].

Tsuchida ve arkadaşları kreatin ve kreatininin belirlenmesi için kreatininaz, kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerini kullanarak enzim elektrotlar geliştirmişlerdir. Bu enzimler selüloz asetat membranının gözenekli kısmına çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edilmiştir. Bu çoklu enzim elektrotların her ikisinde hidrojen peroksit duyarlı polarografik bir elektrodun immobilize enzim membranı ile birleştirilmesiyle hazırlanmıştır. Çoklu enzim elektrotları kreatin ve kreatinine 100 mg/L' kadar doğrusal cevap göstermiştir. Elektrotların cevap süresi 20s ve tayin sınırı 1 mg/L olarak bulunmuştur. Elektrotların çok kararlı olduğu ve 11 gün sonunda 500 deneyden sonra elektrodun aynı performansını koruduğu gözlenmiştir. Elektrotlar +4 °C' de saklanmıştır ve 9 ay sonunda immobilize enzimlerin aktivitesinde kayıp olmadığı gözlenmiştir. Elektrotlar insan serumu numunelerindeki kreatininini belirlemede kullanılmış ve elde edilen sonuçlar jaffe yöntemi ile elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında çok iyi bir uyum göstermiştir [55].

Walsh ve arkadaşı biyolojik sıvılarda kreatinin belirlenmesi için elektrokimyasal, elektroforetik ve spektrofotometrik yöntemleri karşılaştırmıştır. Kreatinin kantitatif analizini elektrokimyasal akış hücresi bazlı biyosensör ve misel elektrokinetik kromatografi (MEKC) ayırma yönteminin ikisinde kullanarak başarmıştır. Kreatinin biyosensörü bir platin elektroda glutaraldehit ve bovine serum albumin (BSA) kullanılarak kreatininaz, kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerinin immobilize edilmesiyle yapılmıştır. Ölçümler 0,7 V' da Ag/AgCl elektroda karşı

yapılmıştır. Biyosensör bir akış hücresi içine 4,5 μM tayin sınırı, 1 dakika cevap zamanı, 0-500 μM çalışma aralığı ve % 1,14 hassasiyetle birlikte idrar örneklerinde kreatinin konsantrasyonunun hızlı bir tayini için yapılan beş idrar örneğinde alınan ölçümler ile jaffe yöntemiyle yapılan ölçümler karşılaştırılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda spektrofotometrik yöntem ile bulunan sonuçların akış hücresi yöntemiyle bulunan sonuçlardan % 36,7 daha iyi olduğu bulunmuştur. Ayrıca kreatinin belirlenmesi için serum analizleri için MEKC yöntemi geliştirilmiş ve çalışılmıştır. Bu yöntem ile tayin sınırı 11,5 μM ve çalışma aralığı 0-4,4 mM arası bulunmuştur. MEKC yöntemi böbrek diyalizine bağlı hastalardan alınan kan örneklerinde kreatinin belirlenmesi için uygulanmış ve jaffe yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Jaffe yöntemiyle oluşturulan ortalama deperleri MEKC yöntemiyle bulunan sonuçlardan % 26,7 daha yüksek olduğu bulunmuştur [56].

Tombach ve arkadaşları hemodiyaliz hastaları için amperometrik kreatinin biyosensörü geliştirmiştir. Kreatinin belirlenmesi için kreatininaz, kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimleri immobilize edilmiştir. Immobilize işlemi çapraz bağlama yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Enzimatik olarak oluşturulan hidrojen peroksit bir platin çalışma elektrotta amperometrik olarak bulunmuştur. İnsan serumundaki girişim yapan maddelerden gelen sinyalleri önlemek için ek bir nafyon membranla modifiye edilmiştir. Sensör kreatinin için 0,06 - 1,7 mg/dL'lik bir doğrusal tayin aralığı göstermiştir. Ölçümler 0,05 M fosfat tamponunda pH=7,5' de 22 °C' de +600 mV potansiyelde yapılmıştır. Sensörün duyarlılığı 0,45 $\mu\text{Acm}^{-2}/\text{mgdL}^{-1}$ olarak bulunmuştur [18].

Yadav ve arkadaşları kreatinin belirlenmesi için demir oksit nanopartikül/çitosan-g-polianilin modifiye edilmiş platin elektroda kreatininaz, kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerini immobilize etmiştir. Immobilizasyon işlemi glutaraldehit ile birlikte çapraz bağlama yöntemiyle yapmışlardır. Fe_3O_4 -NPs elektrodunun karakterizasyonu transmisyon elektron mikroskopu (TEM) kullanılarak yapılmıştır. Kreatin biyosensörü için enzimler/ Fe_3O_4 -NPs/CHIT-g-PANI/Pt çalışma elektrodu olarak, Ag/AgCl referans elektrot ve

Pt tel ise karşıt elektrot olarak kullanılmıştır. Biyosensörün karakterizasyonu ise dönüşümlü voltametri (CV), taramalı elektron mikroskopu (SEM), FTIR, spektroskopik ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) kullanılarak yapılmıştır. Biyosensör 0,4 V potansiyelde optimum pH' 7,5; sıcaklığı 30 °C ve cevap süresi 2s olarak bulunmuştur. Kreatinin konsantrasyon çalışma aralığı 1 – 800 μM olarak bulunmuştur. Biyosensörün duyarlılığı $3,9 \mu\text{Mcm}^{-2}$ ve tayin sınırı $1\mu\text{M}$ bulunmuştur. Kreatinin için Micheal-Menten sabiti (K_m) 0,17 mM bulunmuştur. Biyosensörün 200 gün sonunda 120 ölçümden itibaren performansının % 10' unu kaybettiği görölmüştür [57].

Işıldak ve arkadaşları kreatininin belirlenmesi için yüksek hassasiyetli ve kararlı yeni bir konduktometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Geliştirilen biyosensör katı hal temas amonyum duyarlı sensör bazlı bir biyosensördür. Kreatininaz enzimi katı hal temas amonyum seçici membrana glutaraldehit üzerinden kovalent olarak kimyasal olarak immobilize edilmiştir. Geliştirilen konduktometrik kreatinin biyosensörü kreatinine karşı kısa cevap süresi yüksek duyarlılık göstermiştir. Biyosensörün tayin sınırı 2×10^{-6} M ve cevap süresi 10s' den daha kısa bulunmuştur. Tüm bu ölçümler pH=7,2 fosfat tamponunda yapılmıştır. Biyosensörün doğrusal dinamik çalışma aralığı 1×10^{-1} M ile 9×10^{-6} M arası bulunmuştur. Biyosensör 4-6 °C' de depolanarak en az 4 hafta süresince iyi ölçümler göstermiştir. Biyosensörün tekrarlanabilirliği ve kararlı cevabı en az 10 saat çalıştığında bile performansının iyi olduğunu göstermiştir. Bağıl standart sapması % 0,5 (n=48) olarak hesaplanmıştır [58].

Raluca ve arkadaşları kreatin ve kreatinini belirlemek için amperometrik elmas pasta biyosensörleri hazırlamışlardır. İki enzimli biyosensör kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimleri kullanılarak kreatin deneyleri yapılmıştır. Üç enzimli biyosensör ise kreatininaz, kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimleri kullanılarak hazırlanmıştır ve kreatinin deneyleri yapılmıştır. Kreatin biyosensörünün çalışma potansiyeli 200 mV, kreatinin biyosensörünün çalışma potansiyeli ise 400 mV olarak belirlenmiştir. Kreatin biyosensörünün

Çalışma aralığı $4 \times 10^{-4} \text{ M} - 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ve tayin sınırı $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ olarak bulunmuştur. Kreatinin biyosensörünün çalışma aralığı $2 \times 10^{-4} \text{ M} - 2 \times 10^{-3} \text{ M}$ ve tayin sınırı ise $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ olarak bulunmuştur. Tüm ölçümle pH=7,6 fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan amperometrik biyosensörler serum ve ilaç hammadde ürünlerinde kreatin ve kreatinin belirlenmesi için son derece güvenilir olduğu saptanmıştır [59].

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Cihazlar ve Malzemeler

3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

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

3.1.2. Hücre ve elektrotlar

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



Şekil 3.1. Kaplama ve ölçümde kullanılan hücre sistemi

3.1.3. pH metre

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

3.1.4. Su banyosu

Isıtma, soğutma ve sabit sıcaklık çalışmalarının gerektiği durumlarda Grant GD120 marka termostatlı dolaşımli su banyosu kullanıldı.

3.1.5. Mikro pipet

5 µL – 500 µL ve 100 µL – 1000 µL çözelti ilaveleri için Bland marka $\pm 0,05$ µL hassasiyeti olan mikro pipetler kullanıldı.

3.1.6. Argon gazı

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

3.1.7. Saf su

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

3.1.8. SEM cihazı

Gazi Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Metal bölümünde JEOL JSM-6060 LV markalı cihazda elektrotların yüzey fotoğrafları elde edildi.

3.1.9. AFM cihazı

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik bölümünde Omicron AFM/STM kombine sistem markalı cihazda elektrotların yüzey fotoğrafları elde edildi.

3.1.10. FTIR cihazı

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümünde Thermo Nicolet 670 marka (ABD) MCT dedektörlü FTIR spektrometresinde elektrotların yüzey analizi yapıldı.

3.1.11. Temas açısı cihazı

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümünde flaş kamera aksesuarlı Krüss DSA100 markalı cihazda elektrotların yüzey fotoğrafları elde edildi.

3.1.12. Elipsometre cihazı (Film kalınlığının ölçülmesi)

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümünde DRE EL X-02C Ratzeburg markalı cihazda elektrotların yüzey kalınlığı belirlendi.

3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri

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

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

Kimyasal Madde	Saflık Derecesi	Temin Edildiği Firma
Pirol	%98	Aldrich
Polivinilsülfonat	%25	Aldrich
Kreatin	%98	Sigma-Aldrich
Sodyum perklorat (NaClO_4)	%98	Sigma-Aldrich
Sodyum monohidrojen fosfat(NaHPO_4)	%99	Merck
Sodyum dihidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	%99	Merck
Sodyum hidroksit (NaOH)	%99	Aldrich
Hidroklorik asit (HCl)	%36,5	BDH
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	%35	Merck
Ürik asit ($\text{C}_5\text{N}_4\text{O}_3\text{H}_4$)	% 99	Sigma
Askorbik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)	% 99,7	Carlo Erba
Parasetamol (Asetaminofen)	% 99,4	
Glisin ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)	%98,5	Kimetsan
Üre	%99,8	Carlo Erba
Formaldehit	%37	Merck

3.2.1. Kullanılan çözeltiler

Hidrojen peroksit: % 35'lik $\delta=1,13$ g/mL olan hidrojen peroksitten 255 μL alınarak derişimi 0,1 M olacak şekilde 25 mL stok çözelti hazırlandı. 25'er mL $1,0 \times 10^{-3}$ M ve $1,0 \times 10^{-5}$ M hidrojen peroksit çözeltileri de suyla seyreltilerek hazırlandı.

Fosfat tamponu: Monosodyum hidrojen fosfat ve disodyum hidrojen fosfattan sırasıyla 2,310 ve 11,818 gram tartılarak saf suda çözüldü, hazırlanan çözeltinin pH' sı 1,0 M NaOH ve 1,0 M HCl ile 7,5'a ayarlandı ve çözeltideki analitik derişimi 0,1 M olacak şekilde seyreltildi. Farklı pH ve derişimlerdeki tampon çözeltileri hazırlamak için aynı yol izlendi. Tampon çözelti buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi.

Kreatinaz enzim çözeltisi: Toplam aktivitesi 1000 ünite olan kreatinaz enzimi alındı ve saf suda çözüldükten sonra hacim ölçülü balonda 10 mL'ye

tamamlandı (100 ünite/mL). Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında bekletildi. Uzun süre kullanılmadığı zaman çözelti derin dondurucuda muhafaza edildi.

Sarkozin oksidaz enzim çözeltisi: Toplam aktivitesi 1000 ünite olan sarkozin oksidaz enzimi alındı ve saf suda çözüldükten sonra hacim ölçülü balonda 10 mL'ye tamamlandı (100 ünite/mL). Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında bekletildi. Uzun süre kullanılmadığı zaman çözelti derin dondurucuda muhafaza edildi.

Kreatin çözeltisi: 0,3728 gram kreatin tartılarak fosfat tamponunda 0,1M 25 mL stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden belirli bir miktar alınarak ve aynı şekilde 0,1 M fosfat tamponuyla seyreltilerek 25'er mL $1,0 \times 10^{-2}$ M, $1,0 \times 10^{-3}$ M, $1,0 \times 10^{-4}$ M ve $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatin çözeltileri hazırlandı. Farklı pH'larda kreatin çözeltisi hazırlamak için 0,1 M fosfat tamponu, 1 M NaOH ve 1 M HCl ile istenilen pH'lara ayarlandı ve aynı yol izlendi. Hazırlanan kreatin çözeltisi tazeliğini 7 gün muhafaza etti. Bu süre içinde kreatin çözeltisi buzdolabında muhafaza edildi.

Askorbik asit çözeltisi: Katı askorbik asitten 0,440 gram tartılarak fosfat tamponunda 0,1 M 25 mL stok askorbik asit çözeltisi hazırlandı. Farklı derişimlerdeki askorbik asit çözeltileri stok çözeltiden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

Ürik asit çözeltisi: Katı ürik asitten 0,395 gram tartılarak 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisinde çözüldükten sonra fosfat tamponu eklenerek $5,0 \times 10^{-3}$ M 25 mL stok ürik asit çözeltisi hazırlandı.

Parasetamol çözeltisi (asetaminofen): Katı parasetamolden 0,1511 gram tartılarak, fosfat tamponunda 0,1 M 10 mL stok parasetamol çözeltisi hazırlandı. Farklı derişimlerdeki parasetamol çözeltileri stok çözeltiden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

Glisin çözeltisi: Katı glisinden 0,1876 gram tartılarak, fosfat tamponunda 0,1 M 25 mL stok glisin çözeltisi hazırlandı. Farklı derişimlerdeki glisin çözeltileri stok çözeltiden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

Üre çözeltisi: Katı üreden 0,1501 gram tartılarak, fosfat tamponunda 0,1 M 25 mL stok üre çözeltisi hazırlandı. Farklı derişimlerdeki üre çözeltileri stok çözeltiden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

Formaldehit çözeltisi: %37'lik sıvı formaldehitten 500µL alınarak derişim 0,1M olacak şekilde 50 mL stok çözeltisi hazırlandı. Farklı derişimlerdeki formaldehit çözeltileri stok çözeltiden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek hazırlandı.

Sodyum perklorat çözeltisi: Katı sodyum perklorattan 12,25 gram tartılıp 1 M 100 mL NaClO_4 çözeltisi hazırlandı.

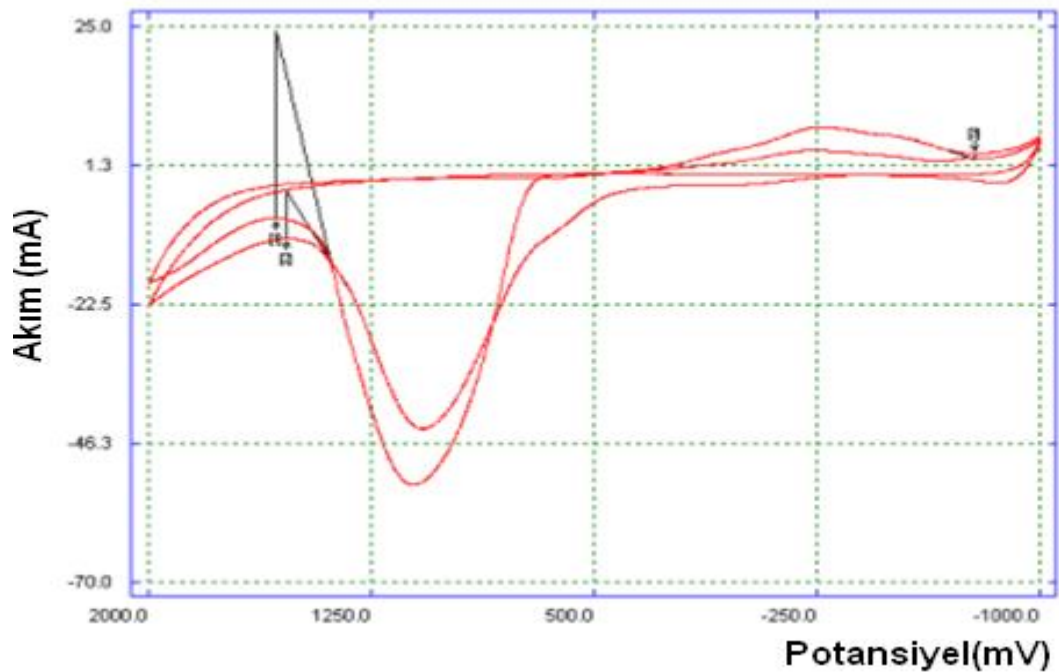
Sodyum hidroksit çözeltisi: Katı sodyum hidroksitten 1,01 gram tartılıp saf suda çözülerek 1 M 25 mL NaOH çözeltisi hazırlandı.

Hidroklorik asit çözeltisi: Derişik HCl'den 2,3 mL alınıp saf su ile seyreltilerek 1 M 25 mL HCl çözeltisi hazırlandı.

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

Elektrot yüzeyinin temizlenmesi: Kaplama işleminden önce platin levhanın yüzeyi mekanik, kimyasal ve elektrokimyasal olarak temizlendi. İlk olarak platin yüzeyi sıfır numara zımpara ile parlatıldı, daha sonra aleve tutuldu. 5 dakika süre ile aseton, etil alkol, derişik HCl ve derişik nitrik asit içerisinde bekletildi. Tekrar saf su ile yıkandı, kurutuldu ve yüzeydeki su uzaklaştırıldı. Her kaplama işleminden önce yüzey bu şekilde temizlendi [60].

Temizlenmiş Pt levha elektrodunun yüzeyi polipirrol-polivinilsülfonat film ile kaplandı. Polipirrol, elektrot yüzeyine pirolün elektropolimerleşmesi ile biriktirildi. Elektropolimerleşmede üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Çalışma elektrodu olarak platin levha(0,5 cm²), karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak da Ag/AgCl elektrot kullanıldı. Polipirrol-polivinilsülfonat film elde etmek amacıyla pirolün hücre içi derişimi 0,1 M olacak şekilde 71 µL pirol, 2,5 mL polivinilsülfonat (%25), 7,43 mL saf su eklenmesiyle toplam 10 mL'lik bir çözelti hazırlandı. Bu çözeltiye temizlenmiş platin elektrot daldırıldı ve 10 dakika argon gazı geçirilerek çözeltideki oksijen uzaklaştırıldı. Elektropolimerizasyon işlemi dönüşümlü voltametri tekniği ile -1,0V ile +2,0V potansiyelleri arasında 50 mV/s tarama hızında 4 dönüşümde yapıldı [61]. Kaplama işleminden sonra elektrot yüzeyi saf su ile yıkanarak yüzeye bağlanmayan monomerlerden ve kirlilikten arındırıldı [62]. Böylece platin/polipirrol-polivinilsülfonat (Pt/PPy-PVS) elektrot hazırlandı. Çalışmalarda kullanılmak üzere tampon çözeltide bekletildi.



Şekil 3.2. Pt/PPy-PVS film elektrodunun voltamogramı

3.3.1. Pt/PPy-PVS film elektrodun SEM analizi

Bölüm 3.3' de hazırlanan film elektrodun SEM analizi yapılmak için değişik fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasında en uygun olan görüntü seçildi (Şekil 4.7).

3.3.2. Pt/PPy-PVS film elektrodun AFM analizi

Bölüm 3.3' de hazırlanan film elektrodun AFM analizi yapılmak için değişik fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasında en uygun olan görüntü seçildi (Şekil 4.9).

3.3.3. Pt/PPy-PVS film elektrodun temas açısı analizi

Bölüm 3.3' de hazırlanan film elektrodun temas açısı analizi yapılmak için değişik fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasında en uygun olan görüntü seçildi (Şekil 4.11).

3.3.4. Pt/PPy-PVS film elektrodun kalınlığının ölçülmesi (Elipsometre)

Bölüm 3.3' de hazırlanan film elektrodun kalınlığı elipsometre cihazı ile ölçüldü.

3.3.5. Pt/PPy-PVS film elektrodun FTIR analizi

Bölüm 3.3.' de hazırlanan film elektrodun yapısal karakterizasyonu FTIR spektrometresi ile ölçüldü ve spektrum pikleri elde edildi (Şekil 4.13).

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

Bölüm 3.3'de hazırlanan Pt/Polipirol-polivinilsülfonat elektrot, Ag/AgCl referans elektrodu ve platin tel; 9 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 1 mL 1 M NaClO₄ çözeltisinin içine daldırıldı. Çalışma elektrodu 0,4 V sabit

potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra artan derişimlerde hidrojen peroksit ilaveleri yapıldı. Her ilave sonunda hücre içerisi 600 s karıştırılıp, karıştırmanın bitiminden itibaren 200 s sonrasındaki akım ölçüldü. Okunan akımlar ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için Δi değerleri hesaplandı. Elde edilen Δi değerleri hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.2).

3.5. Platin/Polipirol-polivinilsülfonat Elektrodunun Serbest Enzim Varlığında Kreatine Duyarlılığının Belirlenmesi

Hazırlanan çalışma elektrodu 8,7 mL tampon çözeltisi 1 mL sodyum perklorat (NaClO_4) bulunan çözeltiye daldırılarak +0,4 V sabit potansiyelde dengeye getirildi. Ardından 150 μL Kreatinaz (CI) ve 150 μL Sarkozin Oksidaz (SO) enzim çözeltiilerinden ilave edilerek, enzimli ortamda dengeye gelmesi beklendi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra artan derişimlerde kreatin ilaveleri yapıldı. Her ilavede çözelti 600 saniye karıştırıldı, 200 saniye akım okundu. Okunan akımlar ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için Δi değerleri hesaplandı. Elde edilen Δi değerleri kreatin derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.3).

3.6. Tutuklama Yöntemi ile Pt/PPy-PVS-CI-SO Biyosensörünün Hazırlanması

Platin elektrot yakma ve asitte bekletme işlemlerinden sonra zımparalanıp saf su ile temizlendi. Ardından hücre içerisine 6,43 μL saf su, 71 μL pirol, 2,5 mL polivinilsülfonat, 0,5 mL kreatinaz (100U/mL) ve 0,5 mL sarkozin oksidaz (100U/mL) enzimleri ilave edilerek 10 mL'lik bir hücre hazırlandı. Hücreden 10 dakika argon gazı geçirilerek oksijen uzaklaştırıldı. Daha sonra dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak -1,0V ile +2,0 V arasında 50 mV/s tarama hızında 4 çevrim alınarak CV taraması yapıldı. Kaplanan elektrot saf suyla yıkandı ve tampon çözelti içerisinde bir süre bekletildi. Tampon çözelti ve destek elektrolit ihtiva eden hücre sisteminde dengeye getirildi. Dengeye gelen sisteme artan kreatin konsantrasyonlarında ölçümler alındı. Okunan

akımlar ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için Δi değerleri hesaplandı. Elde edilen Δi değerleri kreatin derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.4).

3.7. Çapraz Bağlama Yöntemi ile Pt/PPy-PVS-CI-SO Biyosensörünün Hazırlanması

Hazırlanan Pt/PPy-PVS elektrodunun yüzeyi saf su ile yıkandıktan sonra, 60 μ L % 2,5'luk Glutaraldehit (GA), 1 mg BSA, CI ve SO enzimlerini ihtiva eden çözeltiden elektrodun her iki yüzeyine de eşit miktarda damlatılarak kuruyana kadar bekletildi [68]. Kuruyan Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörün yüzeyi bol saf su ile yıkandı. Biyosensör kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında +4 °C'de fosfat tamponunda bekletildi.

3.8. Pt/PPy-PVS-CI-SO Biyosensöründe Cevap Akımı Üzerine Enzim Oranlarının Etkisi

Hazırlanan Pt/PPy-PVS elektrota enzimler çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edildikten sonra bu iki enzimin birbirine göre oran çalışmasına geçildi. Enzimlerin hücre içi üniteleri sırasıyla; CI ve SO enzimlerinin hücre içi üniteleri birbirlerine eşit, SO enzim miktarı CI enzim miktarının iki katı, SO enzim miktarı CI enzim miktarının üç katı, CI enzim miktarı SO enzim miktarının iki katı, CI enzim miktarı SO enzim miktarının üç katı olacak şekilde elektrotlar hazırlandı. Ayrı ayrı hazırlanan her beş elektortda sisteme konularak dengeye getirildi. Her beş ortam içinde artan derişimlerde kreatin ilaveleri yapıldı. İlaveler sonrası 600 s karıştırılıp, 200 s akım okundu. Okunan akımlar ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için Δi değerleri hesaplandı. Elde edilen Δi değerleri kreatin derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.5).

3.9. Pt/PPy-PVS-CI-SO Biyosensöründe Cevap Akımı Üzerine Enzim Miktarlarının Etkisi

Hazırlanan Pt/PPy-PVS elektrotta enzimler immobilize edilip enzimlerin birbirlerine oranı belirlendikten sonra enzim miktarı çalışmasına geçildi. 50 μ L CI ve 50 μ L SO enzimleri kullanılarak biyosensör hazırlandı ve dengeye getirilerek denge akımları kaydedildi. Daha sonra 600 s karıştırılıp 200 s akım okundu. Aynı işlemler 100 μ L CI ve 100 μ L SO, 150 μ L CI ve 150 μ L SO, 200 μ L CI ve 200 μ L SO enzimleri ile yapılarak tekrarlandı. Okunan akımlar ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her dört sistem için elde edilen Δi değerleri grafiğe geçirildi. Elde edilen Δi değerleri kreatin derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.6).

3.9.1. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün SEM analizi

Bölüm 3.9 'daki gibi hazırlanan biyosensörün SEM analizi yapılmak için değişik fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasında en uygun olan görüntü seçildi. Pt/PPy-PVS film elektrot ile Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörün SEM fotoğrafları karşılaştırıldı (Şekil 4.8).

3.9.2. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün AFM analizi

Bölüm 3.9 'daki gibi hazırlanan biyosensörün AFM analizi yapılmak için değişik fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasında en uygun olan görüntü seçildi. Pt/PPy-PVS film elektrot ile Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörün AFM fotoğrafları karşılaştırıldı (Şekil 4.10).

3.9.3. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün temas açısı analizi

Bölüm 3.9 'daki gibi hazırlanan biyosensörün temas açısı analizi yapılmak için değişik fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasında en uygun olan görüntü seçildi. Pt/PPy-PVS film elektrot ile Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörün temas açısı fotoğrafları karşılaştırıldı (Şekil 4.12).

3.9.4. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün film yüzey kalınlığının ölçülmesi (Elipsometre)

Bölüm 3.9 'daki gibi hazırlanan biyosensörün yüzey kalınlığı elipsometre cihazı ile ölçüldü. Pt/PPy-PVS film elektrot ile Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün film kalınlıkları karşılaştırıldı.

3.9.5. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün FTIR analizi

Bölüm 3.9' daki gibi hazırlanan biyosensörün yapısal karakterizasyonu FTIR spektrometresi ile ölçüldü ve spektrum pikleri elde edildi. Pt/PPy-PVS film elektrot ile Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün spektrum pikleri karşılaştırıldı (Şekil 4.14).

3.10. Biyosensörün Kreatine Duyarlılığının Belirlenmesi

Bölüm 3.9'daki gibi hazırlanan biyosensörün kreatine duyarlılığının belirlenmesi için üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Üçlü elektrot sisteminde çalışma elektrodu olarak hazırlanan biyosensör, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot, karşıt elektrot olarak ise platin tel kullanıldı. Elektrokimyasal hücreye fosfat tamponundan 9 mL ve 1 M'lık sodyum perklorat çözeltisinden 1 mL konuldu. 0,4 V sabit potansiyelde biyosensör dengeye getirildi. Denge akımı kaydedildikten sonra farklı derişimlerde hazırlanan kreatin çözeltilerinden ilaveler yapıldı. Her ilavede çözelti 600 saniye karıştırıldı ve 200 saniye sonra akım değerleri okunup kaydedildi ve denge akımı ile farkları alınarak her bir kreatin derişimi için Δi değeri hesaplandı. Elde edilen Δi değerleri bölüm 3.8'de elde edilen değerlerle birlikte grafiğe geçirilerek karşılaştırıldı (Şekil 4.6).

3.11. Biyosensörün En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

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

3.11.1. pH'nın etkisi

Bölüm 3.9'da açıklandığı gibi hazırlanan ve kararlı hale getirilen biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine pH'nın etkisini incelemek için pH'sı 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 ve 9,0 olan 0,1 M fosfat tamponları hazırlandı. Bir hücre içerisine pH değeri 5,5 olan tampon çözeltisinden 9 mL ve 1 M sodyumperklorat çözeltisinden 1 mL konuldu. Elektrot bu çözeltide 0,40 V'da dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Sonra pH değeri 5,5 olan tampon çözeltisiyle hazırlanan stok kreatin çözeltisinden hücredeki kreatin derişimi $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde hücreye ilave edildi. Çözelti 600 saniye karıştırıldı ve 200 saniye sonra okunan akım kaydedildi ve denge akımı ile farkı alınarak $\text{pH}=5,5$ için Δi değeri hesaplandı. Aynı işlemler pH değeri 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 ve 9,0 olan fosfat tamponları için tekrarlandı. Okunan akımlar ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için Δi değerleri hesaplandı. Elde edilen Δi değerleri pH' ya karşı grafiğe geçirildi ve biyosensörün en iyi çalıştığı pH değeri belirlendi (Şekil 4.15).

3.11.2. Sıcaklığın etkisi

Bölüm 3.9'da açıklandığı gibi hazırlanan ve kararlı hale getirilen biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C ve 70 °C sıcaklıktaki ortamlarda biyosensörün amperometrik cevap akımı ölçüldü. Hücre içine pH'sı 8 olan 0,1 M 9 mL tampon çözeltisi ve 1 mL 1 M sodyum perklorat çözeltisi konuldu ve biyosensör hücreye daldırıldı. Su

banyosu kullanılarak hücre içindeki çözeltinin sıcaklığı 20 °C olacak şekilde ayarlandı. 0,4 V sabit potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde kreatin çözeltisi ilave edildi. Çözelti 600 saniye karıştırıldı, 200 saniye sonra akım değerleri okunup, denge akımı ile farkı alınarak 20 °C için bir Δi değeri hesaplandı. Aynı işlemler diğer sıcaklık değerlerinde de yapılarak okunan akımlar kaydedildi. Elde edilen akımlardan Δi değerleri sıcaklığa karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.16).

3.11.3. Substrat derişiminin etkisi

Bölüm 3.9'daki gibi hazırlanan biyosensör; içerisinde, pH'sı 8,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu ve 1 mL 1 M sodyum perklorat bulunan çözeltiye daldırıldı. 0,4 V sabit potansiyelde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Daha sonra $1,0 \times 10^{-7}$ – $5,0 \times 10^{-3}$ M derişim aralığında kreatin ilaveleri yapıldı. Her ilavede çözelti 600 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki farklar alınarak her bir kreatin derişimi için Δi değerleri belirlendi. Kreatin derişimlerine karşı Δi grafiği çizildi (Michaelis-Menten eğrisi) (Şekil 4.17). Çizilen bu grafikten yararlanılarak biyosensörün çalışma aralığı belirlendi. Ayrıca elde edilen verilerden Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten yararlanarak kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimine özgü olan $K_M(\text{gözlenen})$ ve $I_{\text{maks}}(\text{gözlenen})$ değerleri belirlendi (Şekil 4.18).

3.11.4. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

Bölüm 3.9'da belirlendiği gibi hazırlanan ve dengeye getirilen biyosensörün optimum şartlarda tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için $1,0 \times 10^{-5}$ M derişiminde kreatin çözeltileri ile arka arkaya ölçümler yapıldı. Her ölçüm için denge akımı ile ölçülen akım arasındaki farktan Δi değeri hesaplandı. Ölçüm sayısına karşı Δi değerleri grafiğe geçirildi ve elektrodun tekrarlanabilir sonuçlar verdiği belirlendi (Şekil 4.20).

3.11.5. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Bölüm 3.9'da anlatıldığı gibi hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımı 36 gün boyunca üç günlük periyotlarda $1,0 \times 10^{-5}$ M sabit kreatin derişiminde ölçüldü. Bu süre esnasında biyosensör $+4$ °C'de buzdolabında bekletildi. Her ölçüm sırasında denge akımı ile okunan akım arasındaki farklar alınarak Δi değerleri hesaplandı. Saklama süresine karşı Δi değerleri grafiğe geçirilerek enzim elektrodun raf ömrü belirlendi (Şekil 4.21).

3.12. Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler

Hazırlanan biyosensörün amperometrik akım cevabına ürik asit, parasetamol, glisin, üre, formaldehit ve askorbik asidin girişim etkileri incelendi;

Ürik asidin girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.9'da açıklandığı gibi hazırlanan Pt/PPy-PVS-Cl-SO biyosensörü, içerisinde 9 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 1 mL 1 M NaClO_4 bulunan, toplam 10 mL'lik hücrede, 0,4 V elektrot potansiyelinde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücreye derişimi $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde kreatin ilavesi yapıldı. Çözelti 600 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak; $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatinin sebep olduğu cevap akımı kaydedildi. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi $3,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde ürik asit ilavesi yapıldı. Çözelti 600 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak; $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatin ve $3,0 \times 10^{-4}$ M ürik asidin sebep olduğu toplam cevap akımı kaydedildi. Bu akımdan $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatinin sebep olduğu cevap akımı çıkarılarak $3,0 \times 10^{-4}$ M ürik asidin sebep olduğu cevap akımı bulundu. Bulunan bu akım toplam cevap akımına oranlanarak $3,0 \times 10^{-4}$ M ürik asidin yüzde girişimi hesaplandı.

Parasetamolün (asetaminofen) girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.9'da açıklandığı gibi hazırlanan Pt/PPy-PVS-Cl-SO biyosensörü, içerisinde 9 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 1 mL 1 M NaClO₄ bulunan, toplam 10 mL'lik hücrede, 0,4 V elektrot potansiyelinde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücreye derişimi $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde kreatin ilavesi yapıldı. Çözelti 600 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak; $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatinin sebep olduğu cevap akımı kaydedildi. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde parasetamol ilavesi yapıldı. Çözelti 600 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak; $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatin ve $1,0 \times 10^{-4}$ M parasetamolün sebep olduğu toplam cevap akımı kaydedildi. Bu akımdan $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatinin sebep olduğu cevap akımı çıkarılarak $1,0 \times 10^{-4}$ M parasetamolün sebep olduğu cevap akımı bulundu. Bulunan bu akım toplam cevap akımına oranlanarak $1,0 \times 10^{-4}$ M parasetamolün yüzde girişimi hesaplandı.

Askorbik asidin girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.9'da açıklandığı gibi hazırlanan Pt/PPy-PVS-Cl-SO biyosensörü, içerisinde 9 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 1 mL 1 M NaClO₄ bulunan, toplam 10 mL'lik hücrede, 0,4 V elektrot potansiyelinde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücreye derişimi $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde kreatin ilavesi yapıldı. Çözelti 600 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak; $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatinin sebep olduğu cevap akımı kaydedildi. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde askorbik asit ilavesi yapıldı. Çözelti 600 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak; $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatin ve $1,0 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin sebep olduğu toplam cevap akımı kaydedildi. Bu akımdan $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatinin sebep olduğu cevap akımı çıkarılarak $1,0 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin sebep olduğu

cevap akımı bulundu. Bulunan bu akım toplam cevap akımına oranlanarak $1,0 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin yüzde girişimi hesaplandı.

Glisinin girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.9'da açıklandığı gibi hazırlanan Pt/PPy-PVS-Cl-SO biyosensörü, içerisinde 9 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 1 mL 1 M NaClO_4 bulunan, toplam 10 mL'lik hücrede, 0,4 V elektrot potansiyelinde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücreye derişimi $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde kreatin ilavesi yapıldı. Çözelti 600 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak; $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatinin sebep olduğu cevap akımı kaydedildi. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi $3,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde glisin ilavesi yapıldı. Çözelti 600 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak; $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatin ve $3,0 \times 10^{-4}$ M glisinin sebep olduğu toplam cevap akımı kaydedildi. Bu akımdan $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatinin sebep olduğu cevap akımı çıkarılarak $3,0 \times 10^{-4}$ M glisinin sebep olduğu cevap akımı bulundu. Bulunan bu akım toplam cevap akımına oranlanarak $3,0 \times 10^{-4}$ M glisinin yüzde girişimi hesaplandı.

Ürenin girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.9'da açıklandığı gibi hazırlanan Pt/PPy-PVS-Cl-SO biyosensörü, içerisinde 9 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 1 mL 1 M NaClO_4 bulunan, toplam 10 mL'lik hücrede, 0,4 V elektrot potansiyelinde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücreye derişimi $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde kreatin ilavesi yapıldı. Çözelti 600 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak; $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatinin sebep olduğu cevap akımı kaydedildi. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde üre ilavesi yapıldı. Çözelti 600 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak; $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatin ve $1,0 \times 10^{-4}$ M ürenin sebep olduğu toplam cevap

akımı kaydedildi. Bu akımdan $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatinin sebep olduğu cevap akımı çıkarılarak $1,0 \times 10^{-4}$ M ürenin sebep olduğu cevap akımı bulundu. Bulunan bu akım toplam cevap akımına oranlanarak $1,0 \times 10^{-4}$ M ürenin yüzde girişimi hesaplandı.

Formaldehitin girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.9'da açıklandığı gibi hazırlanan Pt/PPy-PVS-Cl-SO biyosensörü, içerisinde 9 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 1 mL 1 M NaClO_4 bulunan, toplam 10 mL'lik hücrede, 0,4 V elektrot potansiyelinde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücreye derişimi $1,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde kreatin ilavesi yapıldı. Çözelti 600 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak; $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatinin sebep olduğu cevap akımı kaydedildi. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde formaldehit ilavesi yapıldı. Çözelti 600 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak; $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatin ve $1,0 \times 10^{-4}$ M formaldehitin sebep olduğu toplam cevap akımı kaydedildi. Bu akımdan $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatinin sebep olduğu cevap akımı çıkarılarak $1,0 \times 10^{-4}$ M formaldehitin sebep olduğu cevap akımı bulundu. Bulunan bu akım toplam cevap akımına oranlanarak $1,0 \times 10^{-4}$ M formaldehitin yüzde girişimi hesaplandı.

Ürik asit, askorbik asit, parasetamol, üre, glisin ve formaldehit için hesaplanan yüzde girişimler Çizelge 4.1'de verildi.

3.13. Biyolojik Sıvıda (Kanda) Kreatin Tayini

Kanda kreatin tayini için beş sağlıklı bireyden kan örneği alındı. Bu örnekler uygun şartlarda muhafaza edildi. Kan örneklerinden 2 numune alınarak biri Gazi Üniversitesi Sağlık ve Kültür Merkezi Biyokimya Laboratuvarına analiz için bırakıldı. Diğer kan örnekleri ise analiz edilmek üzere laboratuvarımıza getirildi ve buzdolabına konularak muhafaza edildi. Kan serumunda kreatin

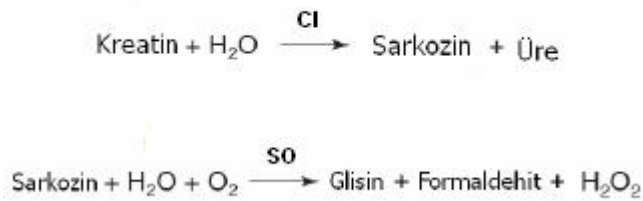
tayini için seyreltme işlemleri yapıldı. Seyreltme işlemi sayesinde kan serumundaki kreatin derişimi biyosensörün doğrusal çalışma aralığına getirilmesi ve girişim yapan maddelerin biyosensörün tayin sınırının altındaki bir derişime indirilmesi sağlandı.

Bölüm 3.9'da ki gibi hazırlanan ve dengeye getirilen biyosensörün kandaki kreatin miktarının belirlenmesi amacıyla, üçlü elektrot sistemli elektrokimyasal hücre kullanıldı. Bu hücrede çalışma elektrodu olarak hazırlanan enzim elektrot, karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot kullanıldı. Elektrokimyasal hücreye pH' sı 8,0 olan fosfat tamponu çözeltisi ve sodyum perklorat çözeltisi konuldu. Kan serumundan belli hacimler alındı ve 200 defa seyreltme işlemi olacak şekilde biyosensörün bulunduğu hücreye ilave edildi. Daha sonra 0,40 V sabit potansiyel uygulanıp hücreden geçen akım kaydedildi. Aynı işlemler alınan beş kan numunesi içinde gerçekleştirildi. Ölçülen akım değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi yöntemiyle kreatin derişimleri belirlendi.

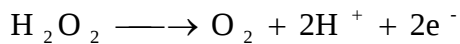
Çizelge 4.2' de hesaplanan derişim değerleri belirtildi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

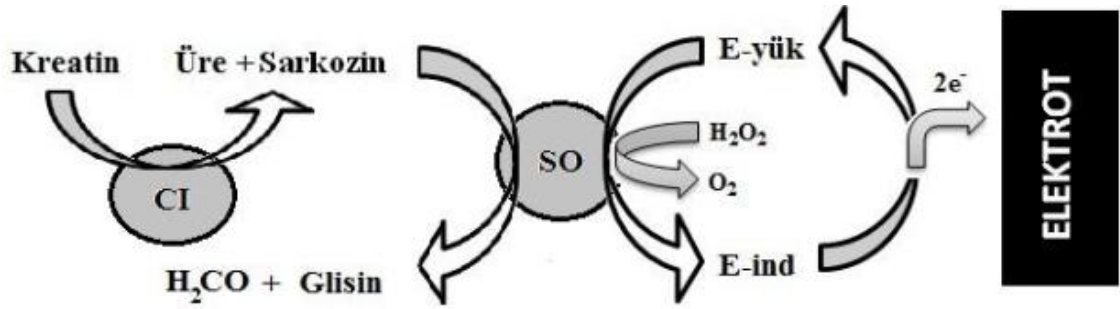
Bu çalışmada platin yüzey üzerine iletken bir polimer olan polipirrol ve polivinilsülfonat kaplandı. Bu film üzerine kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimleri çapraz bağlama yöntemiyle immobilize edildi. Hazırlanan biyosensörün analitik ve biyokimyasal özellikleri incelendi. Film elektrot ve enzim elektrot yüzeyinin morfolojik yapısı SEM, AFM, FTIR, Film kalınlığı ve Temas Açısı ölçümü gibi yöntemlerle karakterize edildi. Biyosensör üzerine pH, sıcaklık, substrat derişimi, girişim etkisi incelendi. Ayrıca biyosensörün takrarlanabilirliği ve raf ömrü belirlendi. Enzimatik reaksiyonların bir kısmında reaksiyon ürünü olarak hidrojen peroksit açığa çıkar. Hazırlanan enzim elektrotların bir kısmı, uygulanan sabit potansiyelde çalışma elektrodunun yüzeyinde enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan hidrojen peroksidin yükseltgenmesi esasına dayanır [63]. Hidrojen peroksit aşağıdaki reaksiyona göre oluşmaktadır.



Kreatinaz enziminin görevi kreatini, sarkozin ve üreye dönüştürmek; sarkozin oksidaz enziminin görevi ise sarkozini glisin, formaldehit ve hidrojen peroksit'e dönüştürmektir. Oluşan bu hidrojen peroksit platin elektrot yüzeyinde sabit bir potansiyelde aşağıdaki reaksiyona göre yükseltgenmektedir [63].



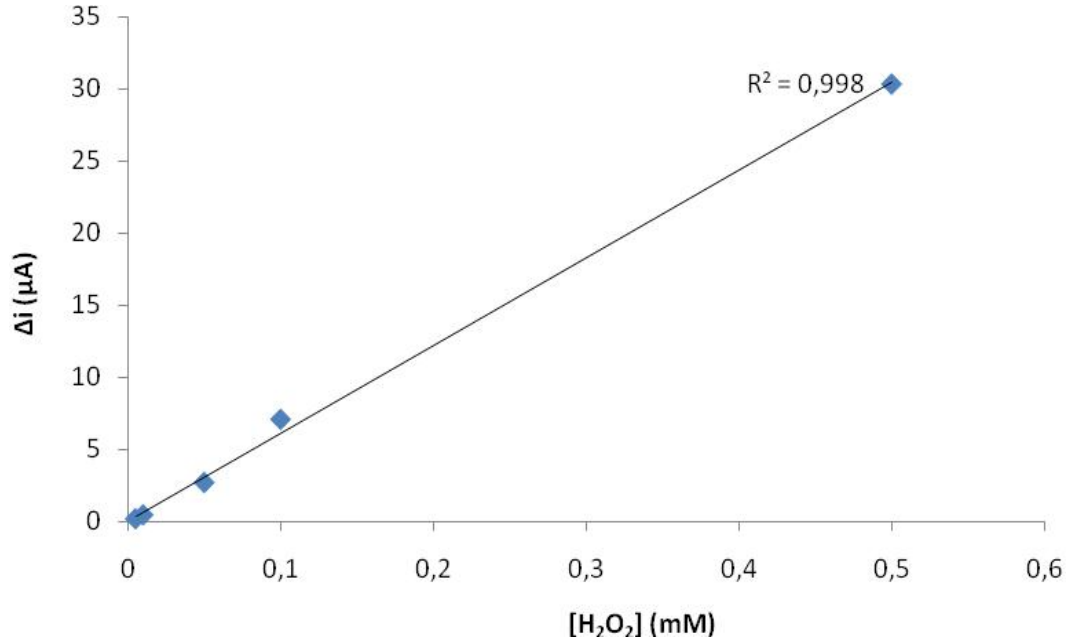
Enzimatik reaksiyon sonucunda kreatinin ölçülmesinde, çözeltide ve elektrot yüzeyinde gerçekteşen olaylar Şekil 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil.4.1. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron aktarımı

4.1. Hazırlanan Pt/PPy-PVS Film Elektrodunun Hidrojen Peroksit Duyarlılığının Belirlenmesi

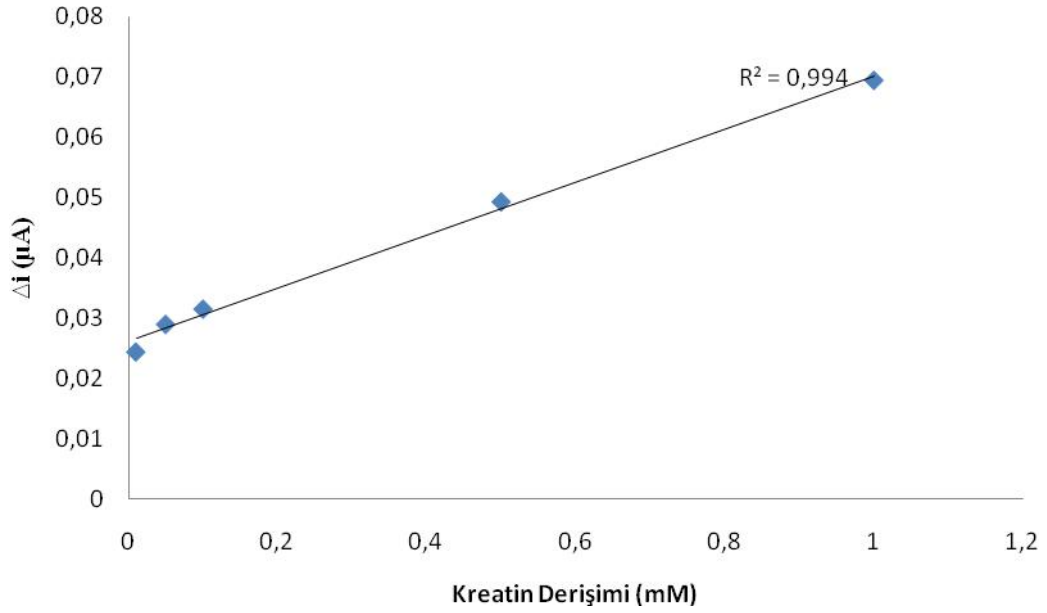
Kreatinin kreatinaz ve sarkozin oksidaz aracılığıyla formaldehit ve glisine dönüşümü sırasında reaksiyon ürünü olarak hidrojen peroksit açığa çıkar. Bu yüzden hazırlanan biyosensörün temeli de reaksiyon sonunda açığa çıkan hidrojen peroksitin elektrot yüzeyinde yükseltgenmesi esasına dayanır. Bu sebeple Bölüm 3.3’ de anlatıldığı gibi hazırlanan Pt/PPy-PVS elektrodun H_2O_2 ’ ye duyarlılığı araştırıldı ve artan H_2O_2 derişimine karşı elde edilen Δi değerleri grafiğe geçirildi. Elde edilen veriler sonucunda elektrodun H_2O_2 ‘e karşı duyarlı olduğu görüldü. Grafik incelendiğinde elde edilen eğrinin doğrusallığının ($R^2 = 0,998$) çok yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Pt/PPy-PVS elektrodun H₂O₂' ye duyarlılığı

4.2. Pt/PPy-PVS Film Elektrodun Serbest Enzimli Ortamda Kreatine Duyarlılığının İncelenmesi

Bölüm 3.5' de açıklandığı şekilde hazırlanan hücrede serbest enzimin kreatin ile reaksiyonu sonucu açığa çıkan hidrojen peroksitin elektrot yüzeyine difüzlenererek yükseltgenmesi sonucu oluşan anodik akımın kreatin derişiminin artmasıyla arttığı görüldü. Elde edilen Δi değerleri gafiğe geçirildi (Şekil 4.3).

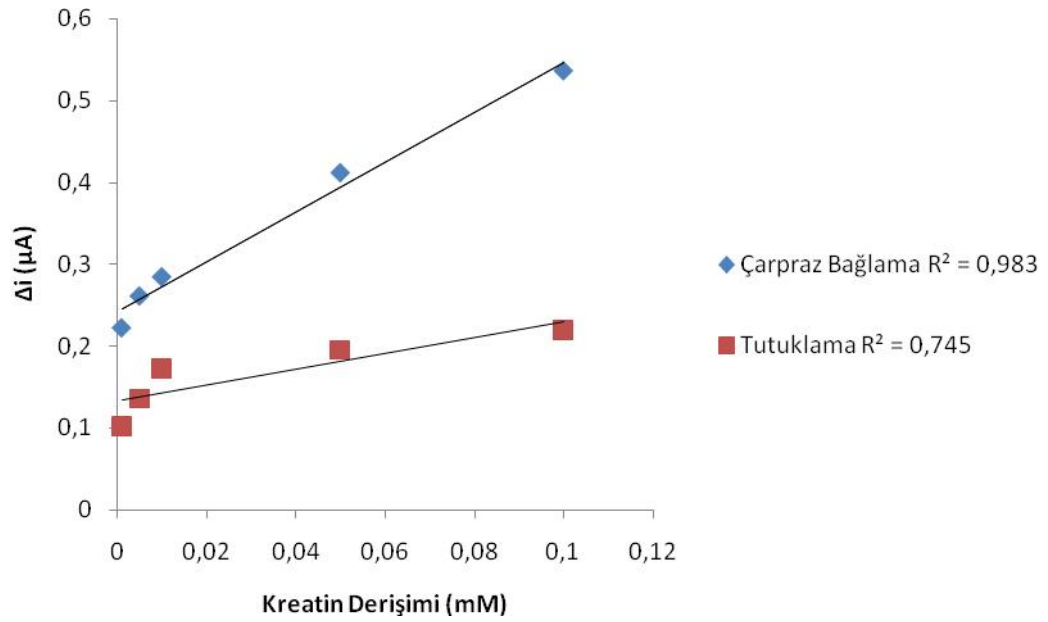


Şekil 4.3. Pt/PPy-PVS film elektrodun serbest enzimli ortamda kreatine cevabı

Grafikte de görüldüğü gibi kreatin derişiminin artışına paralel olarak akımlarda da bir artış gözlenmiştir. Bu sonuç, kreatinin enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşturduğu ürün olan H_2O_2 'nin elektrokimyasal olarak tespit edilebileceğinin ve dolayısı ile biyolojik sıvılarda veya başka örneklerde kreatin tayininin hazırlanan biyosensörle yapılabileceğinin göstergesidir.

4.3. Pt/PPy-PVS Filme Kreatinaz ve Sarkozin Oksidaz Enzimlerinin Farklı İmmobilizasyon Yöntemleri

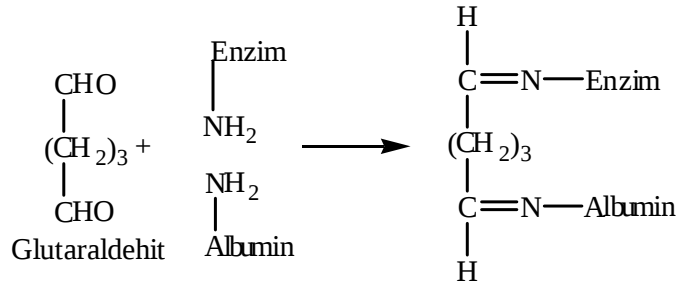
Kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerinin immobilizasyonu ilk olarak tutuklama yöntemiyle denendi. Bölüm 3.6' de anlatıldığı şekilde Pt/PPy-PVS-Cl-SO biyosensörü hazırlandı ve bu elektrot ile ölçümler alındı. Sonra enzim immobilizasyonu Bölüm 3.7' de anlatıldığı şekilde çarpaz bağlama yöntemi ile yapıldı. Bu işlemlerin hepsinde kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzim miktarları aynı olacak şekilde ayarlanarak immobilizasyon gerçekleştirildi. Her iki durum içinde Δi değerleri kaydedilerek tek bir grafikte toplandı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Farklı immobilizasyon tekniklerinin amperometrik akım cevabı üzerine etkisi

Grafikte görüldüğü gibi çarpraz bağlama yöntemi ile immobilizasyon yapıldığında daha yüksek ve daha doğrusal akımlar elde edildi. Tutuklama yönteminde akımların azaldığı görülmüştür. Tutuklama yönteminin, çarpraz bağlama yöntemine göre bazı üstünlükleri olsada fazla miktarda enzimin kullanılması, yani immobilizasyon yönteminin masraflı olması enzimlerin pahalı maddeler olması düşünüldüğünde ciddi bir dezavantajdır.

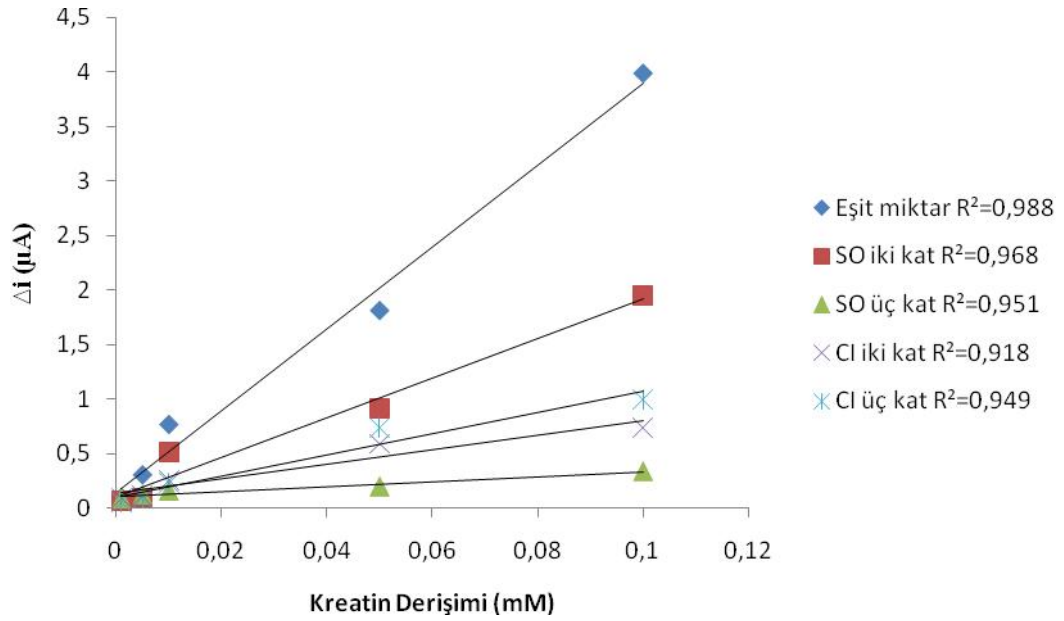
Çarpraz bağlama yönteminde glutaraldehitin karbonil gruplarının BSA (Bovine Serum Albumin) 'in $-NH_2$ gruplarına bağlanarak enzimlerin aktif merkezlerini bloke etmesini engellemektir. Glutaraldehit, enzim ve serum albumin arasındaki reaksiyon şöyledir:



Glutaraldehitin iki fonksiyonel grubu bulunduğundan bir ucuna enzim diğer ucuna albumin bağlanarak suda çözülmeyen bir jel tabakası oluşturur. Bu jel tabakası oda sıcaklığında kurutulduğunda, elektrot yüzeyine yapışarak yüzeyde enzimlerin tutunmasını sağlar. Bu yöntemde enzimlerden ve tampon çözeltiden belirli miktarlar alınarak hazırlanan çözeltiye BSA ve glutaraldehit eklenerek BSA ve enzimlerin glutaraldehit ile çapraz bağlanması sağlandı. Bu şekilde elde edilen enzim elektrodun kreatine duyarlılığının en iyi olduğu bulundu [64].

4.4. Pt/PPy-PVS-Cl-SO Biyosensöründe Cevap Akımları Üzerine Enzim Oranının Etkisi

Kreatinin formaldehit ve glisine dönüşmesi iki basamaklı bir reaksiyondur. İlk reaksiyon basamağını kreatinaz enzimi katalizlerken, ikinci reaksiyonu ise sarkozin oksidaz enzimi katalizlemektedir. Bu yüzden bu iki enzimin birlikte kullanılacağı analitik ölçüm ortamında, enzimlerin birbirlerine göre oranları önemlidir. Bu amaçla immobilize enzimli ortamda enzimlerin oranı Bölüm 3.8’ da anlatıldığı gibi yapıldı ve sonuçlar grafikte verildi (Şekil 4.5).

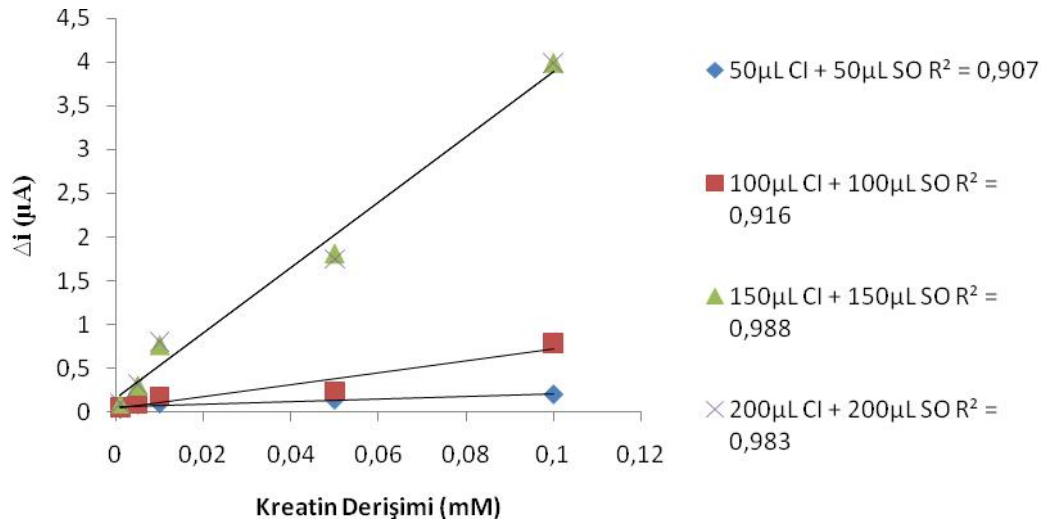


Şekil 4.5. Kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerinin birbirlerine göre oranlarının kreatin duyarlılığına etkisi

Grafik incelendiğinde en yüksek ve en doğrusal akımları enzimlerin birbirlerine göre eşit oranlarda alındığı durumda görüldüğünde bu oranlarda enzim alınarak çalışmalara devam edildi. Kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerinin birbirlerine oranları iki kat ve üç kat alındığı durumlara bakıldığında, akımların azaldığı gözlenmektedir. Literatür çalışmalarına baktığımızda enzim oranının önemli olduğu ve bununla ilgili çalışmaların yapıldığı görülmektedir [42, 46].

4.5. Pt/PPy-PVS-CI-SO Biyosensöründe Cevap Akımları Üzerine Enzim Miktarının Etkisi

Bölüm 3.9' de açıklandığı gibi yapılan enzim miktarı çalışması eşit miktarda kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimleri kullanılarak yapıldı. Uygulanan dört farklı enzim miktarı çalışmasında elde edilen amperometrik cevap akımları kreatin derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.6).

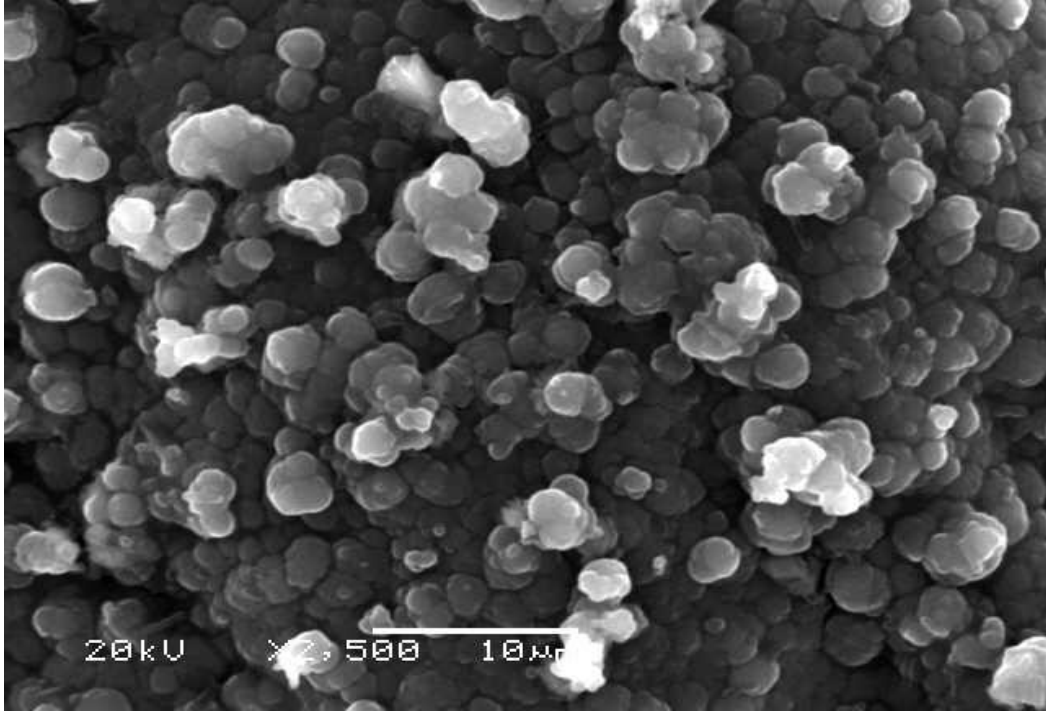


Şekil 4.6. Kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzim miktarlarının karşılaştırılması

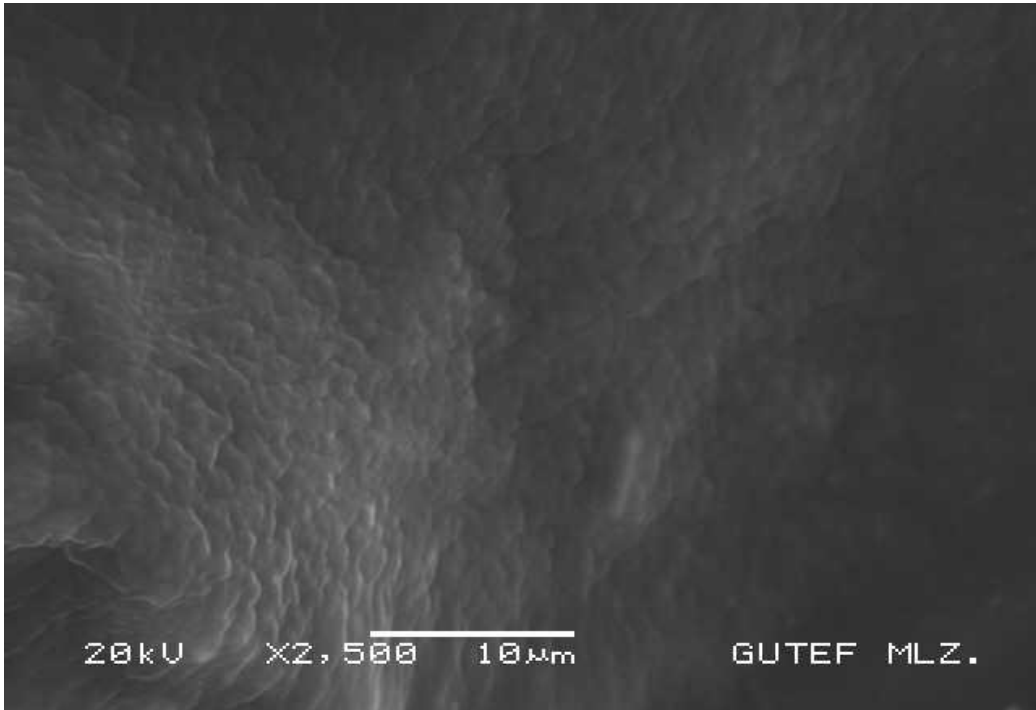
Grafiğe bakıldığında en yüksek ve en doğrusal akımlar 150 μL kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimleri ile 200 μL kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimlerinin kullanıldığı zaman gözlenmiştir. Her iki enzim miktarıda yüksek ve doğrusal akım verdiği için çalışmalara daha düşük maliyetten dolayı 150 μL CI ve 150 μL SO enzim miktarları kullanılarak devam edilmiştir. Enzimlerin yüksek maliyetli maddeler olduğu dikkate alınırca düşük miktarlı enzim miktarının seçilmesi doğrudur.

4.5.1. SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu) analizi

Bölüm 3.3' de anlatıldığı şekilde hazırlanan film elektrot ile bölüm 3.9' da anlatıldığı şekilde hazırlanan biyosensörün taramalı elektron mikroskopu ile çekilen fotoğrafları sırasıyla şekil 4.7 ve şekil 4.8' de gösterilmektedir.



Şekil 4.7. Pt/PPy-PVS filminin SEM fotoğrafı

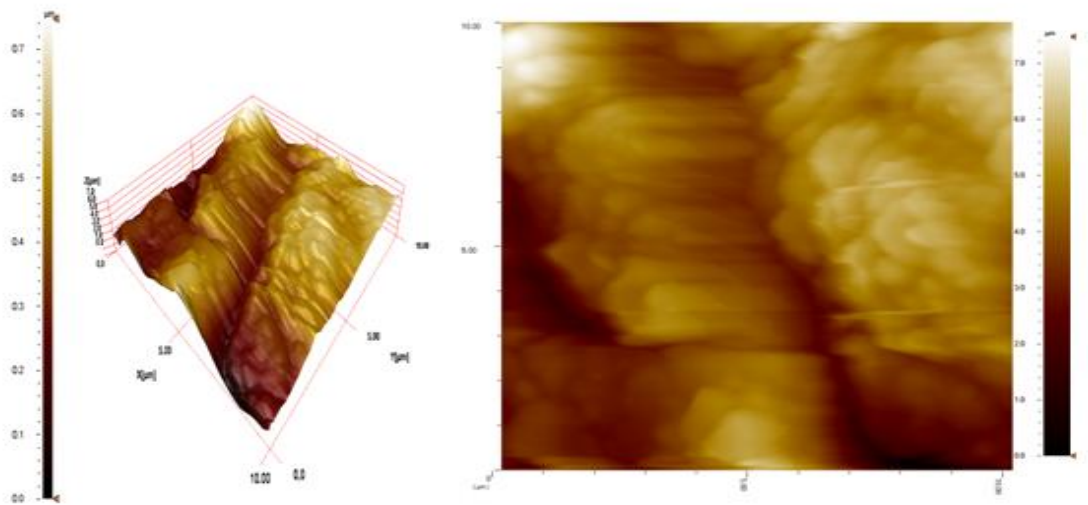


Şekil 4.8. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün SEM fotoğrafı

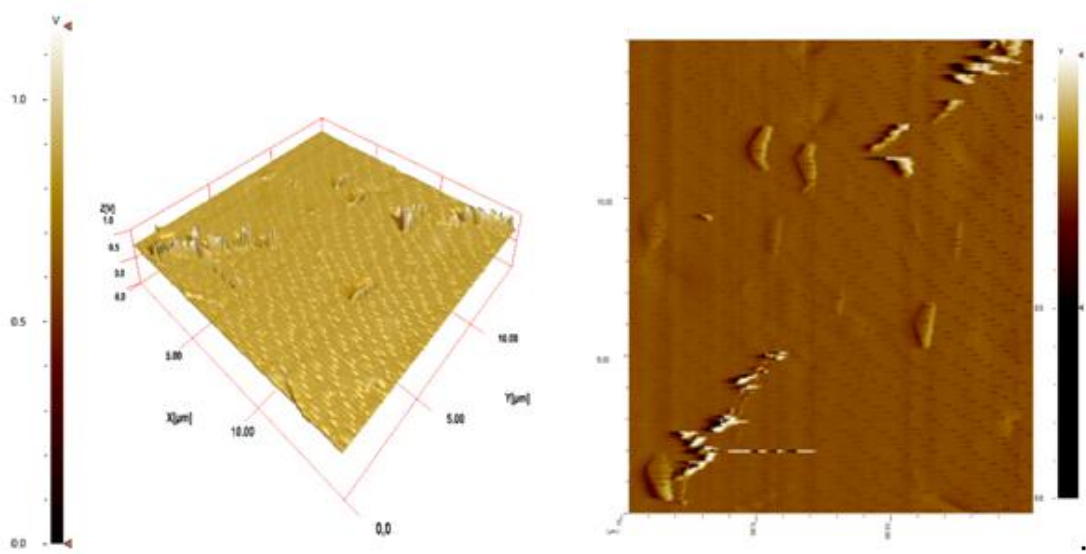
Enzim ile kaplanan elektrot filminin SEM fotoğrafı ile enzimsiz kaplanan film elektrodun SEM fotoğrafına bakıldığında ikisinin birbirinden çok farklı olduğu görülmektedir. Biyosensörün yüzeyinin SEM fotoğrafına bakıldığında enzim moleküllerinin, polimer yapının üstünde değişik bir şekilde yerleşmiş olarak bulunduğu gözlenmektedir. PPy filminin doğal görüntüsü tanecikli yapıya sahiptir. Büyültme oranı artırılarak bu doğal görüntüye bakıldığında bu yapının karnıbahar yapısına benzediği görülmektedir. Kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimleri immobilize edildikten sonra karnıbahar yapısının bozulduğu gözlenmektedir. Enzimlerin immobilizasyonu ile yeni bir morfolojik yapı oluşmuştur. Bu morfolojik yapı bize enzimlerin başarılı bir şekilde Pt/PPy-PVS filme immobilize edildiğini göstermektedir. PPy-PVS film yapısı ve PPy-PVS-CI-SO biyosensörü için alınan görüntüler literatür görüntüleri ile desteklenmektedir [44,52,57].

4.5.2. AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu) analizi

Bölüm 3.3' de anlatıldığı şekilde hazırlanan film elektrot ile bölüm 3.9' da anlatıldığı şekilde hazırlanan biyosensörün atomik kuvvet mikroskobu ile çekilen fotoğrafları sırasıyla şekil 4.9 ve şekil 4.10' de görülmektedir.



Şekil 4.9. Pt/PPy-PVS filminin AFM fotoğrafı



Şekil 4.10. Pt/PPy-PVS-Cl-SO biyosensörünün AFM fotoğrafı

Görüntüler üzerinde ayrıntılı bir çalışma yapılmış olup farklı büyüklüklerde görüntüler alınmıştır. Yapıyı en iyi gösteren görüntüler yukarıda verilmektedir. PPy-PVS filminin yüzeyi üzerinde gayet homojen bir yüzey gözlenmektedir. Enzimli ve enzimsiz görüntüler birbirinden açık bir şekilde ayırt edilebilir durumdadır. Yapıya kreatinaz ve sarkozin oksidaz enzimleri immobilize edilmesiyle, morfolojik yapıyı daha homojen hale getirdiği ve pürüzlülük açısından yapıyı düzenlediği gözlenmektedir. Bu sonuç, yüzey pürüzlülük değeri olan Root Mean Square (RMS) (karekök ortalama) değerleri ile desteklenmektedir. Şekil 4.9' da verilen enzimli görüntü için RMS değeri 31nm ve şekil 4.10' da verilen enzimli görüntü için RMS değeri ise 21nm civarında bulunmuştur. Alınan sonuçlar literatür sonuçları ile desteklenmektedir [50]. Bütün bu sonuçlar yüzeyde enzim moleküllerinin varlığını ispatlamaktadır.

4.5.3. Temas açısı analizi

Bölüm 3.3' de anlatıldığı şekilde hazırlanan film elektrot ile bölüm 3.9' da anlatıldığı şekilde hazırlanan biyosensörün temas açısı fotoğrafları sırasıyla şekil 4.11 ve şekil 4.12' de görülmektedir.



Şekil 4.11. Pt/PPy-PVS filminin Temas Açısı fotoğrafı



Şekil 4.12. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün Temas Açısı fotoğrafı

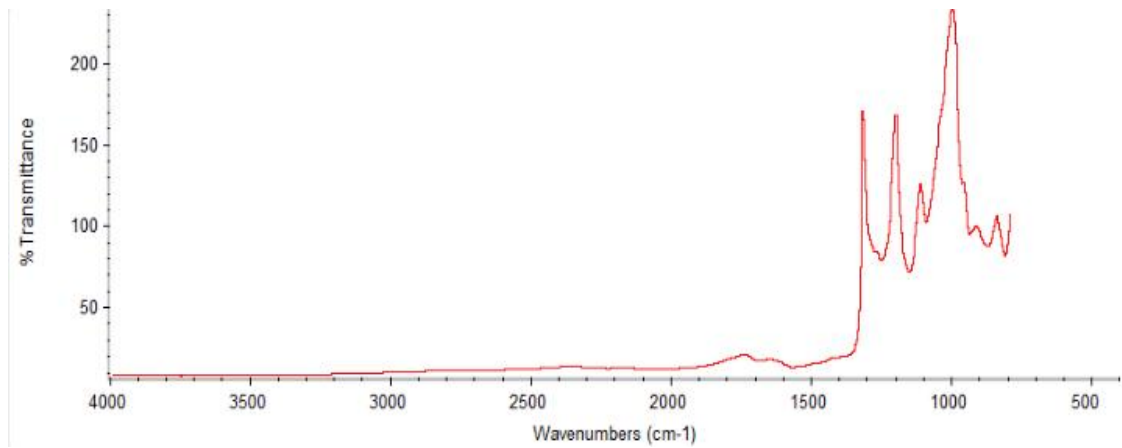
Yüzeylerin hidrofobik-hidrofilik özelliklerinin belirlenmesi birçok biyokimyasal uygulamada büyük önem taşımaktadır. Yüzeylerin hidrofilik-hidrofobik karakterlerinin belirlenmesi için yüzeylerin su değme açısı ölçümleri alınmaktadır. Her iki şekilde incelendiğinde enzim immobilize edilen filmin diğer filmden daha yayvan olduğu gözlenmiştir. Bu da bize enzim immobilize edilen filmin hidrofilik, enzim olmayan filmin ise hidrofobik olduğunu göstermektedir. Zaten enzimler protein yapısında olduğundan hidrofilik olması beklediğimiz bir sonuçtur ve buda bize enzimin polimer yüzeye başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir. Ayrıca temas açıları ölçüldüğünde PPy-PVS film elektrodunun temas açısı 52° , PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün temas açısı ise 9° bulunmuştur. Yüzeyin su değme açısının 9° olması yüzeyin hidrofilik gruplarca zengin hale geldiğini ve hidrofilik karakter kazandığını göstermektedir. Bulunan sonuçlar literatür sonuçları ile de desteklenmektedir [50,65,69].

4.5.4. Elipsometre (Film kalınlığı ölçülmesi)

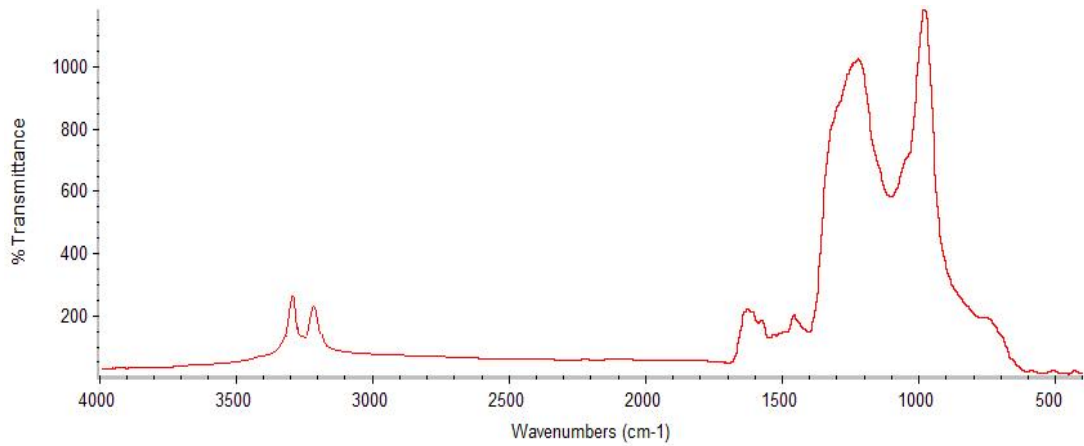
Bölüm 3.3' de anlatıldığı şekilde hazırlanan film elektrot ile bölüm 3.9' da anlatıldığı şekilde hazırlanan biyosensörün film kalınlıkları ölçüldü. Bunun için yüzeyin üç farklı noktasından ölçüm alındı ve bu üç değerın ortalaması alınarak film kalınlıkları hesaplandı. Sonuçlar incelendiğinde platin levha ile film arasındaki kalınlık farkının ortalaması 39,16 nm olarak bulunmuştur. PPy-PVS film ile PPy-PVS-Cl-SO biyosensörü yüzeyi arasındaki kalınlık farkının ortalama değeri ise 86,05 nm olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara bakıldığında biyosensörün film kalınlığının daha büyük olması sebebiyle yüzeye protein ve enzim moleküllerinin başarılı bir şekilde immobilize edildiğinin göstermektedir.

4.5.5. FTIR analizi

Bölüm 3.3' de anlatıldığı şekilde hazırlanan film elektrot ile bölüm 3.9' da anlatıldığı şekilde hazırlanan biyosensörün spektrum pikleri sırasıyla şekil 4.13 ve şekil 4.14' de verilmektedir.



Şekil 4.13. Pt/PPy-PVS filminin FTIR spektrumu



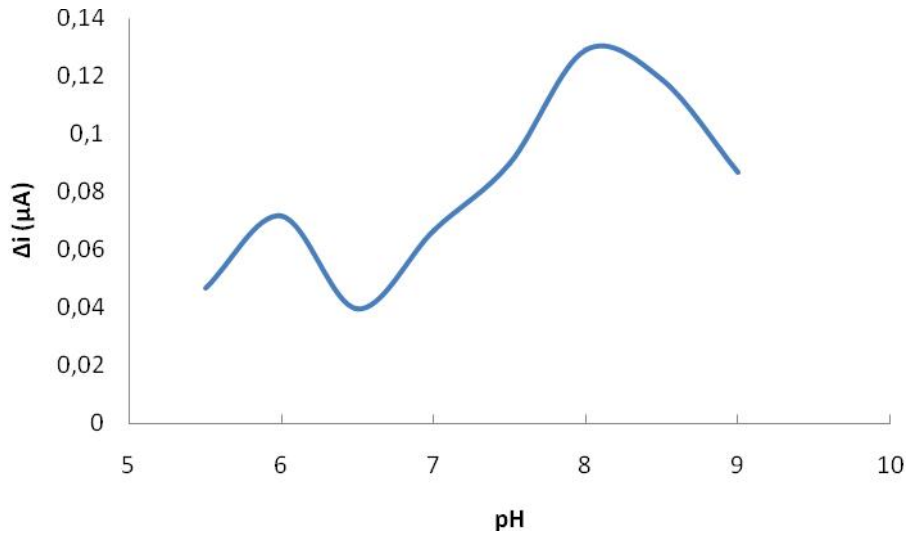
Şekil 4.14. Pt/PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün FTIR spektrumu

PPy-PVS film elektrodu ve PPy-PVS-CI-SO biyosensörünün yüzeylerin yapısal karakterizasyonu FTIR spektrometresi ile yapılmıştır. Her iki şekile bakıldığında biyosensörün FTIR spektrumunun diğerinden daha farklı olduğu gözlenmektedir. 1650 cm^{-1} civarında C=O bağının oluşturduğu pik ve 3300 cm^{-1} civarında oluşan N-H bağının oluşturduğu pikler gözlenmektedir. Sonuç olarak bu pikler göz önüne alındığında enzimlerin polimer yüzeye immobilize olduğunu gözlenmektedir. Ayrıca sonuçlar literatür kaynakları ile de desteklenmektedir [44,50,52].

4.6. Biyosensörün En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

4.6.1. pH'nın etkisi

Enzim aktivitesini etkileyen en önemli değişkenlerden biride pH'dır. Her enzimin aktivitesinin en yüksek olduğu bir pH değeri vardır. Bu nedenle her enzimin dolayısı ile de her enzim elektrodunun en uygun çalışma pH'sının belirlenmesi gerekmektedir. Çift enzimli elektrot sistem için en iyi çalışma pH'sını belirlemek amacı ile Bölüm 3.11.1'deki işlemler yapılarak sonuçlar grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.15).

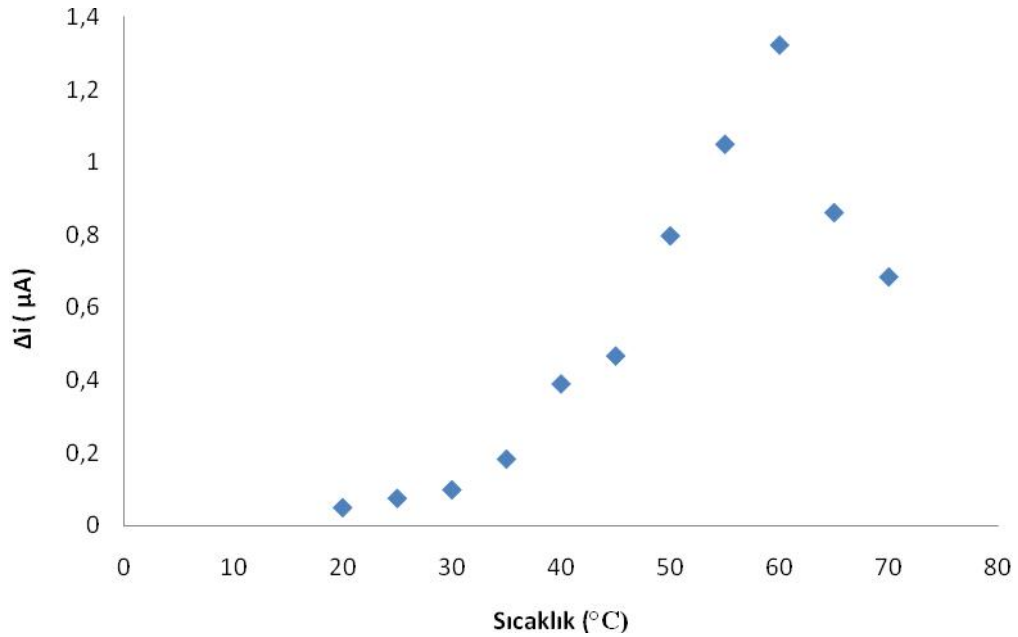


Şekil 4.15. Biyosensörün pH değişimine karşı duyarlılığı

Grafik incelendiğinde pH=6 ve pH=8'de olmak üzere iki maksimum nokta gözlenmektedir. Birinci maksimumdan sonra akımların düşüp tekrar yükseldiği ve ikinci maksimumun daha yüksek akım değerine sahip olduğu görülmektedir. Bundan sonra ise akım değerleri azalmaktadır. Kreatin için yapılan çalışmalarda pH değerinin 8,0- 8,5 civarında olduğu bilinmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda en yüksek akım değerinin gözlemlendiği pH=8 değeri seçilmiştir. Daha önce yapılmış çalışmalara bakıldığında [53, 59] bu değerlere yakın pH değerlerinin bulunduğu gözlenmektedir.

4.6.2. Sıcaklığın etkisi

Enzimlerin aktivitesi sıcaklıkla büyük oranda değişir. Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği bir sıcaklık vardır [30]. Bu nedenle, hazırladığımız enzim elektrodunun cevabının sıcaklıkla nasıl değiştiğinin incelenmesi önemlidir. Bu amaçla, hazırlanan enzim elektrot sistemi için en iyi çalışma aralığının belirlenebilmesi için Bölüm 3.11.2' de anlatıldığı şekilde ölçümler alındı ve Δi değerlerine karşı sıcaklık değerleri grafiğe eçirildi (Şekil 4.16).



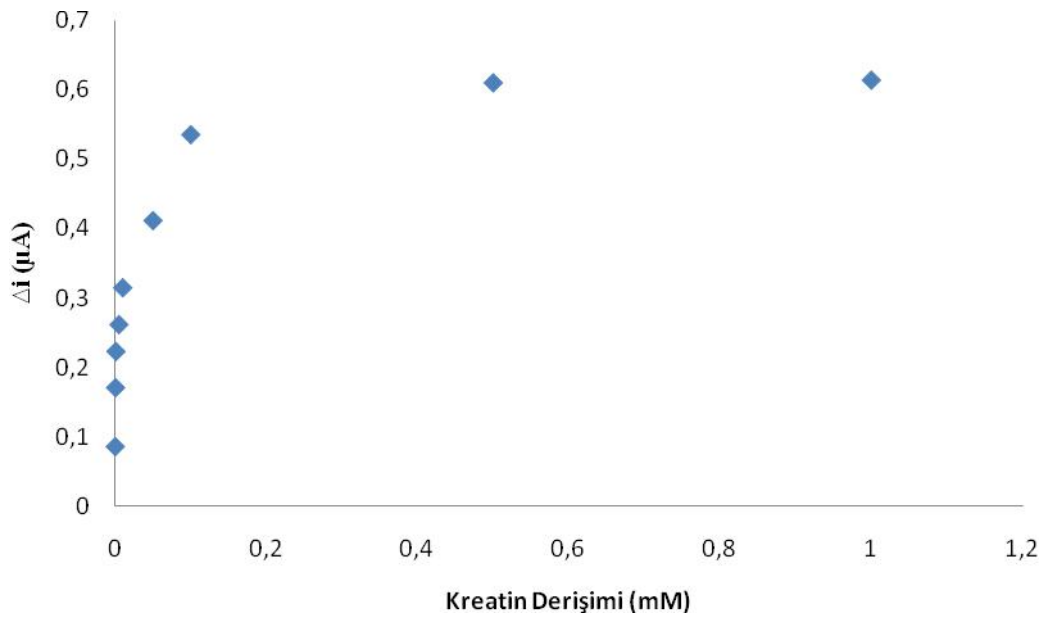
Şekil 4.16. Biyosensörün sıcaklık değişimine karşı duyarlılığı

Elde edilen veriler yardımıyla çizilen sıcaklığa karşı cevap akımları grafiğine bakıldığında sıcaklık 20°C' den 60°C' ye kadar arttığında akımlarda artma, 60°C' den sonra ise akımlarda azalma olduğu görülmüştür. Bu sıcaklık yüksek bir sıcaklıktır ve literatür değerlerinden biraz yüksektir. Ancak bölümümüzde aynı film ile yapılan tez çalışmalarında da benzer durumlarla karşılaşılmıştır [65,66]. Enzimler protein yapısında olduklarından dolayı yüksek sıcaklıklarda enzimin protein yapısı denatürasyona uğrar ve böylelikle aktivitesini kaybederler [67]. Uzun süreli çalışma durumlarında yüksek sıcaklıkta çalışmak enzimin yapısını bozacağından dolayı bundan sonraki çalışmalar oda sıcaklığında yapılmıştır.

4.6.3. Substrat derişiminin etkisi

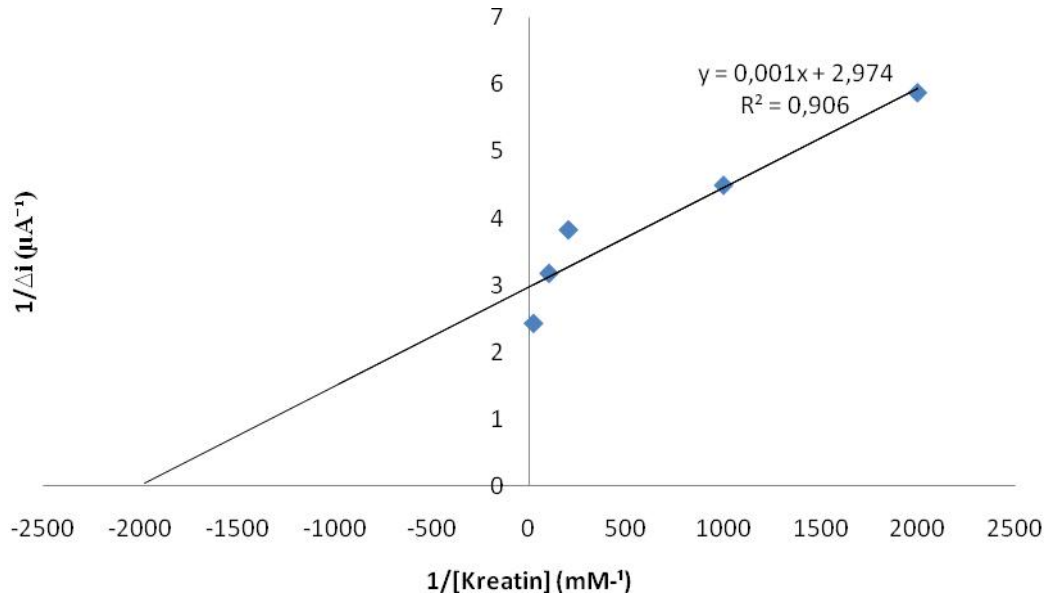
Enzim derişimi ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda enzimatik tepkimenin hızı, substrat derişiminin artırılmasıyla başlangıçta doğrusal bir artış gösterir; fakat substrat ilave edildikçe enzimin aktif merkezinin dolması sebebiyle; hız, giderek daha az artar ve belirli bir düzeyde sabit kalır.

Bölüm 3.11.3'de açıklandığı gibi, Pt/PPy-PVS-Cl-SO enzim elektrodu ile 0,4 V elektrot potansiyelinde; enzimin substrat doygunluğuna kadar ölçüm alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çizilen Michaelis-Menten grafiğine (Şekil 4.17) bakıldığında, $1,0 \times 10^{-4}$ M kreatin ilavesinden sonra cevap akımları sabit kalmaya başlamıştır.



Şekil 4.17. Biyosensörün amperometrik cevabına kreatin derişiminin etkisi (Michaelis-Menten grafiğı)

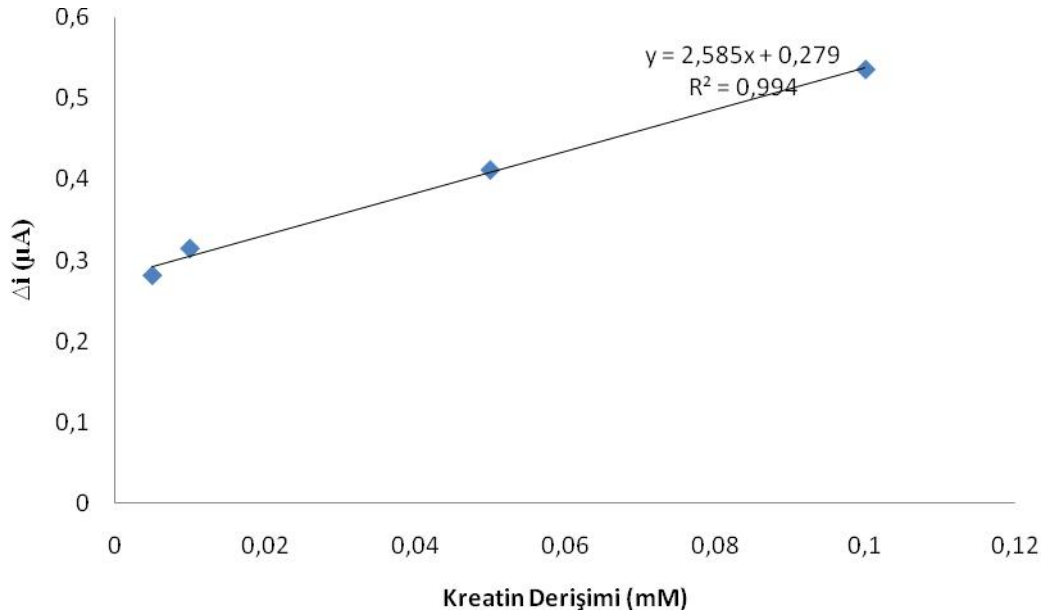
Michaelis-Menten denklemi bir hiperbolik eğrinin denklemidir ve hiperbolik bir eğrinin karakteristik noktalarını belirlemek zordur. Bu durumu kolaylaştırmak için; Michaelis-Menten denkleminin tersine çevirilip çarpanlarına ayrılmasıyla elde edilen denklemin grafiğı (Lineweaver-Burk, Şekil 4.18) çizilmiştir. Doğrusal olan bu grafikten yararlanılarak, çift enzimli elektrot sistemi için $K_{M(gözlenen)}$ ve $I_{maks(gözlenen)}$ değerleri sırasıyla 5×10^{-3} mM ve 0,34 $\mu A/dk$ olarak hesaplanmıştır. Literatürlerde benzer çalışmalar için verilen K_m değerleri 5,2mM; 5,15mM ve 0,26mM'dır [49,51,52].



Şekil 4.18. Biyosensörün kreatine duyarlılığını gösteren Lineweaver-Burk grafiği

Belirli bir miktardaki enzimin reaksiyon hızı ile substrat derişimi arasındaki ilişki başlangıçta doğrusal olarak devam ederken, daha sonra hiperbolik bir şekil almaktadır. İlişkinin doğrusal olarak devam ettiği aralıkta, enzim birinci dereceden bir kinetik gösterir. Bu aralığın en düşük ve en yüksek derişim değerleri, enzim elektrodun çalışma aralığını belirlemektedir.

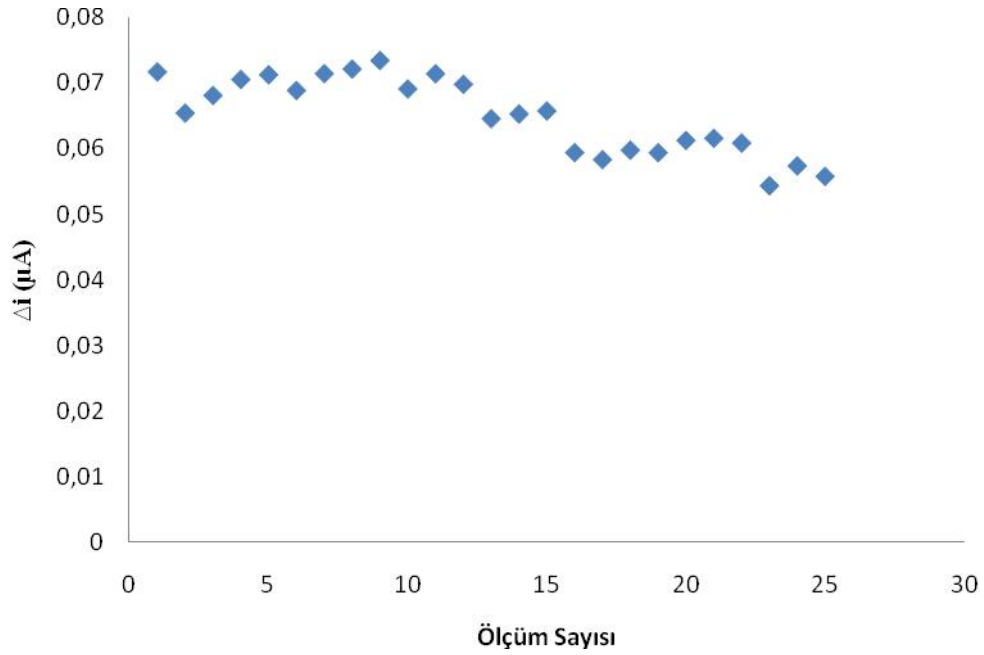
Enzim elektrodunun cevap akımları ile artan kreatin derişimleri arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu kalibrasyon grafiğine (Şekil 4.19) bakıldığında $5,0 \times 10^{-6} \text{ M} - 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ aralığında doğrusallığın çok iyi olduğu ve bu aralığın kantitatif analizlerde kullanılabileceği söylenebilir.



Şekil 4.19. Biyosensörün kalibrasyon grafiğı

4.6.4. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

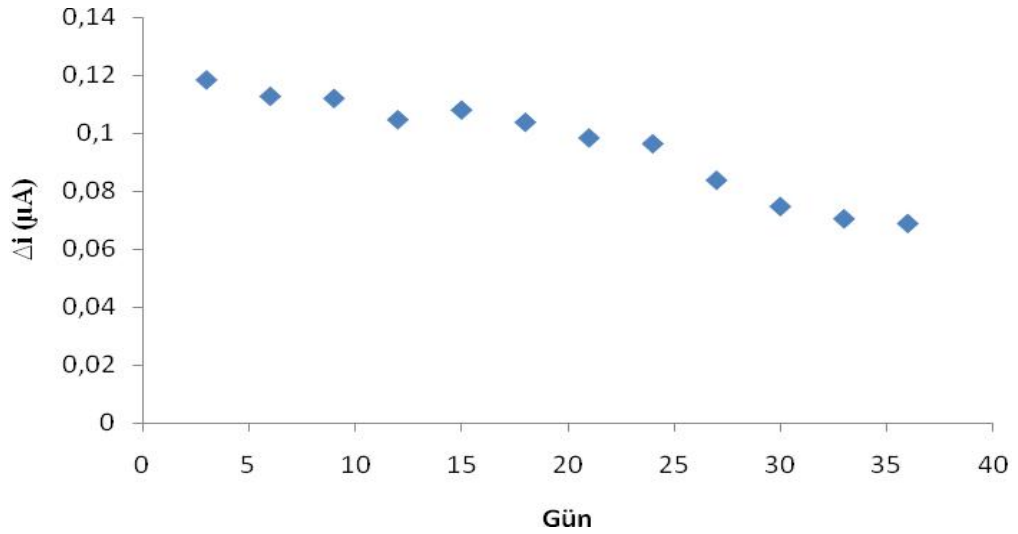
Bölüm 3.11.4'te açıklandığı gibi, biyosensörün tekrar kullanılabilirliği incelendi. Ölçme sayısına karşı cevap akımları grafiğı geçirildi (Şekil 4.20). Grafik incelendiğinde biyosensörün 25 ölçüm sonrasında performansının %77,7' sini koruduğı gözlenmiştir. Bağlı standart sapma $1,0 \times 10^{-5}$ M kreatin derişimi için % 9,28 olarak hesaplanmıştır. Enzimler tek başlarına veya bir taşıyıcıya bağlı olsun bekleme süresince aktivitelerini kaybederler. Ancak bu aktivite kaybının yüksek olması biyosensörler için iyi bir durum değildir. Hazırladığımız biyosensör için gözlenen aktivite kaybı ideal bir biyosensör için beklenen değerler arasındadır. Literatürelere bakıldığında hazırlanan biyosensörün diğer türlere yakın olduğı görülmektedir [46,52,57].



Şekil 4.20. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

4.6.5. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Biyosensörde aranan en önemli özelliklerden biri de elektrodun uzun ömürlü olmasıdır. Bu amaçla biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi Bölüm 3.11.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Biyosensör +4 °C'de buzdolabında fosfat tamponu içinde bekletildi. Saklama süresine karşı akım değişimi değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.21).



.Şekil 4.21. Biyosensörün raf ömrünün incelenmesi

Grafik incelendiğinde 36 günün sonunda biyosensörün başlangıç amperometrik cevabının % 57,9' unu koruduğu görüldü. Hesaplanan bağıl standart sapma değeri ise %18,19' dur. Literatür değerlerine bakıldığında hazırladığımız biyosensörün raf ömrünün ideal bir biyosensör için beklenen değerler arasında olduğu görülmektedir [44,45].

4.7. Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler

Hazırlanan biyosensörün amperometrik cevabına ürik asit, askorbik asit, parasetamol, glisin, üre ve formaldehitin girişim etkileri Bölüm 3.12'de ifade edildiği gibi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Biyosensör üzerine ($1,0 \times 10^{-5}$ M kreatin derişiminde) girişim yapan maddeler ve girişim etkileri

Girişim yapan maddeler	Çalışılan derişimler (M)	Toplam cevap akımı (μ A)	Girişim yapan maddenin cevap akımı (μ A)	Girişim yapan maddenin cevap akımının toplam akıma oranı (%)
Ürik Asit	$3,0 \times 10^{-4}$	0,423	0,196	46,33
Ürik Asit	$1,0 \times 10^{-5}$	0,456	0,097	21,27
Askorbik Asit	$1,0 \times 10^{-4}$	0,518	0,4864	93,89
Askorbik Asit	$1,0 \times 10^{-5}$	0,479	0,244	50,93
Parasetamol	$1,0 \times 10^{-4}$	0,501	0,243	48,51
Parasetamol	$1,0 \times 10^{-5}$	0,499	0,079	15,83
Glisin	$3,0 \times 10^{-4}$	0,0859	0,0389	45,28
Glisin	$1,0 \times 10^{-5}$	0,146	0,044	30,11
Üre	$1,0 \times 10^{-4}$	0,138	0,034	24,63
Üre	$1,0 \times 10^{-5}$	0,285	0,043	45,08
Formaldehit	$1,0 \times 10^{-4}$	0,167	0,012	7,18

Çizelge 4.1'e bakıldığında biyosensörün amperometrik cevabına ürik asit, askorbik asit, parasetamol, glisin, üre ve formaldehitin girişim etkileri sırasıyla %46,33, %93,89, %48,51, %45,28, %24,63 ve %7,18 olarak bulunmuştur. Bu girişim değerleri oldukça yüksek değerlerdir. Askorbik asit girişimi salatalık suyu ve askorbik oksidaz enzimi, ürik asit girişimi ürikaz, üre girişimi ise üreaz ile giderilebilir. Ama enzimler pahalı materyaller olduğu için yüksek maliyet gerektirmektedir. Ayrıca seyreltme ile bu girişimleri azaltmakda mümkündür.

4.8. Biyolojik Sıvıda (Kanda) Kreatin Tayini

Kan numunelerinde yapılan kreatin analizi sonunda ölçülen amperometrik cevap akımlarına karşı gelen derişim değerleri kalibrasyon eğrisi yöntemi kullanılarak gerekli hesaplamalar yapılarak sonuçlar karşılaştırıldı.

Çizelge 4.2. Kalibrasyon grafiği yöntemiyle kan numunelerinde kreatin derişimleri

Kan numunesi	Hesaplanan sonuçlar (Enzim elektrot ile) (mg/100mL)	Hastane sonuçları (Spektrofotometrik yöntem ile (mg/100mL)
1	4,27	1,13
2	1,99	0,55
3	2,31	0,51
4	3,13	0,78
5	1,91	0,83

4.9. Sonuçlar

Sonuç olarak; bu çalışmada hazırladığımız kreatin biyosensörünün;

- Doğrusal çalışma aralığı $5,0 \times 10^{-6}$ M ile $1,0 \times 10^{-4}$ M arasında bulunmuştur.
- Optimum çalışma pH'sı 8,0 olarak bulunmuştur.
- Optimum çalışma sıcaklığı 60°C olarak bulunmuştur.
- 25 ölçüm sonunda performansının %77,7'sini korumuştur.
- 36 günün sonunda performansının %57,9' ini korumuştur.
- Kreatinaz ve sarkozin oksidaz enziminin $K_{M(gözlenen)}$ ve $I_{maks(gözlenen)}$ değerleri sırasıyla 5×10^{-3} mM ve 0,34 μ A/dk olarak hesaplanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Champe, P., and Harvey, R., "Biyokimya", **Nobel Tıp Kitap Evleri**, İstanbul, (1997).
2. Tietz, N.W., "In Textbook of Clinical Chemistry, 1st ed.", 1810 (1986).
3. Sena, F.S., "Effect of high creatinine content on the Kodak single-slide method for creatinine", **Clin. Chem.**, 34, 594-595 (1988).
4. Tietz, N.W., "Fundamentals of clinical chemistry.", 680 (1987).
5. Stefan, R.I., Bokretson, R.G., Standen, F.V., Aboul-Enein, H.Y., "Simultaneous determination of creatine and creatinine using amperometric biosensors", **Talanta**, 60:1223-1228 (2003).
6. Metzler, E. David., "Biochemistry the chemical reactions of living cells", 819 (1977).
7. Greenhaff, P.L., "Creatine and its application as an ergogenic aid", **Int J sport Nutr.**, 5:100-110 (1995).
8. Hulmant, E., Söderlunt, Timmons, J.A., "Muscle creatine loading in men", **J Appl Physiol**, 81:232-237 (1996).
9. Culpepper, R.M., "Southern medical journal", 91:9, 889-892 (1998).
10. Maughan, R.J., "Creatine supplementation and exercise performance", **Int J Sport Nutr.**, 5:94-101 (1995).
11. Earnest, C.P., Snell, P.G., Rodriguez, R., "The effect of creatine monohydrate ingestion on anaerobic power indices muscular strength and body composition", **Acta physiol scand.**, 153:207-209 (1995).
12. Yang, Y.D., "Simultaneous determination of creatine, uric acid, creatinine and hippuric acid in urine by high performance liquid chromatography", **Biomed. Chromatography**, 12:47-49 (1998).
13. Schwedhelm, I., Tsikas, D., Durand, T., Gutzki, F.M., Guy, A., Rossi, J.C., Froelich, J.C., "Tandem mass spectrometric quantification of 8-iso-prostaglandin F2alpha and its metabolite 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-prostaglandin", **J. Chromatography**, 744(1):99-112 (2000).
14. Pezzaniti, J.L., Jeng, T.W., McDowell, L., Oosta, G.M., "Preliminary investigation of near-infrared spectroscopic measurements of urea, creatinine, glucose, protein, and ketone in urine", **Clin. Biomed.**, 34:239-246 (2001).

15. Clark, E.A., Fanguy, J.C., Henry, C.S., "High-throughput multianalyte screening for renal disease using capillary electrophoresis", **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 25:795-801(2001).
16. Burke, D.G., Maclean, P.G., Walker, R.A., Dewar, P.J., Smith-Palmer, T., "Creatinine determination in serum by capillary electrophoresis", **J. Chromatography B.**, 732:479-485 (1999).
17. Okumiya, T., Jiao, Y. Saibara, T., Miike, A., Park, K., Kageoka, T., Sasaki, M., "Sensitive enzymatic assay for erythrocyte creatine with production of methylene blue", **Clin. Chem.**, 44(7):1489-1496 (1998).
18. Tombach, B., Schneider, J., Schaefer, R.M., Chemnitz, G.C., "Amperometric creatinine biosensor for hemodialysis patients", **Clin. Chim. Acta.**, 312:121-134 (2001).
19. Koncki, R., Walcerz, I., Ruckruh, F., Glab, S., "Bioenzymatic potentiometric electrodes for creatine and L-arginine determination", **Anal. Chim. Acta.**, 333:215-222 (1996).
20. BHAT, M.K., "Cellulase and related enzymes in biotechnology", **Biotechnology Advances**, 18(5):355-458 (2000).
21. Tatar, S., "Termofil moderat olarak halofilik Bacillus Sp. suşlarından amilaz enzimi üretimi ve endüstriyel kullanım olanaklarının araştırılması", **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Adana, 1 (2007).
22. Söyler, M., "Van kedisi eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu", **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Van, 1 (2006).
23. Lehninger, A. L., "Principles of Biochemistry 2th Edition", **Worth Publishers Inc.**, New York, 198-239 (1993).
24. Stryer, L., "Introduction to enzymes", Biochemistry, **W.H. Freeman and Company**, San Francisco, 103-131 (1981).
25. Tüzün, C., "Biyokimya", **Palme Yayıncılık**, Ankara, 485 (2002).
26. İnternet:"Roche Applied Science", http://www.roche-applied-science.com/indbio_neu/industry/clinical/pdf/enzymes , 41-43.
27. Yavuz, A. G., "Polivinil ferrosen modifiye elektrodunu temel alan glukoz biyosensörünün geliştirilmesi", **Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Isparta, 12-15 (2005).

28. Pişkin, E., *Biyosensörler Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*, **Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları**, İzmir, 205-223 (1986).
29. Dursun, F., "Medyatör bağlı matrikslerin tyrosinase tabanlı fenol biyosensörüne uygulanması", **Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü**, Gebze, 10,20-30 (2009).
30. Telefoncu, A., "Biyosensörlere genel bakış", *Biyosensörler*, **Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu**, Kuşadası, 1-9 (1999).
31. Abasıyanık, M.F., Şakalar, E., Şenel, M., "Biyosensörlere genel bir bakış ve biyosavunmada kullanılan biyosensörler", **Fatih Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Biyoloji Bölümü, Kimya Bölümü**, 1-6 (2010).
32. Chiang, C.K., Fincher, C.R., Park, Y.W., Heeger, A.J., Shirakawa, H., Louis, E.J., Gau, S.C. ve Macdiarmid, A.G., "Electrical conductivity in doped polyacetylene", **Phys. Rev. Lett.**, 39,1098-1101 (1977).
33. Ito, T., Shirakawa, H., Ikeda, S., "Simultaneous polymerization and formation of polyacetylene film on the surface of concentrated solubla Ziegler-type catalyst solution", **J. Polym. Sci.: Polym. Chem. Ed.**, 12,11-20 (1974).
34. Bartlett, P.N., Cooper, J.M., "A review of the immobilization of enzymes in electropolymerized films", **J. Electroanal. Chem.**, 362,1-12 (1993).
35. Trojanowicz, M., Krawczyk, T.K., "Electrochemical biosensors based on enzymes immobilized in electropolymerized films", **Mikrochim. Acta**, 121,167-181 (1995).
36. Büyükhanutçu, C., "Glukoz tabanlı biyoyakıt pili geliştirilmesi", **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 32-33-36-37 (2009).
37. Ateş, M., "Polimerizasyon ve polimerler hakkında bilgi", **Orta Doğu Teknik Üniversitesi**, Ankara, 7-18 (1998).
38. Dinçkaya, E., "Enzim sensörleri", *Biyosensörler*, **Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu**, Kuşadası, 42-61 (1999).
39. Gardies, F., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Perrot, H., "Micro-enzyme field effect transistor sensor using direct covalent bonding of urease", **Anal. Chim. Acta.**, 231:305-308 (1990).
40. Kauffmann, J. M. ve Guilbault, G., "Enzyme electrode biosensors: theory and applications method", **Biochem. Anal.**, 36:63-113 (1992).

41. Nakabayashi, Y., Nakamura, K., Kawachi, M., Motoyama, T., Yamauchi, O., "Interactions of glucose oxidase with various metal polypyridine complexes as mediators of glucose oxidation", **J. Biol. Inorg. Chem.**, 8: 45-52 (2003).
42. Görgülü, M., "Hipoksantin tayini için polipirol-polivinilsülfonat filme ksantin oksidaz ve ürikaz enzimleri immobilizasyonu ile yeni bir amperometrik biyosensör hazırlanması", Yüksek lisans tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 25-35 (2011).
43. Beskan, U., "Glukoz tayini için polianilin-polivinilsülfonat filme glukoz oksidaz enzimi immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması", Yüksek lisans tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 25-45 (2011).
44. Yadav, S., Kumar, A., Pundir, C.S., "Amperometric creatinine based on covalently coimmobilized enzymes onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline composite film", **Analytical Biochemistry**, 419:277-283 (2011).
45. Shin, J.H., Choi, Y.S., Lee, H.J., Choi, S.H., Ha, J., Yoon, I.J., Nam, H., Cha, G.S., "A planar amperometric creatinine biosensor employing an insoluble oxidizing agent for removing redox active interferences", **Anal. Chem.**, 73:5965-5971 (2001).
46. Erden, P.E., Pekyardımcı, Ş., Kılıç, E., Arslan, F., "An amperometric enzyme electrode for creatine determination prepared by the immobilization of creatinase and sarcosine oxidase in poly(vinylpyrrolidene)", **Artificial Cells. Blood Substitutes and Biotechnology**, 34:223-239 (2006).
47. Khan, G.F., Wernet, W., "A highly sensitive amperometric creatinine sensor", **Analytica Chimica Acta.**, 351:151-158 (1997).
48. Yamato, H., Ohwa, M., Wernet, W., "A polypyrrole/three-enzyme electrode for creatinine detection", **Anal. Chem.**, 67:2776-2780 (1995).
49. Madaras, M.B., Popescu, I.C., Ufer, S., Buck, R.P., "Microfabricated amperometric creatine and creatinine biosensors", **Anal. Chim. Acta.**, 319:335-345 (1996).
50. Tiwari, A., Shukla, S.K., "Chitosan-g-polyaniline: a creatine amidinohydrolase immobilization matrix for creatine biosensor", **Express polymer letters**, 9:553-559 (2009).
51. Kim, E.J., Haruyama, T., Yanagida, Y., Kobatake, E., Aizawa, M., "Disposable creatinine sensor based on thick-film hydrogen peroxide electrode system", **Analytica Chimica Acta.**, 394:225-231 (1999).

52. Hsiue, G.H., Lu, P.L., Chen, J.C., "Multienzyme immobilized modified polypropylene membrane for an amperometric creatinine biosensor", ***Journal of Applied Polymer Science***, 92:3126-3134 (2004).
53. Ramanavicius, A., "Amperometric biosensor for the determination of creatine", ***Anal. Bioanal. Chem.***, 387:1899-1906 (2007).
54. Karakuş, E., Pekyardımcı, Ş., Kılıç, E., "Potentiometric bioenzymatic biosensor based on PVC membrane containing palmitic acid for determination of creatine", ***Process Biochemistry***, 41:1371-1377 (2006).
55. Tsuchida, T., Yoda, K., "Multienzyme-membrane electrodes for determination of creatinine and creatine in serum", ***Clin. Chem.***, 29/1:51-55 (1983).
56. Walsh, D.A., Dempsey, E., "Comparison of electrochemical, electrophoretic and spectrophotometric methods for creatinine determination in biological fluids", ***Analytica Chimica Acta.***, 459:187-198 (2002).
57. Yadav, S., Devi, R., Bhar, P., Singhal, S., Pundir, C.S., "Immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase on iron oxide nanoparticles/chitosan-g-polyaniline modified Pt electrode for detection of creatinine", ***Enzyme and Microbial Technology***, 50:247-254 (2012).
58. Işıldak, İ., Cubuk, O., Altıkatoğlu, M., Yolcu, M., Erci, V., Tinkilic, N., "A novel conductometric creatinine biosensor based on solid-state contact ammonium sensitive PVC-NH₂ membrane", ***Biochemical Engineering Journal***, 62:34-38 (2012).
59. Stefan, R.I., Staden, V., Bokretson, R.G., "Simultaneous determination of creatine and creatinine using monocrystalline diamond paste-based amperometric biosensors", ***Analytical Letters***, 39:2227-2233 (2006).
60. Qiong, C., Tuzhi, P., "Silk fibroin/cellulose acetate membrane electrodes incorporating xanthine oxidase for the determination of fish freshness", ***Analytica Chimica Acta.***, 369:245-251 (1998).
61. Chubey, A., Gerard, M., Singhal, R., Singh, V.S., Malhotra, B.D., "Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole-polivinylsulfonate composite films for application to lactate biosensors", ***Electrochimica Acta.***, 46:723-729 (2000).
62. Lawal, A.T., Adeloju, S.B., "Comparison of polypyrrole-based xanthine oxidase amperometric and potentiometric biosensors for hypoxanthine", ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, 66:270-275 (2010).

63. Perez, D.M., Ferrer, M.L., Mateo, C.R., "A reagent less fluorescent sol-gel biosensor for uric acid detection in biological fluids", **Analytical Biochemistry**, 322:238-242 (2003)
64. Erden, P.E., "Kreatin tayini için poli(vinilferrosen)'e kreatinaz ve sarkozin oksidaz immobilize edilmesi ile hazırlanmış amperometrik enzim elektrot", Yüksek lisans tezi, **Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, (2004).
65. Bal, Ö., "Biyolojik sıvıda glukozun tayini için polipirol filme glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması", Yüksek lisans tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, (2012).
66. Özdemir, M., "Kolin tayini için polipirol-polivinilsülfonat filme kolin oksidaz enzimlerinin immobilizasyonu ile biyosensör hazırlanması", Yüksek lisans tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, (2012).
67. Çete, S., "Ürik asit tayini için biyosensör hazırlanması", Doktora tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, (2005).
68. Ghosh, S., Sarker, D., Misra, T.N., "Development of an amperometric enzyme electrode biosensor for fish freshness detection", **Sensors and Actuators B**, 53:58-62 (1998).
69. Abbasian, A., Ghaffarian, S.R., Mohammadi, N., Fallahi, D., "The contact angle of thin-uncured epoxy films: Thickness effect.", **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 236:133-140(2004).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : ÇALIŞKAN, Süleyman
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 07.09.1985 / Yenimahalle
Medeni hali : Bekar
e-mail : sb.caliskan@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Kimya Bölümü	2009
Lise	Yahya Kemal Beyatlı Lisesi	2003

Yabancı Dil

İngilizce