

**T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LİZİN TAYİNİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ VE  
KARAKTERİZASYONU**

**SANIYE YARAR**

**DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. EMİNE KARAKUŞ**

**İSTANBUL, 2014**

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİZİN TAYİNİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ VE  
KARAKTERİZASYONU

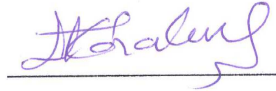
Saniye YARAR tarafından hazırlanan tez çalışması 15.07.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Doç. Dr. Emine KARAKUŞ  
Yıldız Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Doç. Dr. Emine KARAKUŞ  
Yıldız Teknik Üniversitesi



Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU  
Yıldız Teknik Üniversitesi



Prof. Dr. Ayşen YARAT  
Marmara Üniversitesi



Prof. Dr. Ayşe OGAN  
Marmara Üniversitesi



Doç. Dr. Mehmet ŞENEL  
Fatih Üniversitesi



## ÖNSÖZ

---

Bu tezin oluşmasında çok değerli katkıları ve desteği nedeniyle tez danışmanım Doç. Dr. Emine Karakuş'a sonsuz şükranlarımı borç bilirim.

Yine tez çalışmalarım sırasında büyük desteklerinden dolayı YTÜ-Biyokimya Yüksek Lisans mezunu Demet Yılmaz'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktoraya başlamamı sağlayan ve beni cesaretlendiren Prof.Dr. Yasemin Yazar'a ve benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

Ağustos, 2014

Saniye YARAR

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ .....	vii
KISALTMA LİSTESİ .....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ .....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT .....	xiii
<b>BÖLÜM 1</b>	<b>1</b>
<b>GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Literatür Özeti .....	1
1.2 Tezin Amacı .....	1
1.3 Hipotez .....	1
<b>BÖLÜM 2</b>	<b>2</b>
<b>LİZİN .....</b>	<b>2</b>
2.1 Lizin .....	2
2.2 Lizin Tayin Yöntemleri.....	6
2.2.1 Biyosensör Esaslı Yöntemler .....	6
2.2.2 Literatürde Lizinle İlgili Yapılan Çalışmalar .....	7
<b>BÖLÜM 3</b>	<b>14</b>
<b>KURAMSAL TEMELLER .....</b>	<b>14</b>
3.1 Biyosensörler .....	14
3.1.1 Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu .....	15
3.1.2 Biyosensörlerin Uygulama Alanları.....	16

3.1.3	Enzim Sensörleri.....	17
3.1.4	Enzim İmmobilizasyonu .....	18
3.1.5	Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri .....	19
3.1.5.1	Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri .....	20
3.1.5.2	Çapraz Bağlama Yöntemleri .....	21
3.1.5.3	Kopolimerizasyon Yöntemleri.....	21
3.1.5.4	Tutuklama Yöntemi .....	21
3.1.6	Enzim Sensörlerinin Sınıflandırılması.....	22
3.1.6.1	Amperometrik Enzim Sensörleri.....	22
3.1.6.2	Potansiyometrik Enzim Sensörleri.....	23
3.1.6.3	Yarı İletkenleri Esas Alan Enzim Sensörleri.....	24
3.1.6.4	Optik Esaslı Enzim Sensörleri.....	25
3.1.6.5	Kalorimetrik Esaslı Enzim Sensörleri.....	25
3.1.6.6	Piezoelektrik Esaslı Enzim Sensörleri.....	25
3.1.7	Enzim Elektrotlarında Performans Faktörleri .....	25
3.1.7.1	Kalibrasyon ve Duyarlılık.....	25
3.1.7.2	Kararlılık .....	26
3.1.7.3	Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı .....	26
3.1.7.4	Cevap Süresi .....	27
3.1.7.5	Seçicilik .....	27
3.1.7.6	Tekrarlanabilirlik.....	27
3.1.7.7	Sıcaklık .....	27
3.1.7.8	Tıbbi Uygulamalarda Kullanılacak Biyosensörler İçin Biyouyumluluk	28
3.2	Lizin Tayininde Kullanılan Materyallere Genel Bakış .....	28
3.2.1	Lizin Oksidaz.....	28
3.2.2	Nonaktin.....	30
3.2.3	Palmitik Asit .....	31
3.2.4	Dioktil Sebakat (DOS).....	31
3.2.5	Glutaraldehit .....	32
3.2.6	Poli(vinilklorür) (PVC).....	33
3.2.7	1-etil—3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC).....	34
<b>BÖLÜM 4</b>		<b>35</b>
<b>MATERYAL VE METOD .....</b>		<b>35</b>
4.1	Kullanılan Cihazlar.....	35
4.2	Kullanılan Enzim .....	35
4.3	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	35
4.4	Kullanılan Çözeltiler .....	37
4.4.1	Tris Tampon Çözeltisi.....	37
4.4.2	Amonyum Klorür Çözeltileri.....	37
4.4.3	Lizin Çözeltileri .....	37
4.4.4	Çalışma Elektrodu İç Dolgu Çözeltisi.....	38

4.4.5	L-lizin Kapsül ve Tabletinde (Solgar) Lizinin Tayini için Hazırlanan Lizin ve Numune Çözeltileri .....	38
4.5	Amonyum-Seçici Elektrot.....	38
4.6	Lizin Biyosensörü .....	39
4.6.1	Lizin Biyosensörünün Hazırlanması .....	39
4.6.2	Lizin Biyosensörünün Çalışma Aralıklarının ve Eğimlerinin Belirlenmesi ...	40
4.7	Lizin Biyosensörünün Amonyuma ve Lizine Cevabının Belirlenmesi.....	40
4.7.1	Lizin Biyosensörünün Amonyuma Cevabının Belirlenmesi.....	40
4.7.2	Lizin Biyosensörünün Lizine Cevabının Belirlenmesi .....	41
4.8	Lizin Biyosensörünün Performansına Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi.....	41
4.9	Lizin Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği .....	41
4.10	Lizin Biyosensörü ile L-Lizin Kapsül ve Tabletinde (Solgar) Lizin Tayini .....	41
<b>BÖLÜM 5</b>		<b>42</b>
<b>ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>		<b>42</b>
5.1	Lizin Oksidaz Biyosensörleri .....	42
5.1.1	Lizin Biyosensörünün Amonyuma Cevabı.....	43
5.2	Lizin Biyosensörünün Lizine Cevabı .....	45
5.3	Tampon Konsantrasyonu Etkisi.....	46
5.4	Lizin Biyosensörünün Performansına pH Etkisi .....	48
5.5	Lizin Biyosensörünün Performansına Sıcaklık Etkisi .....	50
5.6	Diğer Aminoasitlerin Girişim Etkisi .....	51
5.7	Tekrarlanabilirlik .....	53
5.8	Raf Ömrü .....	54
5.9	Cevap Süresi.....	55
5.10	Ticari L-lizin Tablet ve Kapsülde Lizin Tayini .....	55
<b>BÖLÜM 6</b>		<b>57</b>
<b>SONUÇ.....</b>		<b>57</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>		<b>59</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>		<b>63</b>

## SİMGE LİSTESİ

---

°C	santigrat derece
g	gram
kDa	kilo Dalton
log	logaritma
mg	miligram
mm	milimetre
mM	milimolar
M	molar
$\mu$ A	mikro amper
$\mu$ M	mikromolar
mV	milivolt
$\mu$ l	mikrolitre
RSD	bağıl standart sapma
s	saniye
s	standart sapma
U	unit

## KISALTMA LİSTESİ

---

Arg	Arginin
BOD	Biyokimyasal oksijen istemi
CV	Dönüşümlü voltametri
DOS	Dioktil sebakat
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
ENFET	Enzim alan etki transistörü
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FTIR	Fourier transform infrared
GOD	Glukoz oksidaz
His	Histidin
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
Lys	Lizin
NC	Nitroselüloz
Phe	Fenil alanin
PVC	Polivinil klorür
PVF	Polivinil ferrosen
SAW	Yüzey akustik dalga
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
THF	Tetrahidrofuran
TRIS	Tris(hidroksimetil)amino metan
Tyr	Tirozin



## ŞEKİL LİSTESİ

---

	Sayfa
Şekil 2.1 Lizin amino asitinin kimyasal yapısı.....	2
Şekil 3.1 Biyosensör çalışma prensibi.....	16
Şekil 3.2 Enzim sensörlerinin genel şematik gösterimi.....	18
Şekil 3.3 Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	19
Şekil 3.4 Potansiyometrik esaslı biyosensör şematik gösterimi.....	24
Şekil 3.5 Nonaktin kimyasal yapısı.....	31
Şekil 3.6 Dioktil sebakat kimyasal yapısı.....	32
Şekil 3.7 Glutaraldehit kimyasal yapısı.....	32
Şekil 3.8 Glutaraldehit çapraz bağlama reaksiyonu.....	33
Şekil 3.9 Poli(vinilklorür) (PVC) kimyasal yapısı.....	33
Şekil 3.10 EDC kimyasal yapısı.....	34
Şekil 4.1 Lizin oksidaz biyosensör.....	40
Şekil 5.1 Lizin biyosensörünün amonyuma cevabı.....	44
Şekil 5.2 Lizin biyosensörü kalibrasyon grafiği.....	45
Şekil 5.3 Lizin biyosensör eğiminin tampon konsantrasyonu ile değişimi.....	47
Şekil 5.4 Lizin biyosensör eğiminin pH ile değişimi.....	49
Şekil 5.5 Lizin biyosensör eğiminin sıcaklık ile değişimi.....	50
Şekil 5.6 Lizin biyosensörünün tekrarlanabilirliği.....	53
Şekil 5.7 Lizin biyosensörünün raf ömrü.....	54

## ÇİZELGE LİSTESİ

---

	Sayfa
Çizelge 2.1 Bazı besinlere ait lizin içeriği.....	5
Çizelge 3.1 Biyosensörlerin yapısı ve fonksiyonu.....	15
Çizelge 3. 2 Biyosensörler için uygulama olanakları.....	16
Çizelge 3.3 Biyosensör grupları ve kapsadıkları analizler.....	17
Çizelge 3.4 Enzim Sensörlerinin Sınıflandırılması.....	22
Çizelge 3.5 Lizin oksidaz'ın relatif aktivite değerleri.....	29
Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan aminoasitler.....	36
Çizelge 4.2 Palmitik asit içeren PVC kullanılarak hazırlanan amonyum-seçici membran bileşimi.....	38
Çizelge 5.1 Lizin oksidaz biyosensörünün amonyum iyonu için doğrusal çalışma aralığı ve elektrodun eğimi.....	44
Çizelge 5.2 Lizin oksidaz biyosensörünün lizin için doğrusal çalışma aralığı ve elektrodun eğimi.....	45
Çizelge 5.3 Lizin oksidaz biyosensörünün cevabına tampon konsantrasyonu etkisi.....	47
Çizelge 5.4 Lizin oksidaz biyosensörünün cevabına pH'ın etkisi.....	48
Çizelge 5.5 Lizin oksidaz biyosensörünün cevabına sıcaklığın etkisi.....	50
Çizelge 5.6 Lizin biyosensörüne amino asitlerin girişim oranları.....	52
Çizelge 5.7 Ticari L-lizin tablet ve kapsülde lizin tayini.....	56

## LİZİN TAYİNİNE YÖNELİK BİYSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Saniye YARAR

Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emine KARAKUŞ

İnsanda ve diğer memelilerde L-lizin esansiyel amino asitlerden bir tanesidir ve besinlerle alınması gerekir. Lizin eksikliği bazı hastalıklara sebep olabilir, bu nedenle besinlere takviye olarak ilave edilebilir ve ilaç olarak kullanılabilir. Bu sebeple besinlerde lizin tayini yapmak önem taşır, ısı ve saklama koşullarıyla hemen zarar gören lizin amino asit tayini besin kalitesini ölçmek için iyi bir araçtır.

Biyolojik aktif materyal olarak enzim içeren biyosensörler, temel olarak elektrokimyasal sinyalleri alan bir elektrot ve bu elektrot üzerine immobilize edilmiş enzim veya enzimler içermektedir. İyon seçici elektrotlar üzerine bir veya daha fazla enzim immobilize edilerek, bunların çeşitli substrat tayininde kullanılmaları son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Biyosensörler, vitaminler, antibiyotikler, metabolitler gibi organik maddelerin, bazı inorganik bileşiklerin, enzimlerin, virüslerin ve mikroorganizmaların tayininde kullanıldığı gibi biyoteknoloji ve gıda endüstrisi alanlarında da kullanım alanı bulmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı palmitik asit içeren amonyum-seçici PVC membran elektrot üzerine belli oranlardaki lizin oksidaz enziminin immobilize edilmesi ile biyosensör geliştirilerek lizinin potansiyometrik tayininin yapılmasıdır. Biyosensör oluşumu iki safhada yapıldı, birinci safhada amonyum-seçici poli(vinilklorür)(PVC) membran elektrot oluşturuldu, ikinci safhada ise bu amonyum-seçici elektrot üzerine glutaraldehit kullanılarak lizin oksidaz (LOx) enzimi immobilize edildi. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan amonyum iyonları oluşturulan biyosensör kullanılarak potansiyometrik olarak tayin edildi. Lizin biyosensörün amonyuma ve lizine cevabı belirlendikten sonra lizin için çalışma aralığı, cevap zamanı, optimum tampon konsantrasyonu,

optimum pH, ortam sıcaklığı, raf ömrü ve tekrarlanabilirlik parametreleri belirlendi. Diğer amino asitlerin ve askorbik asidin girişim etkisi çalışıldı. Lizin oksidaz enzimi (LOx) spesifik olarak lizinin  $\alpha$ -oksidasyonun katalizlemekle birlikte L-fenil alanin, L-arjinin ve L-histidin gibi diğer bazı amino asitlere karşıda yavaşta olsa reaksiyon gösterir. Bu çalışmada gerçek numunelerde bulunabilecek askorbik asit ve diğer pek çok amino asit ihmal edilebilir seviyede girişim etkisi göstermiştir. İlave olarak ticari lizin tablet ve kapsüllerde lizin tayini başarıyla gerçekleştirildi. Belirtilen etiket değerleriyle yakın sonuçlar elde edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Lizin, lizin oksidaz, biyosensör, potansiyometrik biyosensörler, PVC, nonaktin

**CONSTRUCTION OF L-LYSINE BIOSENSOR AND ITS CHARACTERISATION**

Saniye YARAR

Department of Chemistry

PhD. Thesis

Adviser: Assoc.Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

In man and the other mammals, L-lysine is one of the essential amino acid and it must be intaken with foods. Lysine deficiency can cause severe diseases therefore it is often added as dieatary supplement to foods and drugs. Owing to this, lysine content of foods can be used as an index of nutritional quality or the evaluation of food processing techniques as it is easily damaged by heat treatment and storage conditions.

The biosensors consisting of enzyme as biologically active material, basically including electrodes transducing electrochemical signals and an enzyme or enzymes immobilised onto these electrodes. It becomes widespread recently to use different substrate detection by using ion selective electrodes immobilised with one or more enzymes. The biosensors used to determination of organic materials like vitamins, antibiotics, metabolites, for determination of inorganic compounds, enzymes, viruses and micro-organism as well as it finds application in biotechnology and food industry.

The aim of this thesis the construction of a L-lysine biosensor on ammonium-selective poly (vinylchloride) (PVC) membrane containing palmitic acid electrode. The construction procedure occurs two stage: the first stage is preparation of ammonium-selective poly (vinylchloride) (PVC) membrane electrode and the second stage is chemically immobilisation of lysine oxidase (LOx) on this by using glutaraldehyde. Ammonium ions produced after enzymatic reaction were determined potentiometrically with the biosensor. The sensitivity of the lysine biosensor against ammonium ions and lysine studied separately. The response time,

linear working range, repeatability, life time of the biosensor studied, optimum pH, buffer concentration and optimum temperature of biosensor determined. The interfering effects of other amino acids and ascorbic acid on the biosensor performance is also studied. Although lysine oxidase enzyme specifically catalyse  $\alpha$ -oxidation of lysine, it shows reaction towards a few amino acids as L-phenyalanine, L-arginin, L-histidine slowly. In this study ascorbic acid and alot of amino acids that can present in some real samples didn't show any important interference. Additionally, lysine assay in commercial lysine tablets and capsules were also succesfully carried out. The results were good agreement with reported value.

**Keywords:** Lysine, lysine oxidase, biosensor, potantiometric biosensors, PVC, nonactin

#### 1.1 Literatür Özeti

Literatürde lizin oksidaz, lizin dekarboksilaz ve lizin dehidrogenazın kullanıldığı pek çok amperometrik esaslı lizin sensörleri ile birlikte daha az sayıda potansiyometrik esaslı sensörlerde bulunmaktadır. Amonyum iyon seçici, palmitik asit içeren poli (vinilklorür) (PVC) membran üzerine lizin oksidaz enziminin immobilize edilerek amonyumun potansiyometrik olarak tayin edildiği bir çalışmaya rastlanmamış olup, bu çalışmamızın özgün olduğunu göstermektedir.

#### 1.2 Tezin Amacı

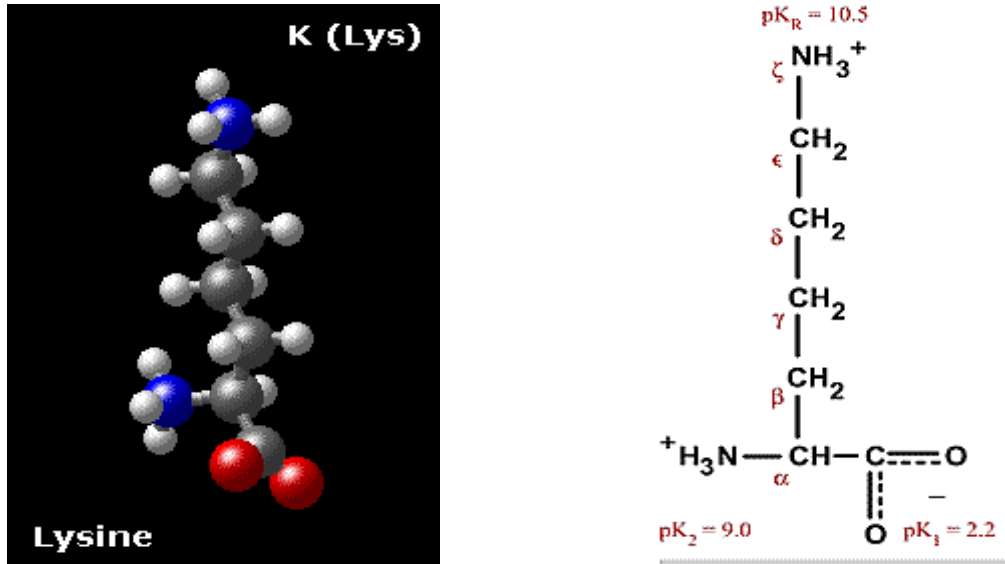
Ticari olarak piyasada mevcut, besin takviye amaçlı lizin içeren farmasötik ürünlerde lizin tayini için potansiyometrik esaslı biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Amonyuma duyarlı membran ile hazırlanan amonyum elektrodunun membranına lizin oksidaz enziminin immobilize edilmesiyle hazırladığımız biyosensör ile enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan amonyum iyonlarının potansiyometrik olarak ölçülmesi sonucu elde edilen amonyum miktarından lizin miktarı tayini yapılmıştır.

#### 1.3 Hipotez

Lizin biyosensörünün hazırlanması, optimum çalışma koşullarının belirlenmesi ve ticari olarak mevcut lizin içeren farmasötik ürünlerde lizin tayininin yapılmasıdır.

#### 2.1 Lizin

Lys veya K ile sembolize edilen lizin bir  $\alpha$ -aminoasittir ve kimyasal formülü  $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 'dir. Lizin bazik bir amino asittir ve  $\epsilon$ - $\text{NH}_3^+$  grubu pH 10'a kadar yükünü kaybetmez. Alifatik aminoasitlerden, ek grubu olmayan amino asit grubuna dahil edilir. Yapısında iki amino ve bir karboksil grubu içerir. Lizin amino asitinin kimyasal yapısı Şekil 2.1'de verilmektedir.



Şekil 2.1 Lizin amino asitinin kimyasal yapısı

İnsan vücudunda sentezlenemeyen ve bu nedenle besinlerle alınması gereken esansiyel bir amino asittir. Arginin ve Histidin gibi bazik bir aminoasittir,  $\epsilon$ -amino grubu



katalizlerde genel bir baz olarak hidrojen bağlarında rol alır. Yaygın olarak posttranslasyonel modifikasyonları arasında  $\epsilon$ -amino grubunun metillenerek metil-, dimetil-, ve trimetillizin oluşumu yer alır. Trimetillizin kalmodulinde yer alır. Lizine ait diğer posttranslasyonel modifikasyonlar asetilasyon ve ubiqinasyondur. Kollajen lizin hidroksilaz tarafından lizinden oluşan hidroksilizin içerir. Endoplazmik retikulum veya golgi aparatında hidroksilizin atıklarının o-glikolizasyonu hücreden salınacak proteinlerin işaretlemesinde kullanılır.

Esansiyel bir aminoasit olarak lizin hayvanlarda sentezlenmez, bu nedenle lizin veya lizin içeren protein olarak alınması gerekir. Bitki ve bakterilerde aspartik asitten sentezlenir.

Oral yolla alınan reçetesiz besin destek gruplarında lizin yaygın olarak bulunmaktadır. L-lizin metabolizmasında, lizin asetoasetil-CoA'nın öncül maddesidir, bu da merkezi sinir sisteminde asetilkolin biyosentezinde önemli bir enzimdir. Lizin ayrıca L-karnitin biyosentezinde de öncül maddedir. L-karnitin, beta oksidasyonu için mitekondriye açıl gruplarının transportunda görev alır. L-karnitin uzun zincirli yağ asitlerinin iç mitokondri membranına transferinde gerekli bir kofaktördür [1].

Proteinlerin yapısında bulunan lizinlerin  $\epsilon$ -amino grupları, taşıdıkları bu yük dolayısıyla, onların polar tabiatını artırır; taşıdıkları pozitif yük dolayısıyla, negatif yüklü yan zincirlerle tuz bağı teşkil edip, protein molekülünün yapısal sağlamlığına yardım ederler. Lizinin amino gruplarının transaminasyon olaylarına katılmadığı, kendisine karşılık gelen  $\alpha$ -keto asit organizmaya verildiğinde lizin haline geçmediği tespit edilmiştir.

Lizinin yıkılışı iki yoldan olur ve her iki yıkım yolundada son ürün Asetil-CoA olduğu için ketojenik bir amino asittir:

- 1- Önce lizinin  $\epsilon$ -amino grubu asetilleşir,  $\epsilon$ -N-asetil lizin oluşur. Lizinin böylece  $\epsilon$  - amino grubunun bloke edilmiş olmasıyla artık  $\alpha$ -amino grubu transaminasyona uğrayabilir. Böylece 2-keto-6-asetamidokaproat teşekkül eder. Bu da halkalaşarak 1-dehidropipekolat üzerinden pipekolata dönüşür; halka açılarak 2-aminoadipik asid üzerinden 2-ketoadipata, oda krotonil KoA'ya yıkılır.

- 2- Bu yıkılış yolunda lizin önce  $\alpha$ -ketoglutarik asit ile reaksiyonlaşıp sakkaropin teşekkül eder. Reaksiyona giren  $\alpha$ -ketoglutarik asit molekülden glutamik asit halinde ayrılıp 2-amino-adipaldehidat oluşur. Bu da 2-aminoadipata dönüşür.

Özel yapılı bazı protein moleküllerindeki lizin kalıntılarının önemli fonksiyonları vardır. Örneğin, insan hemoglobininde, propionat yan zincirlerinin bağlanması için gerekli yük iki lizin kalıntısı tarafından temin edilmektedir. Görme olayında ışık etkisinin sinir impulsu ile sonuçlanmasında da lizin kalıntıları görev almaktadır. Karanlıkta 11-cis-retinal opsin'in etanolamin kısmına Schiff bazı ile bağlıdır. Işık etkisi ile trans retinal haline geçerek aminden ayrılır ve opsindeki bir lizin kalıntısına aktarılır.

Kan pıhtılaşması sırasında fibrin monomerlerinin agregatlaşmasında hidrojen bağları ve hidrofobik etkiler rol oynamakla beraber asıl kuvvetli bağlar monomerler arasında kuvvetli kovalent bağların oluşumu ile sağlanır. Bu kovalent bağlar, transamidaz enziminin etkisi ile, bir monomerdeki lizin grubunun diğer bir fibrin monomerindeki glutaminil kalıntısı ile çapraz bağlanması sonucunda oluşur. Öte yandan lizin kalıntıları, histidil kalıntıları ile birlikte, bazı enzimlerin aktif kısmını oluşturmaktadır. Sığır pankreasından elde edilen ribonukleaz A enziminin etkili kısmında lizin bulunduğu saptanmıştır [2].

Transaminazlarda apoenzimin piridoksal fosfata bağlanışında da lizin kalıntıları görev almıştır. Apoenzimdeki lizin kalıntısı, koenzim olan piridoksal fosfatın aldehid grubu ile reaksiyonlaşarak, bir Schiff bazı olan 'aldimin' oluşturur. Pirüvik asidi oksal asedik aside çeviren pirüvat karboksilaz enziminin etkili kısmı olan biyotin de apoenzimdeki bir lizin kalıntısına bağlıdır. Fosfofruktoaldolaz enziminde de reaksiyon mekanizması enzimin peptid zincirindeki lizil kalıntısının fruktoz-1,6-difosfat, ya da dihidroksi aseton fosfat ile Schiff bazı teşkil etmesi esasına dayanır.

Lizin uygun büyümede önemlidir, karnitin oluşumunda önemli bir rol oynar, karnitin yağ asitlerinin enerjiye dönüşümünde ve kolesterolün azaltılmasında önemlidir. Lizin bakımından zengin gıdalar arasında yumurta, et, peynir ve yer fıstığı sayılabilir. Günlük ihtiyaç genç erkeklerde günde 0.8 g, genç kadınlarda ise 0.5 g kadardır. Besinlerle yeteri kadar lizin alınmaması durumunda yorgunluk, ağrı, baş dönmesi, yavaş büyüme, anemi ve üretkenlikte problemler gözükülebilir. Çizelge 2.1'de bazı besinlere ait lizin içeriği verilmektedir;

Çizelge 2.1 Bazı besinlere ait lizin içeriği [4]

Besin	Lizin içeriği (% protein)
Balık	9.19
Siğir eti	8.31
Mercimek	7.95
Parmesan peyniri	7.75
Azuki fasulye	7.53
Süt, yağsız	7.48
Soya fasulyesi	7.42
Yumurta	7.27

Lizinin herpes simplex enfeksiyonunda faydalı olabileceğini gösteren bazı çalışmalar, bu amino asitin klinik olarak önemli bir yeri olduğunu göstermektedir [3].

Lizin intestinal sistem serotonin reseptörleri üzerinde anksiyolitik etkiye sahip olup, ayrıca amigdalada serotonin düzenlenmesi ile aneksetiyi azalttığı varsayılmaktadır [4].

Ayrıca bazı lizin bileşiklerinin kanser tedavisinde ümit vaat ettiği, ilacın fototerapi ile birleştiği durumda kanserli hücrenin kendi kendini yok ettiği, sağlam hücrelere ise zarar vermediği belirtilmektedir [5].

Tavuklarda lizin eksikliği immun sistemde eksikliğe neden olur. Kısmen lizin eksikliği ile oluşan sistinüri sebeplerden birisi lizin dahil bazik veya pozitif yüklü amino asitlerin hepatik geri emiliminde bozukluk olmasıdır. Buna idrardaki sistein eşlik eder çünkü aynı eksik olan aminoasit taşıyıcıları böbrekte de vardır. Çok kısıtlı sayıda da olsa bazı çalışmalar besinle yüksek oranda lizin alımının kan basıncı üzerine etkili olduğu ve kalp krizi riski oranından bahsetmektedir [6].

Lizin metabolizması bozuklukları aşağıdaki şekilde belirtilebilir;

Hiperlizinemi: Nadir bir genetik hastalık olup, zeka ve fiziksel gelişme bozukluklarına neden olur. Yüksek lizin düzeyi, arginazı inhibe eder ve bunun sonucu plazma arginin konsantrasyonunda artma görülür.

Sakkaropinüri (hiperammonemisiz inatçı hiperlizinemi): Sakkaropini katabolize eden enzim eksikliği sonucu idrarla fazla miktarda sakkaropin ve lizin atılması sonucu, zeka geriliği görülür.

## 2.2 Lizin Tayin Yöntemleri

Lizin tayini için standart amino asit tayin yöntemi dışında, oldukça pahalı bir teknoloji olarak sıvı kromatografi, ters faz sıvı kromatografi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi gibi kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Bu teknikler oldukça pahalı ekipmanlar ve reaktifler, uzun ön işlemler, saflaştırma ve tecrübeli operatörler gerektirmektedir [8].

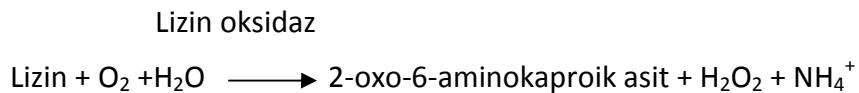
Lizin analizleri son yıllarda pek çok biyosensör esaslı tayin yöntemleri geliştirilmiştir, bu biyosensörlerde biyolojik komponent olarak 4 enzim kullanılmaktadır; L-lizin dekarboksilaz, L-lizin dehidrojenaz, L-lizin monooksijenaz ve L-lizin oksidaz.

Lizin oksidaz enzim reaksiyonlarından yararlanılarak, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan amonyum iyonu amonyum duyar elektrotlar ile tayin edilebildiği gibi, alternatif olarak spektrofotometrik veya florometrik aktif türevlerine dönüştürülerek tayin edilebilir. Enzimatik reaksiyon tüketilen oksijen ve oluşan hidrojen peroksit üzerinden de takip edilebilir.

Lizinin tayininde lizin dekarboksilaz kullanılarak diğer enzimatik biyosensörler tanımlanmıştır. Substratın degradasyonu sonucu karbondioksit ve kadaverin oluşur. Karbondioksit potansiyometrik olarak CO<sub>2</sub> elektrodu ile, kadaverin ise kadaverin hassas membran kullanılarak hazırlanmış optik biyosensör ile tayin edilir. Lizin dehidrojenaz enzimi kullanılarak geliştirilmiş biyosensör örnekleride literatürde mevcuttur [7].

### 2.2.1 Biyosensör Esaslı Yöntemler

Lizin analizi için lizin oksidazın enzimatik reaksiyonunun kullanıldığı pek çok metot geliştirilmiştir. Lizin oksidaz enzimi lizinin aşağıdaki reaksiyonda da görüldüğü gibi 2-oxo-6-aminokaproik asit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a dönüşümünü katalizler.



Bu reaksiyon amperometrik olarak Clark tipi elektrotlar kullanılarak oksijen tüketimini veya platin veya altın elektrotlar kullanarak hidrojen peroksit oluşumunu ölçerek tayin edilebilir. Bu yöntem lizin oksidaz immobilize edilmiş reaktör kullanılarak uygulanabilir [9].

Alternatif olarak, lizin oksidazın farklı tür membranlara immobilize edildiği biyosensör tasarımları da geliştirilmiştir. Bu membranların lizin tayini, doğrudan çalışma elektrodu üzerine yerleştirilmesi ile enzimatik reaksiyon sonucu oluşan elektroaktif türlerin ölçülmesi esasına dayanır [10].

Amperometrik metodlar dışında, lizin oksidaz reaksiyonu sonucu açığa çıkan hidrojen peroksitin optik tayini yapılmıştır. Hidrojen peroksit kemiluminesans, florimetrik veya spektrofotometrik türevleri oluşturularak tayin edilmiştir. Lizin için hidrojen peroksitin luminol ile reaksiyonu sonucu kemilüminometrik biyosensör de tanımlanmıştır [11].

Pek çok biyolojik azot bileşiklerinin ölçümü enzimatik reaksiyon sonucu oluşan amonyum iyonlarının ölçümüne dayanmaktadır. Amonyum ölçümü amonyum gazı veya amonyum-duyarlı elektrotlar kullanılarak doğrudan yapılmıştır. Alternatif olarak spektrofotometrik veya florimetrikaktif türevlerine dönüştürülerek de amonyum tayini gerçekleştirilmiştir [11].

### **2.2.2 Literatürde Lizinle İlgili Yapılan Çalışmalar**

Literatürde lizin tayinine yönelik yapılan en eski çalışmalardan biri 1960 yılında K.J. Carpenter tarafından yapılmıştır. Bu makalede, lizinin fluorodinitrobenzen ile Sanger reaksiyonundan faydalanılarak besinlerde lizin tayini için yöntem geliştirildiği belirtilmiştir. Bu metod ile ısıya maruz kalmış besinlerde  $\epsilon$ -amino grupları diğer gruplara bağlanan bu nedenle reaksiyon veremeyen ve besinlerde de bu nedenle lizin kaybına neden olduğu düşünülmüş, dolayısıyla asit hidroliz yöntemi ile besinlerde lizin tayininin doğru sonuç vermediği, bu geliştirilmiş metod ile problemin aşıldığı belirtilmiştir [12].

Romette ve arkadaşları 1983 yılında, L-lizin oksidaz enzimini  $pO_2$  sensör kullanarak jelatin materyale immobilize edip biyosensör geliştirmişlerdir. Enzim elektrodu fermentörde sürekli akış sisteminde L-lizin ölçümünde kullanılmıştır, lineer aralık

0.2mM-4mM arasındadır, sensör spesifitesi çalışılmıştır ve yaklaşık 6 ay süreyle stabil olduğu belirtilmiştir [13].

Pohlmann ve arkadaşları 1990 yılında spektrofotometrik ölçümle birleştirilmiş akış-enjeksiyon bir teknikle L-lizin oksidaz ve horseradish peroksidaz enzimlerini birlikte immobilize ederek bir biyosensör geliştirmişlerdir. L-lizin oksidaz enzimatik reaksiyonu sonucu açığa çıkan hidrojen peroksit, peroksidaz enzimi tarafından fenol ve 4-aminoantipyrine, buda quinoneimine dönüşür ve 500 nm'de tayin edilebilir. Cevap süresi 2 dakikadan kısadır, lineer aralık 1-16 mM arasındadır ve biyosensörün birkaç ay stabil olduğu belirtilmiştir [14].

Dempsey ve arkadaşları 1992 yılında lizin dehidrogenaz enzimini kullanarak amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Enzim platin bir elektroda selüloz membran üzerinde jelatin bir desteğe tutuklanarak immobilize edilmiştir. Tayin limiti  $7 \times 10^{-8}$  -  $7 \times 10^{-4}$  M aralığına kadar lineerdir [15].

Li ve arkadaşları 1992 yılında, lizin dekarboksilaz ve kadaverin-duyarlı membran kullanarak lizin tayini için optik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Geliştirilen optik biyosensör reaksiyon sonucu oluşan kadaverin tayinine dayanır. Optik kadaverin sensöründe amin taşıyıcı olarak lipofilik tartarat içeren PVC membran kullanılmıştır. Hem kadaverin, hemde lizin için dinamik substrat konsantrasyonu 0.1-100 mM olduğu belirtilmiş, kadaverin için orta derecede seçici (etilaminler başlıca girişimciler), lizin için ise oldukça seçici olduğunu, sadece ana girişimci olarak nikotin olduğunu belirtmişlerdir [16].

Vrbova ve Marek 1992 yılında, Clark tipi oksijen sensörü ve onun yüzeyine immobilize enzim sistemini sabitlemek için uygun bir destek materyal içeren biyosensör tanımlamışlar ve buğday ekstresinde l-lizin tayini için kullanılmıştır. Lizin oksidaz enzimi, katalaz enzimi ile birlikte immobilize edilmiştir. Oksijen sensörü ile oksijen tüketimi esas alınan bu biyosensör için belirttikleri doğrusal çalışma aralığı  $6.7 \times 10^{-6}$  -  $6.7 \times 10^{-4}$  M, Michaelis sabiti 1.3 mM'dır [17].

Preuschoff ve arkadaşları 1993 yılında lizin tayini için enzimatik akış-enjeksiyon prosedürü geliştirmişlerdir. Immobilize edilen L-lizin oksidaz enzimi L-lizinin

kemiluminometrik tayininde kullanılmıştır. Lineer aralık 10-1000  $\mu\text{M}$ 'dır. Oluşturulan biyosensör sisteminin 1 ay süreyle çalışılabilir olduğunu belirtmişlerdir [18].

Siegler ve arkadaşları 1994 yılında L-lizin oksidaz enzimini Clark-tipi elektroda immobilize ederek lizin fermentasyonu proses kontrolünün sağladıkları bir lizin sensörü geliştirmişlerdir. Enzim poliüretan reçine kullanılarak selüloz ve polipropilen arasına immobilize edilmiştir [19].

Ala'ddin ve arkadaşları 1997 yılında immobilize lizin oksidaz ve glukoz oksidaz enzimlerini kullanarak lizin ve glukozu ayrı ayrı ve aynı anda tayin eden flow injection amperometrik ve kemiluminesan biyosensör geliştirmişlerdir. Lizin için kalibrasyon grafiği  $1 \times 10^{-5}$ - $1.6 \times 10^{-4}$  M ve  $2.05 \times 10^{-7}$ - $2.75 \times 10^{-5}$  M aralığında sırasıyla amperometrik ve kemiluminesan tayinde lineerdir. Lizin için tayin sınırı amperometrik tayinde  $5 \times 10^{-6}$ , kemiluminesan tayinde  $4 \times 10^{-8}$  M'dir [20].

Curilli ve arkadaşları tarafından 1998 yılında, besin kalitesini değerlendirmek için iletken-olmayan polimer film kullanılarak yeni bir girişim yapmayan lizin biyosensörü geliştirilmiştir. Bu çalışmada platinyum elektrotları dönüşümlü (siklik) voltametri kullanılarak 1,2-diaminobenzen ile elektropolimerizasyon yöntemi ile kaplanmıştır. L-lizin- $\alpha$ -oksidaz enzimi polimer üzerine pasif adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edilmiş ve lizin için kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Lineer aralığın  $1 \times 10^{-5}$  - $1 \times 10^{-3}$  M olduğu, tayin limitinin ise  $2 \times 10^{-7}$  M olduğu, kaplanmamış platinyum elektroduna göre askorbik asit girişiminin %100, asetaminofen ve sistein girişiminin %99 azaldığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada geliştirdikleri biyosensörün ticari kullanıma uygun, makarna ve sütteki lizin içeriğinin proses sırasında ve saklama süresince tayin için kullanılabilceğini belirtmişlerdir [21].

Saurina, ve arkadaşları 1998'de potansiyometrik lizin oksidaz biyosensörü geliştirmiştir. Bu biyosensör tam katı-hal (all-solid state) amonyum elektrodu üzerine lizin oksidaz enziminin kimyasal immobilizasyonu ile oluşturulmuştur. Enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan amonyum iyonları amonyum elektrodu ile tayin edilir. İmmobilizasyon koşullarının potansiyometrik cevap ve elektrot raf ömrüne etkisi çalışılmıştır. Optimum koşullarda lizin için lineer aralık  $3 \times 10^{-5}$ - $3 \times 10^{-3}$  M bulunmuştur, hassasiyet 50 mV/decade, tekrarlanabilirlik %1.4, cevap süresi  $t_{95}$  15 s'dir [11].

Saurina ve arkadaşları 1999'da L-lizin oksidaz enzimini kullanarak katı iletken bileşiklere dayalı amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Bu lizin biyosensörü kimyasal olarak immobilize edilmiş lizin oksidaz membranların grafit-metakrilat veya oksidaz-modified grafit-metakrilat elektrotları içerir. Lizinin enzimatik degradasyonu sonucu açığa çıkan hidrojen peroksit amperometrik biyosensör ile tayin edilir. Biyosensörün  $1.6 \times 10^{-4}$  M'a kadar lineer aralıkta olduğu belirtilmiştir, tekrarlanabilirlik %1.8, tayin limiti  $8.2 \times 10^{-7}$ , cevap süresi  $t_{95}$  42 s'dir. Geliştirilen biyosensör farmasötik numunelerde lizin tayininde kullanılmıştır [22].

Saurina ve arkadaşlarının 1999'da yaptıkları bir diğer çalışmada farmasötik numune analizleri için endojen olarak amonyum iyonları içeren tam katı-hal (all solid- state) potansiyometrik amonyum elektroduna dayalı lizin oksidaz biyosensörüdür. Lizin elektrodta reaksiyon sonucu amonyum iyonu oluşturur, bu da bir amonyum elektrot yardımı ile tayin edilir. Endojen olarak bulunan amonyum iyonları girişim gösterir, ölçülen cevap enzimatik olarak oluşturulan ve numunede bulunan toplam amonyum iyonu üzerindedir. Bu amonyum iyonu ölçümüne dayalı biyosensörlerin bir dezavantajdır. Lizin ve amonyum iyonu içeren numunelerin çalışmasında konsantrasyon aralığının bulunan lizin konsantrasyonu ve ölçülen potansiyelin logaritmik bir ilişkide olduğu bulunmuştur. Bu nedenle bu aralıkta standart ilave etme yöntemi ile lizin tayin edilebilir, sonrasında elde edilen veri tekrarlanabilir linearizasyon prosedürü ile ele alınır. Bu çalışmada lizin tayini için geliştirilmiş olan potansiyometrik biyosensörlerin endojen amonyum girişim problemini gidermek için matematiksel bir modelleme uygulanmıştır [23].

Kelly ve arkadaşları 2000 yılında, besin kalitesini ölçmek için rutenyum/rodyum kaplı camsı karbon elektrodunu 1,2-diaminobenzen polimeri ile kaplayarak, yüksek seçicilikte ve çok hızlı cevap veren bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Bu biyosensör ile askorbik asit ve asetaminofen gibi yaygın elektrokimyasal girişim gösteren kimyasalların +100 mV'de cevap vermediğini belirtmişlerdir. Bu yeni iletici sistem (transduser) *Trichoderma viride*'den elde edilmiş l-lizin oksidaz ile birleştirilmiştir ve uygun pH da L-ornitin, L-arginin ve L-fenilalanin gibi klasik substrat inhibisyonu, lizin cevabına göre (%100) 3.4, 1.1. ve %0.7'ye düşürülmüştür. Geliştirilen biyosensör gıdalarda başlıca süt ve makarnada lizin içeriğini ölçmek için lizin oksidaz



reaksiyonu sonucu oluşan hidrojen peroksidin tayinine dayalı amperometrik bir biyosensördür [8].

Olschewski ve arkadaşları 2000 yılında, fermentasyon ortamlarında lizin tayini için biyosensör geliştirmişlerdir. Düşük maliyetli bu screen-printed sensörler, bir platin çalışma elektrodu, Ag/AgCl pseudo referans ve bir karbon karşı elektrottan oluşur, enzim sensörleri için iletici olarak kullanılmıştır. L-lizin  $\alpha$ -oksidaz enzimi (*Trichoderma viride* kaynaklı) poliüretan hidrojele tutuklama yöntemi ile immobilize edilmiştir. Sensör lizin için pH, lineer aralık, tekrarlanabilirlik, çoğaltılabilirlik, saklama ve çalışma stabilitesi açısından karakterize edilmiş, diğer amino asitlere olan hassasiyeti belirlenmiştir. Immobilize enzim içeren ve içermeyen iki çalışma elektrotlu bir sistemle diferansiyel ölçüm lizin tayini için kullanılmıştır. Ölçülen lizin konsantrasyonlarının, geleneksel amino asit analiz sonuçları ile uyumlu olduğu belirtilmiştir [7].

Ioannis ve arkadaşları 2000 yılında lizin oksidaz enzimini altın-poli(o-fenilendiamin) elektrot üzerine immobilize ederek bir L-lizin biyosensörü geliştirmişlerdir. Biyosensör elektropolimerizasyon ile elektrot yüzeyinde poli(o-fenilendiamin,o-FD) membran oluşumu ve lizin oksidaz enziminin altın/poli(o-FD) elektrota glutaraldehit ile immobilizasyonu ile oluşturulmuştur. Analiz yöntemi reaksiyon sonucu açığa çıkan hidrojen peroksidin amperometrik olarak biyosensör ile 650 mV'de referans elektroda karşı tayinine dayanır. Altın/poli(o-FD) elektrodunun hidrojen peroksit ve lizine karşı davranışı, elektropolimerizasyonun tekrarlanabilirliği ve polimerin stabilitesi çalışılmıştır. Çalışma elektropolimerizasyonun tekrarlanabilir olduğunu ve en azından 40 gün boyunca oldukça stabil olduğunu göstermiştir. Biyosensör 0.1-10 $\mu$ M lizin konsantrasyonu aralığında lineerdir. Diğer aminoasitlerin girişim etkisi çalışılmış ve amperometrik seçicilik katsayısı hesaplanmıştır. Biyosensör başlıca tirozin ve sisteine cevap vermektedir, fenilalanin, arjinin, histidin ve ornitine cevabı çok düşüktür. Elektropolimerizasyon koşulları değiştirilerek girişim etkisinin azaltıldığını belirtmişlerdir [24].

Garcia-Villar ve arkadaşları 2003 yılında, yayınladıkları makalede akış-enjeksiyon diferansiyel potansiyometrik sistemine dayalı lizin tayin metodunu tanımlamaktadır. Akış enjeksiyon sistemi, destek elektrolit çözelti kanalı ve örnek çözeltinin enjekte

edildiği taşıyıcı olarak görev yapan su kanalından oluşmaktadır. Lizin biyosensörü, tam katı-hal (all solid-state) amonyum elektroduna bağlı naylon bir membrana kimyasal olarak lizin oksidazın immobilize edilmesiyle oluşturulmuştur. Sirküler amonyum elektrodu referans olarak kullanılmıştır, böylelikle olası endojen amonyum girişimi, kısmen diferansiyel potansiyometri ile doğrulanmıştır. Cevap hassasiyetini artırmak için, reaksiyonun kinetik incelemesi ayrıntılı olarak çalışılmıştır. Hassasiyetin 20-40 mV kadar arttığı görülmüştür. Lizin daha seçici ölçümlerinde kullanılabileceği belirtilmiştir [25].

Marquette ve arkadaşları tarafından 2003'de lizin ile birlikte kolin, glukoz, glutamat, laktat ve ürenin peşpeşe tayini için geliştirilen elektrokemiluminesan biyosensör tanımlanmıştır. Biyosensör enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksit tayini esasına dayanır. Ölçümü yapılan bu altı maddeye özel 6 tane farklı spesifik oksidaz enzimi non-kovalent olarak farklı destek materyallere immobilize edilmiştir [26].

Akyılmaz ve arkadaşları tarafından 2007 yılında hassas lizin tayini için *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinden oluşan mikrobiyal bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu amperometrik mikrobiyal biyosensör için *S. cerevisiae* NRRL-12632 hücreleri lizin oksidaz enzimi için uyarılmış ve çapraz bağlayıcı bir ajan ile jelatine immobilize edilmiştir. Mikrobiyal biyosensörün analiz prosedürü lizin varlığında ve yokluğunda hücre respirasyon aktivite farkının oksijenmetrede tayinine dayanır. Mikrobiyosensör cevabı 1.0 ile 10.0  $\mu$ M arasında lizin konsantrasyonuna lineer olarak bağlıdır, cevap süresinin 1 dakika olduğu belirtilmiştir [27].

Guerrieri ve arkadaşları 2007 yılında, platin elektroda immobilize edilmiş lizin oksidaz amperometrik lizin biyosensörü geliştirmişlerdir. Lizin oksidaz, sığır serum albumin ile birlikte glutaraldehit ile platin elektroda çapraz bağlanmıştır. Geliştirilen biyosensörün cevap süresinin 6 saniyeden daha kısa olduğu, lizin için doğrusal çalışma aralığının 0.6 M'a kadar olduğu belirtilmiştir. Geliştirilen sensör farmasötik numunelerde beklenen sonuçları vermiştir [28].

Gökdoğan Ö. tarafından 2011 yılında Selçuk Üniversitesinde doktora tezi olarak, lizin tayini için polivinilferrosen (PVF) polimeri temelli ve metal parçacıklar biriktirilmiş platin elektrotlara lizin oksidaz enzimi immobilize ederek lizin biyosensörü geliştirilmiştir. Biyosensör amperometrik cevapları enzimatik reaksiyon sonucu oluşan

hidrojen peroksitin sabit potansiyelde yükseltgenme akımının ölçülmesi prensibine dayanmaktadır [29].

Guerrieri ve arkadaşları 2013 yılında öncesinde polipirol film ile aşırı oksitlenerek modifiye edilmiş platin elektrot üzerine l-lizin- $\alpha$ - oksidaz enzimini immobilize ederek amperometrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. pH ve akış hızı gibi deneysel parametrelerin optimizasyonu ile spesifikliği düşük ticari enzimlerde bile substrat girişimini minimize ettiğini belirtmişlerdir. Lizin ölçümlerinde L-arjinin, L-histidin ve L-ornitinden gelen girişim etkisinin %1, L-fenilalanin ve L-tirozinden gelen girişim etkisi ise yaklaşık %4 civarındadır. Geliştirilen yaklaşım 0.02 mM-2mM lineer lizin cevap aralığında çalışmaya izin vermiş, tayin limiti 4  $\mu$ M'dır. Amperometrik biyosensör aktivite kaybı olmadan 40 gün süresince kullanılabilmiştir. Polipirol tabaka elektroaktif bileşiklerin girişim etkisini yok etmiştir ve sundukları metodun farmasötik numunelerde ve peynir örneklerinde lizin tayini için kullanılabilir olduğunu belirtmişlerdir [30].

Chauhan ve arkadaşları 2013 yılında lizin tayini için lizin oksidaz enzimini Au/Pt nanopartikülleri ile modifiye edilmiş Au elektrot üzerine kovalent olarak immobilizasyonu ile bir biyosensör geliştirmişlerdir. Ticari enzim kaynağı *Trichoderma viridie'*dir, çapraz bağlama ajanı olarak glutaraldehit ve 3-aminopropiltrietoksisilan (3-APTES) kullanmışlardır. Enzim elektrodu taramalı (scanning) elektron mikroskobu (SEM), fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ve dönüşümlü (sıklık) voltametri (CV) kullanılarak karakterize edilmiştir. Sensör optimum cevabı 4 s 'de vermiştir, lineer aralık ve tayin limiti sırasıyla 1.0-600  $\mu$ M ve 1.0  $\mu$ M (S/N=3)'dir. Biyosensör sütte ve amino asit tabletlerinde lizin tayini için kullanılmış ve HPLC metod sonuçları ile birbirini desteklemiştir. Enzim elektrodu yaklaşık 4 ay içinde 200 kullanım sonrası yaklaşık %50 aktivite kaybına uğramıştır [31].

#### 3.1 Biyosensörler

Son yirmibeş yılda enzimlerin biyolojik kapasitesi hakkında bilginin artması yeni ürünlerin ve proseslerin doğmasına neden olmuştur. Bu ürünlerin arasında en önemli olanlarından bir tanesi biyosensörlerdir, geleneksel analitik tekniklere oldukça güçlü bir alternatiftir. Biyosensör teknolojisi spesifik biyolojik tanıma elemanının, sinyal üretici transduser ile kombinasyonudur. Bu teknoloji son yıllarda özellikle biyomedikal alanında aygıtların yaratılması nedeniyle oldukça gelişme kaydetmiştir. Bu gelişmiş teknoloji yatay olarak çevre, tarım ve gıda gibi diğer sektörlerde transfer edilmiştir. Biyosensörler gıda endüstrisinde gıda kalitesini ölçmek için hızlı ve ekonomik metodlar, gıda güvenliği için efektif proses kontrolü sağlamaktadır [32].

Tüm canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin in vitro kullanımı için temel oluşturmuştur. Canlılara bu uyarıları algılamayı mümkün kılan biyolojik maddelerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensörleri doğurmuştur.

Biyosensörlerin tarihi 50'li yılların ortalarında L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesine (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O<sub>2</sub> miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons, Glukoz Oksidaz (GOD) enzimini oksijen elektrodu ile birleştirerek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başardılar [33]. Böylece yeni bir analitik

sistem oluştu. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifikliğini (enzim), diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrot) tayinsel duyarlılığını birleştirmiştir.

### 3.1.1 Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu

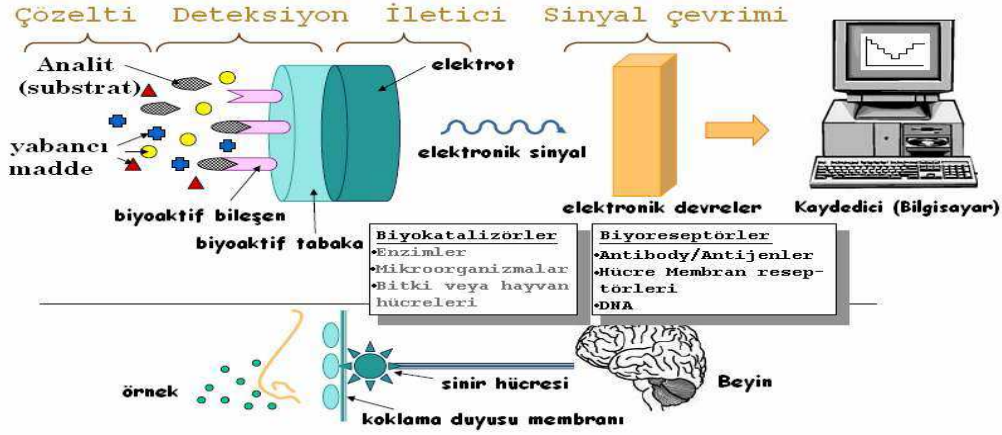
Biyosensörler farklı özellikteki iki elemanın (transduser ve biyoreseptör) birleşimi ile oluşurlar. Biyosensörün görevi biyolojik bir olayın elektriksel sinyale dönüştürülmesidir. Biyosensörlerin yapısında yer alan biyokomponentler çoğu kez biyoreseptör olarak adlandırılırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılanlar enzimler ve antikorlardır. Biyosensörlerin yapısı ve fonksiyonu izelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Biyosensörlerin yapısı ve fonksiyonu

BİYOKOMPONENTLER	TRANSDUSERLER
<ul style="list-style-type: none"><li>• Enzimler</li><li>• Doku kesitleri</li><li>• Organeller</li><li>• Immuno ajanlar</li><li>• Nükleik asitler</li><li>• Mikroorganizmalar</li><li>• Reseptör molekülleri</li></ul>	<p><b><u>Elektrokimyasallar</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Potansiyometrik</li><li>• Amperometrik</li><li>• Konduktometrik</li><li>• Transistrler</li></ul> <p><b><u>Optik</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Fotometri</li><li>• Florimetri</li><li>• Luminesans</li></ul> <p><b><u>Ktle Diğişimi</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Piezoelektrik</li></ul> <p><b><u>Isı değişimi</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Termistrler</li></ul>

Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar ve nükleik asitler, biyolojik membranlar içine yerleştirilmiş kimyasal reseptörler sensörlerde biyokomponent (biyoreseptör) olarak kullanılırlar. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratırlar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler transduser tarafından algılanır. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoreseptrlerdir. Transduserler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyona göre transduser seçilir. Elektrotlar amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde kullanılır [34]. Biyosensör alışma prensibi Şekil 3.1’de verilmektedir.

# BİYOSENSÖR



Şekil 3.1 Biyosensör çalışma prensibi

## 3.1.2 Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespiti ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar (Çizelge 3.2).

Çizelge 3. 2 Biyosensörler için uygulama olanakları

- Klinik teşhis, biyomedikal sektör
- Proses kontrolü
  - Biyoreaktör kontrol ve analitiği
  - Gıda üretim ve analizi
- Tarla tarımı, bağ, bahçe tarımı ve veterinerlik
- Bakteriyal ve viral teşhis
- İlaç analizi
- Endüstriyel atık su kontrolü
- Çevre koruma ve kirlilik kontrolü
- Maden işletmelerinde toksik gaz analizleri
- Askeri uygulamalar

Biyosensörler; gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler ilaçlar gibi organik maddeler, bazı anorganik bileşikler yanında enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar. Bunların dışında BOD, toksisite ve mutajenite testlerinde de uygulanmaktadırlar [29]. Biyosensör grupları ve kapsadıkları analizler Çizelge 3.3’de görülmektedir.

Çizelge 3.3 Biyosensör grupları ve kapsadıkları analizler

<b>Biyosensör Grubu</b>	<b>Kapsadığı Analiz Alanı</b>
Enzim sensörleri	Küçük moleküllü organik ve anorganik maddeler (metabolitler, ilaçlar, gıda maddeleri, vitaminler, antibiyotikler, pestisidler v.b.)
Mikrobiyal sensörler	Enzim sensörlerinin kapsadığı alanlar, BOD, toksisite, mutajenite
DNA-sensörleri	Virüsler, patojen mikroorganizmalar
Immunosensörler	Virüsler, patojen mikroorganizmalar, ksenobiyotikler

### 3.1.3 Enzim Sensörleri

Biyosensör teknolojisinin tarihsel gelişimine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim çalışmaları ile başladığı görülmektedir. Biyosensör teknolojisindeki ilk örnekler özellikle amperometrik ve potansiyometrik enzim elektrotları şeklinde ortaya çıkmıştır. Bu durumun en önemli nedeni o tarihteki bilgi birikiminin söz konusu çalışmalar için yeterli düzeye ulaşmış olmasıdır [34].

Biyosensör teknolojisinde elektrokimyasal esaslı enzim sensörlerinin tartışılmaz bir üstünlüğü vardır. Bunun en önemli nedeni canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin tayininde doğrudan ya da dolaylı olarak kullanılacak binlerce enzimin varlığıdır.

Enzimler, spesifiklik ve duyarlılıklarından dolayı mükemmel analitik ajanlardır. Ancak enzimin kararsızlığı, stabilitesi, enzimatik aktivitesini uzun süre koruma kapasitesi, girişim, aktivatör ve inhibitörler, analizin maliyeti gibi güçlükler, enzimlerin analitik amaçlarla kullanılmasını kısıtlamaktadır. Bu güçlükler, enzimler için çeşitli immobilizasyon teknikleri geliştirilerek azaltılmıştır.

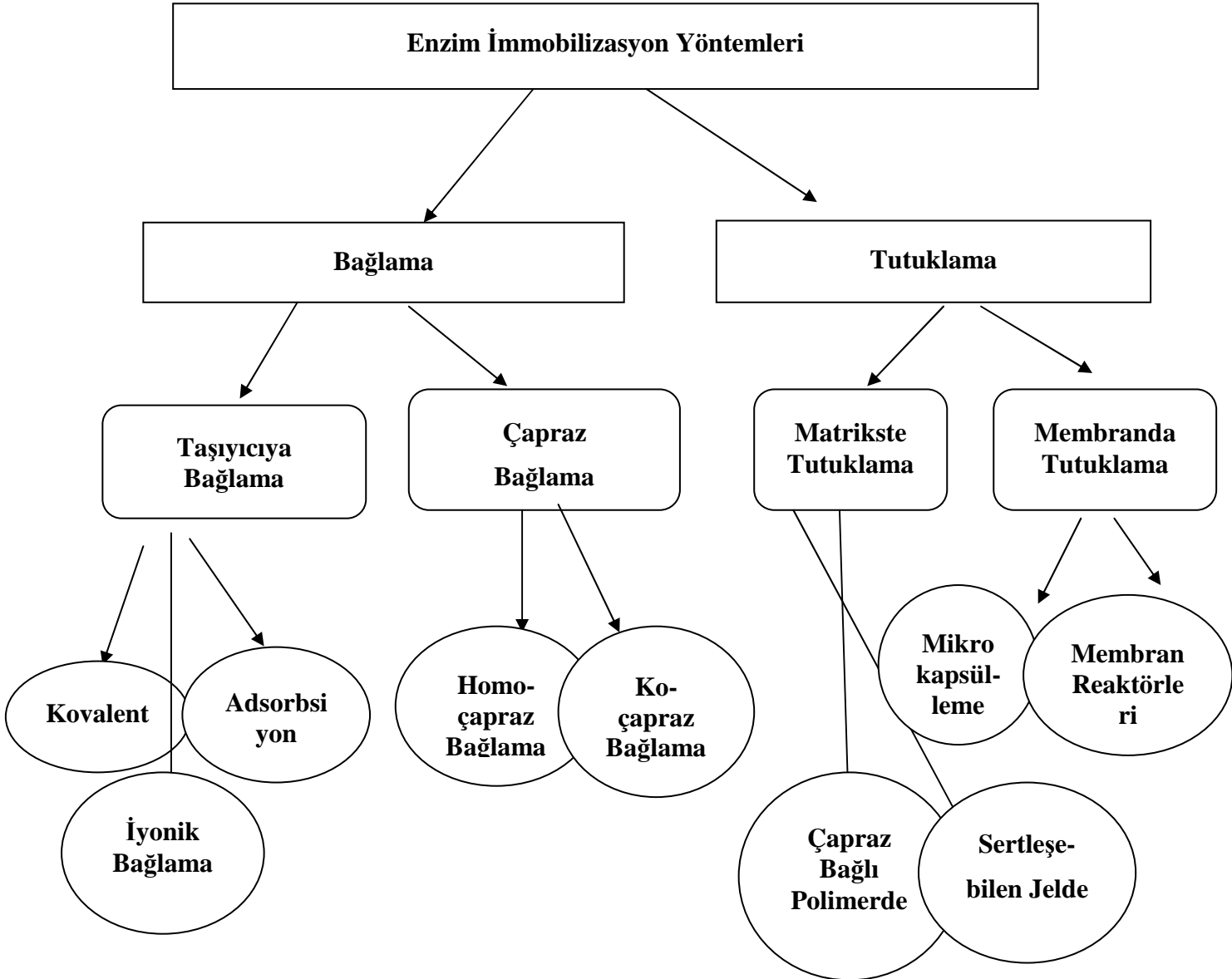




- Çok basamaklı reaksiyonlarda daha fazla mühendislik tasarımına olanak verir
- Daha kararlı olduğu için mekanik çalışmalarda çok uygundur
- Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir

### 3.1.5 Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

İmmobilizasyon yöntemi enzimlerin kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna göre belirlenmektedir. Enzimler için uygulanan tüm immobilizasyon yöntemleri protein yapısındaki diğer biyoreseptörler içinde uygulanabilir. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması [34] Şekil 3.3’de verilmiştir.



Şekil 3.3 Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

### 3.1.5.1 Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

**Kovalent Bağlama:** Enzimin çözünmez bir molekül ile kovalent olarak bağlanarak kimyasal modifikasyonu esasına dayanmaktadır. Kovalent bağlanma, enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinde gerçekleştirilir. Enzimin yapısında bulunan aminoasitler üzerinden yapılmaması ve grupların sterik olarak engellenmemesi gerekir. Biyoreseptörlerin kovalent bağlanma ile immobilizasyonu biyosensörün pH, iyon şiddeti ve sıcaklık değişimlerine karşı direncini artırarak, defalarca kullanımına olanak verir. Ancak biyolojik aktif molekülde kısmi bir aktivite kaybına sebep olur.

Enzimler doğrudan transdusere veya önceden uygun bir film veya tabaka ile kaplanmış transdusere kovalent olarak bağlanabilirler. Kovalent bağlama enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleştirilir.

**Adsorbsiyon yöntemi:** Immobilizasyonda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Adsorbsiyon işlemi sonrası adsorblanmamış enzim yıkanarak uzaklaştırılmaktadır. Bu yöntemde pH, sıcaklık, çözücünün doğası, ortamın iyonik derişimi ile adsorban ve enzim konsantrasyonları gibi parametreler önem taşımaktadır.

Bu yöntemin avantajı, enzimin immobilizasyonunun basit olması, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve adsorbe olmuş enzimin kolaylıkla koşullarına bağlı olarak desorbe olabmesidir. Selüloz asetat membranları, polistiren, polivinilklorür (PVC), silika en çok kullanılan adsorbanlar arasındadır.

**İyonik Bağlama:** İyon değıştirme yeteneğine sahip, suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik olarak bağlanması esasına dayanır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden, enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değışikliğe neden olmaz. Ancak enzim-taşıyıcı arasındaki bağ çok güçlü olmadığı için enzim kaçı söz konusu olabilir.

**Şelat Bağlama:** Bazı metallerin şelatlaşma özellikleri sayesinde enzimlerin organik veya inorganik taşıyıcılara bağlanması esasına dayanır.

**Biyospesifik Bağlanma:** Enzimler ile antikolar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak immobilizasyon gerçekleştirilir.

### 3.1.5.2 Çapraz Bağlama Yöntemleri

Bu yöntem tutuklama yöntemi ile kimyasal bağlanmanın birleştirilmiş şekli olarak uygulanır. Çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehit, hekzametilen diizosiyanat, diflorodinitrobenzen ve disüksinilsüberat yaygın olarak kullanılır. Glutaraldehit en sık kullanılan bifonksiyonel reaktiftir. Ortamdaki konsantrasyonu %2-5 (a/a) olmalıdır.

Çapraz bağlamada daldırma ve doğrudan bağlama yöntemi olmak üzere iki yöntem kullanılır.

**Daldırma Yöntemi:** Elektrot önce enzim ve reaktif polimeri veya enzim, albumin ve jelatin gibi inert bir protein ve çapraz bağlayıcı reaktifi içeren karışıma daldırılır. Daha sonra elektrot kendi eksenine etrafında homojen bir enzim tabakası elde edecek şekilde döndürülür. Elektrot yüzeyinde oluşan film bir O-ring ile tutturulur. Son olarak elektrot glisin çözeltisine daldırılarak nötrleştirilir ve çapraz bağlayıcının fazlası uzaklaştırılır. Yöntem çok kolay ve özellikle küçük transduserler için çok uygundur.

**Doğrudan Bağlama Yöntemi:** Kullanılacak enzim çok pahalı ise bu durumda doğrudan bağlama yöntemi kullanılabilir. Bu yöntemde yaklaşık 10 µl enzim çözeltisi bir kılcal boru yardımıyla dönüştürücü yüzeyine ince bir tabaka oluşturacak şekilde damlatılır. Daha sonra çapraz bağlayıcı reaktif ilave edilir.

### 3.1.5.3 Kopolimerizasyon Yöntemleri

Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanır. Bu yöntem ile enzimin kaçıışı önlenir.

### 3.1.5.4 Tutuklama Yöntemi

Enzimlerin bir membran veya tabaka (matriks) içerisinde hapsedilmesidir. Bu yöntem enzimlerin yanısıra organeller, hücreler ve antikolar içinde uygulanabilir. Tutuklama için en yaygın kullanılan film veya matriksler nişasta, poliakrilamid, silikon lastiği, polivinil klorür ve polivinil alkoldür.

### 3.1.6 Enzim Sensörlerinin Sınıflandırılması

Enzim sensörleri en genel anlamda bakıldığında diğer biyosensörlerde olduğu gibi biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm sisteminden oluşmaktadır. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması en yaygın bir şekilde, enzimatik reaksiyon uyarınca oluşan sinyalin belirlenme ilkesine göre yapılmaktadır. Çizelge 3.4'de enzim sensörlerinin sınıflandırılması özetlenmiştir [34].

Çizelge 3.4 Enzim Sensörlerinin Sınıflandırılması

- 
1. Elektrokimyasal esaslı enzim sensörleri
    - Amperometrik esaslı enzim sensörleri
      - Birinci nesil amperometrik enzim elektrotları
      - İkinci nesil amperometrik enzim elektrotları
      - Üçüncü nesil amperometrik enzim elektrotları
    - Potansiyometrik esaslı enzim sensörleri
      - Amonyum duyar potansiyometrik enzim elektrotları
      - Proton duyar potansiyometrik enzim elektrotları
      - Karbondioksit duyar potansiyometrik enzim elektrotları
      - Diğer iyon duyar potansiyometrik enzim elektrotları
    - Yarı iletkenlik esaslı enzim sensörleri
      - Enzim alan etki transistörleri (ENFET)
  2. Optik esaslı enzim sensörleri
    - Absorbsiyon esaslı optik enzim sensörleri
    - Flurosans esaslı optik enzim sensörleri
    - Biyoluminesans esaslı optik enzim sensörleri
  3. Piezoelektrik esaslı enzim sensörleri
  4. Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri
- 

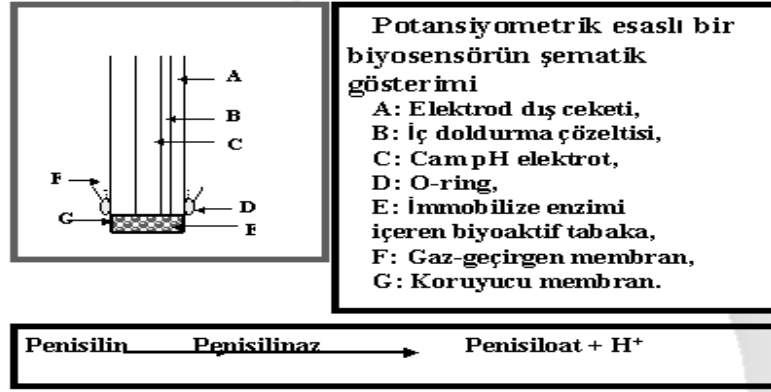
#### 3.1.6.1 Amperometrik Enzim Sensörleri

Amperometrik biyosensörler biyomoleküler elektroniğin en yaygın, çok sayıda ve ticari olarak sunulmuş araçlarıdır. Amperometrik biyosensörlerin önemi, analitik biyoteknoloji alanının gelişmesinin bunlarla başlaması nedeniyledir. Biyosensörlerin özellikle amperometrik biyosensörlerin araştırılması Clark tarafından 1956 yılında oksijen elektrodu çalışmalarının yayınlanmasıyla başlamıştır[30].

Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Sözkonusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen veya indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonudur. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. Sinyal, elektrot yüzeyine kütle aktarım hızına bağlıdır. Elektroaktif bir ürünün salınmaması ya da reaktifin biyokatalitik reaksiyona bağlı olarak tüketimi platin gibi inert bir çalışma elektrodunda doğrudan izlenebilir. Sinyal oluşturan türün sensör yüzeyinde tüketilmesi nedeniyle, iletici ile biyoaktif tabaka ara yüzeyindeki ürün derişiminin sıfır olduğu varsayılır. Bu nedenlerden dolayı, amperometrik enzim sensörlerinde denge durumundaki reaksiyon hızı, enzim içeren biyoaktif tabakanın bir yarı geçirgen membranla çevrelenmiş olduğu koşulda, substratın söz konusu membrandan difüzyon hızına eşittir[34].

### **3.1.6.2 Potansiyometrik Enzim Sensörleri**

Potansiyometri en genel anlamda bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlar. Elde edilen sinyal Nerst Kanunu uyarınca konsantrasyonun logaritması ile orantılıdır. Potansiyometrik enzim sensörlerinde kullanılan temel sensörler, pH veya tek değerlikli iyonlara duyar iyon-seçimli elektrotlar, anyon veya katyonlara duyar iyon-seçimli elektrotlar ve karbondioksit ve amonyağa yönelik gaz duyar sensörlerdir. Potansiyometrik esaslı enzim sensörleri, bu sensörler üzerine uygun immobilizasyon yöntemleri kullanarak bir veya birden çok enzimin pratik yöntemlerle immobilize edilmesi ile hazırlanır. Potansiyometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi Şekil 3.4'de verilmektedir.



Şekil 3.4 Potansiyometrik esaslı biyosensör şematik gösterimi

Cam elektrot ile gaz duyar membran arasında ince bir doldurma çözeltisi bulunur. Doldurma çözeltisi karbondioksit duyar sensörlerde sodyum bikarbonat, amonyak duyar sensörlerde amonyum klorürdür. Potansiyometrik cevap, enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan gazın (CO<sub>2</sub> veya NH<sub>3</sub>) gaz geçirgen membranı geçerek, doldurma çözeltisine difüzyonla ve bir pH değişimi oluşturmasıyla belirlenir.

Çalışma elektrodu, çözeltideki türlerden bazılarında seçicilik gösterir. Analizi yapılacak çözeltiye daldırılan bu elektrot ile aynı çözeltiyle temasta olan bir karşılaştırma elektrodu arasında oluşan gerilim değeri ile analizi yapılan türün derişimi arasında logaritmik bir ilişki vardır. Potansiyometrik enzim sensörlerinde referans elektrot kullanıldığı durumlarda, hazırlanan enzim sensörü ölçüm yapılacak çözeltinin yanına yerleştirilir. Enzim elektrodu ile referans elektrodun ilişkisi bir mV metre ile sağlanır[34].

### 3.1.6.3 Yarı İletkenleri Esas Alan Enzim Sensörleri

Temel sensör olarak metal oksit yarı iletken alan etkili transistörleri yada iyon duyarlı etkili transistörleri esas alan bu tür enzim sensörleri, enzim ile alan etki transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etki transistörü olarak adlandırılır.

#### **3.1.6.4 Optik Esaslı Enzim Sensörleri**

Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan kimyasal yada fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alır. Sinyal ışık yansıması, saçılımı yada yayımı sonucu oluşur. Optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilir.

#### **3.1.6.5 Kalorimetrik Esaslı Enzim Sensörleri**

Temel ilkeleri enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat konsantrasyonunu belirlemekten oluşur. Genel olarak enzimatik reaksiyonların ekzotermik doğasından yararlanır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır.

#### **3.1.6.6 Piezoelektrik Esaslı Enzim Sensörleri**

Bir piezoelektrik sensörün üzerinde enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen piezoelektrik enzim sensörlerinde, enzim moleküllerine substratların bağlanmasından dolayı oluşan kütle değişimlerinin piezoelektrik kuartz diskin titreşiminde neden olduğu farklanmadan yararlanılarak madde miktarına ulaşılır. Piezoelektrik esaslı enzim sensörlerinin yüzey akustik dalga (SAW) ölçümünü esas alan farklı modellerinde çok daha duyarlı tayinle yapmak mümkündür.

#### **3.1.7 Enzim Elektrotlarında Performans Faktörleri**

Genel anlamda bir enzim sensörünü karakterize eden onun çalışma niteliklerini ve verimini belirleyen faktörlerdir. Hazırlanan biyosensörün hedeflenen amaçlar çerçevesinde kullanılabilir olup olmadığına ancak performans faktörlerinin ayrıntılı bir şekilde belirlenmesinden sonra karar verilebilir.

##### **3.1.7.1 Kalibrasyon ve Duyarlılık**

Duyarlılık derişimdeki bir birim değişiklik için biyosensör sinyalinin zamanla değişimi olarak tanımlanır. İdeal olarak bir biyosensörün duyarlılığı biyosensör ömrü boyunca sabit kalmalıdır. Biyosensörün duyarlılığı, analizi yapılacak maddenin bir dizi belli konsantrasyondaki çözeltilerini içeren standart çözeltiler ile yapılan ölçümler sonucu

kalibrasyon grafiği çizilerek belirlenebilmektedir. Zamanla biyosensör duyarlılığındaki değişimin belirlenebilmesi için genellikle hergün kalibrasyon yapılması gerekmektedir.

### **3.1.7.2 Kararlılık**

Bir enzim elektrodunun kararlılığı, diğer faktörlerde yeterli koşullar sağlandıktan sonra onun pratik kullanılabilirliğinin en önemli belirteçlerinden biridir. Kararlılık biyosensör ömrünün uzunluğu hakkında bilgi verir. Uzun ömür aynı materyal ile çok sayıda analizin yapılabileceğini ifade eder, buda maliyet ve işgücü açısından büyük avantaj sağlar. Biyolojik materyal açısından enzim sensörünün kararlılığı incelendiğinde enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi gibi parametreler büyük önem taşır. Genelde fiziksel immobilizasyon yöntemlerinin kullanılması durumunda biyosensör ömrü kimyasal yöntemlere göre daha kısadır. Çalışma koşulları açısından bakıldığında, analiz için yeterli koşulları sağlıyorsa, nispeten düşük sıcaklıklarda çalışmak biyosensör ömrünü uzatır.

### **3.1.7.3 Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı**

Kalibrasyon grafiğinde substrat konsantrasyonu ile sensör cevabı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu konsantrasyon 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 zemin ekstrapolasyon ile kesiştiği nokta olarak tanımlanır.

Potansiyometrik enzim sensörlerinde kalibrasyon grafiği substrat (ya da ürün) konsantrasyonunun logaritması ile potansiyel arasında çizilir. Genelde tayin sınırının  $10^{-5}$  M 'dan daha düşük bir değer olmasının önemi vurgulanır.

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.

Bunun yanısıra biyosensör cevabını etkileyen parametreler, doğrudan sensör kalibrasyonunu da etkilemektedir. Örnek olarak enzim sensörleri incelendiğinde başlıca pH, sıcaklık ve girişimcilerin sensör cevabını etkileyerek tayin aralığını değiştirebilirler.



#### **3.1.7.4 Cevap Süresi**

Cevap süresi, biyosensörün, analizlenecek maddenin bulunduğu ortama temas ettiği andan itibaren ölçüm düzeneğinden sonucun okunduğu ana kadar geçen süredir. Biyosensörlerin büyük bir hızla yaygınlaşmasının en önemli nedenlerinden biri, ideal bir biyosensörün de temel niteliklerinden olan pratik bir işlemlerle kısa sürede sonuç verebilmesidir. Çok sayıda örneğin sözkonusu olduğu rutin analizlerde mümkün olan en az ön işlemlerle en kısa sürede elde edilen sonuç büyük önem taşır.

Biyosensörler için cevap zamanı 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.

#### **3.1.7.5 Seçicilik**

İdeal bir biyosensörün sadece hedef analitin derişimindeki değişikliklere cevap vermesi ve diğer türlerin varlığından etkilenmemesi gerekir. Enzimatik reaksiyonun substrat ve ürünleri ile girişim yapan maddelerin bulunması durumunda sensör sinyali etkilenerek hedef analitin derişimi yanlış tayin edilir. Bu problem girişim yapan maddelerin bir ön işlem ile uzaklaştırılması veya bunlardan etkilenmeyen bir sensör kullanılması ile giderilebilir.

#### **3.1.7.6 Tekrarlanabilirlik**

Enzim sensörlerinde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesinde kullanılan enzimin aktivitesi, kararlılığı ve saflık düzeyi büyük önem taşır. Ancak karakteristik özellikleri çok iyi bilinen enzim preparatlarının kullanılması durumunda bile sensör hazırlama aşamaları ve çalışma ortam ve koşulları açısından beklenen niteliklerde büyük farklanmalar gözlenebilir. Bu nedenle hazırlanan sensörle tekrarlanabilirlik denemelerinin gerçekleştirilmesi bir zorunluluktur.

#### **3.1.7.7 Sıcaklık**

Enzim katalizli reaksiyonların hızları sıcaklığa çok duyarlıdır. Enzimin optimum sıcaklığından uzaklaşılması durumunda özellikle termal kararlılığı düşük olan enzimlerin tersinmez denaturasyonuna neden olarak sensör cevabını olumsuz yönde etkiler.

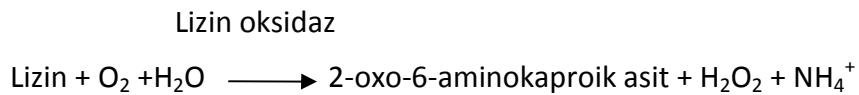
### 3.1.7.8 Tıbbi Uygulamalarda Kullanılacak Biyosensörler İçin Biyouyumluluk

Hastalık tedavisinde veya biyosensörün insan vücuduna uzun süreli implantasyonlarında önem kazanmaktadır. Biyosensörün bulunduğu biyolojik elementlerin aktivitesini etkilememesi gerekmektedir.

## 3.2 Lizin Tayininde Kullanılan Materyallere Genel Bakış

### 3.2.1 Lizin Oksidaz

L-lizin oksidaz (E.C 1.4.3.14) enzimi kofaktörü FAD olan, oksidoreduktaz sınıfında yer alan, bu sınıfta özellikle CH-NH<sub>2</sub> grup donorü ve oksijen akseptörü olan sınıfa aittir. Diğer yaygın olarak kullanılan isimleri L-lizin α- oksidaz ve L-lizil α- oksidaz'dır. Enzim aşağıda reaksiyonda görüldüğü gibi lizinin degradasyonunda yer alır.



Bu çalışmada kullanılan L-lizin α-oksidad enzimi ticari olarak mevcut olan bir enzim olup Sigma'dan temin edilmiştir. *Trichoderma viride*'den elde edilen enzim iki özdeş altbirim içeren bir dimerdir ve yaklaşık molekül ağırlığı 56 kDa'dur. Enzim her bir altbirime bağlı 1 mol FAD içermektedir ve bu prostetik flavin grubu asidik koşullarda proteinden ayrılmaktadır. Proteinin ikincil yapısı %13 α heliks ve %33 β-plakaları içerir[31]. Enzim, L-ornitin, L-fenilalanin, L-arginin, L-histidin ve L-tirozin üzerinde de yavaşta olsa reaksiyon gösterir. Enzimin Km değerleri substrat olarak L-lizine karşı 0.04 mM, L-ornitine karşı 0.44 mM ve L-fenilalanine karşı 14 mM'dır [32].

L-lizin oksidaz enzimi *Trichoderma viride*'den yeni antitümör ajan arayışları sırasında bulunmuştur, Kusakabe ve arkadaşları tarafından izole edilen enzim saflaştırılarak karakterize edilmiş ve enzimin antineoplastik aktivite gösterdiğine dair kanıtlar sunulmuştur. Farklı kaynaklardan pek çok L-amino asit oksidazlar L-lizin üzerinde aktivite gösterirler. *T.viridie*'den elde edilen enzim spesifik olarak lizinin α-oksidadyonunu katalizler. Bu anlamda tektir ve bu nedenle L-Lizin α-oksidad olarak isimlendirilir [37].

Enzimin izoelektrik noktası pH 4.35 olarak tespit edilmiştir, p-kloromerküribenzoat ve HgCl<sub>2</sub> enzimi inhibe eder fakat D-lizin ve diğer maddelerin çok hafif veya inhibisyon etkisi yoktur. Enzimin aminoasit kompozisyonu belirlenmiştir. Substrat spesifikliğı çalışılmıştır, relatif aktivite oksijen elektrodu ile tayin edilmiştir, Çizelge 3.5'te relatif aktivite bilgileri sunulmuştur;

Çizelge 3.5 Lizin oksidaz'ın yaklaşık aktivite değerleri

Substrat	Yaklaşık aktivite (%)
L-Lizin	100.0
L-Ornitin	18.2
L-Fenilalanin	8.3
L-Arjinin	6.1
L-Tirozin	5.5
L-Histidin	3.8
Dihidroksi-L-fenilalanin	2.5
DL-p-Nitrofenilalanin	2.8
DL-Homolizin	31.1
δ-Hidroksi-L-Lizin	37.1
L-Lizin hidroksiamat	62.1
S-(β-Aminoetil)-L-sistein	9.8
S-(β-Aminoetil)-L-homosistein	34.8
S-(β-4-Piridiletıl)-L-sistein	2.7

*Trichoderma viride*'den elde edilen ve saflaştırılan enzim karakterize edilmiştir. Enzimatik aktivitenin değişik tamponlarda pH etkisi çalışılmış, maksimum aktiviteyi pH 7.4-9.2 arasında vermiştir, tampon tipi aktiviteyi etkilememiştir. 30-70 °C sıcaklıkları arasında enzim aktivitesi ölçülmüş, bağıl aktivite 30 °C'de %82, 37 °C'de %100, 50 °C'de %103, 70 °C'de %58 olarak bulunmuştur [37].

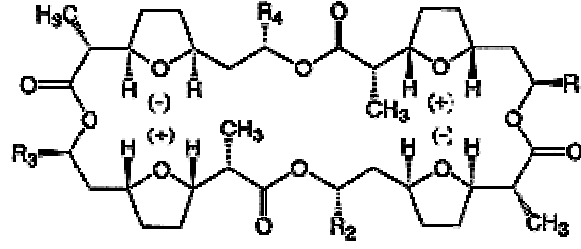
Lukasheva ve Berezov (2002) tarafından *Trichoderma harzianum Rifai*'den izole ettikleri L-lizin α-oksidad enziminin fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri çalışılmıştır ve *Trichoderma viride*'den izole edilen lizin oksidad enzimi ile kıyaslanmıştır. Enzim reaksiyonu sonucu esansiyel aminoasit L-lizin seviyesinin azalışı ve hidrojen peroksidin

oluşumu, L-lizin  $\alpha$ -oksidaz enzimin sitotoksik, antitumor, antimetastik, antiinvasif, antiviral aktivite ve immunomodulator etkisi gibi özelliklerinin açıklaması olarak belirtilmiştir. Doğal L-lizin  $\alpha$ -oksidaz ve immobilize formları değişik biyolojik materyallerde L-lizin konsantrasyonu tayininde kullanılabilir. Her iki kaynaktan elde edilen enzim amino asit dizilimi, proteinlerin sekonder ve tersiyer yapıları, optimum pH'sı gibi özelliklerinde farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir [38].

Lizin oksidaz bakteri, maya ve fungusları içeren mikroorganizmalarda geniş bir dağılım gösterir. *Trichoderma* türü funguslarda L-lizin  $\alpha$ -oksidaz (EC.1.4.3.14) denilen bu oksidoredüktaz enzim *in vivo* olarak düşük terapötik dozlarda antitumor aktivite gösterir, L-lizinin katabolik yıkımını başlatır. L-lizinin basit, hassas ve spesifik olarak tayininde kullanılır. Özellikle gıdalarda ve içeceklerde lizin içeriğinin tayininde, lizinürea ve hiperlisenemiada tanı amaçlı kullanılabilir. Enzimin hiperlisenemiada terapötik ilaç olarak kullanımı beklenmektedir. Ayrıca hiperlisenemia hastaları için düşük-lizin içerikli gıda hazırlanmasında kullanılabilir [39].

### 3.2.2 Nonaktin

Günümüzde valinomisin ve makrotetrolit grubu antibiyotikler sırasıyla  $K^+$  ve  $NH_4^+$  katyonları için en uygun nötral kompleksleştirici ligandlardır. Kompleksleştirici molekül, çok dişli bir ligand olmalı ve içinde oyuk bulunduran kararlı bir yapıya sahip olmalıdır. Oyuk, katyonu içine almaya uygundur. Katyonlar için polar koordinasyon grupları, ligand atomu olarak tercihen oksijen içermelidir. Nonaktin,  $NH_4^+$  katyonu için en uygun ligandtır, aktinomiset kültürlerinden elde edilir. Şekil 3.5'te nonaktinin kimyasal yapısı verilmektedir.



**Nonactin (NON):**  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{CH}_3$   
**Monactin:**  $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3, R_2 = R_3 = R_4 = \text{CH}_3$   
**Diractin:**  $R_1 = R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_3, R_2 = R_4 = \text{CH}_3$   
**Trinactin:**  $R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_3, R_4 = \text{CH}_3$   
**Tetranactin:**  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{CH}_2\text{CH}_3$

Şekil 3.5 Nonaktin kimyasal yapısı

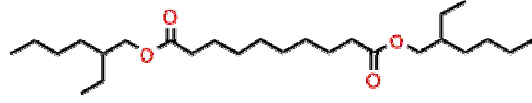
Nonaktinin dört eter oksijeni amonyum iyonu ile hidrojen bağı oluştururken, dört karbonil oksijeni katyonu dipol interaksiyonu ile kararlı hale getirir. Nonaktin son zamanlarda amonyum gibi katyonların mikromolar seviyesinde tayini için ticari iyon seçici elektrotlarda iyonofor olarak kullanılmaktadır. Böyle iyon-seçici sensörler, biyolojik örneklerde üre ve kreatin konsantrasyonlarının indirekt olarak ölçülmesinde faydalıdır [34].

### 3.2.3 Palmitik Asit

Palmitik asit (hekzadekanoik asit) bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan doymuş yağ asitlerinden biridir. Molekül formülü  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$  olan beyaz katı görünümündedir. Adından da anlaşılacağı gibi palmiye yağında bulunur ancak tereyağı, peynir, süt ve ette de bulunmaktadır. Palmitik asit türevleri II. Dünya Savaşı'nda napalm üretiminde kullanılmıştır.

### 3.2.4 Dioktil Sebakat (DOS)

Dioktil sebakat (DOS) renksiz veya açık sarı renkte ve özel bir kokuya sahip yağimsı bir sıvıdır. Hidrokarbon, alkol, ester tipi, eter, benzen ve diğer organik çözücülerde çözünür. Az buharlaşan ve plastikleştirme hızı yüksek olan DOS, soğuğa ve ışığa karşı dayanıklılık gösterir. Genellikle PVC, kloroetilen kopolimeri, nitroselüloz (NC), etil selüloz ve sentetik kauçuk gibi maddelerde de plastikleştirici madde olarak kullanılır. Özellikle soğuğa karşı dirençli kabloların, cilt bezinin, ince film, şerit materyalleri v.b. yapımında kullanılmaktadır. Yapısal formülü Şekil 3.6'te verildiği gibidir.



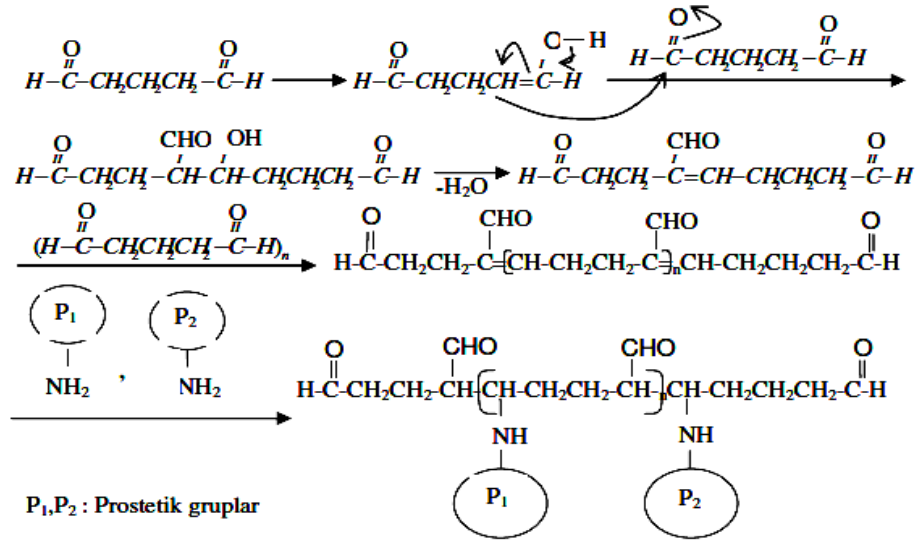
Şekil 3.6 Dioktil sebakat kimyasal yapısı

### 3.2.5 Glutaraldehit

Glutaraldehit, özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan bifonksiyonel bir reaktiftir. Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan biyoaktif materyallerin (enzim, hücre, doku v.b.) jelatin, kollajen, kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehit ile çapraz bağ oluşturması esasına dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça sık kullanılmaktadır. Yöntem kolay uygulanabilir olması yanında immobilize sistemin termal, operasyonel ve depo kararlılığını artırması bakımından tercih edilmektedir. Glutaraldehidin kimyasal yapısı aşağıda Şekil 3.7’te verilmektedir. Glutaraldehit ile çapraz bağlama reaksiyonu Şekil 3.8’de verilmektedir.



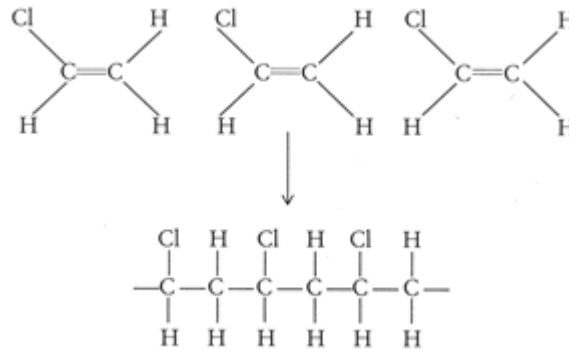
Şekil 3.7 Glutaraldehit kimyasal yapısı



Şekil 3.8 Glutaraldehit çapraz bağlama reaksiyonu

### 3.2.6 Poli(vinil klorür) (PVC)

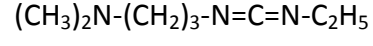
İyonoforlar ile birlikte poli(vinil klorür) (PVC) 'nin kullanımı biyosensörlerin cevap süresinin daha kısa olması, tekrarlanabilirliğinin iyi olması ve tasarımının kolay olması gibi avantajlar sağlamaktadır. Genellikle enzimler PVC iyon-seçici membranlara glutaraldehit çapraz bağlama reaksiyonları ile immobilize edilirler. Fakat PVC membranın hidrofobik yüzeyine enzimin immobilize edilmesi zordur. PVC membranda fonksiyonlu gruplar oluşturularak daha etkili enzim immobilizasyonu gerçekleştirilebilir. Poli(vinil klorür) PVC kimyasal yapısı aşağıda Şekil 3.9'da verilmektedir.



Şekil 3.9 Poli(vinil klorür) kimyasal yapısı

### 3.2.7 1-etil—3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC)

Formülü aşağıda verilen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid, çalışmada poli(vinilklorür) membranı aktiveştirmek amaçlı kullanılmıştır. EDC'nin kimyasal yapısı Şekil 3.10'da aşağıda verilmektedir.



Şekil 3.10 EDC kimyasal yapısı



### MATERYAL VE METOD

#### 4.1 Kullanılan Cihazlar

Çözeltilerin potansiyel ölçümleri Thermoscientific ORION 4 STAR iyonmetre, pH ölçümleri pH-ISE Benchtop ile yapıldı. Referans elektrot olarak çift temaslı gümüş-gümüş klorür elektrot kullanıldı (Orion 90-02). Bu elektroda iç dolgu çözeltisi olarak ORION 900002 ve 900003 katalog numaralı çözeltiler dolduruldu. Çözelti ilaveleri için Brand marka mikro pipetler kullanıldı. Bu çalışmada kullanılan bidestile su PURELAB Classic cihazı kullanılarak temin edildi.

#### 4.2 Kullanılan Enzim

Bu çalışmada ticari olarak mevcut olan 25U L-lizin oksidaz (E.C. 1.4.3.14) *Trichoderma viride* (Sigma) enzimi kullanıldı.

#### 4.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler

L-lizin monohidroklorür ve tetrahidrofuran (THF) Merck'den, kalibrasyon için kullanılan amonyum klorür, amonyum seçici membran oluşturmak için kullanılan poli(vinilklorür) (PVC) Fluka'dan, Trizma HCl ve Trizma baz, nonaktin, bis-(2-etil)hekzil sebakat (DOS), palmitik asit, glutaraldehit çözeltisi (25% a/a) ve 1-etil-3,3-dimetilaminopropil karbodiimid (EDC) Sigma'dan temin edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan askorbik asit ve 14 amino asit Sigma'dan temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan amino asitlere ait bilgiler Çizelge 4.1’de verilmektedir;

Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan aminoasitler

Aminoasidin Adı	Ürün kodu	Firması	Formülü	Molekül ağırlığı (g/mol)
Glisin	12109032	SIGMA	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75,07
L-serin	11309065	SIGMA	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	105,09
L-arginin	41409175	SIGMA	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	174,2
L-askorbik asit	1000528198	SIGMA	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	176,12
L-sistein	W813876	SIGMA	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	121,16
L-valin	41209252	SIGMA	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	117,15
L-lizinhidroklorür	62930	SIGMA	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .HCl	182,65
L-alanin	21509098	SIGMA	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	89,09
L-histidin	52309019	SIGMA	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	155,15
L-metiyonin	WA18354	SIGMA	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	149,21
L-glutamik asit	11509104	SIGMA	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub>	147,13
Triptofan	T8941	SIGMA	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	204.23
L-Fenilalanin	P2126	SIGMA	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	165.19
L-Aspartik asit	A93100	SIGMA	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	133.10
L-İzoleusin	58879	SIGMA	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131.18
L-Prolin	31309046	SIGMA	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	115.13
L-Leusin	31109065	SIGMA	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131.17
L-glutamin	EC200.292.1	SIGMA	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	146,15

Tez çalışmasında Solgar firması tarafından üretilen L-lizin tablet ve kapsül kullanılmıştır. Lizin tablet (Solgar), her bir tablette 1000 mg L-lizin HCl ve 5 mg sodyum içerir. Lizin kapsül (Solgar) 75 mg lizin ve 75'er mg histidin, izoleusin, metionin, fenilalanin, treonin ve valin içermektedir.

#### **4.4 Kullanılan Çözeltiler**

##### **4.4.1 Tris Tampon Çözeltisi**

Trizma baz çözeltisi: 6.055 g Trizma baz suda çözülerek 500 mL'ye tamamlanarak 0.1 M'lık stok çözeltisi hazırlandı.

Trizma-HCl çözeltisi: 7.880 g Trizma-HCl suda çözülerek hacmi 500 mL'ye tamamlanarak, 0.1 M'lık stok çözeltisi hazırlandı.

Hazırlanan stok çözeltilerden belli oranlarda karıştırılarak pH 7.5'e ayarlandı. Tampon çözeltileri kullanılmadığı zaman buzdolabında saklandı.

##### **4.4.2 Amonyum Klorür Çözeltileri**

Stok Amonyum Klorür Çözeltisi: 1.0M standart amonyum klorür çözeltisi kullanılarak,  $1.0 \times 10^{-1}$ - $1.0 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında stok amonyum klorür çözeltileri hazırlandı. Elde edilen amonyum klorür çözeltilerinde Tris tampon konsantrasyonu 0.01 M, çözeltilerin pH'ı 7.5'e, Trizma baz veya Trizma-HCl kullanılarak ayarlandı.

Amonyum klorür çözeltileri kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi için kullanıldı.

##### **4.4.3 Lizin Çözeltileri**

Stok Lizin Hidroklorür Çözeltisi: 1.0 M stok lizin çözeltisi hazırlamak için, 4.566 g lizin hidroklorür tartılarak bir miktar suda çözüldü, hacim 25.0 mL'ye su ile tamamlandı.

Hazırlanan 1.0 M stok lizin çözeltisi kullanılarak  $1.0 \times 10^{-1}$ - $1.0 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında stok lizin çözeltileri hazırlandı. Elde edilen lizin çözeltilerinde Tris tampon konsantrasyonu 0.01 M, çözeltilerin pH'ı 7.5'e, Trizma baz veya Trizma-HCl kullanılarak ayarlandı. Lizin çözeltileri kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi için kullanıldı.

#### 4.4.4 Çalışma Elektrodu İç Dolgu Çözeltisi

Amonyum, lizin tayini için hazırlanan çalışma elektrodu iç dolgu çözeltisi olarak, bölüm 3.4.2’de belirtildiği gibi hazırlanan  $1.0 \times 10^{-2}$  M amonyum klorür (pH 7.5) çözeltisi kullanıldı.

#### 4.4.5 L-lizin Kapsül ve Tabletinde (Solgar) Lizinin Tayini için Hazırlanan Lizin ve Numune Çözeltileri

L-lizin biyosensörü yardımıyla L-lizin tablet ve kapsüllerde lizin tayini için girişim etkisini görmek amaçlı farklı konsantrasyonlarda  $1.0 \times 10^{-1}$  M -  $1.0 \times 10^{-4}$  M aralığında lizin içerecek şekilde tablet ve kapsül numuneleri tartıldı, distile suda çözüldü ve 0.45 mikron filtreden süzüldü, aynı konsantrasyonda lizin içeren kalibrasyon çözeltileri 0.1 M Tris (pH7.5) tampon kullanılarak hazırlandı.

#### 4.5 Amonyum-Seçici Elektrot

Palmitik asit içeren PVC kullanılarak hazırlanan amonyum-seçici membran bileşimi Çizelge 4.2’de aşağıda verilmektedir:

Çizelge 4.2 Palmitik asit içeren PVC kullanılarak hazırlanan amonyum-seçici membran bileşimi

Membran Bileşenleri	%	Kütle, mg
PVC	30.0	118.0
Palmitik asit	3.0	13.6
Nonaktin	3.0	12.6
Bis-(2-etil)hekzil sebakat (DOS)	64.0	255.8
Tetrahidrofuran (THF)		5 mL

Toplam 400 mg civarındaki membran bileşenleri 5 mL THF’de çözüldü, 45 mm’lik cam halkaya dökülüp 24 saat THF’nin uzaklaşması için bekletildi. Oluşan membran 5 mm çapında yuvarlak diskler kesilerek cam bir tüpün ucuna O-ring yardımıyla monte edildi.

Bu tüpün içerisine dolgu çözeltisi olarak  $1.0 \times 10^{-2}$  M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH 7.5) dolduruldu ve içine AgCl ile kaplanmış gümüş-gümüş klorür referans elektrot kullanılarak oluşturulan elektrokimyasal hücrenin şeması aşağıda verilmektedir:

***Referans elektrot/deney çözeltisi/membran/ $1.0 \times 10^{-2}$  M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH 7.5)/Ag;AgCl***

Elektrodlar deney çözeltisine 1.5 cm kadar daldırıldı ve çözelti manyetik karıştırıcı ile ölçüm süresince karıştırıldı. Kararlı potansiyel değerleri elde edildikten sonra mV değerleri okundu. Tüm deneysel çalışmalar  $25.0 \pm 1.0$  °C 'de yapıldı.

## **4.6 Lizin Biyosensörü**

### **4.6.1 Lizin Biyosensörünün Hazırlanması**

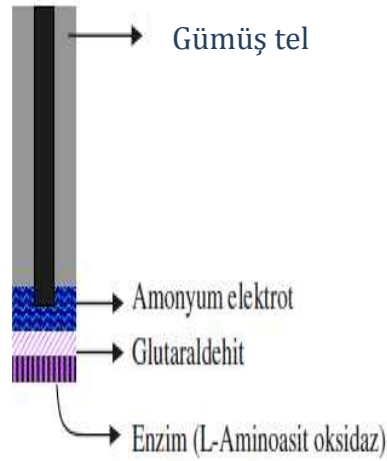
Bölüm 3.5'te belirtildiği şekilde hazırlanan amonyum elektrot membranına ticari Lizin oksidaz enzimi immobilize edilerek, lizin biyosensörü hazırlandı. Bu amaçla yapılan immobilizasyon işlem basamakları aşağıda verilmiştir;

**İşlem A:** 4.4 mg Lizin oksidaz (25U) 1.0 mL bidestile suda çözüldü. Bu enzim çözeltisinden 100 µl alındı ve 0.5 mg karbodiimid ilave edilerek çözüldü. Bu zeltiden 10 µl alınarak membran yüzeyine kondu ve suyun uzaklaşması için bir gece buzdolabında bekletildi.

**İşlem B:** İşlem A'da hazırlanan elektrot membranına %2.5'luk glutaraldehit çözeltisinden 10 µl uygulanarak 30 dakika bekletildi. Daha sonra elektrot yüzeyi bidestile su ile yıkanarak glutaraldehitin aşırısı uzaklaştırıldı.

**İşlem C:** İşlem B'de hazırlanan elektrot membranına 10 µl lizin oksidaz çözeltisi (4.4 mg lizin oksidaz / mL bidestile su) konuldu ve bir gece buzdolabında bekletildi.

Hazırlanan biyosensör kullanılmadığı zaman buzdolabında bekletildi. Lizin oksidaz biyosensör şekil 4.1'de verilmektedir.



Şekil 4.1 Lizin oksidaz biyosensörü

#### 4.6.2 Lizin Biyosensörünün Çalışma Aralıklarının ve Eğimlerinin Belirlenmesi

Hazırlanan lizin biyosensörünün analitik özelliklerini incelemek amacı ile, aşağıda şeması verilen elektrokimyasal hücre oluşturuldu ve çalışmalar  $25.0 \pm 1.0$  °C 'de yapıldı.

***Referans elektrot/lizin çözeltisi/membran/ $1.0 \times 10^{-2}$  M  $NH_4Cl$  (pH 7.5)/Ag;AgCl***

Elektrokimyasal hücredeki lizin çözeltilerinin konsantrasyonları  $1.0 \times 10^{-1}$ - $1.0 \times 10^{-5}$  M arasında değiştirildi. Lizin çözeltilerinin pH'ları Trizma baz ile pH 7.5'e ayarlandı ve elektrot için hücre potansiyeli kaydedildi. Log [lizin]'e karşı potansiyel değerleri (mV) grafiğe geçirildi ve biyosensörün doğrusal çalışma aralığı ve eğimi belirlendi.

#### 4.7 Lizin Biyosensörünün Amonyuma ve Lizine Cevabının Belirlenmesi

##### 4.7.1 Lizin Biyosensörünün Amonyuma Cevabının Belirlenmesi

Hazırlanan lizin biyosensörünün amonyuma duyarlı olup olmadığını anlamak için, amonyum klorür kalibrasyon çözeltilerinin potansiyelleri okunarak kalibrasyon grafikleri çizildi.

#### **4.7.2 Lizin Biyosensörünün Lizine Cevabının Belirlenmesi**

Hazırlanan lizin biyosensörünün lizine duyarlı olup olmadığını anlamak için, 4.4.3’de belirtildiği şekilde hazırlanan lizin çözeltilerinin potansiyelleri okunarak kalibrasyon grafikleri çizildi.

#### **4.8 Lizin Biyosensörünün Performansına Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi**

Lizin biyosensör cevabı üzerine tampon konsantrasyonu, pH etkisi, sıcaklık, amino asit girişim etkisi performansa etki eden parametreler olarak çalışıldı, cevap süresi ve raf ömrü tayinleri yapıldı.

#### **4.9 Lizin Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği**

Tekrarlanabilirlik karakterize edici bir parametredir. Enzim preparatının aktivitesi, kararlılığı, saflık düzeyi hazırlanacak enzim sensörü ile tekrarlanabilir sonuçlar alınması önemlidir. Ancak biyosensör hazırlama aşamaları ve çalışma ortamı açısından beklenen niteliklerde oldukça büyük farklılıklar gözlenebilir. Hazırlanan bir biyosensör ile tekrarlanabilirlik denemelerinin en basiti aynı örnekte peşpeşe ölçüm yapılması ve elde edilen değerlerden standart sapma ve korelasyon katsayısının hesaplanmasıdır.

Aynı gün içerisinde aynı biyosensör ile hazırlanan lizin kalibrasyon çözeltileri ile saatte bir, 15 defa ölçüm alınarak kalibrasyon grafikleri çizildi ve her bir grafiğin eğimi belirlendi.

#### **4.10 Lizin Biyosensörü ile L-Lizin Kapsül ve Tabletinde (Solgar) Lizin Tayini**

Hazırlanan lizin biyosensörü ile Solgar firması tarafından üretilen L-lizin tablet ve kapsül kullanılarak lizin tayini yapıldı ve bulunan değerler ilaçların etiket değerleri ile kıyaslandı.

### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

#### 5.1 Lizin Oksidaz Biyosensörleri

Lizin tayini öncelikle besin kalitesinin belirlenmesi, klinik teşhis amaçlı ve besin takviyelerinde lizin içeriğinin belirlenmesi açısından oldukça önem taşımaktadır. Lizin tayini çeşitli kromatografik yöntemler, standart amino asit tayin yöntemi, spektrofotometrik ve flurometrik yöntemlerle yapılmasına rağmen, bu yöntemlerde kullanılan ekipmanların pahalı olması, uzun ön işleme numune hazırlığına ihtiyaç duyulması, tayin süresinin uzun olması gibi pek çok dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle lizinin daha ucuz, kolay, taşınabilir ve yerinde analizini kısa sürede yapabilecek yeni bir tayin yöntemine ihtiyaç duyulmakta olduğu düşünülerek, poli (vinil klorür), uzun zincirli yağ asidi olan palmitik asit, nonaktin ve bis-2-etil heksil sebakatın kullanılarak hazırlandığı amonyum-seçici membran yüzeyine lizin oksidaz enziminin çeşitli yöntemlerle immobilize edilmesi ile amonyum-seçici potansiyometrik lizin biyosensör hazırlanması amaçlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan amonyum-seçici biyosensör daha önce laboratuvarımızda geliştirilmiş [40], [41], [42], [43], [44] ve karakterize edilmiştir. Elde edilen amonyum-seçici biyosensörün  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  M amonyum iyonu konsantrasyon aralığında Nernstian cevabı (52-58 mV/p[NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]) vermektedir, tayin alt limiti amonyum için  $10^{-6}$  M 'dır. Palmitik asit içeren bu membran, karboksillenmiş PVC membran ile karşılaştırılmış ve daha efektif bir performans gösterdiği kanıtlanmıştır. Bu çalışmamızda amonyum tayini için üstünlüğü kanıtlanmış bu elektrot üzerine lizin oksidaz enzimi immobilize edilip lizin biyosensörü hazırlanması amaçlandı. Bu çalışmada kullanılan lizin oksidaz temelli potansiyometrik lizin biyosensörü hazırlanarak



lizinin tayini, basit olması ve kullanılan ekipmanların ucuz olması nedeniyle analitik yönden oldukça caziptir.

Lizin oksidaz enzimi lizinin 2-oxo-6-aminokaproik asit'e dönüşmesini katalizleyen bir enzimdir. Reaksiyon sonucu oluşan amonyum iyonu elektroaktif bir tür olduğu için hazırladığımız amonyum-seçici potansiyometrik lizin biyosensörü ile kolaylıkla tayin edilebilmektedir, oluşan amonyum miktarından lizin miktarı hesaplanmaktadır.

Azot içeren maddelerin enzimatik reaksiyonları, uygun bir elektrot ile enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan amonyum iyonunun tayininden potansiyometrik olarak izlenebilir.

Tez çalışmamızda lizin biyosensörü iki aşamada hazırlanmıştır:

- 1.Aşama: Amonyum-iyon seçici elektrodun hazırlanması
2. Aşama: Hazırlanmış olduğumuz amonyum-iyon seçici elektrodun membranına lizin oksidaz enziminin immobilize edilmesi ile lizin biyosensörünün hazırlanması

Çalışmamızda enzim miktarının ve immobilizasyon şartlarının optimum şekilde belirlenmesi için gerekli şartlar ayarlanarak çalışmalar yapılmıştır. Lizin oksidaz enziminin immobilizasyonu, daha önce laboratuvarımızda optimum şartları amonyum için belirlenmiş biyosensör kullanılarak yapılmıştır [40]. Elektrodun hazırlanması bölüm 4.6.1'de biyosensör hazırlanması kısmında verilmiştir.

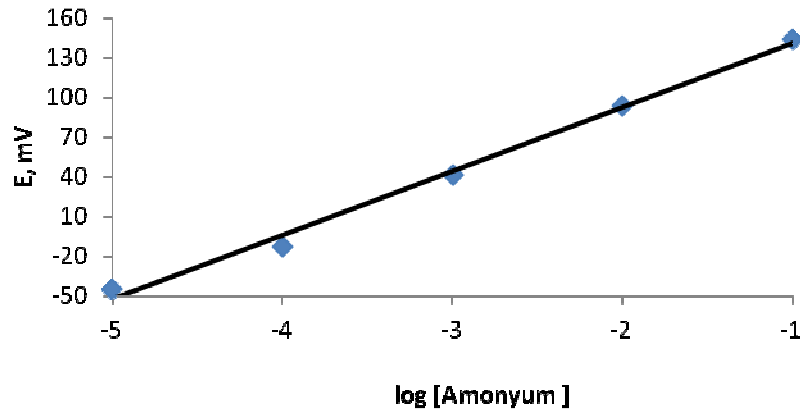
### **5.1.1 Lizin Biyosensörünün Amonyuma Cevabı**

Amonyuma duyarlılığı iyi olduğu belirlenen PVC ve uzun zincirli bir yağ asidi olan palmitik asit içeren membran yüzeyine lizin oksidaz enziminin immobilize edilmesi ile hazırlanan lizin biyosensörünün öncelikle amonyuma duyarlı olup olmadığını anlamak için hazırlanan  $1.0 \times 10^{-1}$ – $1.0 \times 10^{-5}$ M amonyum klorür kalibrasyon çözeltilerinde potansiyel ölçümü yapılarak kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 5.1). Kalibrasyon grafiklerinden amonyum iyonu için doğrusal çalışma aralığı ve elektrotların eğimleri hesaplandı ve Çizelge 5.1'de verildi.

Çizelge 5.1 Lizin oksidaz biyosensörünün amonyum iyonu için doğrusal çalışma aralığı ve elektrodun eğimi

Eğim, (mV/p[amonyum]) $\pm$ s	Çalışma aralığı
48.36 $\pm$ 3.46	1.0 $\times$ 10 <sup>-1</sup> -1.0 $\times$ 10 <sup>-5</sup> M

s: Standart sapma



Şekil 5.1 Lizin biyosensörünün amonyuma cevabı

Kalibrasyon grafiğinden amonyum iyonu için doğrusal çalışma aralığı ve elektrodun eğimi sırasıyla 1.0 $\times$ 10<sup>-1</sup> – 1.0 $\times$ 10<sup>-5</sup>M ve 48.36 $\pm$  3.46 mV/log[NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] olarak belirlendi. Lizin biyosensörünün amonyum-seçici PVC membranının, lizin oksidaz enzimi immobilize edilmesinden sonra da amonyuma duyarlılığının iyi olduğu, lizin tayininde enzimatik reaksiyon sonucu oluşan amonyum iyonunun tayininde rahatlıkla kullanılabileceği düşünülmüştür. Amonyum için tayin limiti 10<sup>-6</sup> M'dır.

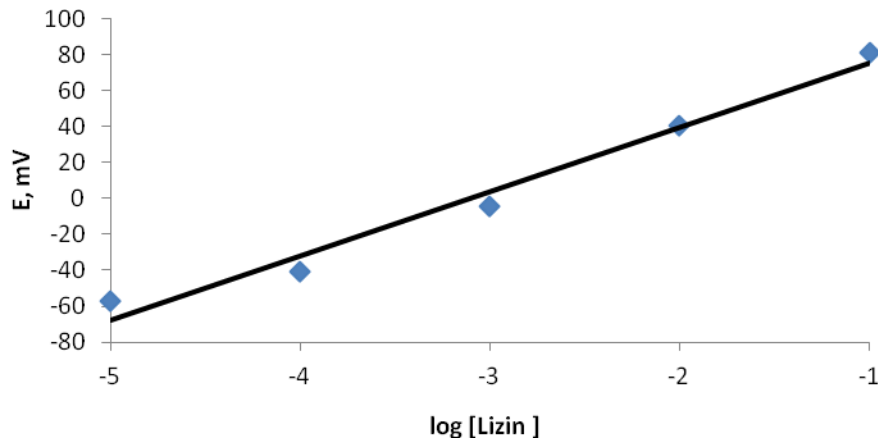
## 5.2 Lizin Biyosensörünün Lizine Cevabı

Amonyum duyarlılığı iyi olduğu anlaşılan lizin biyosensörünün lizine karşı cevabını belirlemek amacıyla kalibrasyon grafiği çizilmesi gerekir. 10 mM Tris tamponunda (pH 7.5) hazırlanan  $1.0 \times 10^{-1}$  M'dan  $1.0 \times 10^{-5}$  M'a kadar 5 farklı konsantrasyonda lizin kalibrasyon çözeltilerinde lizin biyosensörü ile mV okumaları yapılarak lizin biyosensörünün lizine karşı kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 5.2). Kalibrasyon grafiklerinden lizin için doğrusal çalışma aralığı ve elektrotların eğimleri hesaplandı ve Çizelge 5.2'de verildi.

Çizelge 5.2 Lizin oksidaz biyosensörünün lizin için doğrusal çalışma aralığı ve elektrodun eğimi

Eğim, (mV/p[lizin]) $\pm$ s	Çalışma aralığı
35.83 $\pm$ 1.4	$1.0 \times 10^{-1}$ - $1.0 \times 10^{-5}$ M

s: Standart sapma



Şekil 5.2 Lizin biyosensörü kalibrasyon grafiği

Kalibrasyon grafiğinden lizin için doğrusal çalışma aralığı ve elektrodun eğimi sırasıyla  $1.0 \times 10^{-1} - 1.0 \times 10^{-5}$  M ve  $35.83 \pm 1,4$  mV/log[lizin] olarak belirlendi. Lizin için tayin limit  $10^{-6}$  M'dir.

Dempsey ve arkadaşları (1992), lizin dekarboksilaz enzimi kullanarak hazırladıkları amperometrik lizin biyosensörünün lineer çalışma aralığını  $7 \times 10^{-8} - 7 \times 10^{-4}$  M olarak bulmuşlardır [15]. Lizin oksidazın kullanıldığı diğer biyosensörlerde bu değerler 0.2 mM -4mM [13], 1-16 mM [14],  $6.7 \times 10^{-6} - 6.7 \times 10^{-4}$  M [17], 10-1000  $\mu$ M [18],  $1.0 \times 10^{-5} - 1.6 \times 10^{-4}$  M [20],  $1.0 \times 10^{-5} - 1.0 \times 10^{-3}$  M [21], lizin oksidazın kullanıldığı potansiyometrik esaslı diğer bir biyosensör için ise  $3 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$  M olarak bulunmuştur [11]. Bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda bu tez çalışmasında lizin oksidazın PVC-amonyum-seçici elektrodun membranına immobilize edilmesi ile hazırlanan lizin biyosensörünün lineer çalışma aralığının çok daha geniş aralıkta olması ve yüksek eğimde olması, biyosensörün farmasötik ve diğer örneklerde lizin tayininde kullanılabileceği düşünülebilir.

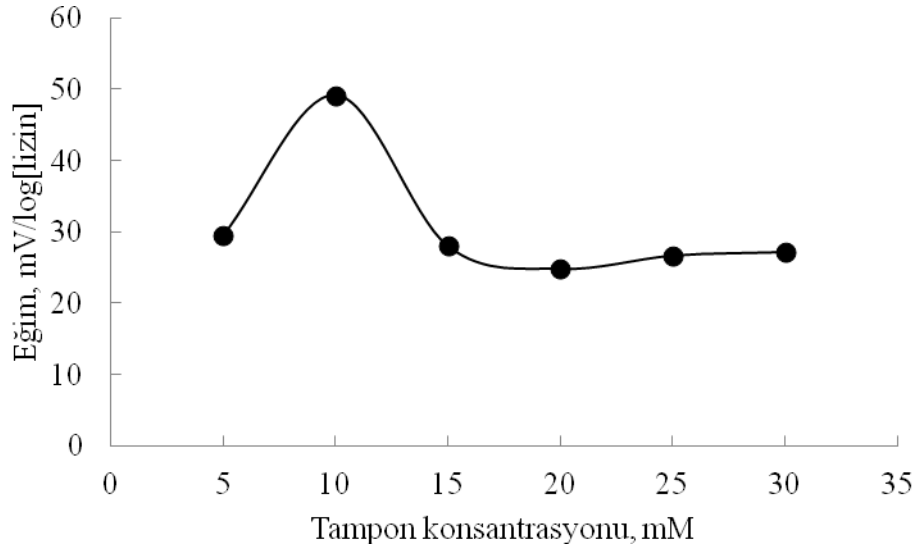
### 5.3 Tampon Konsantrasyonu Etkisi

Lizin biyosensörünün performansına tampon konsantrasyonunun etkisini incelemek için, 6 farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 mM) Tris tamponu kullanılarak hazırlanan lizin çözeltilerinde (pH 7.5) potansiyel ölçümleri yapılarak kalibrasyon grafikleri çizildikten sonra belirlenen eğimler tampon konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.3). Elde edilen eğim değerleri Çizelge 5.3'de verilmektedir.

Çizelge 5.3 Lizin oksidaz biyosensörünün cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi

Tampon Konsantrasyonu	E(mV/p[lizin]) $\pm$ s
5mM	29.5 $\pm$ 1.47
10mM	35.83 $\pm$ 1.4
15mM	28.0 $\pm$ 2.0
20mM	24.84 $\pm$ 0.63
25mM	26.7 $\pm$ 3.2
30mM	27.2 $\pm$ 1.86

s: Standart sapma.



Şekil 5.3 Lizin biyosensör eğiminin tampon konsantrasyonu ile değişimi

Çizelge 5.3'ten de görüleceği gibi, en yüksek eğim değerinin 10 mM konsantrasyonda elde edilmiştir. 10 mM'dan daha yüksek konsantrasyonlarda biyosensör cevabının düştüğü görülmektedir. Bu nedenle lizin biyosensörü için optimum tampon konsantrasyonu 10 mM olarak alınarak tüm çalışmalarda bu konsantrasyonda Tris tamponu kullanılmıştır. 5 mM'dan daha düşük tampon konsantrasyonlarında ise çözeltinin tamponlama kapasitesinin düşük olması nedeni ile çalışılmamıştır.

Saurina ve arkadaşları hazırladıkları lizin biyosensörü ile yaptıkları çalışmada, lineer çalışma aralığının yüksek ve tamponun daha kararlı olması nedeni ile bizim çalışmamızla paralel olarak 10 mM Tris tamponunu seçmişlerdir [11].

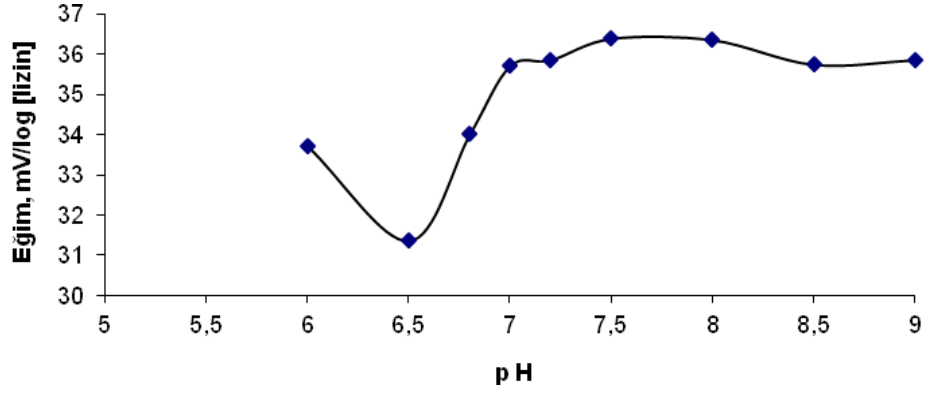
#### 5.4 Lizin Biyosensörünün Performansına pH Etkisi

Lizin biyosensörünün performansına pH'nın etkisini incelemek için 8 farklı pH'da (6.0, 6.5, 7.0, 7.2, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) ve optimum tampon konsantrasyonunda lizin çözeltileri hazırlandıktan sonra kalibrasyon grafikleri çizilerek eğimleri belirlenerek pH değerlerine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 5.4). Daha asidik pH'larda enzim prostetik grubunu kaybettiği için çalışmaya asidik pH'lar dahil edilmemiştir. Elde edilen eğim değerleri Çizelge 5.4'te verilmektedir.

Çizelge 5.4 Lizin oksidaz biyosensörünün cevabına pH'nın etkisi

<b>pH</b>	<b>Eğim (mV/p[lizin])±s</b>
6.0	33.72 ± 1.72
6.5	31.37 ± 2.96
6.8	34.00 ± 2.98
7.0	35.72 ± 1.23
7.2	35.86 ± 0.84
7.5	36.40 ± 1.07
8.0	36.36 ± 2.33
8.5	35.75 ± 2.18
9.0	35.87 ± 3.06

s:Standart sapma



Şekil 5.4 Lizin biyosensör eğiminin pH ile değişimi

Şekil 5.4 incelendiğinde, biyosensör cevabının en yüksek eğim değerini pH 7.5'ta verdiği, lizin oksidaz enzimin aktivitesini pH 9.0' a kadar koruduğu görülmektedir. En yüksek eğim değerinin elde edildiği pH 7.5, optimum pH olarak kabul edilip, tüm diğer çalışmalar pH 7.5'da yapılmıştır. Serbest lizin oksidaz enziminin optimum pH değerinin 7.4-9.2 aralığında olduğu göz önünde bulundurulursa [37], lizin biyosensörünün hazırlanmasında kullanılan immobilizasyon çalışmalarının enzim aktivitesi üzerine herhangi bir olumsuz etkisi olmamıştır. Literatür incelendiğinde lizin biyosensörü hazırlanması ile ilgili birçok çalışmada da optimum pH 7.5 olarak belirlenmiştir [27], [28].

Saurina ve arkadaşları, hazırladıkları potansiyometrik lizin biyosensörü ile pH 6.9-9.3 arasında 10 mM Tris tamponu kullanarak yaptıkları çalışmada, pH artışıyla birlikte kalibrasyon grafiğinin doğrusal aralığında bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir. pH 8.4'ten sonra pH'nın artması, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan amonyum iyonlarının konsantrasyonunun azalmasına neden olduğu için ölçülen potansiyel değerlerinin düştüğünü belirtmişlerdir [11]. Kusakabe ve arkadaşları (1979) *Tricoderma viride*'den saflaştırdıkları lizin oksidaz enzimi kullanarak hazırladıkları amperometrik lizin biyosensöründe enzim aktivitesine pH etkisini çalışmışlar ve maksimum cevabın pH 7.4 ile pH 9.2'de olduğunu belirtmişlerdir [37]. Lizin biyosensörü için elde ettiğimiz pH performansının literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir.

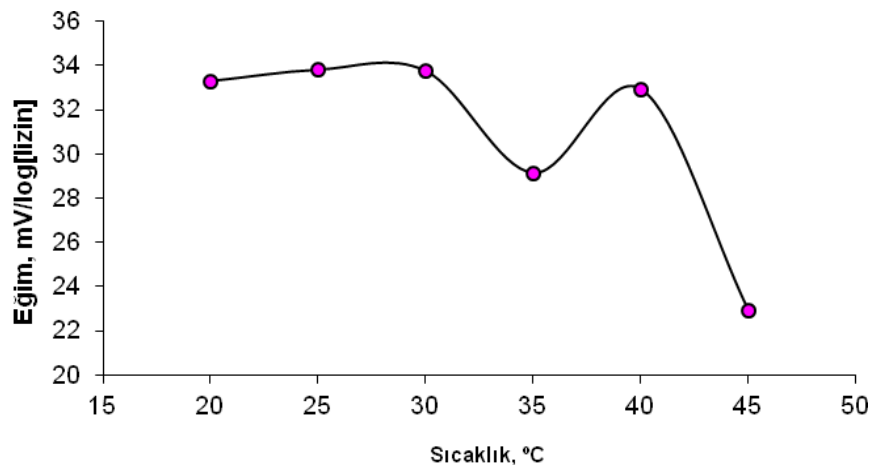
## 5.5 Lizin Biyosensörünün Performansına Sıcaklık Etkisi

Hazırlanan lizin biyosensörlerinin performanslarına sıcaklık etkisini incelemek için 6 farklı sıcaklıkta (20, 25, 30, 35, 40, 45 °C) çalışmalar yapıldı, sıcaklık etkisinden dolayı aktivite kaybını önlemek amaçlı 20-25 ve 30 °C için ayrı bir lizin biyosensörü, yüksek sıcaklıkların her biri için ayrı ayrı lizin biyosensörleri hazırlandı. Aktivite ölçümleri için optimum pH ve tampon konsantrasyonunda lizin çözeltileri hazırlandıktan sonra kalibrasyon grafikleri çizilerek eğimleri belirlendi, eğim değerleri Çizelge 5.5'te verilmektedir. Elde edilen sonuçlar sıcaklığa karşı Şekil 5.5'te grafiğe geçirildi.

Çizelge 5.5 Lizin oksidaz biyosensörünün cevabına sıcaklığın etkisi

Sıcaklık(°C)	Eğim ,(mV/p[lizin]±s
20	33.3 ± 0.9
25	33.8 ± 2.2
30	33.7 ± 1.5
35	29.1 ± 1.8
40	32.9 ± 0.7
45	22.9 ± 3.2

s:Standart sapma



Şekil 5.5 Lizin biyosensör eğiminin sıcaklık ile değişimi



Şekil 5.5 incelendiğinde, biyosensör için eğim değerlerinin 25 °C'ye kadar arttığı, 25-40 °C arası enzim aktivitesini koruduğu, bu sıcaklıktan sonra hızla azaldığı görülmektedir. Bu nedenle en yüksek eğim değerinin elde edildiği sıcaklık olan 25 °C, optimum sıcaklık olarak belirlendi. Literatürde lizin biyosensörleri ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda optimum sıcaklık 30°C ve 40°C arasında bulunmuştur. Çalışmamızda immobilizasyon şartlarının enzim aktivitesini olumsuz etkilemediği ve bulunan değerlerin literatür ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Lizin biyosensörü için optimum sıcaklık 25 °C olup, sıcaklık arttıkça hem lizin oksidaz enziminin aktivitesi hemde enzimatik reaksiyon sonucu oluşan amonyum miktarı azalmaktadır. Amonyumun 20 °C'deki asitlik sabiti 9.1 iken, bu değer 45 °C'de 8.7 olmaktadır. Bu nedenle yüksek sıcaklıklarda amonyum konsantrasyonunda azalma görülmektedir [11].

## **5.6 Diğer Aminoasitlerin Girişim Etkisi**

Karışık çözelti yöntemi (lizin kalibrasyon çözeltilerinde yer almaktadır) kullanılarak lizin biyosensörüne diğer amino asitlerin girişim etkisinin belirlenmesi amacıyla askorbik asit, 14 farklı amino asit ve lizinin  $10^{-2}$  M stok çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir amino asit ve askorbik asit çözeltisi eşit hacimde lizin çözeltisi ile birleştirilerek son konsantrasyonlar  $10^{-3}$ M, (pH 7.5) olacak şekilde çözeltiler hazırlandıktan sonra biyosensörün optimum koşullarında mV ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen potansiyel değerleri, ortamda herhangi bir girişim etkisi olabilecek madde yok iken, yani sadece lizin çözeltisinde ( $10^{-3}$ M, pH 7.5) de ayrıca mV okuması yapılarak elde edilen değere göre oranlandı. Bu şekilde, amino asitlerin girişim etkisi bağıl (yüzde) olarak belirlenmiş ve hesaplanan değerler Çizelge 5.6'da verilmiştir.

Çizelge 5.6 Lizin biyosensörüne amino asitlerin girişim oranları

Aminoasitler	Girişim etkisi, %
Lizin	100.0
L-izolösin	19.2
Glisin	14.0
L-valin	13.7
L-glutamin	8.0
L-prolin	7.9
L-askorbik asit	7.5
L-fenilalanin	6.4
L-lösin	5.2
L-histidin	4.2
L-glutamik asit	3.3
L-arginin	1.4
L-metiyonin	1.2
L-sistein	0.4
L-alanin	0.4
L-Serin	0

Çizelge 5.6 incelendiğinde, en fazla girişim etkisi olan amino asitlerin izolösin, glisin ve valin sırasıyla %19.2, %14.0, %13.7 olduğu görülmektedir. Diğer amino asitlerin ve askorbik asitin ise ihmal edilebilir düzeyde girişim etkisi olduğu görülmektedir.

Ayrı çözelti yöntemi ile de askorbik asit ve 14 çeşit amino asitin girişim etkilerinin incelenmesi yapılmasına rağmen anlamlı sonuçlar elde edilememiş, lizin olmadığı durumda biyosensör diğer amino asitlere bir cevap vermemiştir. Bu nedenle çalışmamızda ayrı çözelti yöntemi kullanılmamıştır.

Saurina ve arkadaşları yaptıkları potansiyometrik lizin biyosensörü ile ayrı çözelti yöntemi kullanarak (lizin kalibrasyonlarda yer almamaktadır) ornitin, tirozin, triptofan, arginin, fenil alanin, aspartik asit ve glutamik asit aminoasitlerinin lizin tayinine girişim etkilerinin sırasıyla %45, %12.1, %13.1, %14.7, %8.6, %13.4 ve %10.1 olduğunu tespit

etmişlerdir. Ayrıca  $10^{-4}$  M lizin konsantrasyonlarında bu amino asitlerin girişim etkilerinin ihmal edilecek kadar az olduğunu tespit etmişlerdir [11].

Saurina ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları kıyaslarsak, fenilalanin %8.6 girişim gösterirken bizim çalışmamızda %6.4, arginin %14.7 girişim etkisi gösterirken, bizim çalışmamızda %1.4, glutamik asit %10.1 etki gösterirken, bizim hazırlamış olduğumuz biyosensör ile %3.3 etki göstermiştir. Bizim çalışmamızda ayrı çözelti yöntemiyle herhangi bir sonuç elde edilemiştir, Saurina ve arkadaşlarının kullandığı potansiyometrik biyosensörde ise sadece ayrı çözelti yöntemiyle çalışılabilmiş, lizin varlığında diğer aminoasitler cevaplarda çok küçük dalgalanmaya neden olmuşlardır, bunu enzimin doğal substratı lizine çok yüksek affinitesi ile açıklamışlardır. Triptofan, tirozin ve sistenin amperometrik lizin biyosensöründe en yüksek girişim etkisini göstermesini enzimatik degradasyonla hidrojen peroksit oluşmasına karşılık, bu aminoasitlerin moleküllerinde kolayca okside olabilen radikaller nedeniyle olduğunu belirtmişlerdir [11].

## 5.7 Tekrarlanabilirlik

Lizin biyosensörlerinin tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla aynı gün içerisinde aynı biyosensör ile 15 farklı seri lizin çözeltisinde (pH 7.5) 1'er saatlik aralıklarla 3 defa ölçüm alındı. Her ölçüm için kalibrasyon grafiği çizilerek her birinin eğimi belirlendi. Eğim değerlerinin bağıl değerleri belirlenerek ölçüm sayısına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 5.6)

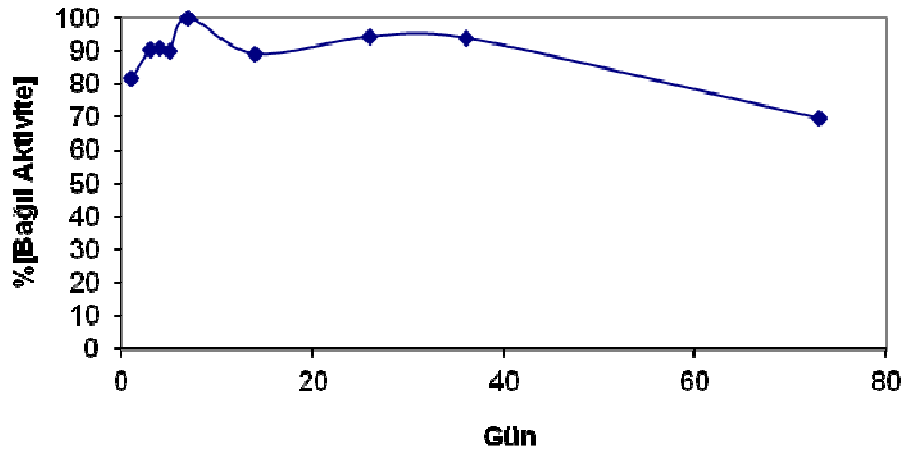


Şekil 5.6 Lizin biyosensörünün tekrarlanabilirliği

Şekil 5.6'dan 15. ölçümde eğim değerinin yaklaşık olarak %85 oranında korunduğu görülmektedir. Eğim değerlerinin bağıl standart sapma (RSD:5.7) değerleri hesaplandı. RSD %10'dan az bulunduğu için lizin oksidaz temelli lizin biyosensörünün tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu söylenebilir [34].

## 5.8 Raf Ömrü

Lizin biyosensörünün raf ömrünü belirlemek amacıyla, lizin biyosensörü +4°C'de depolanarak belli aralıklarla lizin kalibrasyon çözeltilerinde (pH 7.5) mV ölçümleri yapıldıktan sonra kalibrasyon grafikleri çizilerek eğim değerleri hesaplandı. Birinci günde elde edilen eğim değeri %100 kabul edilerek bağıl aktivite değerleri hesaplandı ve günlere karşı bağıl aktivite değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 5.7).



Şekil 5.7 Lizin biyosensörünün raf ömrü

35 gün süresince çeşitli aralıklarla lizin çözeltilerinde düzenli olarak mV ölçümü yapılarak kalibrasyon grafikleri çizildi ve çalışma aralığı ve eğim değerleri belirlendi. 35 günün sonunda biyosensörün eğim değerlerinde herhangi bir değişme olmadığı için lizin biyosensörü ölçüm yapılmaksızın 1 ay süresince +4°C'de depolanmış ve 1 ayın sonunda ölçümlere devam edilmiştir. 70 günün sonunda lizin biyosensörünün çalışma aralığının değişmediği, eğim değerinde ise sadece %30'luk bir düşme olduğu belirlenmiştir. Hazırladığımız palmitik asit içeren poli (vinilklorür) (PVC) membran

temelli lizin biyosensörünün raf ömrünün oldukça uzun olması, biyosensörün biyoanalitik çalışmalarda rahatlıkla kullanılabilceğini göstermektedir.

Literatürde de belirtildiği üzere lizin oksidaz oldukça kararlı bir enzim olup yaklaşık 1 ay süreyle eğitim değerlerinde büyük bir değişim olmadan lizin tayininde kullanılabilir. Karalemas ve arkadaşları [24] elektropolimerizasyon ile altın o-fenilendiamin elektrot üzerine lizin immobilize ederek oluşturdukları biyosensörün en az 40 gün süresince stabil olduğunu, Saurina ve arkadaşları ise katı-iletken kompozite dayalı oluşturdukları amperometrik biyosensörün hassasiyet ve lineer aralığın ilk hafta boyunca sabit olduğu, sonraki haftalarda giderek düştüğünü, 25. Günün sonunda aktivitenin %30 düştüğünü ancak sensörün hassasiyetindeki düşmeye rağmen tekrar kalibre edilerek yaklaşık 1 ay süreyle analitik tayinlerde kullanılabilceğini belirtmişlerdir [11].

### **5.9 Cevap Süresi**

İdeal bir biyosensör kısa sürede sonuç verebilmelidir. Lizin elektrotlarının cevap süresini bulabilmek için optimum şartlarda hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki lizin çözeltilerine lizin biyosensörleri ve referans elektrot daldırılarak potansiyellerinin kararlı hale gelmesi için geçen süre kaydedildi. Cevap zamanı ile belirtilen, biyosensörün analizlenecek maddenin bulunduğu ortama temas ettiği andan itibaren ölçüm düzeneğinden sonucun okunduğu ana kadar geçen süredir. Biyosensörler için cevap zamanı 5 dakikaya kadar olan değerler uygun kabul edilirken, 10 dakika uzun bir süre olarak görülür [29]. Bu çalışmada oluşturulan lizin oksidaz biyosensörünün cevabı yaklaşık 40-60 sn arasında değişmektedir, bu nedenle cevap süresi açısından ideal bir biyosensördür.

Literatürde Saurina ve arkadaşları oluşturdukları potansiyometrik biyosensör cevap süresini 15 sn olarak bulmuşlardır [11], başka bir çalışmada ise amperometrik lizin biyosensörü için bu değer 42 sn olarak belirtilmiştir[22].

### **5.10 Ticari L-lizin Tablet ve Kapsülde Lizin Tayini**

Hazırladığımız lizin biyosensörünün ticari L-lizin tablet ve kapsülde lizin tayininde kullanıp kullanılmayacağı araştırıldı. Bu amaçla, SOLGAR firması tarafından üretilen L-lizin 1000 mg Tablet ve 75 mg kapsül ürünlerinde lizin tayini Bölüm 4.4.5'de

belirtildiği Şekilde hazırlanan cözeltiler kullanılarak lizin tayini yapıldı. Bulunan değerler ilaç etiket değerleri ve aynı konsantrasyonda lizin numunelerinden elde edilen cevap ile kıyaslandı. Elde edilen verim değeri Çizelge 5.7’de verilmektedir.

Çizelge 5.7 Ticari L-lizin tablet ve kapsülde lizin tayini

	<b>Etiket değerı (E)</b>	<b>Lizin biyosensörü ile bulunan değer (L)</b>	<b>% Verim</b>
L-lizin 1000 mg tablet, mg lizin /1 tablet	1000	989±0.10	98.9
Amino 75 kapsül, mg lizin /1 kapsül	75	73±0.12	97.3

$$\% \text{ Verim} = L / E \times 100\%$$

## BÖLÜM 6

### SONUÇ

Bu doktora tez çalışmasında amonyum-seçici PVC membran elektroduna l-lizin oksidaz enzimi immobilize edilerek lizin tayini için potansiyometrik bir biyosensör geliştirilmiştir. Lizin oksidaz enzimatik reaksiyonu sonucu açığa çıkan amonyum iyonları geliştirilen biyosensör ile potansiyometrik olarak tayin edilebildi.

Bölüm 5'teki sonuçlara bakıldığında palmitik asit içeren PVC membran elektrodu ile birçok parametrede iyi sonuçlar elde ettiğimizi görmekteyiz. Lizin oksidaz enzimi kullanarak yaptığımız lizin biyosensörünün amonyum iyonlarına cevabı oldukça iyidir, doğrusal çalışma aralığı  $1.0 \times 10^{-1}$ - $1.0 \times 10^{-5}$  M ve eğim değeri  $48.36 \pm 3.5$  mV/log  $[\text{NH}_4^+]$  olarak belirlenmiştir. Bulunan geniş çalışma aralığı ve yüksek eğim değeri, enzim immobilizasyonundan sonra da sensörün amonyum iyonlarına karşı cevabın oldukça iyi olduğunu kanıtlamaktadır. Geliştirilen l-lizin biyosensörünün lizine cevabı kalibrasyon grafiği ile gösterildi, doğrusal çalışma aralığı  $1.0 \times 10^{-1}$ - $1.0 \times 10^{-5}$  M ve eğim değeri  $35.83 \pm 1.4$  mV/log [lizin] olarak bulunmuştur, elde edilen değerler oluşturulan biyosensörün geniş bir lizin konsantrasyonu aralığında yüksek bir eğim değeri ile lizini ölçebildiğini kanıtlamaktadır. Amonyum ve lizin için tayin limiti  $10^{-6}$  M olarak belirlenmiştir. Lizin ile optimum çalışma koşullarımızı pH 7.0-9.0 aralığında enzim aktivitesini koruduğu halde en yüksek eğim değeri elde ettiğimiz pH=7.5 olarak; optimum tampon konsantrasyonu 10 mM; 25-40 °C aralığında enzim aktivitesini koruduğu halde en yüksek eğim değerini elde ettiğimiz 25°C optimum sıcaklık olarak belirlendi. Raf ömrünü yaklaşık 40 gün olarak bulduk, bu nedenle uzun süreli analizlerde kullanılabilceği kanıtlanmıştır. Cevap süresi 40-60 s gibi kısa bir süre olması nedeniyle ideal bir biyosensördür. Diğer amino asitler ve askorbik asit ile girişim etkisi incelenmiş ve lizin varlığında karışık çözelti yöntemi ile girişim etkileri (%)

hesaplanmıştır. Oluşturduğumuz biyosensörün tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu RSD değerinin 10'dan küçük olması nedeniyle kanıtlanmıştır. Optimize ettiğimiz lizin biyosensörü ile ticari numunelerde lizin tayini yaptık ve olması gereken sonuçlara çok yakın sonuçlar elde ettik.

Daha önce laboratuvarımızda amonyum iyonoforu olarak nonaktin ve palmitik asit içeren PVC membran ile amonyum-seçici elektrot geliştirilmiş ve amonyum iyonlarına cevabının çok iyi olduğu kanıtlanmıştır. Çalışmamızda lizin oksidaz enzimi bu elektrotlar üzerine immobilize edilmiş, amonyum iyonlarına ve lizine cevabının çok iyi olduğu, lizin tayininde kullanılabileceği kanıtlanmıştır.

Bu doktora çalışması Mart 2014 tarihinde makale olarak yayınlaması talebiyle SENSOR LETTERS dergisine gönderilmiştir.



## KAYNAKLAR

---

- [1] Nejem, R.M., (2004). University Of Pretoria etd. "Amperometric biosensor for the enantioanalysis of L-lysine in serum samples".
- [2] Walter, ve Wold, (1976). "The role of lysine in the action of bovine pancreatic ribonuclease A", *Biochemistry*, 15(2):304-10.
- [3] Pierre, S.A., Bartlett, B.L., ve Schlosser, B.J., (2009). "Practical management measures for patients with recurrent herpes labialis", *Skin Therapy Lett.* 14 (8):1-3.
- [4] Smriga, Kameishi, Uneyama ve Torii, (2002). "Dietary L-lysine deficiency increases stress induced anxiety and fecal excretion in rats", *The Journal of Nutrition* 132 (12):3744-6.
- [5] Sciencedaily, "Chemists kill cancer cells with light-activated molecules", (<http://www.sciencedaily.com/release/2007/08/070808132019.htm>) 24 Ocak 2008.
- [6] Flodin, N.W, (1997). "The metabolic roles, pharmacology and toxicology of lysine", *J. Am Coll Nutr*, 16(1):7-21.
- [7] Olschewski, H., Erlenkötter, A., Zaborosch, ve Chemnitz, G.C., (2000). "Screen-printed sensors for L-lysine determination, *Enzyme and Microbial Technology* 26: 537-543.
- [8] Kelly, S.C., O'Connell, P.J., O'Sullivan, C.K., ve Guilbault, G.G., (2000). "Development of an interferent free amperometric biosensor for determination of L-lysine in food ", *Analytica Chimica Acta* 412: 111-119.
- [9] Chen, R.L.C., Lee M.H., ve Matsumoto, K., (1996). *Anal.Sci.* 12: 87.
- [10] Lavagnini, M.G., Moscone, D., Palleschi, G., Compagnone, D., ve Cremisini, C., (1993). *Talanta* 40: 1301.
- [11] Saurina, J., Cassou, S.H., Alegret, S., ve Fabregas, E., (1998). "Potentiometric biosensor for lysine analysis based on a chemically immobilized lysine oxidase membrane, *Analytica Chimica Acta* 371:49-56.
- [12] Carpenter, K.J., (1960). "The estimation of the available lysine in animal-protein foods", *Biochem. J.*, 77: 604.

- [13] Romette, J.L., Yang, J.S., Kusakabe, H., ve Thomas, D., (1983). "Enzyme electrode for specific determination of L-lysine", *Biotechnology and Bioengineering*, XXV: 2557-2566.
- [14] Pohlmann, A., ve Stamm, W.W., (1990). "Enzymatic determination of L-lysine by flow-injection techniques, " *Analytica Chimica Acta*, 235: 329-335.
- [15] Dempsey, E., Wang, J., Wollenberger, U., ve Ozsoz, M., (1992). "A lysine dehydrogenase-based electrode for biosensing of L-lysine, " *Biosensors & Bioelectronics*, 7: 323-327.
- [16] Li, H., He, H., ve Wolfbeis, O.S., (1992). "An optical biosensor for lysine based on the use of lysine decarboxylase and cadaverine-sensitive membrane, " *Biosensors & Bioelectronics*, 7 : 725-732.
- [17] Vrbova, E., Marek, M., ve Ralys, E., (1992). "Biosensors for the determination of L-lysine " , *Analytica Chimica Acta*, 270 : 131-136.
- [18] Preuschoff, F., Spohn, U., Weber, E., Unverhau, K., ve Mohr, K.H., (1993). "Chemiluminometric L-lysine determination with immobilized lysine oxidase by flow-injection analysis " , *Analytica Chimica Acta*, 280 : 185-189.
- [19] Siegler, K., ve Weber, B., (1994). "A lysine sensor for process control", *J. Chem. Tech. Biotechnol*, 59 : 279-287.
- [20] Almuaibed, A.M., ve Townshend, A., (1997), "Flow injection amperometric and chemiluminescence individual and simultaneous determination of lysine and glucose with immobilized lysine oxidase and glucose oxidase", *Analytica Chimica Acta*, 338 : 149-154.
- [21] Curulli, A., Kelly, S., O'Sullivan, C., Guilbault, G.G., ve Palleschi, G., (1998). " A new interference-free lysine biosensor using a non-conducting polymer film " , *Biosensors & Bioelectronics* 13:1245-1250.
- [22] Saurina, J., Cassou, S.H., Alegret, S., ve Fabregas, E., (1999). "Amperometric determination of lysine using a lysine oxidase biosensor based on rigid-conducting composites", *Biosensors & Bioelectronics* 14 : 211-220.
- [23] Saurina, J., Cassou, S.H., Alegret, S., ve Fabregas, E., (1999). "Determination of lysine in pharmaceutical samples containing endogenous ammonium ions by using a lysine oxidase biosensor based on all solid state potentiometric ammonium electrode", *Biosensors & Bioelectronics* 14: 67-75.
- [24] Karalemas, I.D., Georgiou, C.A., ve Papastathopoulos, D.S., (2000). "Construction of a L-lysine biosensor by immobilizing lysine oxidase on a gold-poly (o-phenylenediamine) electrode", *Talanta* 53 : 391-402.
- [25] Villar, N.G., Saurina, J., ve Cassou, S.H., (2003). "Flow injection differential potentiometric determination of lysine by using a lysine biosensor", *Analytica Chimica Acta* 477: 315-324.
- [26] Marquette, C.A., Degiuli, A., ve Blum, L.J., (2003). "Electrochemiluminescent biosensors array for the concomitant detection of choline, glucose, glutamate, lactate, lysine and urate", *Biosensors and Bioelectronics* 19: 433-439.

- [27] Akyılmaz, E., Erdoğan, A., Öztürk, R., ve Yaşa, İ., (2007).“Sensitive determination of L-lysine with a new amperometric microbial biosensor based on *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells“, *Biosensors and Bioelectronics* 22: 1055-1060.
- [28] Guerrieri, A., Cataldi, T.R.I., ve Ciriello, R., (2007).“The kinetic and analytical behaviour of an L-lysine amperometric biosensor based on lysine oxidase immobilised onto a platinum electrode by co-crosslinking“, *Sensors and Actuators.B,Chemical*,126 (2):424-430.
- [29] Gökdoğan, Ö., (2011). Lizin tayini için yeni amperometrik biyosensörlerin hazırlanması ve karakterizasyonu, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- [30] Guerrieri, A., Cataldi, T.R.I., ve Ciriello, R., (2013).“A novel amperometric biosensor based on co-crosslinked L-lysine- $\alpha$ -oxidase/overoxidized polypyrrole bilayer for the highly selective determination of L-lysine“, *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology*,34 (5):523-534.
- [31] Chauhan, N., Narang, J., Sunny, ve Pund, C.S., (2013).” Immobilization of lysine oxidase on a gold-platinum nanoparticles modified Au electrode for detection of lysine”, *Enzyme and Microbial Technology* 52:265-271.
- [32] Cock, L.S., Arenas, A.M.Z., ve Aponte, A.A.,(2008). “Use of enzymatic biosensors as quality indices: A synopsis of present and future trends in the food industry”, *Chilean Journal of Agricultural Research* 69(2):270-280.
- [33] Lyons, C.L.C., (1962). “Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery”, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*102:29.
- [34] Telefoncu, A. (1999). “Biyosensörler, “ 81-142 Ege Üniversitesi, İzmir
- [35] Dzyadevych, S.V., Arkhypova, V.N., Soldatkin, A.P., El’skaya, A.V., Martelet, C., Renault, N.J., (2008).“Amperometric enzyme biosensors:Past, present and future ”, *ITBM-RBM* 29:171-180.
- [36] Sigma Aldrich, Lysine oxidase from *Trichoderma viride*, product information, [sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com).
- [37] Kusakabe, H., Kodama, K., Kuninaka, A., ve Yoshino, H., (1980).“A new antitumor enzyme, lysine  $\alpha$ -oxidase from *Trichoderma viride*-purification and enzymological properties“, *J. Biological Chemistry*, 255:976-81.
- [38] Lukashova, E.V., ve Berezov, T.T., (2002).“L-lysine  $\alpha$ -oxidase: Physicochemical and biological properties”, *Biochemistry (Moscow)*,.67(10):1152-1158.
- [39] Joseph, B., ve Rajan, S.S., (2011).“L-lysine alpha-oxidases from fungi as an anti-tumor agent”, *Advanced Biotech.*,10:08.
- [40] Karakuş, E., Pekyardımcı, Ş., ve Kılıç, E., (2006). “A new potentiometric ammonium electrode for biosensor construction“, *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology*,34(5), 523-534.
- [41] Karakuş, E., Erden, P.E., Pekyardımcı, Ş., ve Kılıç, E., (2006). “Determination of creatine in commercial creatine powder with new potentiometric and

amperometric biosensors, "Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology,34 (3): 337-347.

- [42] Karakuş, E., Pekyardımcı, Ş., ve Kılıç, E.,(2006).“Potentiometric bienzymatic biosensor based on PVC membrane containing palmitic acid for determination of creatine, “ Process Biochemistry, 41(6): 1371-1377.
- [43] Karakuş, E., Pekyardımcı, Ş., ve Kılıç, E.,(2005).“Urea biosensors based on PVC membrane containing palmitic acid, “ Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology,33(3): 329-341.
- [44] Dindar, B., (2010). Urea biosensors development and characterisation , Yüksek Lisans Tezi, YTU Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

## ÖZGEÇMİŞ

---

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** :Saniye YARAR  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 11/09/1971 AMASYA  
**Yabancı Dili** :İngilizce  
**E-posta** :saniyeyarar@hotmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyokimya	Orta Doğu Teknik Üniv.	1997
Lisans	Biyoloji	Hacettepe Üniversitesi	1995
Lise	Fen	Sivas Gazi Lisesi	1989

### İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
1998-2002	Toprak İlaç A.Ş.	ArGe Uzmanı
2002-2011	Mustafa Nevzat Holding	Ürün geliştirme-Müd. Yrd.
2011-...	Deva Holding A.Ş.	Uluslararası Pazarlar Ruh.Gr.Müd.

## **YAYINLARI**

### **Makale**

1. Partial Purification and Characterization of Neutral Trehalase From Baker's Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Food Biochemistry, Vol 24, Issue 6, pages 443-451, December 2000