



**BALIK ETİ TAZELİĞİNİN TESPİTİ İÇİN KSANTİN OKSİDAZ VE
ÜRİKAZ ENZİMLERİNİN POLİPİROL/PARATOULENSÜLFONAT
FİLME İMMOBİLİZASYONU İLE YENİ BİR BİYOSENSÖR
HAZIRLANMASI**

Ezgi EROL

**YÜKSEK LİSANS
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

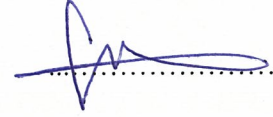
TEMMUZ 2014

EZGİ EROL tarafından hazırlanan “BALIK ETİ TAZELİĞİNİN TESPİTİ İÇİN KSANTİN OKSİDAZ VE ÜRİKAZ ENZİMLERİNİN POLİPİROL/PARATOLUENSÜLFONAT FİLME İMMOBİLİZASYONU İLE YENİ BİR BİYSENSÖR HAZIRLANMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Servet ÇETE

Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Başkan : Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU

Biyokimya (Tıp), Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 21/07/2014

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Ezgi EROL

(21/07/2014)

BALIK ETİ TAZELİĞİNİN TESPİTİ İÇİN KSANTİN OKSİDAZ VE ÜRİKAZ
ENZİMLERİNİN POLİPİROL/ PARATOLUENSÜLFONAT FİLME
İMMOBİLİZASYONU İLE YENİ BİR BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Ezgi EROL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2014

ÖZET

Bu çalışmada, balık eti tazeliğinin tespiti için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Bu amaçla, platin levha üzerinde pirolün paratoluensülfonatlı ortamda elektropolimerleşmesi ile polipirol/ paratoluensülfonat filmi hazırlandı. Ksantin oksidaz ve ürikaz enzimleri, polipirol/ paratoluensülfonat film içine tutuklama yöntemiyle immobilize edildi. Balık tazeliğinin tayini, hazırlanan enzim elektrodun yüzeyinde gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksitin 0,30 V'da yükseltgenmesine dayanarak yapıldı. Biyosensörün balık tazeliğinin tayini için çalışma aralığı tayin edildi. Hazırlanan biyosensörün cevabına pH'nın ve sıcaklığın etkisi araştırıldı. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü tayin edildi. Biyosensörün yüzeyinin morfolojik yapısı SEM, AFM, yüzey temas açısı ve profilometre gibi yöntemlerle karakterize edildi. Hazırlanan biyosensörle balık eti numunelerinde hipoksantin tayini yapıldı. Biyolojik ortamda olabilecek girişimlerin biyosensörün cevap akımına etkileri incelendi.

Bilim Kodu : 201.1.020

Anahtar Kelimeler : Hipoksantin, ksantin oksidaz, ürikaz, biyosensör, polipirol, paratoluensülfonat

Sayfa Adedi : 82

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Servet ÇETE

PREPARATION PROCEDURE FOR A NEW BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF
FISH FRESHNESS BY THE IMMOBILIZATION OF XANTHINE OXIDASE AND
URICASE ENZYMES IN POLYPYRROLE/ PARATOLUENESULPHONATE FILM

(M. Sc. Thesis)

Ezgi EROL

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2014

ABSTRACT

In this study, new amperometric biosensor for determination of hypoxanthine was developed. For this reason; polypyrrole/ paratoluensulphonate films have been prepared on the platinum electrode by the electropolymerization of pyrrole was carried out in the presence of paratoluensulphonate. Xanthine oxidase and uricase enzymes have been immobilized in polypyrrole/paratoluensulphonate via the entrapment method. Hypoxanthine detection is based on the oxidation of hydrogen peroxide at 0,30 V produced by the enzymatic reaction on the enzyme electrode surface. The linear working range of biosensor for hypoxanthine was determined. The effects of pH and temperature on the response of the hypoxanthine biosensor were investigated. Reproducibility and storage stability were determined for the biosensor. The morphological structure of the surface of the biosensor was characterized with some methods such as SEM, AFM, surface contact angle and profilometer. The performance of biosensor has been tested at fish meat samples. The effect of the interference possibly occurring in biological environments on the biosensor response have been investigated.

Science Code : 201.1.020

Key Words : Hypoxanthine, xanthine oxidase, uricase, biosensor, polypyrrole, paratoulensulphonate

Page Number : 82

Supervisor : Assist. Yrd. Doç. Dr. Servet ÇETE

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince bilgi birikimi ve tecrübesi ile beni yönlendiren, desteğini esirgemeyen ve sürekli cesaretlendiren değerli hocam Sayın Yrd. Doç.Dr. Servet ÇETE'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

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

Özel yaşamım ve deneysel çalışmalarımda sabırla bana yardım eden ve desteğini esirgemeyen Özlem ÇOLAK 'a, Arş. Gör. Demet UZUN 'a, Arş. Gör. Elif AYNACI' ya, Gökçen KARPUZ'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma deneysel çalışmalar sırasındaki yardımları ve daha da önemlisi değerli dostlukları için minnettarım.

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

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
TEŞEKKÜR.....	xiv
İÇİNDEKİLER	xviii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xx
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Enzimler	5
2.1.1. Enzimlerin yapısı ve özellikleri	6
2.1.2. Enzimlerin görevi.....	7
2.1.3.Reaksiyon hızını etkileyen faktörler	8
2.2. Ürikaz (U) Enzimi ve Özellikleri	9
2.3. Ksantin Oksidaz (KO) Enzimi ve Özellikleri	10
2.4. Biyosensörler.....	11
2.4.1. Biyosensörlerin tarihçesi	12
2.4.2. Biyosensörlerin ana gövdesini oluşturan yapılar	13
2.4.3. Biyoresöptörler.....	13
2.4.4. Dönüştürücüler (Transduserler)	14
2.4.5. Biyosensör hazırlanmasında dikkat edilmesi gerekenler	17
2.4.6. Biyosensörlerde kullanılan biyoaktif yapılar	17
2.4.7. Biyosensörlerde biyoaktif bileşen immobilizasyon yöntemleri	17
2.4.8. Enzim immobilizasyon metotları	18

	Sayfa
2.5. İletken Polimerler.....	27
2.5.1. İletken polimerlerin tarihsel gelişimi	27
2.5.2. İletken polimerler	27
2.5.3. Pirel	29
2.5.4. Pirelin elektrokimyasal polimerizasyonu	30
2.5.5. Dopant olarak kullanılan paratoluensülfonat	31
2.6. Enzim Sensörleri	31
2.6.1. Enzim sensörlerinin genel çalışma prensibi	32
2.6.2. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması	32
2.7. Performans Faktörleri.....	33
2.7.1. Seçicilik.....	33
2.7.2. Kullanım ömrü	33
2.7.3. Kalibrasyon gereksinimleri	34
2.7.4. Tekrarlanabilirlik.....	34
2.7.5. Kararlılık	34
2.7.6. Yüksek duyarlılık	34
2.7.7. Yeterli düzeyde tayin sınırı	35
2.7.8. Geniş ölçüm aralığı	35
2.7.9. Hızlı cevap zamanı.....	35
2.7.10. Basit ve ucuzluk	35
2.8. Kaynak Araştırması.....	36
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	43
3.1. Cihazlar ve Malzemeler	43
3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı	43

	Sayfa
3.1.2. Hücre ve elektrotlar.....	43
3.1.3. pH metre.....	43
3.1.4. Su banyosu	44
3.1.5. Mikro pipet.....	44
3.1.6. Argon gazı.....	44
3.1.7. Saf su.....	44
3.1.8. SEM cihazı	44
3.1.9. AFM cihazı	44
3.1.10. Yüzey temas açısı analiz cihazı.....	44
3.1.11. Profilometri cihazı (Film kalınlığının ölçülmesi)	45
3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri	45
3.2.1. Kullanılan çözeltiler.....	46
3.3. Platin Yüzeye Polipirol-Paratoluensülfonat (PPy-pTS) Kaplanması.....	47
3.3.1. Pt/PPy-pTS film elektrodun SEM analizi	48
3.3.2. Pt/PPy-pTS film elektrodun AFM analizi.....	48
3.3.3. Pt/PPy-pTS film elektrodun yüzey temas açısı analizi	48
3.3.4. Pt/PPy-pTS film elektrodun profilometri spektrumu (Film kalınlığının ölçülmesi).....	48
3.4. Pt/PPy-pTS Film Elektrodun Hidrojen Peroksite Duyarlılığının Belirlenmesi..	49
3.5. Pt/PPy-pTS Film Elektrodun Serbest Enzimin Bulunduğu Çözeltide Hipoksantine Duyarlılığının Belirlenmesi	49
3.6. Biyosensörlerin Hazırlanması.....	49
3.6.1. Hapsetme yöntemi ile immobilizasyon	49
3.6.2. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün SEM analizi.....	50
3.6.3. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün AFM analizi	50

	Sayfa
3.6.4. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün yüzey temas açısı analizi.....	50
3.6.5. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün profilometri spektrumu	50
3.7. Pt/PPy-pTS/KO-U Biyosensörünün En İyi Koşullarının Belirlenmesi	50
3.7.1. pH'nın etkisi.....	51
3.7.2. Sıcaklığın etkisi.....	51
3.7.3. Substrat derişiminin etkisi	52
3.7.4. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi.....	52
3.7.5. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi	52
3.8. Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler.....	53
3.9. Biyosensörün Gerçek Numuneler Üzerindeki Performansının İncelenmesi	55
3.9.1. Numune hazırlanması.....	55
3.9.2. Balık numunesi ile ölçüm alınması.....	55
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
4.1. Pt/PPy-pTS Elektordunun Hidrojen Peroksite Duyarlılığının Belirlenmesi	59
4.2. Pt/PPy-pTS Elektordunun Serbest Enzimli Ortamda Hipoksantine Duyarlılığının İncelenmesi	60
4.3. SEM Analizi	60
4.4. AFM Analizi.....	61
4.5. Pt/PPy-pTS Biyosensörünün Yüzey Temas Açısı Analizi	62
4.6. Pt/PPy-pTS Biyosensörünün Profilometri Spektrumu.....	63
4.7. Biyosensörün En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi	64
4.7.1. pH'nın etkisi.....	64
4.7.2. Sıcaklığın etkisi.....	65
4.7.3. Substrat derişiminin etkisi	66
4.7.4. Biyosensör için kalibrasyon grafiği çizilmesi	68

	Sayfa
4.7.5. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi.....	69
4.7.6. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi	70
4.8. Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler.....	70
4.9. Biyosensörün Gerçek Numunelere Karşı Davranışlarının İncelenmesi	71
4.9.1. Balık ölümü gerçekleştiği anda alınan ölçüm	71
4.9.2. Derin dondurucuda bekletilmiş balık numunesinde hipoksantin artışlarının incelenmesi	72
4.9.3. Buzdolabında bekletilmiş balık numunesinde hipoksantin artışlarının incelenmesi.....	73
4.9.4. Derin dondurucuda ve buzdolabında bekletilen balık numuneleri için alınan hipoksantin ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması	74
4.10. Sonuç.....	75
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	82

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Mikrobiyal kaynaklı ürikaz enziminin optimum koşulları, Km değeri ve molekül kütlesi.....	9
Çizelge 2.2. Mikrobiyal kaynaklı ksantin oksidaz enziminin optimum koşulları, Km değeri ve molekül kütlesi	11
Çizelge 2.3. Enzim biyosensörleri için kullanılan farklı dönüştürücüler.....	14
Çizelge 2.4. Enzim immobilizasyon yöntemleri.....	18
Çizelge 2.5. Enzimin bağlanmasını sağlayan fonksiyonel gruplar.....	20
Çizelge 2.6. İletken polimerler ve iletkenleri.....	28
Çizelge 2.7. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması.....	33
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar	45
Çizelge 4.1. Biyosensör üzerine girişim yapan maddeler ve girişim etkileri	71

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Balık ölümü sonrasında ksa dokuda ATP nin hipoksantine dönüşümü	1
Şekil 1.2. Enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan hipoksantin, ksantin oksidaz ve ürik asitin halkalı yapıları.....	4
Şekil 2.1. Bir substrat molekülünü bağlayan bir aktif bölgesi enzimin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.2. Reaksiyonlarda enerji profili	7
Şekil 2.3. Enzim reaksiyon hızlarının sıcaklık profili.....	8
Şekil 2.4. Enzim reaksiyonlarının pH profili	9
Şekil 2.5. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi	9
Şekil 2.6. Pürin bazlarının yıkımı	11
Şekil 2.7. Bir biyosensörün şematik yapısı	13
Şekil 2.8. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.9. Kovalent bağlama	20
Şekil 2.10. Adsorpsiyon.....	22
Şekil 2.11. İyonik bağlama	22
Şekil 2.12. Çapraz bağlama	24
Şekil 2.13. Polimer matrikste tutuklama.....	26
Şekil 2.14. Mikrokapsülleme	26
Şekil 2.15. Pirolün polimerizasyonuna ait mekanizma.....	30
Şekil 2.16. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal sıralamasında enzimlerin yeri	31
Şekil 2.17. Enzim sensörlerinin genel şematik gösterimi	32
Şekil 3.1. Kaplama ve ölçümde kullanılan hücre sistemi	43
Şekil 4.1. Elektrot yüzeyi ve hücre sistemi içerisinde elektrot aktarımlarının ve indirgenen- yükseltgenen türlerin temsili şekli.....	58

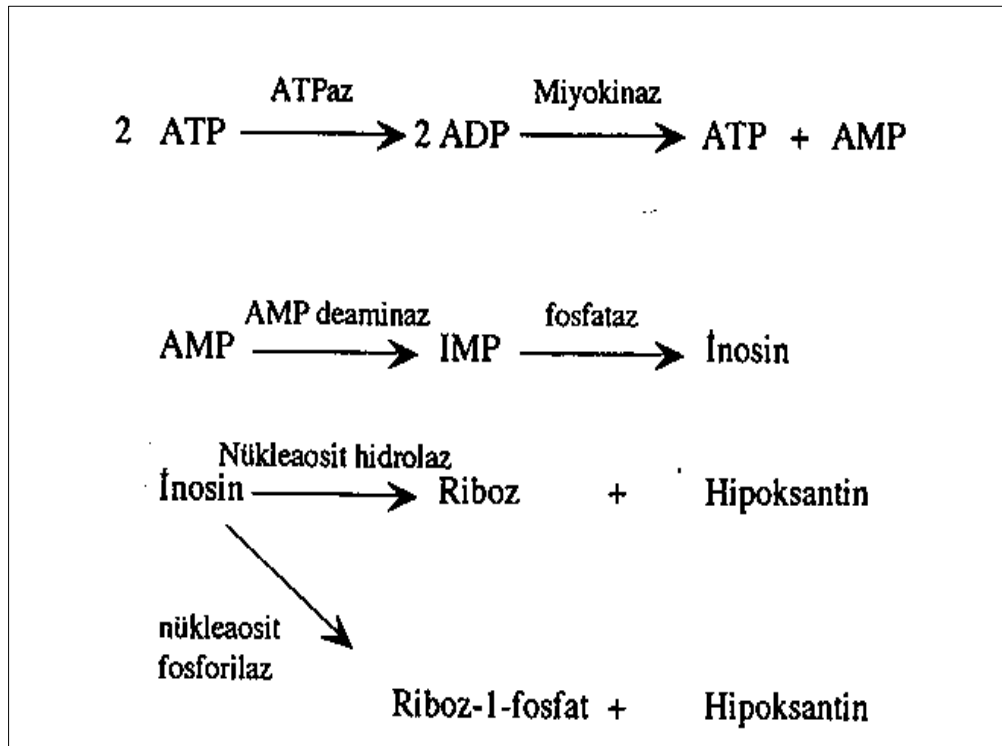
Şekil	Sayfa
Şekil 4.2. Pt/PPy-pTS elektrodun artan hidrojen peroksit derişimine karşı cevap akımları.....	59
Şekil 4.3. Pt/PPy-pTS film elektrodun serbest enzimli ortamda hipoksantine cevabı.....	60
Şekil 4.4. Pt/PPy-pTS film elektrodun SEM fotoğrafı	61
Şekil 4.5. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün SEM fotoğrafı.....	61
Şekil 4.6. Pt/PPy-pTS film elektrodun AFM fotoğrafı	62
Şekil 4.7. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün AFM fotoğrafı	62
Şekil 4.8. Pt/PPy-pTS film elektrodun yüzey temas açısı fotoğrafı	63
Şekil 4.9. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün yüzey temas açısı fotoğrafı	63
Şekil 4.10. Pt/PPy-pTS film elektrodun profilometri spektrumu	64
Şekil 4.11. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün profilometri spektrumu.....	64
Şekil 4.12. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün farklı pH ortamlarındaki cevap akımları	65
Şekil 4.13. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün sıcaklık değişimine karşı duyarlılığı ...	66
Şekil 4.14. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün artan hipoksantin derişimine karşı davranışı.....	67
Şekil 4.15. Biyosensörün Lineweavwe-Burk grafiği.....	68
Şekil 4.16. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün kalibrasyon grafiği.....	69
Şekil 4.17. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği.....	69
Şekil 4.18. Biyosensörün raf ömrü	70
Şekil 4.19. Balık ölümü gerçekleştiği anda proteini çöktürölerek hazırlanmış numune için standart ekleme metodu ile hazırlanmış kalibrasyon grafiği	72
Şekil 4.20. Derin dondurucuda bekletilen numune için periyodik aralıklarla alınan hipoksantin ölçüm sonuçlarının bekletilen gün sayısına karşı grafiği	73
Şekil 4.21. Buzdolabında bekletilen numune için periyodik aralıklarla alınan hipoksantin ölçüm sonuçlarının bekletilen gün sayısına karşı grafiği	74
Şekil 4.22. Her iki durum için alınan sonuçların karşılaştırılması.....	75

1. GİRİŞ

Balıklar, et kalitelerinin ve besin değerlerinin yüksekliği nedeniyle özellikle son yıllarda oldukça fazla tercih edilen gıdalardır. Ancak, sahip oldukları biyolojik kompozisyonları nedeniyle çok çabuk bozulurlar. Bunun yanına bir de uygun olmayan muamele ve depolama şartları eklendiğinde tüketicilere ulaşmadan önce balıkların büyük bir kısmı bozulmaktadır. Balıklarda bozulmaya, avlama sonrası başlayan mikrobiyal, enzimatik, kimyasal ve fiziksel reaksiyonlar neden olmaktadır [1].

Balık öldüğü zaman vücut savunması da durur. Balıkların solungaçlarında, bağırsaklarında ve derisinde bulunan mikroorganizmalar ile doğal olarak bulunan enzimlerin faaliyetleri sonucu balık muhtevasında önemli değişimler olur. Sonuçta balığın lezzeti, kokusu, görünüşü ve tekstüründe bozulmalar meydana gelir [6].

Balık ölümü sonrasında kas dokuda ATP sırasıyla ADP, AMP, inosin monofosfat (IMP) , inosin ve hipoksantine dönüşmektedir.



Şekil 1.1. Balık ölümü sonrasında kas dokuda ATP nin hipoksantine dönüşümü[5].

Kas dokusunun parçalanması sonucu oluşan ürünlerin miktarları belirlenerek verilen bir sürede balığın tazelik durumu belirlenebilmektedir. Balıktaki hoş tatta inosin mono fosfat önemli bir faktörken, depolama esnasında biriken hipoksantin/ksantin ise balığın kötü tat ve kokusundan sorumlu olmaktadır. Bu nedenle hiposantin balıkta tazelik göstergesi olarak uzun yıllardan beri kullanılmaktadır.

Hipoksantin ((C₅N₄OH₄), M_A: 136,11); nükleik asit metabolizmasının ara ürünlerinden azotlu bir pürin bazıdır [4]. Hipoksantin biyolojik materyallerde adenin nükleotidinin yıkımının ana ürünü olarak biyolojik dokularda birikir. Bir balık öldüğü ya da yakalandığı anda bozulma başlar. Balık kasındaki nükleotidler balık ölünce yıkıma başlar ve sonrasında da devam eder. Başlangıçta balık kasında adenoazin-5-trifosfat (ATP) parçalanır. Sonuçta adenoazin-di-fosfat (ADP) oluşur, sonra bu ürün adenoazin-5-mono fosfat (AMP), inosin-5-monofosfat (IMP), inosin (HxR), hipoksantin (Hx), ksantin (X) ve ürik asite parçalanır. Balıktaki hoş tatta inosin mono fosfat önemli bir faktörken, depolama esnasında biriken hipoksantin/ksantin ise balıktaki kötü tatta önemli bir faktördür.

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

Hipoksantin miktarını ölçebilmek için spektrofotometri, kromatografi ve elektroforez gibi yöntemler mevcuttur. Bu metotların bazıları analiz öncesi hazırlık süreci, bazıları karmaşık olması ve bazıları da uzun sürmesi nedeniyle zahmetli metotlardır. Elektrokimyasal biyosensörler, Hx miktar tayininin daha basit ve daha hızlı yapılmasına olanak sağlamak için geliştirilmiştir [10].

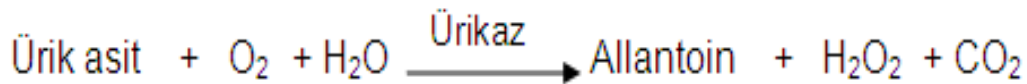
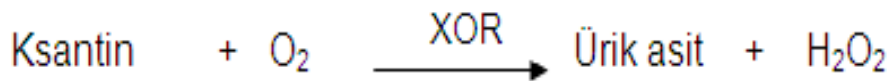
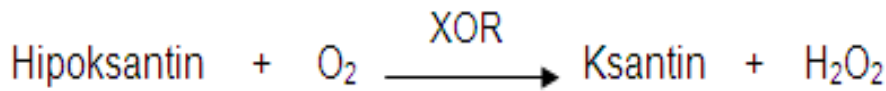
Her ne kadar biyolojik örneklerde bulunan elektrokimyasal aktif interferansların oksidasyonu bir akım meydana gelse de; elektrokimyasal enzim sensörlerinde, enzimlerin hedef molekülleri spesifik olarak tanımasıyla reaksiyon oranında bir akım oluşmasına yol açarlar. Bu yüzden bu tip biyosensörler substrat tespitini etkin ve seçici bir

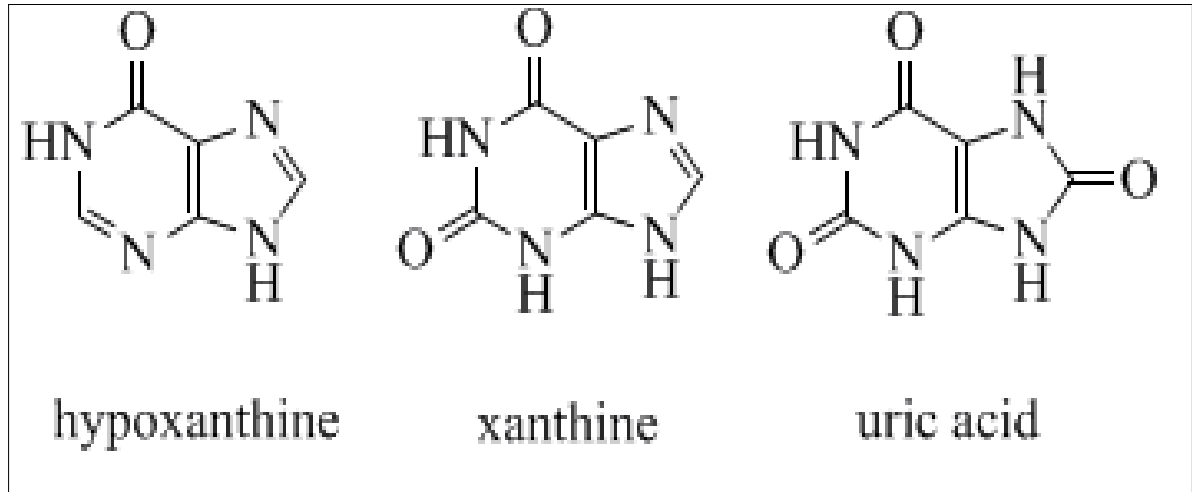
şekilde yaparlar. Birçok elektrokimyasal sensörde enzim, substratın oksidasyonunu katalizleyen bir oksidazdır. Algılama prosesinde elektron alıcı, katalitik bölgeden elektroda gidip- gelen elektronları kullanır. Birçok enzimin doğal elektron akseptörü olduğu için, elektron alıcı olarak genellikle oksijen kullanılır[18].

Çalışmamızda balık tazeliği tespiti için, hipoksantine duyarlı, amperometrik esaslı yeni bir biyosensör hazırlandı. Bu amaçla platin levha üzerine polipirol/paratoluen sülfonat (Pt/PPy-pTS) filmi pirolün elektropolimerleştirilmesiyle hazırlandı. Ksantin oksidaz (KO) ve ürikaz (U) enzimleri hapsedme yöntemiyle elektrot yüzeyine immobilize edilerek, Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörü hazırlandı.

Hipoksantin tayini, hipoksantin enzimatik reaksiyonlar sonucu allantoin oksidasyonu ile oluşan hidrojen peroksit moleküllerinin, +0,3 V'da yükseltgenmesi esasına dayanılarak yapıldı. Biyosensör için en iyi çalışma koşulları ve performansını etkileyen faktörler araştırıldı. Biyosensörün tekrarlanabilirliği ve raf ömrü incelendi. Biyosensör yüzeyinin morfolojik yapısı SEM, AFM, yüzey temas açısı, profilometre gibi yöntemlerle karakterize edildi. Gerçek numune karşısındaki davranışına bakıldı. Bu amaçla balık numuneleri hazırlanarak, numunedeki hipoksantin miktarı tayin edildi. Balık numunesinin +4 °C sıcaklıktaki buzdolabı ortamında ve -18 °C 'de derin dondurucu ortamında belirli sürede bekletilmesi sonucu dokudaki hipoksantin miktarı değişimleri gözlemlendi ve karşılaştırıldı.

Hazırlanan Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörü üzerinde meydana gelen reaksiyonlar aşağıda verilmiştir:





Şekil 1.2. Enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşan hipoksantin, ksantin ve ürik asitin halkalı yapıları

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Enzimler canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları katalize eden ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden % 100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler.

Canlıları oluşturan moleküller, yani biyomoleküller kinetik yönden oldukça kararlı olup kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler. Bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Biyomoleküllerin kararlılığı şu önemli sonucu sağlamaktadır: hücre içinde enzim olmayan reaksiyon hemen hemen vuku bulmaz, kendiliğinden meydana gelmez. Bunun anlamı, enzimler protein yapısında olduğu ve DNA seviyesinde düzenlenip, kontrol edilmektedir demektir. Buradan, enzimleri sadece katalizör özelliği ile nitelemenin eksik bir tanımlama olacağı anlaşılmaktadır. Gerçekten bu moleküller, bir hücreyi diğerlerinden farklı kılan özelliklere ait bilgilerin DNA'dan aktarılmasının en önemli araçlarıdır.

İnsanlar binlerce yıl öncesinden bu yana alkol fermantasyonu, bira ve ekmek yapımı gibi ilk biyoteknolojik çalışmalarla aslında enzimlerden yararlanmışlardır. Buna karşılık enzimler hakkında bilimsel denebilecek araştırma ve bulgular ancak geçtiğimiz yüzyılda görülmeye başlanmıştır. 1783 yılında Spallanzani' nin atmaca mide suyunun eti çözebileceğini bulması, 1811 yılında Kırchoff' un buğday nişastasının zamanla dekstrin ve diğer bileşiklere dönüştüğünü belirlemesi enzimoloji konusundaki ilk çalışmalar olarak gösterilebilir [9].

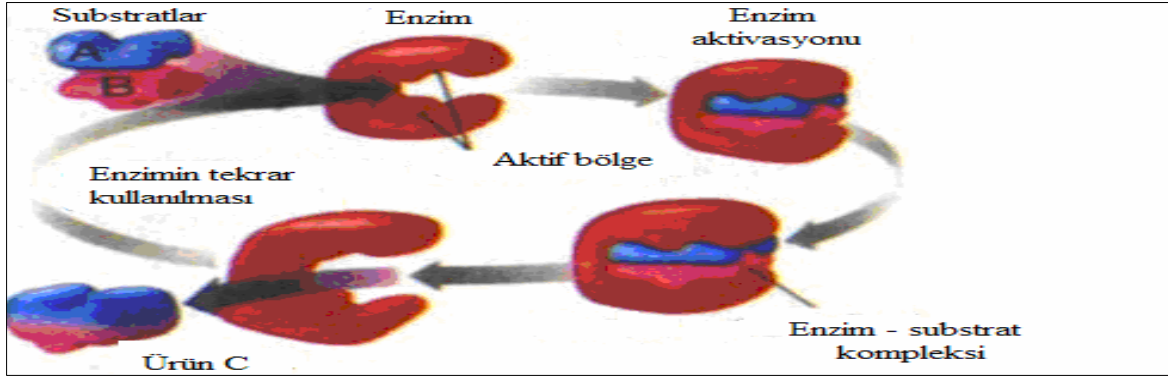
Kataliz olayı ile ilgili önemli ilk denemeler 1760-1825 yılları arasında midedeki enzimatik sindirim üzerinde yapılmıştır. Belirli bir enzim üzerindeki ilk çalışmayı 1835 yılında İsveçli bir kimyager olan S.S. Berzelius gerçekleştirmiş, diastazın nişastayı in vivo olarak sülfürik asitten daha yüksek verimle hidrolizlediğini göstermiştir. 1860 yılında L. Pasteur fermantasyon olayının enzimlerce yürütüldüğünü deneylerle ispat etmiş, bu yüzden

enzimler için ferment terimi kullanılmaya başlanmıştır. Fakat Pasteur enzimlerin yalnız canlı hücre yapısı içerisinde görev yapabildiklerini zannetmiştir. Enzimoloji alanında şüphesiz en önemli gelişme 1926 yılında, J.B. Summer'ın üreaz enzimini “Jack Beané” bitkisinden elde edip kristallendirdikten sonra protein yapısında bir bileşik olduğunu ortaya koymasıdır. Önceleri şüphe ile karşılanan bir sonuç, 1930-1936 yılları arasında J. Northrop'un pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimlerini kristallendirmesi ve protein yapısında olduklarını kesin olarak ortaya koymasıyla doğrulanmıştır. Bugün yaklaşık olarak 2000 kadar enzim tanımlanmış, birçoğu saf halde elde edilip kinetikleri incelenmiş ve 200'den fazlası da kristallendirilmiştir. Ancak yapılan genetik çalışmalar daha tespit edilmemiş birçok enzim varlığını göstermektedir [8].

Enzimler, gerekli koşulların sağlanması durumunda doğal ortamlarının dışında pek çok alanda kullanılabilmektedirler. Bu nedenle enzimlerin yapı ve fonksiyonlarını, kataliz mekanizmalarını ve enzimlerin katalizlediği her türlü metabolik ve biyokimyasal reaksiyonların neden ve nasıl gerçekleştiğini inceleyen enzimoloji bilim dalı, başta biyokimya ve moleküler biyoloji olmak üzere mikrobiyoloji, genetik, tıp, biyoteknoloji, farmakoloji ve toksikoloji gibi bilim dalları ve çeşitli endüstriyel alanlar için büyük önem taşımaktadır.

2.1.1. Enzimlerin yapısı ve özellikleri

Enzimler protein yapıları biyolojik katalizörlerdir. Enzimin protein yapısının yanında enzime aktiflik kazandıran gruplar vardır. Enzimin protein kısmına apoenzim, protein olmayan parçasına kofaktör denir. Apoenzim ve kofaktörün oluşturduğu aktif yapıya da haloenzim denir. Kofaktör arasında metal iyonları ve organik yapıda olan koenzimler yer alır. Sıklıkla karşılaşılan metal iyonları Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , koenzimler ise NAD^+ , FAD dır. Enzimler sadece bir substrata veya aynı fonksiyonlu grubu olan substrat serisine karşı etkindir. Enzim reaksiyonlarında yan ürünler meydana gelmez. Enzim molekülü büyük olmasına karşın, substrat enzim molekülünün her yerine değil aktif merkez denilen özel bir yerine bağlanır ve biyokimyasal reaksiyonlar burada meydana gelir. Aktif merkezde substratın birleşme yüzeyine uygun amino asit dizileri bulunmaktadır ve aktif merkez substratı bağlayarak bir enzim- substrat kompleksi meydana getirir, ardından oluşan kompleks ürüne dönüştükten sonra enzim üründen ayrılır (Şekil 2.1).

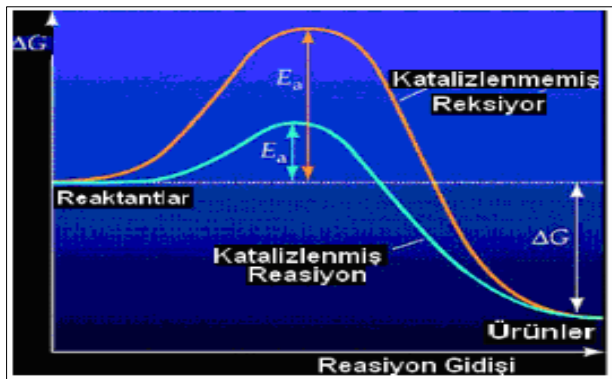


Şekil 2.1. Bir substrat molekülünü bağlayan bir aktif bölgeli enzimin şematik olarak gösterilmesi

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

2.1.2. Enzimlerin görevi

Enzimler, ilgili reaksiyonları ılıman koşullarda çok hızlı ve spesifik bir biçimde katalizleyebilmektedirler. Enzim reaksiyonlarında substrat ürüne dönüşürken enzim-substrat kompleksi üzerinden geçtiği kabul edilir. Aktif merkezin substrata çok uygun geometride olması uygun yön ve açıda bulunması, enzimlerin substrat kompleksinin oluşmasını çok kolaylaştırır ki; etki reaksiyon serbest enerji (ΔG) değişiminin yaklaşık 10 kat küçülmesine yani reaksiyon hızlarının yüz milyon katartmasına yardım eder (Şekil 2.2). Bundan başka aktif komplekste bir gerginlik meydana gelir ki, ürüne dönüşürken bu gerginliğin giderilmesinde reaksiyon hızının artmasına katkısı olur [2].

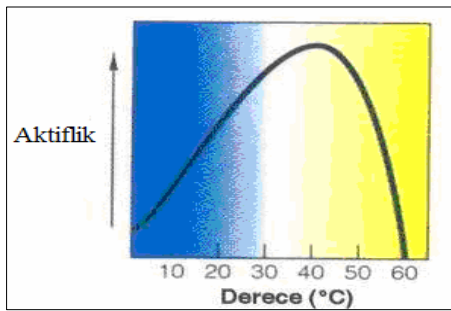


Şekil 2.2. Reaksiyonlarda enerji profili

2.1.3. Reaksiyon hızını etkileyen faktörler

a) Sıcaklık

Sıcaklık moleküllerin hareketini artırdığından tüm kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonların da hızını artırır. Enzimler protein yapısında olduklarından belirli bir sıcaklıktan sonra denatüre olmaya başlarlar. Bu önce enzim molekülünün tersiyer yapısının, sıcaklık arttıkça sekonder yapısının bozulması ve enzimin aktif merkezi etkilenerek reaksiyon hızının keskin düşmesi demektir (Şekil 2.3) [2].

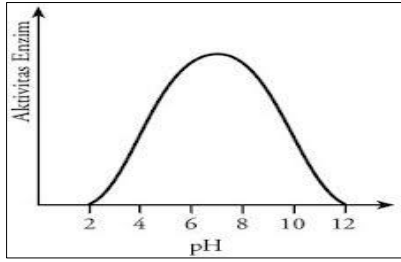


Şekil 2.3. Enzim reaksiyon hızlarının sıcaklık profili

Enzimler genelde 30-40° C arasında maksimum etkinlik gösterirler.

b) pH

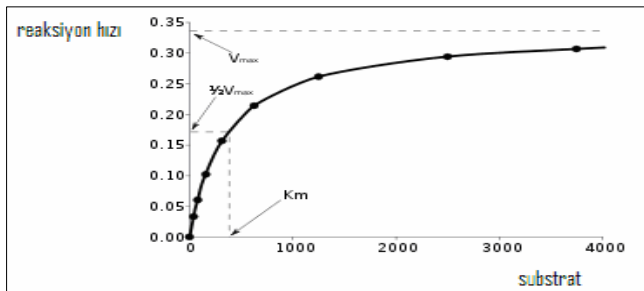
Enzimlerin, substrat ve koenzim moleküllerinde asitli ve bazlı gruplar vardır. Enzim substrat kompleksinin en kararlı bir biçimde oluşması, yani hızının maksimum olabilmesi için bu grupların belirli bir iyonlaşma durumunda olması gereklidir. Bunun dışındaki iyonlaşmalarda enzim-substrat kompleksi zayıflar, böylelikle reaksiyon hızı düşer. Bu, optimum bir pH' da reaksiyon hızının en yüksek olması demektir. pH- hız grafiği çan eğrisi şeklindedir. Her enzimin pH 3 ile 8 arasında olan optimum bir pH' sı vardır. Çok asitli ve bazlı ortamlarda enzim molekülü denatüre olacağından, reaksiyon hızı tersinmez olarak sıfıra düşer. Enzimlerle yapılan invitro deneylerde reaksiyon ortamının tampon çözeltisini hazırlamak için öncelikle optimum pH' sının bilinmesi ve tayin edilmesi gereklidir (Şekil 2.4.) [2].



Şekil 2.4. Enzim reaksiyonlarının pH profili

c) Substrat Derişimi

Enzimatik bir reaksiyon hızı substrat derişimi artıkça artar ve belirli bir substrat derişiminde hızı maksimum olur. Bu noktada enzim substrata tamamen doymuştur, bu noktadan sonra hız değişmez (Şekil 2.5) [2].



Şekil 2.5. Substrat derişiminin reaksiyon hızına etkisi

2.2. Ürikaz Enzimi (U) ve Özellikleri

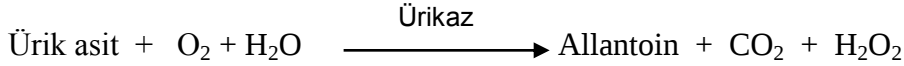
Ürikaz enzimi 120 kDa molekül ağırlığına sahip 4 alt birimli bir proteindir. Her bir alt birim 30 kDa molekül ağırlığına sahiptir [26].

Çizelge 2.1. Mikrobiyal kaynaklı ürikaz enziminin optimum koşulları, K_m değeri ve molekül kütlesi

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

Ürikaz (E.C. 1.7.3.3) , ürik asidin 5-hidroksiüreata oksidasyonunu katalizler. Bu katalizleme esnasında oksijeni de hidrojenperoksit indirger. 5-hidroksiüreata yarı kararlı bir üründür ve hem doğal olarak hem de enzimatik olarak allantoina dönüşür. Allantoin ürik aside göre daha iyi çözünür ve atılması daha kolaydır.

Ürikazın katalizlediği reaksiyon:



Ürikaz enzimi memelilerde, bitkilerde ve mikrobiyal hücrelerde bulunur. Memelilerde çoğunlukla onların karaciğerinde bulunmaktadır. İnsan ve maymunlarda ise bu enzim yoktur. Biyolojik sıvılarda ürik asidin miktarı bazı hastalıkların teşhisinde önem taşımaktadır. Bu hastalıklar gut hastalığı, böbrek hastalığı, Lesch-Nyhan sendromu ve organik asidemi gibi hastalıklardır. Ayrıca biyolojik sıvılardaki ürik asidin artan miktarı sonucu oluşan hiperüriseminin, böbrek hastalıkları, hipertansiyon ve kalp damar hastalığı (kardiyovasküler) türü rahatsızlıklarla ilgisi olduğu bazı makalelerde belirtilmektedir. Ürikaz, plazma ürik asit seviyelerini düşürücü ilaçlar arasında yer almıştır.

Ürikazın insanlarda olmayışının avantaj sayılacak yönü, ürik asidin kuvvetli bir antioksidant oluşudur. Bu özelliği sayesinde ürik asit radikalik oksijen türlerini yok eder ve başta lipid peroksidasyonu olmak üzere doku hasarlarını önlemede önemli rol oynar [11].

Ürikaz enzimi, kozmetik sanayinde, saç boyama ve dalgalandırmada kullanılmıştır. Ürikaz gerek saç boyamada gerekse dalgalandırmada çok olumlu sonuçlar vermiştir. Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada ise, ürikaz enzimi, ürik asit miktarının saptanmasında, biyosensörlerin yapımında kullanılmıştır [27].

2.3. Ksantin Oksidaz (KO) Enzimi ve Özellikleri

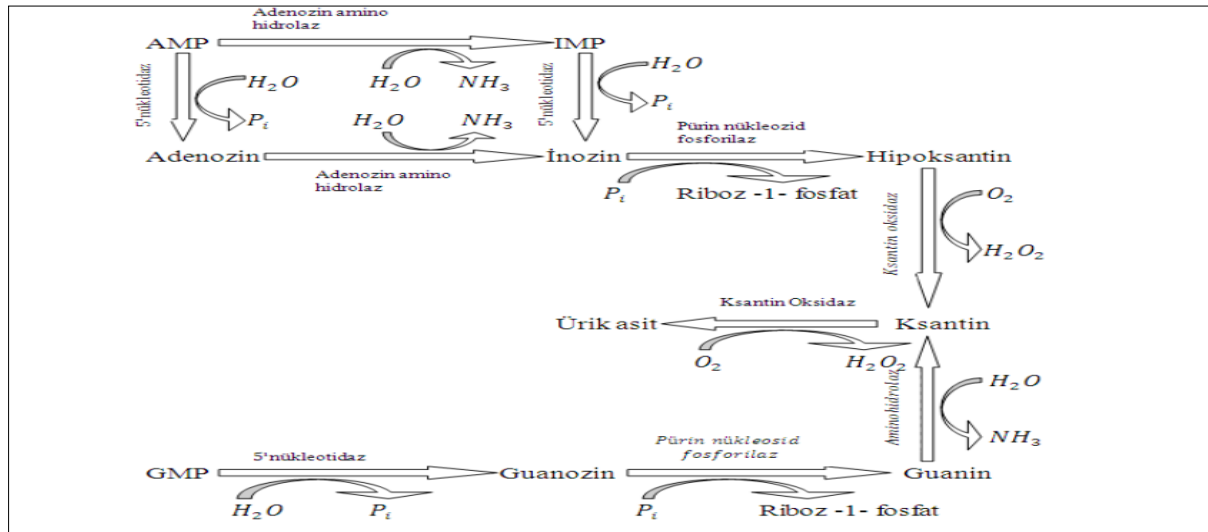
Ksantin oksidoredüktaz (KOR) molibden içeren bir flavoenzimdir. KOR her biri 290 kDa molekül kütlesine sahip iki homodimerden oluşur. Herbir homodimer bir Mo kofaktör, iki [2Fe-2S] merkezi ve bir FAD molekülü içerir [28].

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

Çizelge 2.2. Mikrobiyal kaynaklı ksantin oksidaz enziminin optimum koşullar, K_m ve molekül kütlesi [29]

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

Ksantin oksidoredüktaz (KOR) , insanlarda DNA, RNA'nın yanı sıra ATP, GTP ve cAMP gibi yüksek enerjili fosfatların katabolizmasının son ürünlerinden olan hipoksantin ve ksantin ürik asite oksidasyonunu katalizler.



Şekil 2.6. Pürin bazlarının yıkımı

2.4. Biyosensörler

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

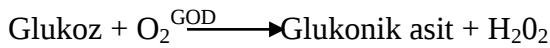
Biyosensörler genel olarak, biyolojik olaylardaki biyokimyasal değişimleri algılayarak biyolojik olayın teşhisine imkân tanıyan bir ölçme sistemi olarak tanımlanabilir.

2.4.1. Biyosensörlerin tarihçesi

Biyosensör terimini ilk defa Clark ve Lyons (1962) ifade etmişlerdir. Enzim-elektrot kompleksini imal eden ikili, bu kompleksi glukoz sensörü olarak kullanmışlardır. Sensör, oksido-redüktaz enzim olan glukoz oksidazın platinyum elektrotta immobilize olmasından ibarettir. Platinyum elektrot enzim tarafından üretilen H_2O_2 tarafından $+0,6\text{ V}$ 'da polarize olur. İşte basitçe bu prensibe göre çalışan tarihin ilk biyosensörü 1974 yılında piyasada *Yellow Springs Instrument* (YSI) olarak tanımlanmıştır.

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

Clark ve Lyons'un geliştirdiği ilk biyosensör jenerasyonu membran diyalizatör, reaksiyon bölgesi ve çeviricileri içermektedir. İkinci jenerasyon biyosensörlerde O_2 yerine elektronları enzimin redoks merkezinden elektrodun yüzeyine taşıyabilen bir elektron akseptörü (redoks mediyatoru) kullanılmıştır[31].



GOD: Glukoz oksidaz

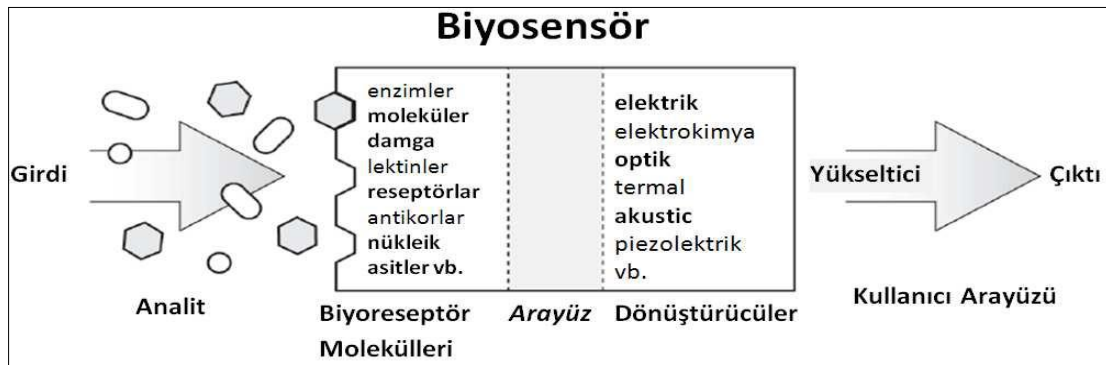


$M_{\text{red}} = M_{\text{ox}} = \text{redoks medyatörü}$

Üçüncü jenerasyon biyosensörlerde enzimin redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında direkt elektriksel iletişim sağlanmış ve redoks mediyatörlerine gereksinim kalmamıştır [31].

2.4.2. Biyosensörün ana gövdesini oluşturan yapılar

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



Şekil 2.7. Bir biyosensörün şematik yapısı

2.4.3 Biyoreseptörler

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

Matrikse fiziksel hapsedme veya kimyasal bağlama yöntemleri analiti tanıyan biyomoleküllerin dönüştürücülere immobilizasyonunda kullanılan stratejilerdir. Kimyasal bağlama yönteminde biyomolekül dönüştürücü yüzeyine uygun bir reaktif tarafından

kovalent olarak bağlanır. Çok az sayıda biyomolekülün bağlanması bile biyosensörün etkili çalışması için yeterli olabilir.

2.4.4. Dönüştürücüler (Transduserler)

Biyoreseptörün analiti tanıdıktan sonra ortamda oluşan fiziksel veya kimyasal değişimi algılayıp bunu ölçülebilir dijital sinyallere dönüştüren cihazlardır. Biyokimyasal reaksiyona göre dönüştürücü seçilir. Dönüştürücü olarak kullanılan elektrotlar amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde kullanılır. Bunların dışında transistörler ve termistörlerde dönüştürücü olarak kullanılmaktadır. Biyosensörlerde, biyoaktif bileşenin tayin edilecek madde ile etkileştiğinde oluşan sinyalin iletim ve ölçümünde genel olarak; elektrokimyasal, optik, kalorimetrik ve piezoelektrik esaslı sistemler kullanılır.

Çizelge 2.3. Enzim biyosensörleri için kullanılan farklı dönüştürücüler

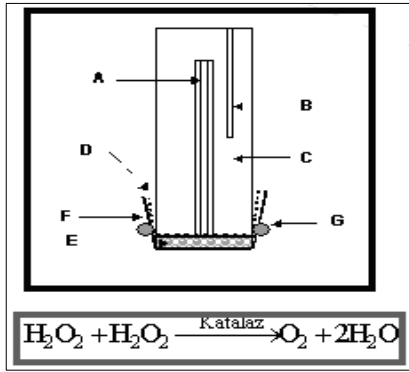
İletim ve Ölçüm Sistemleri	
<u>Elektrokimyasal Esaslı</u>	<u>Kalorimetri Esaslı</u>
Amperometri Esaslı (Elektrotlar)	(Termistörler)
Potansiyometri Esaslı (Elektrotlar)	
Yarı İletken Esaslı (Transistörler)	<u>Piezoelektrik Esaslı</u>
	(Piezoelektrik Kristaller)
<u>Optik Esaslı</u>	
Fotometri Esaslı (Optik Lifler)	
Fluorometri Esaslı (Optik Lifler)	
Biyoluminesans Esaslı (Optik Lifler)	

a) Elektrokimya esaslı biyosensörler

Enzim temelli biyosensörlerin pek çoğunda elektrokimyasal esaslı dönüştürücüler kullanılır. Bu transduserler ile amperometri ve/veya potansiyometri ilkelerine göre ölçümler alınabildiğinden genellikle oksidoredüktaz (elektron açığa çıkaran enzimler) sınıfı enzimler kullanılır.

Amperometrik Biyosensörler

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



Şekil 2.8. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi (A: çalışma elektrodu (Pt), B: referans elektrot (Ag/AgCl), C: elektrolit çözelti (KCl), D: iç gaz geçirgen membran (teflon), E: immobilize enzimi içeren biyoaktif tabaka, F: dış koruyucu membran)

Potansiyometrik Biyosensörler

Potansiyometri bilindiği gibi en genel anlamda bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlar. Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörler pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyon ya da katyonlara duyarlı iyon seçimli elektrotlar ve karbon dioksit ya da amonyağa yönelik gaz algılayan elektrotlardır.

Yarı İletken Temelli Biyosensörler

Temel sensör olarak metal oksit yarı iletken alan etki transistörlerini (MOSFET) ya da iyon duyar alan etki transistörlerini (ISFET) esas alan bu tür enzim sensörleri, enzim ile alan

etki transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etki transistörleri (ENFET) olarak adlandırılırlar. MOSFET'lerin, gazların ölçümüne uygun hale getirilmesiyle oluşan gaz duyar sensörlerde (GASFET) adsorblanan gaz moleküllerinin disosiyasyonu ve oluşan yükün oksit tabakasına transferi temel ilkeyi oluşturur. Bu durum tabanın dielektrik sabitini değiştirerek ve drain akımda bir modifikasyona yol açarak ölçüme imkân verir.

b) Optik temelli sensörler

Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekölün immobilize edilmesiyle hazırlanan ölçüm aygıtlarıdır. Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alırlar. Sinyal, ışık yansımaları, saçılımı ya da yayımı sonucu meydana gelir. Örneğin optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile hazırlanan optik esaslı enzim sensörleri temelde absorpsiyon, fluoresans, biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde işlev görürler.

c) Piezoelektrik temelli biyosensörler

Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki değişimleri belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensör seçiciliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığında veya biriktiğinde piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki değişimin ölçülmesiyle sonuca ulaşılır. Bir piezoelektrik temelli sensörün üzerinde enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen piezoelektrik enzim sensörlerinde, enzim moleküllerine substratların bağlanmasından dolayı meydana gelen kütle değişimlerinin, piezoelektrik kuartz diskin vibrasyonunda sebep oldukları farklanmadan yararlanılarak madde miktarına ulaşılır.

d) Kalorimetri temelli biyosensörler

Kalorimetri temelli enzim sensörleri, termal enzim sensörleri, enzim termistörleri ya da entalpimetrik enzim sensörleri gibi değişik isimlerle tanımlanırlar. Temel ilkeleri bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat konsantrasyonunu

belirlemekten oluşur. Genellikle enzimatik reaksiyonların ekzotermik doğasından yararlanılır. Enzimatik reaksiyon sonucunda meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca varılır. Kalorimetri temelli termal biyoanalizör ile termal enzim sensörleri arasında biyosensör kavramı açısından önemli farklar vardır. Termal biyoanalizörler, yalıtılmış bir sistemde genelde biri referans olmak üzere iki immobilize enzim kolonu içerirler. Pompalar yardımıyla bir sürekli akış olayı gerçekleşir. Enzimatik reaksiyon sonucu substrat konsantrasyonuna bağlı sıcaklık değişimi termofiller yardımıyla izlenir.

2.4.5. 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;

- Analite uygun biyoreseptörün (tanıyıcı molekülün) seçimi,
- Biyoreseptörü dönüştürücüye sabitlemede kullanılacak uygun ve verimli immobilizasyon yönteminin seçimi,
- Biyoreseptörün analiti tanınmasıyla oluşan kimyasal veya fiziksel sinyali anlaşılabilir sinyal formuna dönüştürecek olan dönüştürücünün seçimi ve dizaynı,
- Ölçüm aralığının, duyarlılığın ve ölçümlerdeki parazitlerin dikkate alınması,
- Cihazın kompakt bir hale dönüştürülmesi, olarak sıralanabilir.

2.4.6. Biyosensörlerde kullanılan biyoaktif yapılar

Biyosensörlerde kullanılan ve analizlenecek madde ile spesifik bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bileşenler, komplekslik sıralamasına göre basitten karmaşığa doğru bir sıralama yapıldığında; iyonoforlar, antikorlar, enzimler, nükleik asitler, lipozomlar, biyomembranlar (örneğin; membran reseptörleri), hücre organelleri, tüm hücreler, doku kesitleri ve homojenatları ve organlar olarak sınıflandırılabilirler.

2.4.7. Biyosensörlerde biyoaktif bileşen immobilizasyon yöntemleri

Biyoaktif bileşen ile iletici unsurun birleştirilmesinde oldukça farklı immobilizasyon yöntemlerinden yararlanılabilir. Biyoaktif bileşen sensör olarak da adlandırabileceğimiz

temel unsur üzerinde fiziksel olarak, jel içinde veya polimer matrikste tutuklanabilir, elektrot yüzeyinde biriktirilebilir, kovalent veya çapraz bağlanarak immobilize edilebilir.

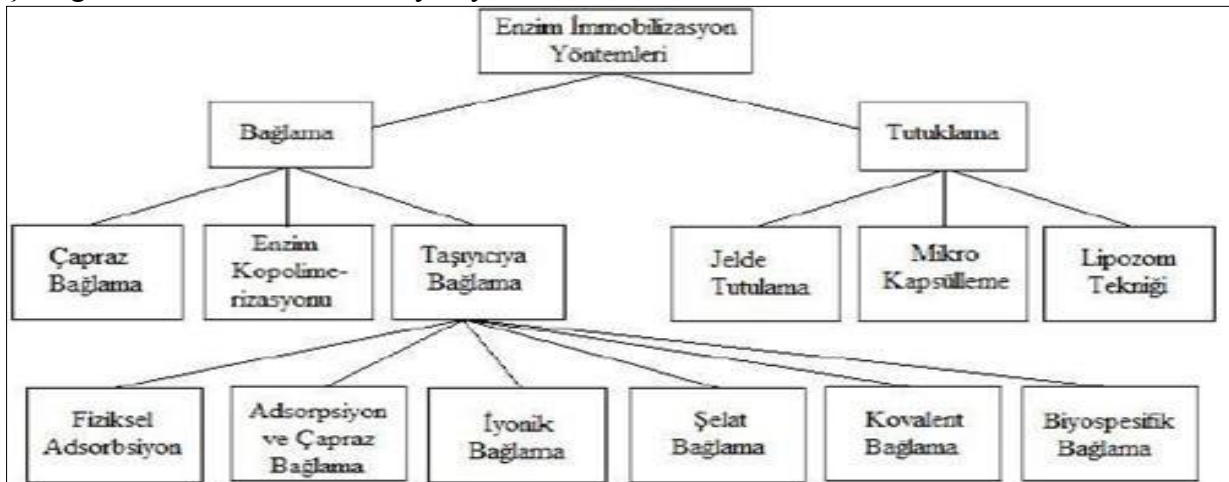
2.4.8. Enzim immobilizasyon metotları

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

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere üstünlükleri şöyle sıralanabilir;

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Çevre koşullarında(pH, sıcaklık vb.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Serbest enzime kıyasla daha karardır.
- 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 2.4. 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;

a) 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 değillerse yardımcı bir reaktif ile aktivite edilmeleri gerekir. İmmobilizasyon, 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 taşımaya dikkat edilir[26].

Kovalent bağlama

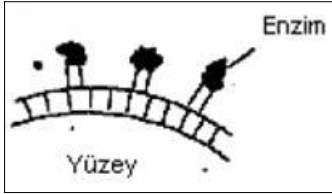
Kovalent bağlamanın gerçekleşmesi için bağlanma yüzeyinde ve/veya biyomolekül üzerinde tiyol (-SH), hidroksil (-OH), amin (-NH₂), karbonil (-C=O), karboksil (-COOH) gibi reaktif grupların olması gerekmektedir. Bu reaktif gruplar olmadığı takdirde çeşitli manipülasyonlarla (kendiliğinden oluşan tek tabakalar, SAM vb. gibi) reaktif gruplar oluşturulabilir. Biyomolekül aktive edilmiş transduser yüzeyine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanıp immobilize biyobileşeni içeren tabaka ile transduser yüzeyinde film oluşturulabilir. Biyobileşenlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonu pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi değişkenlere karşı direnç sağlar ve biyosensörün ömrünü uzatır ancak biyoaktif tabakada bir miktar aktivite kaybına sebep olabilir.

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

Çizelge 2.5. Enzimin bağlanmasını sağlayan fonksiyonel gruplar

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

Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Taşıyıcıya kovalent bağlanma enzimin zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir[26].



Şekil 2.9.Kovalent bağlama

Adsorpsiyon

İmmobilizasyon için kullanılan en basit yöntemlerden biridir. Biyobileşenin transduser yüzeyine non-kovalent etkileşimler (hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri, elektron geçiş kompleksleri ve Van der Waals kuvvetleri) ile tutturulması prensibine dayanır. Adsorpsiyonda kullanılan başlıca adsorbanlar; selüloz, silikajel, cam, hidroksiapatit, kollajen, kil, polimerik aromatik reçinelerdir. 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 işlemden geçirilmesi gerekir.

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

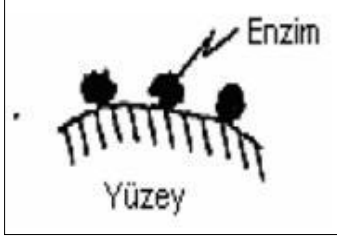
Bir enzimin suda çözünmeyen taşıyıcıda adsorpsiyonu pH, çözücü, iyon şiddeti, enzim-adsorban oranı ve sıcaklık gibi faktörlere bağlıdır. Bu faktörlerin araştırılması, adsorpsiyon ve aktivitenin önemli ölçüde geri kazanılması için optimal koşulların saptanması çok önemlidir. Adsorpsiyon mekanizması genellikle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

Prensip olarak, bir proteinin aktif yüzeylerde adsorpsiyonu tersinir bir işlem olmalıdır. Ancak bazı durumlarda (örneğin; kolenitte adsorplanmış üreaz) tersinir olmayan adsorpsiyon söz konusu olabilmektedir. Eğer aktivite sabit kalıyor ve immobilize enzim sürekli işlemlerde kullanılabilirse, 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 % 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.

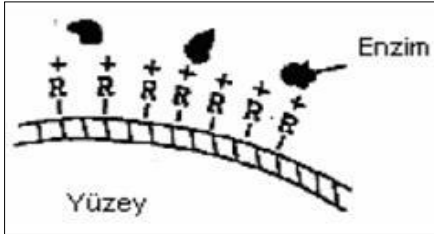


Şekil 2.10. Adsorpsiyon

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 2.11. 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.

b) Çapraz bağlama yöntemleri

Çapraz bağlama; küçük moleküllü bi ya da multi-fonksiyonel gruplar içeren kimyasal reaktifler kullanarak biyobileşen ile adsorban arasında çözünmeyen kompleksler oluşturma prensibine dayanır. En çok kullanılan çapraz bağlama ajanı glutaraldehitir. Glutaraldehit dışında hekzametilendiizosiyanat, 2-izosiyanato-4-izotiyasiyanato-toluen, 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen, bisdiazobenzidin-2,2disülfonikası gibi kimyasallarda çapraz bağlamada kullanılabilir.

Küçük moleküllü, bi veya multi fonksiyonel reaktifler 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.

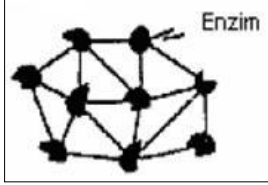
Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu 4 farklı şekilde gerçekleşir:

- 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; glutaraldehit, 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 metod iyi bir immobilizasyon metodu değildir. En çok kullanılan çağraz bağlama reaktifi gluteraldehitdir.



Şekil 2.12. Çapraz bağlama

c) Kopolimerizasyon yöntemleri

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

d) Tutuklama yöntemleri

Yüksek molekül kütleli biyomoleküller sentetik veya doğal jel matrikslerde, yarı geçirgen membranlarda, misellerde ve mikro kapsüllerde tutuklanarak etkin bir şekilde immobilize edilebilirler. Jel matriste tutuklamada kullanılan başlıca malzemeler akrilamid polimerleri, jelâtin tabakaları, nişasta, kalsiyum aljinat jelleri, silikon lastiği, polivinil klorür, polivinil alkoldür. Prensip olarak tutuklama enzim molekülünü belirli bir mekânda 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 çağraz bağlama ile immobilizasyondan ayıran en önemli özellik; enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

Polimer matrikste tutuklama

Polimerizasyon ve çağraz bağlamanın olduğu ortamda enzim de bulunduğu takdirde enzim, çağraz bağlanma sonucu oluşan odacıklarda(kafes) tutuklanmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer; N,N'-metilenbisakrilamid ile çağraz bağlanmış poliakrilamiddir. Yöntem, yüksek derece çağraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması

temeline dayanır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir.

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

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

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

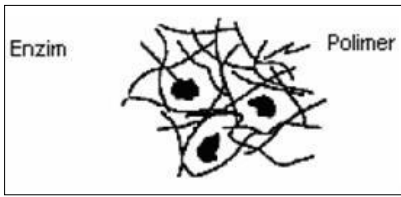
Polimer zincirleri arasındaki çapraz bağlama değişik bifonksiyonel veya multi-fonksiyonel reaktiflerle sağlanmaktadır. Örneğin, bu yöntemle enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan taşıyıcı olan poliakrilamidin çapraşık bağlanması N,N'-metilenbisakrilamid ile gerçekleştirilir.

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

Bu yöntemle immobilize edilen enzimin asıl özelliklerinde bir değişme beklenmez. Ancak taşıyıcının tipi ve enzimatik reaksiyonlar bölgesel mikro çevre etkilerinin oluşmasına neden olurlar. Örneğin, taşıyıcının yüklü olması önemli bir 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 moleküllü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir.



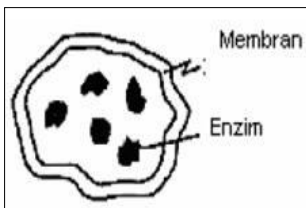
Şekil 2.13. Polimer matrikste tutuklama

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



Şekil 2.14. Mikrokapsülleme

2.5. İletken Polimerler

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

2.5.1. İletken polimerlerin tarihsel gelişimi

İlk olarak elektrokimyasal polimerizasyon metodu 190 yılında Szarvasy tarafından yapıldı[40]. Fakat Szarvasy çalışmasıyla ilgili bir çalışma yapılamadı. Rambold'un metilmetakrilatın elektrokimyasal polimerizasyonunu 1947'de tezinde ele almasına kadar polimerizasyon hakkında önemli bir çalışma yapılamadı. Bu zamandan sonra 1950-1970 arasında bu alanda birçok çalışma yapıldı. Chiang poliasetilenin iletkenliğini yükseltgen dopantlarla artırmayı başardı.

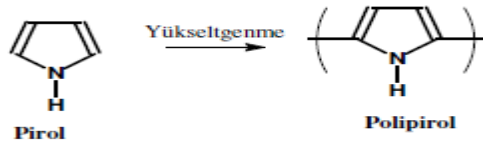
Önemli bir çalışma ise polipirol (ppy) üzerinde yapıldı. Pirolün ilk elektrokimyasal polimerizasyonu Bocchi tarafından 1968 yılında gerçekleştirildi. Bocchi “siyah pirolü” adlı maddeyi 8 S/cm elektrik iletkenliğinde elde etti. 1979 yılında havanın neminden etkilenmeyen iletkenliği 100 S/cm olan free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

2.5.2. İletken polimerler

Polimerik malzemeleri metallere ayıran en önemli özellik yalıtkan olmalarıdır. Bu özellik polimerik malzemelerin kullanımında birçok üstünlükler sağlar. Fakat son yıllarda, elektrik akımını iletebilen yeni bir organik polimer sınıfı geliştirildi. Asetilen, pirol, tiyofen gibi çeşitli benzen türevlerinden sentezlenen ve “organik metaller” olarak da bilinen bu polimer korozyon önleyici kaplama olarak, pillerde ve kararlılıklarına bağlı olarak mikroelektronikte önemli bir potansiyele sahiptirler. Bu polimerler arasında polipirol ve

türevleri, elektriksel özelliği, çevresel kararlılığı, kimyasal ve elektrokimyasal sentezinin kolaylığı nedeniyle en yoğun şekilde incelenmeye alınmış grubu oluşturmaktadır.

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



Pirolün kimyasal sentezi yanı sıra elektrokimyasal sentezi de uzun yıllardan beri bilinen bir yöntemdir. Sulu ya da susuz ortamda elektrokimyasal çalışma olasılığı kimyasal olarak sentezlenen polipirolde daha yüksek iletkenlik gösteren filmler sentezlenebilmesi ve elde edilen polimer filmin yarı iletkenlerin korozyonunu azaltma avantajı elektrokimyasal senteze ilgiyi artırmıştır. Yalnız elde edilen polipirol sert ve kırılgandır ve bu zayıf mekanik özellikler onun uygulama alanlarında kullanım potansiyelini de düşürür. Polimerlerin iletkenliği Çizelge 2.6’da toplanmıştır. Poliasetilen yüksek iletkenliğe sahip olmasına rağmen hava ve nem içerebilmesinden dolayı ticari bir iletken polimer değildir. Polipirol ve politiofen poliasetilenle göre hava ortamında oldukça stabildir.

Çizelge 2.6. İletken polimerler ve iletkenlikleri

Polimer	Yapısı	Doplanan Yapılar	Yaklaşık İletken değerleri (Siemens/cm)
Poliasetilen	$\text{---}(\text{CH})_n\text{---}$	I_2 , Br_2 , Li , Na , AsF_5	10000 ^a
Polipirol		BF_4^- , ClO_4^- , tosilet ^b ,	500-7500
Politiofen		FeCl_4 , ClO_4^- , BF_4^-	1000
Poli(3-alkiltiofen)		BF_4^- , ClO_4^- , FeCl_4	1000-10000 ^a
Polifenilen sülfid		AsF_5	500
Politenil enevinilen		AsF_5	2700 ^a
Polifenilen		AsF_5 , Li , K	1000
Polifuran		BF_4^- , ClO_4^-	100
Polianilin		HCl	200 ^a II

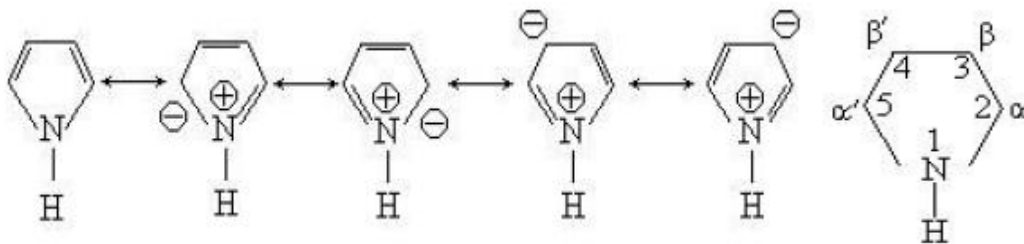
İletken polimerlerin en önemli problemlerinden biri herhangi bir çözücünde çözüneme problemi. Son yıllarda bu çözünme problemi de bilinerek yapısal modifikasyon olmadan polipirölün çözüneme problemini çözmek için sulu demirklorür, çözeltisi, suda çözüneme polimerizasyon sistemleri araştırılmıştır. Fakat bu sistemlerde, metilselölöz, polivinilalkol, polivinil pirolidon veya poliakrilamit gibi nötral polimerler kullanılarak polipirölün koloidal çözeltileri elde edilmiştir[36].

İletken polimerlerin çözünme zorluğu onların antielektrostatik filmler, elektronik pencereler, kimyasal sensörler, şarj edilebilir piller gibi uygulamalar için gerekli elektronik ve optik özelliklerini veren moleküler karakteristikleri olan π -elektronik yapılarının delokalize π -elektronik yapı onların yüksek elektronik polimerizasyonuna dolayısıyla zincir içinde yüksek π - π etkileşmesine yol açar. Bu da polimerin çözünme yerine agregasyonuna neden olur[36].

Polipirölün çözünme probleminin orjini bilindiğinden hemen akla gelen çözüm, polimerinin elektronik polarizebilitesini azaltmaktır. Bunu yapısal modifikasyonla yaparsak polimer çözünabilir ama aynı zamanda tüm yararlı optik ve elektronik özelliklerini kaybedebilir. Bu yüzden son zamanlarda üzerinde çalışılan çözüm, polimerin başka bir polimer ile interpolimer kompleksini oluşturmaktadır. Lineer polimerlerin intermoleküler kompleksleri zıt yüklerin etkileşmesi hidrojen ve hidrofobik bağların oluşumu ya da metal iyonlar yoluyla etkileşerek çözünen veya çözünmeyen polikompleks oluşturmak üzere sentez edilebilirler[36].

2.5.3. Pirol

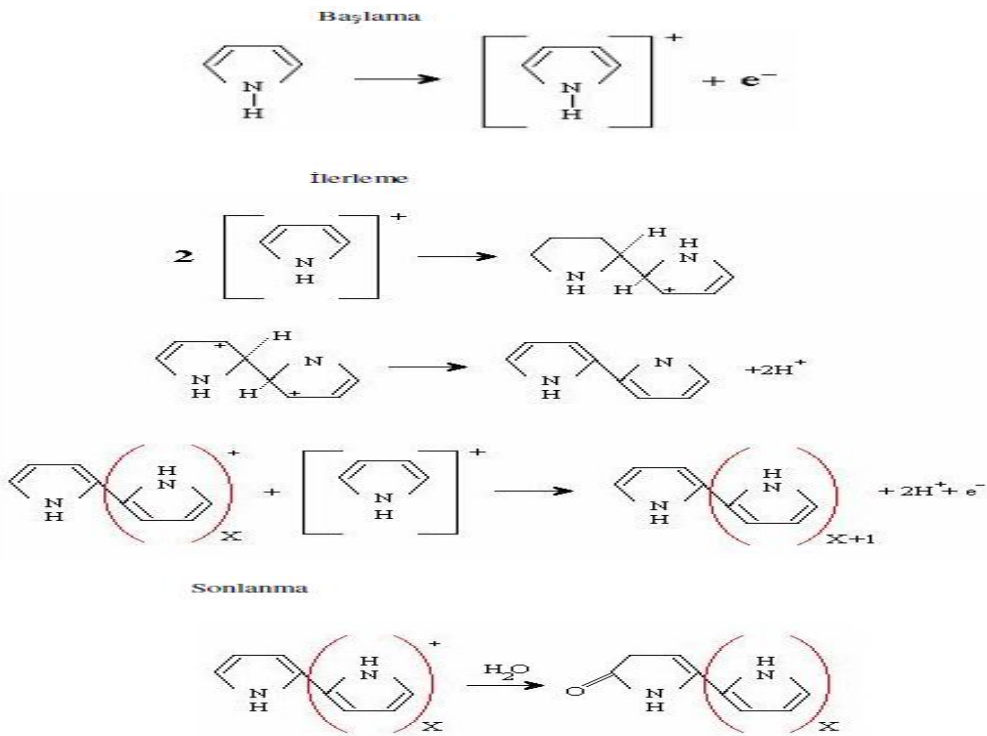
Pirol kaynama noktası 130°C, yoğunluğu 0,948 g/mL olan kokulu renksiz bir sıvıdır. Minerla asitleri ile çabucak polimerleşir. Pirol aromatik bileşiktir ve deneysel rezonans enerjisi 22-27 kcal/mol'dür[36].



Pirol 2 veya 5 pozisyonuna gruplar atak yapabilir. Pirolün heterosiklik azot grubu zayıf bazik özelliktir. Pirol suda az çözünür. Fakat organik çözücülerde çok miktarda çözünür. Pirol alkali iyonlarla çözünmez polimerizasyonla birlikte asit içinde yavaş çözünür[36].

2.5.4. Pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu

Elektronik iletken polipirol filmlerinin oluşumu anodik olarak asetonitrilin yükseltgenmesiyle ilk olarak Diaz tarafından yapılmıştır. Çözücü, elektrolit, fonksiyonel gruplar, elektrot potansiyeli ve diğer özelliklerin değiştirilmesiyle literatürde oldukça fazla miktarda çalışma bilinmektedir. Fakat polimerizasyon mekanizmasını anlamak uzun sürmüştür[36].



Şekil 2.15. Pirolün polimerizasyonuna ait mekanizma

Elektrokimyasal sentez, basitliği ve yeniden üretilebilirliğinden dolayı, elektrik iletken polimerlerin sentezi için hızla genel bir metod olarak kabul görmeye başlamıştır. Elektrokimyasal sentezin oda sıcaklığında gerçekleşebilmesi de onun önemli bir avantajıdır. Hem potansiyel hem de akım zamanla değiştirilerek film kalınlığı da kontrol edilebilir. İletken polimerlerin elektrokimyasal polimerizasyonu genellikle şu metodlarla yapılır: 1. Akıma karşı (galvanostatik), 2. Potansiyele karşı (potansiyostatik), 3. Potansiyel taraması.

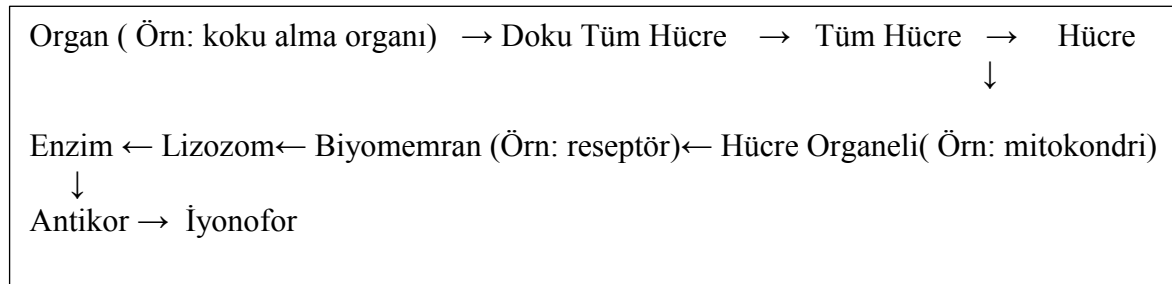
Standart elektrokimyasal teknikte (hücre içerisinde çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrotdan oluşan üçlü elektrod sistemi) genellikle en iyi filmler elde edilmektedir. Elektrokimyasal sentez homojen bir monomerle yapılabildiği gibi, kopolimerizasyonla da yapılabilmektedir. Poliazulen, politiyofen, polianilin, polipirol gibi bazı filmler bu yolla senetezenebilmiştir[38].

2.5.5. Dopant olarak kullanılan paratoluensülfonat

Paratoluensülfonatla hazırlanmış polipirol filmler geniş bir şekilde araştırılmıştır. Kagawa ve arkadaşları yaptıkları çalışmada PPy-pTS ile hazırlanan filmin polipirolle hazırlanan film ile karşılaştırdıklarında daha süper iletkenliğe sahip olduğunu görmüşlerdir. Ochoteco ve arkadaşları hazırladıkları PPy-pTS filmin fiziksel, kimyasal, mekanik özelliklerinin ve yüksek iletkenliklerinin olduğu, bu özelliklerindeki pratik uygulamalarda çok önemli olduğunu söylemişlerdir. pTS gibi, Dodesil Benzen Sülfonat (DBS)'ye göre daha büyük anyonik dopantlarla hazırlanan filmin yüzeyinin daha gözenekli (poröz) olduğu bunun ise enzimin immobilizasyonunda önemli bir faktör olduğu belirtilmektedir [35].

2.6. Enzim Sensörleri

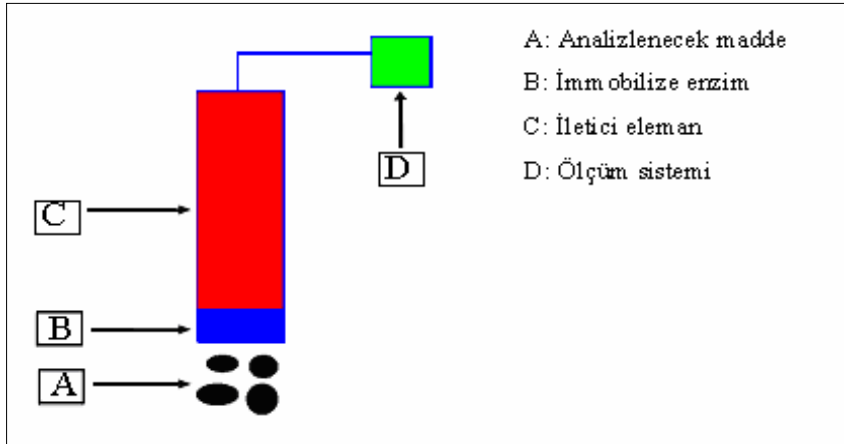
Kullanıldıkları reaksiyonda, yapısında bir değişim olmadan reaksiyon hızını arttıran maddelere katalizör denir. Enzimlerde bir çeşit katalizördür. Biyosensör teknolojisindeki ilk örnekler amperometrik ve potansiyometrik esaslı enzim elektrotlar şeklinde ortaya çıkmıştır. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyolojik materyaller artan kompleksliklerine göre sıralandıklarında; iyonoforlar, antikorlar, enzimler, lipozomlar, biyomembran parçaları (örn: reseptör), hücre organelleri (örn: mitokondri), doku veya tüm hücreler ve organlar (örn: görme ve koklama organları) şeklinde sınıflandırılabilirler[28].



Şekil 2.16. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal sıralamasında enzimlerin yeri

2.6.1. Enzim sensörlerinin genel çalışma prensibi

En genel anlamda bakıldığında bir enzim sensörü; iletici, ince bir enzim tabakası ve ölçüm kombinasyonundan oluşmaktadır. Diğer biyosensörlerden tek fark biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimler bulunmaktadır. Enzim sensörlerinin genel şematik gösterimi Şekil 2.17’de gösterilmiştir[28].



Şekil 2.17. Enzim sensörlerinin genel şematik gösterimi

Bir enzim elektrodunda enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği tepkimeye uygun bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir 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. Bunun yanı sıra biyoaktif tabakada sabit bir substrat derişimi sağlayabilmek için ölçme çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması gerekmektedir. İletici sistemin ölçme sistemine gönderdiği sinyal biyoaktif tabaka ile iletici ara yüzeyindeki derişimlerdeki değişikliğe bağlıdır. Ancak söz konusu derişimler denge halinde ölçme çözeltisindeki derişimlerle orantılı olduğu için çoğu zaman kalibrasyon grafiği çizilerek sonuca varılır[28].

2.6.2. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

Enzim sensörlerinin sınıflandırılması en yaygın şekilde, enzimatik reaksiyon uyarınca oluşan sinyalin ölçüm yöntemine göre yapılmaktadır[28].

Çizelge 2.7. Enzim sensörlerin sınıflandırılması

Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensörleri
A)Amperometrik Enzim Sensörleri; Birincil nesil amperometrik enzim sensörleri İkincil nesil amperometrik enzim sensörleri Üçüncü nesil amperometrik enzim sensörleri
B)Potansiyometrik Enzim Sensörleri; Proton duyar potansiyometrik enzim sensörleri Amonyak duyar potansiyometrik enzim sensörleri Karbon dioksit duyar potansiyometrik enzim sensörleri Diğer iyon duyar potansiyometrik enzim sensörleri
C)Yarı İletkenleri Esas Alan Enzim Sensörleri; Enzim Alan Etki Transistörler (ENFET) 1-Optik Enzim Sensörleri Absorpsiyon esaslı optik enzim sensörleri Flouresans esaslı optik enzim sensörleri Biyoluminesans esaslı optik enzim sensörleri 2- Kalorimetrik Enzim Sensörleri 3- Piezoelektrik Enzim Sensörleri

2.7. Performans Faktörleri

2.7.1. Seçicilik

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

2.7.2. Kullanım ömrü

Biyolojik çevirici olarak enzim kullanıldığı durumlarda enzim aktivitesindeki azalma kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktördür. Enzimin yaşam süresi, biyosensörün

kullanım ömrü yanı sıra kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi parametreleri de etkilemektedir.

2.7.3. Kalibrasyon gereksinmesi

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

2.7.4. Tekrarlanabilirlik

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

2.7.5. Kararlılık

Elektrot kararlılığının yüksek olduğu durumlar ideal biyosensörler için gereklidir. Kararlılık, kullanılan enzimin fiziksel dayanıklılığından etkilendiği gibi; pH, ısı, nem, ortam O₂ derişimi, enzimi immobilize etmede kullanılan polimerin kimyasal ve fiziksel karakteri gibi parametrelerden de etkilenmektedir. Hazırlanan biyosensörün kararlı olması biyosensör ömrünün uzun olması anlamına gelir. Uzun ömür aynı biyosensör ile çok sayıda analizin yapılabilmesi ve analiz maliyetlerinin düşürülmesi açısından önemlidir.

2.7.6. Yüksek duyarlılık

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

2.7.7. Yeterli düzeyde tayin sınırı

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

2.7.8. Geniş ölçüm aralığı

Ölçüm aralığı denen bölge, biyosensörden alınan akım-derişim eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır. Tüm biyosensör uygulamalarında çalışma ortamında belirli bir derişim değerine ulaşıldıktan sonra akım-derişim eğrilerinde lineerlikten sapma gözlenmeye başlar. Bu durum enzimatik eğrilerin en önemli ve de karakteristik özelliğidir. Lineerlikten sapmanın nedeni yanıt olarak okunan akım değerlerindeki değişimin azalmasından kaynaklanır. Bunun nedeniyse ortamda artan analizlenecek madde miktarının fazlasıyla reaksiyona girecek enzim olmamasıdır.

2.7.9. Hızlı cevap zamanı

Amperometrik uygulamalarda analizlenecek bir madde örneğini çalışma ortamına enjekte etmeden önce elektrot yüzeyinde oluşan akımın sabit kalması istenir. Akım sabit kaldıktan sonra analizlenecek madde ortama enjekte edilir ve akımdaki değişim kaydedilir. İkinci bir enjeksiyondan önce akım değerinin yine sabit kalması beklenir. İşte ilk enjeksiyondan sonra akımın tekrar sabit kalmasına kadar geçen zamana ‘cevap zamanı’ denir. Cevap zamanının kısa ya da hızlı olması ideal sensörlerin özelliklerindendir. Özellikle çok sayıdanumunun söz konusu olduğu rutin analizlerde en kısa sürede elde edilen sonuç büyük önem taşıdığından biyosensörün cevap süresinin kısa olması istenir.

2.7.10. Basitlik ve ucuzluk

Kullanımı, tasarımı basit ve ucuz biyosensörler hazırlamak biyosensör yapımında her zaman hedef alınmış bir düşüncedir. Biyosensör yapılarının basitleştirilmesine en iyi örnek

ikinci kuşak biyosensörlerin yapılarında bulunan mediyatörlerin daha gelişmiş modeller olan üçüncü kuşak biyosensörlerde ortadan kaldırılmasıdır.

2.8. Kaynak Araştırması

Servet Çete ürik asit tayini için amperometrik esaslı yeni bir biyosensör geliştirmiştir. Bu amaçla asetonitril ortamında pirolün elektropolimerleşmesiyle platin/polipirol–ferrosenyum elektrot hazırlanmıştır. Bu elektrot kullanılarak serbest ürikaz enziminin aktivitesine pH'nın sıcaklığın, tampon derişiminin ve enzim miktarının etkisi incelenmiştir. Daha sonra, ürikaz enzimi hazırlanan platin/polipirol–ferrosen elektrot üzerine immobilize edilmiştir. Ürik asit tayini, enzim elektrodun yüzeyindeki enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksidin +0,70 V'da yükseltgenmesine dayanarak yapılmıştır. Ürik asit biyosensörünün cevabına pH'nın, tampon derişiminin, sıcaklığın ve yüzeye immobilize edilen enzim miktarının etkisi incelenmiştir. Biyosensörün ürik asit için doğrusal çalışma aralığı $1,0 \cdot 10^{-6} - 5 \cdot 10^{-5}$ M tesbit edilmiştir. Serbest ve İmmobilize enzimin K_M , V_{maks} değerleri hesaplanmıştır. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü tayin edilmiştir. Hazırlanan biyosensörle kan ve idrar gibi biyolojik sıvılarda ürik asit tayini yapılmıştır. Biyolojik ortamlarda olabilecek girişimlerin biyosensör cevabı üzerine etkileri incelenmiştir [11].

Arslan F. ve arkadaşları ksantin ölçümü için yeni bir biyosensör hazırlamışlardır. Platin yüzeyine asetonitril ortamında ferrosen (elektron medyatörü olarak) ve tetrabütilamonyumtetrafloroborat bulunan hücrede pirolün elektrokimyasal polimerleşmesi ile bir elektrot hazırlanmıştır. Film 0,0 -0,9 V arasında 50 m/sn tarama hızında dönüşümlü voltametri ile oluşturulmuştur. Ksantin oksidaz enzimi (KO), glutaraldehit (GA) ve sığır serum albümin (BSA) kullanılarak elektropolimerizasyon sonrasında çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edilmiştir. Biyosensörün +0,7 V'da ksantine karşı cevabı ölçülmüştür. Amperometrik cevap ksantin enzimatik reaksiyonu sonucu oluşan hidrojenperoksitin elektrokimyasal ölçümüne göre yapılmıştır. Farklı koşullar altında biyosensörün performansı incelenmiştir. Biyosensör için çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-6}$ M – $4,0 \times 10^{-4}$ M olarak tespit edilmiştir. Raf ömrü 45 gün olarak bulunmuştur [19].

Mustafa Görgülü hipoksantin tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirmiştir. Bu amaçla, platin levha üzerinde pirolün polivinilsülfonatlı ortamda elektropolimerleşmesi ile

polipirol-polivinilsülfonat filmi hazırlanmıştır. Polipirol-polivinilsülfonat filminin optimum çalışma şartları belirlenmiştir. Ksantin oksidaz ve ürikaz enzimleri, polipirol-polivinilsülfonat film içine tutuklama yöntemiyle immobilize edilmiştir. Hipoksantin tayini, hazırlanan enzim elektrodun yüzeyinde gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksitin 0,40 V'da yükseltgenmesine dayanarak yapılmıştır. Biyosensörün hipoksantin tayini için çalışma aralığı tayin edilmiştir. Hipoksantin biyosensörünün cevabına pH'nın ve sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü tayin edilmiştir. Biyosensörün gerçek numuneye karşı davranışı incelenmiştir [24].

Fatma Arslan ürik asit tayini için amperometrik esaslı yeni bir biyosensör hazırlamıştır. Platin elektrot yüzeyine polianilin-polipirol (pani-ppy) film oluşturulmuş ve ürikaz enzimi glutaraldehit kullanılarak film yüzeyine çapraz bağlama ile immobilize edilmiştir. Ürik asit ölçümü enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksitin 0,4 V'da ölçümüne dayanılarak yapılmıştır. Biyosensör için doğrusal çalışma aralığı $2,5 \times 10^{-6}$ M – $8,5 \times 10^{-5}$ M olarak ölçülmüş ve cevap süresinin yaklaşık 70 s olduğu gözlenmiştir. Biyosensör için optimum parametreler pH=9,0 ve sıcaklık 55 °C olarak bulunmuştur. Enzim elektrodu için tekrarlanabilirlik ve raf ömrü de çalışılmıştır [22].

Nezaket Dolmacı balıkta ksantin ve hipoksantin tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirmiştir. Ksantin oksidaz, pirol ve polivinilsülfonat ile birlikte platin elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Ksantin ve hipoksantin tayini, enzim yüzeyindeki enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ürik asidin +0,30V'da yükseltgenmesine dayanılarak yapılmıştır. Ksantin ve hipoksantin biyosensörünün cevabına pH'nın, sıcaklığın ve substrat derişiminin etkisi incelenmiştir. Enzim elektrotun hipoksantin için doğrusal çalışma aralığı $1,0 \times 10^{-7}$ M - $1,0 \times 10^{-3}$ M, tayin sınırı $1,0 \times 10^{-7}$ M olarak tespit edilmiştir. İmmobilize edilen ksantin oksidazın K_m gözlenen ve V_{max} gözlenen değerleri sırasıyla 0,0154 mM ve 1,202 μ A/dakika olarak bulunmuştur. Enzim elektrodun en iyi çalışma pH'sı 7,75 ve sıcaklığın 25 °C olarak belirlenmiştir. 30 gün sonundaki amperometrik cevabın başlangıç değerinin %49'u olduğu görülmüştür. Balık numunelerinde, balık eti tazeliğini yitirdikçe hipoksantin miktarının arttığı gösterilmiştir [21] .

A.T. Lawal ve S.B Adeloji 2010 yılında hipoksantine duyarlı bir biyosensör geliştirmişlerdir. Ksantin oksidaz (KO) ve potasyum ferrosiyanür medyatörü de

kullanılarak galvanostatik polipirol (PPy) film hazırlanmıştır. Hazırlanan PPy/KO- $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ filminin optimum şartları incelenmiştir. Film 0,4 M pirol, 6,2 U/mL KO ve 40 mM potasyum ferrosiyanür ortamında $0,5 \text{ mA/cm}^2$ akımda 200 saniyede hazırlanmıştır. Potansiyometrik ve amperometrik ölçüm modları incelenmiştir. Amperometrik sensör için optimum potansiyel Ag/AgCl referans elektrot ve 0,05 M fosfat tamponunda 800 mV olarak tespit edilmiştir. Amperometrik ve potansiyometrik modlar karşılaştırıldığında potansiyometrik sensör daha hassas, amperometrik sensör ise daha geniş bir ölçüm aralığına sahip olduğu görülmüştür. PPy-KO filmi balık tazeliği tespitinde de başarılı olduğu belirtilmiştir [7].

S. Gosh arkadaşları tarafından balık tazeliğinin tespiti için bir biyosensör sistemi geliştirmiştir. Sistem balık dokusunda ATP'nin yıkımı ile oluşan hipoksantin (Hx), inozin (INO), ve inozinmonofosfat (IMP) metabolitlerinin kantitatif tayini esas alınarak geliştirilmiştir. Tazelik derecesi, balık dokusunda ATP'nin yıkımıyla oluşan ürün miktarına bağlı olan K_1 ve H değerinin indeksine bakılarak belirlenmiştir. Ferrosenkarboksilik asit (FCA) medyatörü kullanılarak hazırlanan polipirol filme ksantin oksidaz, nükleosid fosforilaz ve nükleotidaz enzimleri immobilize edilmiştir. Hazırlanan enzim elektrodla Hx, INO, ve IMP'nin amperometrik ölçümleri etkili bir şekilde yapılmıştır. Bu basit, hızlı ve kullanıma hazır biyosensör ile bekletilmiş Catla Catla tatlı su balığının H değeri ölçülmüştür. Sonuçlar göstermiştir ki bozulma 7 gün sonunda -12°C 'da bile çok hızlı gerçekleşmektedir [32].

Meliha Çubukçu ve arkadaşları altın nano parçacıkları (Au-nps) camısı karbon elektrota modifiye ettiler ve bu elektrota ksantin oksidaz (KO) enzimini immobilize etmişlerdir. Hazırlanan elektrotla ksantin (X) ve hipoksantin (Hx) ölçümleri yapılmıştır. Biyosensör X ve Hx için karakterize edilmiştir. Biyosensörün doğrusal ölçüm aralığı X için $5,0 \times 10^{-7} \text{ M} - 1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ ve denklemi $y = 0,44x + 0,712$ bulunmuştur. Hx için ise ölçüm aralığı $5,0 \times 10^{-6} \text{ M} - 1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ve denklemi $y = 0,014x + 0,575$ olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar X ve Hx için karşılaştırıldı. Geliştirilen sistem ile konserve tuna balığında Hx tayini yapılmıştır. Sonuçların umut verici olduğunu belirtmişlerdir [12].

Ülkü Anık Kırgöz ve arkadaşları camısı karbon elektrota ksantin oksidaz (KO) enzimini immobilize ederek yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensörün amperometrik ölçümü, KO enziminin katalitik aktivitesi sonucu oluşan hidrojen peroksitin elektrot

yüzeyinde yükseltgenmesi sonucu oluşan akım değişimini esas almıştır. Biyosensör için optimum koşullar araştırıldı ve hipoksantin (Hx) ve ksantin (X) için kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Biyosensörün doğrusal çalışma aralığı ksantin için $5,0 \times 10^{-7}$ M – $4,0 \times 10^{-5}$ M ve hipoksantin için $2,0 \times 10^{-5}$ M – $8,0 \times 10^{-5}$ M olarak görülmüştür. Biyosensörün ölçüm limiti ise ksantin için $1,0 \times 10^{-7}$ M ve hipoksantin için $5,3 \times 10^{-6}$ M'dır. Ayrıca enzim miktarı, optimizasyon, örnek numune uygulamaları ve kesinlik de çalışılmıştır [13].

Jianhong Pei ve Xiao Yuan Li ksantin oksidaz enzimini CuPtCl_6 /camsı karbon elektrot üzerine immobilize ederek bir biyosensör hazırlamışlardır. Hazırlanan enzim elektrodun ksantin ve hipoksantine karşı hızlı ve duyarlı cevap verdiği görülmüştür. Gözlenen kararlı akım, enzim elektrot yüzeyinde meydana gelen reaksiyon süresince oluşan hidrojen peroksitin yükseltgenmesinden kaynaklanmaktadır. Enzim çalışması üzerine pH, sıcaklık ve uygulanan potansiyelin etkisi tartışılmıştır. Ksantin ve hipoksantin ölçümü için karakterize edilen enzim elektrodun ölçüm aralığı: ksantin için, 6×10^{-7} M – 2×10^{-4} M ve hipoksantin için, 5×10^{-7} M - 2×10^{-4} M olarak tespit edilmiştir. Ölçüm limiti: 1×10^{-7} M. Sıvı kromatografide hipoksantin-ksantin karışımının ayrımı yapılmış ve hazırlanan enzim elektrot kimyasal dedektör olarak kullanılmıştır [14].

V. Venugopal balık üretimi ve kalite kontrolü için kullanılan biyosensörleri araştırmış ve bu konuda bir makale hazırlamıştır. Balık eti üretimi yalnızca yiyecek bakımından değil, uluslar arası ticaret ve ihracat geliri bakımından da ülkeler için önemlidir. Balık ve balık ürünleri dayanıksızdır ve balık türlerinin, çevresel koşullarının ve beslenme şekillerinin farklı olmasından dolayı, kalite kontrolü de çok geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Ayrıca bu ürünler, bazı mikrobiyal ve diğer yaşamsal tehlikeler için taşıyıcı olarak da fonksiyon gösterebilirler. Bu yüzden kalite kontrolü balık üretim ve ticaretinde büyük bir öneme sahiptir. Mevcut kalite kontrol teknikleri kullanışsız ve zaman alıcıdır. Deniz ürünleri incelenmesinde biyosensör uygulamaları çok hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedir. Bu makalede deniz ürünleri endüstrisinde biyosensör uygulamalarının faaliyet alanı tartışılmıştır [15].

Jianjun Niu ve Jim Yang Lee balık tazeliğini tespit edebilmek amacıyla hipoksantine duyarlı grafit-seramik amperometrik bir biyosensör hazırlamışlar ve üretmişlerdir. Üretim prosesi sol-gel teknikleri kullanılarak bir silika grafit matrikse ksantin oksidaz enziminin immobilizasyonu ve enzimle modifiye edilmiş matriksin basit bir mekanik cila ile

kolaylıkla yenilenebilmesine imkan sağlayan y zeeye sahip bir disk elektrotla d n st r l p cam bir tüpe montajı ile yapılmıştır. Michaelis-Menten değerleri, medyat rs z olarak hidrojenperoksitin indirgenmesine dayalı sistem, medyat rs z direkt sistem ve benzil violojen medyat rl  sistem için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Sonuçlar sırası ile 0,45; 0,64; 0,35 mM olarak bulunmuştur. Sensör 1×10^{-6} M – 1×10^{-3} M derişim aralıklarında düzgün ve doğrusal bir akım artışı göstermiştir. pH=7,6 olan 0,05M fosfat tamponu ortamında her üç sistem için ölçüm sınırı sırasıyla; $1,3 \times 10^{-6}$ M , $5,6 \times 10^{-6}$ M ve $3,8 \times 10^{-7}$ M olarak tespit edilmiştir. Enzim immobilize edilmiş bölgenin kullanılması ve bu yüzeyin kolayca yenilenebilmesi, sensörün kullanımını kolaylaştırmış ve raf ömrünü uzatmıştır. Çeşitli şartlarda bekletilmiş balık numuneleri ile yapılmış denemelerden elde edilen sonuçların memnuniyet verici olduğu belirtilmiştir. [16].

M.A. Carsol ve arkadaşları karbon esaslı baskılanmış elektrot ile ürik asite duyarlı yeni bir biyosensör hazırlamışlardır. Ksantin oksidaz (KO) enzimini hem elektrot yüzeyine hem de CPG aminopropilsilanlı bir reaktöre direkt olarak immobilize edilmiştir. Reaktörün sensörün tekrar kullanılabilirliğini ve raf ömrünü artırdığı gözlenmiştir. hipoksantin (Hx), inozin (HxR) ve inozinmonofosfat (IMP)  l  mleri için optimum koşullar belirlenmiştir. IMP, Hx ve HxR için kalibrasyon grafikleri çizilmiştir ve her üç molekül için 50  L'lik enjeksiyonlarda 1-50  M arasında doğrusal bir artış gözlenmiştir. Bir  l  m 30 sn içerisinde tamamlanmıştır. 20  M Hx derişimlerinde tekrarlanabilirlik ölçülmüştür [17].

Shengshui Hu ve çalışma grubu sodyummontmorillonit-metilviyolin ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot ile hipoksantine duyarlı yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir. Elektrod yüzeyine elektropolimerizasyonla polianilin filmi oluşturulup ksantin oksidaz enzimi (KO) bu film üzerine immobilize edilmiştir. Hipoksantin  l  m  için KO enziminin katalitik aktivitesi sonucu harcanan oksijen esas alınmıştır. Oksijenin elektrokatalitik indirgenmesi ve sensörün cevabı dönüşümlü voltametri tekniği ile incelenmiştir. Sensör 1  M – 0,4 mM arasında doğrusal akım artışı göstermiş ve minimum ölçüm limiti 0,8  M olarak tespit edilmiştir. Hazırlanan biyosensör ile balık etinde hipoksantin miktarı çalışıldı ve girişimlerin elimine edilmesi için çalışmalar yapılmıştır [18].

Xiao-Hua Li ve grubu hipoksantine (Hx) duyarlı elektrokimyasal bir biyosensör hazırlamışlar ve performansını incelemişlerdir. Bu çalışmada demir-3mezo-tetrafenilporfirin (FeTPP) nanoparçacıkları (NPs) esas alınmıştır. FeTPPNPs filmi çapları

25-45 nm olacak şekilde çözelti karışım teknikleri kullanılarak hazırlanmış ve medyatör olarak kullanılmıştır. Ksantin oksidaz (KO)/FeTPPNPs/camsı karbon (GC) elektrot hipoksantine karşı oldukça iyi amperometrik sinyal vermiştir. İmmobilize KO enziminin katalitik aktivitesi sonucu, hipoksantin yıkımı süresince çözünmüş oksijenin harcanmasına bağlı olarak, biyosensör $1,0 \mu\text{M} - 0,34 \mu\text{M}$ arası Hx derişimlerini ölçebilebilmiştir. Biyosensörün gerçek numunelerde kullanılabiliirliği, mikrodializle süzülen fare beyin sıvısındaki Hx ölçülerek kanıtlanmıştır [20].

Cheng Qiong ve arkadaşları ksantin oksidaz içeren çift yüzeyli bir elektrot hazırlamışlar ve balık tazeliğinin tespitini rapor etmişlerdir. Modifiye edilen elektrot yüzeyine iki adet membran yapıldı; biri enzim immobilize edilmiş fibroin esaslı membran, diğeri; proteinler gibi yüksek molekül kütesine sahip bileşiklerden kaynaklanabilecek girişimleri engelleyen selüloz asetat membran. Biyosensör, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksitin ölçümünü esas almaktadır. Sensör yüksek hassasiyet ve balık numunelerine karşı yüksek tekrarlanabilirlik göstermiştir. Sensörün tespit edebildiği minimum hipoksantin miktarı, 1×10^{-7} M. Selüloz asetat membranın enzimi muhafaza etmesinden dolayı, enzim elektrot 6 haftalık bir raf ömrü ve gerçek numunelere karşı 400 ölçümlük bir tekrarlanabilirlik göstermiştir. Sonuçların oldukça iyi ve biyosensör bazı nehir balık türlerinin tazeliğinin teşhisi için ticari öneme haiz olduğunu belirtilmiştir [23].

Gorou Arai ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, ksantin oksidaz enzimini poli(merkapt-p-benzokinon) filme immobilize etmişler, ksantin ve hipoksantin tayinleri için bir biyosensör hazırlamışlardır. Hazırladıkları biyosensörün çalışma aralığını ksantin için $1,0 \times 10^{-6} - 8,0 \times 10^{-5}$ M, hipoksantin için $1,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-5}$ M olarak tespit etmişlerdir [29].

Rafael Radi ve arkadaşları 1997 yılında yaptıkları çalışmada heparin kompleksine ksantin oksidaz enzimi immobilize etmişler ve kinetiğini incelemişlerdir. İmmobilize edilmiş ksantin oksidazın aktifliğinin serbest ksantin oksidazinkinden farklı olduğunu göstermişlerdir. Serbest ksantin oksidaz için Km değeri 3,0mM iken, immobilize ksantin oksidaz için 15m M olarak hesaplamışlardır [30].

John M.T. ve arkadaşları 1996 yılında yaptıkları çalışmada flavini uzaklaştırılmış ksantin oksidaz enzimi kullanılarak hipoksantin için medyatörün bulunduğu bir biyosensör

hazırlamışlardır. Bu çalışmada kalsiyum klorür ile enzimden flavin adenin dinükleotit grubu uzaklaştırılarak de flavo ksantin oksidaz enzimi elde etmişlerdir. Medyatör olarak 1,1-dimetil ferrosen kullanmışlardır. Doğal ve flavini uzaklaştırılmış enzim için reaksiyon hızlarını $10,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ve $9,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ olarak bulmuşlardır. Enzim elektrot için 150 analiz sonrasında sinyalin gözlenmediği ve 227°K ' de bir ay boyunca aktifliğini % 80 koruduğunu gözlemişlerdir [53].

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

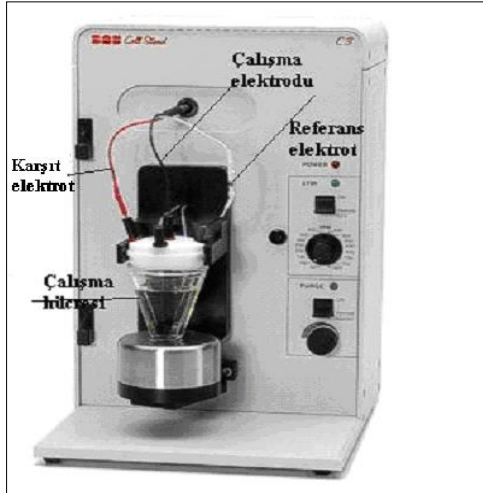
3.1. Cihazlar ve Malzemeler

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-paratoluensülfonat 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 çalışmaları için Grant W14 marka termostatlı dolaşimli su banyosu kullanıldı.

3.1.5. Mikro pipet

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

3.1.6. Argon gazı

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

3.1.7. Saf su

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

3.1.8. 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. Yüzey temas açısı analiz cihazı

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

3.1.11. Profilometri cihazı (Film Kalınlığının Ölçülmesi)

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik bölümünde Veeco dektak 150 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 $\delta=0,987$	Aldrich
Paratoluensülfonat	-	Merck
Hipoksantin	%99	Sigma
Sodyum perklorat	%98	Sigma-Aldrich
Monosodyumhidrojenfosfat (NaH_2PO_4)	%99	Carlo Erba
Disodyumhidrojenfosfat ($\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	%99	Merck
Sodyum hidroksit (NaOH)	%99	Carlo Erba
Hidroklorik asit (HCl)	%36,5	BDH
Hidrojenperoksit (H_2O_2)	%30 $\delta=1,13$ kg/L	Sigma-Aldrich
Trikloroasetik asit (TCA)	%99	Carlo Erba
Ürik asit	%99	Sigma
Parasetamol (Asetaminofen)	%99,4	-
L-(+)- Askorbik asit	%99	Carlo Erba
Glukoz	-	Merck
Lityum karbonat	%45	Merck

3.2.1. Kullanılan çözeltiler

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

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

Enzim çözeltisi: Toplam aktivitesi 100 ünite olan ksantin oksidaz ve ürikaz enzimleri alındı ve saf suda çözüldükten sonra hacim ölçülü balonda 10 mL'ye tamamlandı (10 ünite/mL). Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında bekletildi. Uzun süre kullanılmadığı zaman çözelti derin dondurucuda saklandı.

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

Sodyum perklorat: Katı sodyum perklorattan belli bir miktar tartılıp 1 M 250 mL NaClO_4 çözeltisi hazırlandı.

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

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

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

Ürik asit çözeltisi: Katı ürik asitten belli bir miktar tartılarak 0,1 M Li_2CO_3 çözeltisinde çözüldükten sonra derişimi 50 mM olan fosfat tamponunda pH ' sı 9,5 olacak şekilde 1.10^{-2} M 10 mL stok ürik asit çözeltisi hazırlandı. Farklı derişimler de ürik asit çözeltisi hazırlamak için stok ürik asit çözeltisinden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponu yardımı ile seyreltilerek hazırlandı.

Askorbik asit çözeltisi: Katı askorbik asitten belli bir miktar tartılarak derişimi 50mM olan fosfat tamponu ile pH'sı 9,5 olacak şekilde 1.10^{-2} M 10 mL stok askorbik asit çözeltisi hazırlandı. Diğer derişimlerdeki askorbik asit çözeltileri stok askorbik asit çözeltisinden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponu ile seyreltilerek hazırlandı.

Parasetamol çözeltisi (asetaminofen): Katı parasetamolden belli miktar tartılarak derişimi 50mM olan fosfat tamponu ile pH'sı 9,5 olacak şekilde 1.10^{-2} M 10 mL stok parasetamol çözeltisi hazırlandı. Diğer derişimlerdeki parasetamol çözeltileri, stok parasetamol çözeltisinden belli hacimlerde alınarak fosfat tamponu ile seyreltilerek hazırlandı.

3.3. Platin Yüzeye Polipirol- Paratoluensülfonat (PPy-pTS) 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.

Temizlenmiş Pt levha elektrodunun yüzeyi polipirol-paratoluensülfonat film ile kaplandı. Polipirol, elektrot yüzeyine pirolün elektropolimerleşmesi ile biriktirildi. Elektropolimerleşmede üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Çalışma elektrodu olarak platin levha ($0,5 \text{ cm}^2$), karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak da Ag/AgCl elektrot kullanıldı. Polipirol- paratoluensülfonat film elde etmek amacıyla pirolün hücre içi derişimi 0,1 M olacak şekilde $35,5 \mu\text{L}$ pirol, 2,5 mL paratoluensülfonat 7,465 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 $-0,8 \text{ V} - +0,8 \text{ V}$ potansiyelleri arasında 20 mV/s tarama hızında 20 dönüşümde yapıldı. Kaplama işleminden sonra elektrot yüzeyi saf su ile yıkanarak yüzeye bağlanmayan monomerlerden ve kirliliklerden arındırıldı. Çalışmalarda kullanılmak üzere fosfat tamponu içinde bekletildi. Böylece platin/polipirrol-paratoluensülfonat (Pt/PPy-pTS) elektrot hazırlandı [35].

3.3.1. Pt/PPy-pTS film elektrodun SEM analizi

Bölüm 3.3'de hazırlanan film elektrodun SEM analizi yapılması için değişik fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasında en uygun görüntü seçildi.

3.3.2. Pt/PPy-pTS film elektrodun AFM analizi

Bölüm 3.3'de hazırlanan film elektrodun AFM analizi yapılması için değişik fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasında en uygun görüntü seçildi.

3.3.3. Pt/PPy-pTS film elektrodun yüzey temas açısı analizi

Bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan film elektrodun yüzey temas açısı analizi yapılması için değişik yüzey fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasından en uygun olan görüntü seçildi.

3.3.4. Pt/PPy-PTS film elektrodun profilometri spektrumu (Film kalınlığının ölçülmesi)

Bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan film elektrodun profilometri analizi yapılması için değişik yüzey fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasından en uygun olan görüntü seçildi.

3.4. Pt/PPy-pTS Film Elektrodun Hidrojen Peroksite Duyarlılığının Belirlenmesi

Bölüm 3.3’de belirtildiği gibi hazırlanan Pt/Polipirol-paratoluensülfonat elektrot, Ag/AgCl referans elektrodu ve platin tel; 9 mL 0,1 M fosfat tamponu, 1 mL 1 M NaClO₄ çözeltisinin içine daldırıldı. 300 mV sabit potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Denge akımına ulaşan elektrot ile hücre içi 0,1 µM ile 5×10⁻² µM arasında değişen hidrojen peroksit konsantrasyonlarında ilaveler yapıldı. Her ilave sonunda hücre içerisi 300 s karıştırılıp, karıştırmanın bitiminden itibaren 200 s sonrasındaki difüzyon akımı ölçüldü. Okunan akımlar ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir konsantrasyon için Δi değerleri hesaplandı. Elde edilen Δi değerleri hidrojen peroksit derişimine karşı grafiğe geçirildi.

3.5. Pt/PPy-pTS Film Elektrodunun Serbest Enzimin Bulunduğu Çözeltide Hipoksantine Duyarlılığının Belirlenmesi

Hazırlanan çalışma elektrotu 9 mL tampon çözeltisi 1 mL destek elektrolit (NaClO₄) bulunan çözeltiye daldırılarak 0,3 V sabit potansiyelde dengeye getirildi. Ardından 50 µL Ksantin Oksidaz (KO) ve 50 µL Ürikaz (U) enzimleri ilave edilerek enzimli ortamda dengeye gelmesi beklendi ve denge akımı kaydedildi. Ardından 0.1 µM –1 mM arası artan derişimlerde hipoksantin ilaveleri yapıldı. Her ilave sonrasında reaksiyonun tamamlanabilmesi için 300 saniye karıştırılmıştır. Karıştırmanın bitiminden itibaren 200 saniye sonrasındaki difüzyon akımı okundu. Okunan akımlar ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için Δi değerleri hesaplandı. Elde edilen Δi değerleri enzim derişimine karşı grafiğe geçirildi.

3.6. Biyosensörün Hazırlanması

3.6.1. Hapsetme yöntemi ile immobilizasyonu

Platin elektrot yakma ve asitte bekletme işlemlerinden sonra zımparalanıp saf su ile temizlendi. Ardından hücre içerisine 35.5 µL pirol, 2,5 mL paratoluensülfonat, 0,5 mL ksantin oksidaz, 0,5 mL ürikaz enzimi ve 6,465 mL su ilave edilerek 10 mL’lik bir hücre hazırlandı. Hücreden 10 dakika argon gazı geçirilerek oksijen uzaklaştırıldı. Daha sonra

dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak $-0.8\text{V} - +0.8\text{ V}$ arasında 20 mV/s tarama hızında 20 döngüde CV taraması yapıldı. Kaplanan elektrot saf suyla yıkandı. Biyosensör kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında $+4^\circ\text{C}$ 'de fosfat tamponunda bekletildi.

3.6.2. Pt/PPy-pTS/ KO-U biyosensörünün SEM analizi

Bölüm 3.6.1'deki gibi hazırlanan biyosensörün SEM analizinin yapılması için değişik fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasında en uygun olan görüntü seçildi. Pt/PPy-pTS film elektrodun SEM fotoğrafları karşılaştırıldı.

3.6.3. Pt/PPy-pTS/ KO-U biyosensörünün AFM analizi

Bölüm 3.6.1 'deki gibi hazırlanan biyosensörün AFM analizinin yapılması için değişik fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasında en uygun olan görüntü seçildi. Pt/PPy-pTS film elektrodun AFM fotoğrafları karşılaştırıldı.

3.6.4. Pt/ PPy-pTS/ KO-U biyosensörünün yüzey temas açısı analizi

Bölüm 3.6.1 'de anlatıldığı gibi hazırlanan biyosensörün yüzey temas açısı analizinin yapılması için değişik yüzey fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasından en uygun olan görüntü seçildi. Pt/ PPy-pTS film elektrod ile Pt/ PPy-pTS/ KO-U biyosensörünün yüzey temas açısı fotoğrafları karşılaştırıldı.

3.6.5. Pt/PPy-pTS/ KO-U biyosensörünün profilometri spektrumu

Bölüm 3.6.1. 'deki gibi hazırlanan biyosensörün profilometri analizinin yapılması için değişik yüzey fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar arasından en uygun olan görüntü seçildi. Pt/PPy-pTS film elektrodun profilometri fotoğrafları karşılaştırıldı.

3.7. Pt/PPy-pTS/ KO-U Biyosensörünün En İyi 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.

3.7.1.pH'nın etkisi

Her enzim belirli bir pH ortamında maksimum performans göstermektedir. Hazırladığımız biyosensörde çift enzim bulunduğundan bu çift enzimli elektrot sisteminin optimum pH'sı, her bir enzimin kendisine ait optimum pH'dan farklı olacağı beklenmektedir. Sistemin optimum pH'sının belirlenmesi için farklı pH ortamlarında denemeler yapılmıştır. Bu amaçla Bölüm 3.6.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan biyosensörün 7-10 arası değişen pH'larda hipoksantine karşı duyarlılığı incelendi ve karşılaştırıldı. Bu işlem için pH'sı 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10 ve 10.5 olan 0,1 M fosfat tamponları hazırlandı. Her bir pH ortamı için mevcut pH koşullarında ayrı ayrı hipoksantin çözeltileri, hazırlandı. Her bir pH ortamında ölçüm alınırken biyosensörün o pH ortamına uyum sağlaması için mevcut pH ortamında bir süre bekletildi ve her bir pH ortamı için denge akımına gelmesi bekletildi. Ölçüm işlemi için hipoksantin ilavesi hücre içi derişimi $5,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde yapıldı. Hipoksantin ilavesinden sonra hücre ortamı 300 s karıştırıldı ve 200 s sonundaki difüzyon akımı okundu. Okunan akımlar denge akımından çıkarılarak her bir pH ortamı için Δi değerleri hesaplandı. Elde edilen Δi değerleri pH 'ya karşı grafiğe geçirildi.

3.7.2. Sıcaklığın etkisi

Hazırlanan ve dengeye getirilen biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C ve 80°C sıcaklığındaki ortamlarda biyosensörün amperometrik cevabı ölçüldü. Hücre içine pH'sı 9,5 olan 0,1 M 9 mL tampon çözeltisi ve 1 mL 1 M sodyum perklorat çözeltisi konuldu ve enzim elektrot hücreye daldırıldı. Grant W14 marka termostatl dolaşım su banyosu kullanılarak hücre içindeki çözeltinin sıcaklığı 20 °C olacak şekilde ayarlandı. 300 mV sabit potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Her bir sıcaklık ortamında hücre içi derişimi $5,0 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde hipoksantin ilavesi yapıldı. İlave sonrasında 300 s karıştırılıp 200 s sonundaki difüzyon akımı okundu. Aynı işlemler diğer sıcaklık değerlerinde de yapılarak okunan akımlar kaydedildi. Okunan akımlar ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir sıcaklık için Δi değerleri hesaplandı ve bulunan bu değerler sıcaklığa karşı grafiğe geçirildi.

3.7.3. Substrat derişiminin etkisi

Bölüm 3.6.1 'deki gibi hazırlanan biyosensör içerisinde, pH'sı 9,5 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu ve 1 mL 1 M sodyum perklorat bulunan çözeltiye daldırıldı. 300 mV sabit potansiyelde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Daha sonra 1 μ M–1 mM derişim aralığında hipoksantin ilaveleri yapıldı. Her ilavede çözelti 300 saniye karıştırılıp, 200 saniye sonundaki difüzyon akımı okundu ve denge akımı ile arasındaki farklar alınarak her bir hipoksantin derişimi için Δi değerleri belirlendi. Hipoksantin derişimlerine karşı Δi grafiğı çizildi (Michaelis-Menten eğrisi)(Şekil 4.11). Çizilen bu grafikten yararlanılarak biyosensörün çalışma aralığı ve tayin sınırı belirlendi. Ayrıca elde edilen verilerden Lineweaver-Burk grafiğı çizildi ve bu grafikten yararlanarak ksantin oksidaz ve ürikaz enziminin bulunduğu çift enzimli sistemin $K_{M(gözlenen)}$ ve $V_{maks(gözlenen)}$ değerleri belirlendi.

3.7.4.Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

Bölüm 3.6.1 'de anlatılan şekilde hazırlanan biyosensörün optimum koşullar altında tekrar kullanılabilirliğini ölçmek amacıyla arka arkaya sabit hipoksantin derişiminde ölçümler alındı. Bu amaçla; hazırlanan biyosensör optimum olarak belirlenen pH'daki tampon çözeltisi ve destek elektrolitin bulunduğu hücre içerisine alınarak dengeye getirildi ve 0,1 mM hipoksantin ilave edildi. Hücre ortamı 300 s karıştırıldı ve 200 s sonundaki difüzyon akımı okundu. Hemen ardından aynı şekilde hazırlanan hücre ile tekrar ölçüm alındı. Bu işlem 27 defa tekrar edilerek okunan Δi akımları grafiğı geçirildi.

3.7.5. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Hazırlanan biyosensörün raf ömrünün tespit edilebilmesi için 48 gün boyunca üç günlük periyotlarda ölçümler alınmış ve biyosensörün ilk gün verdiği cevap ile son gün verdiği cevap kıyaslanmıştır. Bu amaçla tampon çözelti ve destek elektrolit içeren hücre sistemine daldırılan biyosensör 300 mV potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Ardından hücre içi derişimi 0,1 mM olacak şekilde hipoksantin ilave edildi ve 300 s karıştırılıp 200 s sonundaki difüzyona akımı okundu. Ölçüm işlemi tamamlanan biyosensör, bir sonraki ölçüm işlemine kadar tampon çözelti içerisinde 18 °C'a ayarlanmış buzdolabında bekletildi. Aynı işlemler her ölçüm için tekrarlandı. Elde edilen Δi değerleri grafiğı geçirildi,

3.8. Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler

Bölüm 3.6.1'e göre hazırlanan ve dengeye getirilen biyosensörün en iyi şartlarda $5,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ hipoksantin derişiminde elde edilen amperometrik cevap akımı üzerine biyolojik sıvılarda var olan ve girişim etkisi yapabilecek maddelerden ürik asit, askorbik asit, parasetamol (asetaminofen) ve glukozun girişim etkileri incelendi.

Ürik asidin girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.6.1'e göre hazırlanan Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörü, içerisinde 9 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 1 mL 1,0 M NaClO_4 bulunan toplam 10 mL'lik hücrede 0,3 V elektrot potansiyelinde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Hücre içi derişimi $5,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ olacak şekilde hipoksantin ilavesi yapıldı. Çözelti 300 s karıştırılıp 200 s sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak ürik asitin neden olduğu cevap akımı kaydedildi. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ olacak şekilde ürik asit eklendi. 300 s karıştırılıp 200 s sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak hipoksantin enzimlerin ve ürik asidin neden olduğu toplam cevap akımı kaydedildi. Bu toplam akımdan $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ hipoksantinden kaynaklanan cevap akımı çıkarılarak $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ürik asidin cevap akımı bulundu. Bulunan bu akım toplam cevap akımına oranlanarak $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ürik asidin yüzde girişimi hesaplandı (Çizelge 4.1).

Askorbik asidin girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.6.1'e göre hazırlanan Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörü, içerisinde 9 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 1 mL 1,0 M NaClO_4 bulunan toplam 10 mL'lik hücrede 0,3 V elektrot potansiyelinde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Hücre içi derişimi $5,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ olacak şekilde hipoksantin ilavesi yapıldı. Çözelti 300 s karıştırılıp 200 s sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak askorbik asidin neden olduğu cevap akımı kaydedildi. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ olacak şekilde askorbik asit eklendi. 300 s karıştırılıp 200 s sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak hipoksantin ve askorbik asidin neden olduğu toplam cevap akımı kaydedildi. Bu toplam akımdan $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ hipoksantinden kaynaklanan cevap akımı çıkarılarak $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ askorbik asidin cevap akımı bulundu. Bulunan bu akım toplam cevap akımına oranlanarak $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ askorbik asidin yüzde girişimi hesaplandı (Çizelge 4.1).

Parasetamol (Asetaminofen)'ün girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.6.1'e göre hazırlanan Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörü, içerisinde 9 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 1 mL 1,0 M NaClO₄ bulunan toplam 10 mL'lik hücrede 0,3 V elektrot potansiyelinde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Hücre içi derişimi 5×10^{-5} M olacak şekilde hipoksantin ilavesi yapıldı. Çözelti 300 s karıştırılıp 200 s sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak hipoksantin neden olduğu cevap akımı kaydedildi. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi 1×10^{-4} M olacak şekilde parasetamol eklendi. 300 s karıştırılıp 200 s sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak hipoksantin ve parasetamolün neden olduğu toplam cevap akımı kaydedildi. Bu toplam akımdan 5×10^{-5} M hipoksantin sebep olduğu cevap akımı çıkarılarak 1×10^{-4} M parasetamolün sebep olduğu cevap akımı bulundu. Bulunan bu akım toplam cevap akımına oranlanarak 1×10^{-4} M parasetamolün yüzde girişimi hesaplandı(Çizelge 4.1).

Glukozun girişim etkisinin incelenmesi

Bölüm 3.6.1'e göre hazırlanan Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörü, içerisinde 9 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 1 mL 1,0 M NaClO₄ bulunan toplam 10 mL'lik hücrede 0,3 V elektrot potansiyelinde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Hücre içi derişimi 5×10^{-5} M olacak şekilde hipoksantin ilavesi yapıldı. Çözelti 300 s karıştırılıp 200 s sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak hipoksantin neden olduğu cevap akımı kaydedildi. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi 5×10^{-3} M olacak şekilde glukoz eklendi. 300 s karıştırılıp 200 s sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak hipoksantin ve glukozun neden olduğu toplam cevap akımı kaydedildi. Bu toplam akımdan 5×10^{-5} M hipoksantin sebep olduğu cevap akımı çıkarılarak 5×10^{-3} M glukozun sebep olduğu cevap akımı bulundu. Bulunan bu akım toplam cevap akımına oranlanarak 5×10^{-3} M glukozun yüzde girişimi hesaplandı (Çizelge 4.1).

3.9. Biyosensörün Gerçek Numuneler Üzerindeki Performansının İncelenmesi

3.9.1. Numune hazırlanması

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

3.9.2. Balık numunesi ile ölçüm alınması

Hazırlanan biyosensör ile gerçek numunelere karşı çalışmalar yapılmış ve performansı incelenmiştir. Bu amaçla canlı olarak elde edilen alabalık türü balık ile denemeler yapıldı. Balığın ölümünden hemen sonra balık numunesi bölüm 3.9.1'de anlatıldığı şekilde ölçüme hazırlandı.

Biyosensör, tampon çözelti ve destek elektrolit bulunan hücre sistemine daldırılıp 300 mV'da dengeye getirilerek ölçüm işlemine hazır hale getirildi. Hazırlanan balık numunesinden 1 mL alınarak hücre içerisine ilave edilip 300 s karıştırıldı ve 200 s sonundaki difüzyona akımı okundu. Ardından standart ekleme yöntemiyle bir kalibrasyon grafiği hazırlandı. Bu amaçla tampon çözelti destek elektrolit ve balık numunesinin bulunduğu, ölçüm alınmış hücre sistemi değiştirilmeden 25 μ M – 75 μ M arasında artan konsantrasyonlarda hipoksantin ilaveleri yapılarak akım değerleri okundu. Elde edilen Δi değerleri hipoksantin derişimine karşı grafik edildi. Ölçümü alınan balık numunelerindeki hipoksantin miktarı, bu grafiğe bakılarak tespit edildi.

Ölümü henüz gerçekleşen balık eşit parçalara bölündü. Parçaların bir kısmı -18 °C'a ayarlanmış derin dondurucuda ve bir kısmı +4 °C'a ayarlı buzdolabında sıcaklığında bekletilerek üç günlük aralıklarla ölçümler alındı. Alınan ölçümler sonunda elde edilen

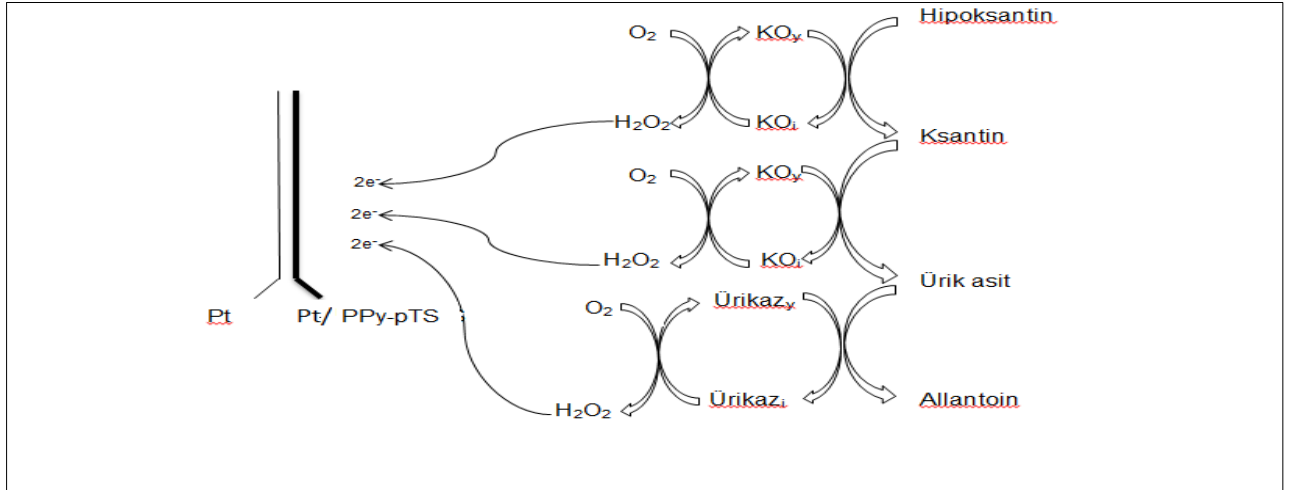
akımlar, ilk günkü balık numunesinden alınan ölçüm sonucu referans alınarak, her iki ortamdaki numune için karşılaştırmaya yapılmak üzere grafik edildi.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

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

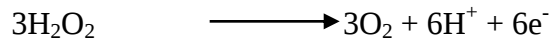
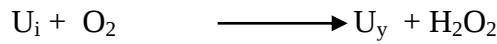
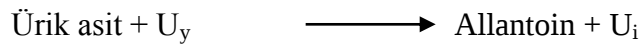
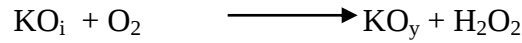
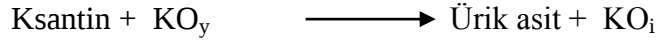
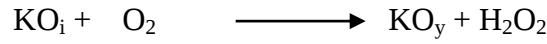
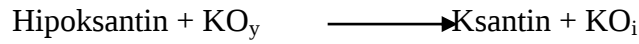
İlk olarak elektrot enzimsiz olarak kaplandı ve elektrot yüzeyine hazırlanan filmin duyarlılığını test edebilmek amacıyla artan hidrojen peroksit derişimlerinde ölçümler alındı. Ardından hazırlanan film elektrodun hipoksantin oksidasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksit karşı duyarlılığını tespit edebilmek için serbest enzimli ortamda ölçümler alındı. Daha sonra her iki enzimin birbirlerine göre en doğru oranını tespit etmek amacı ile serbest enzim ortamında her iki enzimin birbirlerine göre oranları değiştirilerek en iyi oran belirlendi. Elektrodun en iyi çalışma potansiyeli belirlendi. Çalışma potansiyeli olarak 300 mV, enzim oranı da “1 birim ksantin oksidaz 1 birim de ürikaz enzimi” olarak tespit edildi ve çalışmalara bu yönde devam edildi. Enzimler elektrot yüzeyine tutuklama yöntemi ile immobilize edildi. Hazırlanan enzim elektrodun çalışma koşullarının tespit edilebilmesi için değişen sıcaklık ve pH koşulları altında ölçümler alınarak biyosensörün optimum çalışma koşullarına bakıldı. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği incelendi ve raf ömrü tayin edildi. Film elektrod ve biyosensör yüzeyinin morfolojik yapısı SEM, AFM, profilometri, temas açısı ölçümü gibi yöntemlerle karakterize edildi. Son olarak da gerçek numuneler üzerindeki analitik performansı test edildi.

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



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

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



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

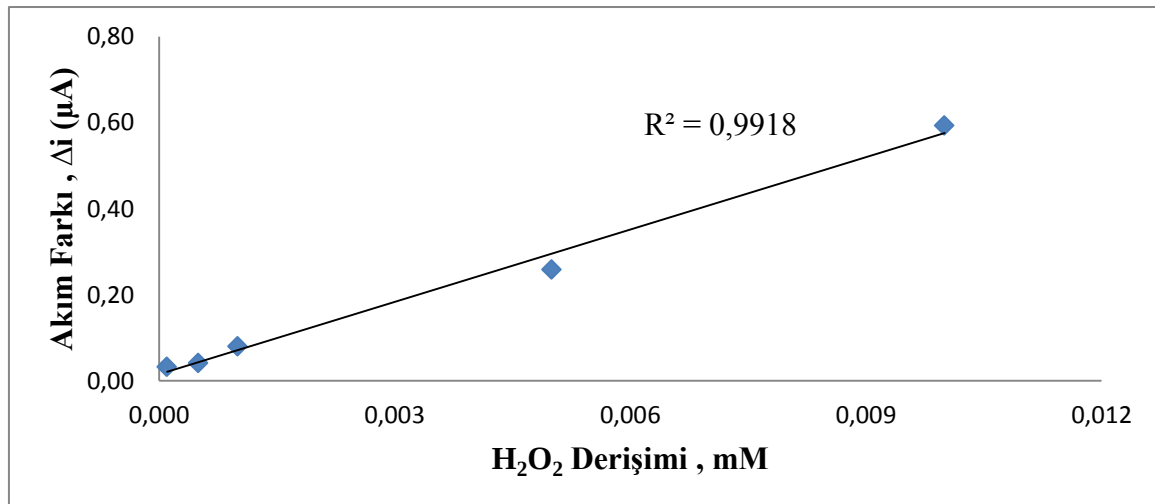
Özgür BAL tarafından hazırlanan “Biyolojik sıvılardaki glukozun tayini için polipirol filme glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması” yüksek lisans tezinde PPy-pTS filminin en iyi çalışma koşulları belirlenmiştir[35].

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

4.1. Hazırlanan Pt/PPy-pTS Film Elektrodunun Hidrojen Peroksit

Duyarlılığının Belirlenmesi

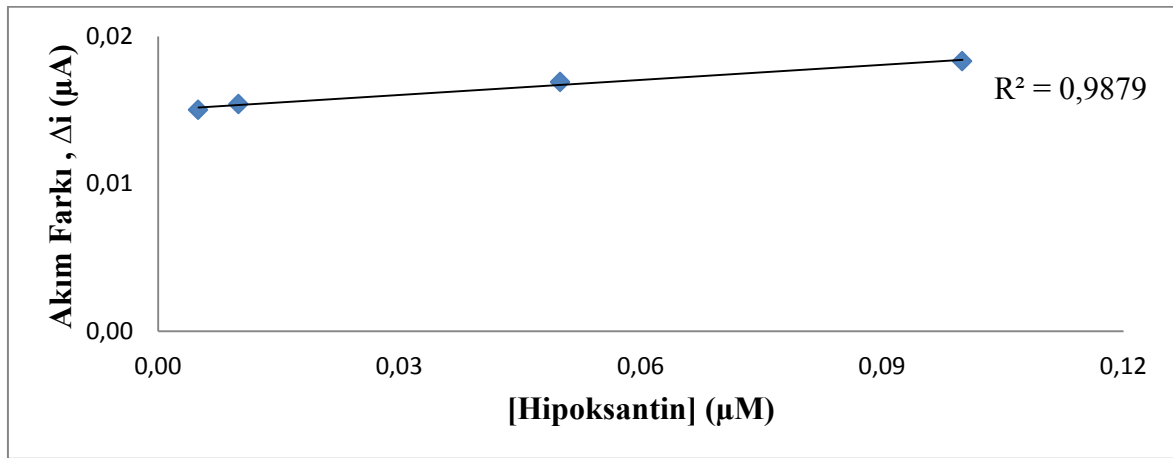
Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan film elektrodun duyarlılığının tespit edilebilmesi için artan hidrojen peroksit derişimlerine karşı cevap akımlarındaki değışimlere bakıldı. Teorik olarak artan hidrojen peroksit derişimi ile orantılı anodik akım cevapları beklenmektedir. Deneysel sonuçlar da bu yönde olmuştur. 0.1µM–1mM arasında artan hidrojen peroksit derişimlerinde doğrusal bir akım artışı gözlenmiştir. Sonuçlar grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen veriler sonucu elektrodun hidrojen peroksit karşı duyarlı olduğunu gösterir. Bu da film elektrodun belirtilen aralıkta hipoksantin tayini için kullanılabilir olduğunu göstermiştir(Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Pt/PPy-pTS film elektrodun artan hidrojen peroksit derişimine karşı cevap akımları

4.2. Pt/PPy-pTS Film Elektrodun Serbest Enzimli Ortamda Hipoksantine Duyarlılığının İncelenmesi

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

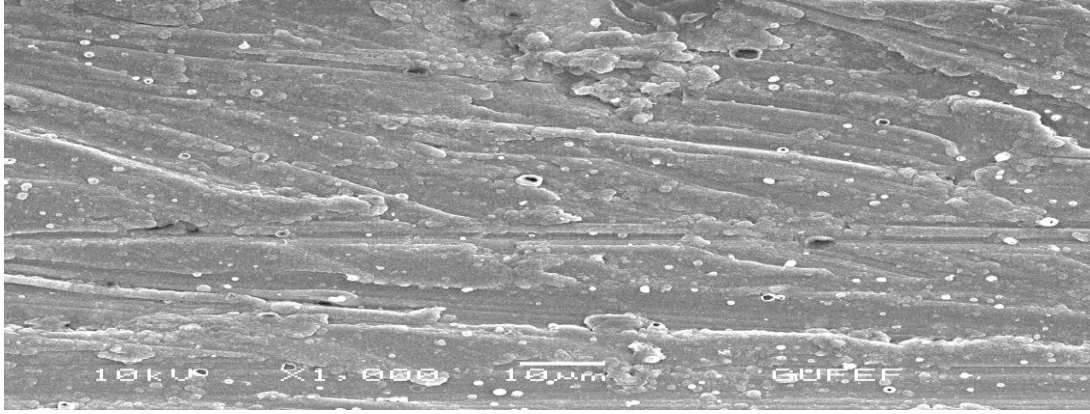


Şekil 4.3. Pt/PPy-pTS film elektrodun serbest enzimli ortamda hipoksantine cevabı

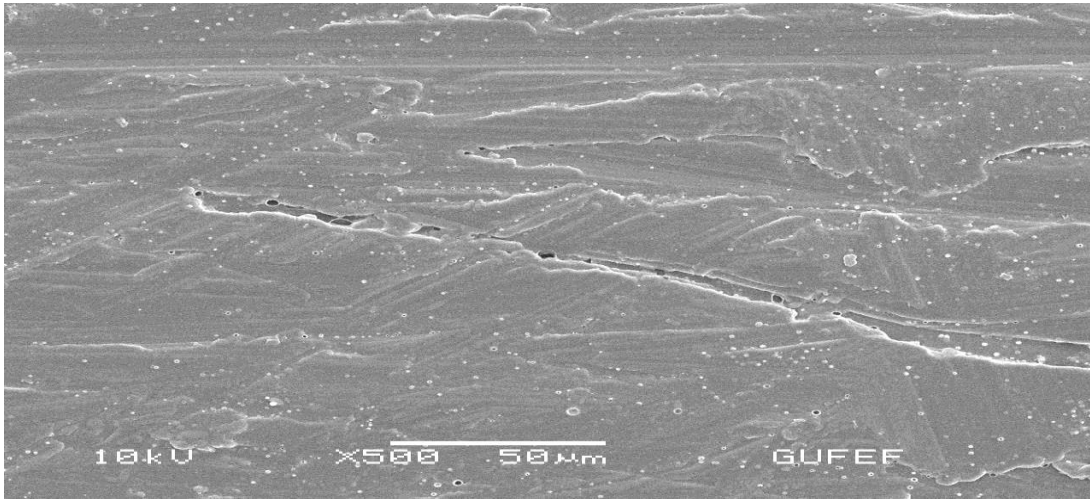
Grafikte de görüldüğü gibi hipoksantin derişiminin artışına paralel olarak akımlarda da bir artış gözlenmiştir. Bu sonuç, hipoksantin enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşturduğu ürünlerin elektrokimyasal olarak tespit edilebileceğinin bir göstergesidir.

4.3. SEM Analizi

Bölüm 3.3 ' de anlatıldığı gibi hazırlanan film elektrot ve bölüm 3.6.2. ' de anlatıldığı gibi hazırlanan biyosensörün taramalı elektron mikroskobu ile çekilen fotoğrafları sırasıyla Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Pt/PPy-pTS film elektrodun SEM fotoğrafı

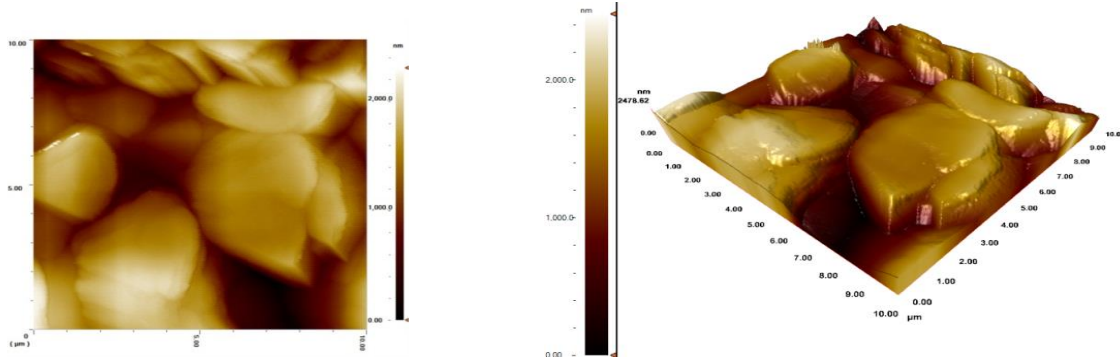


Şekil 4.5. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün SEM fotoğrafı

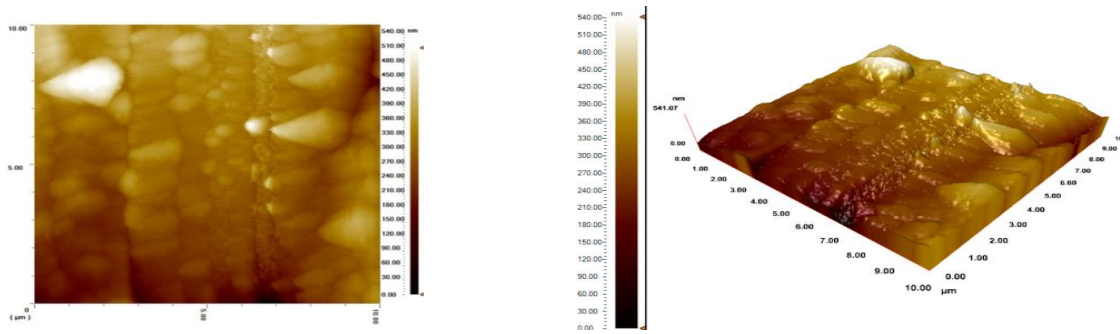
Enzim ile kaplanan elektrot filminin SEM fotoğrafı ile enzimsiz kaplanan elektrot filminin SEM fotoğrafına bakıldığında ikisinin birbirinden çok farklı olduğu görülmektedir [35]. Biyosensör yüzeyinin SEM fotoğrafına bakıldığında enzim moleküllerinin, polimer yapının üstünde değişik bir şekilde yerleşmiş olarak bulunduğu görülmektedir. PPy-pTS filmin doğal görüntüsü taneciklidir. Ksantin oksidaz ve ürikaz enzimleri immobilize edildikten sonra enzimlerin aynı biçimde dağılmasıyla tanecikli yapı kapanmıştır. PPy-pTS film elektrod ve PPy-pTS ksantin oksidaz ve ürikaz biyosensörü için alınan görüntüler literatür görüntüleri ile uyumludur [43,44].

4.4.AFM Analizi

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan film elektrot ve bölüm 3.6.3 ‘ de anlatıldığı gibi hazırlanan biyosensörün AFM (atomik kuvvet mikroskobu) ile çekilen fotoğrafları sırasıyla Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.’de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. Pt/PPy-pTS film elektrodunun AFM fotoğrafı

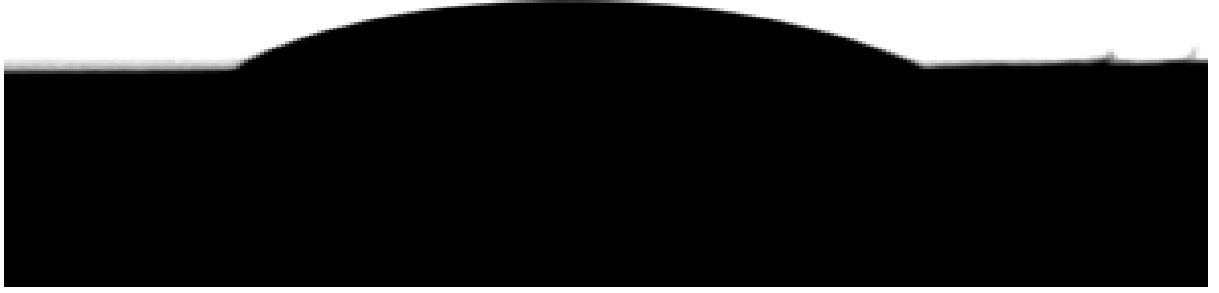


Şekil 4.7. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün AFM fotoğrafı

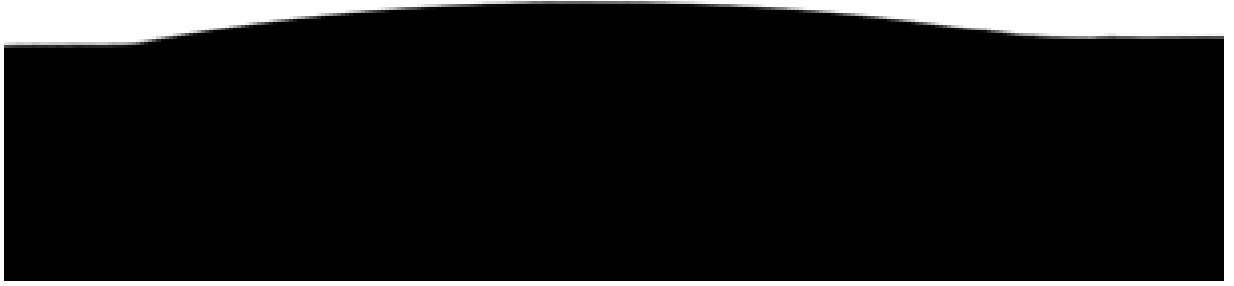
Enzimli ve enzimsiz görüntüler birbirinden açık bir şekilde ayırt edilebilir durumdadır. Yapıya ksantin oksidaz ve ürikaz enzimlerinin immobilizasyonu işlemiyle yapıda oluşmuş olan rastgele dağılmış tanecikli yapılar enzimli yapıya atfedilmektedir. Enzimsiz (PPy-pTS) yapısının yüzey morfolojisi, yapıya ksantin oksidaz ve ürikaz enzimlerinin eklenmesiyle yüzeyde yeni bir morfolojik yapılanma oluşmuştur. Buna bağlı olarak ksantin oksidaz ve ürikaz immobilizasyon işlemi yüzeyi daha pürüzsüz yapmıştır. Bu sonuç, yüzey pürüzlülük değeri olan Root Mean Square (RMS) değeri ile desteklenmektedir. Enzimli görüntü için RMS değeri 306,6534 nm ve enzimsiz yapının RMS değeri 1388,174 nm dir.

4.5. Pt/ PPy-pTS/KO-U Biyosensörünün Yüzey Temas Açısı Analizi

Bölüm 3.3’de anlatıldığı gibi hazırlanan film elektrot ve bölüm 3.6.4. ’de anlatıldığı gibi hazırlanan biyosensörün yüzey temas açısı fotoğrafları Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.’da görülmektedir.



Şekil 4.8. Pt/PPy-pTS film elektrodunun yüzey temas açısı fotoğrafı

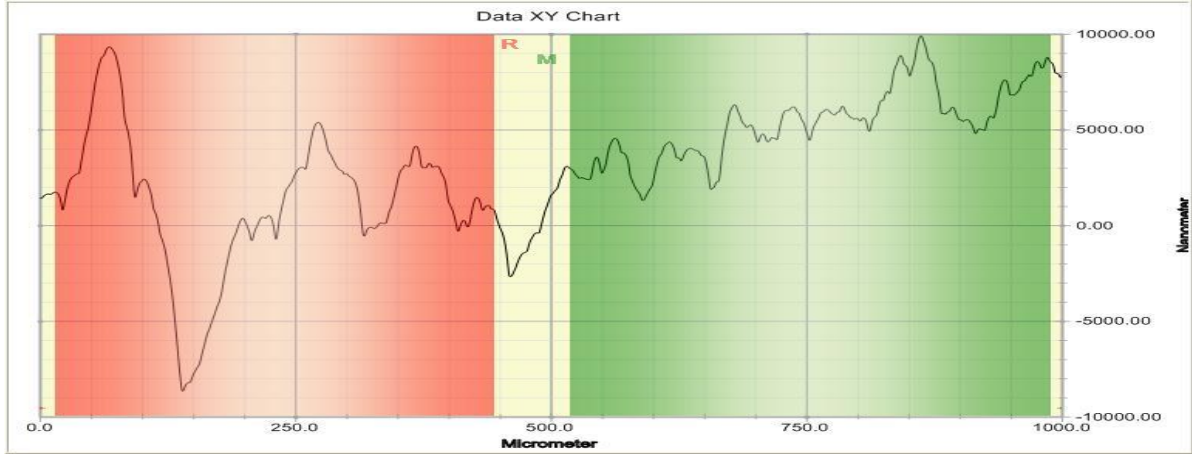


Şekil 4.9. Pt/PPy-pTS/ KO-U biyosensörünün yüzey temas açısı fotoğrafı

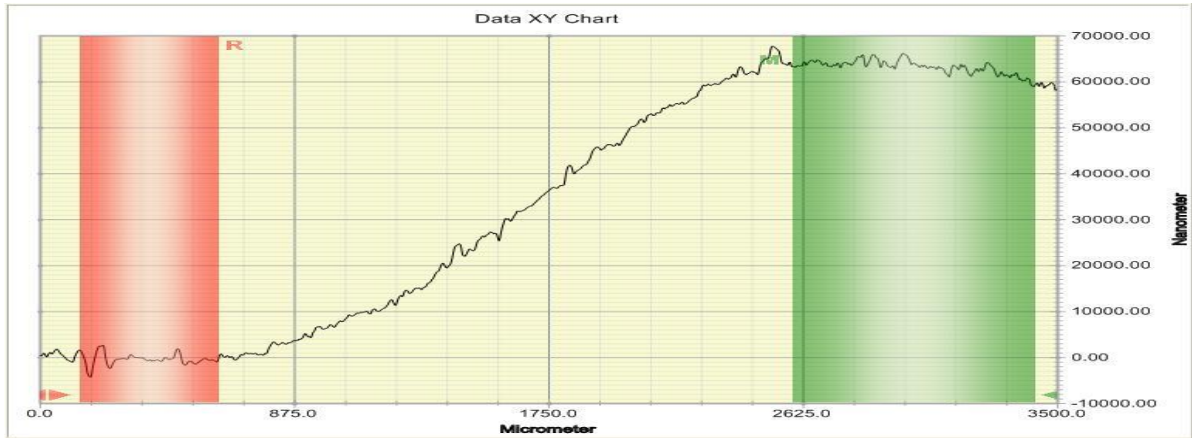
Şekil 4.8 ve Şekil 4.9 görüntüleri incelendiğinde sırasıyla yüzey temas açılarının $55,21^\circ$ ve $7,66^\circ$ olduğu görülmektedir. Yüzey açısının biyosensörde daha düşük olması yüzeyin hidrofilikliğinin bir göstergesidir. Şekiller incelendiğinde enzim immobilize edilen film elektrod görüntüsünün (Şekil 4.9) biraz daha yayvan olduğu görülmektedir. Bu da enzim elektrod yapısının hidrofilik, PPy-pTS film elektrodun ise daha hidrofobik olduğunun göstergesidir. Ksantin oksidaz ve ürikaz enzimleri yapılarında hidrofilik gruplar içerdiğinden Şekil 4.9'un daha yayvan olması beklenen sonuçtur. Bu görüntüler ise enzimlerin yüzeye immobilize edildiğini kanıtlamaktadır.

4.6. Pt/ PPy-pTS/KO-U Biyosensörünün Profilometri Spektrumu

Bölüm 3.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan film elektrot ve bölüm 3.6.5. 'de anlatıldığı gibi hazırlanan biyosensörün film kalınlığına ait spektrum Şekil 4.10 ve Şekil 4.11 'de görülmektedir.



Şekil 4.10. Pt/PPy-pTS film elektrodunun profilometri spektrumu



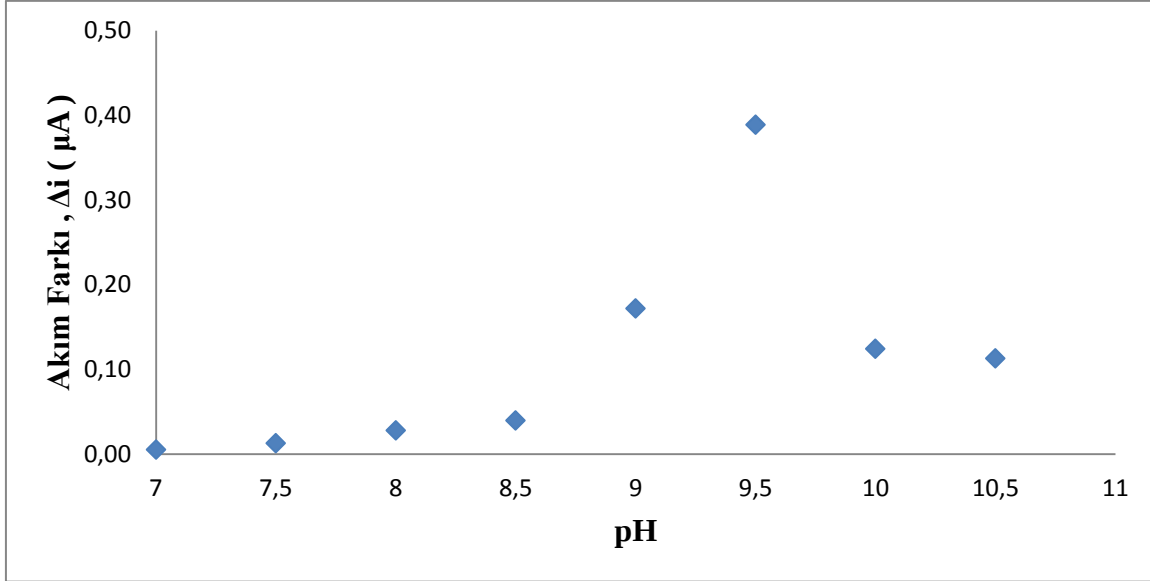
Şekil 4.11. Pt/PPy-pTS/ KO-U biyosensörünün profilometri spektrumu

Şekil 4.10 incelendiğinde platin levha ile PPy-pTS film yüzeyi arasındaki kalınlık farkı 4,1 μm olarak ölçülmüştür. Şekil 4.11 incelendiğinde platin levha ile Pt/PPy-pTS/ KO-U enzim elektrot yüzeyi arasındaki kalınlık farkı 63,6 μm olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar ise PPy-pTS film üzerine enzimin immobilize edildiğini kanıtlamaktadır.

4.7. Biyosensörün En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

4.7.1. pH etkisi

Çift enzimli elektrot sistem için optimum çalışma pH'sını belirlemek amacı ile Bölüm 3.7.1'deki işlemler yapılarak sonuçlar grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.12).

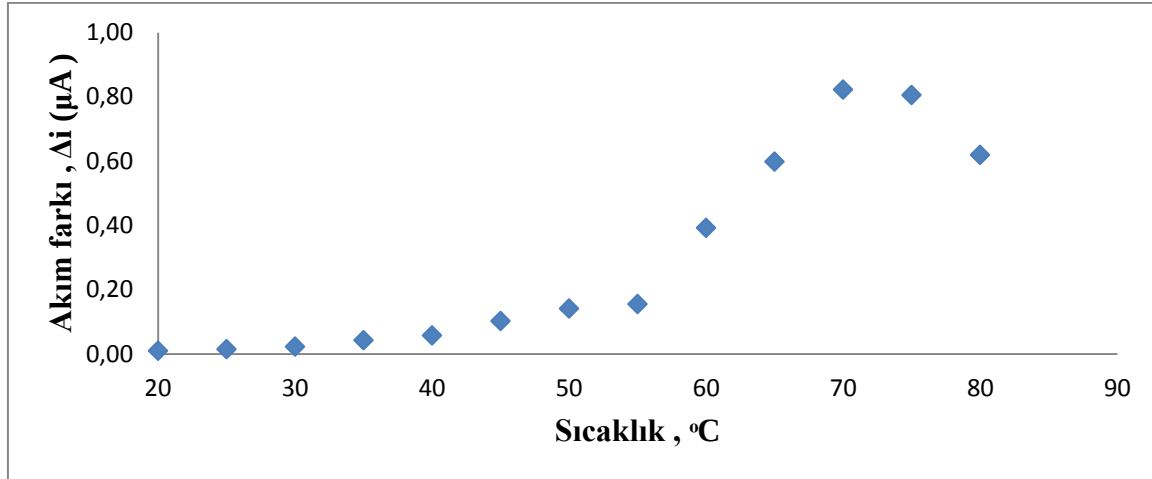


Şekil 4.12. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün farklı pH ortamlarındaki cevap akımları

Ölçümler pH: 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 ve 10,5 ortamlarında alınmıştır. En yüksek akımlar pH 9,5 ortamında elde edilmiştir. Fakat çift enzimli elektrot sisteminde çalıştığımız için grafiğin tepe noktasına karşılık gelen pH'nın optimum pH olarak alınması daha uygun olacaktır. Çünkü her iki enzimin optimum pH'ları birbirlerinden farklıdır (Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2). Tepe noktasının x eksenini kestiği nokta 9,5 'dir. Çalışmalara pH 9,5 ile devam edildi. Bulunan sonuçlar literatür değerleriyle desteklenmektedir. Literatürler incelendiğinde ksantin oksidaz ve ürikaz enzimlerinin immobilizasyonu ile hazırlanan elektrot için pH değeri 8,2 olarak bulunmuştur [24]. Ayrıca ksantin ile hazırlanan biyosensör çalışmalarında pH 8,0 ve 9,0 [45,46]; ürikaz ile hazırlanan biyosensör çalışmalarında 9,0 ve 9,5 olarak bulunmuştur [22,42].

4.7.2. Sıcaklık etkisi

Hazırlanan biyosensör için en iyi çalışma aralığının belirlenebilmesi için Bölüm 3.7.2'de anlatıldığı şekilde ölçümler alındı ve sonuçlar grafiğe geçirildi.



Şekil 4.13. Pt/ PPy-pTS/KO-U biyosensörün sıcaklık değişimine karşı duyarlılığı

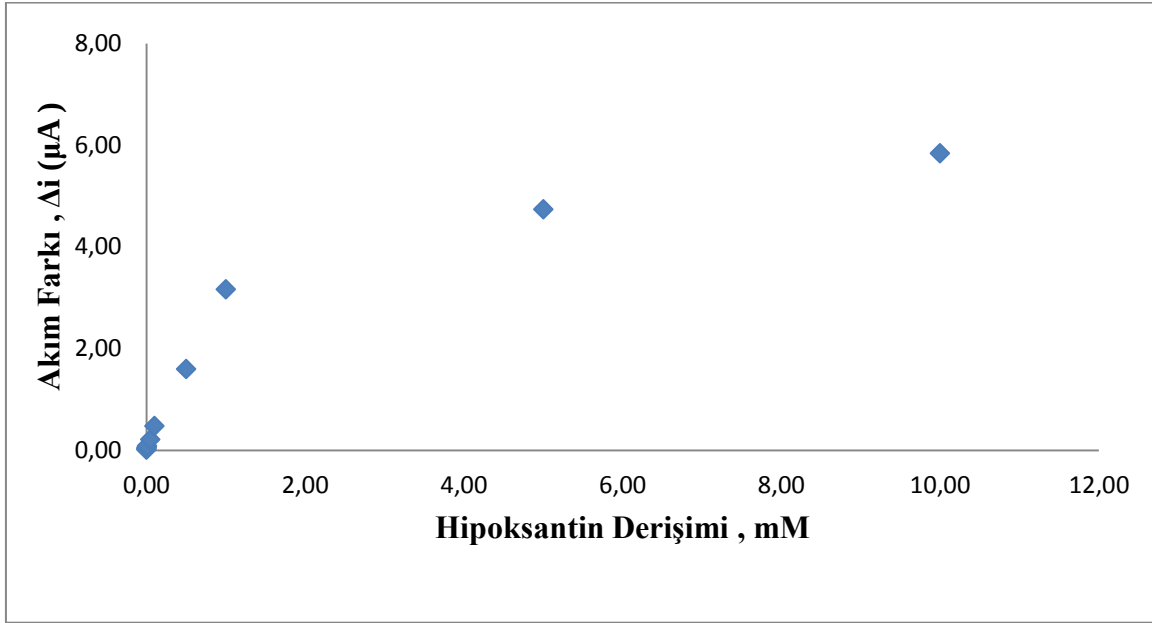
En yüksek akım değerleri 70 °C’da elde edilmiştir. Grafiğin tepe noktasının x eksenini kestiği nokta da 70 °C olduğundan, optimum sıcaklık değeri olarak 70 °C kabul edildi.

Sıcaklığın bu kadar yüksek çıkmasının sebebi pirolün elektropolimerleşmesiyle elde edilen polipirol(PPy) filmin, aktif enzimleri korumak için iyi bir mikro çevre sağlaması sonucu; ksantin oksidaz ve ürikaz enzimleri aktifliğini kaybetmemiştir. Enzimler protein yapısında olduklarından dolayı yüksek sıcaklıklarda enzimin protein yapısı denatürasyona uğrar ve böylelikle aktivitesini kaybeder [35]. Uzun süreli çalışma durumlarında yüksek sıcaklıkta çalışmak enzim yapısını bozacağı için bundan sonraki çalışmalar oda sıcaklığında yapılmıştır. Literatürlerde de değişik destek materyallere immobilize edilmiş ksantin oksidaz ve ürikaz için optimum sıcaklık değeri 30°C olarak bulunmuştur [24]. Her bir enzim için ayrı ayrı yapılan çalışmalarda ürikaz ile hazırlanan biyosensörlerde 35°C, 55 °C ve 70°C gibi sıcaklıklar bulunmuştur [39,42,47]. Ksantin oksidaz ile hazırlanan biyosensörlerle yapılan çalışmalarda ise sıcaklıklar 35°C, 55 °C ve olarak bulunmuştur[13,21].

4.7.3. Substrat derişiminin etkisi

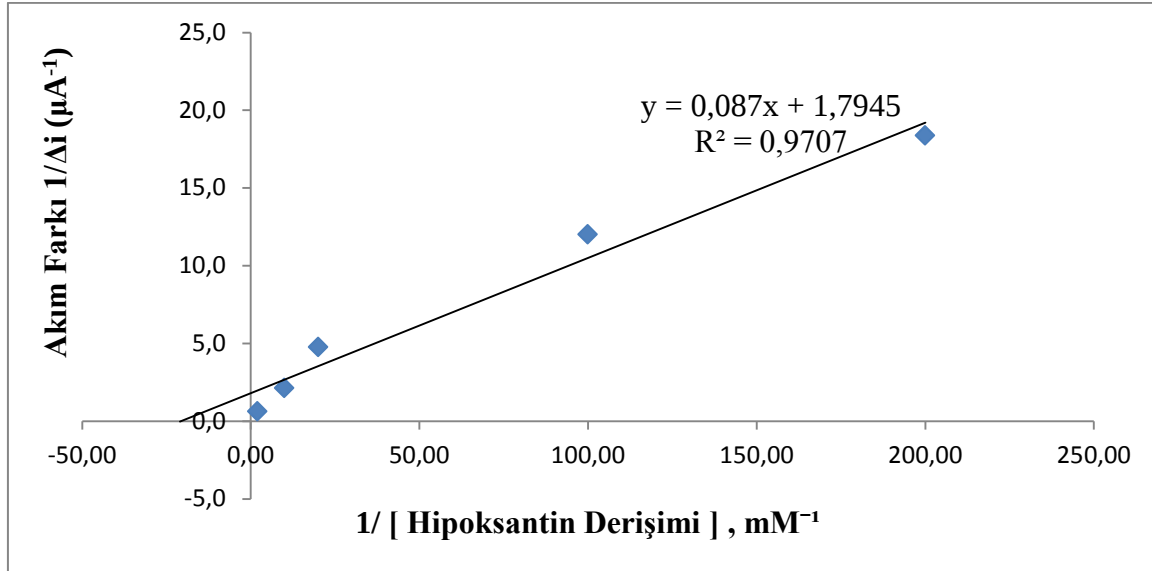
Enzimler artan substrat konsantrasyonlarında sürekli olarak aynı şekilde davranmazlar. Başlangıçta ilave edilen substrat anında ürüne dönüşür. Fakat belli bir substrat derişimine gelindiğinde, artık enzimin aktif merkezi substrata doygun hale gelir ve oluşan ürün miktarı artan substrat konsantrasyonuna rağmen sabit kalır. Hazırlanan biyosensör sisteminde reaksiyonu gerçekleştiren ana etken enzim olduğu için, biyosensörün genel

davranışında, enzimlerin davranışlarının en büyük rol oynayacağı bilinmektedir. Artan substrat konsantrasyonlarında da biyosensörün cevabı enzimlerin karakteristikleri ile benzer olacaktır. Yani artan substrat derişimine karşı başlangıçta artan bir akım sergileyecek sonrasında da enzim aktif merkezi substrata doygun hale geleceğinden akım değerleri sabitlenecektir. Bu bölümde hazırlanan biyosensörün artan hipoksantin derişimine karşı davranışı incelendi. Bu amaçla Bölüm 3.7.3’de anlatılan işlemler yapılarak elde edilen akımlar grafiğe geçirildi.



Şekil 4.14. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörün artan hipoksantin derişimine karşı davranışı

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

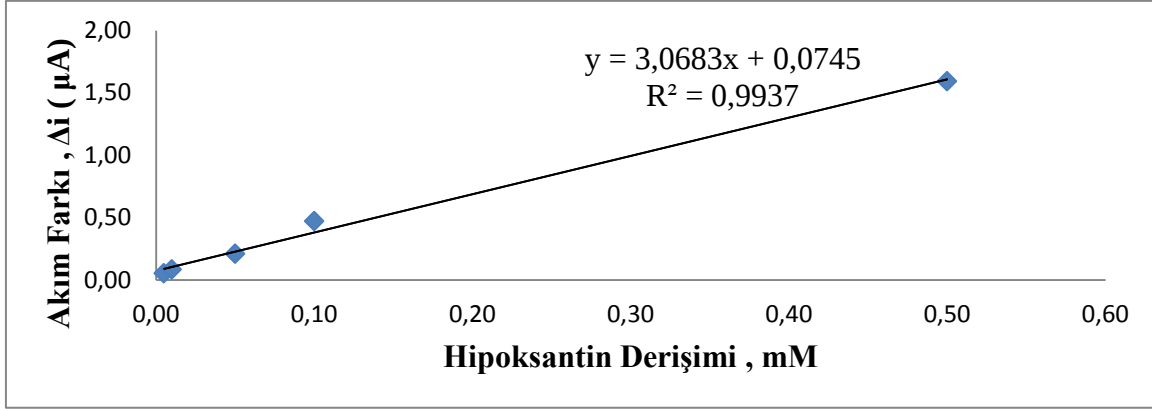


Şekil 4.15. Biyosensörün Lineweaver-Burk grafiği

Bu grafikten yararlanılarak çift enzimli elektrot sistemi için $K_{M(gözlenen)}$ değeri 0,048 mM tespit edilmiş ve $V_{maks(gözlenen)}$ değeri ise 0,56 μA olarak bulunmuştur. Biyosensörün tespit edebildiği minimum hipoksantin derişimi 5 μM , maksimum hipoksantin derişimi ise 0,5 mM olarak gözlenmektedir. Sonuç olarak hazırlanan biyosensörün çalışma aralığı 5 μM – 0,5 mM hipoksantin derişimleri arasındadır. Literatürlerde ksantin oksidaz ve ürikaz immobilizasyonu ile hazırlanan biyosensör için verilen $K_{M(göz.)}$ değeri 0,0037 mM ve $V_{maks(göz.)}$ değeri 0,19 μA ’dır [24]. Literatürlerde değişik destek materyallere immobilize edilmiş ürikaz enzimi ile hazırlanan biyosensörler için $K_{M(göz.)}$ değerleri 0,00618; 0,44 ve 0,238 mM; $V_{maks(göz.)}$ ise 0,685 ve 0,0741 μA olarak bulunmuştur [39,41,48]. Ksantin enzimi ile hazırlanan biyosensörler için $K_{M(göz.)}$ değerleri 1,538; 0,0154; 0,003 ve 1,11 mM; $V_{maks(göz.)}$ ise; 1,203 μA olarak bulunmuştur [14,21,30,54]

4.7.4. Biyosensör için kalibrasyon grafiği çizilmesi

Enzim elektrodun ölçüm aralığının tespitinden sonra, içeriği bilinmeyen numunede hipoksantin miktarının yapılabilmesi için kalibrasyon grafiği çizildi. Bu işlem için Şekil 4.11 grafiğindeki doğrusal olan noktalar baz alınarak 2,5 μM ile 10 μM arasında artan konsantrasyonlarda hipoksantin ilaveleri ile dört noktalı bir kalibrasyon grafiği elde edildi (Şekil 4.16).

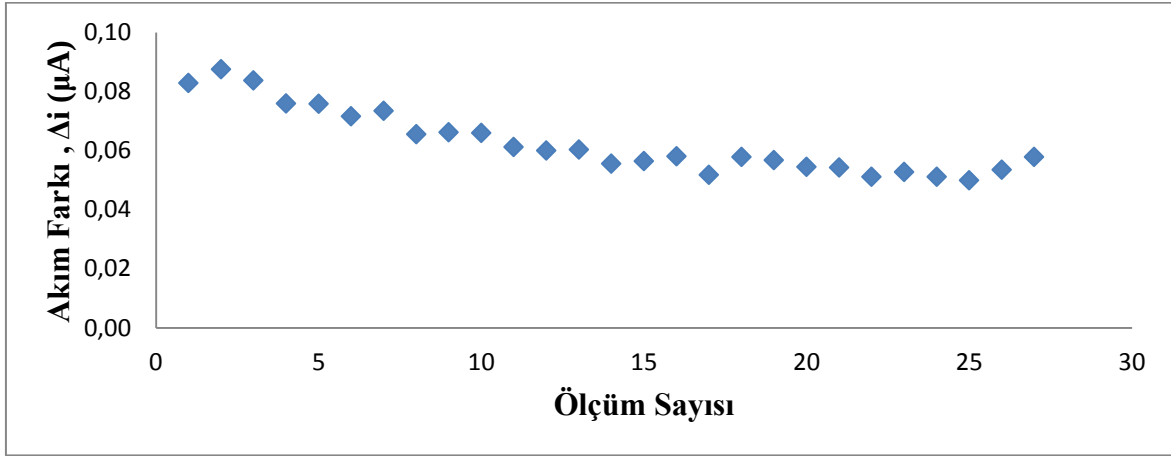


Şekil 4.16. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün kalibrasyon grafiği

Şekildeki kalibrasyon grafiğinin doğrusallığı oldukça yüksek çıkmıştır. İçeriği bilinmeyen numunelerin kantitatif analizinde kullanılmak üzere ideal olduğu görülmüştür.

4.7.5. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin tespit edilebilmesi için Bölüm 3.7.4’de anlatılan işlemler uygulanarak elde edilen akımlar grafiğe geçirilmiştir.



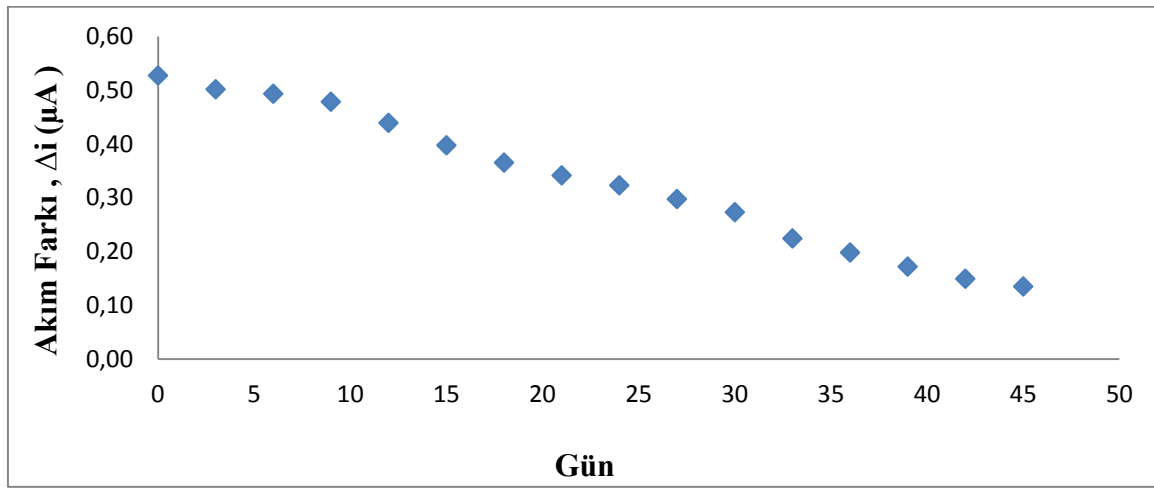
Şekil 4.17. Pt/PPy-pTS/KO-U biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği

Ölçümler alınırken, her bir ölçümde koşulların aynı olmasına özen gösterilmiştir. Sonuç olarak biyosensörün 27 ölçüm sonrasında performansının % 70’ini koruduğu ve bağıl standart sapma değeri % 17,49 olarak bulunmuştur. Literatürlerde ksantin oksidaz ve ürikazın immobilize edilmesiyle hazırlanan biyosensörün 20 ölçüm sonrasında performansının %74,5’ini koruduğu ve bağıl standart sapma değerinin %9,78 olduğu; ksantin oksidaz ile yapılan çalışmalarda 20 ölçüm sonucunda elde edilen akım değişimlerinden hesaplanan bağıl standart sapma % 26,0 olduğu, başka bir çalışmada 11

günlük süre boyunca performansının %80' ini koruduğu ; ürikaz ile yapılan çalışmalarda 30 ölçüm sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 76,6'sını koruduğu ve bağıl standart sapma değerinin % 8,67 olduğu belirtilmiştir [21, 24, 42, 55].

4.7.6. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Hazırlanan biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.7.5'de anlatılan işlemler uygulanarak elde edilen değerler grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Biyosensörün raf ömrü

48 günün sonunda biyosensörün performansında %74 'lük bir azalma meydana gelmiştir. Literatürlerde ksantin oksidaz ve ürikazın immobilize edilmesiyle hazırlanan biyosensörlerde 33 günde aktivitesinin %44'ünü kaybetmiştir[24].Ürikaz immobilize edilerek hazırlanan biyosensörde 60 gün sonunda başlangıç amperometrik cevabının yaklaşık % 58 'ini kaybettiği görülmüştür[42].Ksantin oksidaz immobilize edilerek hazırlanan biyosensörde 30 gün sonra başlangıç amperometrik cevabının %51' ini kaybettiği görülmüştür[21].

4.8. Biyosensörün Üzerine Girişim Yapan Maddeler

Hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımına askorbik asit, ürik asit, parasetamol ve glukozun girişim etkileri bölüm 3.8' de belirtildiği gibi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1 ' de verilmiştir.

Çizelge 4.1 . Biyosensör üzerine girişim yapan maddeler ve girişim etkileri

Girişim Yapan Tür	Hücre İçi Derişimi	% Girişim
Ürik Asit	0,1 mM	% 62,8
Ürik Asit	0,3 mM	% 80
Ürik Asit	0,5 mM	% 99
Askorbik Asit	0,1 mM	% 80
Askorbik Asit	0,01 mM	% 39
Glikoz	5,0 mM	% 92
Parasetamol	0,1 mM	% 95
Parasetamol	0,01 mM	% 68

Bu girişim değerleri oldukça yüksektir. Askorbik asidin ciddi girişimlere sebep olduğu ve bu girişim etkisinin büyük oranlarda seyreltme, salatalık suyu ilavesi ve doğrudan askorbik asidi yükseltgeyen askorbat oksidaz ilavesi yöntemleri ile giderilmeye çalışıldığı literatürlerde belirtilmektedir[18,49,52].Parasetamolün girişim etkisi ise büyük oranda seyreltmeler yapılarak giderilebildiği literatürlerde belirtilmiştir [51, 52]. Literatürlerde hazırlanan farklı biyosensörler için ürik asidin girişim etkisinin görüldüğü ve bunun seyreltme yapılarak giderildiği belirtilmektedir [18, 23, 35].

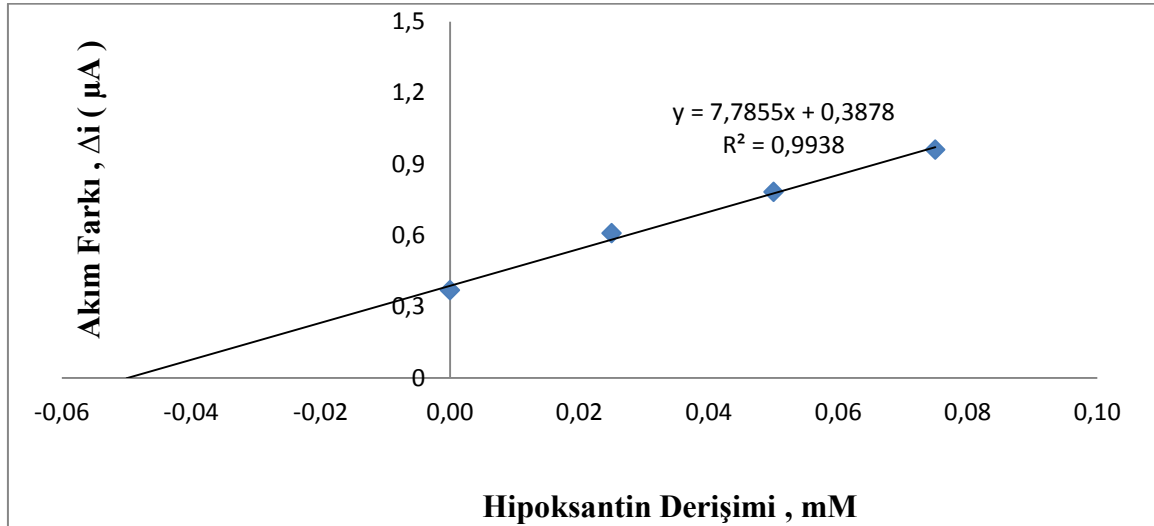
4.9. Biyosensörün Gerçek Numunelere Karşı Davranışının İncelenmesi

Biyosensörün gerçek numunelere karşı performansının incelenmesi için alabalık balık türü tercih edilmiştir. Balık canlı iken alınıp, ölümünden hemen sonra hipoksantin miktarına, hazırlanan biyosensör ile bakılmıştır. Ardından balıktaki hipoksantin artışlarını izlemek ve bu artışları hazırlanan biyosensörün tespit edip edemeyeceğini gözlemek için, balık numunesi çeşitli ortamlarda bekletildikten sonra ölçümler alınmıştır. Bu amaçla Bölüm 3.9.1 ve Bölüm 3.9.2'deki işlemler sırasıyla yapılmıştır.

4.9.1. Balık ölümü gerçekleştiği anda alınan ölçüm

Balık ölümü gerçekleştiği anda numune Bölüm 3.9.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanarak ölçüm alındı. Burada protein çöktürme ile çöktürmeme arasındaki akım değerlerindeki değişimi gözlemek için ilk numune hazırlamada protein çöktürmesi yapılmadı. Aynı numune proteini çöktürülerek de hazırlandı ve ikisinin akımları karşılaştırıldı. Ardından

standart ekleme metoduyla kalibrasyon grafiği çizildi. Bu grafiğin denkleminde, okunan akım değeri yerine yazılarak x ekseninde karşılık gelen değeri numunedeki hipoksantin miktarı olarak okundu.

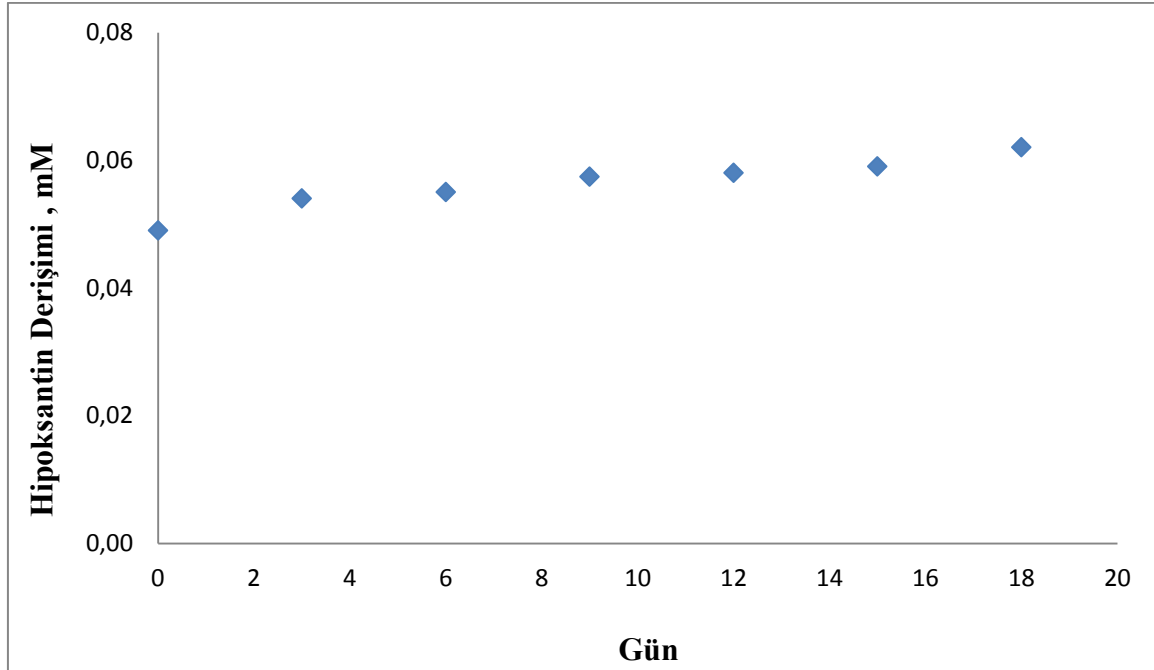


Şekil 4.19. Balık ölümü gerçekleştiği anda proteini çöktürölerek hazırlanmış numune için standart ekleme metodu ile hazırlanmış kalibrasyon grafiği

Numune için okunan akım değeri grafikteki yerine yazıldığında elde edilen değeri: 0,049 mM 'dır. Proteini çöktürölmemiş balık numunesi için yapılan ölçümlerde daha yüksek bir akım değeri elde edileceğinden numune hazırlanırken protein çöktürmesi yapılmıştır. Böylece proteinlerin girişim etkisi yapması önlenmiştir [24].

4.9.2. Derin dondurucuda bekletilmiş balık numunesinde hipoksantin artışlarının incelenmesi

İlk ölçümü alınan balık numunesi parçalara ayrılarak bir kısmı -18 °C'a ayarlanmış derin dondurucuda bekletilerek 3 günlük periyotlarda ölçümler alınarak hipoksantin artışı hazırlanan biyosensörle gözlemlenmek istenmiştir. Bu amaçla Bölüm 3.9.1'de anlatıldığı şekilde numune hazırlandı ve Bölüm 3.9.2'de anlatıldığı şekilde ölçümler alındı. Ölçüm sonuçları kalibrasyon grafiğinden okundu. Okunan değeri bekletilen gün sayısına karşı grafik edildi.

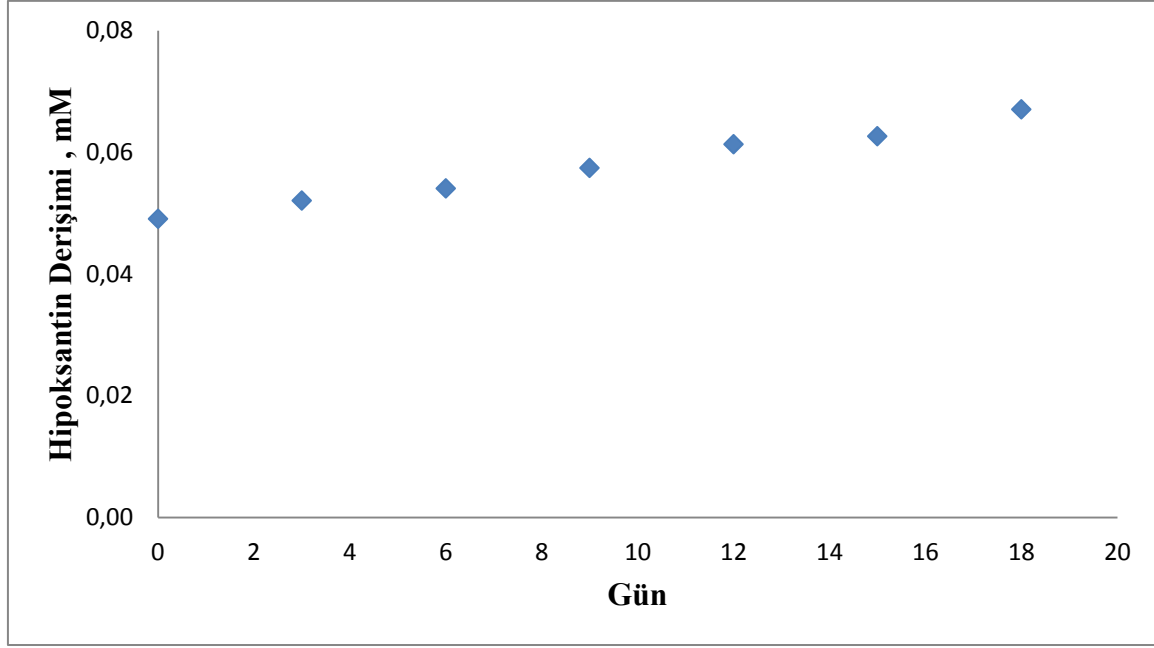


Şekil 4.20. Derin dondurucuda bekletilen numune için periyodik aralıklarla alınan hipoksantin ölçüm sonuçlarının bekletilen gün sayısına karşı grafiği

Grafiğe bakıldığında derin dondurucuda bekletilen balık numunesinde hipoksantin miktarının ilk güne göre biraz yükseldiği fakat bu yükselmenin derin dondurucuda ileriki zamanlarda sabitlendiği görülmektedir. Bulunan sonuçlar literatürlerle karşılaştırıldığında bulunan değerlerin literatür değerlerine yakın olduğu görülmüştür [24].

4.9.3. Buzdolabında bekletilmiş balık numunesinde hipoksantin artışlarının incelenmesi

İlk ölçümü alınan balık numunesi parçalara ayrılmış, parçaların bir kısmı da +4 °C' a ayarlanmış buzdolabında bekletilmiştir. Üç günlük periyotlarla ölçümler alınmış ve alınan ölçümlerden elde edilen sonuçlar gün sayısına karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.21).

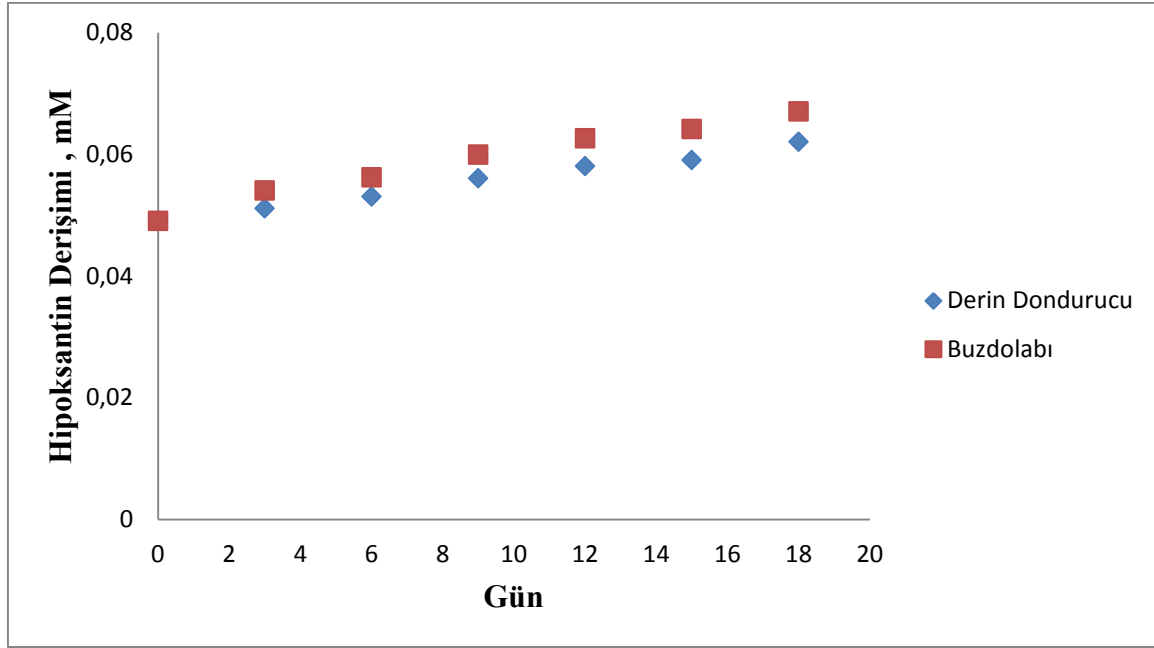


Şekil 4.21. Buzdolabında bekletilen numune için periyodik aralıklarla alınan hipoksantin ölçüm sonuçlarının bekletilen gün sayısına karşı grafiği

Dolapta bekletilen balık numunesinde hipoksantin artışı ilk güne göre yükselmiştir. Dolapta bekletilmesi, balık numunesinde hipoksantin artışını her ne kadar yavaşlatsa da durdurucu etki göstermemiştir. Ksantin oksidaz ve ürikaz enzimleri ile yapılan benzer çalışmalarda elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında sonuçların oldukça iyi olduğu görülmüştür [24].

4.9.4. Derin dondurucuda ve buzdolabında bekletilen balık numuneleri için alınan hipoksantin ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması

Derin dondurucuda ve buzdolabında bekletilen balık numuneleri içi alınan sonuçların tamamı tek bir grafikte toplanmıştır (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Her iki durum için alınan sonuçların karşılaştırılması

Grafiğe bakıldığında balık numunesinde hipoksantin artışının en yüksek olduğu durum balık numunesinin buzdolabında bekletildiği durumdur. Balık derin dondurucuda bekletildiğinde hipoksantin artışı çok düşük seviyelerdedir. Literatürlerle karşılaştırıldığında bulunan değerlerin literatür değerlerine göre oldukça iyi olduğu [24].

4.10. Sonuç

Hazırlanan hipoksantin duyarlı biyosensörün;

- Doğrusal çalışma aralığı: $5\mu\text{M} - 0,5\text{mM}$ arasındır. Bu değerler oldukça iyidir.
- 27 ölçüm sonunda performansının % 70 'ini korumuş ve bağıl standart sapma değeri % 17,49 olarak bulunmuştur. Bu değerler literatürlerle kıyaslandığında çalışmamızın oldukça iyi olduğu görüldü.
- 48 günün sonunda performansının % 74' ünü kaybetmiştir. Bu durum enzimlerin yüzeydeki tutunmasının zayıf olmasından dolayı yüzeyden muhtemel ayrılmalardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Bu durumun çözümü için, enzim immobilizasyonu jel içinde hapsedme veya farklı çapraz bağlayıcılar kullanarak kovalent bağlama yapılabilir.

- Ksantin oksidaz ve ürikaz enzimleri immobilize edilerek hazırlana Pt/PPy-pTS/KO-U enzim elektrot sistemi için $K_{M(gözlenen)}$ değeri 0,048 mM ve $V_{maks(gözlenen)}$ değeri ise 0,56 μA olarak bulunmuştur.
- Enzim elektrot sistemi için optimum pH değeri 9,5 olarak bulunmuştur.
- Optimum sıcaklık değeri 70 °C olarak tespit edildi.
- Gerçek numuneler karşı davranışı incelenmiş ve balık numunelerindeki hipoksantin miktarı tespit edilmiştir. Bekletilen balık numunesindeki hipoksantin artışı da doğrusal bir şekilde gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Hisar Aras, Ş., Hisar, O. ve Yanık, T. (2004). Balıklarda Mikrobiyolojik, Enzimatik ve Kimyasal Bozulmalar. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(3-4), 261-265.
2. Tüzün, C. (Editörler). (1992). *Enzim Reaksiyonlarına Sıcaklığın ve pH'nın Etkisi*, Biyokimya, Ankara:Palme yayınları, 125-130.
3. Champe, P. and Harvey, R. (Editörler). (1997). *Enzimler*, Biyokimya, İstanbul:Nobel Tıp Kitap Evleri, 48-53.
4. Fernandez-Quejo, M., De la Fuente, M. and Navarro, R. (2005). Theoretical calculations and vibrational study of hypoxanthine in aqueous solution. *Journal of Molecular Structure*, 744-747, 749-757.
5. Soyer , A. (1999). Balıkta avlanma sonrası meydana gelen biyokimyasal değişimler. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü*, 24(1), 33-39.
6. Okuma, H. and Watanabe, E. (2002). Flow system for fish freshness determination based on double multi- enzyme reactor electrodes. *Biosensors & Bioelectronics*, 17(5), 367-372.
7. Lawal, A.T. and Adeloju, S.B. (2010). Comparison of polypyrrole-based xanthine oxidase amperometric and potentiometric biosensors for hypoxanthine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66(3-4), 270-275.
8. Keha, E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ. (Editörler). (2009). *Biyokimya*, İstanbul:Aktif yayınevi, 91-139.
9. Telefoncu, A. (1997). *Immobilize Enzimler*, *Enzimoloji*. Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu, Kuşadası, 1-243.
10. Abasıyanık, M.F., Şakalar, E. ve Şenel, M. Biyosensörlere genel bir bakış ve biyosavunmada kullanılan biyosensörler. *Fatih Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Biyoloji Bölümü, Kimya Bölümü*, 1-6.
11. Çete, S. (2005). *Ürik asit tayini için biyosensör hazırlanması*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-7.
12. Çubukçu M., Timur S. ve Anık Ü. (2007). Examination of performance of glassy carbon paste electrode modified with gold nanoparticle and xanthine oxidase for xanthine and hypoxanthine detection. *Talanta*, 74(3), 434-439.
13. Kirgöz, Ü. A., Timur, S., Wang, J. ve Telefoncu, A. (2004). Xanthine oxidase modified glassy carbon paste electrode. *Electrochemistry Communications*, 6(9), 913-916.

14. Pei, J. and Li, X. Y. (2000). Xanthine and hypoxanthine sensors based on xanthine oxidase immobilized on a CuPtCl_6 chemically modified electrode and liquid chromatography electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, 414(1-2), 205-213.
15. Venugopal, V. (2002). Biosensors in fish production and quality control. *Biosensors & Bioelectronics*, 17(3), 147-157.
16. Niu, J. and Lee, J.Y. (2000). Bulk-modified amperometric biosensors for hypoxanthine based on sol-gel technique. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 62(3), 190-198.
17. Carsol, M., A., Volpe, G. and Mascini, M. (1997). Amperometric dedection of uric acid and hypoxanthine with Xanthine Oxidase immobilized and carbon based screen-printed electrode. Application of fish freshness determination. *Talanta*, 44(11), 2151-2159.
18. Hua, S., Xu, C., Luo, J., Luo, J. and Cui, D. (2000). Biosensor for detection of hypoxanthine based on xanthine oxidase immobilized on chemically modified carbon paste electrode. *Analytica Chimica Acta*, 412(1-2), 55-61.
19. Arslan, F., Yaşar, A. ve Kılıç, E. (2006). An amperometric biosensor for xanthine determination prepared from xanthine oxidase immobilized in polypyrrole film. *Artificial Cells, Blood Substitues and Biotechnology*, 34(1), 113-128.
20. Lia X. H., Xiea, Z. H., Mina, H., Xiana, Y. Z. and Jina, L. T. (2009). Amperometric Biosensor for Hypoxanthine Based on Immobilized Xanthine Oxidase on Iron (III) Meso-tetraphenylporphyrin Nanoparticles Modified Glassy Carbon Electrode. *Analytical Letters*, 41(3), 456-468.
21. Dolmacı, N. (2009). *Balık eti tazeliği tespiti için ksantin oksidaz enziminin polipirol-polivinilsülfonat filme immobilizasyonu ile amperometrik biyosensör hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-81.
22. Arslan, F. (2008). An amperometric biosensor for uric acid determination prepared from uricase immobilized in polyaniline-polypyrrolefilm. *Sensors*, 8(9), 5492-5500.
23. Qiong, C., Tuzhi, P. and Liju, Y. (1998). Silk fibroin/cellulose acetate membrane electrodes incorporating xanthine oxidase for the determination of fish freshness. *Analytica Chimica Acta*, 369(3), 245-251.
24. Görgülü, M. (2011). *Hipoksantin tayini için polipirol-polivinil sülfonat filme ksantin oksidaz ve ürikaz enzimleri immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-81.
25. Tana, Q.Y., Wangb, N., Yangc, H., Zhangd, L.K., Liub, S., Chenf, L., Liub, J., Zhangd, L., Hub, N.N., Zhaoe, C.J., Zhang, J.Q. (2010). Characterization, stabilization and activity of uricase loaded in lipid vesicles. *International Journal of Pharmaceutics*, 384(1-2), 165-172.
26. Telefoncu, A. (1999). *Biyoreseptör immobilizasyonu, Biyosensörler*. Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu, Kuşadası, 42-61.

27. Okamoto, K., Kawaguchi, Y., Bryan, T., Eger, E. F., Nishino, P. and Nishino, T. (2010). Crystal Structures of Urate Bound Form of Xanthine Oxidoreductase: Substrate Orientation and Structure of the Key Reaction Intermediate. *University of California, United States*, 132(48), 17080-17083.
28. Dinçkaya, E. ve Telefoncu, A.(1999). *Enzim sensörleri, Biyosensörler*. Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu, Kuşadası, 81-139.
29. Arai, G., Takahashi, S., and Yasumori, I. (1996). Xanthine and hypoxanthine sensors based on xanthine oxidase immobilized in poly(mercapto-p-benzoguinone) film. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 410(2), 173-179.
30. Radi, R., Rubbo, H., Bush, K. and Freeman, B.A. (1997). Xanthine Oxidase Binding to Glycysaminoglycans: Kinetics and Superoxide Dismutase Interactions of immobilized Xanthine Oxidase – Heparin Complexes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339, 125-135.
31. Telefoncu, A. (1991). *Biyosensörlere genel bakış, Biyosensörler*. Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu, Kuşadası, 1-9.
32. Ghosh, S., Sarker, D. and Misra, T.N. (1998). Development of an amperometric enzyme electrode biosensor for fish freshness detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 53(1-2), 58–62.
33. Kan, J., Pan, X. and Chen, C. (2004). Polyaniline-uricase biosensor prepared with template process. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(12), 1635–1640.
34. Devi, R., Yadav, S., Nehra, R., Yadav, S. and Pundir, C.S. (2013). Electrochemical biosensor based on gold coated iron nanoparticles / chitosan Composita bound xanthine oxidase for detection of xanthine in fish meat. *Journal of Food Engineering*, 115(2), 207-214.
35. Bal, Ö. (2012). *Biyolojik sıvılardaki glukozun tayini için polipirol filme glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-28.
36. Ateş, M. *Polimerizasyon ve polimerler hakkında genel bilgi*. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, 7-18.
37. Erden, P. E. (2010) . *Ksantin ve ürik asit tayini için farklı medyatörlü modifiye karbon pasta enzim elektrotların hazırlanması*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-25.
38. Gerard, M., Chaubey, A. and Malhotra, B.D. (2002). Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 17(5), 345–359.
39. Çete, S., Yaşar, A. ve Arslan, F. (2007). Immobilization of uricase upon polypyrrole-ferrocenium film. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 35(6), 607-620.

40. Akbulut, U. (1999). *İletken polimerlerle transduser hazırlanması*. Biyosensörler, Telefoncu A, Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu, Kuşadası, 10-16.
41. Pınarbaşı, Z. A. (2012). *Ürikaz enziminin polipirrol-polivinilsülfonat filme immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-24.
42. Karpuz, G.(2013). *Polipirrol–paratoluensülfonat (PPy-pTS) filme ürikaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-78.
43. Xiao, Y., Li, C.M., Yu, S., Zhou, Q., Lee, Vee. S. and Moomhala, S. M. (2007). Synthesis and characterization of p-toluenesulfonate incorporated poly(3,4-ethylenedioxythiophene). *Talanta*, 72(2), 532–538.
44. Sultana, I., Rahman, Md. M., Wang, J., Wang, C., Wallace, G. G. and Liu Hua-Kun (2012). All-polymer battery system based on polypyrrole (PPy)/para (toluene sulfonic acid) (pTS) and polypyrrole (PPy)/indigo carmine (IC) free standing films. *Electrochimical Acta*, 83, 209– 215.
45. Stredonsky, M., Pizzariello, A., Miertus, S. and Suore, J. (2000). Selective and sensitive biosensor for theophylline based on xanthine oxidase electrode. *Analytical Biochemistry*, 258(2), 225-229.
46. Kılınç, E., Erdem, A., Gocgunnec, L., Dalbasti, T., Karaoglan, M. and Ozsos, M. (1998).Butternilk based cobalt phthalocyanine dispersed ferricyanide mediated amperometric biosensor for the determination of xanthine. *Electroanalysis*, 10(4), 273-275.
47. Arora, K., Sumana, G., Saxena, V., Gupta, R.K., Gupta, S.K., Yakhmi, J.V., Pandey, M.K., Chand, S. and Malhotra, B.D. (2007). Improved performance of polyaniline-uricase biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 594(1), 17-23.
48. Zhang, F., Wang, X., Ai, S., Sun, Z., Wan, Q., Zhu, Z., Xian, Y., Jin, L. and Yamamoto, K. (2004). Immobilization of uricase on ZnO nanorods for a reagentless uric acid biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 519(2), 155–160.
49. Wang, Y. and Tong, Li-li (2010). Electrochemical sensor for simultaneous determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on poly (bromocresol purple) modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 150(1), 43-49.
50. Volpe, G. and Mascini, M. (1996). Enzyme sensors for determination of fish freshness. *Talanta*, 43(2), 283-289.
51. Zen, J. M. and Hsu, C. T. (1997). A selective voltammetric method for uric acid detection at Nafion-coated carbon paste electrodes. *Talanta*, 46(6), 1363-1369.

52. Yao, D., Vlessidis, A. G. and Evmiridis, N. P. (2003). Microdialysis sampling and monitoring of uric acid in vivo by a chemiluminescence reaction and an enzyme on immobilized chitosan support membrane. *Analytica Chimica Acta*, 478(1), 23-30.
53. Luong, M.T.J. and Thatipamala, R. (1996). Kinetics and performance of a mediated biosensor for hypoxanthine using deflaus xanthine oxidase. *Analytica Chimica Acta*, 319: 325-333.
54. Basu, A. K., Chattopadhyay, P., Choudhury, U. R. and Chakraborty, R. (2005). Development of an amperometric hypoxanthine biosensor for determination of hypoxanthine in fish and meat tissue. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43(07), 646-653.
55. Thandavan K., Gandhi S., Sethuraman S., Rayappan J. B. B. and Krishnan U. M. (2013). Development of electrochemical biosensor with nano-interface for xanthine sensing – A novel approach for fish freshness estimation. *Food Chemistry*, 139(1-4), 963–969.
56. Yücel, A. (2013). *Çoklu enzim esaslı biyosensör geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 1-14.
57. White, J.S. and White, D.C. (1997). *Source Book of Enzymes*. CRC Press, 85-82, 129-132.
58. Ertan, F. ve Aksöz, E. (2000). *Aspergillus Niger'den Ürikaz Enziminin Üretilmesi ve Aktiviteye Etkili Bazı Faktörlerin Belirlenmesi*. *Turkish Journal of Biology* , 24, 11-23.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : EROL, Ezgi
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 26.08.1986, Ankara
Medeni hali : Bekâr
Telefon : 0 (554) 920 47 84
e-mail : e_erol_86@hotmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/F.B.E.	Devam Ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi	2009
Lise	Çankaya Anadolu Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2009-Halen	Uğur Dershaneleri	Kimya Öğretmeni

Yabancı Dil

İngilizce