

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

13/436

ENZİM İMMOBİLİZASYONUNU TEMEL ALAN
GLUKOZ BİYOSENSÖRLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Yasemin NUMANOĞLU

KİMYA ANA BİLİM DALI

ANKARA
2003

Her hakkı saklıdır

13/436
T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Prof. Dr. Sibel SUNGUR danışmanlığında Yasemin NUMANOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 28 / 2 / 2003 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Muzaffer TALU



Üye

Prof. Dr. Ural AKBULUT



Üye

Prof. Dr. Atilla ÖKTEMER



Üye

Prof. Dr. Kadirhan SUNGUROĞLU

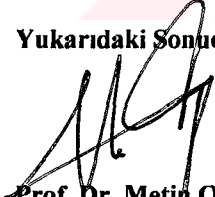


Üye

Prof. Dr. Sibel SUNGUR



Yukarıdaki Sonucu Onaylarım



Prof. Dr. Metin OLGUN
Enstitü Müdürü

ÖZET
DOKTORA TEZİ
ENZİM İMMOBİLİZASYONUNU TEMEL ALAN GLUKOZ
BIYOSENSÖRLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Yasemin NUMANOĞLU

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Sibel SUNGUR

Biyosensör, temel olarak biyolojik ve fizikokimyasal bileşenleri birleştiren ve geniş çeşitliliği olan bir sistemdir. Biyosensörlerde enzimlerin kullanımı elektrotların yüzeyinin immobilize enzim ile kaplanması yöntemiyle gerçekleştirilir. Çalışmada kullanılan glukoz oksidaz enzimi (β -D-Glukoz: Oksijen oksido redüktaz, E.C. 1.1.3.4) moleküler oksijen varlığında β -D-glukozun, hidrojen peroksit ve δ -glukanolaktone dönüşümünü katalizleyen enzimdir.

Bu çalışmada gıda, içecek ve klinik tayinlerde kullanılmak üzere glukoz biyosensörü geliştirilmiştir. Glukoz oksidaz enzimi, jelatine gluteraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılarak çapraz bağlama yöntemine göre immobilize edilmiştir. Immobilizasyonda jelatinin yanında dolgu maddesi olarak poliakrilamid kullanılmıştır. Jelatin ve jelatin-poliakrilamid taşıyıcı sistemleri ile glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu optimize edilerek en uygun biyosensörün geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, serbest enzim, immobilize enzim ve immobilize glukoz oksidaz elektrotları kimyasal ve elektrokimyasal (amperometrik) yöntemler kullanılarak karakterize edilmiş ve sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Sıcaklık, pH, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, tekrar kullanılabilirlik, termal inaktivasyon ve kinetik parameterlerin incelendiği çalışmada ayrıca biyolojik örneklerde bulunabilecek ürik asit biyosensörün tepkisini ne şekilde etkilediği araştırılmıştır.

Bu çalışmada gıda, içecek ve klinik uygulamalarda glukoz tayini amacıyla daha önce literatürde yer almayan yeni bir glukoz biyosensörü geliştirilmiştir. Hızlı, hassas ve kullanımı pratik olan bu biyosensörün maliyeti oldukça düşük olup duyarlılığı değişmeden 51 günlük bir süre boyunca en az 17 kez kullanılabilceği tespit edilmiştir.

2003, 122 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Enzim immobilizasyonu, amperometrik enzim elektrotu, glukoz oksidaz, jelatin, poliakrilamid, gluteraldehit, glukoz biyosensörü, immobilize glukoz oksidaz.

ABSTRACT
Ph. D. Thesis
DEVELOPMENT OF GLUCOSE BIOSENSORS
BASED ON ENZYME IMMOBILIZATION
Yasemin NUMANOĞLU

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry
Supervisor: Prof.Dr. Sibel SUNGUR

Biosensors are systems that mainly combine biological and physicochemical components and also have a wide variety. Enzyme usage in biosensors is accomplished by coating the electrode surface with immobilized enzyme. The enzyme used in this work, glucose oxidase (β -D glucose: oxygen oxidoreductase, EC. 1.1.3.4) catalysis the conversion of β -D glucose to hydrogen peroxide and δ -gluconolactone in the presence of molecular oxygen.

In this work, a glucose biosensor was developed to be used in food, drink and clinical detections. Glucose oxidase was immobilized into gelatine with process polyacrylamide polymer was added to gelatine as filling material. it was aimed to optimise the immobilization of glucose oxidase onto gelatine and gelatine-polyacrylamide support systems to develop the most convenient biosensor.

The free and immobilized enzymes and immobilized glucose oxidase biosensors were characterized using chemical and electrochemical methods (amperometric) and the results were compared. Temperature, pH, cross-linking agent concentration, enzyme concentration, reusability, thermal stability and kinetic active compaunds (uric acid, ascorbic, glycerine, NH_4^+ and NaCl and KCl) on the response of biosensor was also investigated. in this study a new glucose oxidase biosensor, which have not previously been cited in literature, have been developed for determination of glucose in food, drink and clinical application. This fast responding, accurate and easily usable biosensor's production cost is low and can be used 17 times within 51 days without losing its accuracy.

Responding, accurate and easily usable biosensor's production cost is low and can be used 17 times within 51 days without losing its accuracy.

2003,122 pages

Key Words: Enzyme immobilization, amperometric enzyme electrode, glucose oxidase, gelatine, polyacrylamide, glutaraldehyde, glucose biosensor, immobilized glucose oxidase.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın doktora tezi olarak seçilmesi, tezin alt yapısının oluşturulup sistemin kurulması, çalışmanın sonuçlandırılması süresince bilgi, tecrübe ve imkanlarını esirgemeyen, hem master hem de doktora çalışmamda bana yol gösteren, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman unutmayacağım danışmanım sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Sibel SUNGUR'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı) teşekkürlerimi sunarım.

Temelinde sevginin olduğu işlerin üstesinden gelebileceğimi bana öğreten ve desteklerini her zaman hissettiğim sevgili babam İsmet NUMANOĞLU ve sevgili annem Güler NUMANOĞLU'na öğrenciliğim boyunca verdikleri maddi ve manevi destekleri için çok teşekkür ediyorum.

Dayanışmanın gücünü ve bu gücün başarıya dönüşmesini mutlulukla paylaştığım her zaman yanımda olan ve doktora çalışmam boyunca da desteklerini esirgemeyen sevgili ablam Hülya KESKİN, sevgili abim Faruk KESKİN ve sevgili Ecenur'a teşekkür ediyorum.

Tezin yazılımı ve dizgisi sırasında imkanlarını seferber eden ve her zaman yanımda bulduğum sevgili Aleaddin CANDANSAYAR ve kardeşlerim Yeliz CANDANSAYAR ve Deniz NUMANOĞLU 'na destekleri için teşekkür ediyorum.

Doktora tezimin yazım aşamasında yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma sevgili Gülşen KAPUCU, sevgili A.Sinan ÇEVİK'in şahsında teşekkür ediyorum.

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Araştırma Fon Müdürlüğü tarafından 2000-0705035 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Yasemin Numanoğlu
Ankara, Şubat 2003

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. Enzim Biyosensörleri (Enzim Elektrotları).....	5
2.1.1. İmmobilizasyon metodları.....	5
2.1.1.1. Adsorpsiyon.....	6
2.1.1.2. Tutuklama.....	7
2.1.1.3. Kovalent Bağlama.....	9
2.1.1.4. Çapraz Bağlama.....	11
2.1.1.5. Koenzim İmmobilizasyonu.....	12
2.1.1.6. Aracı İmmobilizasyonu	12
2.1.2. İmmobilize enzim elektrotlarının hazırlanması.....	13
2.1.3. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması.....	14
2.1.3.1. Amperometrik Esaslı Enzim Sensörleri.....	15
2.1.3.1.1. Birinci Nesil Enzim Elektrotları.....	18
2.1.3.1.2. İkinci Nesil Enzim Elektrotları.....	19
2.1.3.1.3. Üçüncü Nesil Enzim Elektrotları.....	21
2.1.3.2. Potansiyometrik esaslı enzim sensörleri.....	22
2.1.3.3. İletkenlik esaslı enzim sensörleri	24
2.1.4. Enzim biyosensörlerinin performansını etkileyen faktörler.....	25
2.1.5. Enzim biyosensörlerinin uygulamaları.....	29
2.1.5.1. Gıda Endüstrisinde uygulamalar.....	29
2.1.5.2. Tıpta uygulamalar.....	31
2.2. Glukoz Biyosensörleri.....	31
2.3. Glukoz Oksidaz Enzimi ile İlgili Kaynak Araştırması.....	35
2.4. Çalışmada Kullanılan Enzim, Substrat, Taşıyıcılar ve Çapraz Bağlayıcıların Özellikleri.....	37
2.4.1. Enzim: Glukoz Oksidaz.....	41
2.4.2. Substrat: β -D-Glukoz.....	41
2.4.3. Taşıyıcı.....	41
2.4.3.1. Jelatin.....	41
2.4.3.2. poliakrilamid.....	41
2.5. Çalışmanın Amacı.....	46
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	48
3.1. Materyal.....	48
3.2. Yöntem.....	49

3.2.1. Elektrokimyasal ölçüm.....	49
3.2.2. Enzim aktivitesi tayini ve immobilizasyon.....	51
3.2.2.1. Kimyasal metot ile serbest GOD aktivitesi tayini.....	51
3.2.2.2. Elektrokimyasal metot ile serbest GOD aktivitesi tayini.....	52
3.2.2.3. Jelatin Glukoz oksidaz enzim elektrotlarının hazırlanması.....	52
3.2.2.4. Jelatin-poliakrilamid Glukoz oksidaz enzim elektrotlarının hazırlanması.....	53
3.2.2.5. Enzim elektrotlarının kimyasal metot ile GOD aktivitesinin tayini.....	54
3.2.2.6. Enzim elektrotlarının GOD aktivitesinin elektrokimyasal metot ile tayini.....	54
3.2.3. Serbest ve immobilize glukoz oksidaz enzimin özelliklerinin incelenmesi	55
3.2.3.1. Enzim aktivitesi üzerine çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun etkisi.....	55
3.2.3.1.1 Kimyasal yöntem.....	55
3.2.3.1.2. Elektrokimyasal yöntem.....	55
3.2.3.2. Poliakrilamid ilavesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi... ..	56
3.2.3.2.1 Kimyasal yöntem.....	56
3.2.3.2.2. Elektrokimyasal yöntem.....	56
3.2.3.3. Jel miktarının GOD aktivitesi üzerine etkisi.....	56
3.2.3.3.1. Kimyasal Aktivite.....	56
3.2.3.3.2. Amperometrik aktivite üzerine jel miktarının etkisi... ..	57
3.2.3.4. Aktivite üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi.....	57
3.2.3.4.1. Kimyasal yöntem.....	57
3.2.3.4.2 Elektrokimyasal yöntem	57
3.2.3.5. Aktivite üzerine pH' ın etkisi.....	58
3.2.3.5.1 Kimyasal yöntem.....	58
3.2.3.5.2 Elektrokimyasal yöntem.....	58
3.2.3.6. Aktivite üzerine sıcaklığın etkisi.....	59
3.2.3.6.1. Kimyasal yöntem.....	59
3.2.3.6.2. Elektrokimyasal yöntem	59
3.2.3.7. Serbest glikoz oksidaz ve immobilize enzim elektrotlarının termal inaktivasyonu.....	60
3.2.3.8. Aktivite üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	60
3.2.3.8.1 Kimyasal yöntem.....	60
3.2.3.8.2. Elektrokimyasal yöntem.....	61
3.2.3.9. Elektroaktif bileşiklerin enzim elektrotlarının amperometrik aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması.....	61

3.2.3.10. Glukoz oksidaz enzim elektrotlarının tekrar kullanımı...	62
3.2.3.10.1. Kimyasal yöntem.....	62
3.2.3.10.2. Enzim elektrotlarının tekrar kullanılabilirliği.....	62
3.2.3.11. Enzim elektrotlarının Depolama Kararlılığı.....	63
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	64
4.1 Enzim Aktivitesi Üzerine Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Etkisi.....	64
4.2. Amperometrik Aktivite Üzerine Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Etkisi.....	64
4.3. Poliakrilamit İlavesinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	67
4.3.1. Kimyasal yöntem.....	67
4.3.2. Amperometrik aktivite üzerine poliakrilamit konsantrasyonunun etkisi.....	67
4.4. Jel Miktarının GOD Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	70
4.4.1. Kimyasal Aktivite.....	70
4.4.2. Amperometrik Aktivite Üzerine jel miktarının etkisi.....	70
4.5. Aktivite Üzerine Enzim Konsantrasyonunun Etkisi.....	73
4.5.1. Kimyasal yöntem.....	73
4.5.2. Amperometrik aktivite üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi.....	73
4.6. Aktivite Üzerine pH' ın Etkisi.....	79
4.7. Elektrokimyasal yöntem.....	79
4.8. Aktivite Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	85
4.9. Amperometrik Aktivite Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	85
4.10. Serbest glukoz oksidaz ve immobilize enzim elektrotlarının termal inaktivasyonu.....	90
4.11. Aktivite Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	93
4.12 Amperometrik Aktivite Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	94
4.13 Elektroaktif Bileşiklerin Enzim Elektrotlarının Amperometrik Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	101
4.14. Glukoz oksidaz elektrotlarının tekrar kullanımı.....	104
4.14.1. Kimyasal yöntem.....	104
4.14.2. Amperometrik aktivite üzerine tekrar kullanımın etkisi ...	104
4.15. Enzim Elektrotlarının Depolama Kararlılıkları.....	109
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	110
6. KAYNAKLAR.....	117

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Antikor esaslı bir immunosensörün şematik olarak etkileşimi	3
Şekil 1.2 Genel olarak bir biyosensör modeli	3
Şekil 2.1 İmmobilizasyon metotları (Fraile, J.M 2002).....	5
Şekil 2.2. Fiziksel adsorpsiyonla enzim immobilizasyonu.....	7
Şekil 2.3. Enzim tutuklanması a) Mikrokapsülasyon b) Kafes tutuklanması	7
Şekil 2.4. Daldırma metodu ile elektrot yüzeyinin kaplanması	13
Şekil 2.5 Direk bağlama yöntemiyle elektrot yüzeyinin kaplanması.....	13
Şekil 2.6 Aeresol kullanımı	14
Şekil 2.7 Enzimin direk olarak (aracısız) substrat ile elektriksel etkileşimi.	19
Şekil 2.10 Glukozun oksidasyon reaksiyonunun şematik olarak gösterilimi	33
Şekil 2.11 Bir glukoz biyosensörünün şematik gösterilimi.....	33
Şekil 2.12. GOD haloenzimi.....	38
Şekil 2.13. Glukoz oksidaz altbiriminin yapısı.....	39
Şekil 2.14. Sulu çözeltide D-glukozun farklı yapıları.....	41
Şekil 2.15 Tip A ve tip B jelatininin pH diyagramı.....	43
Şekil 4.1. Jelatin-GOD immobilize enzim aktivitesi üzerine çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun etkisi.....	65
Şekil 4.2. Jelatin-GOD enzim elektrotlarının amperometrik aktivitesi üzerine çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun etkisi	66
Şekil 4.3. Poli akrilamid ilavesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi	68
Şekil 4.4. Amperometrik aktivite üzerine poliakrilamid konsantrasyonunun etkisi.....	69
Şekil 4.5. GOD aktivitesi üzerine jel miktarının etkisi.....	71
Şekil 4.6 Amperometrik aktivite üzerine jel miktarının etkisi.....	72
Şekil 4.7 Aktivite üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi	75
Şekil 4.8 Serbest enzim amperometrik aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi	76
Şekil 4.9 PAA/j-GOD Amperometrik aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi	77
Şekil 4.10 PAA/j-GOD Sensörü için respon süresi enzim..... konsantrasyonu ilişkisi	78
Şekil 4.11. Serbest GOD aktivitesi üzerine pH etkisi	81
Şekil 4.12. pAA/j –GOD aktivitesi üzerine pH etkisi.....	82
Şekil 4.13. Amperometrik Serbest aktivite üzerine pH etkisi.....	83
Şekil 4.14. PAA/j–GOD sensörlerinin amperometrik aktivitesi üzerine pH etkisi.....	84
Şekil 4.15 Serbest GOD Aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi	86

Şekil 4.16 PAA/j-GOD aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	87
Şekil 4.17 Serbest GOD amperometrik aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	88
Şekil 4.18 PAA/j-GOD Amperometrik aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	89
Şekil 4.19 Serbest GOD enzimi ve j-GOD ile pAA/j-GOD enzim elektrotlarının termal inaktivasyonu.....	92
Şekil 4.20 Serbest GOD Kimyasal Substrat Çalışması Lineveawer Burk grafığı.....	96
Şekil 4.21 pAA/j-GOD elektrotlarının aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi Lineveawer Burk grafığı.....	97
Şekil 4.22 Serbest Glukoz oksidaz Amperometrik aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi, Lineveawer-Burk grafığı	98
Şekil 4.23 PAA/j-GOD Amperometrik aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi, Lineveawer Burk Grafığı.....	99
Şekil 4.24 PAA/j-GOD Sensörtlü için respons süresi glukoz konsantrasyonu ilişkisi	100
Şekil 4.25 PAA/j-GOD ve kör (pAA/j) sensörleri üzerine elektroaktif bileşiklerin etkisi	102
Şekil 4.26. PAA/j-GOD ve kör (pAA/j) sensörlerinin relatif responsları.	103
Şekil 4.27. pAA/j-GOD ve j-GOD Elektrotlarının enzim aktivitesi üzerine tekrar kullanımın etkisi	105
Şekil 4.28 Farklı enzim konsantrasyonundaki elektrotların tekrar kullanımlarının enzim aktivitesine etkisi	106
Şekil 4.29 pAA/j-GOD ve j-GOD sensörlerinin amperometrik aktiviteleri üzerine tekrar kullanımın etkisi.....	107
Şekil 4.30 Farklı enzim konsantrasyonundaki elektrotların tekrar kullanımlarının enzim aktivitesine etkisi	108

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 İmmobilizasyon metotlarının özelliklerinin karşılaştırılması	6
Çizelge 2.2 Kovalent bağlama için bazı destek maddeleri	10
Çizelge 2.3. Enzim immobilizasyonunda kullanılan çapraz bağlanma reaktifleri.....	11
Çizelge 2.4 Amperometrik biyosensörler	18
Çizelge 2.5 Potansiyometrik biyosensörler	24
Çizelge 2.6 Gıda ve içecek endüstrisinde kullanılan amperometrik biyosensörler	30
Çizelge 2.7 Glukoz oksidaz enziminin diğer karbonhidratlarla β -D-glukopiranoz spesifikliğinin karşılaştırılması	39
Çizelge 2.8 Jelatinin gıda endüstrisinde kullanımını	44
Çizelge 2.9 Katı poliakrilamidin fiziksel özellikleri.....	45
Çizelge 4.1. Jelatin-GOD immobilize enzim aktivitesi üzerine çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun etkisi	65
Çizelge 4.2. Jelatin-GOD Enzim elektrotlarının amperometrik aktivitesi..	66
üzerine çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun etkisi.....	66
Çizelge 4.3. Poliakrilamid ilavesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi	68
Çizelge 4.4.Amperometrik aktivite üzerine poliakrilamid konsantrasyonunun etkisi.....	69
Çizelge 4.5. GOD Aktivitesi üzerine jel miktarının etkisi.....	71
Çizelge 4.6. Amperometrik aktivite üzerine jel miktarının etkisi.....	72
Çizelge. 4.7 Aktivite üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi	75
Çizelge 4.8 Serbest enzim amperometrik aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi.....	76
Çizelge 4.9 PAA/j-GOD Amperometrik aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi.....	77
Çizelge 4.10 PAA/j-GOD Sensörü için respon süresi enzim konsantrasyonu ilişkisi.....	78
Çizelge 4.11. Serbest GOD aktivitesi üzerine pH etkisi	81
Çizelge 4.12. PAA/j –GOD aktivitesi üzerine pH etkisi.....	82
Çizelge 4.13 Amperometrik Serbest aktivite üzerine pH etkisi.....	83
Çizelge 4.14 PAA/j –GOD Sensörlerinin amperometrik aktivitesi üzerine pH etkisi	84
Çizelge 4.15 Serbest GOD Aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi	86
Çizelge 4.16 PAA/j-GOD Aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	87
Çizelge 4.17 Serbest GOD Amperometrik aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	88
Çizelge 4.18 PAA/j-GOD Amperometrik aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	89

Çizelge 4.19 Serbest GOD enzimi ve j-GOD ile pAA/j-GOD enzim elektrotlarının termal inaktivasyonu.....	92
Çizelge 4.20. Serbest glukoz oksidaz aktivite-substrat konsantrasyonu ilişkisi.....	96
Çizelge.4.21 AA/j-GOD elektrotlarının aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	97
Çizelge 4.22. Serbest glukoz oksidaz amperometrik aktivite-substrat konsantrasyonu ilişkisi.....	98
Çizelge 4.23 PAA/j-GOD Amperometrik aktivite-substrat konsantrasyonu ilişkisi.....	99
Çizelge 4.24 PAA/j-GOD Sensörü için respons süresi glukoz konsantrasyonu ilişkisi.....	100
Çizelge 4.25. Çıplak platin, pAA/j-GOD ve kör (pAA/j) sensörleri üzerine elektroaktif bileşiklerin etkisi.....	102
Çizelge 4.26. PAA/j-GOD ve kör (pAA/j) sensörlerinin relatif responsları.....	103
Çizelge 4.27. pAA/j-GOD ve j-GOD elektrotlarının enzim aktivitesi üzerine tekrar kullanımın etkisi.....	105
Çizelge 4.28. Farklı enzim konsantrasyonundaki elektrotların tekrar kullanımları.....	106
Çizelge 4. 29 pAA/j-GOD ve j-GOD sensörlerinin amperometrik aktiviteleri üzerine tekrar kullanımın etkisi.....	107
Çizelge 4.30 Farklı enzim konsantrasyonundaki elektrotların tekrar kullanımları.....	108
Çizelge 4.31 PAA/j-GOD elektrotlarının depolama kararlılıkları.....	109

1.GİRİŞ

Biyosensör, biyolojik ve fizikokimyasal bileşenlerin birleşmesi temeline dayanan ve geniş çeşitliliği olan analitiksel bir sistemdir. Gıda endüstrisi, tıp, çevre analizi, savunma sanayi ve genel endüstriyel işlemlerde kullanımı yaygındır.

Biyosensörlerin oluşum süreci 1950 li yıllarda O_2 miktarının bir elektrot ile izlenmesiyle başlamıştır. 1962 yılında Clark ve Lyons Glukoz Oksidaz (GOD) enzimini O_2 elektrotu ile birleştirilerek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır. Böylece yeni bir analitik sistem oluşmuştur, bu sistem bir yandan biyokomponentin (enzim) yüksek spesifikliğini diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur.

Canlılar teknologların hayal bile edemeyeceği duyarlılık performansı gösterirler; bazı köpeklerin koku almaları insanlardan 100.000 kat daha duyarlıdır, yılan balıkları tonlarca su içerisine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi derhal algırlar. İnsan vücudunda ise, dış ortamdaki mekanik, fiziksel ve kimyasal gibi çeşitli enerji değişiklikleri özel alıcılar içeren sinir uçları veya özel hücreler tarafından farkedilir. Örneğin, 400-760 nm arasındaki elektromanyetik dalgalar gözdeki alıcıları etkiler ve ışık hissedilir, termal alıcılar ısı enerjisindeki değişiklikleri, kemoalıcılar ise tat alma, koku duyma, kandaki oksijen değişiklikleri gibi kimyasal enerji değişikliklerini farkedirler.

Canlıların bu uyarıları algılamasını mümkün kılan biyolojik maddelerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensörlerin doğmasına yol açmıştır. Biyosensörlerde biyolojik aktif materyal olarak enzimlerin yanısıra doku kültürleri, mikroorganizmalar, organeller, antikorlar ve nükleik asitler de kullanılabilir. Ölçme tekniğine göre, amperometrik, potansiyometrik, termal, piazoelektrik, akustik veya optik sensörler olarak adlandırılırlar.

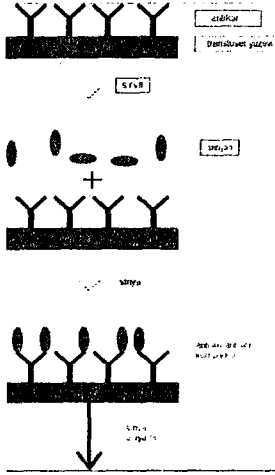
Biyosensörlerin yüksek spesifikliğinin yanısıra, renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir konsantrasyon aralığında doğrudan ölçüme olanak sağlamak gibi üstünlükleri de vardır.

Biyolojik aktif materyal, genellikle biyoreseptör olarak adlandırılır. Bunların içinde en yaygın kullanılanlar enzimler ve antikorlardır. Enzimler

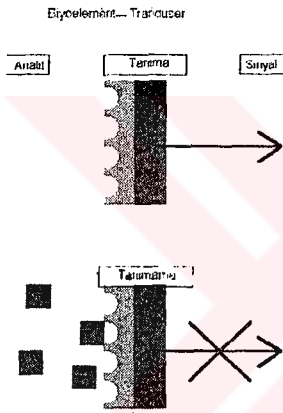
biyosensörlerde kullanılan ilk biyokomponenttir. Biyosensörleri çalışma prensiplerine göre biyoaffinite sensörler ve biyokatalitik sensörler olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür.

Biyoaaffinite sensörlerinde, antijenler ve hormonların moleküler olarak tanımlanmaları için boyalar, lektinler, antikorlar veya hormon reseptörleri ve glikoproteinler kullanılmaktadır (Şekil.1.1). Biyokatalitik sensörlerde ise; saf enzimler, organeller, doku kesitleri veya mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen moleküler değişimlere analitlerin kimyasal dönüşümü eşlik eder. Bu nedenle bu tip sensörler “katalitik veya metabolizma sensörleri” olarak adlandırılır. Genel olarak biyosensör, immobilize edilmiş biyolojik veya biyokimyasal bir bileşenin, biyokimyasal etkileşime sonucunda uygun bir sinyal ileticisi (transduser) aracılığıyla, analitin miktar veya aktivitesi ile orantılı bir sinyalin oluşmasını sağlayan cihazlar veya sistemler olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.2)

Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir. Enzimler kullanılarak hazırlanan elektrot sistemlerine “enzim elektrotları” veya “enzim biyosensörleri” denir. Enzim elektrotları, biyolojik bileşen (enzim) ile sinyal ileticisinin kombine olduğu sistemlerdir (Telefoncu 1999).



Şekil 1.1 Antikor esaslı bir immunosensörün şematik olarak etkileşimi



Şekil 1.2 Genel olarak bir biyosensör modeli

Bir enzim biyosensörü hazırlanmasında aşılması gereken en önemli sorun uygun enzim ile transduserin (sinyal iletici) kombinasyonu aşamasıdır. Bu kombinasyon işlemi "enzim immobilizasyonu" olarak tanımlanmaktadır. Immobilizasyon işlemi için çeşitli yöntemler uygulanabilir, hangi yöntemin kullanılacağı seçilen transduser ve enzime göre belirlenmektedir

(immobilizasyon enzimin kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlamaktadır).

İmmobilizasyon, biyolojik olarak aktif maddelerin (enzim, hücre, hormon) katalitik aktivitelerini kaybetmeksizin defalarca ve sürekli kullanılması amacıyla çeşitli taşıyıcılara lokalizasyonudur. Enzim immobilizasyonunda bazı önemli hususlara dikkat edilmesi gerekmektedir. İmmobilizasyonda enzim aktivitesindeki kaybı önleyecek bağlanma metodu seçilmelidir. Bunu sağlamak için enzimin aktif bölgesi ve bu bölgedeki gruplar dikkate alınmalıdır.

Bazı durumlarda aktif bölgenin korunması amacıyla, aktif bölge bağlanma sırasında daha sonra uzaklaştırılabilecek koruyucu gruplar vasıtasıyla korunabilir. İmmobilize enzim yüzeyi enzimin kendi içinde hidrojen bağı ve elektron geçiş kompleksinin oluşmasına izin verecek kompozisyonunu korumalıdır, çünkü bu enzimin termal kararlılığı korumak için gereklidir. Enzimin ve enzim yüzeyinin mikro çevresindeki değişiklikler serbest enzimin optimum pH 'ından 2 pH birimi kadar bir değişikliğe sebep olabilir.

Enzim immobilizasyonu ilk olarak 1961 yılında Nelson ve Griffen tarafından gerçekleştirilmiştir. İlk ticari proses ise 1967 yılında immobilize amino açilaz kullanılarak D ve L-aminoasitlerin aydınlatıldığı procestir. İmmobilizasyonun optimizasyonu biyosensörlerin sürekli kullanımı için çok önemlidir. Çünkü bu koşullar enzim biyosensörlerinde karakteristik parametreleri etkilemektedir.

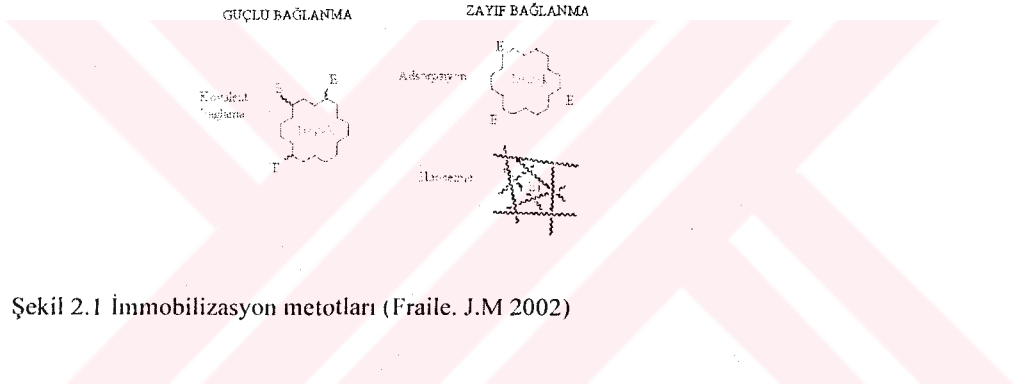
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Enzim Biyosensörleri (Enzim Elektrotları)

Genel anlamda bakıldığında diğer biyosensörlerde olduğu gibi enzim biyosensörleri de biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm sistemlerinden oluşmuştur. Enzim biyosensörlerinde biyoaktif tabakada biyolojik aktif materyal olarak enzimler yer alır. Bütün enzim biyosensörlerinde enzim immobilize formdadır ve biyosensörün belirli bir bölgesinde yer alır.

2.1.1. İmmobilizasyon metodları

Günümüzde çeşitli immobilizasyon metodları geliştirilmiştir. Biyosensör sistemlerinde enzimlerin immobilizasyonu için dört metot yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar, adsorbsiyon, tutuklama, kovalent bağlanma ve çapraz bağlamadır (Şekil 2.1) Çizelge 2.1'de ise immobilizasyon metodlarının özellikleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



Şekil 2.1 İmmobilizasyon metodları (Fraile. J.M 2002)

Çizelge 2.1 İmmobilizasyon metotlarının özelliklerinin karşılaştırılması

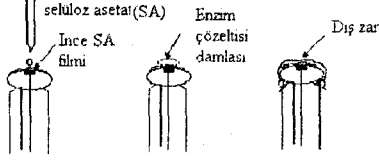
Özellikler	Adsorpsiyon	Tutuklama	Kovalent bağlama	Çapraz bağlama
Matriks maddesi	<ul style="list-style-type: none"> •iyon-değiştirici reçine •aktif kömür •silika jel •kil •poröz cam 	<ul style="list-style-type: none"> •alginat •karageenan •kolojen •poliakrilamit •jelatin •silikon kauçuk •poliüretan 	<ul style="list-style-type: none"> •agaroz •seluloz •PVC •iyon değiştirici reçine •poröz cam 	Fonksiyonel olarak inert Proteinler (BSA,jelatin)
Bağlanmanın doğası	Tersinir, pH'a göre değişken, iyonik şiddetin yüksek olmasıyla enzim ayrılabilir	Fiziksel hapsedime	Kimyasal bağlama	<ul style="list-style-type: none"> •gluteraldehit •bisizosiyanat •bis diazobenzidin ile çapraz bağlanma
Enzim yükleme	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek
Enzim sızıntısı	Çok	Orta	Çok az	Az
Aktivite kaybı	İhmal edilebilir	İhmal edilebilir	Önemli	Çok az
Maliyet	Ucuz	Ucuz	Pahalı	Ucuz

2.1.1.1 Adsorpsiyon

İmmobilizasyonda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Genelde enzim çözeltisine yüzeyi membran veya film ile kaplanmış olan transduser daldırılır ve belirli bir süre beklenir (Şekil 2.2). Membran veya film immobilize edilecek biyokimyasal aktif materyale göre hidrofilik veya hidrofobik karakterde seçilebilir. Enzimler için daha çok hidrofilik membranlar kullanılır. Adsorpsiyon işlemi sonunda serbest enzim çözünmeyen taşıyıcı üzerinden yıkanarak uzaklaştırılır. Adsorpsiyon verimi, pH, sıcaklık, çözücünün türü, iyonik göç, biyokomponentler ve adsorbanın konsantrasyonu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. En çok kullanılan adsorbanlar; selüloz asetat membranları, polistiren, polivinil klorür ve silikadır.

Metodun avantajı, immobilize sistemin hazırlanmasının kolay ve enzim aktivitesindeki azalmanın minimum düzeyde olmasıdır. Ayrıca farklı yüklerde ve büyüklükte taşıyıcıların seçilebilmesi ile birden fazla enzimin aynı anda immobilizasyonunun gerçekleştirilebilmesidir.

Metodun dezavantajı ise, adsorpsiyonun tersinir bir olay olması nedeniyle verimin düşük olmasıdır.



Şekil 2.2. Fiziksel adsorpsiyonla enzim immobilizasyonu

2.1.1.2. Tutuklama

Tutuklama metodu, enzimin polimer örgüsü veya yarı geçirgen zarlar içerisine hapsedilmesi olmak üzere iki şekilde gerçekleşir, bunlardan birisi mikrokapsülasyon diğeri de kafes tutuklanmasıdır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Enzim tutuklanması a) Mikrokapsülasyon b) Kafes tutuklanması

a) Mikrokapsülasyon: Bu yöntem enzimlerin yarı geçirgen zarlar içerisine tutuklanması ile gerçekleştirilir. Özel olarak hazırlanmış olan bu zarlardan

enzimler dışarı çıkamazken substrat ve ürünün hareketi serbesttir. Kapsül zarının kalınlığı ve geçirgenliği kapsülün oluşum zamanına, organik çözücünün kompozisyonu, konsantrasyonu ve kullanılan bileşiklerin doğasına bağlıdır.

b) Kafes tutuklanması: Enzimler, organeller, hücreler ve antikorlar için uygulanabilen bir yöntemdir. Bu yöntem, biyokimyasal materyallerin suda çözünmeyen çapraz bağlı polimer örgüsü içerisinde tutuklanması şeklinde gerçekleştirilir. Bu şekilde biyomoleküller polimerin örgü yapısı içinde fiziksel olarak tutuklanmakta ve dışarı çıkamamaktadır. Substrat yapının içine girebilmekte ve katalitik reaksiyon sonucunda oluşan ürün yine örgü yapısının dışına difüzlenebilmektedir.

Metodun avantajı, diğer fiziksel tutuklama metodlarında olduğu gibi enzimde herhangi bir kimyasal değişiklik meydana gelmez, buna bağlı bir aktivite azalması olmaz.

Metodun dezavantajları ise, substrat ve ürünün serbest olarak geçişinin mümkün olabilmesi için sadece düşük molekül ağırlıklı substratların katalitik reaksiyonlarında bu metodun kullanılabilmesi ve çapraz bağlı polimer örgüsü arasından enzimin sızma ihtimalinin olmasıdır.

Elektrokimyasal polimerizasyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu:

Enzim, monomer ve sulu çözelti içeren elektrokimyasal hücre içerisinde gerçekleştirilmektedir. Elektrot yüzeyinde polimerin birikmesi sırasında enzim immobilize olmaktadır. Reaksiyon pH, sıcaklık gibi şartların enzim aktivitesini etkilemeyecek nitelikte ılımlı olduğu sulu çözelti içerisinde belli potansiyel aralığında gerçekleşmektedir. Potansiyelin değiştirilmesi ile elektrot yüzeyinde polimer birikiminin ve tutuklanan enzim miktarının kontrol edilebilmesi ve işlemin kolaylığı bu metodun avantajlarındandır.

Son yıllarda elektrokimyasal yöntem ile enzim immobilizasyonunda; polipirol, polianilin, politiyofen ve poli indol gibi iletken polimerler taşıyıcı olarak tercih edilmektedir.

2.1.1. 3 Kovalent bağlama

Enzim veya diğ er biyomolek uller ile suda  oz nmeyen taşıyıcı molek ul arasında kovalent bağ oluşumunu içermektedir.

Bu enzim ile suda  oz nmeyen polimerin fonksiyonlu grupları arasında en az bir bağ oluşumu ile gerçekleşmektedir. Enzimdeki bu fonksiyonlu grupların en  onemlileri; amino grupları lizin amino asitinden, karboksil grupları ise L-aspartat ve L-glutamat amino asit kalıntılarından gelmektedir. Amino grupları ile kovalent bağlama aldehit, diazonyum tuzları, izosiyanatlar gibi a ilasyon ve alkilasyon yapan reaktiflerle gerçekleştirilebilmektedir. Karboksil grupları amino gruplarına nazaran daha az reaktif gruplardır. Sadece birkaç katı destek ile kovalent bağlanma yapılabilir. Bunlardan en çok bilinenler, alkilamin grupları ile enzimin bağlanma reaksiyonudur, bu bağlanma için en çok kullanılan reaktif disikloheksil karbodiimittir.

Enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilecek en  onemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için essensiyel olan aminoasitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların bağlanma sırasında sterik olarak rahatsız edilmemesidir. Hidrolaz enzimleri dışındaki enzimler için kofaktörün de immobilizasyonu gereklidir.

Kovalent bağlanmada destek maddesinin doğası immobilizasyonda kullanılacak enzim için çok önemlidir. Destek maddeleri, inorganik, organik veya biyolojik olmak  zer 3 grupta incelenmektedir, bazı örnekler  izelge 2.2' de listelenmiştir.

Çizelge 2.2. Kovalent bağlanma için bazı destek maddeleri

Modifiye selüloz	Silika
Dekstran	Kum
Sephadex	Silika reçine
Hidroksiapatit	Polistiren
Alümina	Akrilikler
Aktif kil	Naylon
Baryum stearat	Sentetik poliaminoasit
Nikel olksit	Suni protein membranı
Çelik (TiO ₂ ile kaplı)	Hücre duvarı
Magnetik parçalar(magnetik Fe ₃ O ₄)	Hücre memebbranları
Cam	Cam pamuğu

Özel amaçlar için hazırlanan bir immobilize sistemde uygun desteğin seçimi çok önemlidir. Analitik amaçlar için immobilize sistemlerin hazırlanmasında da özel destek materyalleri seçilmelidir. Özellikle immobilize enzim birçok tayinde kullanılacaksa bu oldukça önemlidir. Ayrıca destek materyali analiz ortamındaki herhangi bir bileşene (örneğin; serumdaki proteazlarla) ve bakteri etkisine karşı inert olmalıdır. Örneğin cam ve naylon gibi destekler birçok uygulama için mükemmel bir inertlik gösterirken, agaroz ve selüloz gibi destekler ise analitiksel çalışmalar için problemlidir.

Destek materyallerinin çoğu immobilizasyondan önce aktive edilmelidir. Örneğin, metal elektrotun yüzeyi genellikle hidroksil gruplarıyla oksitlenir, meydana gelen bu gruplar aminopropil etoksilan gibi silanize reaktiflerin yüzeyindeki amino gruplarıyla etkileşebilir. Grafit desteklerin oksidasyon derecesi yüzeydeki karboksil gruplarının elektrokimyasal oksidasyonu ile artırılabilir.

Bu grupların proteine bağlanması disikloheksilkarbodiimit reaktif vasıtasıyla gerçekleşir. Eğer bağlanma reaksiyonu kontrol edilebilirse bu immobilizasyon işlemi elektrot yüzeyinde tek enzim tabakası ile sonuçlanır ve bu substratın hızlı difüzyonunu sağlar.

Gluteraldehit gibi bifonksiyonel aldehit grupları bulunduran çapraz bağlayıcı reaktifler ile kovalent bağlama en yaygın olanıdır. Bu reaksiyonun

tamamı oda sıcaklığında, Gluteraldehit ile proteinin sulu çözeltisinde meydana gelebilir. Enzimlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonu, enzimin pH, iyon şiddeti ve sıcaklık değişimlerine karşı yüksek bir direnç kazanması ve defalarca kullanılabilmesi gibi avantajlar sağlar. Enzimde belirli bir aktivite kaybı ise metodun dezavantajıdır.

2.1.1. 4. Çapraz bağlama

Çapraz bağlama yöntemi ile enzimlerin immobilizasyonu; tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde gerçekleşir. Enzim moleküllerinin birbirleriyle veya taşıyıcı matriksindeki bazı fonksiyonlu gruplar ile çapraz bağlanması şeklinde meydana gelir. Bu bağlanmalar bifonksiyonel reaktiflerle veya iki farklı fonksiyonel grup içeren reaktiflerle meydana gelir.

Sonuç olarak, bir enzim molekülünün diğerine bağlanması ile enzim moleküllerinin geniş bir matriksi oluşur. Eğer destek materyali yüzeyinde fonksiyonel gruplara sahipse enzim molekülleri taşıyıcıdaki bu gruplara kovalent olarak bağlanır Çapraz bağlayıcı reaktiflerin listesi çizelge 2.3 de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Enzim immobilizasyonunda kullanılan çapraz bağlanma reaktifleri

A: İki tane aynı fonksiyonlu grubu	B: İki farklı fonksiyonlu grubu
bulunanlar	bulunanlar
Gluteraldehit, Hekzadiazamin	Trikloro 5- triazin
1,5 difloro 2,4 dinitro benzen	3-metoksidifenilmetan-4.4
Bisdiazobenzidin-2,2 dinitrobenzen	diizosiyanat
Difenil 4,4'-ditiyosiyanat-2,2'-disülfonik asit	Toluen 2 izosiyanat-4 izosiyanat
Fenol 2,4- sülfonik asit	
Hekza metilen disiyanat	

Bu reaktiflerden gluteraldehit en çok kullanılan reaktiftir.

2.1.1. 5. Koenzim İmmobilizasyonu

Apoenzime oldukça sağlam bağılı grupların (örneğin, GOD'a bağılı FAD gibi) ayrıca immobilizasyonu gerekmez. Enzim immobilize edildiğinde bu prostetik grup kendiliğinden immobilize edilmiş olur. Ancak koenzim durumundakiler (NAD^+ , $NADP^+$, ATP, ADP) diyaliz ile apoenzimden kolayca uzaklaşabildiklerinden ayrıca immobilizasyonları gerekir. Koenzim immobilize edilmezse biyokimyasal reaksiyon koenzim üzerinden yürüdüğü için bir enzimatik reaksiyon gerçekleşmez. Koenzimler küçük moleküller olduklarından tutuklama yöntemi ile immobilizasyonları mümkün değildir. Ayrıca immobilizasyondan sonra koenzimin rejenerasyonunun gerçekleşeceği, apoenzimin aktif merkezine ulaşabilecek kadar hareket serbestliğine sahip olması gerekmektedir.

2.1.1. 6. Aracı İmmobilizasyonu

Aracılar oksidoredüktaz enzimlerinin koenzimlerinin rejenerasyonunda önemli rol oynarlar. Enzim çözünmüş formda değilse koenzimin hareket serbestliği azalır ve elektronların elektrot ve koenzim arasında taşınması için bir aracıya gereksinim duyulur. Aracının gerekli fonksiyonu gösterebilmesi için diğer bazı koşulları da sağlaması gerekir.

- Tersinir heterojen kinetik göstermeli
- indirgenmiş koenzimler ile hızlı reaksiyon vermeli
- yükseltgenmiş ve indirgenmiş formları kararlı olmalı
- rejenerasyon potansiyeli düşük ve pH'tan bağımsız olmalı
- *in vivo* uygulamalar için toksik olmamalıdır.

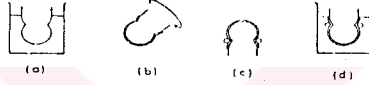
Ferrosen yukarıda belirtilen tüm şartları sağlamaktadır, fakat yükseltgenmiş formu maalesef kısmen çözünmektedir.

Aracılar inert veya elektroaktif polimer ile immobilize edilir. İyon değiştirici polimerler (Nafyon) veya iletken polimerler (polipirrol, polianilin, polifenol ve polindol gibi) bu amaçla kullanılır. Bu polimerler elektrokimyasal polimerizasyon ile hazırlanmaktadır.

2.1. 2. İmmobilize enzim elektrotlarının hazırlanması

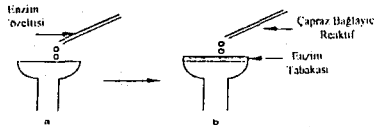
Uygulamada değişik yöntemler kullanılmaktadır; ya polimerizasyon doğrudan transduser yüzeyinde oluşturulup bir film elde edilir, veya önceden hazırlanan polimer transduser yüzeyine uygulanır. Transduser hazırlama teknikleri; daldırma, direk bağlama, aerosol kullanımı ve membran kullanımıdır.

Daldırma : Elektrot önce enzim ve reaktif polimeri veya enzim, inert bir protein ve çapraz bağlayıcı reaktifi içeren karışıma daldırılır ve elektrot kendi ekseninde etrafında homojen bir enzim tabakası elde edilecek şekilde döndürülür. Elektrot yüzeyinde oluşan film bir O-ring ile tutturulur. Elektrot glisin çözeltisine daldırılarak nötralleştirilir ve çapraz bağlayıcının fazlası uzaklaştırılır. Yöntem çok kolay ve özellikle küçük transduserler için çok uygundur (Şekil 2.4).



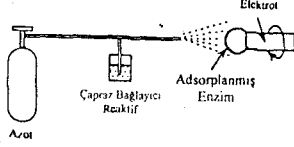
Şekil 2.4. Daldırma metodu ile elektrot yüzeyinin kaplanması

Direk bağlama yöntemi : Kullanılacak enzim çok pahalı ise bu yöntem daldırma yöntemine tercih edilir. Daldırma yöntemiyle transduser yüzeyinde bir membran oluşturulabileceği gibi hazır membranlarla da kaplama yapılabilir ve yaklaşık 10µl enzim çözeltisi bir kapiler yardımıyla ince bir tabaka oluşturacak şekilde damlatılır. Daha sonra aynı şekilde çapraz bağlayıcı reaktif ilave edilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Direk bağlama yöntemiyle elektrot yüzeyinin kaplanması

Aerosol kullanımı : Transduser 20 dakika enzim çözeltisine daldırılıp enzim adsorpsiyonu sağlanır ve 4°C'de kurutulduktan sonra çapraz bağlayıcı püskürtüldüğünde, enzimin transduser yüzeyine çok ince bir tabaka halinde daha sağlam tutulması gerçekleşir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Aerosol kullanımı

Biyosensörün cevap süresi, transduser yüzeyindeki tabaka kalınlığı ile doğru orantılıdır. Biyosensör sistemlerinde bu süre çok önemlidir.

Membran kullanımı : Önce enzimi immobilize formda içeren membran hazırlanır ve bu membran ile transduser yüzeyi kaplanır. Böylece aynı karakterli membrandan bol miktarda hazırlanabilir ve bu membranlar biyosensör fabrikasyonu için çok uygundur.

2.1.3. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

Enzim sensörlerinin sınıflandırılması yaygın olarak enzimatik reaksiyon sırasında oluşan sinyalin belirlenme ilkesine göre yapılmaktadır. Buna göre;

- Amperometrik esaslı enzim sensörleri:
Birinci nesil amperometrik enzim elektrotları
İkinci nesil amperometrik enzim elektrotları
Üçüncü nesil amperometrik enzim elektrotları
- Potansiyometrik esaslı enzim sensörleri:
Proton duyarlı potansiyometrik enzim elektrotları
Amonyum duyarlı potansiyometrik enzim elektrotları
CO₂ duyarlı potansiyometrik enzim elektrotları
Diğer iyon duyar potansiyometrik enzim elektrotları

- İletkenlik esaslı enzim sensörleri
- Optik esaslı enzim sensörleri
- Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri
- Piezoelektrik esaslı enzim sensörleri

2.1.3.1. Amperometrik esaslı enzim sensörleri

Biyosensör iletim sistemleri içerisinde en çok kullanılan metottur. Bir çalışma elektrotu ile karşı elektrot arasına dışarıdaki denge geriliminden farklı bir gerilim uygulanırsa, sistem yeniden dengeye ulaşmaya çalışır ve bu sırada bir elektrot tepkimesi olur, yani iki elektrot arasından bir akım geçer, bu yönüme amperometri denir.

Ticari biyosensörlerde çoğunlukla amperometrik enzim elektrotları kullanılır. Amperometrik iletim sırasında referans elektrota göre sabit potansiyel belirlenir, çalışma elektrotunun yüzeyindeki elektroaktif türlerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi ile oluşan akım ölçülür. Sonuç akım, ya iki elektrotun (çalışma ve karşı) ya da üç elektrotun (çalışma, karşı, referans) birlikte kullanılması durumunda, akımın çözültiden geçmesiyle azalan potansiyelden dolayı meydana gelir. Ölçülen akım **I**, faraday kanunu olarak tanımlanan elektrokimyasal reaksiyon hızının direk ölçüsüdür.

Faraday kanunu : $I = ZF \cdot dn/dt$

I: akım, **F**: Faraday sabiti, **dn/dt** : Yükseltgenme veya indirgenme hızı (mol.s⁻¹)

Çözeltide destek elektrolit denilen ve elektrotlar arasına uygulanan gerilim değerlerinde elektroaktif olmayan yani elektrotta indirgenmeyen ya da yükseltgenmeyen iyonların fazla miktarda bulunması çözeltinin elektriksel direncini azaltır. Ayrıca destek elektrolitin varlığında ve çözeltinin karıştırılmadığı durumda elektrotta indirgenen veya yükseltgenen türün elektrota taşınması sadece difüzyonla olur.

Bir elektrot tepkimesinin hızı yani tepkime nedeniyle geçen akım;

- ❖ çözüldüden elektrot yüzeyine doğru olan kütle aktarımının hızına bağlıdır, yani sonuç akım elektrot yüzeyindeki konsantrasyonun bir fonksiyonudur.
- ❖ elektrotta tepkimeye girecek olan maddenin bir kimyasal tepkimeyle oluştuğu durumlarda bu çözelti tepkimesinin hızına.
- ❖ elektrot yüzeyindeki madde ile elektrot arasındaki elektron ya da yük aktarım hızına bağlıdır.

Elektron transfer hızı, elektrotlar arasındaki potansiyel farkının artırılmasıyla hızlandırılabilir. Elektrot yüzeyindeki reaksiyon hızı olduğunda potansiyel arttığı için maksimum reaksiyon hızına ulaşılır. Bu hızlı reaksiyon tersinir durumlar olarak bilinir ve kütle aktarımının maksimum hızıyla sınırlıdır. Bu maksimumluk elektrot yüzeyindeki analit konsantrasyonu sıfır olduğunda gerçekleşir. Elektrot yüzeyine kütle aktarımının hızı ise, çözeltideki analitin konsantrasyonuna, elektrotun yüzey alanına, difüzyona ve konveksiyon koşullarına bağlıdır.

Elektrota uygulanan gerilim denge gerilimine eşit ise devreden net bir akım geçmez, ileri ve geri yöndeki elektrot tepkimeleri eşit hızla yürür. Hücreden net bir akımın geçebilmesi için uygulanan gerilimin denge geriliminden farklı olması gerekir.

Amperometri için çalışma ve karşı elektrotlar kimyasal olarak inert olmalı ve elektrot ile elektroaktif bileşik arasında hızlı elektron aktarımı yapılabilmelidir. Uygun elektrot materyalleri; iletken inert metaller, grafit ve karbonun modifiye formları ve iletken polimerlerdir. Ag/AgCl elektrotları ise en iyi referans elektrottur. Ayrıca Hg/Hg₂Cl₂ elektrotları, Ag, Pt veya Au gibi metal tellerde referans elektrotu için uygundur.

Amperometrik sensörler için en iyi örnek Clark oksijen elektrotudur. Clark oksijen elektrotu, amperometrik ölçümlere dayanan sensörlerin öncüsüdür. Bu sistemde altın (Au), gümüş (Ag) veya platinden (Pt) meydana gelen katot, silikon ve teflondan yapılmış bir gaz geçirgen zar ile kaplıdır, bu zar girişim yapan bileşiklerin indirgenmesini engeller.

Bu katot ile aynı zamanda bir karşılaştırma elektrotu olan gümüş anot arasına 1.5 V'luk bir pil bağlanır ve iki elektrot arasından geçen akım bunların arasına yerleştirilen bir ampermetre ile ölçülür. Bu elektrot sisteminin daldırıldığı çözeltide çözünmüş oksijen zardan geçer, katoda ulaşır ve uygulanan gerilimde indirgenir. İndirgenme akımı 1-10 mg/L derişim aralığında çözünmüş oksijen miktarı ile doğru orantılıdır. Pt katot (-0.6 V'ta) standart kalomel elektrotu karşı tutularak yeterince negatif potansiyel uygulanmıştır.

Katodik reaksiyon: $O_2 \rightarrow 4H^+ + 4e^- + H_2O_2$

Anodik reaksiyon: $H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^-$

Hidrojen peroksiti (H_2O_2) izlemek için genel olarak anodik dedeksiyon kullanılır. Pt veya karbon elektrot üzerinde doymuş kalomel elektrotu (SCE) karşı 0.6-0.9 V arasında dengelenen elektrot üzerinde oksidasyon gerçekleşir.

İletici olarak amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en önemli fark; ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde sürekli tüketilerek uzaklaştırılmasıdır. Sinyal oluşturan türün sensör yüzeyinde tüketilmesi nedeniyle, kinetik yaklaşımda iletici ile biyoaktif tabaka ara yüzeyindeki ürün konsantrasyonunun sıfır olduğu varsayılır ($[P]=0$).

Bu nedenden dolayı amperometrik esaslı enzim sensörlerinde denge durumunda reaksiyon hızı, enzim içeren biyoaktif tabakanın yarı geçirgen bir zarla çevrilmiş olduğu koşulda, substratın söz konusu zardan difüzyon hızına eşittir. Zarın yüksek geçirgen özelliğe sahip olması durumunda ise düşük substrat konsantrasyonlarının ölçümü mümkündür. Zar geçirgenliği azaldıkça ancak daha yüksek substrat konsantrasyonlarında tayinler yapılabilir. Çizelge 2.4'te amperometrik sensörlere örnekler verilmiştir.

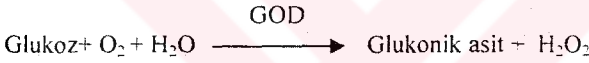
Çizelge 2.4 Amperometrik biyosensörler

SUBSTRAT	ENZİM	TAYİN TÜRÜ
Laktik asit	Laktat Oksidaz	O ₂
Askorbik asit	Askobat oksidaz	O ₂
Glukoz	Glukoz Oksidaz	O ₂
Glukoz	Glukoz Oksidaz	H ₂ O ₂
L-Amino asitler	L-Amino asit oksidaz	H ₂ O ₂ I ⁻
Süksinik asit	Süksinat dehidrojenaz	O ₂
Etil alkol	Alkol oksidaz	O ₂

Klasik örnekler ile enzim elektrotlarının evrimini açıklanacak olursa, elektrotlar birinci, ikinci ve üçüncü nesil olmak üzere üç grupta ele alınabilmektedir.

2.1.3.1.1. Birinci nesil enzim elektrotları

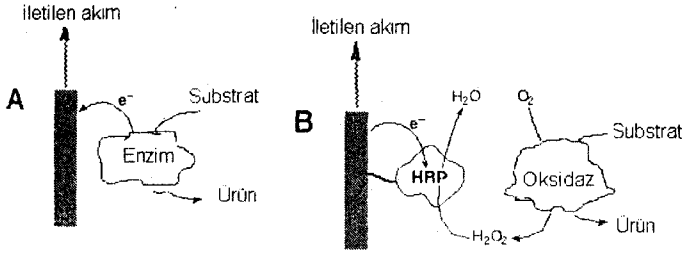
En klasik örnek, glukozun GOD tarafından glukonik aside oksidasyonunu esas alan sistemdir (Şekil 2.7).



Bu tür enzim elektrotlarında GOD bir oksijen elektrotu üzerindeki poliakrilamit jelde immobilize edilmiştir. Söz konusu sistemde reaksiyon sonucu ölçülen akım, elektrot üzerinde oksijenin indirgenmesinden kaynaklanır ve O₂ konsantrasyonunun bir fonksiyonudur. Bu oksijen tüketen reaksiyonda oksijen konsantrasyonunun hız sınırlayıcı bir faktör olmadığı durumda ve glukoz konsantrasyonunun immobilize GOD un görünür Km değerinin altında olduğu koşullarda glukoz konsantrasyonu ile oksijen konsantrasyonundaki azalış arasındaki ilişki doğrusaldır. Oksijen konsantrasyonundaki azalma akımdaki azalmaya karşılık gelmektedir.

İkinci örnek ise, reaksiyon ürünü hidrojen peroksidin +0.6 V sabit potansiyelde oksidasyonunu esas alır. Bu türün değerine nazaran en önemli

avantajı, değişen oksijen konsantrasyonlarının analizde önemli bir problem yaratmaması ve daha duyarlı sonuçlar alınmasına imkan vermesidir. Örneklerde askorbik asit gibi aynı potansiyelde yükseltgenebilecek türlerin girişimine açık olması ise önemli bir dezavantajdır. Halbuki gaz geçirgen bir zarla çevrilmiş ve oksijenin indirgenmesini esas alan bir önceki sistemde bu olasılık yok denecek kadar azdır.



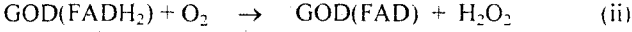
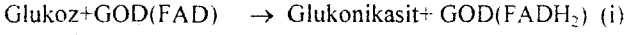
Şekil 2.7 Enzimin direk olarak (aracısız) substrat ile elektriksel etkileşimi A) Elektrot ile elektrot yüzeyindeki enzim arasında direk elektron transferi. B) Birincil enzim olarak oksidaz kullanılarak H_2O_2 dedeksiyonu için direk elektron aktarıcısı olarak HRP nin (Horsheredish peroxidase) kullanılması

Son yıllarda glukoz tayinine yönelik ticari analizörlerin büyük çoğunluğu bu iki tür sistemi esas almaktadır. Bu tür enzim elektrotlarında temel sensör olarak oksijen basıncına duyarlı ve H_2O_2 'e duyarlı ileticiler kullanılır.

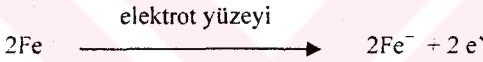
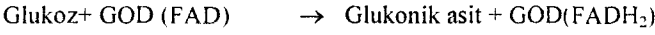
2.1.3.1.2. İkinci nesil enzim elektrotları

Enzimatik reaksiyonda elektron transferini sağlamak için aracı maddelerin kullanıldığı sistemlerdir. Aracılar oksijenden daha kolay indirgenen bileşiklerdir ve bunlar oksijen değişikliklerinden bağımsız olarak çalışma imkanı sağlarlar. Aynı zamanda bunlar ya örnek çözeltisi içinde çözünür halde ya da elektrot yüzeyine immobilize olmuş bir halde bulunabilme özelliğine sahiptirler.

Amperometrik glukoz elektrotu günümüzde en başarılı bir şekilde aracı ile birlikte kullanılan elektrottur. Burada çoğunlukla “ferrosen türevi” aracı olarak kullanılmaktadır. GOD’un immobilize edildiği grafit elektrota “dimetil ferrosen” ilave edilmiştir. Bu elektrotun işleyişinde, reaksiyon sırasında indirgenmiş GOD tekrar elektrokimyasal olarak yenilenmiş “ferrisium “ iyonları tarafından yükseltgenir. Bu tür glukoz biyosensörlerinde reaksiyonlar aşağıdaki şekildedir;



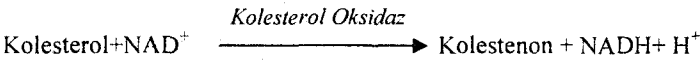
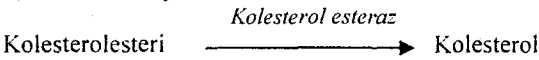
(ii) Reaksiyonunda FADH₂ nin yükseltgenmesi elektronların oksijene transferi ile olur. Oksijen yerine aracı olarak ferrosen kullanılması durumunda gerçekleşen reaksiyon;



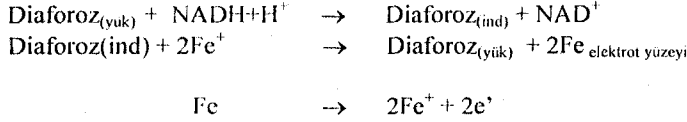
Aracı molekül olarak farklı kimyasal maddelerin kullanıldığı farklı immobilizasyon yöntemlerinin denendiği ve karakteristiklerinin incelendiği çalışmalar aşağıda verilmiştir.

Bu tür enzim sensörlerinde temel iletici sistem olarak Au, Pt ve grafit esaslı elektrotlar kullanılmaktadır.

1) Kolesterol tayini



Aracı: Diaforoz, Fe¹



2) Etanol tayini

Enzim: *Alkol Dehidrojenaz* (ADH)

Koenzim: NAD⁺

Aracı: Fe(II)/Fe(III)

3) Solunum zincirinde elektron transfer hızlarının incelenmesi

Enzim: *Sitokrom Oksidaz*

Sitokrom IIc/Sitokrom IIIc

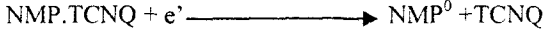
2.1.3.1.3 Üçüncü nesil enzim elektrotları

Enzimin redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında doğrudan bir elektriksel ilişki kurulması esasına dayanır. Genelde bu ilişki organik iletken tuzlarla gerçekleştirilir. Söz konusu maddeler ortam sıcaklığında metalik nitelik gösterdikleri için genelde organik metaller olarak adlandırılırlar. NMP (N-metilfenotiyazin), TCNQ (Tetraasiyanokinodimetan) ve TTF (Tetratyofulvalen) den hazırlanan organik iletken tuzlar sıklıkla kullanılır. TTF geri dönüşümlü olarak oksitlenir, TCNQ ise geri dönüşümlü olarak indirgenir.

Bu iletken tuzlar genelde kristal olarak pellet şeklinde sıkıştırılarak veya grafit tozuyla pasta şeklinde kristal olarak elektrot ile kombine edilerek kullanılır. Bu sistemde flavoprotein karakterinde veya NAD(P)H bağımlı enzimlerin katalizlediği reaksiyonlardan yararlanılır. NMP ve TCNQ organik tuzlarının kullanılması durumunda doymuş kalomel elektrota karşı + 0.5 V potansiyelde NMP.TCNQ çözünür olmayan TCNQ vererek yükseltgenir:

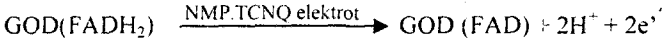
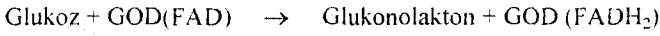


Potansiyel -0.05 V ' un altına düşürüldüğünde ise NMP çözünür olmayan türler vererek indirgenir:

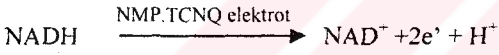
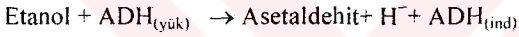


İletici sistem olarak genellikle damla halinde kaplanmış, sıkıştırılmış oyuk ve karbon pasta elektrotlar kullanılır.

1) Glukoz tayini



2) Etanol tayini



2.1.3.2. Potansiyometrik esaslı enzim sensörleri

Potansiyometrik esaslı sensörler sıfır akım koşullarında çalışma elektrot ve karşı elektrot arasındaki potansiyel farkını ölçer. Bu koşullar altında analit

tüketimi olmamakta ve bu teknik “ yıkım olmayan teknik “ olarak tanımlanmaktadır. Bir karşılaştırma elektrotu ve uygun bir çalışma elektrotu ile oluşturulan elektrokimyasal hücrede ölçülen gerilim değerleri yardımı ile hücre çözeltisindeki türlerin kantitatif analizine potansiyometri denir.

Çalışma elektrotu; çözeltideki türlerden bazılarına seçicilik gösteren analizi yapılacak çözelti ile karşılaştırma elektrotundan ayrılmalı elektrottur.

Çözeltiye daldırılmış olan analizi yapılacak bu elektrot ile aynı çözeltideki karşılaştırma elektrotu arasında oluşan gerilim değeri ve analitin derişimi arasında logaritmik bir ilişki vardır. Bu gerilimin ölçümü sırasında iki elektrot arasında uygun bir devre yardımıyla akım geçmemesi sağlanır. İçte ve dışta bulunan çözeltelerde analitin derişimi açısından bir fark varsa membranın iç ve dış yüzeyi arasında bir gerilim farkı oluşur. Bu gerilim farkının, değeri analizi yapılan türe ve derişimine bağlı olduğu gibi, membranın cinsine ve çözeltide bulunan öteki bileşenlerin türüne ve miktarına bağlıdır.

Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlar. Potansiyometrik esaslı enzim elektrotları söz konusu sensörler üzerine bir veya birden çok enzimin uygun immobilizasyon yöntemleriyle ve uygun metotlarla monte edilmesiyle hazırlanır.

Potansiyometrik cevap, enzimatik reaksiyon sonucunda açığa çıkan gazın (CO_2 veya NH_3) gaz geçirgen zarı geçerek difüzyonlanması ve bir pH değışikliğı meydana getirmesiyle belirlenir. Potansiyometrik biyosensörlerin son derece kararlı bir referans elektrota gereksinim duymaları bu sistemlerin dezavantajıdır. Potansiyel esaslı enzim biyosensörlerinde genellikle standart kalomel elektrotunun referans elektrot olarak kullanılmasıyla potansiyel ölçümü gerçekleştirilir.

Potansiyometrik enzim sensörlerinde kullanılan temel elektrotlar;

- pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı elektrotlar
- Anyon veya katyonlara duyarlı iyon seçici elektrotlar
- Gaz duyarlı elektrotlar (CO_2 veya NH_3)

İyon seçici elektrotlar (ISE) suların kontrolü gibi alanlar için uygundur. Birçok iyon ve nötral molekül için elektrotlar seçicidir. En önemlisi cam elektrotlardır, camın kompozisyonu seçiciliğini etkiler. Çizelge 2.5'te potansiyometrik biyosensörler verilmiştir.

Çizelge 2.5 Potansiyometrik biyosensörler

SUBSTRAT	ENZİM	KULLANILAN ELEKTROT
Üre	Üreaz	H^+ , NH_4^+ , NH_3
Glukoz	Glukoz oksidaz Peroksidaz	I^-
Glukoz	Glukoz Oksidaz	H^+
Ürik asit	Ürokinaz	CO_2
L-Arginin	Arginaz/üreaz	NH_4^+
Difenilkarbamil florür	D-Kimotropsin	F^-
L-Amino asitler	L-Amino asit oksidaz	NH_4^+
Okzalat	Okzalat dekarboksilaz	CO_2
L-Tirozin	L-Tirozin dekarboksilaz	CO_2

2.1.3.3. İletkenlik esaslı enzim sensörleri

Elektrolit çözeltilerinin elektrik akımını iletmeleri üzerine kurulmuş yöntemdir. Bir elektrolit çözeltisinin elektrik akımını iletmesi, elektrotlar arasına uygulanan potansiyel farkı ile iyonların kendi yüklerinden farklı yükteki elektrota geçmesi ile oluşur. İki elektrot arasına bir alternatif akım uygulandığında, düşük frekanslarda yük taşınması, iyonların

elektiriksel alandaki göçü ile gerçekleşirken, yüksek frekanslarda çözücünün polarlanması ile yük taşınmasına çözücünün de katkısı olur.

Bu yöntemin kullanıldığı iletken sensörlerin seçiciliği yoktur. İletkenlik sensörleri enzim katalizli reaksiyonların izlenmesinde de kullanılabilir ve bu şekilde biyosensörler geliştirilebilir. Örneğin, üreaz enzimi ile ürenin etkileştiği reaksiyon sonucunda oluşan NH_4^+ ve HCO_3^- iyonları ortamın iletkenliğini arttıracığından iletkenlik ölçümü ile üre tayin edilebilir.

2.1.4. Enzim biyosensörlerinin performansını etkileyen faktörleri

Bir enzim biyosensörünü karakterize eden, onun çalışma niteliklerini ve verimini belirleyen faktörler; kararlılık, tayin aralığı ve tayin sınırı, seçicilik, cevap süresi ve tekrarlanabilirliktir.

Kararlılık: Kararlılık, biyosensörün ömrünün uzunluğu hakkında fikir verir, aynı materyale çok sayıda analizin yapılabilmesi kararlılık ifadesidir. Enzim sensörleri hibrit bir yapıya sahip oldukları için hem sensör hem de enzim kararlılığı açısından değerlendirilmelidir. Örneğin, iyon seçimli sensörler genelde yüksek kararlılığa sahip iken gaz duyar olanların doldurma çözümlerinin belirli aralıklarla değiştirilmesi gereklidir.

Amperometrik sensörlerde özellikle yüksek potansiyelde çalışıldığında reaksiyon ürünleri tarafından yüzeyin bozulması problemi ile karşılaşılabilir. Biyolojik aktif materyal açısından enzim biyosensörünün kararlılığı incelendiğinde enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi gibi parametreler önem taşımaktadır. Genel olarak fiziksel immobilizasyon yöntemlerinin kullanıldığı biyosensörlerin ömrü kimyasal yöntemler ile hazırlananlara göre daha kısadır. Enzimin saflık düzeyi yükseldikçe doğal ortamlardaki bileşenlerinden uzaklaşıldığı için kararlılıkta azalma söz konusu olabilir.

Çalışma koşulları açısından bakıldığında, analiz için yeterli koşulları sağlıyorsa nispeten düşük sıcaklıklarda çalışmak biyosensörün ömrünü uzatır, $+4^{\circ}\text{C}$ ' de saklanması ise mikrobiyal üremeye izin vermeyen ortam olması açısından tavsiye edilen bir sıcaklıktır.

Tayin aralığı ve tayin sınırı: Kalibrasyon grafiğinde substrat konsantrasyonu ile sensör cevabı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu konsantrasyon aralığına “doğrusal aralık” denir. Bu grafiğin en alt sınırı tayin sınırı olarak tanımlanırken bu değer bir doğruluk ve kesinlik ifade eder.

Genelde tayin sınırının 10^{-5} M dan daha düşük bir değer olmasının önemi vurgulanır. Amperometrik esaslı enzim sensörlerinde diğerlerine nazaran oldukça yüksek duyarlıklara erişebilmek mümkündür. Tayin aralığı ve tayin sınırı, tayin edilecek maddenin analiz ortamındaki düzeyi ve girişim yapabilecek diğer maddelerin ortamda bulunmasından önemli ölçüde etkilenmektedir. Biyosensör cevabını etkileyen pH, sıcaklık gibi parametreler girişimcilerin sensör cevabını etkileyerek tayin aralığını değiştirdikleri görülür. pH sensör cevabını iki yönde etkiler; birincisi, enzimin optimumu pH sından uzaklaşma ile biyoaktif tabakadaki toplam enzim aktivitesindeki değişimdir. İkincisi ise, enzimatik reaksiyon ile tüketilen veya üretilen ve sinyal oluşumuna yol açan türlerin pH değişikliğiyle değişmesidir. Bu durum tayin edilecek maddenin aktif türünün konsantrasyonunda değişikliğe sebep olarak sensör cevabını da değiştirir. Bunun sonucu olarak pH değişikliği ile kalibrasyon eğrisinde değişimler meydana gelir.

Sıcaklık, enzim biyosensör cevabını optimum sıcaklıktan uzaklaşılması durumunda olumsuz yönde etkiler. Bu özellik termal kararlılığı düşük enzimlerde tesinmez bir denatürasyonla da sonuçlanabilir. Buna karşın, çeşitli kimyasal türlerin difüzyon hızlarının sıcaklıkla artması sensör cevabında bir artışa sebep olur.

Sonuç olarak, enzim sensör cevabındaki değişim kalibrasyon grafiğinde farklılığa ve çoğu zaman tayin aralığında ve tayin sınırında değişmeye yol açar. Bu gibi problemleri ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için, temel sensörler seçilirken analiz ortamında onu etkileyecek unsurların varlığı dikkate alınmalıdır.

Seçimlilik: Diğer analiz sistemleri ile kıyaslanınca biyosensörlerin özelliklerinin en ön sıralarında seçimlilik gelir. Seçimlilik, mutlak spesifik bir enzim söz konusu olduğunda en üst seviyelerdedir. Buna karşılık

spesifikliği düşük enzimler, grup spesifikler, kısmi saflaştırılmış enzim preparatları, dokular ve mikroorganizmalar seğıimlilik bakımından bazı dezavantajlara sahiptir. Bir biyosensörün seğıimliliği üzerinde; sensör için girişimler, biyokatalizör ile girişimler ve pH etkili olmaktadır.

Sensörde meydana gelebilecek girişimleri engellemenin en iyi yolu örnekteki diğer maddelere cevap vermeyen ve yalnızca ilgilenilen biyokatalitik reaksiyonu izleyebilecek biyosensör geliştirmektedir.

Amperometrik sensörler potansiyometrik olanlara nazaran daha spesiftir. Seğıilmiş sabit potansiyelde kullanılmalarına rağmen söz konusu koşullarda başka elektroaktif maddelerin varlığı girişime neden olabilir. Buna karşılık özellikle Clark tipli oksijen elektrotunun gaz geğıirgen bir hidrofobik membranla çevrelenmesi seğıimliliği çok yüksek düzeye çıkarır. Girişim veren maddeler enzim biyosensörleri için olduğunda iki başlık altında incelenebilir. Bunlar kompetitif substratlar ve enzimi aktive veya inhibe eden maddelerdir.

Bir enzim biyosensöründe enzim aktivitesi ölçüm ortamından gelebilecek en önemli inhibitörler, Ag^+ , Hg^+ ve Cu^{+2} gibi metal iyonları, organo fosfatlar ve sülfidril reaktifleridir. ve başta oksidazlar olmak üzere pekçok enzimin aktif merkezinde yer alan serbest tiyol gruplarını bloke eder.

Ortamın pH sı seğıimliliği etkileyen en önemli parametrelerden biridir. pH etkisi hem enzime hem de sensöre değıişik şekillerde yansır. İmmobilizasyon sonucu bazı durumlarda taşıyıcının doğasına bağlı olarak enzimin optimum pH'ında kaymalar olabilir. Bunun yanısıra, ilgili enzimatik reaksiyonda yüklü substratların sözkonusu olması durumunda pH a bağlı olarak bu substratların yük durumundaki değıişiklikler de seğıimlilik üzerine etki edebilir. Ayrıca tayin aralığının da seğıimlilik üzerine bir etkisi vardır.

Cevap süresi: Cevap süresi biyosensörün analizlenecek maddenin bulunduğu ortama temas ettiği andan itibaren ölçüm düzeneğinden sonucun okunduğu ana kadar geğıen süredir. Cevap süresi üç ana aşamada meydana gelen olaylar tarafından etkilenir, bunlar;

- i) substratın analiz ortamından membran yüzeyine difüzyon hızı,
- ii) substratın membran içine difüzyon hızı ve biyokatalizörün aktif merkezi ile reaksiyon verme hızı,
- iii) oluşan ürünün ölçüldüğü yer olan sensör yüzeyine difüzyon hızıdır.

Bu üç olayı etkileyen başlıca unsurlar, çözeltinin karıştırılma hızı, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, taşıyıcının yapısı ve sensör yüzeyinde veya biyoaktif tabaka yüzeyinde herhangi bir membranın kullanılıp kullanılmadığı ve kullanılıyorsa niteliğidir. Bu unsurlardan karıştırma hızının artışı cevap süresini kısaltırken, substrat konsantrasyonundaki artış ise uzamasına yolaçar. Enzim miktarının artırılması, optimum sıcaklık ve pH'a yaklaşma cevap süresini kısaltır. Yüzeyde kullanılan membranların kalınlığı, hidrofilik substratlar için hidrofobik nitelik sensör cevabını olumsuz yönde etkiler.

Biyosensörler için cevap süresi genel olarak birkaç saniye ile birkaç dakika arasında değişir. Cevap süresi 5 dakikaya kadar olan değerler kabul edilirken 10 dakikaya kadar olan değerler oldukça uzundur.

Tekrarlanabilirlik: Tekrarlanabilirlik bütün analitik tekniklerde olduğu gibi biyosensörler açısından da son derece önemli bir parametredir. Hazırlanan bir biyosensör ile tekrarlanabilirlik denemelerinin en basiti aynı bir örnekte ardarda ölçüm yapılması ve elde edilen değerlerden standart sapma ve korelasyon katsayısının hesaplanmasıdır.

Diğer performans faktörleri: Bir biyosensörün performansını etkileyen diğer önemli faktörlerden biri maliyettir. Maliyet genelde bir biyosensörün hazırlanması giderleri ile söz konusu biyosensörler yapılan yapılan bir analizin giderlerinin toplamıdır. Biyosensörün ekonomik açıdan kullanılabilir olmasındaki en önemli faktörlerden biri, analiz maliyetlerinin diğer analitik yöntemlerden az olmasıdır. Fakat insan gücü açısından avantaj sağlayan ön işlem gerektirmeme gibi niteliklere sahip olma, örnek almanın sakıncalı olduğu bazı fermentasyon proseslerine adaptasyon veya bir analizin başka herhangi bir yöntemle yapılamama durumlarında maliyet ikinci plana itilebilir.

Özellikle çevre ve savunma alanlarında kullanılacak olan bir biyosensör için taşınabilir olması büyük önem taşır. Buna karşılık büyük sağlık tesislerindeki komplike analizör sistemleri için taşınabilirlik bir gereksinim değildir. Ayrıca kullanım kolaylığı da önemli bir noktadır.

2.1.5. Enzim biyosensörlerinin uygulamaları

Enzim biyosensörleri, gıda endüstrisi, savunma sanayi, tıp ve çevre analizi gibi birçok alanda önem taşımaktadır.

2.1.5.1. Gıda endüstrisinde uygulamaları

Gıda endüstrisinde, gıdalara ilişkin analizler doğal örneklerden, ham maddelere işlem basamaklarından mamül ürünlere kadar geniş bir alanda yapılır. Doğal örnekler ve ham ürünlerde genellikle olgunlaşma ve tazelikle ilgili maddelere yönelik tayinlerle kimyasal ve mikrobiyal kontaminasyon ve bunu önlemek amacıyla kullanılan katkı maddelerinin tayini önem taşır. Gıda analizlerinde bahsedilen tüm aşamalarda tayinlerde en büyük ortak problem gıda maddelerinin kimyasal olarak birbirinden farklı ve benzer çok sayıda bileşiği içeren kompleks karışımlar olmalarıdır. Bu durumda tayinlerin girişimsiz, kararlı, hassas ve tekrarlanabilir olması gerekmektedir. Bu anlamda biyosensörler, ölçüm sistemleriyle doğrudan bağlantılı ve çoğu zaman taşınabilir olmalı, hızlı, duyarlı, hassas, kolay ve ucuz tayin gibi avantajlar sağlamalı ve gıda analizlerinde önemli bir alternatif sunmalıdır.

Gıdaların temel beslenme bileşenlerinden önemli bir kısmını şekerler oluşturmaktadır. Şekerlerin meyva ve bazı sebzelerde, süt ve bal gibi ürünlerde, kola, şarap, meyva suları ve çeşitli alkolsüz içeceklerde, bazı üretim ve fermentasyon proseslerinde tayinleri önem taşımaktadır. Gıdalardaki şekerlerin belirlenmesine yönelik araştırılan biyosensörlerin büyük çoğunluğunu H_2O_2 veya O_2 duyarlı amperometrik sensörleri esas alan enzim elektrotları oluşturmaktadır (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.6 Gıda ve içecek endüstrisinde kullanılan amperometrik biyosensörler

Oksijen esasl biyosensörler	
Tayiniyapılacak bileşikler	Biyolojik materyaller
Glukoz	<i>Pseudomonas fluoresceses</i>
H ₂ O ₂	Şiğir karaciğeri
Tirozin	Şeker pancarı
Glutamik asit	Glutamat oksidaz
Sülfüt	Sülfüt oksidaz
Okzalal	Okzalal Oksidaz
Hidrojen peroksit esasl biyosensörler	
Tayiniyapılacak bileşikler	Biyolojik materyaller
Sülfüt	Sülfüt oksidaz
Ksantin	Ksantin Oksidaz
Kolesterol	Kolesterol Oksidaz
Glutamat	Glutamat Oksidaz
Galaktoz	Galaktoz Oksidaz
Sakkaroz	Invertaz, mutorotaz, glukoz oksidaz
Glutamin	Glutaminaz, glutamat oksidaz
Laktat	Laktat oksidaz

Dengeli beslenme açısından gıdaların içerdiği metal iyonlarının belirlenmesi gereklidir. Metal iyonu tayinine yönelik bir biyosensörde ilke, biyoaktif tabakada ilgilenilen reaksiyonu katalizleyen enzim aktivitesinin, metal iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak değişimidir.

Gıdalarda bulunması istenmeyen maddeler; pestisitler, mutajenler, alerjenler ve mikroorganizma kontaminasyonlarıdır. Pestisit ve atıklarının belirlenmesinde asetilkolin esterase ve butirilkolin esterase enzim elektrot sistemleri kullanılır. Ayrıca, gıda maddelerinin dayanıklılığı için kullanılan antioksidan ve antimikrobiyal maddelerin tayininden gıda kalite kontrolü için yararlanır.

Gıda maddelerinin tazelik kontrolü meyvelerde alkol, yağlarda aldehit, balık etlerinde hipoksantin tayini ile gerçekleştirilir. Ayrıca sığır etinin tazeliğinin kontrolü için bıçak tipli glukoz sensörleri araştırılmaktadır.

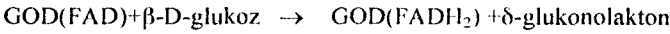
2.1.5.2 Tıpta Uygulamalar

Biyosensörlerin tıpta uygulamaları özellikle acil servislerde, yoğun bakım ünitelerinde, birçok klinik analiz, uydu laboratuvarlarında veya hasta yatağında analizler için araştırılmaktadır. Biyosensörlerin diğer analitik sistemlere üstünlüğünün ve biyosensörlere karşı artan ilginin en önemli nedeni, spesifik bir metabolitin veya tedavide kullanılan bir ilacın konsantrasyonunun elektrokimyasal cihazlarla devamlı olarak takip edilebilme arzusudur.

Yoğun bakım ve acil servis laboratuvarlarında, doğrusalılığı yüksek ve basit sistemler kullanılarak, kanın alınması ile sonucun verilmesi arasındaki süre kısaltılmaya çalışılmaktadır. Tam kan örneğiyle çalışan oldukça basit biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi diyabet hastalarının kendi kendilerini takip etmeleri için araştırılmaktadır.

2.2. Glukoz Biyosensörleri

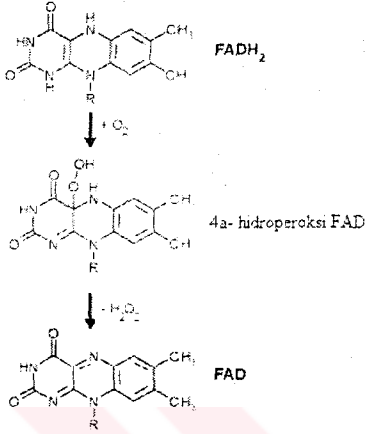
Glukoz biyosensörleri biyolojik aktif materyal olarak immobilize glukoz oksidaz içeren biyosensör sistemleridir. GOD enzimi ilk olarak Alman kimyacı Müller tarafından çalışılmıştır. *A.niger* kaynaklı GOD enzimi yapısı en iyi aydınlatılmış olandır, bu enzim oldukça kararlı ve sağlam bir yapıya sahiptir. Enzimin redoks merkezinde iki molekül FAD prostetik grup olarak bulunur. Ortamda β -D-glukoz bulunduğunda aşağıdaki reaksiyon gerçekleşir;



Fizyolojik olarak enzim ortamda O_2 bulunması durumunda indirgenmiş prostetik yapı aşağıdaki reaksiyonu vererek yenilenir.



Oksijenin doğal elektron akseptörü olarak katıldığı reaksiyonda FADH₂ 'nin oksidasyon mekanizması aşağıda verilmektedir;



Enzim elektrot sistemlerinin kullanıldığı biyosensörlerin gelişmesinde GOD enziminin önemli bir payı vardır. Biyosensör geliştirilmesinde ilk adım 1950 li yıllarda Clark ve Lyons tarafından GOD kullanılarak atılmıştır. Bu araştırmacılar GOD enzimini O₂ elektrotu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başarmışlar ve böylece analitik bir sistem oluşmuştur.

Glukoz konsantrasyonunu ölçmek için üç farklı metot kullanılmaktadır;

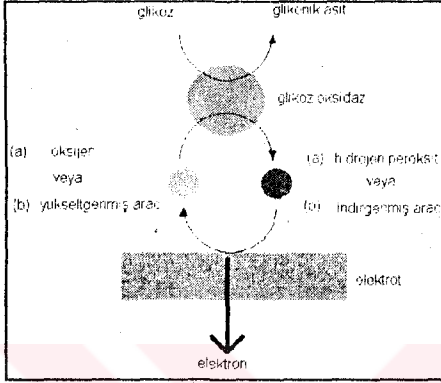
- Oksijen sensörü ile oksijen tüketiminin ölçülmesi.
- Peroksit sensörü ile H₂O₂ üretiminin ölçülmesi
- pH sensörü ile oluşan glukonik asidin ölçülmesi

Glukoz miktarının tayini için en çok kullanılan yöntemler O₂ tüketimi veya H₂O₂ üretiminin ölçülmesidir.

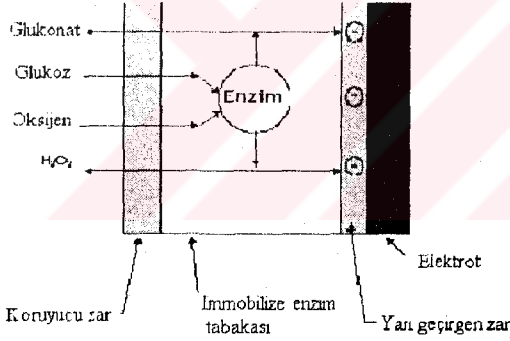
Bir biyolojik sıvıdaki glukoz; çözülmüş oksijen etrafındaki membranı geçerek elektrot yüzeyine ulaştığında oksitlenerek glukonik aside dönüşür

ve bu sırada O_2 harcanır. Oksijen elektrotu ile başlangıçtaki O_2 ve reaksiyon sonundaki çözülmüş O_2 ölçülür, aradaki fark ortamdaki glukozun oksidasyonu için harcanan oksijen olup buna bağlı olarak biyolojik sıvıdaki glukoz miktarı hesaplanır.

Aşağıda sırasıyla glukozun oksidasyon reaksiyonunun şematik olarak gösterilimi ve bir glukoz biyosensör modeli verilmiştir (Şekil 2.10, Şekil 2.11).



Şekil 2.10 Glukozun oksidasyon reaksiyonunun şematik olarak gösterilimi

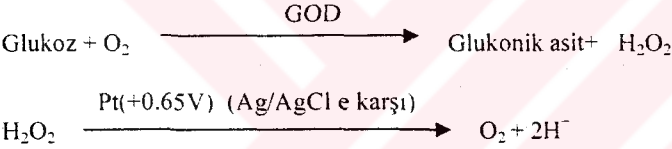


Şekil 2.11 Bir glukoz biyosensörünün şematik gösterilimi

Diyabetik hastalar, relatif ve mutlak olarak insulin yetmezliğine sahip olan ve dolayısıyla kan glukoz seviyeleri normal aralığın 75-115 mgdl^l (4.2-6.4 mmol.dm⁻³) dışında seyreden kişilerdir. Bazen glukoz seviyeleri çok aşağıya düşer (**hipoglisemi**) bu da istenmeyen durumlara ve tehlikeli şuur bozukluklarına hatta şoka neden olabilir.

Bazen de kan glukoz seviyeleri yüksek düzeylerde (**hiperglisemi**) seyrederek uzun vadede gözde, sinirlerde, böbrek ve kan damarlarında ciddi doku komplikasyonlarına sebep olabilir. Bu nedenle son yıllarda diyabetik kontrolü iyileştirmek için çok yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların temel hareket noktası, kan glukoz düzeylerinin hızlı, hassas, kolay,ucuz ve kompleks işlem gerektirmeyecek şekilde ölçülmesidir. Vücudumuz için hayati önem taşıyan glukoz tayininde bu özellikleri taşıyan biyosensörlerin geliştirilmesi için halen çok sayıda çalışma devam etmektedir.

Enzim elektrotu içeren ilk ticari analizör diyabetik hastaların kanında glukoz tayini için geliştirilmiştir. Diyabetik hastalarda glukoz düzeyinin kontrolünü iyileştirmek için çok yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların sonucunda en iyi buluş implante glukoz sensörü vasıtasıyla insulinin kana geçiş hızının feedback kontrolünün yapılmasıdır. Buna göre glukoz sensörünün şeması aşağıda özetlenmiştir.



Clemens ve arkadaşları (1977) böyle bir sensörü hastabaşı yapay bir pankreasta ilk defa kullanmışlardır.

GOD enzimi ile ilgili birçok araştırma yapılmış ve hala devam etmektedir. Canlılar için büyük önem taşıyan glukozun daha çabuk, daha kararlı ve sürekli tayini için bu araştırmalar sürmeye devam edecektir.

2.3. Glukoz Oksidaz Enzimi ile İlgili Kaynak Araştırması

Glukoz oksidaz enzimi ile yapılan çalışmalar çoğunlukla glukoz tayininin oksijen konsantrasyonundan bağımsız olarak, hidrojen peroksit aracılığıyla ölçülmesinde yoğunlaşmıştır. İkinci ve üçüncü nesil enzim elektrotları hazırlanarak tayinler gerçekleştirilmiştir. platin, camı karbon, platinize aktif karbon, karbon pastası, altın, paslanmaz çelik iğne destek materyalleri olarak kullanılmış, bunlardan camı karbon elektrot Nafyon membranların ya da aracılı sistemlerin hazırlanması durumunda çoğunlukla tercih edilmiştir. Karbon pastası, hidrofilik enzimlerin denatürasyonuna sebep olduğu için bu elektrot sistemine PEI (polietilen glikol) ilavesiyle bu sorunun üstesinden gelinmiştir (Yabuki *et al* 1993).

Membran olarak, polikarbonat, gaz geçirgen membran (OMR-83 ve KE-347), Nafyon, poliamino benzen, poliüretan silanize membranlar, poliakrilamit (katyonik membranlar) gibi membranlar kullanılmıştır. Elektrot sistemine membranların ilave edilmesiyle girişim önemli ölçüde engellenmiştir (Nafyon membranlarla askorbik asit girişiminin önlenmesi gibi.).

Referans elektrot olarak Ag/AgCl ün KCl içinde doymuş kalomel elektrotu kullanılırken, mikroemülsiyon ile glukoz sensörünün hazırlandığı bir çalışmada referans elektrot olarak Ag/Ag fosfat kullanılmıştır (Chan *et al* 1994).

Respons süreleri (1 dakikadan az) dikkate alındığında respons süresi en düşük olan glukoz sensörleri aşağıda verilmiştir.

Lipit modifiye GOD ve Nafyon anyonik polimer kullanarak daldırma yöntemi ile transduser hazırlanmıştır. Destek materyali camı karbon, karşı elektrot platin ve referans elektrot Ag / AgCl elektrot, + 0,9 V anodik potansiyelde tayin aralığı $0.2 \cdot 10^{-3}$ –3 mM arasında olan sensörün respons süresi 2 saniyedir. Nafyon membran askorbik asit girişimini lipit modifikasyonu da GOD sızmasını önlemiştir (Mizutani *et al* 1993).

Platin elektrot üzerine GOD-gluteraldehit çapraz bağlanmasıyla immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Referans elektrot yine Ag/AgCl

elektrot, 1.85 V anodik potansiyelde tayin aralığı 2.10^{-3} -5 mM , respons süresi ise 2-4 saniyedir. Platinizasyon, anodizasyon, aminosilanizasyon ve Gluteraldehit ile çapraz bağlama işlemlerinin yapılması ile sensörün ömrü 5 günden 30 güne çıkarken, %50 hassasiyet artışı gözlenmiştir (Kawakami *et al* 1991).

Mikro emülsiyon ile GOD sensörünün hazırlandığı sistemde, enzim iletken olmayan bir polimer içine hapsedilmiş ve organik çözüciye olan gereksinimi ortadan kaldıracak bir yöntem geliştirilmiştir. Pt destek üzerinde çalışma elektrotu hazırlanırken paslanmaz çelik tüp karşı elektrot, Ag/Ag fosfat ise referans elektrot olarak kullanılmıştır. Respons süresi 3-4 saniyedir.

Poliyeten imit üzerine GOD immobilize edilerek hazırlanan sensörde, oksijene karşı seçici polipropilen membran olarak bulunmakta, Clark tipli bir Pt elektrot çalışma elektrotu, yine Ag/AgCl elektrot referans elektrot olarak kullanılmaktadır.

Enzimatik reaksiyonun ping-pong mekanizmasına göre yürüdüğü belirtilmiştir. Bu tipik bir Clark O₂ elektrotu olan birinci nesil enzim elektrottur ve respons süresi 20 saniyedir. (Ramanathan *et al* 1994)

Elektropolimerizasyon yöntemiyle GOD immobilizasyonunun yapıldığı çalışmalarda ise, polimerizasyon için kullanılan monomerler; anilin ve türevleri çoğunlukla, fenilendiamin, pirol ve türevleri. 4-vinil piridin, indol ve [Os(bpy)₂(PVP)₁₀Cl]Cl kullanılmıştır.

Polianilin polimerleriyle hazırlanan glukoz biyosensörlerinin respons süreleri 5 ile 40 saniye arasında değişmektedir. Bunun yanısıra pirol-2-karboksilik asit (Py-2-COOH) ve DHB (4,4'-dihidroksibenzofenon) iletken olmayan glukoz biyosensörlerinin respons süreleri ise 3-6 saniye ye kadar düşürülebilmektedir.

Osmiyum (Os) polimerleriyle oluşturulan sensörlere iki farklı çalışmada rastlanmıştır. Bunlardan birinde, osmiyum polimeri/GOD ile osmiyum polimer/GOD/PEI (poliyeten imin) karşılaştırılmış , PEI li sistemin daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Buna göre, PEI li sistemin duyarlılığının

arttığı ve girişimin daha az olduğu farkedilmiş ,ayrıca PEI ilavesiyle sensörün pH aralığına karşı hassasiyetinin arttığı görülmüştür. Osmiyum polimerli ikinci çalışmada ise bu sefer sisteme fenol ilave edilerek polifenol (PPh) oluşturulmuştur. Os/GOD sensörü ile Os/GOD/PPh sensörünün karşılaştırılmasında ise yine glukozu karşı hassasiyet artmış ve girşim azalmıştır (Jezkova *et al* 1997).

2.4. Çalışmada Kullanılan Enzim, Substrat, Taşıyıcılar ve Çapraz Bağlayıcıların Özellikleri

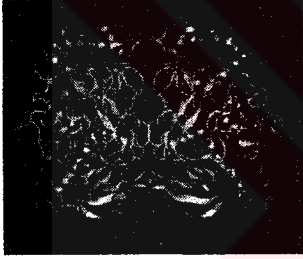
2.4.1. Enzim: Glukoz Oksidaz

Glukoz oksidaz (β -D-Glukoz; oksijen 1-oksidoredüktaz, E.C.1.1.3.4) molekül kütlesi 160 kDa olan her iki monomerinde kofaktör olarak flavin adenin dinükleotit (FAD) bulunduran dimer bir proteindir. Enzim molekülünün kütlece % 74 protein, % 16 nötral şeker ve % 2 amino şeker içermektedir. Karbonhidrat içeriği % 80 civarında mannoz ihtiva eder. Manno, Asparagin, Treonin, ve serin amino asitlerine N ve O- ucundan glukozit bağıyla bağlanmıştır.

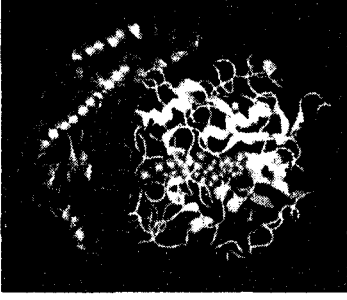
FAD enzime kovalent olmayan bir şekilde sıkıca bağlıdır ve proteine uygulanabilecek kısmi çözme işlemiyle haloenzimden ayrılabilir. Bu işlem proteinin denatürasyonu önlenmiş ılıman koşullar altında gerçekleştirilebilir. GOD'un apoenzimi FAD'ın ekstraksiyonu ile elde edilebilir. FAD 'ını kaybetmiş apoenzim biyokatalitik aktiviteye sahip değildir ve fakat suni veya doğal olarak FAD modifikasyonu ile yeniden oluşturulabilir. Haloenzim molekülünü oluşturan mol kütlesi 80 000 dalton olan iki özdeş altbirim arasında hem tuz köprüleri hem de hidrojen bağlarını oluşturan ve merkezinde 11 aminoasit bulunduran 120 temas noktası vardır. Monomerler dar bir temas alanı boyunca kovalent olmayan bir şekilde birbirine bağlanmıştır.

Monomerik molekül yaklaşık 60°A x 52 °A x 37 °A çaplarında birbiri içine girmiş kürelerden oluşan katlanmış iki domain içermektedir. Domainlerden biri FAD'ı bağlar, diğeri ise üzerinde substratın bağlanacağı bir bölge bulundurur. Dimerlerin çapları 70 °A x 55 °A x 80 °A 'dür.

Glukoz oksidaz enziminin ikincil ve üçüncül yapısı şekil 2.12 ve şekil 2.13'te verilmiştir. İkincil yapısı, alt birimde 1 tane disülfid köprüsü bulundurulur, dimerik protein % 28 heliks, % 18 yaprak olmak üzere fazla oranda ikincil yapı ihtiva eden elipsoidal bir yapıdır. Enzimin üçüncül yapısı ise, birbirinden farklı iki ayrı β -yaprak sistemleriyle karakterize edilir. Bunlardan birisi FAD molekülünü bağlayan domaini oluştururken, diğeri aktif bölgenin kenarını oluşturan, 4 tane α -heliks tarafından desteklenen ve bu bölgeye yerleşmiş 6 tane büyük antiparalel β -yaprak yapılarıdır. Bu β -yapraklar iki alt birim arasındaki arayüzeye yakın bir yere yerleşmiştir. Flavin zincir sistemi ise aktif bölgede huni şekline benzer geniş derin bir cep bulundurulur ve dimerin ikinci molekülünün kalıntılarıyla bir kenar oluşturmuştur. Katalitik oyuğun (aktif bölge) alt kısmı, izoalloksazin parçasının önüne yakın bir şekilde çoğunlukla saklanmış olan aspartik asit 584, tirozin 515, histidin 559 ve histidin 556 amino asit kalıntılarından oluşmaktadır. Bu bölge katalitik reaksiyon sırasında amino asitlerin substrata bağlandığı yerdir. Ayrıca fenilalanin 414, triptofan 426 ve asparagin 514 amino asitleri de substrat ile temas kurabileceği pozisyonda bulunurlar. Flavin ve monomer yüzeyi arasındaki minimum mesafe 13 Å iken izoalloksazin yarılarının arasında da yaklaşık 40 Å kadar bir aralık vardır. Böylece, bu yapılarda bulunan fonksiyonel gruplar arasında herhangi bir etkileşimin olması engellenmiştir.



Şekil 2.12. GOD haloenzimi



Şekil 2.13. Glukoz oksidaz altbiriminin yapısı

Enzim β -D- glukopiranoz için yüksek spesifikliğe sahiptir. 2 - Deoksi glukoz, D - mannoz ve D - fruktoz indirgenmeye daha fazla istekli olsa da GOD enzimi

β -D glukozu karşı çok yüksek bir spesifite göstermektedir (çizelge 2.7). Bu substrat için aktivite 100 kabul edilirse buna göre diğer bazı karbonhidratlar için aktivite değerleri çok düşüktür.

Çizelge 2.7 Glukoz oksidaz enziminin diğer karbonhidratlarla β -D- glukopiranoz spesifikliğini karşılaştırılması

	Aktivite (%)
β -D-Glukopiranoz	100
4,6-Benziliden glukoz	1.90
6-metil glukoz	1.85
Mannoz	0.94
α -D-Glukopiranoz	0.64
Altroz	0.16
Galaktoz	0.14

GOD enziminin katalizlediği reaksiyonda normal olarak hidrojen alıcısı (akseptörü) oksijendir. Sadece oksijenin bulunduğu ortamdaki aktivitesi hava atmosferindeki oksijeninkinin 1.5 katıdır. GOD'un literatürlerdeki glukozun GOD ile yükseltildiği reaksiyonun entalpi değişimi termistörle ölçülebilecek yeterliliktedir ve birçok glukoz biyosensör konfigürasyonunun temelini oluşturur. Radyoaktif olarak oksijenler etiketlendiğinde,

peroksitteki oksijenin sudan değil suda çözünen oksijenden geldiği tesbit edilmiştir.

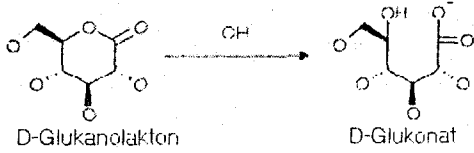
Ag^+ , Hg^{+2} , Cu^{+2} Glukoz oksidaz enzimidaki FAD'ın nükleotidlerine bağlanarak inhibisyon yapar.

HCN, H_2S , NH_3 , NaF veya üretan gibi kimyasallarla inhibe olmadığı gibi glukoz haricindeki diğer şekerlerin ortama ilavesinde bile ancak % 15 civarında bir inhibisyon gerçekleşebilir. β -D-Glukozun anomeri olan α -D-glukozun ortamda bulunması bile inhibisyon yaratmaz. Bu da enzimin substratına karşı ne kadar spesifik olduğunun bir göstergesidir. Ortamda 0.01 mol dm^{-3} 8-hidroksikinolin, sodyum nitrat ve semikarbazit bulunduğu anda enzim sırasıyla %11, %13 ve %20 oranında inhibe olur.

GOD enziminin aktivitesi $pH > 8$ ve $pH < 2$ de hızlı bir şekilde azalır. Enzim, çok saf enzim preparatları açık sarı renkli ve toz halinde iken anaerobik (O_2 siz) koşulda glukoz varlığında enzim renksiz haldedir. Kuru enzim numuneleri $0^\circ C$ ta 2 yıla kadar kararlıdır. % 0,1 ve % 0,2 'lik sulu çözeltileri ise $5^\circ C$ ta bir hafta kararlıdır. GOD Enzimi 377 nm ve 455 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon verir. UV ışıkta fluoresan (ışımaya) vermezken, ısıtıldıktan veya asit ya da bazla muamelesinden sonra koenzimi FAD dan dolayı karakteristik yeşil renkli bir ışımaya verdiği gözlenmiştir.

Ayrıca $pH 2.5$ ' ta pepsin ve $pH 7.5$ 'ta tripsin sindirim enzimlerinden etkilenmez. GOD enzimi gıda endüstrisi, tıp, çevre gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.

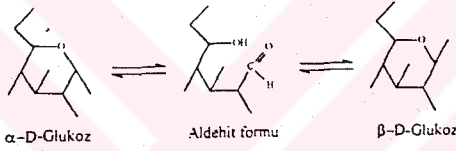
GOD enzimi β -D glukozu moleküler oksijeni elektron alıcısı olarak kullanarak, D-glukano-1.5-lakton ve hidrojen peroksit'e dönüşümünü katalizleyen enzimdir. D-glukano-1.5-lakton oksidasyonun başlangıç ürünüdür, ve aynı zamanda GOD 'un zayıf yarışmalı inhibitörüdür.



Bu reaksiyonun hız sabiti pH 'a bağlıdır. pH 3 'te reaksiyon yavaş iken pH 8'de reaksiyonun yarılanma ömrü 10 dakikadır.

2.4.2. Substrat: β -D-GlukoZ

D-GlukoZ vücutta en çok bulunan monosakarittir, üzümde bol miktarda bulunduğu için üzüm şekeri olarak adlandırılır. Polarize ışığı sağa çevirir, suda kolaylıkla çözünebilen 6 karbonlu bir şekerdir. Suda çözüldüğünde üç farklı yapının denge karışımı bulunmaktadır. Bunlar α - anomeri (%36,5), β - anomeri (% 63) ve aldehit zincir formudur (% 0,003) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Sulu çözeltide D-glukoZun farklı yapıları

2.4.3. Taşıyıcı

İmmobilizasyon işlemlerinde taşıyıcının seçimi enzimin doğasına bağlı olduğu gibi aşağıdaki hususlara da bağlıdır:

- Taşıyıcının parçacık büyüklüğüne.
- taşıyıcının yüzey alanına,
- taşıyıcıdaki hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranına,
- taşıyıcının kimyasal kompozisyonuna bağlıdır.

Genel olarak taşıyıcı üzerindeki hidrofilik grupların artmasıyla taşıyıcıya bağlanacak enzim miktarı artar ve bununla ilişkili olarak elde edilen aktivite değeri artmış olur. İmmobilizasyon işlemlerinde selüloz, dekstran, agaroz, jelatin ve poliakrilamid taşıyıcıları kullanılmaktadır.

Kovalent bağlanma metodunda taşıyıcı üzerindeki amino, hidroksil, tiyol, karboksil, imidazol, sülfidril ve fenolik vs. gibi gruplar üzerinden enzimlerin bağlanması gerçekleşmektedir. Kovalent bağlanmada bağlanma reaksiyonları ve oluşan bağ türlerini örneklersek; diazotizasyon (destek-N=N-Enzim), amid bağı oluşturma (destek-CO-NH-Enzim), alkilasyon ve arilasyon (destek-CH₂-NH-Enzim), schiff bağı oluşumu (destek-CH=N-Enzim) vs. şeklinde verilmektedir

2.4.3.1 Jelatin

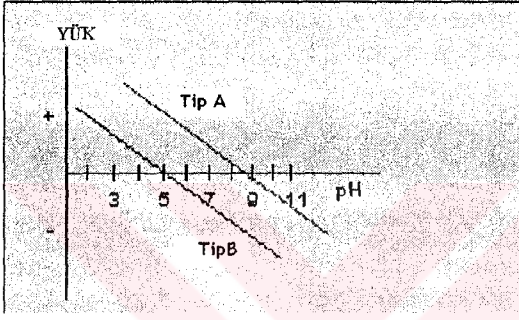
Jelatin, kolajenin kısmi hidrolizi sonucunda elde edilen, suda çözünen ipliksi (lineer) bir proteindir. Bağ dokusu, deri, kemik, kaslar ve hayvan postunda bulunur. Molekül ağırlıkları ortalama 3000 ile 200.000 arasında değişen jelatin kolajenini hidroliz ürünlerinin heterojen karışımıdır. Polipeptit zincirinde en çok tekrarlanan glisin-prolin-prolin ve glisin-prolin-hidroksiprolin serisidir.

Jelatinin amino asit bileşimi: %26,4-30,5 glisin, %14,8-18 prolin, %13,3-14,5 hidroksiprolin, %11,1-11,7 glutamik asit, %8,6-11,3 alanin ve azalan sırada ise arginin, aspartik asit, lizin, serin valin, fenil alanin, treonin, izolösin, hidroksilizin, histidin, metiyonin ve tirozin bulunur.

Lizinin serbest amino grubu, argininin guanidin grubu ve histidinin serbest imidazol grubu jelatine amfoterik bir yapı kazandırır. Bunlardan en önemlileri lizinin amino grubu ile argininin guanidin grubudur. Karboksil grupları ise glutamik asit ve aspartik asitin fonksiyonlu gruplarıdır. Amino asit molekülleri sulu çözeltide dipolar iyon olarak davranırlar, izoelektrik noktasında iyonize olan asidik ve bazik gruplar arasındaki denge güçlü molekül içi bağlanmalara neden olur. Ancak diğer pH değerlerinde bunlar açılmış düz zincir halinde bulunurlar. Bu kümelenme jelatinin fiziksel ve

mekanik özelliklerini etkiler ve dolayısıyla da jelatin çözeltilerinin viskozitesinde önemli derecede değişikliklere yol açar. İzoelektrik pH ta jelatinin viskozitesi minimumdur.

Kaynak ve elde ediliş prosesine göre tip A ve tip B olmak üzere iki tip jelatin vardır. Tip A jelatin hammadde olarak domuz derisinin kullanıldığı asidik proses ile elde edilen, tip B jelatin ise sığır derisi ve postunun hammadde olarak kullanıldığı bazik prosesle elde edilen jelatindir. Kullanım amacına göre jelatin tipinin seçimi çok önemlidir. Örneğin, karaagenan gibi anyonik polimerlerle tip A jelatin kullanıldığında istenmeyen etkileşimlerle karşılaşılır, oysa tip B jelatin kullanıldığında bu durum yaşanmaz. İki jelatinin de izoelektrik pH 'ları farklıdır, tip A 'nın izoelektrik pH 'ı 9 iken tip B'nin izoelektrik pH sı 5 tir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 Tip A ve tip B jelatininin pH diyagramı

Jelatinin en karakteristik fiziksel özelliği, sulu çözeltide ısıtıldığında tersinir elastik jeller oluşturabilmesidir. Kuru jelatin ağırlığının yaklaşık % 40'ı kadar nem absorblar. Soğuk su içerisinde serbest halde şişmeye bırakıldığı ağırlığının % 600-700'ü kadar su absorblamaktadır. Jelatinin fonksiyonelliğini yitirmemesi için, jelatin topaklaşmadan tamamen çözülmeli, asitli ortamdan uzak tutarak ve aşırı ısıtmaktan kaçınarak istenmeyen hidrolizi ve denatürasyonunu önleme gibi hususlara dikkat edilmelidir.

Jelatin bazı çok değerlikli metal iyonları ile veya gluteraldehit, formaldehit gibi aldehitlerle çapraz bağlar oluşturarak sertleşir. Sertleşmiş jelatin suda çözünmez. Ticari jelatin, parlak şekilsiz bir madde olup, renksiz taneler

veya ince tabakalar halinde satılır, derişik çözeltileri çok açık sarıdır. Jelatin günümüzde teknolojiye çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünyada yaklaşık 250 000 ton jelatin üretilmektedir, bunun % 60 'ı yiyecek endüstrisinde % 40 'ı ise ilaç endüstrisi, fotoğrafçılık ve diğer amaçlar için kullanılmaktadır. Çizelge 2.8'de gıda teknolojisinde jelatinin kullanımı verilmektedir. Jelatin;

- silah sanayisinde; küçük silah mühimmatı için dumansız barutun imalatında topaklaşmayı önlemek amacıyla koruyucu kolloit olarak,
- polimer sanayisinde; sentetik polimerlerin çöktürüldüğü emülsiyonların koagülasyonuna ve ufalanmasına yardımcı olmak amacıyla,
- fotoğrafçılıkta; boya içeren çeşitli dökme filmlerde ışık filtreleri olarak,
- basım işlerinde; bir masterdan birkaç kopyanın çoğaltılmasında,
- oksijen geçirmeyen film veya lamellerin eldesinde,
- ilaç endüstrisinde ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır.

Çizelge 2.8 Jelatinin gıda endüstrisinde kullanımı

ÜRÜN	JELATİNİN FONKSİYONU
sakız, jöleli pastil şeklinde şekerler	Jelleştirici, sakızlaştırıcı, parlaklık verici
Lokum	Jelleştirici, şekerin kristallenmesinin kontrolü
Karamel, bon bon şekeri	Emülsifiye edici, sakızlaştırıcı
Peynir ürünleri (krem peynir)	Stabilize edici
Dondurma	Jelleştirici
Hazır tatlılar	Jelleştirici
Yiyecek süsleri	Jelleştirici
Yoğurt, ekşi krema	Jelleştirici, stabilize edici
Dondurulmuş tatlılar	Isı şokundan koruyucu, jelleştirici, dolgu maddesi olarak
Konserve ürünleri (jambon, sosis, salamura et)	Jelleştirici
Mayonez	Emülsifiye edici, jelleştirici
Jöle, süsleme jeli	Jelleştirici
Kaplanmış sosis	Jelleştirici, yapıştırıcı
Düşük yağlı margarin (% 60'tan az yağ)	Stabilize edici, dolgu maddesi olarak
Tatlılar	Jelleştirici

2.4.3.2 Poliakrilamid

Poliakrilamid, genel olarak $[-CH_2=CHCONH_2]$ formülü ile gösterilen akrilamid birimlerinin tekrarından oluşan lineer bir polimerdir. Bütün koşullarda suda çözünebilir, sert, camsı parçacık görünümünde 200 °C üzerindeki sıcaklıklarda bozunarak yumuşayan bir polimerdir. Poliakrilamidler kendisini meydana getiren akrilamid birimlerine nazaran daha yüksek sıcaklıklarda bozunurlar. Sudaki çözeltileri oldukça viskozdur, polimerin % ağırlığı arttıkça viskozitenin çok daha fazla arttığı görülmüştür.

Katı poliakrilamid polimeri tamamen kuru, parlak beyaz renktedir. Ticari olarak mevcut olan katı poliakrilamid tozları normal koşullarda kurudur ve genellikle % 5-15 su içerir. Higroskopiktirler, polimerin iyonik karakteri arttıkça su çekme kapasitesi de artar, özellikle katyonik poliakrilamid higroskopiktir. Katı poliakrilamidin fiziksel özellikleri çizelge 2.9'de verilmiştir.

Çizelge 2.9 Katı poliakrilamidin fiziksel özellikleri

ÖZELLİKLER	AÇIKLAMA
Yoğunluk	1.302 g cm ⁻³
Camsı geçiş sıcaklığı	188 °C
Zincir yapısı	Esas olarak doğrusal veya dallanmış
Kristal görünümü	Amorf halinde (yüksek mol kütleli)
Çözücileri	Su, etilen glikol, formamid
Çözünmediği çözücüler	Ketonlar, hidrokarbonlar, eterler, metanol
Yandıığında açığa çıkan gazlar	H ₂ , CO, CO ₂ , NH ₃ , NO ₂

Poliakrilamid bazik ortamda düşük sıcaklıkta hidrolizlenirken, nötral veya asidik ortamda yüksek sıcaklıkta hidrolizlenmektedir. (Othmer 1991).

Üzerinde karboksil grubu bulunduran poliakrilamid polimerleri ve kopolimerleri sulu çözeltileri alüminyum, krom ve diğer polivalent katyonlarının tuzları ile etkileştiklerinde kıvamlı bir jel oluştururlar. Jel oluşumu, polimer molekülündeki amit grubunun karboksil grubuna oranına, pH, katyonun cinsine, polimerin konsantrasyonuna ve polimerin molekül kütlesine gibi koşullara bağlı olarak değişmektedir.

2.4.4. Çapraz bağlayıcı: Gluteraldehit

İmmobilizasyon işleminde taşıyıcı üzerine inorganik ve organik sertleştiriciler ilave edilerek çapraz bağlama reaksiyonları gerçekleştirilmektedir. İmmobilizasyonda kullanılan çapraz bağlayıcılar immobilize örneklerin mekanik özellikleri, jelleşmesi ve aktivitelerini belirlemektedir. Jelatin bazı organik veya anorganik çapraz bağlayıcılar ile reaksiyona girerek çapraz bağlar oluşturur ve sertleşir. Sertleştirilmiş jelatin suda çözünmez. Çalışmada jelatininin ve enzimin çapraz bağlanması organik sertleştirici olarak gluteraldehit [OHC-(CH₂)₃-CHO] kullanılmıştır.

Aldehit grupları jelatin ve enzimin serbest amino grupları ile çapraz bağlar oluşturmaktadır.

Gluteraldehit tıpta dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Örneğin, %2 'lik gluteraldehitin % 70 'lik izopropil alkol veya % 0,3 'lük bikarbonat zeltisi içerisindeki karışımı cerrahi aletlerin virüs, bakteri, mantar ve spordan uzaklaştırılarak dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır (Bilgehan 1992). Jelatin zeltisi içerisine ilave edilen çapraz bağlayıcılar, yüksek sıcaklıklarda jeli çözünmeyen hale getirdikleri gibi kuru ve ıslak jelatin tabakalarına mekanik direnç kazandırmakta ve yüksek asidik ve bazik zellikleki zeltiler içerisinde bile dağılmamalarını sağlamaktadır.

2.5. Çalışmanın Amacı

Sunulan çalışmada gıda, içecek ve klinik tayinlerde kullanılmak üzere glukoz biyosensörü geliştirilmesi amaçlanmıştır. Son yıllarda biyosensörlerle ilgili birçok çalışma yapılmasına rağmen doğru sonuç veren, hızlı, hassas, kullanımı pratik ve kolay olan bir biyosensör geliştirilememiştir.

Çalışmada Glukoz oksidaz enziminin, jelatine gluteraldehit çapraz bağlayıcı olarak immobilize edilmiştir. Taşıyıcı jelatin gluteraldehit

ile çapraz bağ oluşturarak sertleşir. Poliakrilamid ise aynı koşullarda çapraz bağ oluşturarak sertleşmez. Bu nedenle poliakrilamid glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonunu geliştirmek amacı ile kullanılmıştır. Poliakrilamid immobilizasyonda dolgu materyali olarak kullanılmıştır. Immobilizasyon sonrası çözünerek uzaklaştırılarak taşıyıcı sistemin yüzey alanının buna bağlı olarak relatif aktivitenin artırılması amaçlanmıştır.

Elde edilen immobilize sistemlerin birbirleriyle karşılaştırılması ve optimizasyonu ile en iyi biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, serbest enzim, immobilize enzim ve immobilize glukoz oksidaz elektrotları kimyasal ve elektrokimyasal (amperometrik) yöntemler kullanılarak karakterize edilerek sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Sıcaklık, pH, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, tekrar kullanılabilirlik, termal inaktivasyon ve kinetik parameterlerin incelendiği çalışmada ayrıca biyolojik örneklerde bulunabilecek ürik asit, askorbik asit, gliserin, NH_4^+ , NaCl ve KCl gibi elektroaktif bileşiklerin biyosensörün cevabını ne şekilde etkilediği araştırılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3. 1. Materyal

Çalışmada kullanılan kaynağı *Aspergillus niger* olan glukoz oksidaz (β -glukoz: oksijen oksidoredüktaz EC 1.1.3.4) Sigma (A.B.D) ürünüdür.

Kaynağı yaban turpu (Horshradish crude) olan peroksidaz (POD EC 1.11.1.7) Sigma (A.B.D) ürünüdür. Mililitresinde 60 purpurogallin unit olacak şekilde bidistile su ile her deney için taze olarak hazırlanmıştır.

o- Dianosidin hidroklorür (3,3'- dimetoksibenzidin), Sigma (A.B.D) ürünüdür.

D- Glukoz, Merck' ten (Almanya) temin edilmiştir. Bidistile suda hazırlanan çözeltisi, mutarotasyonunun tamamlanması için 24 saat bekletildikten sonra kullanılmıştır.

Taşıyıcı granüler fotoğrafik jelatin Croda (UK) ürünüdür.

Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan gluteraldehit ve dolgu maddesi olarak kullanılan poliakrilamid Aldrich Chemical Co (UK) ürünüdür.

Tamponların hazırlanmasında kullanılan kimyasallar Merck'ten (Almanya) temin edilmiş ve saflaştırılmadan kullanılmıştır.

HCl, Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Kimyasal deneylerde elde edilen optik yoğunluk değerleri JENWAY 6105 UV/Vis model spektrofotometre ile ölçülmüştür.

Elektrokimyasal sentez ölçümleri, Potentio-Galvanoscan Wenking PGS 95 model potansiyostat gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Elektrokimyasal ölçüm

Çalışmada amperometrik analizleri gerçekleştirmek amacıyla, çözelti direnç problemini önlemek için üç elektrot potansiyostatik sistem geliştirilmiştir. Üç elektrot sistemi, referans ve çalışma elektrodunun yerleştirilmesinde büyük esneklik sağlamak ve IR (I = akım, R =direnç) düşüş etkisini minimuma indirmektedir. Ayrıca referans elektrodundan akım geçmemesi gibi bir avantajı vardır.

Üç elektrotlu sistemde, zamanla potansiyeli doğrusal olarak değişen mikro elektrot veya çalışma elektrodu, potansiyeli deney süresince sabit kalan bir referans elektrot ve karşıt elektrot ile çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel kontrolünü düzenleyen bir dış devre bulunmaktadır. Potansiyostat daima üç elektrotlu hücre ile çalışmakta ve sabit bir referans elektroda karşı çalışma elektrodunun potansiyelini ayarlanan seviyede tutarak fonksiyon göstermektedir.

Potansiyostat, çözeltideki IR voltaj düşüşünü kompanse ederek çalışma ve referans elektrotları arasındaki voltaj farkını istenilen değerde tutabilen alettir. Potansiyostat, elektrolitik hücreden geçen akımın değişmesine, elektroaktif maddenin konsantrasyonuna ve çözelti direncine rağmen potansiyeli sabit tutmaktadır. İstenilen voltajda referans elektrodu ile çalışma elektrodunun potansiyelini sürekli karşılaştırarak çalışma elektrodundaki herhangi bir değişikliği kompanse edebilmek için çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasındaki potansiyel farkını hemen değiştirmektedir.

Potansiyostat tarafından, çalışma ile karşıt elektrotları arasında oluşturulan akım, seri olarak karşıt elektrota bağlanan küçük bir direnç üzerinden voltaj düşüşünün ölçülmesi ile tayin edilebilmektedir. Ölçümlerin alındığı alet, bu dirence paralel bağlanmış bir kaydedici olabilmektedir. Referans elektrot

potansiyeli (V_{RE}) ile çalışma elektrot potansiyeli (V_{CE}) arasındaki fark ($V = V_{RE} - V_{CE}$) kadar akıma ihtiyaç vardır ve hücre içindeki dirençten bağımsızdır. Potansiyostatların çoğunda çalışma elektrodu topraklanmıştır. Bu potansiyostatın temel özelliği değildir ve gürültüyü minimuma indirmek için yapılmaktadır.

Üç elektrotlu potansiyostatik sistemde, ana akım referans elektrot üzerinden geçmez, bunun yerine sadece çalışma ve karşıt elektrotlar üzerinden geçer. Akım amplifikatörü, çözelti direncinden bağımsız olarak potansiyel kontrolünü sağlamaktadır. Çok yüksek dirence sahip çözeltilerde karşıt ile çalışma elektrodu arasındaki voltaj düşüşü, amplifikatörün çıkış kapasitesine göre oldukça yüksek olabilmektedir. Bu sistem ile iki elektrot arasındaki potansiyel kontrolünün sağlanması başarılmıştır. Bu da üç elektrot sisteminin kullanılmasının en önemli faydalarından birisidir.

Amperometrik tayin deneyleri, her biri 1.5 cm^2 olan platin levha elektrotlarının (çalışma elektrodu ve karşıt elektrot) ve Lugging kapiler içerisinde Ag^0/Ag^+ referans elektrotlarının yerleştirildiği 60 ml çözelti alabilen H şeklindeki elektroliz hücresi içerisinde gerçekleştirilmiştir. Anot ve katot bölmeleri, 2 cm çapında poröz sinterli cam ile bağlanmıştır. Hücre azot geçişi için uygun girişler içermektedir.

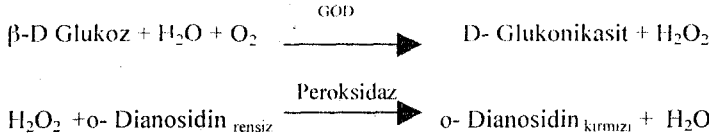
Elektroliz hücresinde kullanılan platin elektrotlar kullanılmadan önce $0.05 \mu\text{m}$ büyüklüğündeki alümina ile parlatılarak önce mekanik olarak temizlenmiş daha sonra nitrik asit ile kimyasal işlem uygulanarak temizlenmiştir. Fiziksel ve kimyasal temizleme işleminden sonra platin elektrotlar bidestile su ile yıkanarak yüzeylerinde olabilecek safsızlıklar, alümina ve nitrik asit uzaklaştırılmıştır.

3.2.2. Enzim aktivitesi tayini ve immobilizasyon

3.2.2.1. Kimyasal metot ile serbest GOD aktivitesi tayini

Serbest glukoz oksidaz enziminin aktivitesi substrat olarak β -D glukoz (% 10 w/v) kullanılarak kimyasal olarak spektrofotometrik Sigma metoduna göre tayin edilmiştir (Sigma Chemical Co).

o-Dianosidin ($0.21 \text{ mmol dm}^{-3}$), β -D glukoz (% 10'luk çözeltisi) ve peroksidaz enzimi (6 purpuragallin unit) içeren reaksiyon ortamına 35°C 'ta glukoz oksidaz enzimi (0.5 U) ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. İnkübasyon süresi olarak 4 dakika seçilmiş ve bunun sonunda örneklerin optik yoğunluğu örnekler ile aynı şekilde hazırlanan enzim içermeyen kör çözeltilerine karşı kolorimetrik olarak 500 nm 'de okunmuştur. Aktivite ölçümü ile ilgili enzimatik reaksiyon aşağıda verilmiştir.



Bir ünite Glukoz oksidaz enzimi: Deney koşullarında 1 dakikada 35°C 'de $1 \mu\text{mol}$ β -D Glukozu, D-glukonik asit ve H_2O_2 'e dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Glukoz oksidaz enziminin optik yoğunluğu, 500 nm 'de yükseltgenen o-dianosidin miktarının spektrofotometrik tayini yoluyla ölçülmüştür. Mikromolar ünite cinsinden GOD aktivitesi, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Mikromolar Ünite} = \frac{A_{500\text{nm}} / \text{zaman} \times 3.1}{7.5 \times (\text{GOD})_{\text{ml}} / (\text{reaksiyon karışımı})_{\text{ml}}}$$

Zaman= 4 dakika

Reaksiyon Karışımının Toplam Hacmi= 3.1 ml

$(\text{GOD})_{\text{ml}} = 0.1 \text{ ml}$

Yükseltgenmiş o-DNS kromofor için milimolar ekstrinksiyon katsayısı= $7.5 \text{ mmol}^{-1}\text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$

3.2.2.2. Elektrokimyasal metod ile serbest GOD aktivitesi tayini

Serbest glukoz oksidaz enziminin elektrokimyasal yöntem ile aktivite tayini potansiyostata bağlanan üç kompartımanlı hücre içerisinde yapılmıştır.

Elektrokimyasal sistem, platin çalışma elektrodu, platin karşıt elektrot ve Ag/AgCl elektrotlarından oluşmaktadır. Bu elektrotlar, asetat tamponu (0.05 mol dm⁻³, pH 5.1) ve enzim (10 U) içeren hücre içerisine yerleştirilerek elektrokimyasal sistem oluşturulmuştur. Kullanılan platin çalışma ve karşıt elektrotlar hücre içerisine daldırılmadan önce yüzey temizliği yapılmıştır.

Potansiyostat + 0.6 V sabit potansiyele ayarlanarak hücrenin yataşkan hale gelmesi beklenmiştir. Daha sonra 25 °C 'ta hücreye β-D-glukoz (50 mmoldm⁻³) ilave edilmesiyle oluşan akım tayin edilmiştir.

Glukoz oksidaz enzimi, β-D-glukozun glukanolakton ve H₂O₂'e yükseltgenmesini katalizlemektedir. Bu potansiyelde H₂O₂ platin yüzeyinde aşağıdaki reaksiyona göre yükseltgenmektedir.



Glukoz oksidazın elektrokimyasal aktivitesi, amperometrik metod ile tayin edilmiştir. Platin çalışma elektrodunda 0.6 V potansiyelde hidrojen peroksit yükseltgenmesi ile oluşan akım glukozun yükseltgenme hızı ile orantılıdır.

3.2.2.3. Jelatin Glukoz oksidaz enzim elektrotlarının hazırlanması

Glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcı jelin hazırlanması için 0.75 g fotoğrafik jelatine çözeltinin son hacmi 10 cm³ olacak şekilde asetat tamponu (0.05 mol dm⁻³, pH 5.1) ilave edilip oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek şişmesi sağlanmıştır. Daha sonra su banyosunda 50 °C 'ta tamamen çözününceye kadar bekletilmiştir. Jelin sıcaklığı 32 °C 'a düşürülerek glukoz oksidaz enzimi ve değişik

konsantrasyonlarda glutraldehit ($0.002-0.015 \text{ mol dm}^{-3}$) çapraz bağlayıcısından ilave edilmiştir. Çapraz bağlayıcı ilavesinden sonra elde edilen jelden 0.100 cm^3 'lük miktarlar ile daha önce fiziksel ve kimyasal temizleme işlemlerinden geçirilip en son bidestile su ile yıkanmış platin levhanın her iki yüzeyi ince bir film halinde kaplanmıştır. Örnekler, çapraz bağlanma reaksiyonunun tamamlanması için 48 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra kullanılmıştır.

Kör örnekler yukarıda belirtildiği gibi enzim ilavesi yapılmadan hazırlanmıştır.

3.2.2.4 Jelatin-poliakrilamit Glukoz oksidaz enzim elektrotlarının hazırlanması

Glukoz oksidaz enziminin jelatin destek materyaline immobilizasyonunda elektrot yüzeyini genişletmek ve immobilize enzimin relatif aktivitesini yükseltmek amacıyla poliakrilamit kullanılmıştır. GOD enziminin poliakrilamit-jelatin destek materyaline immobilizasyonunda kullanılan taşıyıcı jelin hazırlanması için 0.75 g fotoğrafik jelatine çözeltinin son hacmi 10 cm^3 olacak şekilde asetat tamponu (0.05 mol dm^{-3} , pH 5.1) ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletilip şişmesi sağlanmış, daha sonra su banyosunda $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 'ta tamamen çözününceye kadar bekletilmiştir. Jelin sıcaklığı $32 \text{ }^\circ\text{C}$ 'a düşürülerek değişik oranlarda poliakrilamit/jelatin (0.050, 0.100, 0.125, 0.150, 0.200 pAA/j, g/g) oranları içeren jeller hazırlanmıştır. Glukoz oksidaz (10 U) ve glutraldehit çapraz bağlayıcısı ($0.004 \text{ mol. dm}^{-3}$) ilavesi yapılmış ve bu jel karışımından 0.1 cm^3 'lük miktarlar ile, yüzey alanı 1.5 cm^2 olan platin levhanın her iki yüzeyi ince film halinde kaplanarak immobilize örnekler hazırlanmıştır. Örnekler, çapraz bağlanma reaksiyonunun tamamlanması için 48 saat $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'ta sıcaklığında bekletildikten sonra kullanılmıştır.

Bağlanmayan enzimlerin uzaklaştırılması: Çalışmada hazırlanan j-GOD ve pAA-j-GOD ve kör elektrotları kimyasal enzim aktive ve amperometrik aktivite tayinleri yapılmadan önce elektrotlar asetat tamponu ile (0.05 mol dm^{-3} , pH 5.1) 3 kez yıkanarak bağlanmayan enzim ortamdan uzaklaştırılmıştır. Çalışmalarda kullanılan tüm örneklere yıkama işlemi uygulanmıştır.

Bütün yıkama çözeltilerinde GOD aktivite tayini yapılarak enzim sızıntısı kontrol edilmiştir. Yapılan aktivite tayinleri sonucunda enzim sızıntısının ihmal edilebilecek düzeyde olduğu tesbit edilmiştir.

3.2.2.5. Enzim elektrotlarının kimyasal metot ile GOD aktivitesinin tayini

Bölüm 3.2.2.4'te verilen metoda göre hazırlanan örneklerin aktivite tayinleri kimyasal olarak spektrofotometrik Sigma metoduna göre yapılmıştır (Sigma Chemical Co).

İmmobilize örnekler, o-Dianosidin (0.21 mmol dm⁻³), β-D glukoz (10' luk çözeltisi) ve peroksidaz enzimi (60 purpuragallin unit) içeren reaksiyon ortamına sokularak 35 °C'ta 4 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi sonunda immobilize örnekler çözeltilerden ayrılarak reaksiyon sonlandırılmıştır. Daha sonra, bu örneklerin enzimsiz olarak hazırlanmış kör çözeltilere karşı 500 nm dalga boyunda optik yoğunlukları ölçülmüştür.

% Relatif aktivite ler aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır.

ra : [kompleksin aktivitesi/ çapraz bağlama için kullanılan serbest enzimin toplam aktivitesi - enzim sızıntısı ile olan aktivite kaybı]

ma: Deney serisinde maksimum ra' nın değeri

% Relatif aktivite : ra x 100

% Maksimum aktivite : ra x 100/ma

3.2.2.6. Enzim elektrotlarının GOD aktivitesinin elektrokimyasal metot ile tayini

Elektrokimyasal ölçümler, potansiyostata bağlanan üç elektrotlu H-tipi hücre içerisinde gerçekleştirilmiştir. Asetat tamponu (0.05 moldm⁻³, pH 5.1) içeren hücreye, çalışma elektrodu olarak Bölüm 3.2.2.4'te hazırlanmış olan enzim elektrodu, platin karşıt ve Ag/AgCl referans elektrotları yerleştirilmiştir. Potansiyostat 0.6V sabit potansiyele ayarlanarak hücrenin yatışkan hale gelmesi beklenmiştir. Yatışkan hale

gelen hücreye β -D-glukoz (50 mmol dm^{-3}) ilave edilerek 25°C 'ta zamana karşı akım değişimi kaydedilmiştir.

3.2.3. Serbest ve immobilize glukoz oksidaz enzimin özelliklerinin incelenmesi

3.2.3.1. Enzim aktivitesi üzerine çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun etkisi

3.2.3.1.1 Kimyasal yöntem

Çalışmada, GOD kimyasal aktivitesi üzerine çapraz bağlayıcı konsantrasyonunu incelemek amacıyla, jelatin destek materyali üzerine glukoz oksidaz enziminin kimyasal çapraz bağlanması için glutraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılmıştır. Çalışmada bu amaçla $0.002\text{-}0.015 \text{ moldm}^{-3}$ aralığında glutraldehit kullanılarak Bölüm 3.2.2.4' e göre GOD elektrotları hazırlanmıştır. Bölüm 3.2.2.6 'da verilen metoda göre bu immobilize örneklerin aktivite tayinleri çalışılmış ve en uygun çapraz bağlayıcı konsantrasyonu araştırılmıştır.

3.2.3.1.2. Elektrokimyasal yöntem

Çalışmada, GOD amperometrik aktivitesi üzerine çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla, jelatin destek materyali üzerine glukoz oksidaz enzimini çapraz bağlamak için glutraldehit çapraz bağlayıcısını $0.002\text{-}0.015 \text{ moldm}^{-3}$ aralığında kullanarak Bölüm 3.2.2.4 'te belirtilen yöntemle göre GOD elektrotları hazırlanmıştır. Bu elektrotların Bölüm 3.2.2.6 'te verilen yöntemle göre amperometrik aktiviteleri tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre optimum çapraz bağlayıcı konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.2.3.2. Poliakrilamit ilavesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

3.2.3.2.1 Kimyasal yöntem

Destek materyali olarak jelatin ve poliakrilamit kullanılarak Bölüm 3.2.2.4 'te verilen metota göre hazırlanan GOD elektrotlarının kimyasal aktiviteleri Bölüm 3.2.2.6'da verilen yönteme göre tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, destek materyali olarak sadece jelatinin kullanıldığı örneklerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Buna göre, optimum jelatin-poliakrilamit oranı tesbit edilmiş ve bundan sonraki çalışmalar için immobilize enzim elektrotlarının hazırlanmasında bu oran kullanılmıştır.

3.2.3.2.2. Elektrokimyasal yöntem

Bölüm 3.2.2.4 'te verilen yönteme göre farklı oranlarda jelatin-poliakrilamit (0.050, 0.100, 0.125, 0.150, 0.200 pAA/j, g/g) kullanılarak hazırlanan GOD elektrotlarının amperometrik aktiviteleri Bölüm 3.2.2.6'da verilen metoda göre tayin edilmiştir. Optimum jelatin-poliakrilamit oranı tesbit edilmiş ve amperometrik aktivite değerleri sadece jelatin kullanılarak hazırlanan örnekler ile karşılaştırılmıştır. Daha sonraki amperometrik çalışmalar için tesbit edilen bu jelatin-poliakrilamit oranı kullanılarak örnekler hazırlanmıştır.

3.2.3.3. Jel miktarının GOD aktivitesi üzerine etkisi

3.2.3.3.1. Kimyasal Aktivite

Jel miktarının GOD aktivitesi üzerine olan etkisini incelemek amacıyla 0.0083g- 0.0248g (pAA+j) aralığında farklı jel miktarları kullanılarak Bölüm 3.2.2.4 'te belirtilen metoda göre elektrotlar hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek optimum jel miktarı tesbit edilmiştir.

3.2.3.3.2. Amperometrik aktivite üzerine jel miktarının etkisi

Amperometrik aktivite üzerine jel miktarının etkisini incelemek amacıyla 0.0083 g- 0.0248g (pAA+j) aralığında jel miktarları kullanılarak Bölüm 3.2.2.4'te verilen yöntemle göre GOD elektrotları hazırlanmıştır. Elektrotların amperometrik aktiviteleri Bölüm 3.2.2.6 'te verilen yöntemle göre tayin edilerek en uygun jel miktarı belirlenmiş ve bütün çalışmalarda bu jel miktarı kullanılarak elektrotlar hazırlanmıştır.

3.2.3.4. Aktivite üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi

3.2.3.4.1. Kimyasal yöntem

Serbest enzim : Enzim konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisinin incelendiği çalışmada 0.5U-40U aralığında değişen enzim konsantrasyonları denenmiştir. Aktivite tayinleri Bölüm 3.2.2.1'de anlatılan metoda göre gerçekleştirilmiştir.

İmmobilize enzim : Enzim elektrotları değişen GOD konsantrasyonlarında (0.5U-40U) Bölüm 3.2.2.4 'te belirtilen yöntemle göre hazırlanmıştır. Elektrotlara 3 kez yıkama işlemi uygulanarak bağlanmayan enzim ve safsızlıklar uzaklaştırılmış ve aktivite tayinleri 3.2.2.6 'te verilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4.2 Elektrokimyasal yöntem

Serbest enzim : Serbest enzimin amperometrik aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi Bölüm 3.2.2.4 'te verilen yöntemle göre çalışılmıştır. Çalışma elektrodu olarak kullanılan çıplak platinin yüzey temizliği yapılarak 0.5 U- 40 U arasında enzim konsantrasyonları denenmiştir.

İmmobilize enzim elektrotları: Bölüm 3.2.2.4 'te verilen yÖnteme göre 0.5 U- 40 U aralığında değişen enzim konsantrasyonlarında pAA/j-GOD elektrotları hazırlanmıştır. Örneklerin amperometrik aktiviteleri Bölüm 3.2.2.6 'ya göre tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre optimum GOD miktarı belirlenmiş ve çalışmada kullanılan elektrotlar için bu enzim miktarı esas alınarak hazırlanmıştır.

3.2.3.5. Aktivite üzerine pH' ın etkisi

3.2.3.5.1 Kimyasal yöntem

Serbest Enzim : Serbest GOD aktivitesi üzerine pH'ın etkisini tayin etmek için pH 4-9 aralığında tampon çözeltiler kullanılmıştır. Bu pH 'larda serbest enzim aktiviteleri Bölüm 3.2.2.1'de verilen Sigma metodu ile spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

İmmobilize enzim : İmmobilize GOD aktivitesi üzerine pH etkisini tayin etmek amacıyla örnekler Bölüm 3.2.2.4'te verilen yÖnteme göre hazırlanmıştır. Elektrotların immobilize enzim aktiviteleri pH 4-9 aralığında tampon çözeltiler kullanılarak Bölüm 3.2.2.6 'da verilen yÖnteme göre spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

3.2.3.5.2 Elektrokimyasal yöntem

Serbest Enzim : Serbest enzim aktivitesi üzerine pH 'ın etkisinin elektrokimyasal yöntem ile araştırıldığı çalışmada pH 4-9 aralığında tampon çözeltiler kullanılmıştır. Çalışma elektrodu olarak kullanılan platin elektrodun mekanik ve kimyasal yüzey temizliği yapılmıştır. Bu pH'larda amperometrik enzim aktivite tayinleri Bölüm 3.2.2.4'de verilen elektrokimyasal metot kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İmmobilize enzim elektrotları : PAA/j-GOD elektrotlarının amperometrik aktivitesi üzerine pH etkisinin araştırıldığı çalışmada pH 4-9 aralığında

tampon çözeltileri kullanılmıştır. Bölüm 3.2.2.6 'da verilen yönteme göre elektrotların amperometrik aktiviteleri tayin edilmiştir.

3.2.3.6. Aktivite üzerine sıcaklığın etkisi

3.2.3.6.1. Kimyasal yöntem

Serbest Enzim : Çalışmada 15-75 °C aralığında değişen sıcaklıklarda reaksiyonlar gerçekleştirilerek serbest glukoz oksidaz aktiviteleri, Bölüm 3.2.2.1'e göre tayin edilmiştir.

İmmobilize Enzim : Reaksiyon sıcaklığının enzim elektrotları üzerine etkisinin incelendiği çalışmada Bölüm 3.2.2.4' te verilen yönteme göre pAA/j-GOD immobilize örnekler hazırlanmıştır. Enzim aktiviteleri, Bölüm 3.2.2.6 'da belirtilen metoda göre 15-75 °C aralığında değişen sıcaklıklarda tayin edilmiştir.

3.2.3.6.2. Elektrokimyasal yöntem

Serbest enzim : Serbest enzimin sıcaklığa karşı amperometrik aktivitesindeki değişimi araştırmak amacıyla deneyler 15-75 °C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiştir. Serbest enzim aktiviteleri Bölüm 3.2.2.2' de verilen amperometrik metod ile bu sıcaklıklarda tayin edilmiştir.

İmmobilize enzim elektrotları : Çapraz bağlayıcı olarak 0.004 moldm⁻³ glutraldehit kullanılarak pAA/j-GOD elektrotları Bölüm 3.2.2.4' te verilen yönteme göre hazırlanmıştır. İmmobilize glukoz oksidaz elektrotlarının 15-75 °C aralığındaki sıcaklıklarda amperometrik aktiviteleri Bölüm 3.2.2.6'da belirtilen metoda göre tayin edilerek araştırılmıştır.

3.2.3.7. Serbest glikoz oksidaz ve immobilize enzim elektrotlarının termal inaktivasyonu

Serbest enzim : Serbest glukoz oksidaz enziminin 60 °C 'ta termal inaktivasyonunu araştırmak amacıyla, serbest GOD enzimi (10 U) 60 °C 'ta farklı sürelerde (0 - 100 dakika) bekletildikten sonra Bölüm 3.2.2.2'de verilen yöntemle göre aktivite tayinleri çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar başlangıç aktivite değeri ile karşılaştırılarak serbest GOD enziminin termal inaktivasyon değışimi amperometrik yöntem kullanılarak incelenmiştir.

İmmobilize enzim elektrotları : İmmobilizasyonun enzimin termal inaktivasyonuna etkisini incelemek amacıyla, Bölüm 3.2.2.4'te verilen yöntemlere göre j-GOD ile pAA/j-GOD elektrotları hazırlanmış ve 60 °C'ta termal inaktivasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Enzim elektrotları (j-GOD ve pAA/j-GOD), asetat tamponu (0.05 mol/dm³, pH 5.1) içerisinde 60 °C sıcaklıkta 10 dakika-100 dakika arasında farklı sürelerde bekletilmiş, sonra Bölüm 3.2.2.6'da verildiği gibi amperometrik aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Yapılan bu termal deneyler sonucunda j-GOD ve pAA/j-GOD elektrotlarıyla elde edilen sonuçlar hem birbirleriyle hem de serbest enzimin sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

3.2.3.8. Aktivite üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

3.2.3.9.1 Kimyasal yöntem

Serbest enzim : Serbest GOD enziminin aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini tayin etmek amacıyla 1-100 mmoldm⁻³ aralığında değişen β -D-glukoz konsantrasyonları kullanılmıştır. Enzim aktivite tayinleri Bölüm 3.2.2.1 'de verilen metoda göre spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir.

İmmobilize enzim : PAA/j-GOD enzim elektrotları Bölüm 3.2.2.4' te verilen metoda göre hazırlanmıştır. İmmobilize enzim aktiviteleri Bölüm 3.2.2.6'da belirtilen metoda göre 1-100 mmoldm⁻³ substrat aralığında spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

3.2.3.8.2. Elektrokimyasal yöntem

Serbest enzim : Substrat konsantrasyonunun serbest enzimin amperometrik aktivitesi üzerine etkisini tayin etmek için 1-100 mmoldm⁻³ aralığında değişen β -D-glukoz konsantrasyonları denenmiştir. β -D-glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak serbest enzimin amperometrik akımları Bölüm 3.2.2.2 'de verilen metoda göre tayin edilmiştir.

İmmobilize enzim elektrotları : Bölüm 3.2.2.4 'te verilen metoda göre hazırlanan pAA/j-GOD elektrotlarının 0.05-100 mmoldm⁻³ aralığında değişen β -D-glukoz konsantrasyonlarında 25 °C'ta amperometrik aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Substrat konsantrasyonunun değişmesi ile amperometrik aktivitedeki değişimin araştırıldığı çalışmada immobilize enzimin kinetik özellikleri karakterize edilmiştir.

3.2.3.9. Elektroaktif bileşiklerin enzim elektrotlarının amperometrik aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması

Biyolojik numunelerde glukoz ile beraber genellikle askorbik asit, ürik asit, NH₃ vs. gibi kolay yükseltgenen bileşikler de bulunabilmektedir. Bu elektroaktif tanecikler, glukoz tayininde gerçekçi sonuç alınmasını engellemektedir. Bu nedenle 0.6 V potansiyelde askorbik asit, ürik asit, NH₄⁺, gliserinin fizyolojik ortamla uyumlu konsantrasyonları kullanılarak, enzimsiz kör elektrot (pAA/j) ve pAA/j-GOD enzim elektrotları ile amperometrik olarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca bu bileşiklere ilave olarak fizyolojik ortamda tamamen çözünmüş olarak bulunan yüklü taneciklerin etkisini araştırmak amacıyla NaCl ve KCl'ün fizyolojik ortamdaki konsantrasyonunda ölçümler gerçekleştirilmiş ve pAA/j-GOD sensörü için girişim etkileri araştırılmıştır.

İmmobilizasyon matrisinin bu tanecikleri ne oranda engellediğini tesbit edebilmek için çıplak platin ile de aynı deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.10. Glukoz oksidaz enzim elektrotlarının tekrar kullanımı

3.2.3.10.1. Kimyasal yöntem

Çalışmada, Bölüm 3.2.2.4 'te verilen metotlara göre $0.004 \text{ mol dm}^{-3}$ glutraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılarak hazırlanan, j-GOD ve pAA/j-GOD immobilize örneklerin elektrotlarının tekrar kullanılabilirlikleri spektrofotometrik yöntem ile araştırılmıştır. Bu örneklere önce Bölüm 3.2.2.6'da verilen yönteme göre 3 kez yıkama işlemi uygulanmıştır. Daha sonra her iki elektrodun Bölüm 3.2.2.6'te verilen metoda göre aktivite tayinleri 3 gün aralıklar ile yapılmış ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Çalışmada, ayrıca farklı enzim konsantrasyonlarıyla (0.5U, 10U, 20U) hazırlanmış immobilize örneklerin tekrar kullanılabilirlikleri de araştırılmıştır. Hazırlanan bu elektrotların tekrar kullanılabilirlikleri Bölüm 3.2.2.6 'da verilen yönteme göre analiz edilmiştir.

Tekrar kullanılabilirliğin incelendiği çalışmada kullanılan örnekler çalışma süresince asetat tamponu içerisinde $+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ' ta buzdolabında saklanmış ve her kullanım sonrasında elektrotların saklandığı bu asetat tamponu yenilenmiştir.

Enzim elektrotları üç gün aralıkla 17 kez kullanılmıştır ve çalışma yaklaşık 51 günlük bir süreyi kapsamaktadır.

3.2.3.10.2. Enzim elektrotlarının tekrar kullanılabilirliği

Çalışmada, Bölüm 3.2.2.4' te verilen metotlara göre hazırlanan j-GOD ve pAA/j-GOD enzim elektrotlarının amperometrik yöntemle tekrar kullanılabilirlikleri test edilmiştir. Bu enzim elektrotların amperometrik aktiviteleri Bölüm 3.2.2.6 'ya göre tayin edilerek tekrar kullanımları araştırılmıştır. Örnekler üç gün aralıklarla 17 kez kullanılmış ve çalışma toplam 51 günlük bir sürede tamamlanmıştır.

Ayrıca, farklı enzim konsantrasyonları (5 U, 10 U, 20 U) kullanılarak Bölüm 3.2.2.4' e göre hazırlanan pAA/j-GOD elektrotlarının amperometrik olarak tekrar kullanımları da araştırılarak, farklı enzim konsantrasyonlarıyla hazırlanmış elektrotların tekrar kullanımları sonucunda amperometrik aktivitelerindeki değişim incelenmiştir. Enzim elektrotları kullanım süreleri boyunca +4 °C 'ta asetat tamponu içerisinde saklanmıştır.

3.2.3.11. Enzim elektrotlarının Depolama Kararlılığı

Bölüm 3.2.2.4'te verilen yönteme göre, 0.004 mol.dm⁻³ gluteraldehit çapraz bağlayıcısı ve 10U GOD kullanılarak eş örnekler hazırlanmıştır. Bu örneklere asetat tamponu ile (0.05 mol.dm⁻³, pH 5.1) 3 kez yıkama işlemi uygulanmıştır. Daha sonra 1 ay ara ile örneklerin amperometrik aktiviteleri Bölüm 3.2.2.6' te verilen metoda göre  l mlm Őt r. Yaklaşık 5 aylık bir süreyi kapsayan raf ömrü çalışması süresince elektrotlar asetat tamponu (0,05 mol dm⁻³, pH 5.1) içerisinde, +4  C'de buzdolabında saklanmıştır. ,

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Enzim Aktivitesi Üzerine Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Etkisi

Çalışmada, GOD kimyasal aktivitesi üzerine çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla, 0.002-0.015 mol dm⁻³ aralığında glutraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılarak j-GOD immobilize örnekleri hazırlanmıştır. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi 0.004 mol dm⁻³ glutraldehit konsantrasyonunda maksimum aktiviteye ulaşılmış daha yüksek konsantrasyonlarda ise aktivitede hızlı bir düşüşün olduğu gözlenmiştir.

4.2. Amperometrik Aktivite Üzerine Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Etkisi

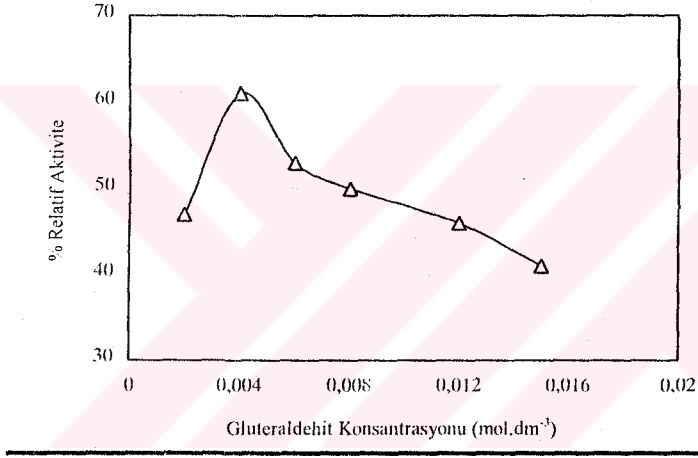
Çalışmada, j-GOD enzim elektrotlarının amperometrik aktivitesi üzerine çapraz bağlayıcı konsantrasyonunu incelemek amacıyla, 0.002-0.015 mol.dm⁻³ aralığında glutraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılmış ve Bölüm 3.2.2.4'te belirtilen yöntemle göre GOD elektrotları hazırlanmıştır. Bu elektrotların amperometrik aktiviteleri tayinleri Bölüm 3.2.2.6 'te verilen yöntemle göre tayin edilmiştir. Şekil 4.2' de görüldüğü gibi en yüksek amperometrik aktivite 0.004 mol.dm⁻³ glutraldehit konsantrasyonu için belirlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde 0.002 mol.dm⁻³ glutraldehit konsantrasyonunda düşük bir amperometrik aktivite gözlenirken, 0.004 mol.dm⁻³ 'ün üzerindeki glutraldehit konsantrasyonlarında gittikçe azalan amperometrik aktivite değerleri dikkati çekmektedir.

Düşük çapraz bağlayıcı konsantrasyonu kullanıldığında enzimin tamamı destek maddesine bağlanamadığı için bir enzim sızıntısı olmakta bunun sonucunda da amperometrik olarak düşük bir aktivite gözlenmektedir. Çapraz bağlayıcı konsantrasyonu arttıkça enzim ile enzim veya taşıyıcı arasında daha fazla çapraz bağ oluşumu ile enzim inaktivasyonu ve difüzyon kısıtlamasındaki artış sonucu katalitik aktivitede düşme görülmektedir. Bu sonuca bağlı olarak azalan aktivite değerleri kimyasal yöntemle kıyasla elektrokimyasal yöntem ile daha fazla gözlenmektedir.

Buna göre, bundan sonraki çalışmalarda çapraz bağlayıcı olarak 0.004 mol.dm⁻³ gluteraldehit kullanılarak elektrotlar hazırlanmıştır.

Çizelge 4.1. Jelatin-GOD immobilize enzim aktivitesi üzerine çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun etkisi

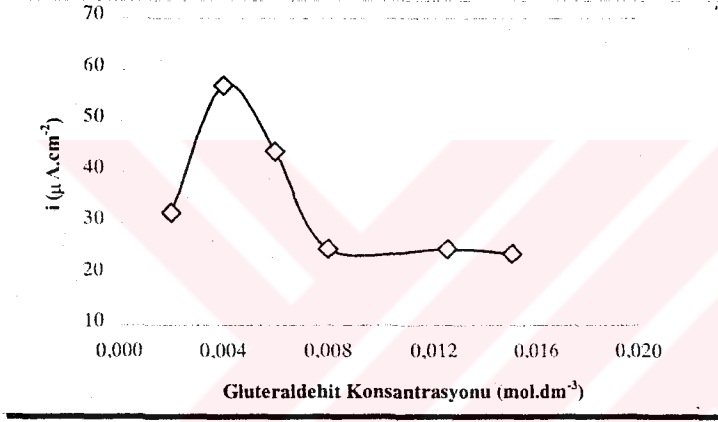
Gluteraldehit Konsantrasyonu (mol.dm ⁻³)	Relatif Aktivite %
0.002	47
0.004	61
0.006	53
0.008	50
0.012	46
0.015	41



Şekil 4.1. Jelatin-GOD immobilize enzim aktivitesi üzerine çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun etkisi

Çizelge 4.2. Jelatin-GOD Enzim elektrotlarının amperometrik aktivitesi üzerine çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun etkisi

Gluteraldehit Konsantrasyonu (mol.dm ⁻³)	Akım yoğunluğu(i) (µA. cm ⁻²)
0,002	32
0,004	57
0,006	44
0,008	25
0,0125	25
0,0150	24



Şekil. 4.2. Jelatin-GOD enzim elektrotlarının amperometrik aktivitesi üzerine çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun etkisi

4.3. Poliakrilamit ilavesinin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

4.3.1. Kimyasal yöntem

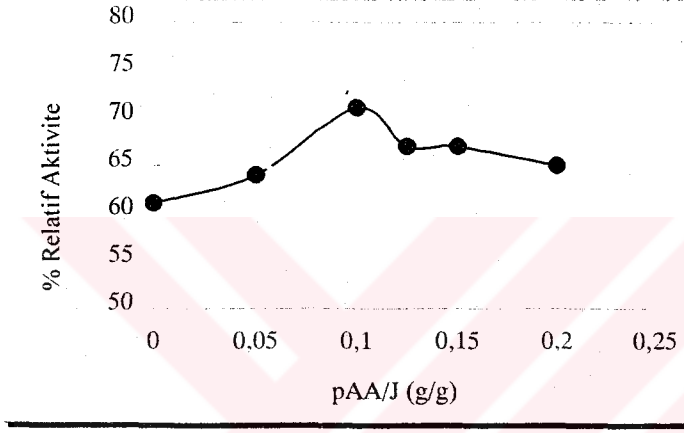
İmmobilizasyonu geliştirmek amacıyla taşıyıcı jelatine farklı oranlarda poliakrilamit (0.050 - 0.200 pAA/J, g/g) ilave edilerek Bölüm 3.2.2.6' te verilen metoda göre GOD elektrotları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu elektrotların kimyasal aktiviteleri Bölüm 3.2.2.4' de verilen yöntemle göre spektrofotometrik olarak tayin edilmiş, elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Poliakrilamit ilavesi 0.100 pAA/j oranına kadar kimyasal aktivitede bir artış gözlenmektedir. PAA/j oranının daha fazla artırılması ise aktivitede düşüşe neden olmaktadır. Şekil 4.3 'ten de görüldüğü gibi 0.100 (g/g) poliakrilamit/jelatin oranında en yüksek kimyasal aktivite değerine ulaşılmıştır.

4.3.2. Amperometrik aktivite üzerine poliakrilamit konsantrasyonunun etkisi

Çalışmada destek maddesi olarak farklı oranlarda poliakrilamit- jelatin kombinasyonu (0.050, 0.100, 0.125, 0.150, 0.200 pAA/j, g/g) kullanılarak hazırlanan glukoz oksidaz elektrotlarının amperometrik aktiviteleri Bölüm 3.2.2.6'da verilen yöntemle göre tayin edilmiştir. Poliakrilamit elektrot üzerindeki taşıyıcı yüzeyini genişleterek enzim aktivitesini artırmaktadır. Sadece jelatinin kullanıldığı elektrot sistemleriyle elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında poliakrilamit ilavesiyle amperometrik aktivitede % 54 oranında artış olduğu gözlenmiştir. Buna göre optimum poliakrilamit + jelatin oranı Şekil 4.4'ten de görüldüğü gibi 0.100 olarak tesbit edilmiştir.

Çizelge 4.3. Poliakrilamid ilavesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

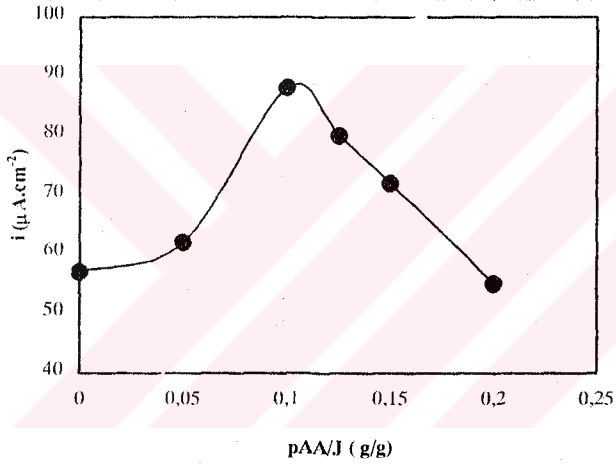
PAA/j oranı (g/g)	% Relatif Aktivite
0.000	61
0.050	64
0.100	71
0.125	67
0.150	67
0.200	65



Şekil 4.3. Poli akrilamid ilavesinin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.4. Amperometrik aktivite üzerine poliakrilamit konsantrasyonunun etkisi

pAA/j Oranı (g/g)	Akım yoğunluğu (i) ($\mu\text{A. cm}^{-2}$)
0,000	57
0,050	62
0,100	88
0,125	80
0,150	72
0,200	55



Şekil. 4.4. Amperometrik aktivite üzerine poliakrilamit konsantrasyonunun etkisi

4.4. Jel Miktarının GOD Aktivitesi Üzerine Etkisi

4.4.1. Kimyasal Aktivite

Çalışmada GOD aktivitesi üzerine jel miktarının etkisini incelemek amacıyla 0.0083-0.0248 g aralığında taşıyıcı poliakrilamit ve jelatin kullanılarak Bölüm 3.2.2.4'te belirtilen metoda göre pAA/j-GOD elektrotları hazırlanmıştır. Şekil 4.5 'ten de görüldüğü gibi jel konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesi azalmakta fakat belli bir değerden itibaren artık değişmemektedir. İmmobilize örneklerin aktivite ve mekanik dayanıklıkları değerlendirildiğinde 0.0165 g (pAA-j) jel miktarı optimum olarak seçilmiştir.

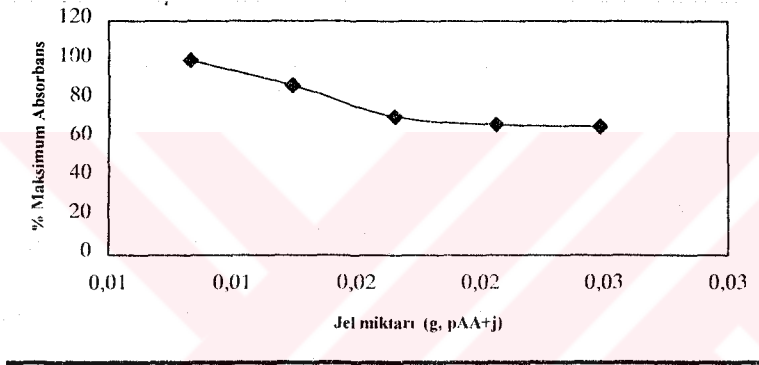
4.4.2. Amperometrik Aktivite Üzerine jel miktarının etkisi

Çalışmada amperometrik aktivite üzerine jel miktarının etkisini incelemek amacıyla 0.0083-0.0248 g (pAA+j) aralığında jel miktarları kullanılarak Bölüm 3.2.2.4 'de verilen yöntemle göre pAA/j-GOD (pAA/j=0.100) elektrotları hazırlanmıştır.

Elektrotların amperometrik aktiviteleri Bölüm 3.2.2.6'te verilen yöntemle göre tayin edilmiştir. Şekil 4.6 'dan görüldüğü gibi jel miktarı arttıkça sensör aktivitesi azalmaktadır. Bu durum, elektrot yüzeyindeki jel miktarının artmasıyla elektrot yüzeyinde substrat-ürün difüzyonunun zorlaşmasından kaynaklanmaktadır. Elektrotların mekanik dayanıklılıkları ve sensör aktiviteleri dikkate alındığında en uygun jel miktarı 0.0165 g (pAA+j) jel miktarı kullanılarak elde edilmektedir. Bu sonuca göre daha sonraki çalışmalarda kullanılan örnekler 0.0165 g (pAA+j) kadar jel kullanılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 4.5. GOD Aktivitesi üzerine jel miktarının etkisi

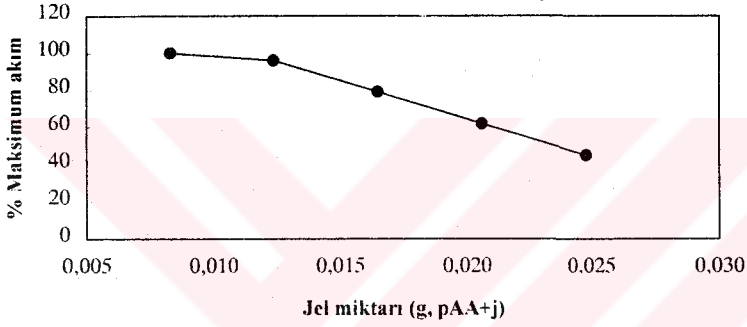
Jel miktarı (pAA+j) (g)	% Maksimum Absorbans
0,0083	100
0,0124	87
0,0165	71
0,0206	67
0,0248	66



Şekil. 4.5. GOD aktivitesi üzerine jel miktarının etkisi

Çizelge 4.6. Amperometrik aktivite üzerine jel miktarının etkisi

Jel miktarı (pAA+j) (g)	% Maksimum Akım
0,0083	100
0,0124	96
0,0165	79
0,0206	62
0,0248	45



Şekil 4.6 Amperometrik aktivite üzerine jel miktarının etkisi

4.5. Aktivite Üzerine Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

4.5.1. Kimyasal yöntem

Serbest enzim : Enzim konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisinin incelendiği çalışmada 0.5U-40U aralığında değişen enzim konsantrasyonları denenmiştir. Aktivite tayinleri Bölüm 3.2.2.1'de anlatılan metoda göre spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar immobilize GOD elektrotları ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.7'de verilmiştir.

İmmobilize enzim: Enzim konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisinin araştırılması amacıyla, değişen enzim konsantrasyonlarında (0.5U-40U) GOD enzimi kullanılarak Bölüm 3.2.2.4'te belirtilen yöntemle göre enzim elektrotları hazırlanmıştır. Elektrotlara 3 kez yıkama işlemi yapılarak bağlanmayan enzim uzaklaştırılmış ve aktivite tayinleri Bölüm 3.2.2.4' te verilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.7'de pAA/j-GOD enzim elektrotlarının amperometrik aktivite tayin sonuçları verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi serbest enzim ile yapılan çalışmada serbest GOD kullanıldığında 20U'da maksimum aktiviteye ulaşılabilirken, immobilizasyon çalışmasında 10U GOD'un immobilizasyonu ile maksimum aktivite değerine ulaşılabilir, bu noktadan sonra aktivitede önemli bir değişiklik olmamaktadır.

4.5.2. Amperometrik aktivite üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi

Serbest enzim : Serbest enzimin amperometrik aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla 0.5U- 40 U arasında GOD kullanılarak Bölüm 3.2.2.2'de verilen yöntemle göre amperometrik aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrotu olarak, yüzey temizliği yapılmış çıplak platin elektrot ve enzimsiz olarak kaplanmış kör pAA/j elektrotu kullanılarak serbest enzimin amperometrik aktivitesi tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.8 'de verilmiştir.

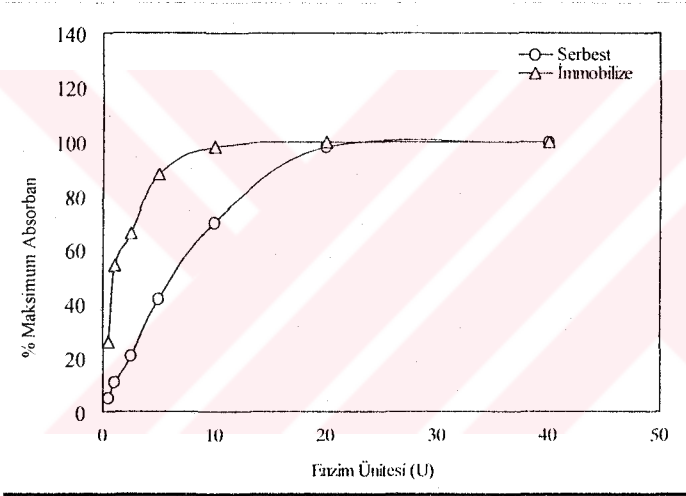
İmmobilize enzim elektrotları: Bölüm 3.2.2.4 'te verilen yöntemle göre 0.5U- 40U aralığında değişen enzim konsantrasyonlarında pAA/j-GOD elektrotları hazırlanmıştır. Bu elektrotların Bölüm 4.5 'e göre yıkamaları yapılmış ve elektrotların amperometrik aktiviteleri Bölüm 3.2.2.6 'ya göre tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da verilmiştir.

Çalışmada immobilize enzim elektrotlarının respons sürelerine karşı enzim konsantrasyon değerleri grafiğe geçirildiğinde, 0,5U-5U enzim konsantrasyonları aralığında cevap süresinin azaldığı gözlenmekte iken, cevap süresi 10U ve 20U enzim konsantrasyonunda değişmeden sabit kalmaktadır. Enzim konsantrasyonu 40U olduğunda ise respons süresinin yeniden artmaya başladığı görülmüştür (Şekil 4. 10).



Çizelge. 4.7 Aktivite üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi

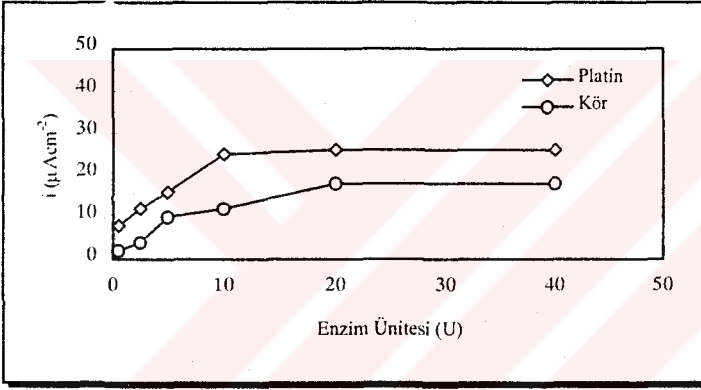
Enzim ünitesi (U)	% Maksimum Absorbans	
	Serbest GOD	İmmobilize GOD
0.5	5	26
1.0	11	56
2.5	21	66
5.0	42	88
10	70	98
20	98	100
40	100	100



Şekil 4.7 Aktivite üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi

Çizelge 4.8 Serbest enzim amperometrik aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi

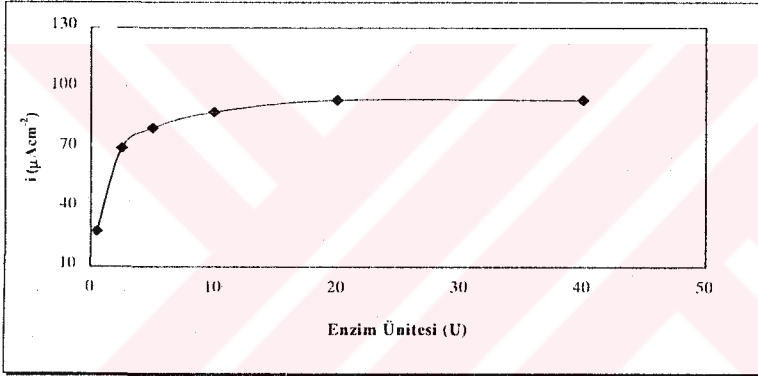
Enzim Konstrasyonu (U)	Akım Yoğunluğu (i) ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)	
	Serbest Enzim	
	Platin	Kör (pAA/j)
0.5	8	2
2,5	12	4
5.0	16	10
10	25	12
20	26	18
40	26	18



Şekil 4.8 Serbest enzim amperometrik aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi

Çizelge 4.9 PAA/j-GOD Amperometrik aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi

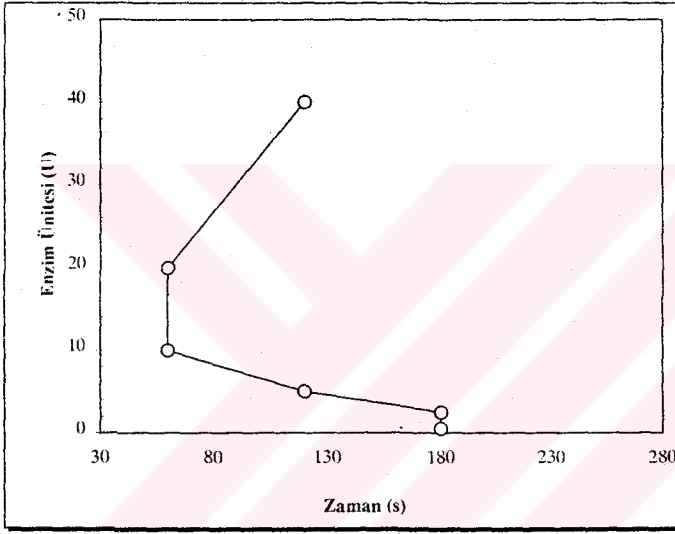
Enzim Konstrasyonu (U)	Akım Yoğunluğu (i) ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)
0.5	28
2.5	70
5.0	80
10	88
20	94
40	94



Şekil 4.9 PAA/j-GOD Amperometrik aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi

Çizelge 4.10 PAA/j-GOD Sensörü için respon süresi enzim konsantrasyonu ilişkisi

Enzim ünitesi (U)	Respon süresi (s)
0,5	160
2,5	160
5,0	100
10	40
20	40
40	100



Şekil 4.10 PAA/j-GOD Sensörü için respon süresi enzim konsantrasyonu ilişkisi

4.6. Aktivite Üzerine pH'ın Etkisi

Serbest Enzim : Serbest GOD aktivitesi üzerine pH etkisini tayin etmek ve optimum pH'ın tayin edilmesi için pH 4-9 aralığında tampon çözeltiler kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.11'den görüldüğü gibi serbest GOD için optimum pH 5.1 olarak tesbit edilmiştir.

İmmobilize enzim : İmmobilize GOD aktivitesi üzerine pH etkisini tayin etmek için, pAA/j-GOD elektrotları Bölüm 3.2.2.4'te verilen yönteme göre hazırlanmıştır. Elektrotların immobilize enzim aktiviteleri pH 4-9 aralığında tampon çözeltiler kullanılarak Bölüm 3.2.2.4'te verilen yönteme göre spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. pAA/j -GOD elektrotlarının optimum pH değeri 7 olarak tesbit edilmiştir (Şekil 4.12).

4.7. Elektrokimyasal yöntem

Serbest Enzim: Serbest glukoz oksidaz enziminin amperometrik aktivitesi üzerine pH etkisinin araştırıldığı çalışmada pH 4-9 aralığında tampon çözeltileri ile çalışılmıştır. Çalışma elektrotu olarak kullanılan platin elektrot mekanik ve kimyasal yüzey temizliği yapıldıktan sonra kullanılmıştır. Amperometrik enzim aktivite tayinleri Bölüm 3.2.2.2'de verilen elektrokimyasal metod kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Serbest GOD'un optimum pH değeri 5.1 olarak belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.13'te verilmiştir.

İmmobilize enzim elektrotları : PAA/j -GOD elektrotlarının amperometrik aktivitesi üzerine pH etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.2.2.4'e göre enzim elektrotları hazırlanmıştır. Elektrotların amperometrik aktiviteleri pH 4-9 aralığında tampon çözeltiler kullanılarak Bölüm 3.2.2.6'da verilen elektrokimyasal yönteme göre tayin edilmiştir. Şekil 4.14'te görüldüğü gibi pAA/j -GOD elektrotlarının amperometrik tayinleri sonucunda optimum pH değeri 7 olarak tesbit edilmiştir.

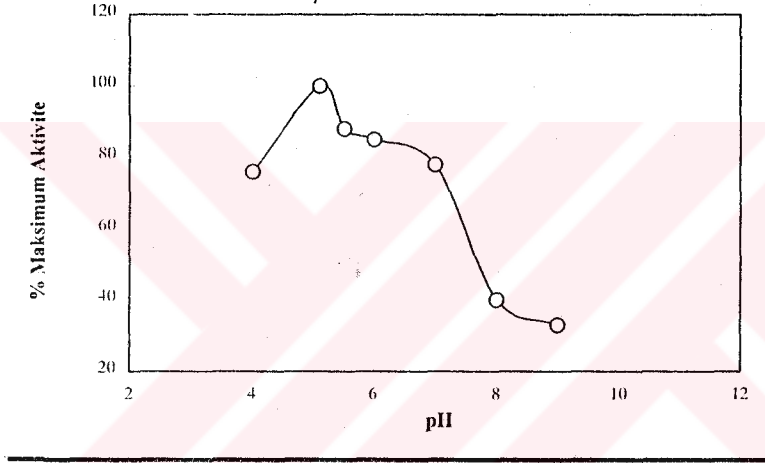
GOD enziminin gluteraldehit çapraz bağlayıcısı ile kimyasal çapraz bağlama yöntemiyle geliştirmiş olduğumuz destek materyaline

immobilizasyonu sonucunda optimum pH değerinin bazik bölgeye doğru kaydığı gözlenmiştir. Kimyasal ve elektrokimyasal çalışmaların sonucunda elde edilen değerler immobilizasyonun enzimin pH kararlılığını artırdığını ve bunun sonucu olarak daha uç pH larda daha yüksek enzim aktivitesi gözlendiğini göstermektedir.

Enzimlerin aktif merkezlerinde bulunan iyonlaşabilen gruplar, iyonlaşabilecekleri pH'larda enzim aktif bölgesinin konformasyonel yapısının korunmasını sağlarlar. Bu gruplarda ekstrem pH larda görülen iyonizasyon değişlikleri enzimin aktif bölgesinde bozulmaya ve dolayısıyla katalitik mekanizma ve konformasyonel yapının her ikisinin birden bozulmasına neden olabilir (Erarslan 2002). Ayrıca, immobilizasyon sonucunda doğal enzim ile kıyaslandığında immobilize olmuş enzim üzerindeki bazı fonksiyonel gruplarla bağlanmalara katılmış ve bundan dolayı mikroçevresi değişmiştir. Mikro çevresinin değişmesi enzimin optimum pH'ında yaklaşık olarak 2 pH birimi kadar bir artışa neden olmaktadır. Bu çalışmada da benzer bir durum söz konusudur.

Çizelge 4.11. Serbest GOD aktivitesi üzerine pH etkisi

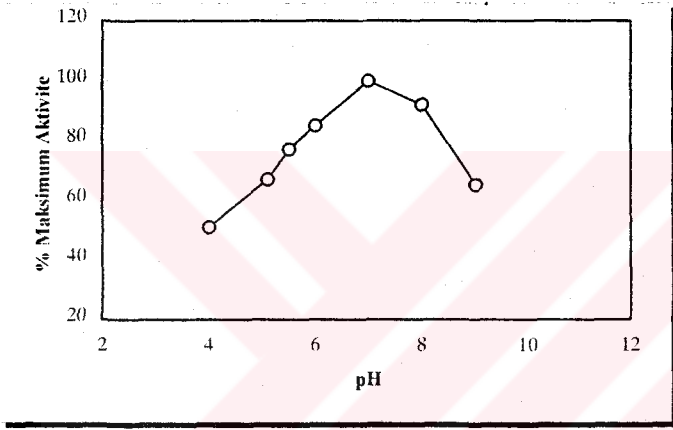
pH	% Maksimum Aktivite
4	76
5,1	100
5,5	88
6	85
7	78
8	40
9	33



Şekil.4.11. Serbest GOD aktivitesi üzerine pH etkisi

Çizelge 4.12. PAA/j –GOD aktivitesi üzerine pH etkisi

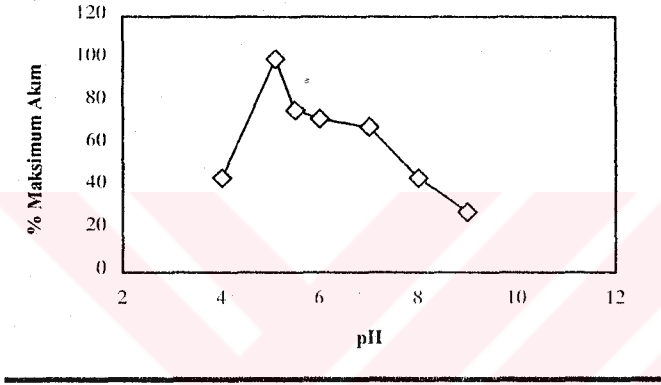
PH	% Maksimum Aktivite
4	51
5,1	67
5,5	77
6	85
7	100
8	92
9	65



Şekil 4.12. pAA/j –GOD aktivitesi üzerine pH etkisi

Çizelge 4.13 Amperometrik Serbest aktivite üzerine pH etkisi

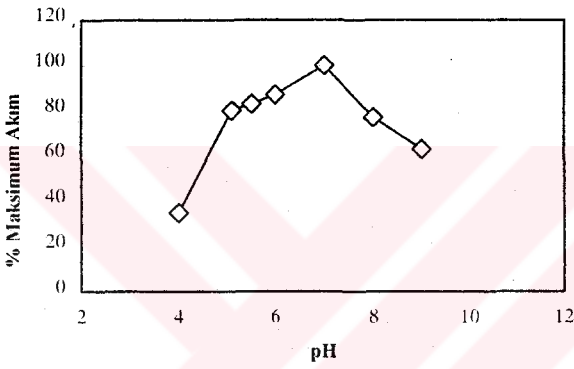
PH	% Maksimum Akım
4	44
5,1	100
5,5	76
6	72
7	68
8	44
9	28



Şekil 4.13. Amperometrik Serbest aktivite üzerine pH etkisi

Çizelge 4.14 PAA/j –GOD Sensörlerinin amperometrik aktivitesi üzerine pH etkisi

PH	% Maksimum Akım
4	35
5,1	80
5,5	83
6	87
7	100
8	77
9	63



Şekil.4.14. PAA/j-GOD sensörlerinin amperometrik aktivitesi üzerine pH etkisi

4.8. Aktivite Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Serbest enzim: Serbest glukoz oksidaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 15-75 °C sıcaklık aralığında reaksiyonlar gerçekleştirilerek kimyasal aktivite tayinleri yapılmıştır. Şekil 4.15'ten de görüldüğü serbest glukoz oksidaz enzimi 45 °C 'ta maksimum aktivite göstermektedir. Daha yüksek sıcaklık değerlerine çıktığında enzimin denatürasyonu sonucunda aktivitenin düştüğü gözlenmektedir.

İmmobilize enzim : Bölüm 3.2.2.4 'e göre hazırlanan pAA/j-GOD elektrotlarının 15-75 °C aralığındaki sıcaklıklarda kimyasal aktivite tayinleri yapıldığında serbest enzimde olduğu gibi maksimum aktivite değerine 45 °C 'de ulaştığı görülmektedir (Şekil 4.16).

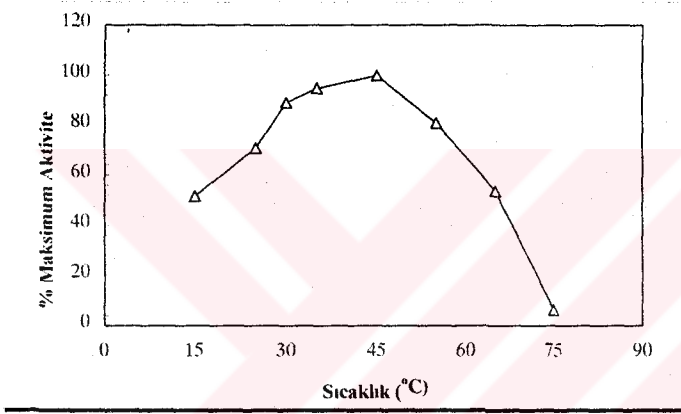
4.9. Amperometrik Aktivite Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Serbest enzim : Serbest glukoz oksidaz enzimin amperometrik aktivitesi 15-75 °C arasındaki sıcaklıklarda çalışılarak tayinler gerçekleştirilmiştir. Serbest enzim ile belirtilen sıcaklıklarda reaksiyonlar gerçekleştirilerek amperometrik aktiviteleri ölçülmüştür (Şekil 4.17). Şekil'den de görüldüğü gibi en yüksek akım yoğunluğu 45°C' ta elde edilmiştir. Sıcaklığın daha fazla artırılması akım değerinin düşmesine neden olmaktadır.

İmmobilize enzim elektrotları: Sıcaklığın immobilize glukoz oksidaz elektrotlarının amperometrik aktivitesi üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmalarda deneyler 15-75 °C sıcaklıkları arasında gerçekleştirilerek amperometrik aktiviteleri tayin edilmiştir. PAA/j-GOD elektrotlarının belirtilen sıcaklıklarda ve 50 mmol dm⁻³ glukoz varlığında amperometrik aktiviteleri akım yoğunluğu cinsinden tayin edilmiştir. Elektrotların en yüksek akım yoğunluğuna 45 °C ' ta ulaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.18). Yapılan bu sıcaklık deneyler sırasında 45 °C'ın üzerindeki sıcaklıklara çıktığında akım yoğunluklarının düştüğü gözlenmektedir. Bu durum, bu sıcaklıklarda glukoz oksidaz enziminin denatürasyona uğraması ve katalitik aktivitesinin azalması ile açıklanabilir.

Çizelge 4.15 Serbest GOD Aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi

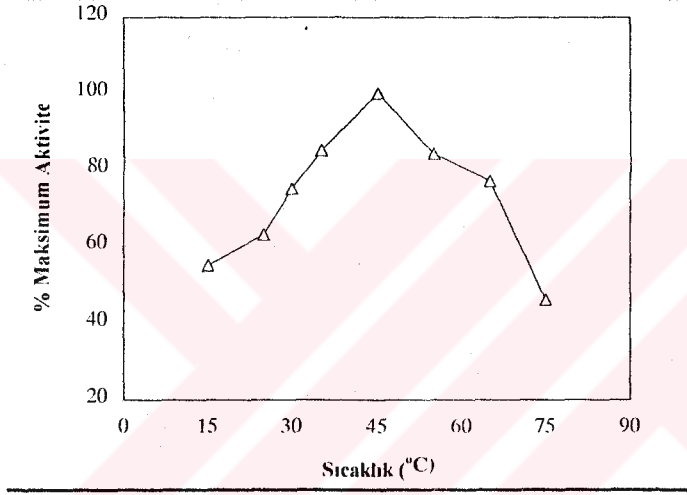
Sıcaklık (°C)	% Maksimum Aktivite
15	52
25	71
30	89
35	95
45	100
55	81
65	54
75	6



Şekil 4.15 Serbest GOD Aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi

Çizelge 4.16 PAA/j-GOD Aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

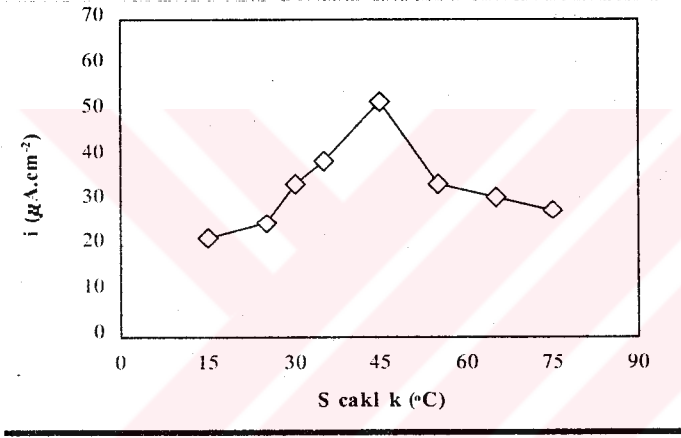
Sıcaklık (°C)	% Maksimum Aktivite
15	55
25	63
30	75
35	85
45	100
55	84
65	77
75	46



Şekil 4.16 PAA/j-GOD aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Çizelge 4.17 Serbest GOD Amperometrik aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

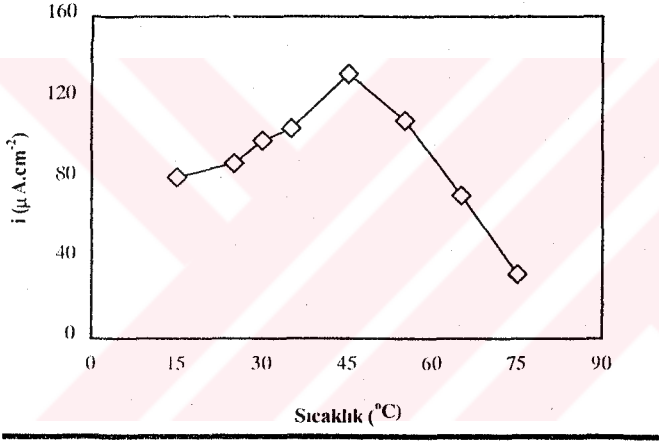
Sıcaklık(°C)	Akım yoğunluğu (i) ($\mu\text{A cm}^{-2}$)
15	22
25	25
30	34
35	39
45	52
55	34
65	31
75	28



Şekil 4.17 Serbest GOD amperometrik aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Çizelge 4.18 PAA/j-GOD Amperometrik aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık(°C)	Akım Yoğunluğu (i) ($\mu\text{A cm}^{-2}$)
15	81
25	88
30	99
35	105
45	132
55	109
65	72
75	32



Şekil 4.18 PAA/j-GOD Amperometrik aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

4.10. Serbest glukoz oksidaz ve immobilize enzim elektrotlarının termal inaktivasyonu

Serbest enzim: Serbest glukoz oksidaz enziminin 60 °C 'ta termal inaktivasyonunu araştırmak amacıyla, 10U serbest GOD enzimi 60 °C 'ta farklı sürelerde (10-100 dakika) bekletildikten sonra Bölüm 3.2.2.2'de verilen yöntemle göre aktivite tayinleri yapılmıştır. Serbest GOD enziminin 60 °C' ta termal kararlılık deneyleri sonucunda ilk 10 dakikada % 50 termal inaktivasyona uğradığı, 100 dakika sonra ise %80 oranında aktivite kaybına uğradığı gözlenmiştir(Şekil 4.19).

İmmobilize elektrotlar: Jelatin-GOD ve poliakrilamid-jelatin-GOD elektrotlarının (gluteraldehit, 10 U GOD) termal kararlılığını incelemek amacıyla, Bölüm 3.2.2.6'da verilen yöntemlere göre j-GOD ile pAA/j-GOD elektrotları hazırlanmış ve 60 °C'ta termal inaktivasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. İmmobilize j-GOD ve pAA/j-GOD enzim elektrotları, 60 °C'ta asetat tamponu (0.05 mol.dm⁻³, pH 5.1) içerisinde 10 dakika-100 dakika arasında farklı sürelerde bekletildikten sonra Bölüm 3.2.2.6'da verilen metoda göre amperometrik aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir.

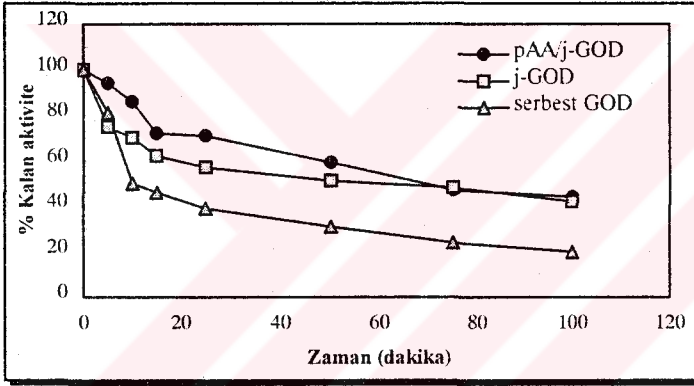
Yapılan termal kararlılık deneyleri sonucunda, her iki elektrot sisteminin de 60 °C'ta serbest enzime göre termal kararlılıklarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Serbest GOD enzimi 10 dakikalık bir sürede % 50 oranında termal inaktivasyona uğrarken aynı sürede j-GOD elektrotu % 30, pAA/j-GOD elektrotu ise % 14 oranında bir inaktivasyona uğramaktadır. Enzim elektrotlarının 60 °C'ta 100 dakika inkübasyonu sonucunda j-GOD sensörü aktivitesini % 42 , pAA/j-GOD sensörü ise % 44 oranında korumaktadır(Şekil 4.19).

Protein veya enzim moleküllerinin hassas tersiyer yapısının çapraz bağ oluşturucu reaksiyonlarla kuvvetlendirilmesi onların inaktivasyona karşı kararlılıklarını artırmaktadır. Kimyasal çapraz bağlar moleküle ağırs bir yapı kazandırarak inaktivasyon hızını azaltırlar. Enzim molekülünün doğal yapısının sabitleştirilmesi molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlar oluşturulması ile gerçekleştirilir (Wong 1992).

Çalışmada, glukoz oksidaz enzimi gluteraldehit çapraz bağlayıcısı ile hem jelatin, hem de poliakrilamid-jelatin olan destek maddesi kullanılarak kimyasal çapraz bağlama yöntemine göre immobilize edilmiştir. Gluteraldehit çapraz bağlayıcısı molekülündeki karbonil grubu ile protein molekülündeki lizin kalıntılarının α -amino grubu, sisteinin sülfidril grupları, tirozin ve histidin kalıntılarının fenol ve imidazol grupları ile bazı peptitlerin N-terminal amino grupları arasında spesifik olmayan tarzda schiff bazları oluşturarak moleküller arası veya molekül içi çapraz bağlar meydana getirmektedir. Böylece gluteraldehit çapraz bağlayıcısı ile enzim molekülü ağısı bir yapı kazanarak, immobilizasyon işlemi ile enzimin inaktivasyon hızını azalmaktadır. Bu çalışmada da benzer bir durum gözlenmiştir.

Çizelge 4.19 Serbest GOD enzimi ve j-GOD ile pAA/j-GOD enzim elektrotlarının termal inaktivasyonu

60 °C'ta İnaktivasyon süresi(dakika)	% KALAN AKTİVİTE		
	Serbest GOD	j-GOD	PAA/j-GOD
0	100	100	100
10	50	70	86
15	46	62	72
25	39	57	71
50	31	51	59
75	24	48	47
100	20	42	44



Şekil. 4.19 Serbest GOD enzimi ve j-GOD ile pAA/j-GOD enzim elektrotlarının termal inaktivasyonu

4.11. Aktivite Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Serbest enzim: Serbest glukoz oksidaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi farklı konsantrasyonlardaki β -D glukoz ($1-100 \text{ mmol.dm}^{-3}$) kullanılarak incelenmiştir. Serbest glukoz oksidaz enzimi için maksimum aktiviteye 50 mmol.dm^{-3} β -D glukoz konsantrasyonunda ulaşılmış, bu konsantrasyondan daha yüksek konsantrasyonlarda ise aktivitede önemli bir değişiklik gözlenmemiştir.

İmmobilize enzim: Çalışmada hazırlanan pAA/j-GOD elektrotlarının $1-100 \text{ mmol.dm}^{-3}$ aralığında değişen β -D glukoz çözeltileriyle kimyasal aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. İmmobilize enzim ile 50 mmol.dm^{-3} β -D glukoz konsantrasyonunda maksimum aktivite değerine ulaşılmıştır, daha yüksek substrat konsantrasyonlarında ise değişiklik tesbit edilmemiştir.

Kinetik özellikler: İmmobilize ve serbest glukoz oksidaz enziminin kinetik özellikleri incelenmiş ve çalışma sonuçlarının Lineveawer Burk grafikleri Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de verilmiştir. Bu çalışmada V_m ve K_m sabitleri hesaplanmıştır. Serbest glukoz oksidazın V_m değeri ile immobilize glukoz oksidazın (pAA/j-GOD) V_m değerini karşılaştırdığımızda, immobilizasyon sonucunda enzim aktivitesinde yaklaşık %31 kadar bir düşüş olduğu gözlenmiştir. Genellikle, immobilizasyon işlemi sonunda difüzyon kısıtlaması ve enzim inaktivasyonu gibi nedenlerden dolayı immobilize enzimin katalitik aktivitesi orjinal enzime göre düşüş göstermektedir. Bu çalışmada da benzer bir sonuç elde edilmiştir.

Serbest glukoz oksidaz enzimi için;
 $K_m = 11.10 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $V_m = 0.541 \text{ } \mu\text{mol.dk}^{-1}\text{ml}^{-1}$
pAA/j-GOD immobilize enzim elektrotu için;
 $K_m = 1.67 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $V_m = 0.372 \text{ } \mu\text{mol.dk}^{-1}\text{ml}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Sonuçlar karşılaştırıldığında elektrot yüzeyine immobilize olmuş GOD enziminin maksimum aktivitesinin yarısına ulaşmak için gereken substrat konsantrasyonu (Michaelis Menten sabiti, K_m) serbest enzim için elde edilen sabitten yaklaşık 7 kat daha olduğu tesbit edilmiştir.

konsantrasyonu (Michaelis Menten sabiti, K_m) serbest enzim için elde edilen sabitten yaklaşık 7 kat daha olduğu tesbit edilmiştir.

4.12 Amperometrik Aktivite Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Serbest enzim: Çalışmada amperometrik serbest glukoz oksidaz aktivitesi

1-100 mmol dm^{-3} aralığında değişen β -D glukoz konsantrasyonları kullanılarak tayin edilmiştir. Serbest enzim maksimum akım yoğunluğuna 50 mmol. dm^{-3} β -D glukoz konsantrasyonunda ulaşmıştır, daha yüksek substrat konsantrasyonlarında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

İmmobilize enzim elektrotları: Bölüm 3.2.2.4'e göre hazırlanan pAA/j-GOD elektrotlarının 0.05-100 mmol dm^{-3} aralığında değişen β -D glukoz konsantrasyonlarına karşı akım yoğunlukları araştırılmıştır. PAA/j-GOD elektrotları ile yapılan çalışmada maksimum akım yoğunluğu değerine 50 mmol dm^{-3} β -D glukoz konsantrasyonunda ulaşılmıştır. Bu konsantrasyondan daha yüksek değerlere çıkıldığında akım yoğunluğunda önemli bir artış gözlenmemiştir. Bütün substrat çalışmaları değerlendirilerek çalışma boyunca yapılan tayinlerde 50 mmol. dm^{-3} β -D glukoz konsantrasyonu kullanılmıştır.

Kinetik özellikler: Serbest ve immobilize enzimin amperometrik yöntemle kinetik özellikleri araştırıldığı çalışmada Lineveawer Burk grafikleri Şekil 4.22 ve 4.23'te gösterilmiştir.

Serbest glukoz oksidaz enzimi için;
 $K_m = 7.75 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $I_m = 25 \text{ } \mu\text{A.cm}^{-2}$

İmmobilize pAA/j-GOD enzim elektrotları için;
 $K_m = 6.5 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $I_m = 88 \text{ } \mu\text{A.cm}^{-2}$

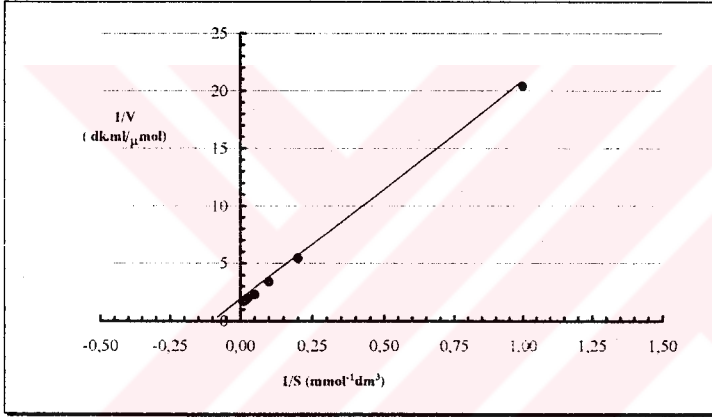
PAA/j-GOD sensörlerinin I_m değerini serbest enzim ile karşılaştırdığımızda, enzim elektrotlarının I_m değerinin oldukça yüksek olduğu gözlenmektedir. Enzim elektrotlarında, enzim elektrot yüzeyine

daha kısa sürede yüksek bir akım değerine ulaşılabilir. Oysa, serbest enzim ile yapılan elektrokimyasal çalışmada çözelti içerisinde dağılık olarak bulunan enzimin çok az bir kısmı reaksiyona girebilmekte ve bu da daha az elektron aktarımı olmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak, enzim miktarı serbest ve immobilize çalışma için aynı olmasına rağmen serbest enzim % 71.6 kadar kayıp ile reaksiyonu tamamlamaktadır.

Çalışmada respons süresine karşı glukoz konsantrasyonları grafiğe geçirildiğinde respons süresi artan glukoz konsantrasyonuna paralel olarak artmaktadır (Şekil 4.24). Düşük glukoz konsantrasyonlarında reaksiyon platin elektrot üzerindeki film yüzeyinde gerçekleşmektedir. Yüksek glukoz konsantrasyonlarında ise hem yüzey reaksiyonu hem de jele difüzleneren glukozun reaksiyonu söz konusudur. Bu durum yüksek glukoz konsantrasyonlarında substratın difüzyon süresine bağlı olarak respons süresinin uzamasına neden olmaktadır.

Çizelge 4.20. Serbest glukoz oksidaz aktivite-substrat konsantrasyonu ilişkisi

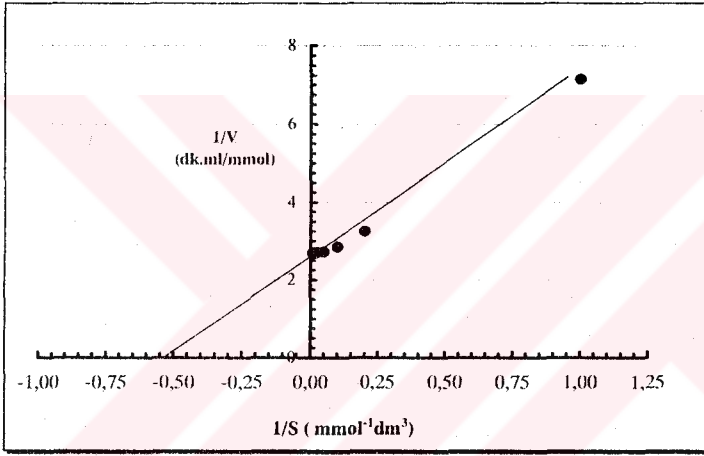
$1/S$ ($\text{mmol}^{-1} \text{dm}^3$)	$1/V$ (dk.ml. μmol^{-1})
1	20,4
0,2	5,44
0,1	3,41
0,05	2,28
0,025	1,95
0,02	1,85
0,0125	1,72
0,01	1,70



Şekil. 4.20 Serbest GOD Kimyasal Substrat Çalışması Lineveawer Burk grafiği

Çizelge.4.21 AA/j-GOD elektrotlarının aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

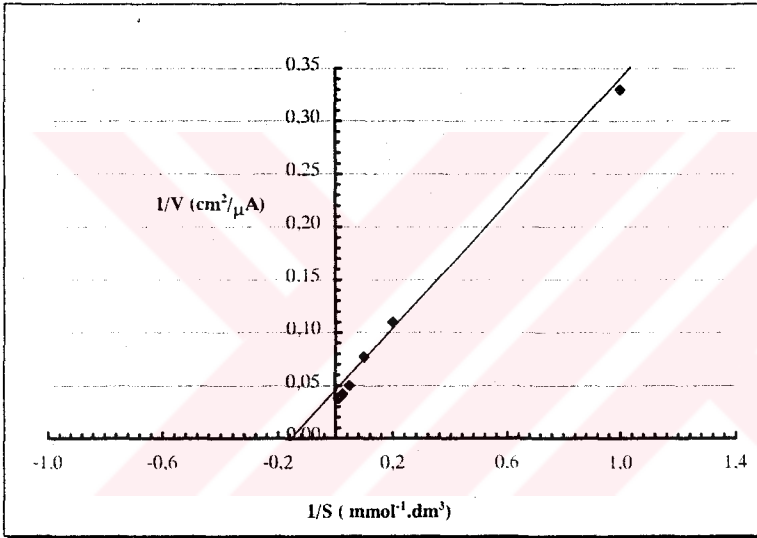
$1/S$ (mmol ⁻¹ dm ³)	$1/V$ (dk.ml. μ mol ⁻¹)
1	7,14
0,2	3,25
0,1	2,85
0,05	2,72
0,025	2,71
0,02	2,69
0,0125	2,69
0,01	2,69



Şekil .4.21 pAA/j-GOD elektrotlarının aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi Lineveawer Burk grafiği

Çizelge 4.22. Serbest glukoz oksidaz amperometrik aktivite-substrat konsantrasyonu ilişkisi

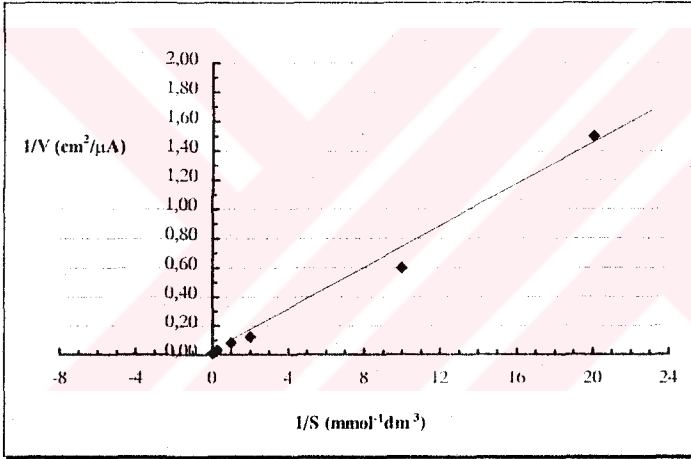
$1/S$ ($\text{mmol}^{-1} \text{dm}^3$)	$1/V$ ($\text{cm}^2 \cdot \mu\text{A}^{-1}$)
1	0,33
0,2	0,11
0,1	0,077
0,05	0,05
0,025	0,042
0,02	0,04
0,0125	0,038
0,01	0,038



Şekil.4.22 Serbest Glukoz oksidaz Amperometrik aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi, Lineaver-Burk grafiği

Çizelge 4.23 PAA/j-GOD Amperometrik aktivite-substrat konsantrasyonu ilişkisi

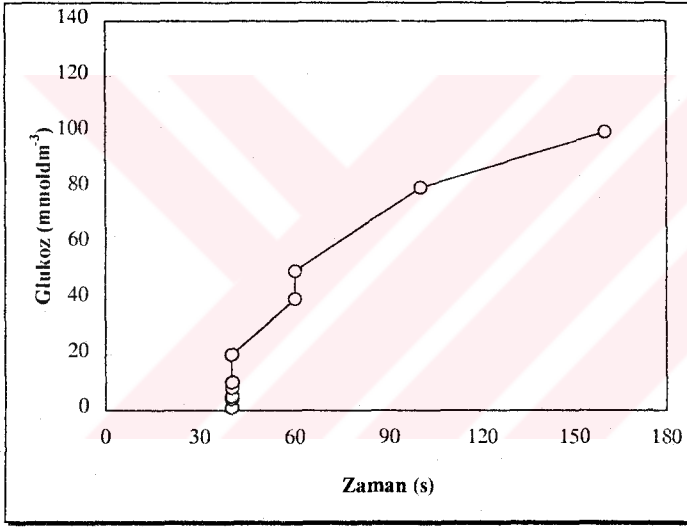
$1/S$ ($\text{mmol}^{-1} \text{dm}^3$)	$1/V$ ($\text{cm}^2 \cdot \mu\text{A}$)
20	1,5
10	0,6
2	0,125
1	0,083
0,25	0,033
0,2	0,0167
0,125	0,015
0,1	0,0143
0,05	0,0125
0,025	0,011
0,02	0,011
0,0125	0,011
0,01	0,011



Şekil.4.23 PAA/j-GOD Amperometrik aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi, Lineveawer Burk Grafiği

Çizelge 4.24* PAA/j-GOD Sensörü için respons süresi glukoz konsantrasyonu ilişkisi

Glukoz Konsantrasyonu (mmoldm^{-3})	Respons süresi (s)
1	40
4	40
5	40
8	40
10	40
20	40
40	60
50	60
80	100
100	160



Şekil 4.24 PAA/j-GOD Sensörü için respons süresi glukoz konsantrasyonu ilişkisi

4.13 Elektroaktif Bileşiklerin Enzim Elektrotlarının Amperometrik Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çalışmada, immobilize enzim elektrotlarının elektroaktif taneçiklerden ne oranda etkilendiği araştırılmıştır. Askorbik asit, ürik asit, NH_4^+ , gliserin, NaCl ve KCl gibi fizyolojik ortamda bulunabilecek bileşiklerin fizyolojik ortamla uyumlu konsantrasyonları kullanılarak çıplak Pt, enzimsiz pAA/j (kör) ve pAA/j-GOD enzim elektrotları ile amperometrik aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Askorbik asitin $0.15 \text{ mmol dm}^{-3}$ ve 0.5 mmol dm^{-3} lik konsantrasyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda hem kör elektrotlar hem de enzim elektrotları ile önemli bir girişimin olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca, ürik asit (0.5 mmol dm^{-3}) ile yapılan amperometrik tayinler sonucunda da kör elektrotlarla birlikte pAA/j-GOD sensörüne karşı herhangi bir girişimin olmadığı tesbit edilmiştir. Bunun dışında gliserin, NH_4^+ , NaCl ve KCl gibi fizyolojik ortamda bulunabilecek bileşiklerin de geliştirilen sensör sistemiyle çalışılan deney koşullarında girişim vermediği gözlenmiştir (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26).

Elektroaktif bileşiklere karşı pAA/j (kör), pAA/j -GOD elektrotlarının relatif aktiviteyi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$RR = I_{(im)}/I_{(p)}$$

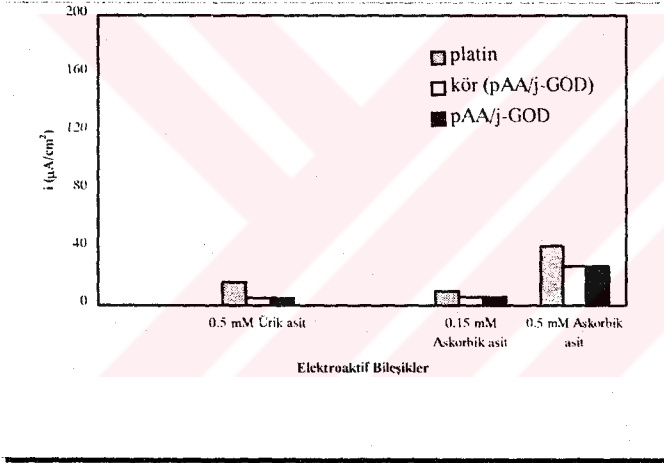
RR= Relatif respons

$I_{(im)}$ = Elektroaktif bileşiklere karşı enzim /kör elektrotların verdiği cevap

$I_{(p)}$ = Elektroaktif bileşiklere karşı çıplak platin elektrotların verdiği cevap

Çizelge 4.25. Çıplak platin, pAA/j-GOD ve kör (pAA/j) sensörleri üzerine elektroaktif bileşiklerin etkisi

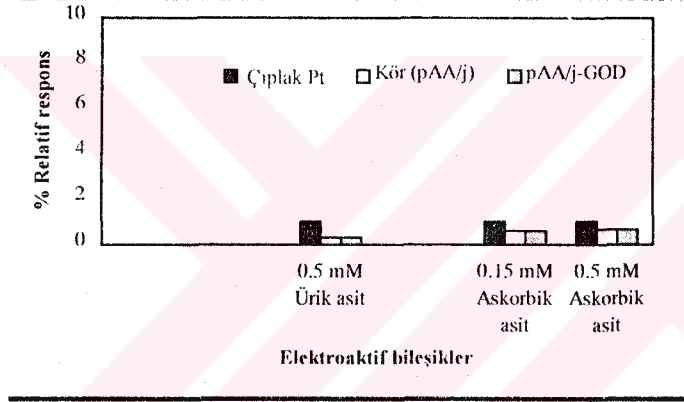
Elektroaktif Madde	Akım Yoğunluğu (i) ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)		
	Platin	Kör (pAA/j)	PAA/j-GOD
Gliserin (0.48 mM)	-	-	-
NH_4^+ (0.5 mM)	-	-	-
NaCl	-	-	-
KCl	-	-	-
Ürik Asit (0.5 mM)	16	5	5
Askorbik Asit 0.15 mM	10	6	6
0.5 mM	41	27	27



Şekil 4.25 PAA/j-GOD ve kör (pAA/j) sensörleri üzerine elektroaktif bileşiklerin etkisi

Çizelge 4.26. PAA/j-GOD ve kör (pAA/j) sensörlerinin relatif responsları

Elektroaktif Madde	Relatif Respons		
	Platin	Kör (pAA/j)	PAA/j-GOD
Gliserin (0.48 mM)	-	-	-
NH ₄ ⁺ (0.5 mM)	-	-	-
NaCl	-	-	-
KCl	-	-	-
Ürik Asit (0.5 mM)	1	0,31	0,31
Askorbik Asit 0.15 mM	1	0.60	0,60
0.5 mM	1	0.66	0.66



Şekil 4.26. PAA/j-GOD ve kör (pAA/j) sensörlerinin relatif responsları

4.14. Glukoz oksidaz elektrotlarının tekrar kullanımı

4.14.1. Kimyasal yöntem

Çalışmada, Bölüm 3.2.2.4'te verilen metota göre $0.004 \text{ mol.dm}^{-3}$ glutraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılarak j-GOD ve pAA/j-GOD immobilize örnekler hazırlanmıştır. Bu örnekler 3 kez yıkama işleminden geçirilmiştir. Daha sonra tekrar kullanım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.27'da karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Enzim elektrotlarının tayin sonuçları serbest enzime karşı relatif aktiviteleri hesaplanarak değerlendirildiğinde, pAA/j-GOD enzimin başlangıçtan itibaren j-GOD enzimine göre % 20 daha fazla aktivite göstererek kararlılığını koruduğu gözlenmiştir. Her iki elektrot sistemi en az 17 defa 51 günlük süre boyunca kullanılabilir.

Ayrıca, farklı konsantrasyonlarda (0.5U, 10U, 20U) GOD enzimi içeren pAA/j-GOD örneklerinin tekrar kullanılabilirlikleri de Bölüm 3.2.2.4'e göre kimyasal aktivite tayinleri yapılarak araştırılmıştır. Enzim elektrotları üç gün aralıkla 17 kez kullanılmıştır ve çalışma 51 günlük bir süreyi kapsamaktadır. Sonuçlar Şekil 4.28 'de toplu olarak gösterilmiştir.

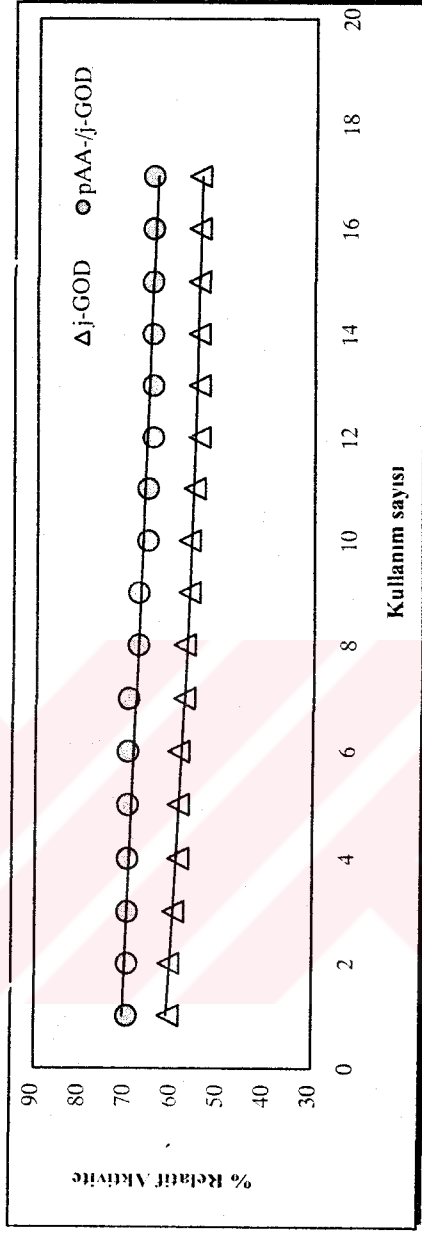
4.14.2. Amperometrik aktivite üzerine tekrar kullanımın etkisi

Bölüm 3.2.2.4 'te verilen metodlara göre hazırlanan j-GOD ve pAA/j-GOD elektrotlarının amperometrik yöntemle tekrar kullanılabilirlikleri Bölüm 3.2.2.6'da verilen yönteme göre tayin edilmiştir. Şekil 4.29' da her iki elektrot sistemiyle elde edilen sonuçlar verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi pAA/j-GOD elektrotları j-GOD elektrotlarından ortalama % 50 oranında fazla aktivite değeri göstererek kararlılığını korumaktadır.

Bölüm 3.2.2.4' e göre farklı enzim konsantrasyonları (5U, 10U , 20U) kullanılarak hazırlanan pAA/j-GOD elektrotlarının elektrokimyasal olarak tekrar kullanımları araştırılmıştır. Başlangıçta enzim konsantrasyonuna bağlı olarak amperometrik aktivite değerleri yüksek iken 7. kullanımdan itibaren üç elektrotun da amperometrik aktivitelerinin birbirine yaklaştığı gözlenmiştir (Şekil.4.30).

Çizelge 4.27. pAA/j-GOD ve j-GOD elektrotlarının enzim aktivitesi üzerine tekrar kullanım etkisi

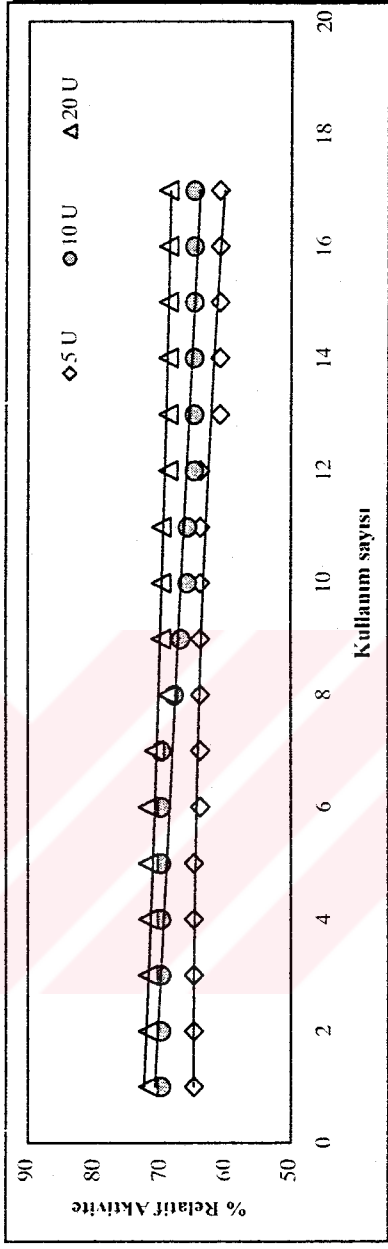
Taşıyıcı	% Relatif Aktivite																
	Tekrar kullanım																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Jelatin	61	61	60	59	59	59	58	58	57	57	56	55	55	55	55	55	55
Jelatin+pAA	70	70	70	70	70	70	70	68	68	66	66	65	65	65	65	65	65



Şekil 4.27. pAA/j-GOD ve j-GOD Elektrotlarının enzim aktivitesi üzerine tekrar kullanım etkisi

Çizelge 4.28. Farklı enzim konsantrasyonundaki elektrotların tekrar kullanımını

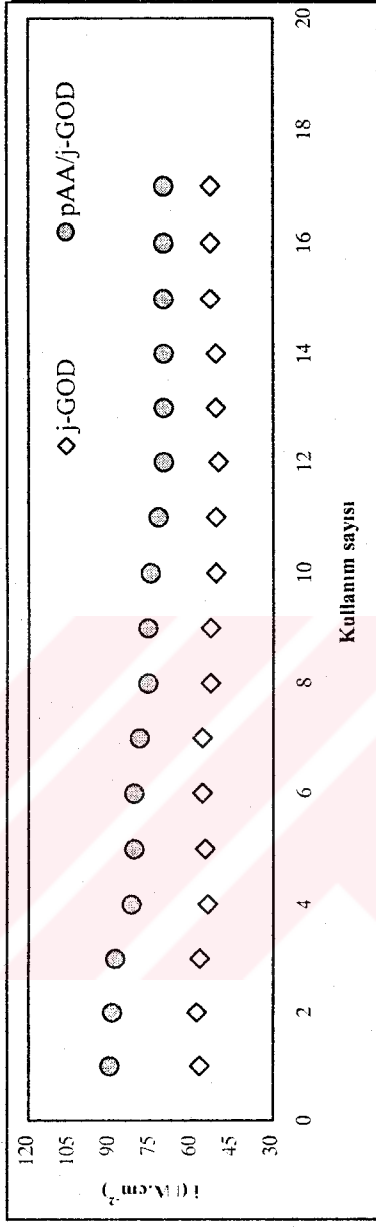
Enzim Ünitesi	% Relatif Aktivite /Tekrar kullanım																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
5U	65	65	65	65	65	64	64	64	64	64	64	64	61	61	61	61	61
10U	70	70	70	70	70	70	70	68	67	66	66	65	65	65	65	65	65
20U	72	72	72	72	72	72	71	69	70	70	70	69	69	69	69	69	69



Şekil 4.28 Farklı enzim konsantrasyonundaki elektrotların tekrar kullanımının enzim aktivitesine etkisi

Çizelge 4. 29 pAA/j-GOD ve j-GOD sensörlerinin amperometrik aktiviteleri üzerine tekrar kullanımın etkisi

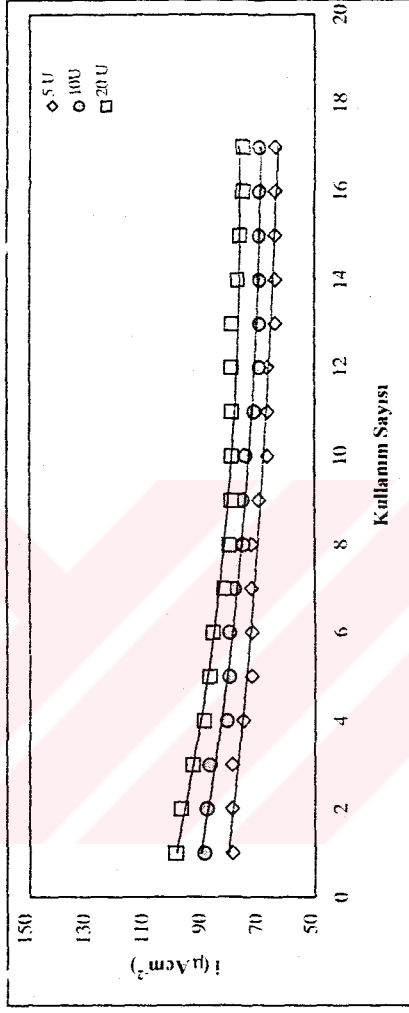
Taşıyıcı	Akım Yoğunluğu (i) ($\mu\text{A cm}^{-2}$) / Tekrar kullanım																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Jelatin	57	58	57	54	55	56	56	53	53	51	51	50	51	51	53	53	53
Jelatin + pAA	90	89	88	82	81	81	79	76	76	75	72	70	70	70	70	70	70



Şekil 4.29 pAA/j-GOD ve j-GOD sensörlerinin amperometrik aktiviteleri üzerine tekrar kullanımın etkisi

Çizelge 4.30 Farklı enzim konsantrasyonundaki elektrotların tekrar kullanımları

Enzim Ünitesi	Akım Yoğunluğu (i) ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) / Tekrar kullanımı																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
5U	80	80	80	76	73	73	73	73	70	67	67	67	64	60	60	60	60
10U	90	89	88	82	81	81	79	76	76	75	72	70	70	70	70	70	70
20U	100	98	94	90	88	87	83	81	80	80	80	80	80	78	77	76	76



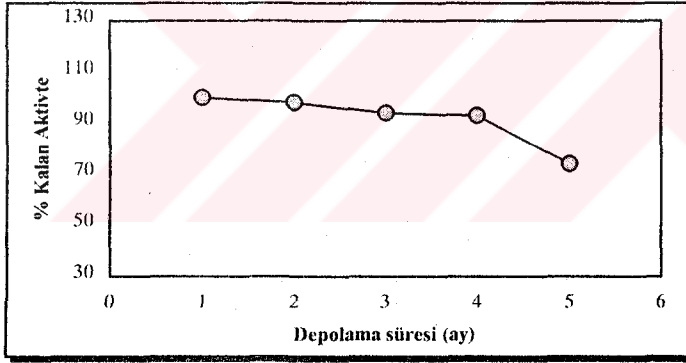
Şekil 4.30 Farklı enzim konsantrasyonundaki elektrotların tekrar kullanımlarının enzim aktivitesine etkisi

4.15. Enzim Elektrotlarının Depolama Kararlılıkları

Enzim elektrotlarının raf ömrü 5 aylık bir zaman aralığında araştırılmıştır. İmmobilizasyon işleminde $0.004 \text{ mol.dm}^{-3}$ gluteraldehit çapraz bağlayıcısı ve 10U GOD kullanılarak 5 adet eş pAA/j-GOD elektrotu hazırlanmıştır. Bu örneklerasetat tamponu ile (0.05 mol.dm^{-3} , pH 5.1) 3 kez yıkama işlemi yapılmıştır. Daha sonra 1 ay ara ile örneklerin amperometrik aktiviteleri tayin edilmiştir. Enzim elektrotları aktivitelerini 4 ay süresince % 93 oranında korumaktadır. Daha sonra 5.ayın sonunda ise % 74 'lük aktivite elde edilmiştir (Şekil 4.31). Sonuç olarak geliştirilen pAA/j-GOD enzim elektrotları yüksek bir aktivite ile en az 5 ay süreyle kararlılıklarını korumaktadır.

Çizelge 4.31 PAA/j-GOD elektrotlarının depolama kararlılıkları

Depolama süresi (Ay)	%Kalan Aktivite
1	100
2	92
3	94
4	93
5	74



Şekil 4.31 PAA/j-GOD elektrotlarının depolama kararlılıkları

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan çalışmada daha önce literatürde yer almayan yeni bir glukoz biyosensörü geliştirilmiştir. Araştırmada serbest glukoz oksidaz ve immobilize glukoz oksidaz elektrotları elektrokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Ayrıca serbest ve biyosensörde kullanılan immobilize enzimin özellikleri kimyasal yöntem ile Sigma metodu kullanılarak spektrofotometrik olarak kinetik parametreler incelenmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Çalışmada glukoz oksidaz immobilizasyonunda taşıyıcı olarak jelatin kullanılmıştır. Enzim taşıyıcıya kimyasal çapraz bağlama yöntemine göre gluteraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılarak immobilize edilmiştir. Ayrıca enzim immobilizasyonunda taşıyıcı jelatinin yanında poliakrilamid kullanılarak biyosensörün özellikleri geliştirilmiştir. Çalışmada elde edilen bu iki tür glukoz biyosensörün elektrokimyasal ve kimyasal aktiviteleri tayin edilerek incelenmiştir.

Sunulan çalışma iki bölümden oluşmaktadır; bunlar glukoz oksidaz immobilizasyonu ve immobilize glukoz oksidaz enzim elektrodu geliştirilmesi.

Serbest glukoz oksidaz ile yapılan çalışmalarda enzimin optimum sıcaklık, pH, enzim konsantrasyonu ve kinetik özellikleri kimyasal ve elektrokimyasal yöntem kullanılarak araştırılmıştır.

Kimyasal yöntem ile serbest enzimin optimum pH' ı 5.1, sıcaklığı 45 °C ve kinetik özellikleri; $K_m = 11.10 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $V_m = 0.541 \text{ mol dk}^{-1}\text{ml}^{-1}$ olarak tesbit edilmiştir. Elektrokimyasal yöntem ile yapılan çalışmada optimum pH 5.1, sıcaklık 45 °C, $K_m = 7.75 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $I_m = 25 \text{ } \mu\text{A/cm}^2$ olarak bulunmuştur.

İmmobilizasyonu geliştirmek amacıyla jelatine ilave olarak kullanılan poliakrilamidin optimum oranı 0.100 pAA/j olarak tesbit edilmiştir. Bu şekilde poliakrilamid polimerinin katkısı ile immobilize GOD enzim elektrotlarının yüzey alanı genişletilerek enzim aktivitesinde önemli miktarda artış sağlanmıştır.

Çalışmada amperometrik aktivite üzerine jel miktarının etkisi incelenmiş ve 0.0165 g (pAA+j) jel miktarı kullanılarak pAA/j-GOD elektrotları hazırlanmıştır. Elektrotların amperometrik aktiviteleri tayin edildiğinde jel

miktının amperometrik aktivite üzerindeki etkisinin önemli olduğu gözlenmiştir. Jel miktarı arttıkça sensör aktivitesi azalmaktadır, bu durum elektrot üzerindeki jel miktarının artmasıyla elektrot yüzeyinde substratın difüzyonunun zorlaşmasından kaynaklanmaktadır. Elektrotların mekanik dayanıklılıkları ve sensör aktiviteleri dikkate alındığında en uygun jel miktarı 0.0165 g (pAA+j) için elde edilmektedir.

Çalışmada geliştirilen j-GOD ve pAA/j-GOD elektrotlarının kimyasal metot ile tekrar kullanımları çalışılmıştır. Enzim elektrotları için elde edilen sonuçlar serbest enzim ile karşılaştırıldığında, pAA/j-GOD elektrotlarının başlangıçtan itibaren j-GOD elektrotlarına göre % 20 daha fazla aktivite göstererek kararlılığı koruduğu gözlenmiştir.

PAA/j-GOD ve j-GOD elektrotlarının amperometrik yöntem ile tekrar kullanımları araştırıldığında, pAA/j-GOD elektrotları j-GOD elektrotlarından ortalama % ,50 oranında fazla aktivite değeri göstererek kararlılığını korumaktadır. Her iki elektrot sistemi 51 günlük bir sürede en az 17 defa kullanılabilir.

Çalışmada, serbest glukoz oksidaz enzimi ve j-GOD ile pAA/j-GOD elektrotlarının

60 °C 'ta termal inaktivasyonu amperometrik olarak araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, serbest GOD enziminin 10. dakikadan itibaren termal inaktivasyona uğradığı, 100 dakikadan sonra ise enzimin çoğunluğu denatüre olarak %80 oranında aktivite kaybının olduğu gözlenmiştir. Jelatin ve poliakrilamid-jelatin taşıyıcısına 0.004 moldm⁻³ konsantrasyonunda gluteraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılarak GOD enzimin immobilizasyonunun enzimin termal kararlılığına katkısı ve aynı zamanda immobilize enzimin termal inaktivasyonunu incelemek amacıyla enzim elektrotlarının amperometrik aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, her iki elektrot sisteminin de 60 °C'ta serbest GOD enzimine göre termal kararlılıklarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Serbest GOD enzimi 10 dakikada % 50 oranında termal inaktivasyona uğrarken aynı sürede j-GOD elektrodu % 30, pAA/j-GOD elektrodu ise % 14 oranında bir aktivite kaybı göstererek inaktivasyona uğramaktadır. Serbest GOD enzimi sıcaklığa maruz kaldığı süre boyunca hızlı bir şekilde inaktivasyona uğrarken, enzim elektrotlarının termal kararlılıklarını daha uzun süre koruduğu ve daha düşük oranda aktivite

kayıplarının olduğu gözlenmiştir. Çalışmada enzim molekülü gluteraldehit çapraz bağlayıcısı ile destek maddesine kimyasal çapraz bağlama metoduna göre immobilize edilmiştir. Kimyasal çapraz bağlar moleküle ağırsı bir yapı kazandırarak inaktivasyon hızını azaltırlar. Enzim molekülünün doğal yapısının sabitleştirilmesi molekül içi ve moleküller arası çapraz bağlar oluşturulması ile gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmada gluteraldehit çapraz bağlayıcısı ile enzim molekülüsabitleştirilmiş ve enzimin inaktivasyon hızı azalmıştır. Bunun sonucunda geliştirilen biyosensörlerin termal kararlılıkları serbest enzime göre önemli oranda artırılmıştır.

PAA/j-GOD elektrotları ile yapılan kimyasal çalışmalarda, optimum pH 7, sıcaklık 45 °C, enzim konsantrasyonu 10U, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu 0.004 mol.dm⁻³, Michaelis-Menten sabiti K_m=1.67 mmol.dm⁻³ ve maksimum aktivite V_m=0.372 µmoldk⁻¹ml⁻¹ olarak bulunmuştur.

PAA/j-GOD elektrotlarının amperometrik tayinleri sonucunda, optimum pH'ı 7, sıcaklık 45 °C, enzim konsantrasyonu 10U, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu 0.004 mol.dm⁻³, Michaelis-Menten sabiti K_m= 6.5 mmol.dm⁻³ ve maksimum akım yoğunluğu I_m = 88 µA.cm⁻² olarak hesaplanmıştır.

Çalışmada elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında serbest enzim ve immobilize enzim elektrotlarından kimyasal ve elektrokimyasal yöntem ile elde edilen sonuçların uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Elektrokimyasal yöntemde elektrotların amperometrik aktiviteleri, glukoz oksidaz enzim aktivitesinin bir fonksiyonudur. Bu kimyasal ve elektrokimyasal çalışmalar sonunda elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında açık olarak görülmektedir.

Serbest glukoz oksidazın her iki yöntemde de optimum pH' ı 5.1 , sıcaklık 45 °C olarak bulunmuştur.

İmmobilize enzim için her iki yöntemde, optimum pH serbeste göre daha nötral pH' a kaymış ve 7 olarak tesbit edilmiştir. Optimum sıcaklık, enzim konsantrasyonu gibi özelliklerin değişmediği ve sırasıyla 45 °C ve 10U olduğu gözlenmiştir.

Çapraz bağlayıcı olan gluteraldehit konsantrasyonunun glukoz oksidaz aktivitesi üzerine etkisi hem kimyasal hem de elektrokimyasal yöntem ile incelendiğinde her iki yöntemde de; $0.004 \text{ mol.dm}^{-3}$ konsantrasyonunun optimum olduğu tesbit edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde $0.002 \text{ mol.dm}^{-3}$ gluteraldehit konsantrasyonunda düşük bir amperometrik aktivite gözlenirken, $0.004 \text{ mol.dm}^{-3}$ 'ün üzerindeki gluteraldehit konsantrasyonlarında gittikçe azalan amperometrik aktivite değerleri dikkati çekmektedir. Düşük çapraz bağlayıcı konsantrasyonu kullanıldığında enzimin tamamı destek maddesine bağlanamadığı için amperometrik olarak düşük bir aktivite gözlenmektedir. Çapraz bağlayıcı konsantrasyonu arttıkça enzim inaktivasyonunun yanında, enzim ile destek maddesi arasında daha sıkı bir bağlanma, daha sıkı bir jel olmakta buna bağlı enzimin hareket serbestliğinin azalması, difüzyon kısıtlamasının artması katalitik aktivitede azalma ile sonuçlanmaktadır.

Çalışmada substrat konsantrasyonunun etkisi serbest ve immobilize glukoz oksidaz için hem kimyasal hem de elektrokimyasal yöntemle incelenmiştir. Sonuçta serbest ve immobilize enzimin her iki yöntemde de aktivitesi 50 mmoldm^{-3} substrat konsantrasyonuna kadar artmakta bu noktadan sonra ise substrat konsantrasyonundaki artışın aktivite üzerine bir etkisinin olmadığı tesbit edilmiştir. Bu sonuçlar değerlendirilerek çalışmada optimum glukoz konsantrasyonu 50 mmoldm^{-3} olarak seçilmiştir.

Kimyasal ve elektrokimyasal yöntem ile elde edilen sonuçların Lineweaver Burk grafikleri çizilmiş ve Michaelis-Menten sabit K_m , maksimum hız V_m ve maksimum akım yoğunluğu değerleri hesaplanmıştır.

Kimyasal yöntem ile yapılan çalışmada serbest glukoz oksidaz için;
 $K_m = 11.10 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $V_m = 0.541 \text{ } \mu\text{moldk}^{-1}\text{ml}^{-1}$,

immobilize pAA/j-GOD elektrotları için;
 $K_m = 1.67 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $V_m = 0.372 \text{ } \mu\text{moldk}^{-1}\text{ml}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Elektrokimyasal yöntem ile akım yoğunluğu-substrat grafiklerinden serbest enzim için;

$K_m = 7.75 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $I_m = 25 \text{ } \mu\text{A/cm}^2$,

İmmobilize pAA/j-GOD elektrotları için;

$K_m = 6.5 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $I_m = 88 \text{ } \mu\text{A.cm}^{-2}$,
olarak hesaplanmıştır.

Sonuçlar değerlendirildiğinde kimyasal yöntemde pAA/j-GOD enzim örneklerinin maksimum hızı serbest enzime göre düşüktür. Bu durum, immobilize enzimin aktivitesi immobilizasyon işleminden dolayı enzim inaktivasyonu uğraması ve çapraz bağlanması sonucunda meydana gelen ağ yapısından kaynaklanan difüzyon kısıtlamasına bağlı bir azalma ile açıklanabilir.

Elektrokimyasal yöntem ile elde edilen serbest enzimin akım yoğunluğu immobilize pAA/j-GOD enzim örneklerinin akım yoğunluğuna göre oldukça düşüktür. Serbest enzimde enzimatik reaksiyon çözeltide oluşurken, enzim elektrotlarında elektrot yüzeyinde oluşmakta ve elektrot yüzeyinde oluşan reaksiyonda elektronlar platine direk olarak aktarılmaktadır. Elektrokimyasal ölçümlerde reaksiyon elektrotta ne kadar yakın olursa elektrodun reaksiyon hızı o kadar yüksek olacaktır. İmmobilize pAA/j-GOD elektrotları için elde edilen akım yoğunluğu değerleri ile serbest enzimin akım yoğunluğu değerleri karşılaştırıldığında benzer bir durum olduğu görülmektedir.

Çalışmada, farklı konsantrasyonlarda (0.5U, 10U, 20U) GOD enzimi içeren pAA/j-GOD elektrotlarının tekrar kullanılabilirlikleri de hem kimyasal yöntem hem de elektrokimyasal yöntem ile araştırılmıştır. Hazırlanan glukoz biyosensörleri +4 °C'ta saklanarak 51 günlük bir sürede üç gün aralıklarla 17 kez kullanılarak her iki yönteme göre aktiviteleri tayin edilmiştir. Enzim elektrotlarının kimyasal aktivite tayinleri sonucunda, 10U enzim konsantrasyonundaki glukoz biyosensörlerinin başlangıçtan itibaren diğer enzim elektrotlarına göre daha stabil bir kararlılık gösterdiği gözlenmiştir.

Enzim elektrotlarının raf ömrü 5 aylık bir zaman aralığında araştırılmıştır. Raf ömrü ile ilgili çalışmalar sonucunda, geliştirilen yöntem ile hazırlanan pAA/j-GOD enzim elektrotlarının önemli bir aktivite kaybı olmaksızın en az 4 ay süreyle kararlılıklarını koruduğu tesbit edilmiştir.

Biyolojik örneklerde tayin edilmek istenen bileşikler genellikle karmaşık bir ortamda bulunur ve birçok bileşik girişim verebilir. Çalışmada biyolojik örneklerde bulunabilecek elektroaktif askorbik asit, ürik asit, NH_4^+ , gliserin, NaCl ve KCl gibi fizyolojik ortamda bulunabilecek bileşiklerin biyosensörün cevabını ne şekilde etkilediği araştırılmıştır. Bu çalışmada çıplak platin elektrotlarına göre pAA/j ve pAA/j-GOD elektrotlarının askorbik asitin $0.15 \text{ mmol dm}^{-3}$ ve 0.5 mmol dm^{-3} lik konsantrasyonları ile yapılan çalışmalar sonucunda hem kör elektrotlar hem de enzim elektrotlarına önemli bir girişimin olmadığı gözlenmiştir. Bunun dışında gliserin, NH_4^+ , NaCl ve KCl gibi fizyolojik ortamda bulunabilecek bileşiklerin de geliştirilen sensör sistemiyle girişim vermediği gözlenmiştir.

Çalışmada geliştirilen biyosensörün respons süresi 60 saniyede kararlı bir hale geldiği tesbit edilmiştir. Bu değer literatürdeki respons sonuçları ile karşılaştırıldığında oldukça kısadır. Bu durum glukoz tayinlerinde hızlı bir sonuç elde edilmesi açısından önem taşımaktadır.

Diyabetik hastalar, relatif ve mutlak olarak insülin yetmezliğine sahip olan ve dolayısıyla kan glukoz seviyeleri normal aralığın $75-115 \text{ mgdl}^{-1}$ ($4.2-6.4 \text{ mmol.dm}^{-3}$) dışında seyreden kişilerdir. Bazen glukoz seviyeleri çok aşağıya düşer (hipoglisemi) bu da istenmeyen durumlara ve tehlikeli şuur bozukluklarına hatta şoka neden olabilir. Bazen de kan glukoz seviyeleri yüksek düzeylerde (hiperglisemi) seyrederek uzun sürede gözlerde, sinirlerde, böbrek ve kan damarlarında ciddi doku komplikasyonlarına sebep olabilir. Normal kişilerde kan glukoz konsantrasyonu $9.5-10 \text{ mmoldm}^{-3}$ ün üzerine çıktığında glukozüri meydana gelir. Glisemi ve glukozüride glukoz ölçümleri acil yöntemler gerektirmektedir. Çalışmada geliştirilen glukoz biyosensörleri ile 0.05 mmoldm^{-3} gibi çok düşük miktarlarda ve glukozun tayini çok kısa sürede yapmak mümkündür ve yöntem kan, idrar örneklerinde glukoz tayini için uygundur.

Çalışmada gıda ve klinik uygulamalarda glukoz tayini amacıyla daha önce literatürde yer almayan yeni bir glukoz biyosensörü geliştirilmiştir. Hızlı, hassas, doğru, kolay sonuç veren bu biyosensörün maliyeti oldukça düşük olup yaklaşık iki aylık bir süre boyunca kararlı bir şekilde en az 17 defa tekrar kullanılabilceği kararlılığını koruyarak en az 5 ay saklanabileceği tesbit edilmiştir.

Ayrıca bu araştırmada geliştirilen yöntem klinik ve endüstriyel alanda önemli birçok bileşimin tayininde kullanılmak üzere başka enzimler için uygulanarak yeni biyosensörler geliştirilebilir.



6. KAYNAKLAR

- Barmin, A. V., Eremenko, A.V., Sokolovskij, A.A., Chernov, S.F., Kurochkin, I.N.1993. New catalytic properties of glucose oxidase in monomolecular films. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 18; 369-376.
- Bartlett, P.N; 1991. Application of electropolymerized films in electrochemical sensors. *Analytical Proceedings*. November, Vol.28; 373-374.
- Bartlett, P.N, Caruana, D.J. 1992. Electrochemical immobilization of enzymes Part V. Microelectrodes for detection of glucose based on glucose oxidase immobilized in poly(phenol) film. *Analyst*. August, vol.117: 1287-1292.
- Bartlett, P.N., Birkin, P.R. 1993. The application of conducting polymers in biosensors. *Synthetic Metals*, 61; 15-21.
- Bradley, J., Kidd, A., Anderson, P., Dear, A., Ashby, R., Turner, A. 1989. Rapid determination of the glucose content of molasses using a biosensor. *Analyst*, March (114); 375-379.
- Brooks, S.L., Higgins, I. J., Newman, J.D., Turner, A.P.F. 1991. Biosensors for process control. *Enzyme Microbial Technology*, December, (13); 946-955.
- Cardosi, M., Vaughan, H. 2002. Glucose oxidase. www.biol.paisley.ac.uk.
- Centonze, D., Losito, I., Malitesta, C., Palmisano, F., Zambonin, P.G. 1997. Electrochemical immobilization of enzymes on conducting organic salt electrodes: characterisation of an oxygen independent and interference-free glucose biosensor. *Journal of electroanalytical chemistry*, 435; 103-111.
- Chan, H.O, Gan, L.M., Chi, H., Toh, C.S, 1994. A renewable glucose sensor fabricated from microemulsion polymerization of thiophene in flow cell with application in a high-performance liquid chromatography system. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 379; 293-300.

- Cosnier, S., Gondran, C., Senillou, A., Grützel, M., Vlachopoulos, N. 1997. Mesoporous TiO₂ films: New catalytic electrode Materials for fabricating amperometric biosensors based on oxidases. *Electroanalysis*, 9 (18); 1387-1392.
- Curilli, A. and Palleschi, G. 1997. Electropolymerized of pyrrole-2-carboxylic acid and 4,4' dihydroxybenzophenone on platinum electrodes. Applications to assemble novel glucose sensors. *Electroanalysis*, 9, (14); 1107-1112.
- Despande, M.V. and Amalnerkar, D.P. 1993. Biosensors prepared from electrochemically-synthesized conducting polymers. *Progress polymer science*, Vol. 18; 623-649.
- Doretto, L., Ferrara, D., Barison, G., Lora, S. 1994. Glucose sensors based on enzyme immobilization onto biocompatible membranes obtained by radiation-induced polymerization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49; 191-202.
- Erarslan, A. 2002. Tübitak. Enzim karakterizasyonu ve stabilizasyonu uygulanamalı eğitim kursu. Gebze.
- Fraille, J.M. 2002. Immobilization of chiral catalysts. <http://wzar.unizar.es/acad//fac/cie/quiorg/catalisis>
- Galan-Vidal, C.A., Munoz, J., Dominguez, C., Alegret, S. 1997. Glucose biosensor based on a reagentless graphite-epoxy screen-printable biocomposite. *Sensor and Actuators B*, 45; 55-62.
- Greenough, K., Skillen, A.W., McNeil, C. 1994. Potential glucose sensor for perioperative blood glucose control in diabetes mellitus. *Biosensor and Bioelectronics*, 9; 23-28.
- Gründig, B., Strehlitz, B., Kotte, H., Ethner, K. 1993. Development of a process-FIA system using mediator-modified enzyme electrodes. *Journal of Biotechnology*, 31; 277-287.
- Hilditch, P., Green, M. 1991. Disposable electrochemical biosensors. *Analyst*, December, Vol 116; 1217-1220.

- Ježková, J., Iwuoha, E., Smyth, M., Vytras, K. 1997. Stabilization of an osmium bis-bipyridyl polymer- modified carbon paste amperometric glucose biosensor using polyethyleneimine. *Electroanalysis*, 9 (13), 978-984.
- Kawakami, M., Koya, H., and Gondo, S. 1991. Immobilization of enzyme to platinum electrode and its use as enzyme electrode. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol.28-29; 211-219.
- Kress-Roger, E., D'Costa, E.J. 1986. Biosensor for the food industry. *Analytical Proceedings*. May (23); 149-151.
- Linke, B., Kerner, W., Kiwit, M., Pishko, M., Heller, A. 1994. Amperometric biosensor for in vivo glucose sensing based on glucose oxidase immobilized in a redox hydrogel. *Biosensors and Bioelectronics*, 9; 151-158.
- Losada, J., García Armada, M.P. 1997. A glucose Amperometric sensor based on covalent immobilization of glucose oxidase in poly-2-aminoaniline film via chloranil on platinized platinum electrode. *Electroanalysis*, 9 (18); 1416-1421.
- Lukachova, L., Karyakin, A., Karyakine, E., Gorton, L. 1997. The improvement of polyaniline glucose biosensor stability using enzyme immobilization from water-organic mixtures with a high content of organic solvent. *Sensor and Actuators B*, 44; 356-360.
- Mizutani, F., Yabuki, S., Katsura, T. 1993. Amperometric enzyme electrode with fast response to glucose using a layer lipid-modified glucose oxidase and nafion anionic polymer. *Analytica Chimica Acta*, 274; 201-207.
- Nguyen, A., Luong, J.T. 1993. Mediated Glucose biosensor based on polyvinylferrocene. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 43; 117-132.
- Othmer, K. 1991. *Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley and Sons, Inc. 266-287, Canada .

- Palleschi, G., Faridnia, M., Lubrano, G., Guilbault, G. 1991. Ideal hydrogen peroxide-based glucose sensor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 31, 21-34.
- Pravda, M., Jungar, C.M, Iwuoha, E., Smyth, M., Vytras, K., Ivaska, A. 1995. Evaluation of amperometric glucose biosensors based on co-immobilisation of glucose oxidase with osmium redox polymer in electrochemically generated polyphenol films. *Analytica Chimica Acta*, 304; 127-138.
- Ramanathan, K., Annapoorni, S.Malhotra.,B.D. 1994. Application of poly(aniline) as a glucose biosensor. *Sensor and Actuators B*,21; 165-169.
- Rose-Margalit, I., Rishpon, J. 1993. Novel approaches for the use of mediators in enzyme electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 8; 315-323.
- Shaolin, M., Huaiguo,X., Bidong, Q. 1991. Bioelectrochemical responses of the polyaniline glucose oxidase electrode. *Journal of electroanalytical chemistry*, 304; 7-16.
- Suzuki, H., Sugama, A., Kojima, N., Takei, F., Ikegami, K.1991. A miniature clark-type oxygen electrode using a polyelectrolyte and its application as a glucose sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 6 ; 395-400.
- Tatsu, Y., Yamashita, K., Yamaguchi, M., Yamamura, S., Yamamot, H., Yoshikawa, S. 1992. Entrapment of glucose oxidase in silica gel by the sol-gel method and its application to glucose sensor. *Chemistry Letters*, 1615-1618.
- Telefoncu. A. 1999. *Biyosensörler. Kuşadası*
- Towe, B.C., Pizziconi, V.B.1997. A microflow amperometric glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol 12 (9-10); 893-899.
- Wen, Z., Ye, B. And Zhou, X. 1997. Direct electron transfer reaction of glucose oxidase at bare silver electrodes and its application in analysis. *Electroanalysis*, 9 (8); 641-644.

- Wilner, I., Katz, E. and Wilner, B. 1997. Electrical contact of redox enzyme layers associated with electrodes: Routes to amperometric biosensors. *Electroanalysis*, 9 (13); 965-977.
- Wong, S.S., Wong, L.C., Chemical cross linking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme Microbial Tecnology*, 14; 866-874.
- Yabuki, S., Mizutani, F., Katsura, T. 1993. Electrical communication of polyethylene glyco-modified glucose oxidase in carbon paste and its application to the assay of glucose. *Sensor and Actuators B*,13-14; 166-168.
- Zahir, M.H., Ab Ghani, .S., 1997. Fabrication of directly polymerized 4-vinylpyridine onto a pencil 2B graphite paste electrode for glucose monitoring. *Analytica Chimica Acta*, 354 ; 351-358.
- Zen, J.M, Lo, C.W. 1996. A glucose sensor made of an enzymatic clay-modified electrtrode and methyl viologen mediator. *Analytical Chemistry*, 68; 2635-2640.

ÖZGEÇMİŞ

1971'de Niğde ilinin Bor ilçesinde doğdu. Orta öğrenimini İstanbul Çamlıca kız lisesinde tamamladı. 1993 'te Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünden Bölüm birincisi ve fakülte üçüncüsü olarak mezun oldu. 1993 Ekim'de Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans çalışmasına başladı ve 1997-şubat 'ta yüksek lisans çalışmasını tamamladı.

1997-Şubat'ta Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında doktora çalışmasına başladı. 1994-2002 yılları arasında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümünde Araştırma görevlisi olarak çalıştı. Aralık 2002 tarihinden itibaren Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesinde öğretim görevlisi olarak çalışmaktadır.

