

KOLESTEROL TAYİNİ İÇİN BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI

Sinan Mithat MUHAMMET

**DOKTORA TEZİ
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2008
ANKARA**

SİNAN MİTHAT MUHAMMET tarafından hazırlanan “KOLESTROL TAYİNİ İÇİN BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI” adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

.....

Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Melike KABASAKALOĞLU

.....

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

.....

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Esmâ KILIÇ

.....

Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

.....

Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Selma ATEŞ

.....

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih:01/ 02 /2008

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

Prof. Dr. Nermin ERTAN

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Sinan Mithat MUHAMMET

KOLESTEROL TAYİNİ İÇİN BİYOSENSÖR HAZIRLANMASI**(Doktora Tezi)****Sinan Mithat MUHAMMET****GAZİ ÜNİVERSİTESİ****FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****Ocak, 2008****ÖZET**

Bu çalışmada, kolesterol tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Bu amaçla sülfürik asit ortamında pirolün ve anilinin elektropolimerleşmesiyle platin/polianilin-polipirol elektrot hazırlandı. Kolesterol oksidaz enzimi hazırlanan platin/polianilin-polipirol elektrot üzerine immobilize edildi. Kolesterol tayini, enzim elektrodun yüzeyindeki enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksidin +0,70 V'da yükseltgenmesine dayanarak yapıldı. Kolesterol biyosensörünün cevabına pH'nın ve sıcaklığın etkisi incelendi. Biyosensörün kolesterol için doğrusal çalışma aralığı ($1,8 \cdot 10^{-5}$ – $5 \cdot 10^{-5}$ M) olarak tespit edildi. İmmobilize enzimin K_M , V_{maks} değerleri hesaplandı. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü tayin edildi. Hazırlanan biyosensörle biyolojik sıvıda (kan) kolesterol tayini yapıldı.

Bilim Kodu : 201.1.020**Anahtar Kelimeler : Kolesterol, Kolesterol Oksidaz, Biyosensör, Polipirol, Polianilin, Biyolojik Sıvı, İmmobilize Enzim****Sayfa Adedi : 73****Tez Yöneticisi : Prof.Dr. Ahmet YAŞAR**

**PREPARATION OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR CHOLESTEROL
DETERMINATION**

(Ph D. Thesis)

Sinan Mithat MUHAMMET

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

January 2008

ABSTRACT

In this study, a new amperometric biosensor for determination of cholesterol oxidase was developed. For this purpose platinum/polypyrrole-polyaniline electrode was prepared by electropolymerization pyrrole and aniline in sulphuric acid media containing pyrrole. Cholesterol oxidase has been immobilized on the surface of platinum / polypyrrole-polyaniline electrode. Determination of cholesterol was performed by means of oxidation of hydrogen peroxide liberated during the enzymatic reaction on the surface of the enzyme electrode at +0,70V (Ag/AgCl). The effects of pH and temperature on the response of the cholesterol biosensor were investigated. The linear working range of biosensor was $1,8 \cdot 10^{-5} - 5 \cdot 10^{-5}$ M of cholesterol concentration. Value of K_M and V_{max} of immobilized enzyme were estimated respectively. Reuse number and storage stability were determined of the biosensor. Determination of cholesterol was carried out in biological fluid (in blood) by biosensor.

Science Code : 201.1.020

**Key Words : Cholesterol, Cholesterol Oxidase, Biosensor, Polypyrrole,
Polyaniline, Biological Fluid, Immobilized Enzyme**

Page Number : 73

Adviser : Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli bilgi ve katkılarıyla beni yönlendiren hocam Prof. Dr. Ahmet YAŞAR'a, Prof. Dr. Esma KILIÇ ve Prof.Dr. Melike KABASAKALOĞLU'na, Dr.Servet ÇETE ve Dr. Fatma ARSLAN' a ve manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enzimler	3
2.1.1. Enzimlerde seçicilik	4
2.1.2. Enzim aktivitesi.....	5
2.2. Kolesterol Oksidaz Enzimi	6
2.2.1. Kolesterol oksidazın kaynakları	7
2.2.2. Tepkime mekanizması.....	9
2.2.3. Kolesterol oksidazın uygulama alanları.....	10
2.2.4. Analitik uygulamaları	11
2.3. Kolesterol.....	12
2.4. Biyosensörler.....	13
2.4.1. Biyosensörlerin uygulama alanları.....	15
2.4.2. Biyobileşenler.....	17
2.5. İletken Polimerlerle Dönüştürücü Hazırlanması.....	17

Sayfa

2.5.1. İletken polimerler.....	17
2.5.2.. Elektrokimyasal polimerleşme mekanizması.....	17
2.5.3. İletken polimerlerle enzim immobilizasyonu.....	20
2.6. Biyobileşen İmmobilizasyonu.....	21
2.6.1. Kovalent bağlama.....	21
2.6.2. Tutuklama.....	22
2.6.3. Çapraz bağlama.....	22
2.6.4. Adsorbsiyon.....	24
2.7. Enzim Sensörleri.....	24
2.7.1. Genel çalışma ilkesi.....	25
2.7.2. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması.....	26
2.8. Performans Faktörleri.....	28
2.8.1. Kararlılık.....	28
2.8.2. Tayin aralığı ve tayin sınırı.....	29
2.8.3. Seçimlilik.....	31
2.8.4. Cevap süresi.....	33
2.8.5. Tekrarlanabilirlik.....	34
2.8.6. Diğer performans faktörleri.....	34
3. DENEYSEL KISIM.....	36
3.1. Cihazlar ve Malzemeler.....	36
3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı.....	36
3.1.2. Hücre ve elektrotlar.....	36
3.1.3. pH metre.....	37

	Sayfa
3.1.4. Su banyosu	37
3.1.5. Mikro pipet.....	37
3.1.6. Azot gazı.....	37
3.1.7. Saf su.....	37
3.1.8. SEM analizi.....	37
3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri.....	38
3.2.1. Kullanılan çözeltiler.....	38
3.3. Platin Yüzeye Sülfürik Asit ortamında Polipirrol-Polianilin Kaplanması.....	39
3.3.1. Elektrotların Hidrojen Peroksit Duyarlılığı.....	40
3.4. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi	42
3.5. Film kalınlığına çevrim sayısının etkisi	42
3.6. Kolesterol Biyosensörünün Hazırlanması.....	43
3.7. Kolesterol Biyosensörünün Çalışma Şartlarının Belirlenmesi.....	43
3.7.1. pH' ın etkisi.....	43
3.7.2. Sıcaklığın etki.....	43
3.7.3. Substrat derişiminin etkisi.....	44
3.7.4. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi.....	44
3.7.5. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi.....	44
3.7.6. Biyosensörün cevap süresinin belirlenmesi.....	45
3.7.7. Biyolojik sıvıda (kan) kolesterol tayini.....	45
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	47
4.1. Çalışma Potansiyelinin belirlenmesi.....	49
4.2. Çevrim sayısının belirlenmesi.....	50

Sayfa

4.3. Pt/Polianilin-Polipirol Filminin SEM Fotoğrafi.....	53
4.3.1. Pt/Polipirol-Polianilin filminin SEM fotoğrafı.....	54
4.4. Kolesterol Biyosensörünün Çalışma Şartları İle İlgili Sonuçlar.....	55
4.4.1.Farklı elektrotlara enzim immobilizasyonu ile aktivite değişiminin incelenmesi.....	55
4.4.2. Pt/Polipirol- polianilin-enzim-glutaraldehit-albumin filminin fotoğrafı.....	58
4.4.3. pH' nın etkisi.....	59
4.4.4. Sıcaklığın etkisi.....	60
4.4.5. Substrat derişiminin etkisi.....	61
4.4.6. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği.....	63
4.4.7. Biyosensörün raf ömrü.....	64
4.4.8. Cevap süresi.....	65
4.4.9. Biyolojik sıvıda (kanda) kolesterol tayini.....	66
4.4.10. Farklı yöntemlerle bulunan kolesterolün (Kanda) karşılaştırılması.....	66
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	73

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Çeşitli kaynaklardan elde edilen enzimlerin özelliklerinin karşılaştırılması.....	9
Çizelge 2.2. Biyosensörler için uygulama olanakları.....	16
Çizelge 2.3. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması.....	27
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edildikleri firmalar.....	38
Çizelge 4.1. Kan numunelerinde hesaplanan kolesterol içeriği.....	66

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Kolesterol oksidaz enziminin üç boyutlu yapısı.....	7
Şekil 2.2. Kolesterol oksidaz enziminin reaksiyon mekanizması.....	10
Şekil 2.3.a) Pirolün elektrokimyasal yükseltgenme ile polimerleşme Mekanizması.....	19
b) Anilinin kimyasal polimerleşmesine ait önerilen mekanizma.....	20
Şekil 2.4. Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri.....	22
Şekil 2.5. Direkt bağlama ile enzim immobilizasyonu.....	23
Şekil 2.6. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal sıralamasında enzimlerin yeri.....	25
Şekil 2.7. Bir enzim sensörünün genel gösterimi (A: Analizlenecek madde, B:)	26
Şekil 3.1. Kaplama ve ölçme yapmada kullanılan hücre sistemi.....	36
Şekil 4.1. Kolesterol'ün kolestenona yükseltgenmesi sırasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron aktarımı.....	48
Şekil 4.2. Polipirol-Polianilin kaplı film elektrodun farklı çalışma potansiyellerinde duyarlılığının belirlenmesi.....	49
Şekil 4.3. Sabit hidrojen peroksit derişimde polipirol elektrodun çevrim sayısına karşı duyarlılığı.....	50
Şekil 4.4. Sabit hidrojen peroksit derişimde polianilin elektrodun çevrim sayısına karşı duyarlılığı.....	51
Şekil 4.5. 16-16 çevrimde Pt/PPy-Pani elektrodun hidrojen peroksit derişimine karşı duyarlılığı.....	52
Şekil 4.6. 16-16 çevrimde Pt/ Pani- PPy elektrodun hidrojen peroksit derişimine karşı duyarlılığı.....	52
Şekil 4.7. Sabit çevrimde polipirol-polianilin film elektrotun farklı derişimlere karşı duyarlılığı.....	53
Şekil 4.8. Pt/Polianilin-Polipirol filminin SEM fotoğrafı.....	54

Şekil	Sayfa
Şekil 4.9. Pt/Polipirol-Polianilin filminin SEM fotoğrafı.....	55
Şekil 4.10. Polipirol film elektroda enzim immobilizasyonu ile aktivitenin incelenmesi.....	56
Şekil 4.11. Polianilin film elektroda enzim immobilizasyonu ile aktivitenin incelenmesi.....	56
Şekil 4.12. Polianilin-Polipirol film elektroda enzim immobilizasyonu ile aktivitenin incelenmesi.....	57
Şekil 4.13. Polipirol-Polianilin film elektroda enzim immobilizasyonu ile aktivitenin incelenmesi.....	58
Şekil 4.14. Pt/Polipirol-Polianilin-Enzim-Glutaraldehit-Albumin filminin SEM fotoğrafı.....	59
Şekil 4.15. Biyosensörün aktivitesine pH' nın etkisi.....	59
Şekil 4.16. Biyosensörün aktivitesine sıcaklığın etkisi.....	60
Şekil 4.17. Biyosensörün aktivitesi üzerine kolesterol derişiminin etkisi (Michealis-Menten grafiğı).....	61
Şekil 4.18. Biyosensörün aktivitesi üzerine kolesterol derişiminin etkisini gösteren Lineweaver-Burke grafiğı.....	62
Şekil 4.19. Kolesterol biyosensörü için kalibrasyon grafiğı.....	62
Şekil 4.20. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.....	63
Şekil 4.21. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi.....	64
Şekil 4.22. Biyosensörün cevap süresi.....	65

1. GİRİŞ

Enzimlerin kullanımı çok eski çağlara dayanır. İlk çağlarda insanlar bilinçsiz olarak ekmek hamuru, peynir, kımız, yoğurt gibi gıdaların hazırlanmasında enzimlerin işlevlerinden yararlanmışlardır. Enzimlerin yapısı ve tepkime mekanizmalarının aydınlatılmasıyla enzimler gıda, ilaç, kozmetik, tekstil, temizlik maddeleri gibi çeşitli endüstriyel maddelerin üretiminde, üretime yönelik çeşitli tepkimelerin katalizlenmesinde ve fizyolojik rahatsızlıkların tedavisinden tıpta tanı çalışmalarına kadar uzanan yeni birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır [1]. Enzimoloji konusundaki gelişmeler 1897’de Büchner’in canlı maya hücrelerinden ilk aktif enzimi ekstre etmesiyle başlamıştır. Büchner bu çalışmasıyla enzimlerin katalitik aktivitelerini içinde bulundukları hücrelerin yaşamsallığına bağlı olmaksızın farklı ortamlarda da devam ettirdiğini göstermiştir. 1926’da Sumner enzimlerin protein yapısında olduğunu ortaya koymuş ve ilk enzim saflaştırmasını gerçekleştirmiştir [2].

Enzimler canlı hücrelerden elde edilmiş protein yapısındaki büyük bileşiklerdir. Değişik avantajlarından dolayı enzimler çeşitli kimyasal tepkimelerde katalizör olarak kullanılmaktadır. Bitki , hayvan dokuları ve mikroorganizmalardan elde edilen çok sayıdaki enzim yapılarına ve kontrol ettikleri tepkime mekanizmalarına göre karakterize edilmişlerdir. Karakterize edilen bu enzimlerin ticari ve saf şekillerinin bulunması endüstriyel uygulamalarda kullanılmalarını sağlamaktadır. Enzimlerin spesifik olmaları ve tepkimeleri katalizleme kabiliyetleri onların biyokimyasal, endüstriyel ve analitik alanlarda uygulamalarını cazip hale getirmektedir [3].

Doğal enzimler yüksek molekül kütlesine sahip protein yapısında olup suda çözünürler. Ancak çözelti halinde kararlılıklarının sınırlı olması, ortamdan ayrılmasının çok zor olması, tepkime denetimlerini güçleştirmelerini ve enzimlerin tekrar kullanımlarının mümkün olmaması immobilize enzim düşüncesini ortaya çıkarmıştır. Sonuçta immobilizasyon ile enzimlerin sıcaklık, mekanik ve kimyasal kararlılıklarının artırılması ile tekrar kullanılabilmesi mümkün kılınmıştır [4].

Bu çalışmada, kolesterol tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi. Bu amaçla sülfürik asit ortamında pirolün ve anilinin elektropolimerleşmesiyle platin/polianilin–polipirol elektrot hazırlandı. Bu elektrot kullanılarak serbest kolesterol oksidaz enziminin aktivitesi incelendi. Daha sonra, kolesterol oksidaz enzimi hazırlanan platin/polianilin–polipirol elektrot üzerine immobilize edildi. Kolesterol tayini, enzim elektrodun yüzeyindeki enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksidin +0,70 V’da yükseltgenmesine dayanarak yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Enzimler

Enzimler canlı hücrede meydana gelen kimyasal tepkimeleri katalizleyen veya düzenleyen biyokatalizörlerdir. Organizmadaki organik moleküllerin yapımı, yıkımı, kas hareketleri ve solunum gibi fizyolojik olaylar enzimler yardımıyla yürütülmektedir. Bu sebeple hayat enzimatik tepkimelerin tümüdür denilebilir.

Enzimler dört temel açıdan çok güçlü katalizörlerdir:

1. Enzimler son derece etkilidirler. Sıradan kimyasal katalizörlere göre tepkimeleri 10^8-10^{11} kez daha hızlı gerçekleştirebilmektedirler. Enzimler gösterdikleri bu hıza ulaşırken pH, sıcaklık, basınç açısından oldukça ılımlı koşullarda çalışabilmeyi mümkün kılarlar. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar fazla enerji gerektirmezler. Ayrıca en kolay bulunan, en ucuz, en emniyetli çözücü olan su içerisinde çalışmak enzimler için mümkün olmaktadır. Mesela amonyak elde etmek için kullanılan Haber prosesinde azot bağlamak için 200-1000 atm basınç ve 500°C sıcaklık gereklidir. Ama azot bağlayan bir bakterinin bu işlemi yaparken yüksek basınç ve sıcaklığa ihtiyacı yoktur.
2. Enzimler kimyasal katalizörlere göre çok daha değişik kimyasal reaksiyonları katalizleyebilirler.
3. Enzimler reaksiyonun tipine ve substrata son derece spesifiktirler. Böylece yüksek verim ve çok az sayıda yan ürün meydana gelir.
4. Enzimlerin çok çeşitli doğal kontrol mekanizmaları vardır. Enzimlerin aktivitesi, içinde bulundukları şartlara göre düzenlenebilir. Ayrıca kontrol edici küçük moleküller de enzimatik aktiviteyi azaltabilir ya da arttırabilir [5].

Enzimler tepkimenin başlaması için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürürler. Bir enzim daima bir çeşit tepkimeyi kontrol eder. Biyosensör yüzeyi arttıkça enzim aktivitesi de artar.

Hücre içinde üretilmelerine rağmen hücre dışında da etki gösterebilirler. Enzimlerin kontrol ettiği tepkimelerin çoğu çift yönlüdür. Genellikle protein yapılı olmalarından dolayı proteinlerin etkilendiği faktörlerden etkilenirler [6].

Enzimlerde proteini oluşturan amino asitlerin sayısı, diziliş sırası ve moleküllerin yapısı belirli bir düzen içindedir. Bu düzen enzimin substrata seçiciliğini sağlar. Bazı enzimler yalnızca proteinden oluşurken bazıları protein yanında protein olmayan bir kısım içerirler. Bu tip enzimlerde enzimin protein kısmına “Apoenzim”, denir. Koenzim ya da kofaktör enzime kovalent bağlıysa “Prostetik grup“ adı verilir. Koenzimler genellikle vitamin türevleri, ve organik moleküllerden oluşur. Apoenzim ve koenzim birlikte “Holoenzim“ diye adlandırılır. Holoenzimin büyük bir kısmını apoenzim oluşturur. Apoenzim tek başına katalitik aktivite göstermez. Enzimin gerçek aktivitesi sadece koenzim ve apoenzim bir arada olduğunda gözlenir [7].

Enzim molekülünün belirli bir bölgesinde belirli amino asitlerin oluşturduğu bir kısım bulunur. Protein zincirinin bu bölgesi enzimin katalitik etkisinden sorumlu olup “Aktif bölge“ olarak tanımlanır. Substrat ve eğer varsa koenzim, bu merkeze hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar veya kovalent bağlar ile bağlanır. Substratın dönüşümüne katılan ve katalitik prosesi yürüten amino asit yan zincirleri de aktif merkezi oluştururlar [6].

2.1.1. Enzimlerde seçicilik

Enzimler yüksek seçiciliğe sahip katalizörlerdir. Bu seçiciliği beş kısımda incelemek mümkündür [7].

- *Mutlak Seçicilik* : Bu durumda enzim belirli bir substratı katalizleyerek belirli bir ürüne dönüştürür. Örneğin üreaz, üreyi hidrolizlerken ve maltaz, maltozu monosakkaritlerine parçalarken bu türden seçicilik gösterirler.
- *Grup Seçiciliği* : Grup seçiciliği gösteren enzimler yapısında belirli bir grup bulunduran tüm substratları katalizler. Proteini parçalayan proteolitik enzimlerin çoğu grup seçiciliği gösterir.

- *Tepkime ya da Bağ Seçiciliği* : Bu gruptaki enzimler belirli bir tepkime türünü katalizler ve substrat yapısında bulunan belirli bir bağa seçicidir. Organik esterlerin hidrolizini katalizleyen lipazlar bu tür seçiciliğe örnek oluştururlar.
- *Sterokimyasal Seçicilik* : Bu gruptaki enzimler substratın belirli bir sterokimyasal şeklini katalizler. Diğer sterokimyasal şekillere karşı etkisizdir. Laktik dehidrojenaz, laktik asidin yükseltgenmesinde L-Laktik asidi yükseltgerken, D-Laktik aside karşı katalitik aktivite göstermez.
- Bütün bu seçiciliklerden farklı olarak diğer bir seçicilik türü aynı enzimin farklı kaynaklardan elde edilmiş analoglarının aynı substrata farklı etkiler göstermesi şeklindedir. Örneğin polipeptit bağlarının hidrolizini katalizleyen kimotripsin ve tripsin enziminin aktif bölgesindeki amino asit yan zincirlerindeki farklılık nedeniyle, peptit bağlarını farklı yerlerden kırarlar [8].

2.1.2. Enzim aktivitesi

Enzim aktivite birimi (Ünite) yaygın olarak standart koşullarda 1 dakikada 1 μ mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Bu tanım Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından 1965 yılında kabul edilmiştir [8]. Ancak gıda endüstrisinde kullanılan enzimlerin bir çoğu için bu tanım farklı şekillerdedir, çünkü bu enzimler hammaddedir ve enzimatik olarak aktif protein miktarını ölçmek olanaksızdır. Bu nedenle derişik ham enzim preparatları için aktiflik mL enzim başına enzim birimi (Ünite) (Ünite/mL enzim çözeltisi) olarak veya preparatın içerdiği protein miktarı tayin edilmişse mg toplam protein başına Ünite (Ünite / mg protein) olarak da tanımlanabilir [7]. 1 saniyede 1 mol substratı ürüne dönüştüren enzim aktivitesine *1 katal* denir.

Enzim aktivitesini etkileyen faktörler, enzimler tarafından katalizlenen tepkimelerin aktivitesini dolayısıyla hızını etkileyen faktörler; enzim derişimi, substrat derişimi, sıcaklık, pH, iyonik aktivite, inhibitör veya aktivatörlerin derişimi, tepkime ürünlerinin derişimi ve özellikleri, sistemdeki akışkan kuvvetler, ışık ve diğer fiziksel faktörler olarak sıralanabilir. Bu faktörlerin enzim tepkimeleri üzerine olan etkilerini

saptamak için etkisi ölçülmek istenen faktör dışındaki koşullar sabit tutularak sadece bu faktörün farklı değerlerindeki enzimli tepkime hızları ölçülür [1].

2.2. Kolesterol Oksidaz Enzimi

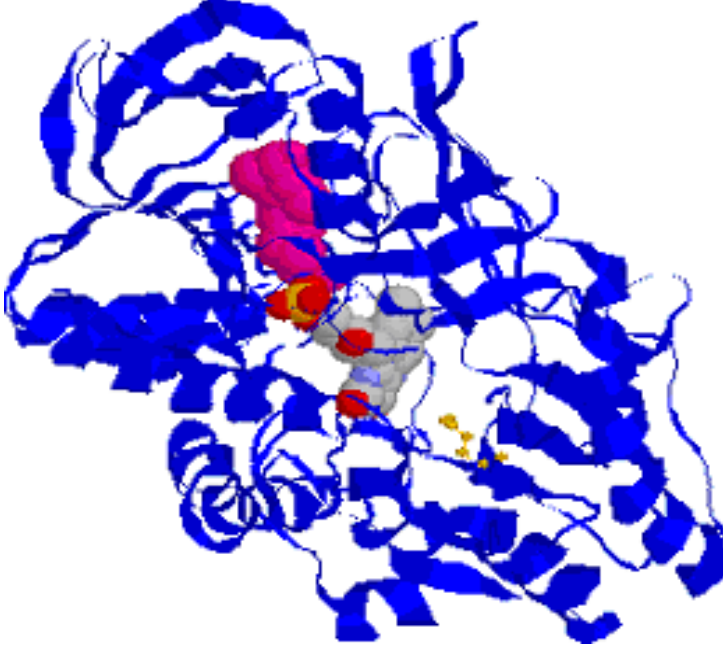
Kolesterol oksidaz çeşitli mikroorganizmalardan saflaştırılan iki işlevli bir enzimdir. Bu enzim merkezde iki tepkimeyi katalizler. İlk tepkimede kolesterolün, yükseltgenmesini, ikinci tepkimede ise oluşan yükseltgenme ürününün kolesterol-4-en-3-on'a dönüşümünü sağlar ve bu sırada aşağıda da verildiği gibi H_2O_2 açığa çıkar [9-13].



1975'ten beri kolorimetrik tayin ile serum içindeki serbest kolesterolün hesaplanmasında bu enzim kullanılmaktadır [9,14,15]. Serum içindeki toplam kolesterolün hesaplanması klinik teşhisler için gereklidir. Kolesterolün yüksek değeri bazı damarların çeperlerinde birikerek damarların tıkanmasına, tiroit bezinin az çalışmasından kaynaklanan tiroit bozukluğuna, böbrek tubuluslarının dejenerasyonun yol açtığı bir hastalığa, ve şeker hastalığına ve sarılığa sebep olur. Düşük değeri ise boynun önünde bulunan tiroit bezinin fazla çalışmasından ileri gelen bir bozukluğa ve kansızlığa sebep olur [16,17].

Kolesterol oksidaz steroidlerin izomerizasyonunu ve oksidasyonunu sağlayan koenzim olarak FAD taşıyan bir enzimdir [9,11]. Enzimin protein yapısında 492 tane amino asit kalıntısı vardır. Aktif merkezdeki amino asitler His447, Glu361'dir. En önemli amino asit kalıntısı Glu361'dir. Glu361 mekanizmadaki izomerizasyon basamağında bir proton alıcısı gibi görev yapar. Şekil.2.1.'de Glu361 küçük sarı

toplar olarak gösterilmiştir. Proteine bağlı FAD, enzimin mavi renkte gösterilen α -sarmal ile çevrelenmiştir [16].



Şekil 2.1. Kolesterol oksidaz enziminin üç boyutlu yapısı

2.2.1. Kolesterol oksidazın kaynakları

Kolesterol oksidaz farklı ortamlarda bulunan mikroorganizmalardan elde edilmiştir. Bunların sınıflandırılması yıllar boyunca geliştirilmiştir. İlk defa Turfitt, *Nocardia erythropolis* mikroorganizmasından enzimi saflaştırmış ve kolesterolün yükseltgenmesi üzerine etkilerini incelemiştir. Stadtman ve arkadaşları ekstrakte edilen serbest enzimin inkübasyonundan 4-kolest-3-on 'u elde etmişlerdir. Bu gelişmelerden sonra birçok mikroorganizmada bu enzim bulunmuştur. Kolesterol oksidazın elde edildiği mikroorganizmalar aşağıda verilmiştir [18,19].

- *Corynebactericum*
- *Arthrobacter*
- *Nocardia erythropolis* ve *Rhodococcus eryhcopolis*

- *Nocardia rhodochrous* ve *Rhodococcus rhodochrous*
- *Mycobacterium*
- *Pseudomonas*
- *Schizopyllum commune*
- *Brevibacterium cholesterolicum*
- *Streptoverticillium cholesterolicum*
- *Streptomyces violascens*
- *Rhodococcus*

Streptomyces bakterisinden elde edilen kolesterol oksidazın özellikleri [17]:

Sistematik adı : E.C.1.3.3.6 kolesterol oksijen oksidoredüktaz

Görünümü : Donmuş toz hali sarıdır.

Molekül kütlesi : Yaklaşık 59 kDa (jel filtrasyonu ile)

İzoelektrik noktası : $5,1 \pm 0,1$ ve $5,4 \pm 0,1$

İnhibitörleri : İyonik deterjanlar , Hg^{++} , Ag^{++}

En iyi pH : 6,5 – 7,5

En iyi sıcaklık : 37 ° C

pH kararlılığı : 4,0 – 9,0

Termal kararlılığı : 70 ° C ‘ nin altında

Kararlılığı : 37 ° C de en az bir ay

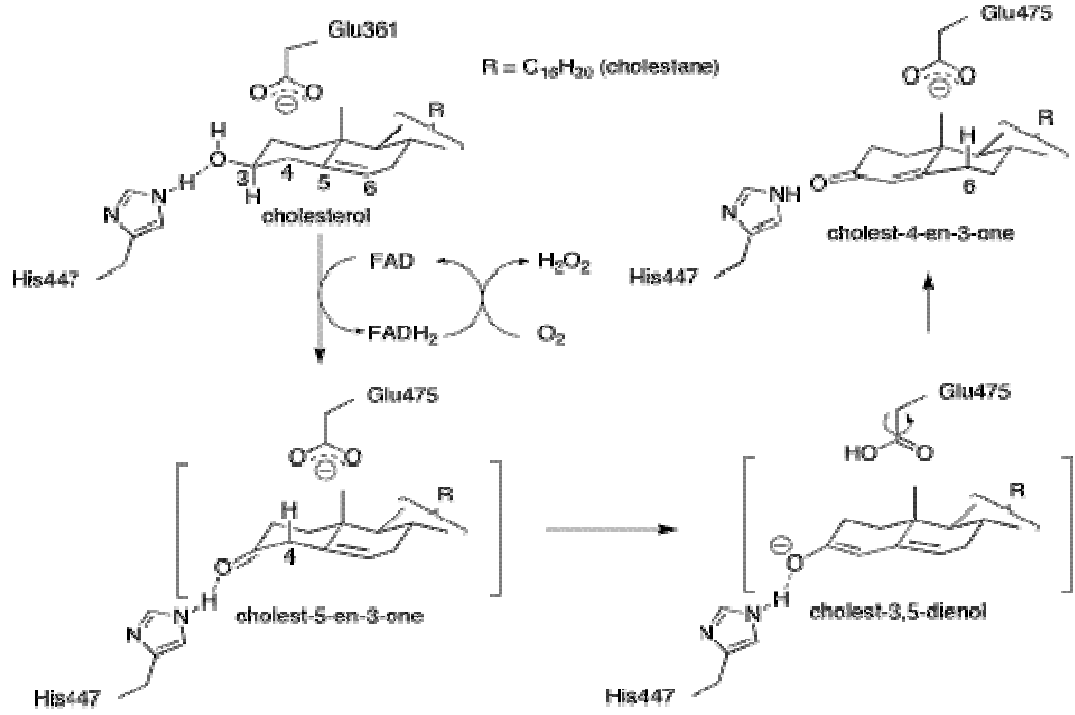
Farklı kaynaklardan elde edilen enzimin özelliklerinde farklılıklar görülür (Çizelge 2.1) [18].

Çizelge 2.1. Çeşitli kaynaklardan elde edilen enzimlerin özelliklerinin karşılaştırılması

Bakteri adı	Optimum pH	Optimum sıcaklık	Km	Ma	İnhibitör-leri
Nocardia	7	32 ° C	55-45-69 ± 0,3 mM	—	—
Rhodococcus	—	—	—	80-40 kDa	—
Brevibacterium Sterolicum	7	37 ° C	—	55k Da	—
Streptomyces	7	37 ° C	4,5- 6,7.10 ⁻⁴ M	59 kDa	İyonik deterjan-lar, Hg ⁺⁺ , Ag ⁺⁺
Pseudomonas	7	37 ° C	—	56 kDa	Fe ⁺⁺ , Zn ⁺⁺ , Hg ⁺⁺

2.2.2. Tepkime mekanizması

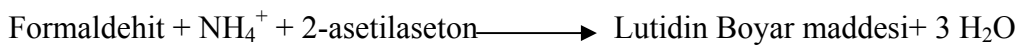
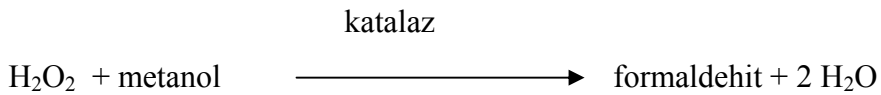
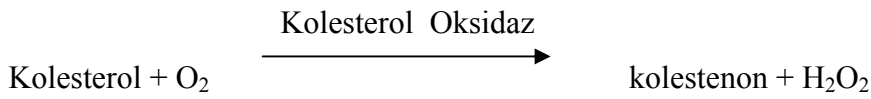
Kolesterol oksidaz enziminin katalizlediği tepkime mekanizması [Şekil 2.2]'de gösterildiği gibidir. Katalizleme iki safhada gerçekleşir. İlk tepkime kolesterolün kolest-5-en-3-on'a yükseltgenmesi, ikinci tepkime ise kolest-5-en-3-on' un kolest-4-en-3-on ' a dönüşüm tepkimesidir [19].



Şekil 2.2. Kolesterol oksidaz enziminin tepkime mekanizması [19]

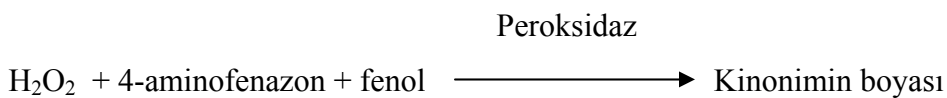
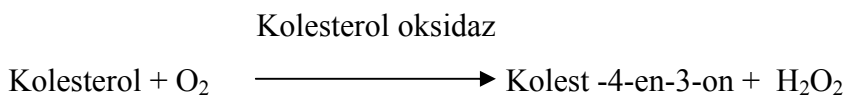
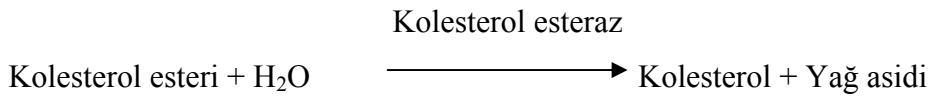
2.2.3. Kolesterol oksidazın uygulama alanları

- Gıda analizlerinde kolesterol tayini amacıyla kullanılır.



Katkı maddesi olarak yumurta sarısı içeren gıdalarda kolesterol tayini amacı ile kullanılır [6].

- Klinik analizlerde kolesterolün belirlenmesi amacıyla kullanılır. Kolesterol esterase, kolesterol oksidaz ve peroksidaza bağımlı enzimatik kolorimetrik metot kolay duyarlı ve özeldir. Bu yüzden de rutin analizler için uygundur. Bu da aşağıdaki kimyasal reaksiyonlara dayandırılmaktadır.



Bu örnekteki ilk tepkimede kolesterol esterleri kolesterol esterase tarafından kolesterol ve yağ asitlerine hidrolizlenir. İkinci tepkimede kolesterol, kolesterol oksidaz tarafından kolest-4-en-3-on ve H_2O_2 ‘ ye yükseltgenir. H_2O_2 , peroksidaz katalizörlüğünde 4-aminofenazon ve fenol varlığında renkli 4-[p-benzokinon-monoimino]fenazon oluşumunu sağlar. İndikatör ve stokiyometrik olarak eşleşmiş tepkimeler yardımıyla kolesterol derişimine ulaşılır [21]. Etkin enzim güçlü bir böcek öldürücüdür [22].

2.2.4. Analitik uygulamaları

Analitik inceleme olarak kolesterol oksidazın kullanımı için birçok yeni uygulamalar vardır.

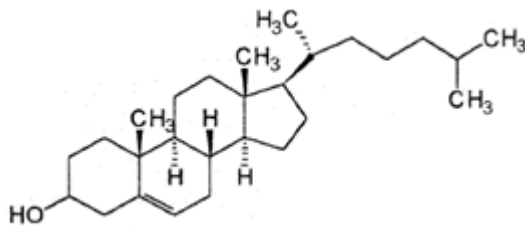
- Farklı örnek türlerinde kolesterolün saptanması için kullanılır. Bu örnekler
 - Serumda toplam ve esterleşmiş kolesterol tayini
 - Yüksek ve düşük yoğunluklu [HDL-LDL] lipoprotein ölçülmesi
- Hücrelerdeki kolesterol tayini ve enzimlerin yol açtığı hücre zarlarının parçalanmasının tespit edilmesi
- İnsan safrası ve safra taşlarındaki toplam kolesterol tayini

- d) Kemilüminesans ve floresans yöntemleriyle kolesterol tayini
- e) Biyosensör yapımı ve enzimin polimer matrikse immobilizasyonu

Genelde kolesterol tayini yöntemlerin çoğu H_2O_2 ölçümüne dayanır. Bu sebeple bu yöntem dolaylı bir yöntemdir. Bunun sebepleri çeşitlidir. Birinci olarak H_2O_2 ' in renk oluşturan bileşenlerle eşleşmesi sonucunda yüksek seviyede renk verici maddeler oluşur. Bu da daha hassas kolesterol ölçümünü sağlar. İkinci olarak, H_2O_2 ' nin redoks tepkimesi açık bir şekilde saptanır. Bu da kolay voltametrik ve amperometrik ölçme yapılmasını sağlar [18].

2.3. Kolesterol

Kolesterol 3-hidroksi-5-dehidro kolestan olup, hayvansal organizmalarda en çok bulunan bir steroldür. Açık formülü aşağıda verilmektedir.



Kolesterol

İnsan vücudunda bulunan kolesterolün bir kısmı besinler ile dışarıdan alınırken büyük bir kısmı da yağ asitleriyle esterleşmiş haldedir. Kolesterol, kan plazmasında steroit bileşiklerinin sentezinde çıkış maddesi olarak kullanılır [14,15].

Kolesterol yaşam için gerekli olan mum kıvamında yağimsı bir maddedir. Beyin, sinirler, kalp, barsaklar, kaslar, karaciğer başta olmak üzere tüm vücutta yaygın olarak bulunur. Vücut kolesterolü kullanarak hormon, D vitamini ve yağları sindiren safra asitlerini üretir. Bu işlemler için kanda çok az miktarda kolesterol bulunması yeterlidir. Kanda fazla miktarda kolesterol bulunması kolesterolün kan damarlarında birikmesine, damarların daralmasına, sertleşmesine yol açar. Kolesterol hangi organın damarlarında birikirse o organa ait hastalıklar ortaya çıkar. Örneğin kalbi

besleyen atar damarlarda kolesterol birikimi olursa, göğüs ağrısı, kalp krizi gibi sorunlar oluşur. Böbrek damarlarındaki birikim ise yüksek tansiyon ve böbrek yetmezliğine yol açabilir [20].

Kolesterol normal koşullarda kanda çözünmez. Kanda çözünmesi için karaciğerde bir proteinle birleşmesi gerekir. Bu kolesterol ve protein birleşimine lipoprotein adı verilir. Çok çeşitli lipoprotein türleri vardır bunların en önemlileri aşağıda verilmiştir. 5' e ayrılır.

- Düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL): Kan kolesterolünün yaklaşık %70'ini taşımaktadırlar. Kan damarları duvarlarına girebilmek için yeterince küçüktürler ve damarlara zarar verirler. Kötü bir kolesterol olarak adlandırılırlar.
- Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL): Vücudun kullanmadığı kolesterolü karaciğerden safraya boşaltmak üzere taşır. Kolesterolün bir cins ters naklini yaptığı için iyi tür kolesterol olarak adlandırılırlar.
- Şilomikronlar
- Çok düşük yoğunluklu lipoproteinler
- Ara yoğunluktaki lipoproteinler

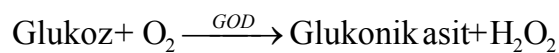
Kanda toplam kolesterol ve LDL kolesterolün yüksek olması yüksek risk oluşturmaktadır. Ayrıca HDL kolesterolün düşük olması da bir risktir. Normal şartlarda insan kan plazmasında 130-260mg/100 mL kolesterol bulunur. Bunun üzerindeki değerler yüksek kolesterol seviyesi olarak bilinir [20].

2.4. Biyosensörler

Bütün canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin hücre dışı [in vitro] kullanımı için temel oluşturmuştur [25].

Biyosensör, biyolojik olaylardaki biyokimyasal değişimleri algılayarak, biyolojik olayın teşhisine imkan tanıyan bir ölçme sistemi olarak tanımlanabilir [25].

Biyosensörlerin tarihi 1950'li yılların ortalarında L.C. Clark'ın kandaki glukoz seviyesini ölçmesiyle başladı. Clark ve Lyons'un geliştirdiği birinci nesil biyosensörlerde elektron alıcı olarak oksijen kullanılırken, ikinci nesil biyosensörlerde elektron alıcı olarak redoks medyatörleri kullanılmaya başlanmıştır [25].



GOD=Glukozoksidaz



$\text{M}_{\text{ind}} = \text{M}_{\text{oks}}$ =redoks medyatörü

Üçüncü nesil biyosensörlerde enzimin indirgenme yükseltgenme merkezi ile elektrot yüzeyi arasında doğrudan elektriksel iletişim sağlanmış ve indirgenme yükseltgenme medyatörlerine gereksinim kalmamıştır [25].

Biyosensörlerde biyobileşen olarak enzimler yanında doku kültürleri, mikroorganizmalar, organeller, antikorlar ve nükleik asitler de kullanılabilmekte ve ölçme tekniğine göre amperometrik, potansiyometrik, termal, piezoelektrik, akustik veya optik sensörler olarak adlandırılmaktadırlar [25].

Biyosensörlerin yüksek spesifikliğı yanında; renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir derişim aralığında doğrudan ölçmeye olanak sağlamak gibi üstünlükleri vardır. Fakat reseptör olarak adlandırılan biyobileşenlerin pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenmesi biyosensörün kullanım ömrünü kısaltmaktadır [25].

Medyatörler ve özellikleri: Medyatörler oksidoredüktazların koenzimlerinin yenilenmesinde önemli rol oynarlar. Enzim çözünmüş şekilde değilse koenzimin hareketi azalır ve elektronların elektrot ve koenzim arasında taşınması için bir medyatöre gereksinim duyulur. Medyatörün tatmin edici bir fonksiyon gösterebilmesi için aşağıdaki özellikleri de sağlaması gerekir [25].

- Kolay indirgenip yükseltgenebilmesi,
- Yükseltgenmiş ve indirgenmiş şeklinin kararlı olması,
- Çözeltideki oksijen ile tepkime vermemesi,
- Hücre içi uygulamalar için zararlı olmaması.

Ferrosen yukarıda belirtilen bütün şartları sağlayan bir maddedir. Medyatörler inert veya elektroaktif bir polimer ile immobilize edilir. İyon değiştirici polimerler (nafyon gibi) ve iletken polimerler (polipiroller, polianilinler, poliindoller gibi) bu amaçla kullanılır . Son zamanlardaki yapılan çalışmalarda biyosensörlerde enzimin indirgenme yükseltgenme merkezi ile elektrot yüzeyi arasında doğrudan elektriksel iletişim sağlamış olduğundan redoks medyatörlerine gereksinim kalmamıştır [25].

2.4.1. Biyosensörlerin uygulama alanları

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma sanayi ve birçok endüstriyel alanda özellikle otomasyon ve kalite kontrolünde çok önemli rol oynarlar. Bugüne kadar 180’den fazla farklı madde için biyosensör hazırlanmış olup, bunlardan ancak 25 kadarı ticari olarak üretilmektedir. Biyosensörlerin uygulama alanlarının bazıları Çizelge 2.2’de verilmiştir [25].

Biyosensörler; gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler ile bazı anorganik bileşikler yanında enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar [25].

Hiç kuşkusuz biyomedikal sektör biyosensörler için en iyi pazardır. Bu alanda uygulama olanağı bulunan ilk biyosensörler enzim sensörleridir. Ticari olarak

üretileen ilk biyosensör ise şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayininde kullanılan glukoz oksidaz elektrodudur [25].

Çizelge 2.2. Biyosensörler için uygulama olanakları

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

Son yıllarda tıbbi analizörlere enzim elektrodları takılarak yoğun bakım ünitelerinde kullanılmaya başlanmıştır. Biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde başta glukoz olmak üzere birçok monosakkarit, aminoasitler, organik asitler (laktik asit) üre ve alkol tayinlerinde enzim sensörleri kullanılmaktadır. Ayrıca, gıdalardaki yabancı maddeler (pestisitler, toksinler ve hormonlar vb.) yanında aroma ve tazelik gibi kompleks değişkenlerin tayininde de biyosensörler kullanılabilir. Toprak, hava ve su kirliliğinin kontrolünde mikrobiyal sensörler ve enzim sensörleri kullanılmaktadır. İlaçların kötü amaçla kullanımı ve uyuşturucu ile mücadelede biyosensörler kullanılabilir. Böylece uyuşturucu madde arayan köpeklerin yerini biyosensörler alabilir ve böylece gümrüklerde, karakollarda daha kısa sürede sonuç alınabilir [25].

2.4.2. Biyobileşenler

Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar , nükleik asitler ve biyolojik zarlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler, sensörlerde biyobileşen olarak kullanılırlar. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler dönüştürücü tarafından algılanır. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyomateriyallerdir. Uygun bir enzimin bulunamaması veya enzimin kararsız olması ve birden çok sayıda maddenin tayini durumlarında hücre sistemleri ve tercihen mikroorganizmalar kullanılır [25].

2.5. İletken Polimerlerle Dönüştürücü Hazırlanması

2.5.1. İletken polimerler

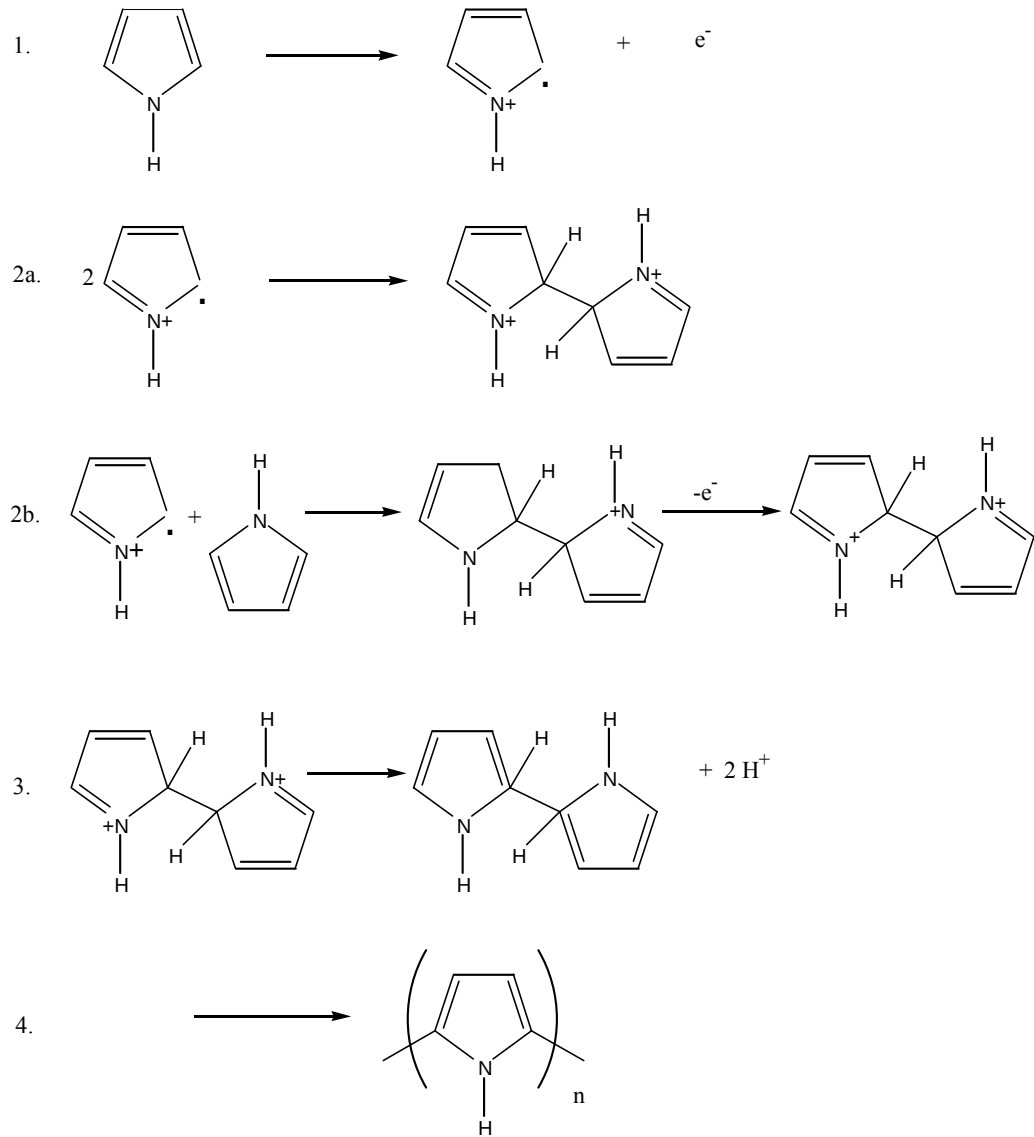
İletken polimerler konusundaki çalışmalar 1950’lerde başlamıştır. İletkenlikleri oda sıcaklığında 10^{-5} S/cm olan yarı iletken polimerler 1950-1960 yılları arasında üretilmiştir. Günümüzdeki anlayışa uygun iletken polimerler 1970’lerin sonunda ortaya çıkmaya başlamıştır. Shirakawa yöntemiyle üretilen poliasetilenin yükseltgen ile dop edilmesi sonucunda iletkenliğinin 10^8 kat arttırıldığı görülmüştür [26].

İletkenlik konusunda en önemli adım 1979’da Diaz’ın pirolü elektrokimyasal yöntemle yükseltgeyerek polipirolü üretmesiyle atılmıştır. Polipirol anot üzerinde üretilmiş ve güçlü bir film olarak yüzeyden çıkarıldığında iletkenliği 100 S/cm’ye ulaşabilmiştir. Benzer şekilde, elektroyükseltgenme yöntemiyle iletken politiyofen anot üzerinde üretilenmiştir [26].

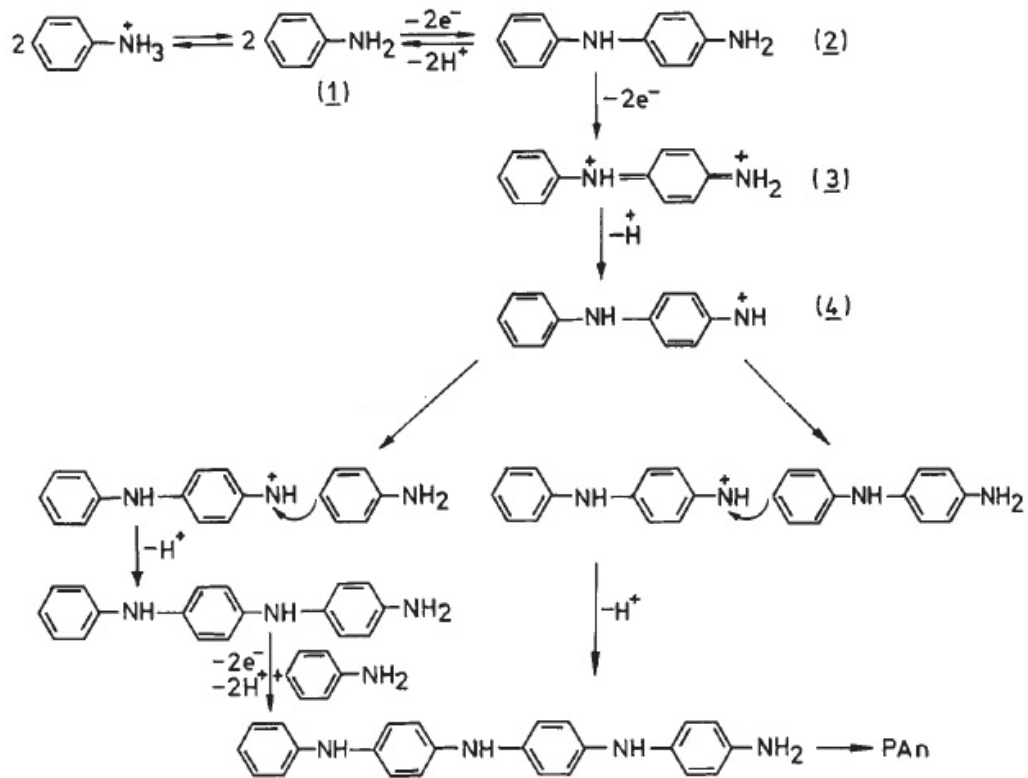
2.5.2. Elektrokimyasal polimerleşme mekanizması

Polipirolün elektrokimyasal oluşma mekanizması Şekil 2.3’de verilmektedir. Reaksiyon sulu veya susuz çözeltilerde ve oksijensiz ortamlarda anodik yükseltgenme ile başlar ve devam eder. Polipirol kimyasal olarak da üretilir.

Şekil 2.3’de görüldüğü gibi radikal katyonlar dimerleşip tekrar yükseltgenme veya başka monomere katılıp sonra yükseltgenmektedir. Oluşan dikatyon iki proton kaybedip nötürleştikten sonra yükseltgenme ile başlayan basamağa tekrar dönmekte ve bu mekanizma polimerleşme duruncaya kadar tekrarlanmaktadır. Elde edilen polimerin yapısı, mol kütlesi, iletkenliği ve fiziksel dayanıklılığı deney koşullarına göre değişkenlik gösterir. Çözücü olarak genellikle dielektrik sabiti yüksek olan ancak nükleofilik karakter göstermeyen organik çözücüler tercih edilir. Anot olarak platin levha, camsı karbon veya indiyum kalay oksit (ITO) camı kullanılır. Elektrolitlerin yüksek potansiyellerde bozunmaması istenir ve tetra alkilerin BF_4^- veya ClO_4^- tuzları tercih edilir. Bu anyonlar aynı zamanda polimerler için en uygun dopantlardır. Anot potansiyelinin de aşırı yükseltgenmeye neden olmayacak şekilde düşük tutulması gerekir. Aşırı yükseltgenen polimerin ana zincirindeki konjuge çift bağlar kırılır ise konjugasyon kesintiye uğrar ve iletkenlik düşer. Örneğin polipirol sulu çözeltide Ag/AgCl referans elektroduna göre +0,8 volttan daha yüksek potansiyellerde aşırı oksitlenerek iletkenliğini kaybedebilir [26].



Şekil 2.3.a) Pirlün elektrokimyasal yükseltgenme ile polimerleşme mekanizması
 b) Anilinin kimyasal polimerleşmesine ait önerilen mekanizma [26,27]



Şekil 2.3.(Devam) a) Pirolün elektrokimyasal yükseltgenme ile polimerleşme mekanizması b) Anilinın kimyasal polimerleşmesine ait önerilen mekanizma [26,27]

2.5.3. İletken polimerlerle enzim immobilizasyonu

İletken polimer elektrotların elektroanalitik uygulamalarında, enzim immobilizasyonuna sıklıkla rastlanılmaktadır. Çizelge 2.2’de görüldüğü gibi enzim kullanılan biyosensörlerin geniş bir uygulama alanı bulunmaktadır [26].

Aizawa ve Foulds tarafından yapılan çalışmaların ardından enzimler çeşitli iletken polimerlerle immobilize edilmiştir . Enzim molekülüne monomer kimyasal olarak bağlanabilmekte ve ardından iletken polimer elektrolizle üretilebilmektedir. Bu yöntem ile kovalent bağlı enzim elektrot elde edilmektedir [26].

Birden fazla enzimin iletken polimerlere immobilize edilmesiyle de biyosensörler hazırlanabilmektedir. Laktat dehidrojenaz ve laktat oksidaz enzimlerinin poli (fenilendiamin) polimerine immobilize edilmesiyle çok hassas biyosensörler hazırlanmıştır [26].

2.6. Biyobileşen İmmobilizasyonu

Biyosensörler farklı özellikteki iki elemanın [dönüştürücü ve biyobileşen] kombinasyonu ile oluşurlar. Uygun biyoreseptör ve dönüştürücü seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması aşılması gereken en önemli sorundur. Bu bağlama işlemi biyoreseptör immobilizasyonu olarak tanımlanır. Bağlama işleminde çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen dönüştürücü ve biyoreseptöre göre belirlenir. İmmobilizasyon biyoreseptörün kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. Biyosensör immobilizasyonunda başlıca dört yöntem kullanılmaktadır [28].

2.6.1. Kovalent bağlama

Enzimler doğrudan dönüştürücü veya önceden uygun bir film veya tabaka ile kaplanmış dönüştürücüye kovalent olarak bağlanabilirler. Enzimler aktive edilmiş dönüştürücü yüzeylerine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanarak immobilize edilen enzim preparatının dönüştürücü yüzeyinde bir film veya tabaka oluşturmasıyla da biyosensörler hazırlanabilir [28].

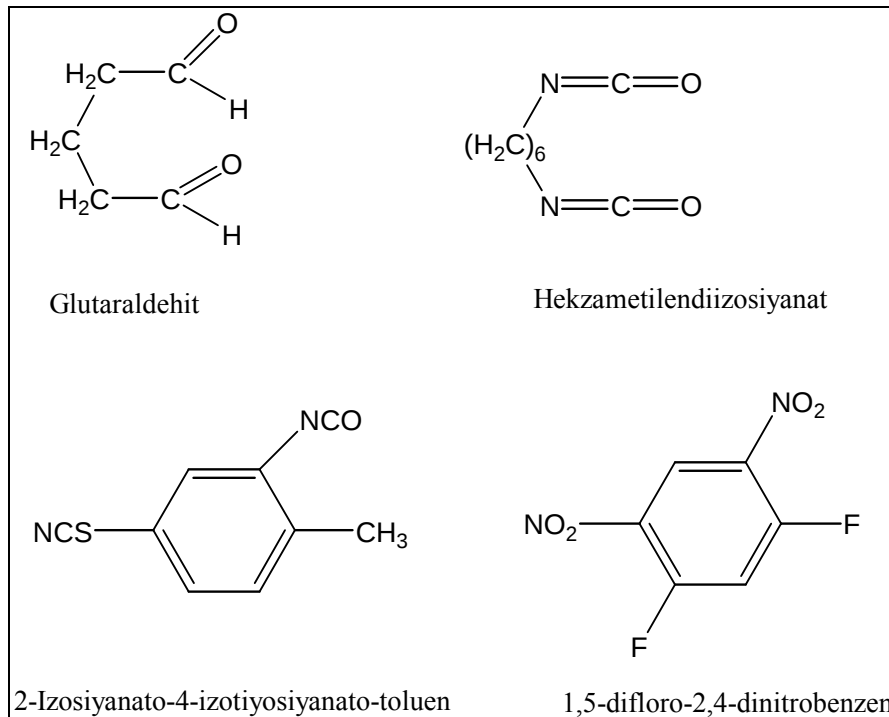
Enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için aktif merkezdeki amino asitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların sterik olarak rahatsız edilmemesidir. Kovalent bağlanma enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir [28].

2.6.2. Tutuklama

Biyoreseptörün bir membran veya tabaka içerisinde hapsedilmesidir. Enzimler makromoleküler yapıları proteinler olup polimer jel tabakalarda ve daha basit olarak diyaliz membranlarında tutuklanabilirler. Bu yöntem enzimler yanında organeller, hücreler ve antikorlar için de uygulanabilir. Elektrokimyasal polimerleşme diğer bir tutuklama yöntemidir [28].

2.6.3. Çapraz bağlama

Bu yöntem biyosensör hazırlanmasında daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde uygulanır. Çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehit, heksametilen diizosiyanat, diflorodinitrobenzen, bismaleimidoheksan, disüksinilsüberat sık kullanılır. İki fonksiyonlu reaktifler enzimler yanında organeller, hücreler ve antijenlerin immobilizasyonunda da uygulanır. Bazı çapraz bağlayıcıların formülleri Şekil 2.4 'de verilmiştir [28].



Şekil 2.4. Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri

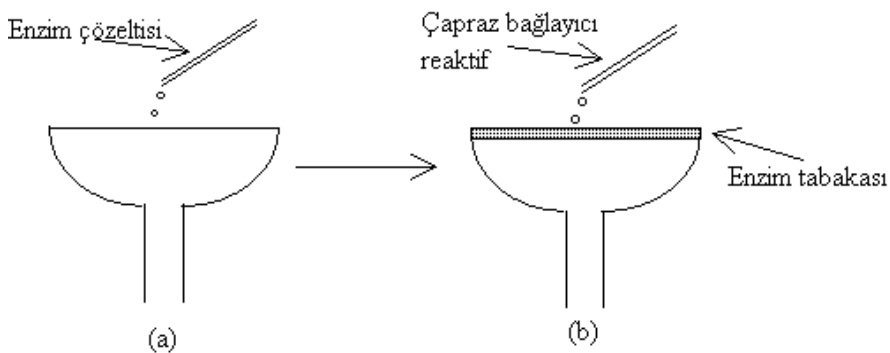
Çapraz bağlamada iki yöntem kullanılır:

Daldırma yöntemi

Elektrot önce enzim ve çapraz bağlayıcının bulunduğu karışıma veya enzim, albumin, jelatin gibi, suda çözünen protein ve çapraz bağlayıcının bulunduğu karışıma daldırılır, sonra kendi eksenine etrafında homojen bir enzim tabakası elde edilecek şekilde döndürülür. Bundan sonra elektrot glisin çözeltisine daldırılarak nötürleştirilir ve çapraz bağlayıcının fazlası ve diğer reaksiyona girmeyen maddeler yıkanarak uzaklaştırılır. Yöntem çok kolay ve özellikle küçük dönüştürücüler için çok uygundur [28].

Doğrudan bağlama yöntemi

Bu yöntemde yaklaşık 10 μ L enzim çözeltisi bir kılcal boru yardımıyla dönüştürücü yüzeyine ince bir tabaka oluşturacak şekilde damlatılır (Şekil 2.5 (a)). Daha sonra çapraz bağlayıcı reaktif ilave edilir (Şekil 2.5 (b)). Bu yöntemde daldırma yöntemine göre daha az biyobileşen ile çalışılabilmektedir [28].



Şekil 2.5. Direkt bağlama ile enzim immobilizasyonu (a) Enzim çözeltisi
b) çapraz bağlayıcı reaktif ilave edilmesi [28]

2.6.4. Adsorpsiyon

Bu yöntemde biyobileşenin film veya tabakaya adsorbe olması sağlanır. Biyobileşenlerin kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna göre immobilizasyon yöntemi belirlenir. Enzimler için uygulanan tüm immobilizasyon yöntemleri protein yapısındaki diğer biyoreseptörler için de uygulanabilir. Örneğin; hayvan ve bitki dokuları zar yapısında olduklarından farklı immobilizasyon yöntemleri uygulamak gerekir [28].

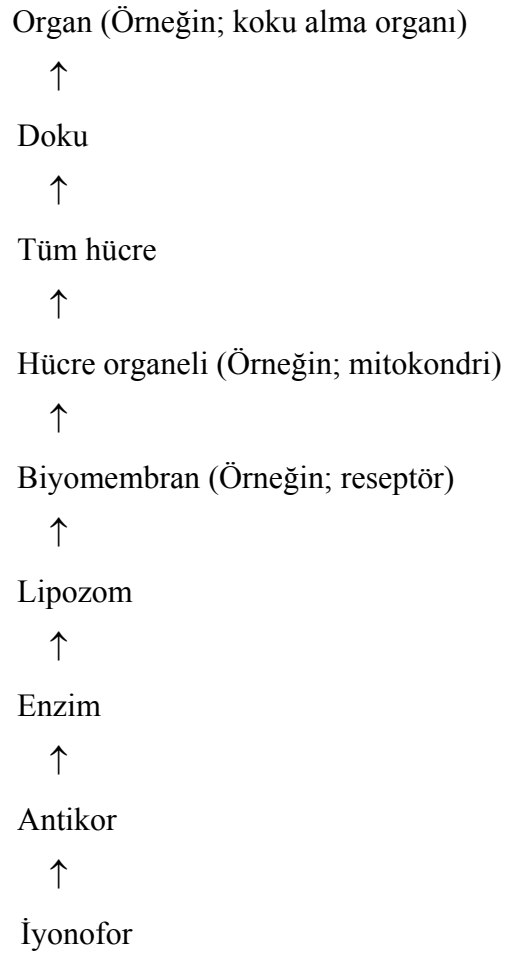
İmmobilizasyon yöntemine göre biyosensörlerin ortalama ömürleri aşağıda verilmiştir.

Adsorpsiyon: 1 gün, *Membranda tutuklama:* 1 hafta

Fiziksel tutuklama: 3-4 hafta *Kovalent bağlama:* 4-14 ay

2.7. Enzim Sensörleri

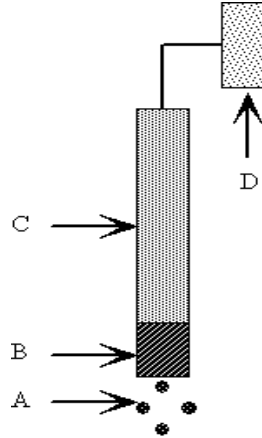
Biyosensör teknolojisindeki ilk örnekler özellikle amperometrik ve potansiyometrik temelli enzim elektrotları şeklinde ortaya çıkmışlardır. Bu durumun en önemli nedeni o tarihteki bilgi ve teknolojik birikimin, söz konusu çalışmalar için yeterli düzeye ulaşmış olmasıdır. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal sıralamasında enzimlerin yeri Şekil 2.6' da verilmiştir [29].



Şekil 2.6. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal sıralamasında enzimlerin yeri

2.7.1. Genel çalışma ilkesi

Enzim sensörleri, biyobileşen olarak enzimin kullanıldığı iletici ve ölçme sisteminden oluşur. Diğer biyosensörlerde olduğu gibi enzim sensörlerinde de biyoaktif tabakanın iç ve dış yüzeylerinde zarlar, sinyali yükselticiler, mikro işlemciler, kaydedici veya bilgisayar sistemleri amaca yönelik olarak kullanılabilir. Bir enzim sensörünün genel gösterimi Şekil 2.7’da verilmiştir [29].



Şekil 2.7. Bir enzim sensörünün genel gösterimi

(A: Analizlenecek madde, B: İmmobilize enzim tabakası, C: İletici eleman, D: Ölçme sistemi)

Bir enzim elektrodunda enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği tepkime uygun bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir iletici ile birleştirilmektedir. İletim sistemi biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan ürünün miktarındaki artışı tespit edebilecek şekilde seçilmelidir. Biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka iletici ara yüzeyindeki derişimlerin hızlı bir şekilde dengeye ulaşabilmesi için difüzyon engelini en aza indirmek amacıyla biyoaktif tabaka kalınlığının mümkün olduğunca ince olması gerekmektedir. Bunun yanı sıra biyoaktif tabakada sabit bir substrat derişimi sağlayabilmek için ölçme çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması gerekmektedir. İletici sistemin ölçme sistemine gönderdiği sinyal biyoaktif tabaka ile iletici ara yüzeyindeki derişimlerdeki değişikliğe bağlıdır. Ancak söz konusu derişimler denge halinde ölçme çözeltisindeki derişimlerle orantılı olduğu için çoğu zaman kalibrasyon grafiği çizilerek sonuca varılır [29].

2.7.2. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

Enzim sensörlerinin sınıflandırılması en yaygın şekilde, enzimatik tepkime sonucu oluşan sinyalin belirlenme ilkesine göre yapılmaktadır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması[29]

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

Elektrokimyasal esaslı enzim sensörleri

Elektrokimyasal esaslı enzim sensörleri, enzim sensörleri içerisinde en yaygın kullanım alanı bulmuş türü oluşturur. Bu durumda, enzim sensörlerinin dolayısıyla biyosensörlerin ilk ortaya çıkan örnekleri elektrokimyasal enzim sensörleridir [29].

Amperometrik esaslı enzim sensörleri

Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin derişimlerinin bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin derişimlerinin belirlenmesinde yararlanılır [29].

İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark oluşan ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir [29].

2.8. Performans Faktörleri

Hazırlanan biyosensörün hedeflenen amaçlar çerçevesinde kullanılabilir olup olmadığına ancak performans faktörlerinin ayrıntılı bir şekilde belirlenmesinden sonra karar verilebilir [29].

2.8.1. Kararlılık

Bir enzim elektrodunun kararlılığı diğer faktörlerde yeterli koşullar sağlandıktan sonra onun pratik kullanılabilirliğinin en önemli belirteçlerinden biridir. Kararlılık biyosensör ömrünün uzunluğu hakkında fikir verir. Uzun ömür aynı materyalle çok sayıda analizin yapılabileceğini gösterir. Bu durum da iş gücü ve maliyet açısından önemli avantajlar sağlar [29].

Doğanın temel ilkeleri çerçevesinde başta organik moleküller olmak üzere tüm maddeler kaçınılmaz bir yıkıma uğrarlar. Dolayısıyla biyosensörlerin de bir ömrü vardır. Söz konusu ömür onların depolama ve çalışma koşulları açısından başlıca iki durumda incelenir. Doğal olarak kullanılmadan ideal koşullarda depolandığındaki ömür ile sürekli çalışma koşullarındaki ömrü farklı olacaktır [29].

Biyolojik materyal açısından enzim sensörünün kararlılığı incelendiğinde enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi gibi değişkenlerin önem taşıdığı görülür. Genelde fiziksel immobilizasyon yöntemlerinin kullanılması durumunda biyosensör ömrü kimyasal yöntemlere göre daha kısadır. Enzimin saflık düzeyi yükseldikçe doğal ortamındaki bileşenlerinden uzaklaştığı için kararlılıkta azalma söz konusu olabilir [29].

2.8.2. Tayin aralığı ve tayin sınırı

Kalibrasyon grafiğinde substrat derişimiyle sensör cevabı arasındaki ilişkisinin doğrusal olduğu derişim aralığına “doğrusal aralık” denir. Bu doğrusal grafiğin en alt sınırı tayin sınırı olarak tanımlanır. Bu değer bir kesinlik ve doğruluk ifade eder. Tayin sınırı kalibrasyon grafiğinin, doğrusal kısmının uzatılarak x eksenini kestiği nokta olarak tanımlanır [29].

Potansiyometrik enzim sensörlerinde kalibrasyon grafiği substrat (yada ürün)derişiminin logaritması ile potansiyel arasında çizilir. Buna karşılık amperometrik esaslı enzim sensörlerinde substrat (veya ürün) derişimiyle akım arasında doğrusal grafikler elde edilir. Ancak bütün grafikler Michaelis-Menten eşitliğinin kapsamı içindedirler. Genelde tayin sınırının 10^{-5} M’den daha düşük bir değer olmasının önemi vurgulanır. Amperometrik esaslı enzim sensörlerinde diğerlerine nazaran oldukça yüksek duyarlılıklara erişebilmek mümkündür [29].

Doğal olarak doğrusal tayin aralığının ve tayin sınırının çalışma için uygunluğu, hedeflenen analizde analizlenecek maddenin analiz ortamındaki düzeyi ve girişim yapabilecek diğer maddelerle birlikteliğinden önemli ölçüde etkilenmektedir [29].

Bunun yanı sıra biyosensör cevabını etkileyen değişkenlerin doğrudan sensör kalibrasyonunu etkileyeceği gözden uzak tutulmamalıdır. Örnek olarak enzim sensörleri incelendiğinde başlıca pH sıcaklık ve girişim yapan maddeler sensör cevabını etkileyerek tayin aralığını değiştirebilirler. Çalışma pH’sından

uzaklaşılmasıyla biyoaktif tabakadaki toplam enzim aktivitesinde değişimler olabilir. İkincisi ise enzimatik tepkime uyarınca tüketilen yada üretilen ve sinyal oluşumuna yol açan türlerin pH değişimiyle beraber disosiasyon değerlerinin değişmesidir. Bu durum tayin edilecek maddenin aktif türün derişiminde değişikliğe neden olarak sensör cevabında değişmeye yol açabilir. Böylece pH farklanmasıyla kalibrasyon eğrisinde değişimler ortaya çıkar [29].

Sıcaklık, enzim sensörünün cevabını optimum sıcaklıktan uzaklaşması durumunda olumsuz yönde etkiler. Bu, özellikle termal kararlılığı düşük enzimlerde geri dönüşümsüz bir denaturasyonla da sonuçlanabilir. Buna karşılık çeşitli kimyasal türlerin difüzyon hızlarının sıcaklıkla artması enzim sensör cevabında bir artışa neden olur [29].

Herhangi bir girişim yapan madde enzim sensörü cevabını başlıca üç şekilde etkileyebilir. Bu etkileşimlerden birincisi, girişim yapan maddenin etkisinin temel sensör üzerinde, ikincisi biyoaktif tabakadaki enzim üzerinde, üçüncüsü ise; enzimatik tepkimedeki bileşikler üzerinde göstermesiyle gerçekleşir. Söz konusu durumlara örnek olarak sırasıyla katyon seçici temel sensörlerin ortamdaki diğer katyonlardan etkilenmesi, inhibitör veya aktivatörlerin veya mutlak özgül olmayan enzimler için benzer substratların biyoaktif tabakadaki enzim aktivitesini etkilemesi ve ortamda bulunabilecek bazı indirgen veya yükseltgen maddelerin enzimatik reaksiyonun substrat veya ürünleriyle etkileşmesi verilebilir. Sonuçta enzim sensörü cevabındaki değişim kalibrasyon grafiğinde değişmeye ve çoğu zaman tayin aralığında ve tayin sınırında değişmeye yol açar. Bu gibi problemleri ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için, temel sensör seçilirken analiz ortamında onu etkileyecek unsurların varlığı dikkate alınmalıdır. Enzim aktivitesi açısından aktivatörlerin maksimum düzeyde ilavesine buna karşılık inhibitörlerin uzaklaştırılmasına önem verilmelidir. Aktivatör ve inhibitör etkisi biyooaktif tabakadaki enzim aktivitesinin arttırılmasıyla büyük ölçüde engellenebilir. Enzimatik tepkimenin substrat ve ürünleriyle girişim yapan maddelerin varlığı önemli bir problemdir. Bu problem girişim yapan maddenin bir ön işlemle uzaklaştırılması ya

da tepkime bileşenlerinden girişim yapan maddenin etkilemediği bir tanesine duyar bir temel sensör kullanılmasıyla çözüme kavuşturulabilir [29].

2.8.3. Seçimlilik

Seçimlilik diğer analiz sistemleriyle kıyaslandığında biyosensörlerin varlık nedenlerinin en ön sıralarında gelmektedir. Kullanılan biyomateryal açısından bakıldığında enzimler genel anlamda seçimlilik sıralamasında antikor ve nükleik asitlerden sonra gelirler. Ancak bu genel yaklaşım mutlak özgül enzimler söz konusu olduğunda geçersizdir. Dolayısıyla mutlak spesifik bir enzim söz konusu olduğunda seçimlilik de en üst seviyelere yükselir. Buna karşılık özgüllüğü düşük enzimler, grup özgül enzimler, kısmi saflaştırılmış enzim preparatları, dokular ve mikroorganizmalar seçimlilik açısından bir takım olumsuzluklara sahiptirler [29].

Bir biyosensörün seçimliliği üzerinde başlıca, sensörle girişimler, biyokatalizörle girişimler ve pH etkili olmaktadır.

Sensörde meydana gelebilecek girişimleri engellemenin en iyi yolu örnekteki diğer maddelere cevap vermeyen ve yalnızca ilgilenilen biyokatalitik tepkimeyi izleyebilecek bir sensör kullanmaktır. Örneğin; kanda üre tayinine yönelik bir biyosensörde temel sensör olarak NH_4^+ 'a duyarlı bir iyon seçimli elektrodun kullanılması ortamda bulunan Na^+ ve K^+ iyonlarının girişimine neden olur. Buna karşılık temel sensör olarak NH_3 'a duyarlı bir sensör kullanılması bu istenmeyen durumu ortadan kaldırır [29].

Amperometrik sensörler potansiyometrik olanlara nazaran bir ölçüde daha özgüldürler. Seçilmiş sabit bir potansiyelde iş görmelerine rağmen, söz konusu koşullarda elektroaktif maddelerin varlığı girişime neden olabilir [29].

Seçimliliği etkileyen diğer önemli değişken biri olan biyokatalizatörle girişim, enzimler söz konusu olduğunda, iki başlık altında incelenebilir. Bunlar yarışmalı substratlar ve enzimi aktive veya inhibe eden maddelerdir. Eğer enzim üreaz

[substrat :üre], ürikaz [substrat: ürik asit], aspartaz [substrat: aspartik asit] gibi yalnızca bir substratla tepkime verme özelliğine sahipse yarışmalı bir başka substrat girişimi söz konusu değildir. Ancak alkol oksidaz gibi grup özgüllüğüne sahip enzimler (substrat: düşük molekül kütleli primer alkoller) veya amino asit oksidazlar (substrat: amino asitler) söz konusuysa esas tayin edilecek türün yanında diğerlerinin de varolması girişim etkisine yolaçar. Bu durumda bazı ön işlemlerin yapılması gereksinimi doğar. Bir enzim sensöründe enzim aktivitesi ölçme ortamından gelen inhibitör ve aktivatörlerden de etkilenir. En önemli inhibitörler Ag^+ , Hg_2^{++} ve Cu^{2+} gibi metal iyonları, organofosfatlar ve tiyol bileşikleridir. Başta oksidazlar olmak üzere pek çok enzimin aktif merkezinde yeralan serbest tiyol gruplarını bloke ederler. Ortamda bulunabilecek enzim aktivatör veya inhibitörleri, enzim aktivitesini değiştireceği için hatalı sonuçlara ulaşılmasına neden olurlar. Bu nedenle analizlenecek örnek içeriğinin iyi yorumlanması büyük önem taşır [29].

Ortamın pH'sı da seçimliliği etkileyen önemli değişkenlerden biridir. pH etkisi hem enzime hem de sensöre değişik şekillerde etkir. Bilindiği gibi her enzim en yüksek düzeyde aktivite gösterdiği bir optimum pH'ya sahiptir. İmmobilizasyon sonucu bazı durumlarda taşıyıcının yapısına bağlı olarak optimum pH'da kaymalar olabilir. Bunun yanısıra ilgili enzimatik tepkimede yüklü substratların sözkonusu olması durumunda pH'ye bağlı olarak bu substratların yük durumlarındaki değişimler de seçimlilik üzerine etki edebilir. Ayrıca temel sensörün de, özellikle bazı tür elektrodalarda optimum cevap için belirli pH gereksinimleri vardır. İleriki faktör arasındaki uyum, teorik olarak pH zorlamalarının yerine, en pratik bir şekilde, hazırlanan biyosensörün en hızlı, en kararlı ve en duyarlı cevap verdiği optimum pH değerinin deneysel olarak belirlenmesiyle elde edilir [29].

Gerçekte tayin aralığının da seçimlilik üzerinde bir etkisi vardır. Örneğin; bir ölçme yapılacak ortamda analizlenecek hedef maddenin yanında girişim yapabilecek bir başka maddenin varolması durumunda, hedef maddeye ilişkin tayin aralığı büyük önem taşır. Oldukça düşük tepkimelere inebilen bir tayin aralığında, örnekteki hedef maddenin önemli ölçüde seyreltilerek tayinine olanak varsa, girişim yapacak

maddenin konsantrasyonunu bu işlemler sonucunda tayin sınırları dışına çıkarılması mümkün olabilmektedir. Bu durum sonuçta seçiciliğe önemli bir katkı sağlar [29].

2.8.4. Cevap süresi

Biyosensörlerin büyük bir hızla yaygınlaşmasının en önemli nedenlerinden biri, ideal bir biyosensörün de temel niteliklerinden olan pratik bir işlemle kısa sürede sonuç verebilmesidir. Çok sayıda örneğin söz konusu olduğu rutin analizlerde mümkün olan en az ön işlemle en kısa sürede elde edilen sonuç büyük önem taşımaktadır. Cevap süresi ile kastedilen, biyosensörün, analizlenecek maddenin bulunduğu ortama temas ettiği andan itibaren ölçme düzeneğinden sonucun okunduğu ana kadar geçen süredir [29].

Bir biyosensörün cevap süresi 3 ana aşamada meydana gelen olaylar tarafından etkilenir. Bunlar;

1. Substratın analiz ortamından zar yüzeyine ne kadar hızlı, difüzlendiği,
2. Substratın zar içine ne kadar hızlı difüzlendiği ve biyokatalizörün aktif merkezi ile ne kadar çabuk tepkime verdiği,
3. Oluşan ürünün ölçüldüğü yer olan sensör yüzeyine ne kadar hızlı difüzlendiği.

Bu üç olayı etkileyen başlıca unsurlar da çözeltinin karıştırma hızı, substrat derişimi, enzim derişimi , optimum pH, sıcaklık ve sensör yüzeyinde veya biyoaktif tabaka yüzeyinde herhangi bir zarın kullanılıp kullanılmadığı ve kullanılıyorsa niteliğidir. Bu unsurlardan karıştırma hızının artışı cevap süresini kısaltırken, substrat derişimindeki artış uzamasına yol açar. Enzim miktarının artışı ve optimum pH'ya yaklaşma cevap süresini kısaltır. Ancak enzim miktarı artışı biyoaktif tabaka kalınlaşmasına yol açacağı için difüzyon problemini arttırabilir ve cevap süresi uzar. Bu sorun spesifik aktivitesi yüksek enzim preparatlarının kullanımıyla giderilebilir. Sıcaklık difüzyonu olumlu yönde etkileyerek cevap süresinin ksalmasına yol açar.

Ancak enzimin optimum sıcaklığından uzaklaşmasının enzim aktivitesinde bir düşmeye neden olacağı gözden uzak tutulmamalıdır [29].

Biyosensörler için cevap süresi genel olarak birkaç saniye ile birkaç dakika arasında değişir. 5 dakikaya kadar olan değerler kabul edilebilir. Ancak 10 dakika gibi bir süre oldukça uzun kabul edilir. Doğal olarak bir biyosensörün en az sürede en çok sayıda analize imkan vermesi sadece cevap süresiyle sınırlı bir durum değildir. Yeni bir ölçüme hazır hale gelebilmesi için gereken polarizasyon, denge veya yenilenme gibi işlemlerin aldığı süre çoğu zaman cevap süresinden çok daha fazla bir süre alır [29].

2.8.5. Tekrarlanabilirlik

Hazırlanan bir biyosensör ile tekrarlanabilirlik denemelerinin en basiti aynı bir örnekle ardarda ölçme yapılması ve elde edilen değerlerden standart sapma ve korelasyon katsayısının hesaplanmasıdır. Her zaman standart kalibrasyon grafiği çizme gereğinden kaçınılması durumunda, standart ilave yöntemlerinden yararlanılır. Bu amaçla analizlenecek örnek ölçülür, ardından gerçek değeri bilinmeyen bu örneğin ölçme sonuçlarına göre yaklaşık iki katı derişimde bilinen bir standart eklenir ve ölçme işlemi gerçekleştirilir. Bu yöntem sensör cevabının örnek derişimiyle doğrusal değıştiğinin bilindiğı durumlarda aşağıdaki bağıntı yardımıyla hesaplanır [29].

$$C_u = \frac{ruC_s}{r(u + s) - ru}$$

Bağıntıda C_u : Bilinmeyen örneğin derişimini, C_s : Eklenen standardın konsantrasyonunu, ru : bilinmeyen örneğin sensör cevabını, $r[u+s]$: bilinmeyen örnek ve eklenen standardın sensör cevapları toplamını ifade eder [29].

2.8.6. Diğer performans faktörleri

Bir biyosensörün performansını etkileyen diğer önemli faktörlerden biri de maliyettir. Maliyet genelde biyosensörün hazırlanması giderleri ile söz konusu biyosensörle yapılan bir analizin giderlerinin toplamıdır. Hazırlanma giderlerinin az olması durumunda genelde bu fasıldan analiz başına gelecek gider katkısı azalacaktır. Doğal olarak biyosensörün kullanılma kararlılığı bu faktörü büyük ölçüde etkileyecektir [29].

Özellikle çevre ve savunma gibi alanlarda kullanılacak bir biyosensör için taşınabilir olması büyük önem taşır. Taşınabilirlik beraberinde kullanım kolaylığını ifade edecek şekilde basit olma niteliğini de içeriyorsa daha yaygın kullanım olanağı ortaya çıkacaktır. Ancak pratik kullanım için basitleştirilmiş sistemlerin, çoğu zaman karışık sistemlere nazaran hatalı olabileceği gözden uzak tutulmamalıdır. Genelde bu gibi sistemlerden acil durumlarda bir fikir edinmek amacıyla ya da diğer türden bir analizin mümkün olmadığı koşullarda yararlanılmalıdır [29].

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Cihazlar ve Malzemeler

3.1.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

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

3.1.2. Hücre ve elektrotlar

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



Şekil 3.1. Kaplama ve ölçme yapmada kullanılan hücre sistemi

3.1.3. pH metre

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

3.1.4. Su banyosu

Sabit sıcaklık çalışmalarında Grant W14 Marka termostatlı dolaşımli su banyosu kullanıldı.

3.1.5. Mikro pipet

5 µL - 500 µL çözelti ilaveleri için Volac marka $\pm 0,05$ µL hassasiyeti olan mikro pipetler kullanıldı.

3.1.6. Azot gazı

Çözeltide çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için, inert gaz olarak Kargaz firmasından temin edilen yüksek saflıktaki [% 99,999] azot gazı kullanıldı.

3.1.7. Saf su

Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan saf su GFL Marka saf su cihazından temin edildi.

3.1.8. SEM analizi

Hazırlanan elektrotların yüzey fotoğrafları çekme işlemlerinde Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümündeki Jeol-JSM-6060 LV marka cihaz kullanıldı.

3.2. Kullanılan Reaktifler ve Özellikleri

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

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

Kimyasal Madde	Saflık Dereceleri	Temin Edildiği Firma
Pirol (C_4H_5N)	%97,0	Fluka
Anilin	%99.5	Aldrich
Glutaraldehit ($C_5H_8O_2$)	%25d=0,78	Aldrich
Sodyum hidroksit (NaOH)	-	Fluka
Hidroklorik asit (HCl)	%36.5	Merck
Sodyum Monohidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	-	Merck
Sodyum Dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)	-	Merck
Sülfürik asit (H_2SO_4)	%98	Merck
Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	%35	Merck
Sığır Serum Albumin (BSA)	-	Merck
Triton X-100	-	Merck
Kolesterol	-	Merck
Propan 2-ol	-	Merck

3.2.1. Kullanılan çözeltiler

Sülfürik asit çözeltisi: Derişik sülfürik asitten belli bir miktar alınıp uygun şekilde seyreltilerek derişimi 0,1 M olan çözelti hazırlandı.

Fosfat tamponu: Monosodyum fosfat monohidrat ve disodyum fosfat heptahidrat belli bir miktar tartılarak saf suda çözüldü, hazırlanan çözeltinin pH' sı 0,1 M NaOH ile 7,2' e ayarlandı ve çözeltideki analitik derişimi 0,1M olacak şekilde seyreltildi. Farklı pH ve derişimlerdeki tampon çözeltileri hazırlamak için aynı yol izlendi. Tampon çözelti ölçülü balonda buzdolabında saklandı.

Enzim çözeltisi: Toplam aktivitesi 100 U ve miktarı 5,0 mg olan kolesterol oksidaz enzimi alındı ve saf suda çözüldükten sonra hacim ölçülü balonda 10 mL'ye tamamlandı [10 ünite/mL]. Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında bekletildi, ancak uzun süre kullanılmadığı durumlarda çözelti derin dondurucuda saklandı.

Glutaraldehit çözeltisi: % 25 'lik glutaraldehit çözeltisinin seyreltilmesiyle %5' lik glutaraldehit çözeltisi hazırlandı.

Kolesterol çözeltisi: 0,0193 g kolesterol, 2,56 mL propan 2-ol içerisinde çözüldü. Üzerine 0,4 mL Triton X-100 ilave edildi. Hazırlanan çözeltinin homojenliğini sağlamak amacıyla çözelti iyice karıştırıldı. Daha sonra fosfat tamponu [pH = 7, 0,1 M] ile hacmi 25 mL' ye tamamlandı ve +4°C' da saklandı.

Sodyum hidroksit çözeltisi: Katı sodyum hidroksitten belli bir miktar tartılıp suda çözülerek 0,1 M, 250 mL çözeltisi hazırlandı.

Hidrojen peroksit çözeltisi: %30'luk hidrojen peroksit çözeltisinden belli bir miktar alınarak 1,0 M'lık stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden belli miktarlarda alınıp seyreltilerek 1.10^{-3} , 1.10^{-4} , 1.10^{-5} M'lık hidrojen peroksit çözeltileri hazırlandı.

Hidroklorik asit çözeltisi: Derişik HCl' den belli bir miktar alınıp uygun bir şekilde seyrelterek 0,1 M 250 mL çözeltisi hazırlandı.

3.3. Platin Yüzeye Sülfürik Asit ortamında Polipirol-Polianilin Kaplanması

Elektrot yüzeyinin hazırlanması: Kaplama işleminden önce platin levhanın yüzeyi mekanik, kimyasal ve elektrokimyasal olarak temizlendi. Önce yüzey sıfır numara zımpara ile parlatıldı, sonra aleve tutuldu. 5 dakika süre ile sırasıyla aseton, etil alkol, derişik HCl ve derişik nitrik asit çözeltisi içerisinde bekletildi. Elektrot yüzeyi bol saf su ile yıkandıktan sonra 5 M H_2SO_4 içinde -2,0 V - +2,0 V arasında tarama yapılarak elektrokimyasal olarak temizlendi. Tekrar saf su ile yıkandı ve kurutuldu. Her kaplama işleminden önce yüzey, bu şekilde temizlendi [30].

Temizlenmiş Pt levha elektrodunun yüzeyi bir iletken polimer olan polipirol ve polianilin ile kaplandı. Polipirol ve polianilin elektrot yüzeyine pirolün ve anilinin elektropolimerleşmesi ile biriktirildi. Elektropolimerleşmede üçlü elektrot sistemi kullanıldı (Şekil 3.1). Çalışma elektrodu olarak platin levha ($0,5\text{ cm}^2$), karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak da Ag/AgCl elektrot kullanıldı. Enzim elektrot yapımında kullanılmak üzere polianilin-polipirol elektrot hazırlandı. Bu amaçla 0,00-0,7 V arasında 50 mV/s tarama hızında çevrim alınarak (dönüşümlü voltametri ile) anilinin ve pirolün platin yüzeyde elektropolimerleşmesi gerçekleştirildi. Kaplama işleminden sonra elektrot yüzeyi tampon çözeltisi ile yıkandıktan sonra kullanılmak üzere tampon içinde bekletildi ve böylece platin/polianilin/polipirol elektrot hazırlandı. Hazırlanan platin/polianilin-polipirol elektrodun yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile fotoğrafı çekildi.

3.3.1. Elektrotların hidrojen peroksit duyarlılığı.

Bölüm 3.3' de belirtildiği şekilde hazırlanan polianilin-polipirol kaplanmış platin elektrotlar kolesterol biyosensörü yapımında kullanılacağından ve enzimatik reaksiyon sonucunda elektroaktif tür olarak hidrojen peroksit oluştuğundan, bu elektrotların ve platin elektrodun hidrojen peroksit duyarlılığı ve doğrusal çalışma aralığı belirlendi. Bu üç elektrot için yapılan işlemler aşağıda kısaca açıklandı.

Platin [Pt] elektrodunun hidrojen peroksida duyarlılığı

Yüzey alanı $0,5 \text{ cm}^2$ olan ve Bölüm 3.3’de belirtildiği şekilde temizlenen ve çalışma elektrodu olarak kullanılan platin levha elektrodun, hidrojen peroksida duyarlılığını belirlemek amacıyla Bölüm 3.3’de kullanılan üç elektrot sistemli elektrokimyasal hücre kullanıldı. Elektrokimyasal hücreye pH’ sı 7,0 olan 10 mL, 0,1 M fosfat tamponu ilave edildi. Suda çözünmüş olan oksijeni uzaklaştırmak amacıyla 10 dakika azot gazı geçirildi. Kararlı akım elde etmek için çalışma potansiyeli olarak seçilen +0,70 V sabit potansiyelde platin elektrot dengeye getirildi. Elektrodun dengeye gelmesi için yaklaşık bir saat beklendi ve kararlı akım kaydedildi. Bölüm 3.2.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan $1,0 \times 10^{-3}$ M stok çözeltisinden mikro pipet yardımıyla elektrokimyasal hücreye hidrojen peroksit ilave edildi ve bir dakika süreyle N_2 gazı geçirildi. + 0,70 V sabit potansiyel uygulanarak her 5 dakika sonundaki akımlar kaydedildi. Hidrojen peroksit derişimine karşı akım değerleri grafiğe geçirildi [kalibrasyon eğrisi] ve platin elektrodun hidrojen peroksida doğrusal cevap verdiği aralık belirlendi.

Platin / Polipirol (Pt/PPy) elektrodunun hidrojen peroksida duyarlılığı

Bölüm 3.3’ de anlatıldığı gibi hazırlanan Pt/PPy elektrot çalışma elektrodu olarak kullanıldı ve hidrojen peroksit duyarlılığı Platin (Pt) elektrodunun hidrojen peroksida duyarlılığı’de anlatıldığı şekilde belirlendi.

Platin / Polianilin(Pt/Pani) elektrodunun hidrojen peroksida duyarlılığı

Bölüm 3.3’ de anlatıldığı gibi hazırlanan Pt/Pani elektrot çalışma elektrodu olarak kullanıldı ve hidrojen peroksit duyarlılığı Platin (Pt) elektrodunun hidrojen peroksida’de anlatıldığı şekilde belirlendi.

Platin / Polipirol–Polianilin(Pt/PPy-Pani) elektrodunun hidrojen peroksit duyarlılığı

Bölüm 3.3’ de anlatıldığı gibi hazırlanan Pt/PPy-Pani elektrot çalışma elektrodu olarak kullanıldı ve hidrojen peroksit duyarlılığı Platin (Pt) elektrodunun hidrojen peroksit’de anlatıldığı şekilde belirlendi.

Platin / Polianilin-polipirol– (Pt/Pani-PPy) elektrodunun hidrojen peroksit duyarlılığı

Bölüm 3.3’ de anlatıldığı gibi hazırlanan Pt/ Pani-PPy elektrot çalışma elektrodu olarak kullanıldı ve hidrojen peroksit duyarlılığı Platin (Pt) elektrodunun hidrojen peroksit’de anlatıldığı şekilde belirlendi.

3.4. Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi

Bölüm 3.3’ de hazırlanan polianilin-polipirol elektrodunun hidrojen peroksit duyarlılığı araştırılırken, hidrojen peroksitin yükseltgenebilmesi için uygun potansiyelin belirlenmesi amacıyla, çeşitli çalışma potansiyellerinde kalibrasyon eğrileri çizildi. Bu potansiyeller şöyledir: +0,70; +0,60; +0,50; +0,40; +0,30 V; +0,20 V. Her bir potansiyelde çizilen kalibrasyon eğrilerinden en iyi çalışma potansiyeli belirlendi.

3.5. Film Kalınlığına Çevrim Sayısının Etkisi

Literatürde film kalınlığının çevrim sayısı ile ve devreden geçen yük ile ilişkili olduğu belirtilmektedir, ancak kullanılan cihazda doğrudan yük saymak mümkün olmadığından film kalınlığının elektrodun hidrojen peroksit duyarlılığına etkisi kaplamadaki çevrim sayısı değiştirilerek incelendi. Bu amaçla Bölüm 3.3’de anlatıldığı şekilde hazırlanan elektrotlar için sırası ile polipirol için 5, 10, 15, 20, 25, ve 60 çevrim alınarak denendi. Polianilin için ise 5, 15, 30, 45, 55, 65, 70 çevrim sayıları denendi. Sonra uygun çevrim sayısında platin-polipirol elektrodun hazırlanması için elektrot yüzeyi polipirol ve polianilinin farklı çevrim sayılarında kaplandı.

3.6. Kolesterol Biyosensörünün Hazırlanması

Bir tüp içerisinde 100 μL kolesterol oksidaz, 100 μL fosfat tamponu, 50 μL glutaraldehit ve 3 mg sığır serum albumin [BSA] dan oluşan çözelti hazırlandı. Bölüm 3.3'e göre hazırlanan platin/ polianilin/polipirol elektrodun her bir yüzeyine bu karışımdan 50 μL damlatıldı ve çözücünün uzaklaşması için beklendi. Biyosensör kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında $+4^{\circ}\text{C}$ ' da fosfat tamponunda bekletildi. Hazırlanan biyosensörün yukarıda anlatılan her aşaması için elektrot yüzeyinin taramalı elektron mikroskobu [SEM] ile fotoğrafı çekildi.

3.7. Kolesterol Biyosensörünün Çalışma Şartlarının Belirlenmesi

3.7.1. pH' nın etkisi

Bölüm 3.6'a göre hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine pH' nın etkisini incelemek için önce biyosensör, derişimi 100 mM pH' sı 5 olan 10 mL fosfat tamponunda oda sıcaklığında $+0,7\text{ V}$ 'da dengeye getirildi. Sonra stok kolesterol çözeltisinden, hücredeki derişimi 5.10^{-5} M olacak şekilde ilave edildi. Daha sonra $+0,7\text{ V}$ sabit potansiyelde amperometrik cevap akımı ölçüldü. Aynı işlemler derişimi 100 mM ve pH' sı 5,0; 5,5,6,0; 6,5;7,0; 7,5; 8,0; 8,5; olan fosfat tamponları ve 5.10^{-5} M kolesterol çözeltileri için de tekrarlandı. Farklı pH' lardaki her bir çözelti için $+0,70\text{ V}$ sabit potansiyelde ölçülen amperometrik cevap akımları pH' ya karşı grafiğe geçirildi ve grafikten biyosensörün optimum çalışma pH' sı [7,0] belirlendi.

3.7.2. Sıcaklığın etkisi

Bölüm 3.6'e göre hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için önce biyosensör, derişimi 100 mM pH' sı 7,0 olan 10 mL fosfat tamponunda 20°C ' da $+0,7\text{ V}$ 'da dengeye getirildi. Sonra derişimi 100 mM pH' sı 7,0 olan fosfat tamponunda hazırlanmış stok kolesterol çözeltisinden

hücredeki derişimi 5.10^{-5} M olacak şekilde ilave edildi. Daha sonra +0,7 V sabit potansiyelde amperometrik cevap akımı ölçüldü. Aynı işlemler 20, 30, 35, 37, 40, 50, 60, 65°C sıcaklıkları için de tekrarlandı. Farklı sıcaklıklardaki her bir çözelti için + 0,70 V sabit potansiyelde ölçülen amperometrik cevap akımları sıcaklığa karşı grafiğe geçirildi ve grafikten biyosensörün optimum çalışma sıcaklığı [60°C] belirlendi. Çalışma şartlarının kolay olmasından dolayı bundan sonraki deneylerde çalışma sıcaklığı olarak 25°C seçildi.

3.7.3. Substrat derişiminin etkisi

Bölüm 3.6.'e göre hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine substrat derişiminin optimum şartlarda etkisini incelemek için önce biyosensör, +0,7 V'da dengeye getirildi. Sonra biyosensörün kolesterole cevabının ve çalışma aralığının belirlenmesi için 1.10^{-6} - 3.10^{-4} M kolesterol derişimi aralığında amperometrik cevap akımları ölçüldü ve bulunan değerler kolesterol derişimlerine karşı grafiğe geçirildi [Michaelis-Menten eğrisi]. Bu grafikten yararlanarak biyosensörün çalışma aralığı belirlendi. Enzim sabitleri olan K_m ve V_{maks} 'ı belirleyebilmek için Lineweaver-Burk grafiğini çizildi.

3.7.4. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

Bölüm 3.6'a göre hazırlanan ve dengeye getirilen biyosensörün optimum şartlarda tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için 5.10^{-5} M kolesterol derişiminde arka arkaya yapılan ölçmeler sonucu elde edilen amperometrik cevap akımlarına karşı ölçme sayısı grafiğe geçirildi ve bu grafikten ölçülen akım değişimleri kullanılarak aktivitedeki azalma değeri hesaplandı.

3.7.5. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Bölüm 3.6'a göre hazırlanan ve dengeye getirilen biyosensörün optimum şartlarda raf ömrünü belirlemek için biyosensör 25 gün boyunca 4° C' da buzdolabında bekletildi. Üç günde bir defa olmak üzere 5.10^{-5} M kolesterol derişiminde

biyosensörün amperometrik cevap akımı ölçüldü. Bekletme süresine karşı cevap akımları grafiğe geçirildi ve bu grafikten ölçülen akım değişimleri kullanılarak aktivitedeki azalma değeri hesaplandı.

3.7.6. Biyosensörün cevap süresinin belirlenmesi

Bölüm 3.3.'e göre hazırlanan ve dengeye getirilen biyosensörün optimum şartlarda cevap süresini belirlemek için 5.10^{-5} M kolesterol derişiminde +0,7 V'da çeşitli zaman aralıklarında devreden geçen akım değerleri kaydedildi. Zamana karşı ölçülen amperometrik cevap akımları grafiğe geçirilerek akım değişiminin sabit kaldığı süre biyosensörün cevap süresi [300 s] olarak belirlendi.

3.7.7. Biyolojik sıvıda [kanda] kolesterol tayini

Biyolojik sıvıda ki kolesterol tayini için 5 kişiden kan örneği alındı. Örnek alma işlemleri sağlıklı bireylerden yapıldı. Bu örnekler steril kaplara alındı ve muhafaza edildi. Kan örneklerinden aynı anda 2 paralel numune alındı. Örneklerden biri karşılaştırma yapmak amacıyla Sağlık Kültür Spor Daire Başkanlığı biyokimya laboratuvarında analiz için bırakıldı. Diğer kan örnekleri ise tarafımızdan analiz edilmek üzere getirildi ve hemen buzdolabına konularak muhafaza edildi.

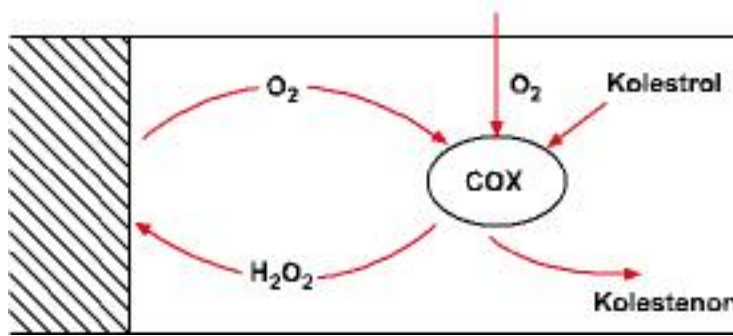
Kan örneklerinin analizi için ön işlemler uygulandı. Kan analizleri genellikle kan serumunda yapıldığı için öncelikle kan örneklerinden bir miktar alındı ve 3000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstte kalan [kan serumu] kısmı alındı. Daha sonra analiz sırasında girişim yapabileceğini düşündüğümüz proteinleri bulundukları kan serumu ortamından ayırmak için %10'luk triklorasetik asit kullanıldı ve çöken proteinler sonucu oluşan çökelek süzülerek ortamdan uzaklaştırıldı. Proteinleri çöktürülmüş kan serumu analiz yapılınca kadar buzdolabında muhafaza edildi.

Kan serumunda kolesterol tayini için seyreltme işlemleri yapıldı. Bu işlem kan serumundaki kolesterol derişiminin biyosensörün doğrusal çalışma aralığına getirilmesi için yapıldı.

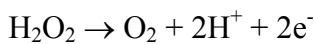
Kan serumundan belli hacimlerde alındı ve 20 defa seyreltme olacak şekilde biyosensörün bulunduğu hücre ortamına ilave edildi. Ölçülen akım değerlerinden kalibrasyon grafiğı kullanılarak kolesterol derişimi tayin edildi. Her numune için 3 paralel deney yapıldı ve standart sapma değerleri hesaplandı.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada platin yüzey üzerine iletken bir polimer olan polipirol ve polanilin kaplandı. Ayrıca bu film elektrot üzerine kolesterol oksidaz enzimi bir protein olan albumin ve çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehitin varlığında immobilize edildi. Hazırlanan biyosensörün analitik ve biyokimyasal özellikleri incelendi. Bilindiği gibi enzimatik reaksiyonların bir kısmında tepkime ürünü olarak H_2O_2 açığa çıkar. Hazırlanan enzim elektrotların çoğu, uygulanan sabit potansiyelde çalışma elektrodunun yüzeyinde enzimatik tepkime sonunda oluşan H_2O_2 ' in yükseltgenmesi esasına dayanmaktadır [31- 33]. H_2O_2 aşağıdaki tepkimeye göre oluşmaktadır.

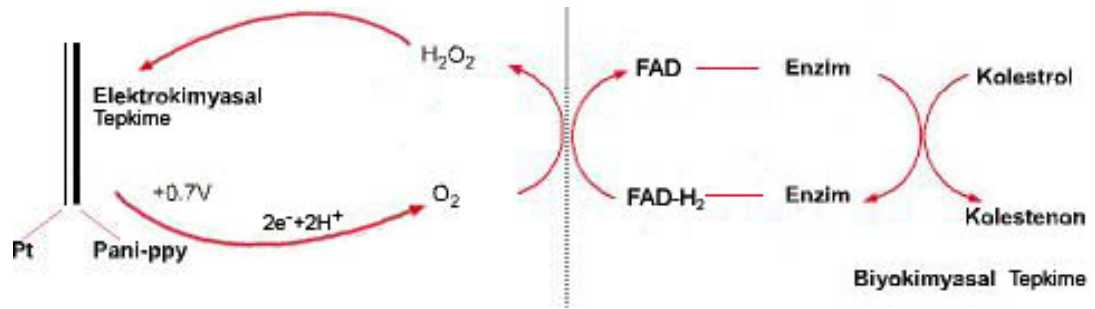


Oluşan hidrojen peroksit platin elektrot yüzeyinde sabit bir potansiyelde aşağıdaki tepkimeye göre yükseltgenmektedir [31].



Yükseltgenmenin meydana geleceği bir potansiyelde çalışıldığında devreden geçen anodik akım oluşan hidrojen peroksitin derişimi, dolayısıyla kolesterol derişimi ile orantılıdır. Bu çalışmanın prensibi de yukarıdaki prensiple aynı olmakla beraber daha önce polipirol-polianilin kolesterol oksidaz enziminin serbest ve immobilize edilmiş şekli ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden yapılan bu çalışma orjinal bir çalışmadır.

Bu çalışmada Pt/Pani-PPy elektrodu ile enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan hidrojen peroksidin dolayısıyla kolesterolün ölçülmesinde çözeltide ve elektrot yüzeyinde gerçekleşen olaylar şematik olarak Şekil 4.1.' de gösterilmektedir.

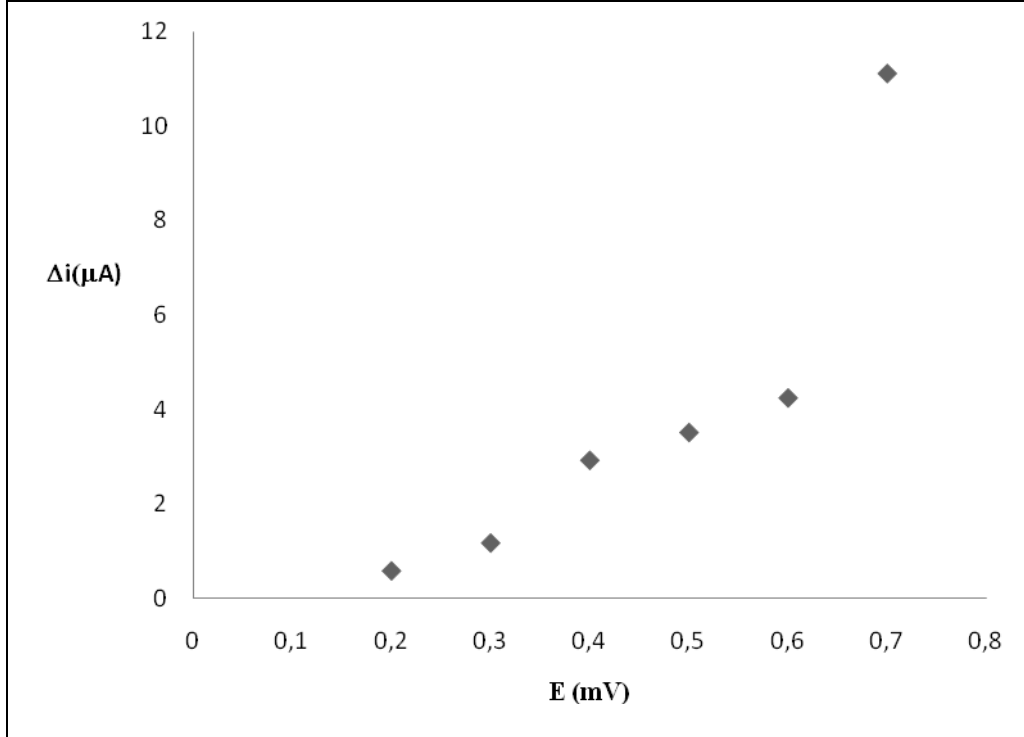


Şekil 4.1. Kolesterol'ün kolestenona yükseltgenmesi sırasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron aktarımı

Şekil 4.1'e göre kolesterol elektronlarını enzime vererek kolestenona yükseltgenir. Elektronları alan Enzim-FAD kompleksi indirgenir. Yeni bir substrat molekülü ile tepkimeye girebilmesi için enzimin yeniden yükseltgenmesi gerekir, bu nedenle enzim elektronları oksijene elektron vererek yeniden yükseltgenmiş hale geçer. Sonra hidrojen peroksit +0,70 V'da elektrot yüzeyinde yükseltgenir. Bu elektrodun uzun süre kullanılabilmesi için enzimin sürekli yükseltgenmiş halde bulunması gerekir.

Bu çalışmada Pt/polipirrol-polianilin film elektrotla kolesterol oksidaz enziminin immobilize şekline ait analitik ve biyokimyasal özellikler incelenmiş olup bunlarla ilgili sonuçlar ve yorumları aşağıda sunulmuştur.

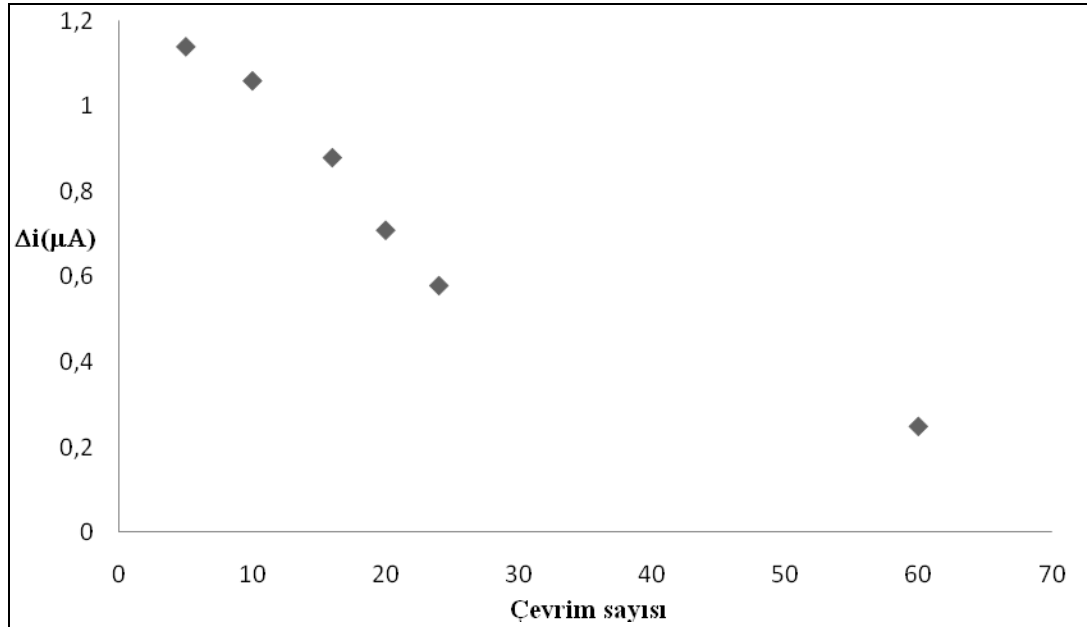
4.1. Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi



Şekil 4.2. Polianilin-Polipirol kaplı film elektrodun farklı çalışma potansiyellerinde duyarlılığının belirlenmesi

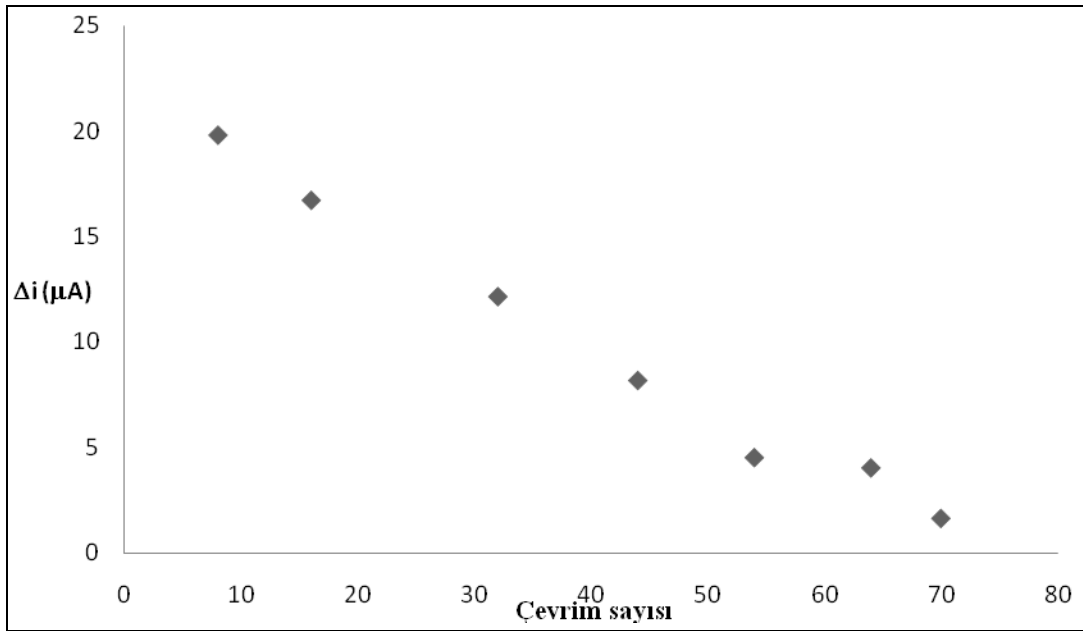
Şekil 4.2 ' da ise Pt/Pani-PPy elektroda ait potansiyel çalışması görülmektedir. 0,2-0,7 V arasında sabit hidrojen peroksit derişiminde 6 farklı potansiyelde akım şiddetleri ölçülmüş ve potansiyele karşı akım şiddeti grafiğe geçirilmiştir. Grafik incelendiğinde düşük potansiyelerde akım şiddetinin düşük olduğu ve potansiyel arttıkça ölçülen akım şiddeti değerlerinin arttığı görülmektedir. En yüksek akım değerinin ölçüldüğü 0,7 V bundan sonraki çalışmalarda en iyi çalışma potansiyeli olarak belirlendi.

4.2. Çevrim sayısının belirlenmesi



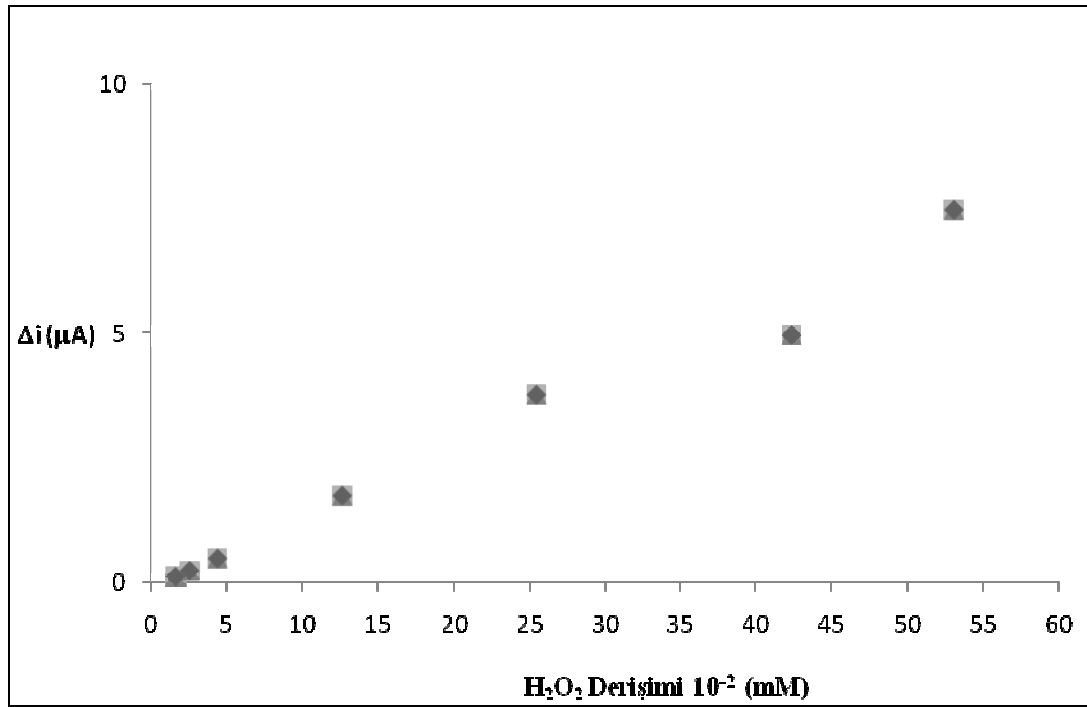
Şekil 4.3. 1.10^{-7} M sabit hidrojen peroksit derişimde polipirol elektrodun çevrim sayısına karşı duyarlılığı

Şekil 4.3’de polipirol film elektrodun 0,7 V ve 1.10^{-7} M sabit hidrojen peroksit derişimde çevrim sayısı ile akım şiddetindeki değişim incelenmektedir. Şekilden görüldüğü gibi düşük çevrim sayılarında akımların yüksek olduğı ve çevrim sayısı arttıkça akım şiddetinin düştüğü görülmektedir. En yüksek akım şiddetinin ölçüldüğü 5 çevrim optimum çevrim sayısı olarak belirlendi.

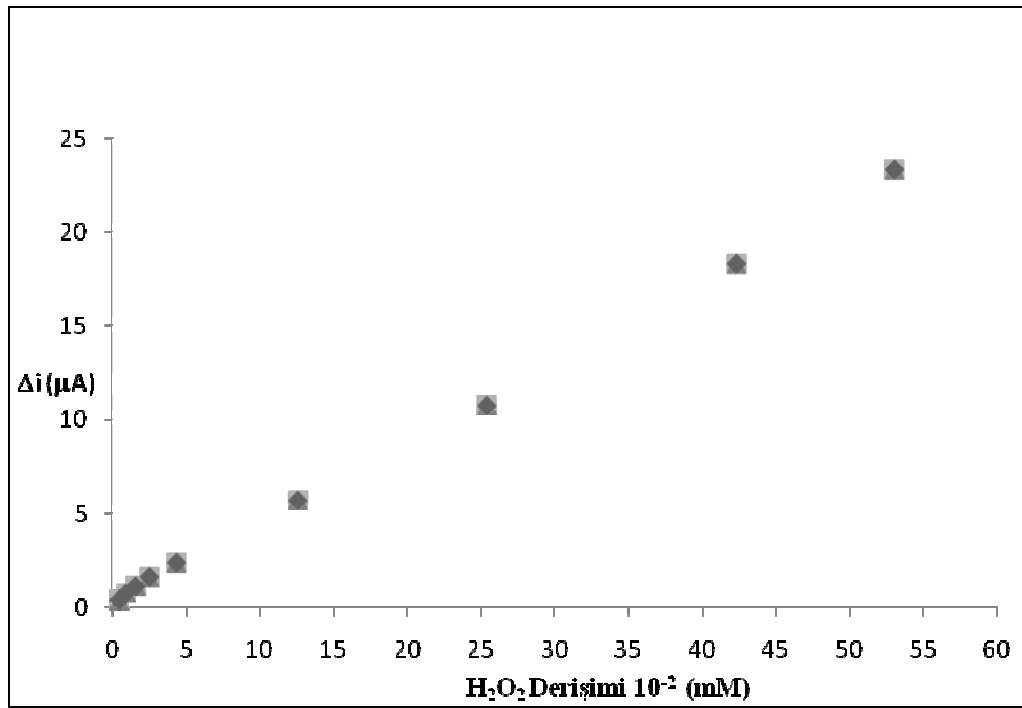


Şekil 4.4. 1.10^{-4} M Sabit hidrojen peroksit derişimde polianilin elektrodun çevrim sayısına karşı duyarlılığı

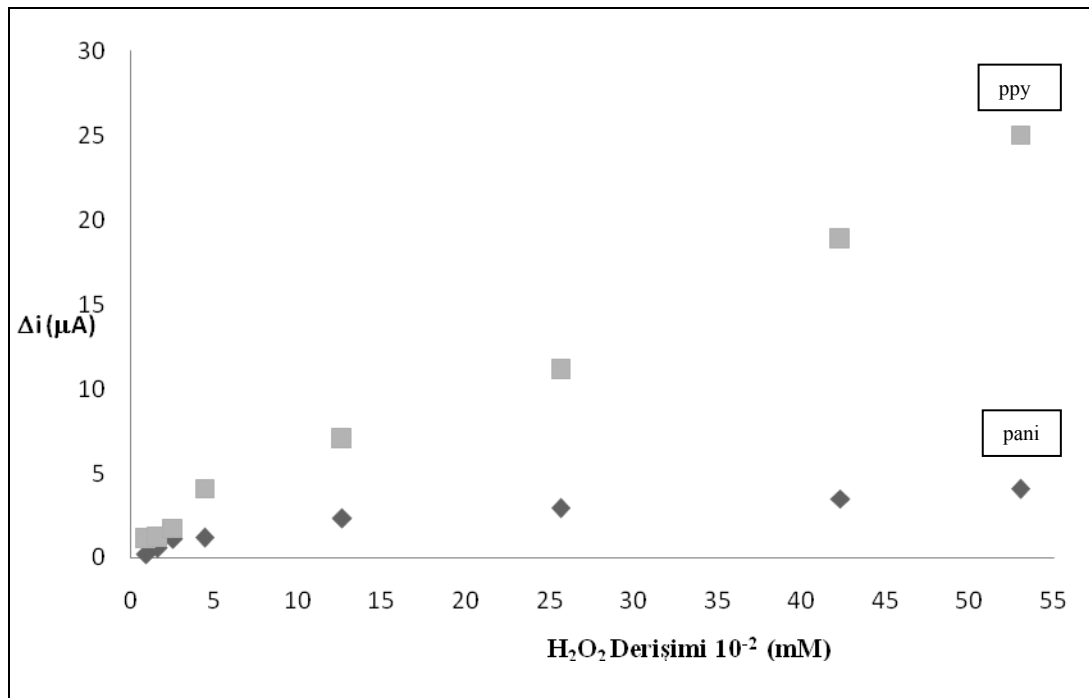
Şekil 4.4’de polianilin film elektrodun 0,7 V ve 1.10^{-4} M sabit hidrojen peroksit derişimde çevrim sayısı ile akım şiddetindeki değişim incelenmektedir. Şekilden görüldüğü gibi düşük çevrim sayılarında akımların yüksek olduğı ve çevrim sayısı arttıkça akım şiddetinin düştüğü görülmektedir. En yüksek akım şiddetinin ölçüldüğü 10 çevrim optimum çevrim sayısı olarak belirlendi.



Şekil 4.5. 16-16 çevrimde Pt/PPy-Pani elektrodun hidrojen peroksit derişimine karşı duyarlılığı



Şekil 4.6. 16-16 çevrimde Pt/ Pani- PPy elektrodun hidrojen peroksit derişimine karşı duyarlılığı

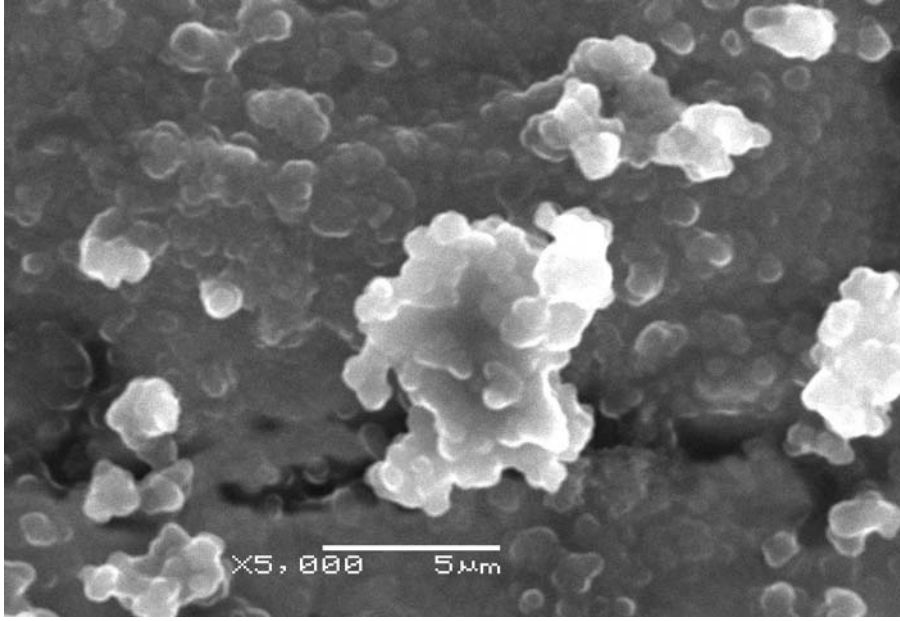


Şekil 4.7. 16-16 Sabit çevrimde polipirol-polianilin film elektrotun farklı hidrojen peroksit derişimlere karşı duyarlılığı

Şekil 4.6 ve Şekil 4.7 incelendiğinde aynı çevrim sayısında kaplanmış olan Pt/ Pani-PPy elektrodunun Pt/PPy-Pani elektroduna göre aynı hidrojen peroksit derişiminde daha yüksek akım şiddetine sahip olduğu görülmektedir. Bu yüzden bundan sonraki çalışmalarda çevrim sayısı olarak 16 polipirol ve 16 polianilinin kullanıldığı ve polipirolün üstte olduğu elektrodun kullanılmasına karar verildi. Bunun sebebi olarak polianilinin kaplama potansiyelinin 1,0 V' dan daha yüksek olması ve dolayısıyla bizim kaplama potansiyelimizde [0,7 V] filmin bozulmasıdır.

4.3. Pt/Polianilin-Polipirol filminin SEM fotoğrafı

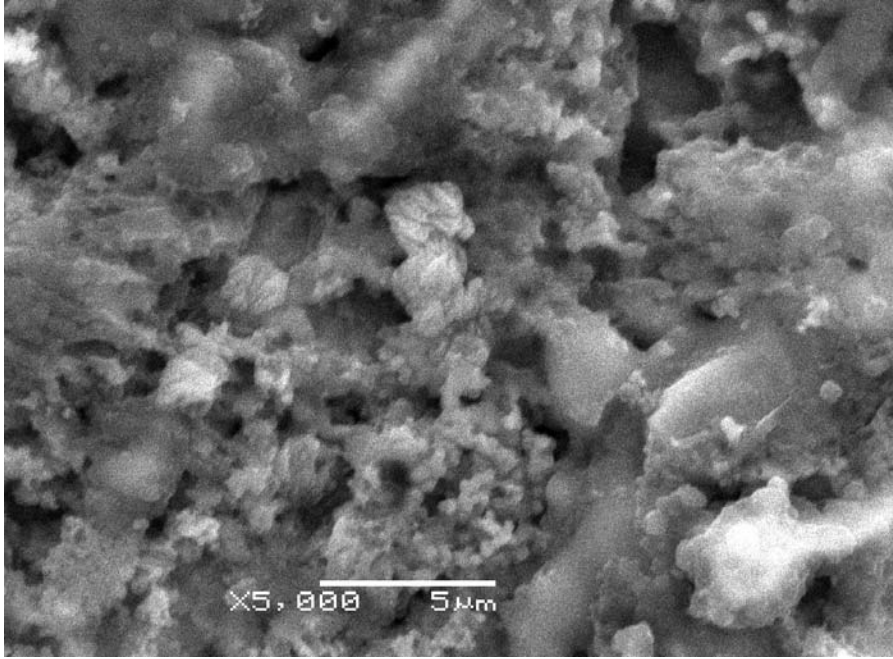
Bölüm 3.3' e göre hazırlanan Pt/Polianilin-Polipirol filminin Şekil 4.8' de verilen SEM fotoğrafında, karnabahar yapıları görülmektedir. Bu yapı yüzeyin polipirolle kaplandığını göstermektedir.



Şekil 4.8. Pt/Polianilin-Polipirol filminin SEM fotoğrafı

4.3.1. Pt/Polipirol-Polianilin Filminin SEM Fotoğrafı

Bölüm 3.3' a göre hazırlanan Pt/Polipirol-polianilin filminin SEM fotoğrafı Şekil 4.9.' de görülmektedir. Şekil 4.8' de Pt/ Polianilin-Polipirol filmi incelendiğinde karnabahar yapıları görülmektedir. Şekil 4.9 incelendiğinde ise karnabahar yapılarının belli bir düzeyde bozulduğu ve bunun ise polianilinden kaynaklandığı söylenebilir. Litaratürde de bu yapıyı destekleyen çalışmalar mevcuttur [34].

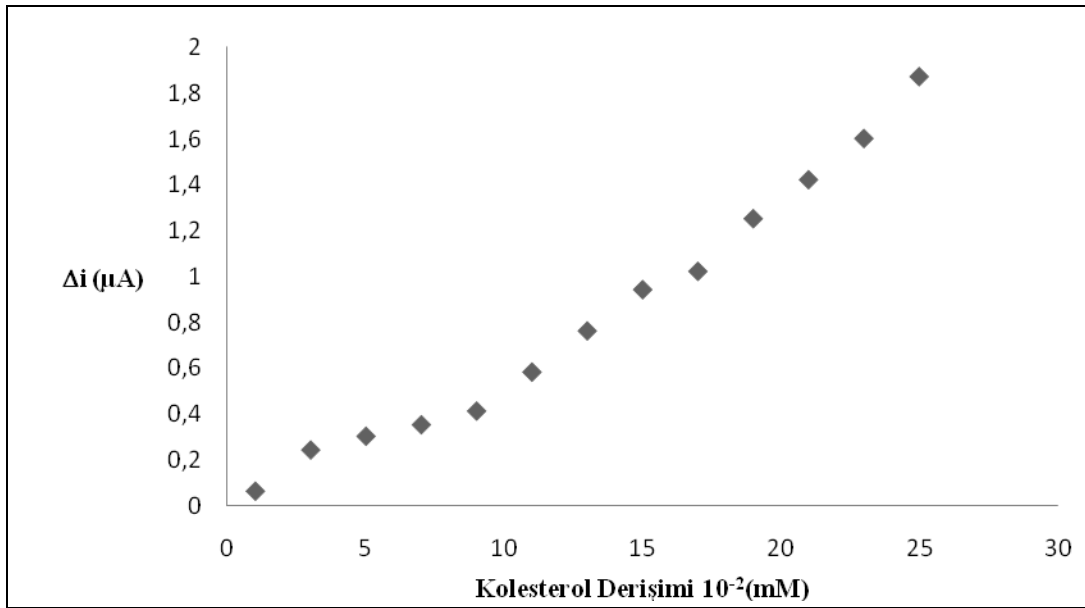


Şekil 4.9. Pt/Polipirol-Polianilin filminin SEM fotoğrafı

4.4. Kolesterol Biyosensörünün Çalışma Şartları ile İlgili Sonuçlar

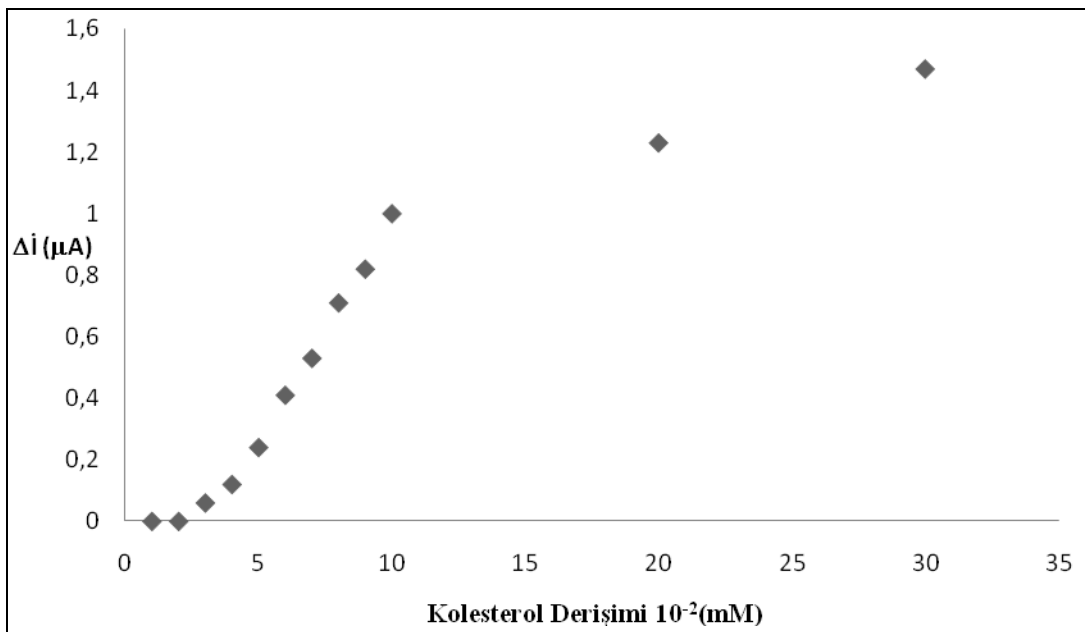
4.4.1.Farklı elektrotlara enzim immobilizasyonu ile aktivite değişiminin incelenmesi

Bu çalışmada filmin yapısını oluşturan polimerler tek tek ve birlikte elektrot yüzeyine kaplanarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Bunun için polipirol üzerine enzim, polianilin üzerine enzim, polipirol-polianilin film üzerine ve polianilin-polipirol üzerine enzim immobilize edilerek akımdaki değişimler incelendi.



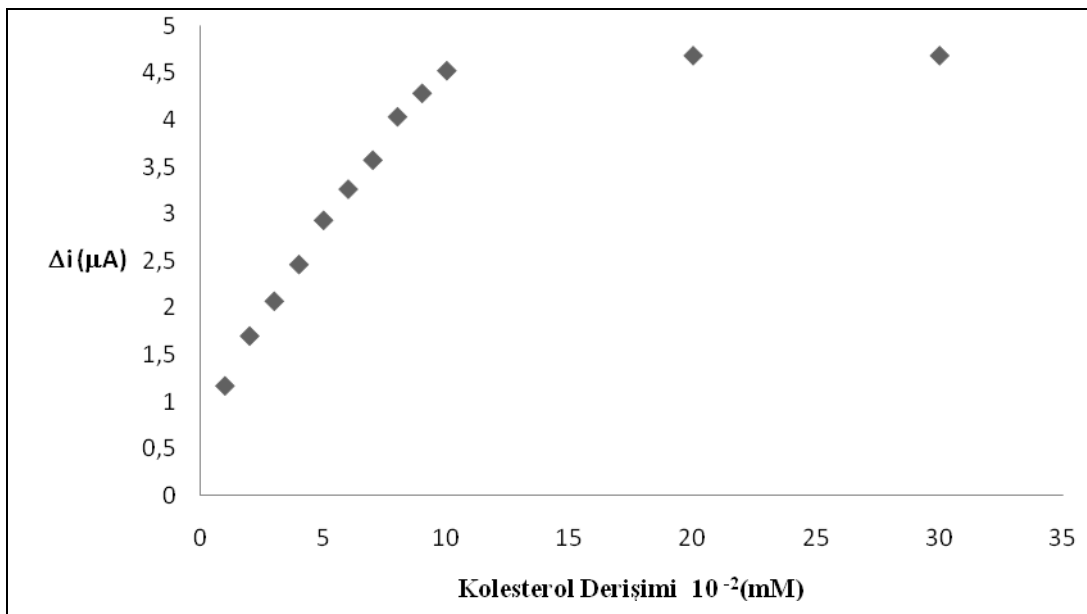
Şekil 4.10. Polipirol film elektroda enzim immobilizasyonu ile aktivitenin incelenmesi

İlk olarak polipirol ile kaplanmış film üzerine enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi ve akım değişimleri incelendi. Derişim arttıkça akım değerlerinin arttığı görüldü (Şekil 4.10).



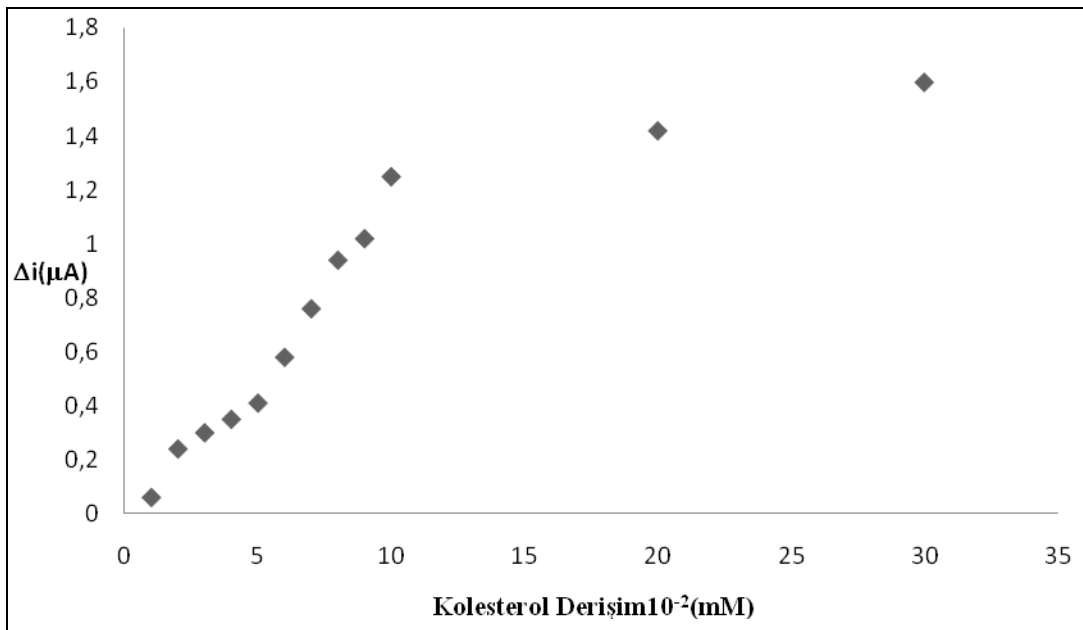
Şekil 4.11. Polianilin film elektroda enzim immobilizasyonu ile aktivitenin incelenmesi

İkinci olarak polianilin ile kaplanmış filme enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi ve akım değişimleri incelendi (Şekil 4.11.). Derişim arttıkça akım değerlerinin arttığı görüldü. Ancak bir önceki polipirol film üzerine yapılan immobilizasyonla karşılaştırıldığında polipirolle kaplı filme ait akım değerlerinin daha yüksek olduğu görüldü.



Şekil 4.12. Polianilin-Polipirol film elektroda enzim immobilizasyonu ile aktivitenin incelenmesi

Daha sonra polianilin-polipirol ile kaplanmış filme enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi ve akım değişimleri incelendi. Derişim arttıkça akım değerlerinin yine arttığı görüldü (Şekil 4.12).

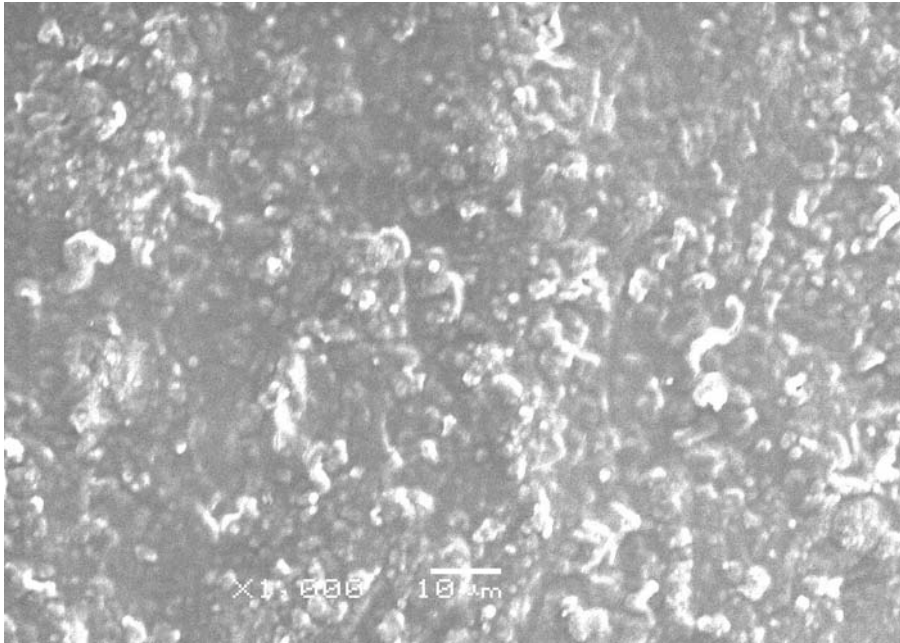


Şekil 4.13. Polipirol-Polianilin film elektroda enzim immobilizasyonu ile aktivitenin incelenmesi

Son olarak polipirol-polianilin ile kaplanmış filme enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi ve akım değişimleri incelendi. Derişim arttıkça tek başına polipirol veya polianilin varlığındaki kadar bir artış görüldü (Şekil 4.13). Polipirol-polianilin film ile Polianilin-polipirol film karşılaştırıldığında Polianilin-polipirol filme enzim immobilize edildiğinde daha yüksek akım değerlerinin gözlemlendiği ve dolayısıyla bu filme ait aktivite değerlerinin daha yüksek olduğu görüldü. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarda film olarak Polianilin-Polipirol film elektrot seçildi.

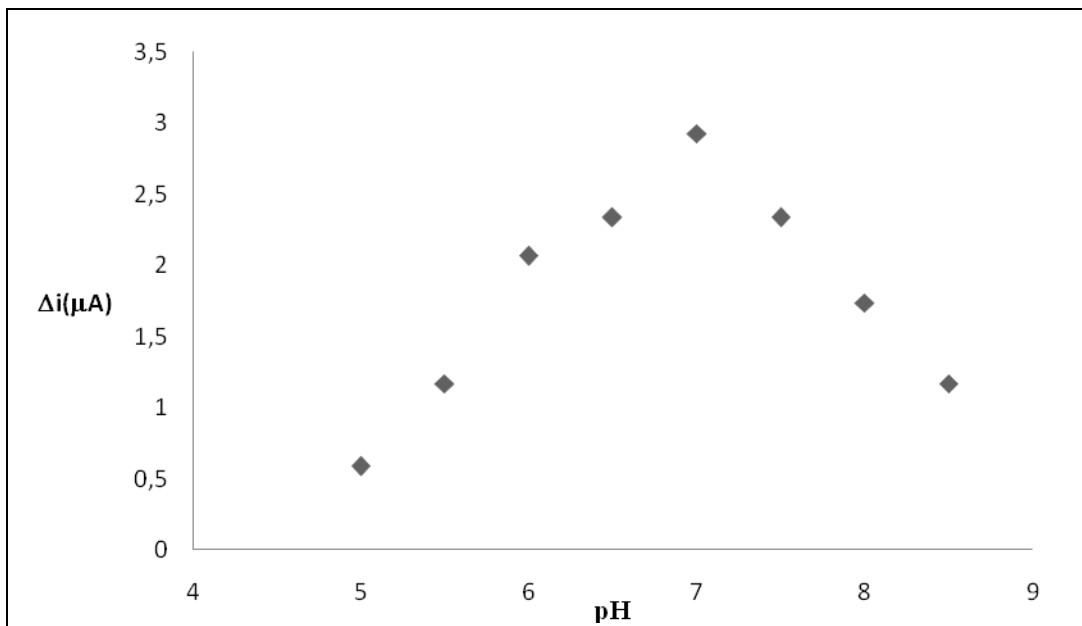
4.4.2. Pt/Polipirol- polianilin-enzim-glutaraldehit-albumin filminin fotoğrafı

Bölüm 3.6' a hazırlanan Pt/Polipirol- Polianilin-enzim- filminin SEM fotoğrafı Şekil 4.14'de görülmektedir. Bu fotoğraf bir önceki Pt/Polipirol-Polianilin filmi ile karşılaştırıldığında polianilin yapısının değiştiği ve bunun kolesterol oksidazdan kaynaklandığı söylenebilir. Bu yapı literatürlerle uyum halindedir [34].



Şekil 4.14. Pt/Polipirol-Polianilin-Enzim-Glutaraldehit-Albumin filminin SEM fotoğrafı

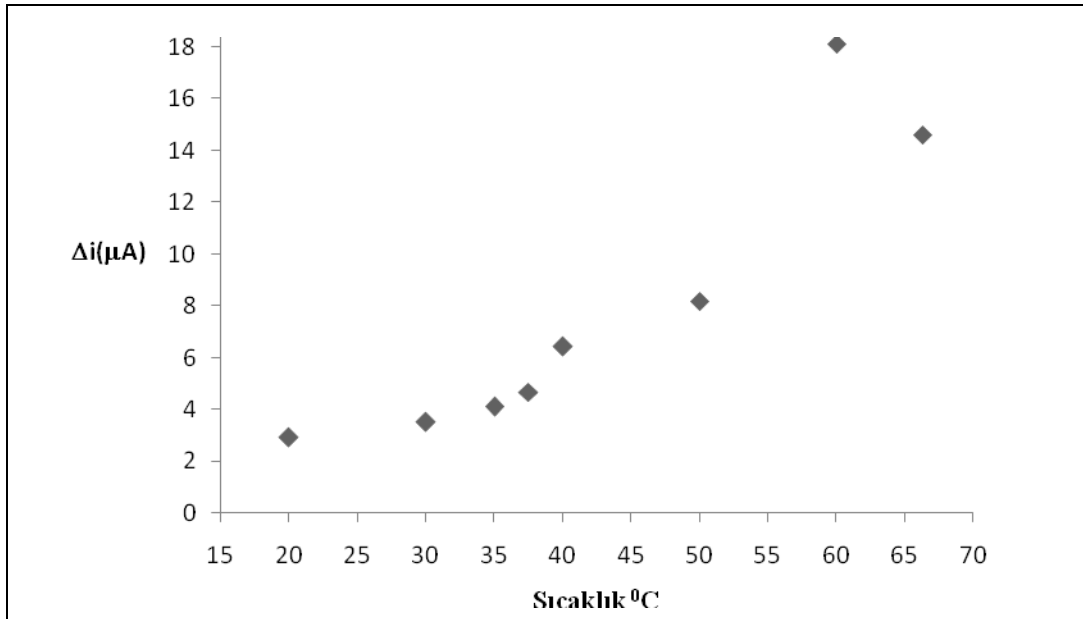
4.4.3. pH' nın etkisi



Şekil 4.15. Biyosensörün aktivitesine pH' nın etkisi

Bölüm 3.6'a göre hazırlanan biyosensör ile yapılan deneyler sonunda (0,7 V) elde edilen amperometrik cevap akımları pH' ya karşı grafiğe geçirilerek Şekil 4.15' de verildi. Şekil incelendiğinde düşük pH değerlerinde ölçülen amperometrik cevap akımının küçük olduğu, pH değerleri büyüdükçe amperometrik cevap akımının büyüdüğü görülmektedir. Cevap akımındaki bu artış optimum pH değerine yaklaştıkça beklenen bir durumdur. Grafik incelendiğinde maksimum cevap akımı pH 7,0'de gözlenmiştir. Literatürler de ise değişik destek materyallere immobilize edilmiş kolesterol oksidaz için pH değerleri 7,4; 7,0; 6,5; 7,25 olarak bulunmuştur (34-36). Bulunan bu değer literatür verileri ile uyushmaktadır. 7,0'den sonraki pH değerlerinde cevap akımı tekrar azalmaya başlamıştır. Enzim ve substrat moleküllerinde asidik ve bazik gruplar olduğundan (E-S) aktifleşmiş kompleksinin en kolay bir şekilde oluşması, yani hızının maksimum olması için bu grupların belirli bir iyonlaşma durumunda olması gereklidir. Bunun dışındaki iyonlaşmalarda (E-S) kompleksinin oluşumu zorlaşacak ve tepkime hızı düşeceğinden akımlardaki azalma beklenen bir durumdur [37].

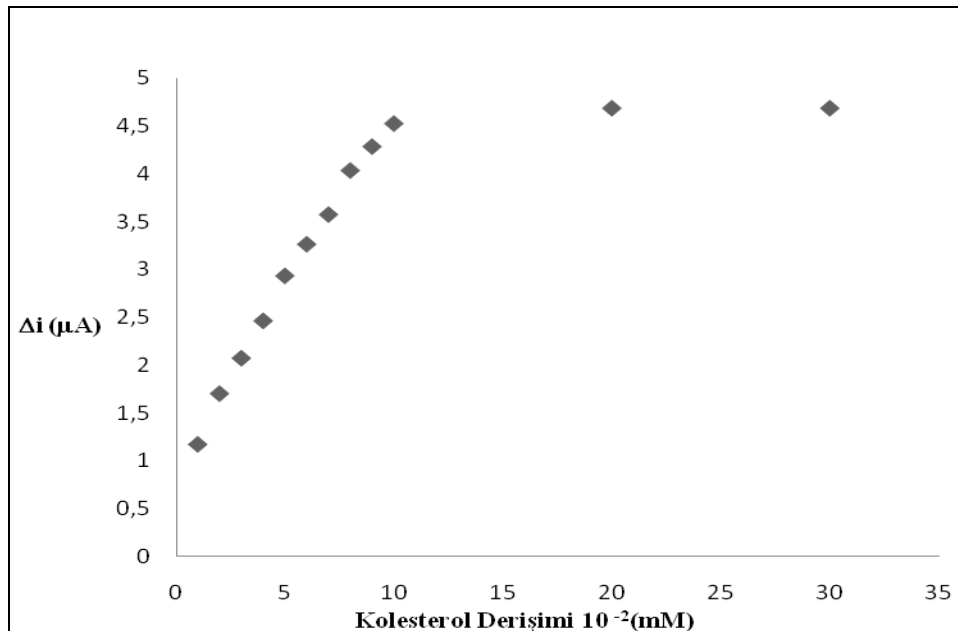
4.4.4. Sıcaklığın etkisi



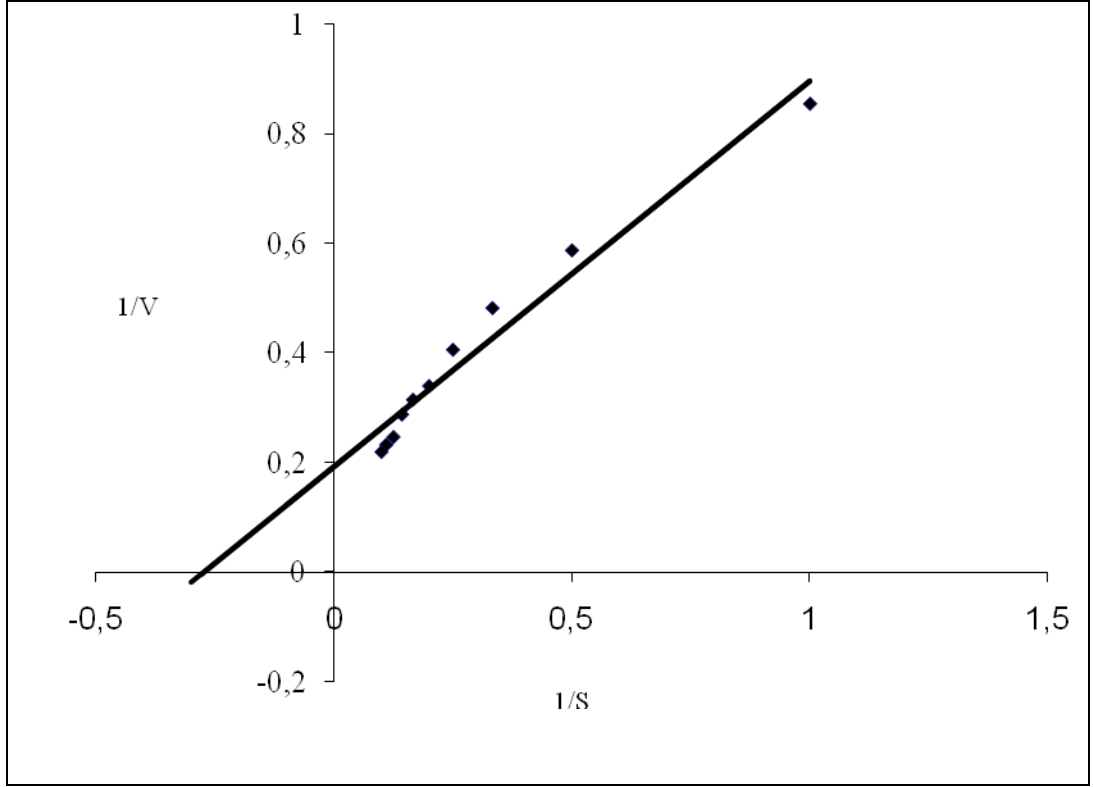
Şekil 4.16. Biyosensörün aktivitesine sıcaklığın etkisi

Bölüm 3.6'a göre hazırlanan biyosensör ile yapılan deneyler sonunda elde edilen amperometrik cevap akımları (0,7 V ve pH=7) sıcaklığa karşı grafiğe geçirilerek Şekil 4.16' da verildi. Şekil 4.16. incelendiğinde düşük sıcaklık değerlerinde enzimin düşük aktivite gösterdiği ve amperometrik cevap akımlarının sıcaklık arttıkça arttığı görülmektedir. Maksimum cevap akımının 60 °C' da olduğu gözlenmiştir. 60 °C'dan sonra enzimin aktivitesinin düştüğü görülmektedir. Aktivitede ki bu düşüşlerin enzimin protein yapısının ve yüksek sıcaklıklarda denatüre olması ve bundan aktif merkezin ve enzim aktif merkezindeki koenzimin etkilenmesinden ileri geldiği söylenebilir. Ancak maksimum cevap akımının gözlendiği 60 °C oldukça yüksek bir sıcaklıktır. Literatürlerde de değişik destek materyallere immobilize edilmiş kolesterol oksidaz için 49; 40; 40; °C gibi sıcaklıklar bulunmuştur (34,35,36). Çalışma koşullarının kolay olmasını sağlamak, rutin analizlerde daha kolay uygulanabilir olması ve uzun inkübasyon sürelerinde yüksek sıcaklıklarda enzim aktivitesinin azalmasından dolayı bundan sonraki çalışmalarda oda sıcaklığı olan 25°C seçildi.

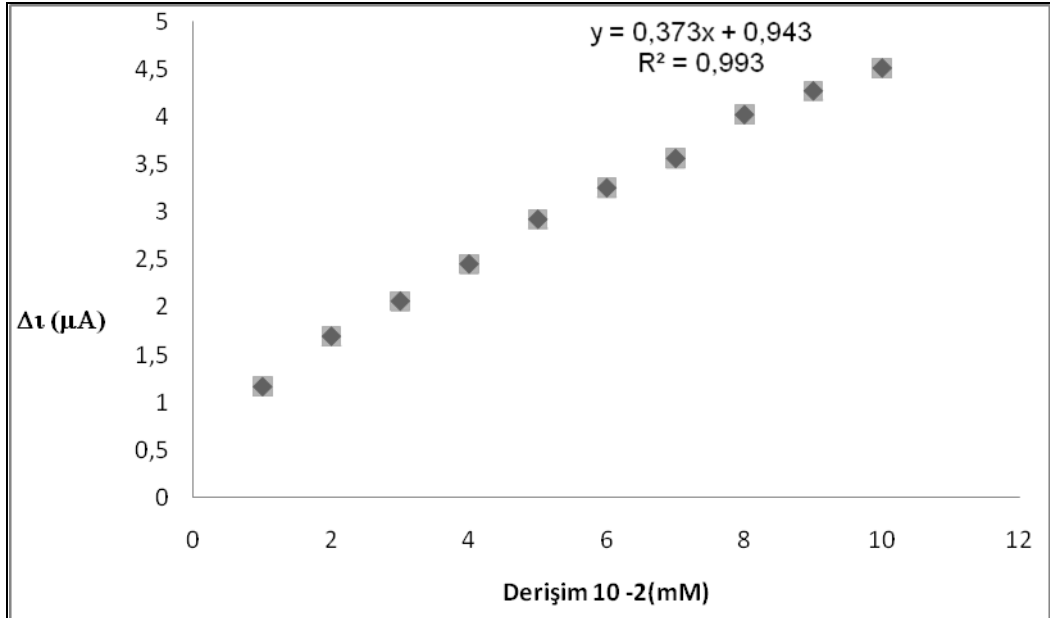
4.4.5. Substrat derişiminin etkisi



Şekil 4.17. Biyosensörün aktivitesi üzerine kolesterol derişiminin etkisi [Michealis-Menten grafiği, pH=7 ve 25°C]



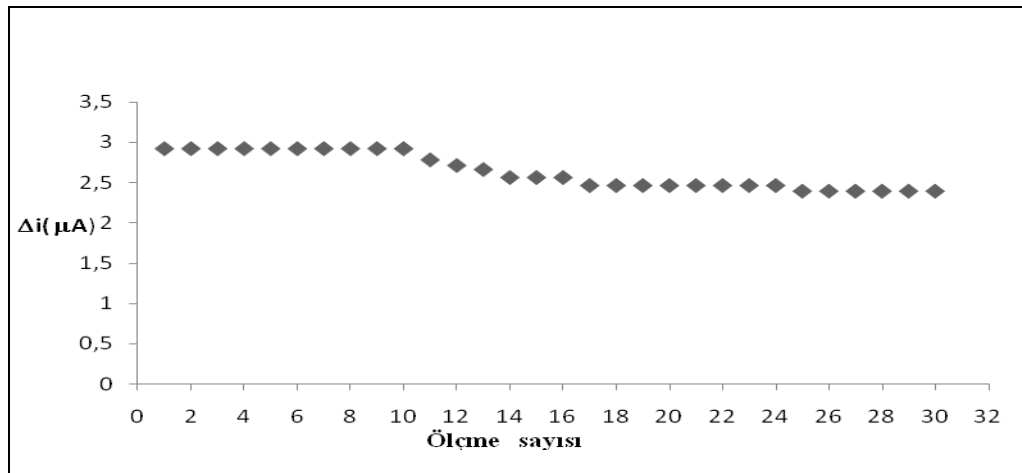
Şekil 4.18. Biyosensörün aktivitesi üzerine kolesterol derişiminin etkisini gösteren Lineweaver-Burke grafiğı



Şekil 4.19. Kolesterol biyosensörü için kalibrasyon grafiğı

Bölüm 3.6' a göre yapılan deneyler sonunda elde edilen sonuçlardan, kolesterol derişimine karşı amperometrik cevap akımları [pH=7 ve 25°C] grafiğe geçirilerek Şekil 4.17.' de verildi. Şekil 4.17. incelendiğinde akımların belli bir derişime kadar doğrusal olarak arttığı ve bu derişimden sonra doğrusallıktan saptığı söylenebilir. 1.10^{-6} - 5.10^{-5} M aralığında doğrusal bölge olduğu, bu bölgenin doğrusallığının iyi olduğu [$R^2=0,996$] ve kolesterolün kantitatif tayini için kullanılabileceği söylenebilir [Şekil 4.19 pH=7 ve 25°C]. Daha sonra $1/[S]$ değerlerine karşı $1/V$ değerleri grafiğe geçirilerek Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Kolesterol oksidaz enzimi için spesifik olan K_m ve V_{maks} değerlerini bulmak için Bölüm 3.6.' a göre yapılan deneyler sonunda çizilen grafiklerden Şekil 4.18. [pH=7 ve 25°C] kullanılarak gözlenen K_m değeri 3,3 mM V_{maks} ise 5,26 mM/dakika olarak hesap edildi. Literatürlerde değişik destek materyallere immobilize edilmiş farklı kaynaklardan saflaştırılmış kolesterol oksidaz enzimi için K_m değerleri 0,41; 2,72; 9,8; mM [38,39,35] V_{maks} ise 0,908; 1,495 mM/dakika [40,41] olarak bulunmuştur.

4.4.6. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliği

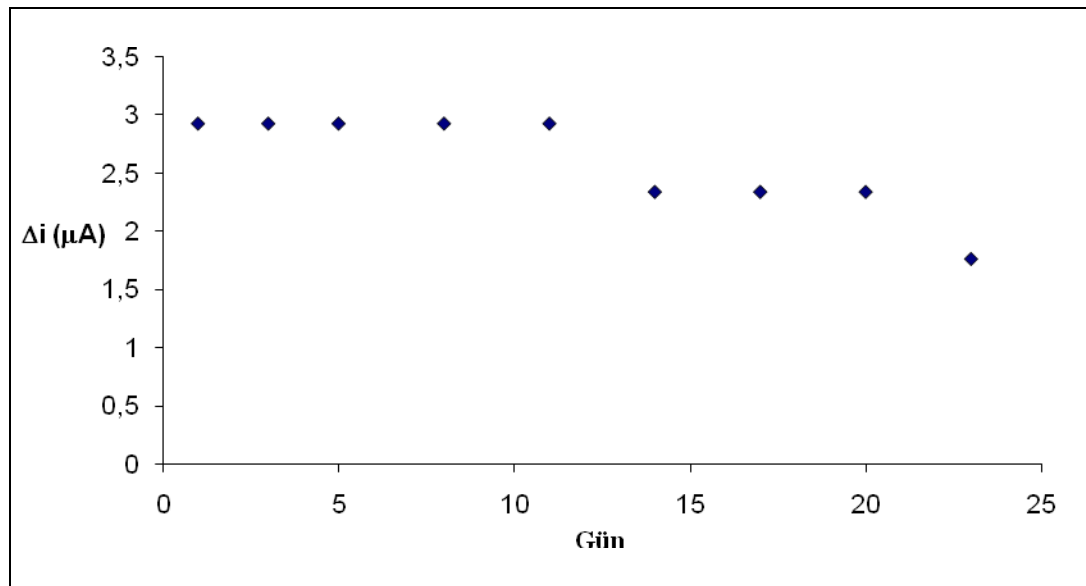


Şekil 4.20. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

Bölüm 3.6' a göre yapılan deneyler sonunda elde edilen amperometrik cevap akımları ölçme sayısına karşı grafiğe geçirilerek Şekil 4.20.' da (pH=7 ve 25°C)

verildi. Şekil 4.20 incelendiğinde ölçme sayısı arttıkça akımlarda azalma olduğu görülmektedir. Akımlardaki bu düşmelerin zamanla enzim aktivitesindeki değişmeden kaynaklandığı söylenebilir. Biyosensörün 30 ölçme sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 82'sini koruduğu görülmektedir. Biyosensörün zamanla aktivitesinin çok fazla değişmemesi kullanılan immobilizasyon tekniğinin iyi olduğunu göstermektedir. Tekrarlanabilirlik biyosensör için çok önemli olup hazırlanan biyosensörle arka arkaya fazla sayıda analiz yapabileceğimizi göstermektedir. Rutin analizlerde tek ölçmede kullanılan kitler maliyet açısından pahalı olduğu için bu şekilde hazırlanan bir biyosensör daha avantajlıdır. Bulunan sonuç literatür değerleri ile karşılaştırıldığında hazırlanan biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin oldukça iyi olduğu söylenebilir [40,42].

4.4.7. Biyosensörün raf ömrü

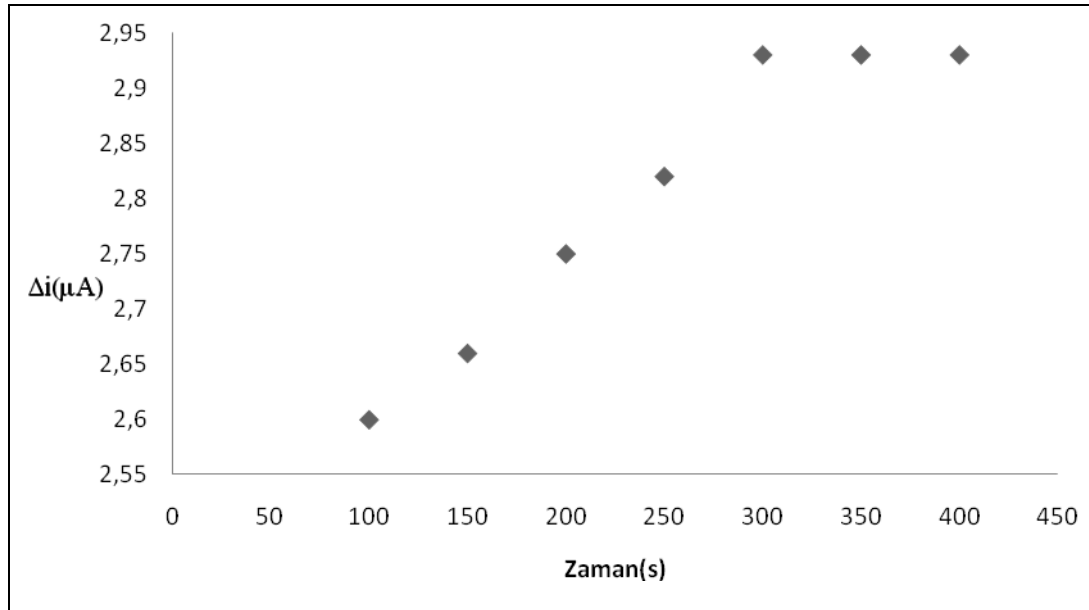


Şekil 4.21. Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Bölüm 3.6' ya göre yapılan deneyler sonunda elde edilen amperometrik cevap akımları güne karşı grafiğe geçirilerek Şekil 4.21' de (pH=7 ve 25°C) verildi. Şekil incelendiğinde ilk onbir gün boyunca alınan 5 ölçüm sonunda aynı cevap akımı gözlenirken 11.günden sonra akımın biraz düştüğü akımın biraz düştüğü, 11.günden

15.güne kadar alınan 3 ölçüm için aynı akım değerinin ölçüldüğü ve 20.günden sonra 23.güne kadar alınan tek ölçümde yine akımın bir miktar düştüğü görüldü. Bu ise biyosensörün 23 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 60' ını koruduğunu göstermektedir. Ancak 11. güne kadar akımlardaki azalmanın çok fazla olmadığı ve başlangıç aktivitesini koruduğu görülmektedir. Ayrıca enzimin aktif merkezinde sıcaklığın, havanın ve bazı kimyasal maddelerin etkisi ile değişiklikler meydana gelmesi ya da aktif merkezdeki grupların çevresindeki diğer gruplarla etkileşmesi sonucu biyosensörün aktivitesinde zamanla meydana gelen azalma beklenen bir sonuçtur. Biyosensörün raf ömrünün uzun olması kullanılan immobilizasyon yönteminin iyi olduğunu göstermektedir. Bulunan sonucun literatür değerleri ile karşılaştırıldığında oldukça iyi olduğu söylenebilir [43,44].

4.4.8. Cevap süresi



Şekil 4.22. Biyosensörün cevap süresi

Bölüm 3.6' ya göre yapılan deneyler sonunda elde edilen amperometrik cevap akımları zamana karşı grafiğe geçirilerek Şekil 4.22' de verildi. Ölçülen amperometrik cevap akımlarına karşı çizilen zaman grafiğinden (Şekil 4.22.) akım değişimlerinin sabit kaldığı 300 s' lik süre cevap süresi olarak belirlendi. Genelde

biyosensörler için cevap süresinin 5 dakikayı geçmemesi istenir [29]. Bulunan sonuç bu değere yakın bir değerdir.

4.4.9. Biyolojik sıvıda (kanda) kolesterol tayini

Biyolojik sıvılarda yapılan kolesterol analizi sonunda ölçülen amperometrik cevap akımlarına karşı gelen derişim değerleri kalibrasyon grafiğı kullanılarak hesaplandı ve Çizelge 4.1 verildi. Bulunan sonuçlar, enzimatik kit kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülen hastane sonuçları ile kıyaslandığında yaklaşık olarak % 30' a yakın önemli bir fark olduğu gözlemlendi. Biyokimyasal ölçmelerde %20' ye kadar olan farklılıklar normal kabul edilebilir. Ancak burada farkın % 30 çıkmasının nedeni deneysel hatalar olabileceğı gibi hastanede bulunan sonuçlardan da kaynaklanabileceğı düşünülebilir. Çünkü hastanede kullanılan cihazın kalibrasyonunun tam yapılamamış olması böyle bir sonucu doğurabilir.

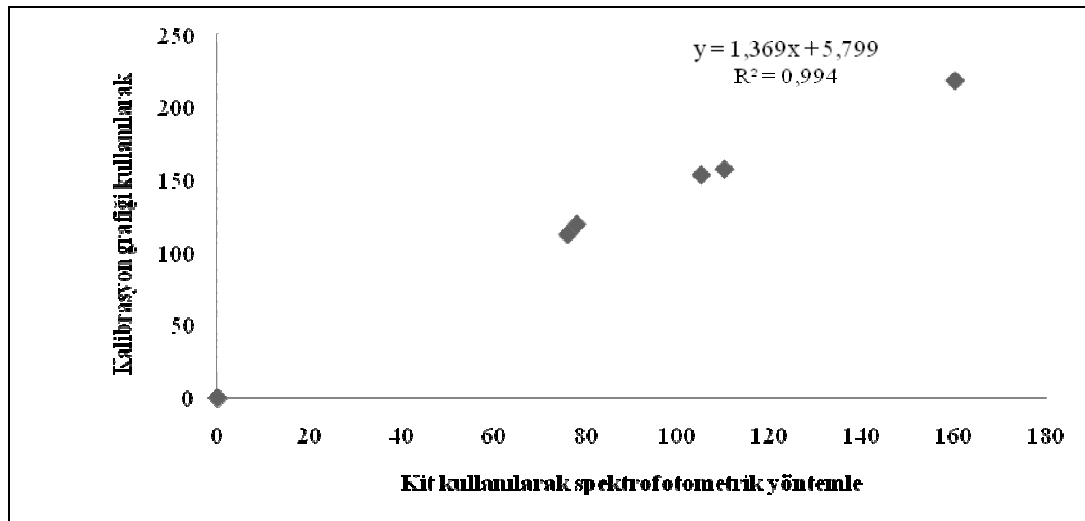
Çizelge 4.1. Kan numunelerinde hesaplanan kolesterol içeriğı

Kan numunesi	Sonuç [mg/100mL]	Enzimatik kit kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülen hastane sonucu [mg/100mL]
1	160 $\pm$ 4	218
2	110 $\pm$ 3	157
3	105 $\pm$ 2	153
4	78 $\pm$ 2	119
5	76 $\pm$ 1	112

4.4.10. Farklı yöntemlerle bulunan kolesterolün(Kanda) karşılaştırılması

Hazırlanan biyosensörle Şekil 4.19.' daki kalibrasyon grafiğı kullanılarak bulunan kolesterol değerleri, kit kullanılarak spektrofotometrik yöntemle bulunan kolesterol değerlerine karşılık grafiğı geçirilerek Şekil 4.23' de verilmiştir. Şekil 4.23 incelendiğinde doğrunun eğiminin bire yakın olması kolesterol biyosensörü ile elde

edilen sonuçların kit kullanılarak spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğunu göstermektedir. Bu ise hazırlanan biyosensörle kan serumunun bozucu etkisi olmaksızın serumda kolesterol tayini yapılabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.23. Kanda kolesterol tayininde yöntemlerin uyumluluğu

Sonuç olarak; bu çalışmada hazırladığımız kolesterol biyosensörünün;

- Doğrusal çalışma aralığı oldukça geniştir [$1 \cdot 10^{-6}$ M- $5 \cdot 10^{-5}$ M].
- Tekrar kullanılabilirliği yüksektir [30 ölçme sonunda biyosensörün aktivitesini %82 oranında koruduğu görülmüştür].
- Raf ömrü uzundur [23 gün ve 9 ölçüm sonunda başlangıç amperometrik cevabının yaklaşık % 60' ını korumaktadır].
- Hazırlanan biyosensör için cevap süresi 300 s olarak bulunmuştur. Bu süre literatürde verilen değerlerle karşılaştırıldığında normal bir süredir.
- Polipirrol-polianilin filmle yapılan biyosensördeki immobilize enzime ait gözlenen K_m değeri 3,3 mM ve V_{maks} değeri ise 5,26 mM/dakika bulunmuştur.
- Hazırlanan biyosensör ile biyolojik sıvıda [kanda] birden fazla numunede kolesterol tayini yapılabilmekte ve bu da rutin analizlerde kullanılan ve fazla maliyet getiren tek kullanımlık kitlerin yerine hazırlanan biyosensörün kullanılabileceğini göstermektedir.

- Literatürlerde kolesterol oksidaz enziminin değişik filmlere immobilizasyonu ile hazırlanmış biyosensörler mevcuttur. Yine polipirol film üzerine kolesterol oksidaz enziminin immobilizasyonu ile hazırlanmış biyosensörler mevcuttur. Ancak polianilin-polipirol film üzerine kolesterol oksidazın immobilizasyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden çalışmada kullanılan film orijinal olduğu için hazırlanan biyosensör orjinaldir.

KAYNAKLAR

1. Bailey, J., E. and Ollis, F., D., "Biochemical Engineering Fundamentals 2nd ed.", **McGraw Hill International Editions**, 984 (1986).
2. Geminos, G. and Greenfield, P.F., "An enzymatic technique for the detection of dextran in cane juice and prediction of viscosity increases", **International Sugar Journal**, 80:227-231 (1978).
3. Zaborsky, O., "Immobilized Enzyme", **CRC Pres**, Ohio, 1-3 (1973).
4. Kutay, F., "Enzimler", İnsan Biyokimyası, Onat T., Emerk K., Sözman E.Y., **Palme Yayıncılık**, Ankara, 197-202 (2002).
5. Wiseman, A., "Handbook of Enzyme Biotechnology, 2nd ed.", **John Wiley&Sons Chicester**, İngiltere, 12 (1986).
6. Telefoncu A., "İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri", **Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu**, İzmir, 1-16, 193-249, (1986).
7. Fennema, O.R., "Food Chemistry, 2nd ed.", **Macel Dekker Inc.**, New York, 994 (1985).
8. Lehninger, A., L., "Biochemistry, 2nd ed.", **Worth Publishers**, New York, 1103 (1979).
9. Fujishiro, K., Uchida, H., Shimokawa, K., Nakano, M., Sano, F., Ohta, T., Kayahara, N., Aisaka, K., Uwajima, T., "Purification and properties on a new *brevibacterium sterolicum* cholesterol oxidase produce by *e.coli* mm294/pnh10", **FEMS Microbiology Letters**, 215:243-248 (2002).
10. Yin, Y., Liu, P., Anderson, G.W.R. and Sompson, S., N., "Construction of a catalytical inactive cholesterol oxidase mutant: investigation of the interplay between active side-residues glutamate 361 and histidine 447", **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 402:235-242 (2002).
11. Akgöl, S., Bayramoğlu, G., Kacar, Y., Denizli, A., Arıca, M.Y., "Poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) reactive membrane utilised for cholesterol oxidase immobilisation", **Polymer International**, 51:1316-1322 (2002).
12. Nishiya, Y., Hirayama, N., "Alteration of substrate affinity of streptomyces cholesterol oxidase application to the rate assay of cholesterol serum", **Clinica Chimica Acta**, 287:111-122 (1999).

13. Lario, I.P., Sampson, N. and Verielink, A., "Sub-atomic resolution crystal structure of cholesterol oxidase: what atomic resolution crytallography reveals about enzyme mechanism and the role of the fad cofactor in redoks activity", **Journal Molecular Bio.**, 326:1635-1650 (2003).
14. Singh, S., Chaubey, A., Malhotra, B.D., "Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on conduction polypyrrole films", **Analytica Chimica Acta**, 502:229-234 (2004).
15. Isobe, K., Shoji, K., Nakanishi, Y., Yokoe, M. and Wakao, N., "purification and some properties of cholesterol oxidase stable in detergents frod γ -probacterium Y-134", **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 95 (3): 257-263 (2003).
16. Coulombe, R., Yue, K., Q., Ghisla, S. and Vrielink, A., "Oxygen access to the active side of cholesterol oxidase through a narrow channel is gated by an arg-glu pair", **The Journal Of Biological Chemistry**, 276 (32): 30435-30441 (2001).
17. Suman, Pundir, C.S., "Co-immobilization of cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase onto alcylamine glass beads for measurement of total cholesterol in serum", **Current Applied Physics**, 3:129-133 (2003).
18. MacLachlan, J., Wotherspoon, A.T.L., Ansell, R.O., Brooks, C.J.W., "Cholesterol oxidase:sources, physical properties and analytical applications", **Journal of Steroid Biochemistry&Molecular Biology**, 72:69-195 (2000).
19. Bokoch, M.P., Devadoss, A., Palencsar, M.S., Burgess, J.D., "Steady-state oxidation of cholesterol catalyzed by cholesterol oxidase in lipid bilayer membranes on platinum electrodes", **Analytice Chimica Acta**, 519:47-55 (2004).
20. Wang, H., Mu, S., "Bioelectrochemical characteristics of cholesterol immobilized in a polyaniline film", **Sensor and Actuators B**, 56:22-30 (1999).
21. Raghavan, V., Ramanathan, K., Sundaram, P.V., Danielsson, B., "An enzyme thermistor-based assay for total and free cholesterol", **Clinica Chimica Acta**, 289:145-158 (1999).
22. Shen, Z., Corbin, D.R., Greenplate, T.J., Grebenok, R.J., Galbraith, D.W. and Purcell, J.P., "Studies on the mode of action of cholesterol oxidase on insect midgut membranes", **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 34:429-442 (1997).
23. Bongiovanni, C., Feri, T., Poscia, A., Varalli, M., Santucci, R., Desideri, A., "An electrochemical multienzymatic biosensor for determination of cholesterol", **Bioelectrochemistry**, 54:17-22 (2001).
24. Tahrán, L. and Uslan, A., "Characterization and operational stability of immobilised catalase", **Process Biochemistry**, 14:345-373 (1990).

25. Telefoncu A., “Biyosensörlere genel bakış” , Biyosensörler, **Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu**, Kuşadası, 1-9 (1999).
26. Akbulut U., “İletken polimerlerle transduser hazırlanması” , Biyosensörler, Telefoncu A, **Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu**, , Kuşadası, 10-16 (1999).
27. Bejan, D., Duca, A., ‘Voltammetry of Aniline with Different Electrodes and Electrolytes’ **Croatica Chemica Acta**, 71 (3) 745-756 (1998)
28. Telefoncu A., “Biyoreseptör immobilizasyonu” , Biyosensörler, **Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu**, Kuşadası, 42-61 (1999).
29. Dinçkaya, E., “Enzim sensörleri” , Biyosensörler, Telefoncu A, **Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu**, Kuşadası, 81-139 (1999).
30. Qiong C., Tuzhi P., Liju., “ Silk fibroin/cellulose asetat membrane electrodes incorporating xanthine oxidase for the determination of fish freshness” ,**Analytica Chimica Acta.**, 369: 245-251(1998).
31. Hoshi, T., Saiki, H. and Anzai, J., “Amperometric uric acid sensors based on polyelectrolyte multilayer films” , **Talanta.**, 61: 363-368 (2003).
32. Kuwabata, S., Nakaminami, T., Ito, S. and Yoneyama, H., “Preparation and properties of amperometric uric acid sensors”, **Sensors and Actuators.**, B52: 72-77 (1998).
33. Suzuki M., Takayanagi T., Yashiro T., “Use of the o-Phenilendiamine fluorescence system in the enzymatic assay of serum uric acid”, **Chem.Pharm.Bull.** 39: 2745-2747 (1991).
34. Chetna D., S.P. Singh., Sunil K. Arya., Monika Datta.,B.D. Malhotra., Cholesterol biosensor based on electrophoretically deposited conducting polymer film derived from nano-structured polyaniline colloidal suspension’ **Analytica chimica acta** 602 :244–251(2007)
35. Singh, S., Chaubey, A., Malhotra, B.D. ‘Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on Conducting polypyrrole films’ **Analytica Chimica Acta** 502:229–234 (2004).
36. Brahim, S., Narinesingh D., Guiseppi-E.A., ‘Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole–hydrogel membrane’**Analytica Chimica Acta**, 448: 27-36 (2001).
37. Tüzün, C., “Enzimler ve enzim kinetiği” , Biyokimya, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 124-150 (1992).

38. Xuecai Tan, Minjian Li, Peixiang Cai, Lijun Luo and Xiaoyong Zou ‘An amperometric cholesterol biosensor based on multiwalled carbon nanotubes and organically modified sol-gel/chitosan hybrid composite film’ **Analytical Biochemistry**, 337: 111-120 (2005).
39. Wang, H., Mu, S., ‘Bioelectrochemical characteristics of cholesterol oxidase immobilized in a polyaniline film’ **Sensors and Actuators B: Chemical**, 56:22-30 (1999).
40. Vidal J.C., Garcia ., Castillo J.R. ‘Development of a platinized and ferrocene-mediated cholesterol amperometric biosensor based on electropolymerization of polypyrrole in a flow system’ **Analytical Sciences**, 18:537-542 (2002).
41. Wang, H., Mu, S., “Bioelectrochemical characteristics of cholesterol immobilized in a polyaniline film”, **Sensor and Actuators B**, 56:22-30 (1999).
42. Vidal J.C. , Garcia E., Espulas C., Aremandia T., Castillo J.R. ‘Comparison of biosensors based on entrapment of cholesterol oxidase and cholesterol esterase in electropolymerized films of polypyrrole and diaminonaphthalene derivatives for amperometric determination of cholesterol’ **Analytical and Bioanalyticalchemistry**, 377:273-280 (2003).
43. Singh, S., Chaubey, A., Malhotra, B.D., “Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on conduction polypyrrole films”, **Analytica Chimica Acta**, 502:229-234 (2004).
44. Kumar, H., Kumar, A., Kumari, P., Jyotimai, S., Tulsani, N., B., “Immobilization of cholesterol oxidase on formar using organic solvents”, **Biotechnology Application Biochemistry**, 30:231-233 (1999).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : MUHAMMET, Sinan Mithat
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 06.12.1965 Erbil
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (312) 2126768
 Faks : 0 (312) 2126768
 e-mail : mithat@gazi.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Kimya Bölümü	2000
Lisans	Selahattin Üniversitesi/ Kimya Bölümü	1988
Lise	Alnidal Lisesi	1984

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
1994-2006	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2006	Gazi Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

Yabancı Dil

1.İngilizce
 2. Arapça

Yayınlar

1. Muhammet S, Hasdemir E, Tuzen M, et al., “Lead levels in plant and soil samples collected from the vicinity of Ankara-Istanbul highway, Turkey”, fresenius environmental bulletin , Volume: 12 Issue: 7 Pages: 728-731 Published: 2003

Hobiler

Tenis, Bilgisayar teknolojileri