

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

**ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜL TEMELLİ GLUTAMİN
BİYOSENSÖRÜ TASARLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

DİLRUBA ALBAYRAK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. EMİNE KARAKUŞ**

İSTANBUL, 2014

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

**ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜL TEMELLİ GLUTAMİN
BİYOSENSÖRÜ TASARLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

DİLRUBA ALBAYRAK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. EMİNE KARAKUŞ**

İSTANBUL, 2014

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜL TEMELLİ GLUTAMİN
BİYOSENSÖRÜ TASARLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Dilruba ALBAYRAK tarafından hazırlanan tez çalışması _____ tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS 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

Yrd. Doç. Dr.Mesut KARAHAN

Üsküdar Üniversitesi

ÖNSÖZ

Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı Biyokimya Anabilim Dalındaki yüksek lisans eğitimim süresince bilgisi ve deneyimleriyle bana yardım eden ve yönlendiren, zamanını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Emine KARAKUŞ'a;

Tezimin hazırlanmasında laboratuvar olanaklarını kullanabilme fırsatını bana sunan Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı hocalarıma,

Özel yaşamım ve deneysel çalışmalarımda sabırla bana yardım eden ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Çağla ATAN ve Berat BAKIR'a

Hayatımın her döneminde hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan beni bugünlere getiren, maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan sevgili babam Necati ALBAYRAK ve annem Lutfiye ALBAYRAK'a, her zaman yanımda olan canım kardeşim Elif ALBAYRAK'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2014

Dilruba ALBAYRAK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	2
1.3 Hipotez.....	2
BÖLÜM 2	3
GLUTAMİN	3
2.1 Glutaminin Fonksiyonları	4
2.2 Glutamin Sentez ve Yıkımı	8
2.2.1 Glutamin sentezi.....	8
2.2.2 Glutamin Yıkımı.....	9
2.3 Glutamin Tayin Yöntemleri.....	10
2.3.1 Biyosensör Esaslı Glutamin Tayin Yöntemleri.....	11
2.3.1.1 Optik Sensörler	11
2.3.1.2 Amperometrik Sensörler	11
2.3.1.3 Kapiler Elektroforez Yöntemi.....	12
2.3.1.4 Laser Induced Fluorescence (LIF).....	12
2.3.1.5 Potansiyometrik Sensörler	12
2.4 Glutamin ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	13
2.5 Glutamin Tayininde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış.....	17
2.5.1 Glutaminaz	17
2.5.2 Kitosan.....	17
2.5.3 Çinko Oksit Nanorod.....	17
BÖLÜM 3	18
NANOTEKNOLOJİ.....	18

3.1 Nanoyapıların Sentezleme Teknikleri	21
3.1.1 Fiziksel Buhar Çöktürme (PVD)	22
3.1.2 Kimyasal Buhar Çöktürme (CVD)	22
3.1.3 Sol-gel Yöntemi	23
3.2 Çinko Oksit'in Özellikleri	23
3.3 Çinko Oksit Nanorod Sentez Mekanizması	24
3.4 ZnO Nanorodların Sentez Metotları	25
3.4.1 Elektrokaplama Metodu	25
3.4.2 Buhar-Sıvı-Katı (VLS) Metodu	25
3.4.3 Kimyasal Banyo Kaplama (CBD) Metodu	26
3.4.4 Metal-Organik Kimyasal Buhar Kaplama (MOCVD)	26
3.4.5 Sol-gel Metodu	26
3.4.6 Mikrodalga Isıtma Metodu	26
3.4.7 Hidrotermal Sentez Metodu	26
BÖLÜM 4	29
ENZİMLER	29
4.1 Enzimlerin Yapıları ve Mekanizmaları	30
4.1.1 Aktif bölge	31
4.1.2 Kofaktörler	32
4.1.3 Koenzimler	32
4.1.4 Özgüllük	32
4.1.5 Anahtar Kilit Modeli	33
4.2 Enzimlerin Sınıflandırılması	33
4.3 Enzimlerin Aktivitesine Etki Eden Faktörler	34
4.3.1 Sıcaklık	34
4.3.2 pH	34
4.3.3 Substrat Konsantrasyonu	34
4.4 Glutaminaz Enzimi	35
4.4.1 Glutaminaz Enziminin Kullanım Alanları ve Fonksiyonları	36
4.4.2 Glutaminaz Enziminin Eldesi	37
4.5 Enzim İmmobilizasyonu	39
4.5.1 İmmobilizasyon Yöntemleri	40
4.5.1.1 Kovalent Bağlama	41
4.5.1.2 Tutuklama	44
4.5.1.3 Adsorpsiyon	45
4.5.1.4 Çapraz Bağlama	45
4.6 Kitosan	46
4.6.1 Kimyasal Yapısı ve Reaksiyonu	48
BÖLÜM 5	49
BİYOSENSÖRLER	49
5.1 Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu	52
5.1.1 Biyokomponentler	53
5.1.2 Transduserler	54
5.1.3 Biyosensörlerde Analizlenebilecek Unsurlar	54
5.1.4 Biyosensörlerde Kullanılan Biyoaktif Yapılar	55
5.1.5 Biyosensörlerde Yararlanılan İletim ve Ölçüm Sistemleri	56
5.1.6 Biyosensör Çeşitleri	57
5.1.6.1 Elektrokimyasal Sensörler	57

5.1.6.2	Potansiyometrik Biyosensörler	57
5.1.6.3	Voltametrik Biyosensörler	57
5.1.6.4	Amperometrik Biyosensörler	57
5.1.6.5	Optik Sensörler	58
5.1.6.6	Termal Sensörler	58
5.1.6.7	Kütle Hassas Sensörler	58
5.1.7	Biyosensörlerin Uygulama Alanları	59
5.1.7.1	Tıbbi Alanda Biyosensör Kullanımı	59
5.1.7.2	Endüstriyel Alanda Biyosensör Kullanımı	60
5.1.7.3	Çevresel Denetimlerde Biyosensör Kullanımı	60
5.1.7.4	Savunma Alanında Biyosensör Kullanımı	61
5.1.7.5	Gıda Sektöründe Biyosensör Kullanımı	61
5.1.8	Enzim Sensörleri	62
5.1.8.1	Enzim Sensörlerinin Sınıflandırılması	64
5.1.9	Enzim Elektrotlarında Performans Faktörleri	69
5.1.9.1	Kalibrasyon ve Duyarlılık	70
5.1.9.2	Kararlılık	70
5.1.9.3	Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı	70
5.1.9.4	Cevap Süresi	71
5.1.9.5	Seçicilik	71
5.1.9.6	Tekrarlanabilirlik	72
5.1.9.7	Sıcaklık	73
5.1.9.8	Tıbbi Uygulamalarda Kullanılacak Biyosensörler İçin Biyouyumluluk	73
BÖLÜM 6		74
MATERYAL VE METOD		74
6.1	Kullanılan Cihazlar	74
6.2	Kullanılan Numuneler	74
6.2.1	GNC L-glutamin Tozu	74
6.3	Glutaminaz Enzimi	74
6.4	Kullanılan Kimyasal Maddeler	74
6.5	Kullanılan Çözeltiler	75
6.5.1	0.15M Fosfat Tamponu Çözeltisi (pH 7.4)	75
6.5.2	Kitosan Çözeltisi	75
6.5.3	Yüzey Bağımsız ZnO Nanorod/Kitosan Çözeltisi	75
6.5.4	Glutaminaz/Kitosan Çözeltisi	75
6.5.5	Glutamin Çözeltileri	76
6.5.6	Glutamin Tayini İçin Kalibrasyon Çözeltileri	76
6.5.7	GNC L-glutamin Tozunda Glutaminin Tayini İçin (Standart Katma Yönteminde) Kullanılan Çözeltiler	77
6.6	Glutamin Biyosensörleri	77
6.6.1	Glutamin Biyosensörlerinin Hazırlanması	77
6.6.1.1	Hidrotermal Yöntemle Çinko Oksit Nanorod Hazırlanışı	77
6.6.1.2	Glutamin Biyosensörünün Hazırlanması	79
6.6.2	Glutamin Biyosensörünün Çalışma Aralıklarının ve Eğiminin Belirlenmesi	80
6.6.3	Glutamin Biyosensörünün Performansına Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi	81
6.6.3.1	Glutamin Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği	81

BÖLÜM 7	82
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	82
7.1 Glutamin Biyosensörünün Kalibrasyon Grafiği	82
7.2 Tampon Konsantrasyonunun Etkisi.....	83
7.3 pH'ın Etkisi.....	84
7.4 Sıcaklığın Etkisi.....	85
7.5 Girişim Etkisinin İncelenmesi	86
7.6 Karıştırma Hızının Etkisi	88
7.7 Cevap Süresi	88
7.8 Raf Ömrü	89
7.9 Tekrarlanabilirlik	90
7.10 Enzim Kinetik Parametrelerinin (Km ve Vmax değerleri) Belirlenmesi	91
7.11 Gerçek Numunelerde Glutamin Tayini.....	92
7.11.1 GNC L-glutamin Tozunda Glutamin Tayini	92
BÖLÜM 8	94
SONUÇ.....	94
KAYNAKLAR	96
ÖZGEÇMİŞ	103

SİMGE LİSTESİ

%	Yüzde
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
dL	Desilitre
g	Gram
Km	Michaelis Menten sabiti
L	Litre
Log	Logaritma
M	Molar
mg	Miligram
mM	Milimolar
mV	Milivolt
nA	Nanoamper
Rpm	Rounds per minute
s	Standart Sapma
U	Unite
V _{max}	Maksimum hız
ΔmV	Milivolttaki değişim

KISALTMA LİSTESİ

BOD	Biyokimyasal oksijen sistemi
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CS	Kitosan
DNA	Deoksiribonükleik asit
GC	Gas Chromatography
Gln	Glutamin
GlnBP	Glutamin bağlayıcı protein
GOD	Glukoz oksidaz
HCl	Hidroklorik asit
HMT	Hekzametilen tetramin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ISE	İyon seçici elektrot
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
LIF	Laser Induced Fluorecence
MS	Mass Spectroscopy
MWNT	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
NW	Nanotel
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TCA	Trikarboksilik asit

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Glutamin ve üç boyutlu yapısı	4
Şekil 2.2	Amonyak metabolizmasında glutaminin yeri	6
Şekil 2.3	Glukoz-alanin döngüsü	7
Şekil 2.4	Glutaminin üre döngüsüne katılması	8
Şekil 2.5	Glutamin biyosentezi	9
Şekil 2.6	Kitosanın kimyasal yapısı	17
Şekil 3.1	Nanopartikül ve nanorodlarda elektron transferi	21
Şekil 3.2	Hekzagonal ZnO yapısı.....	23
Şekil 3.3	ZnO nanorodların silisyum yüzey üzerinde VS metodu ile büyüme mekanizması	25
Şekil 4.1	Enzimin substratla bağlanma şekilleri: Enzim-substrat ve enzim-substrat kofaktör ilişkisi	29
Şekil 4.2	Enzimin yapısı	31
Şekil 4.3	Enzimlerde indüklenmiş uyum modeli	33
Şekil 4.4	Glutaminaz enziminin dahil olduğu enzim sınıfı.....	35
Şekil 4.5	Glutaminaz enziminin yapısı	36
Şekil 4.6	Enzim molekülünün glutaraldehid ile çapraz bağlanması	44
Şekil 4.7	Enzim molekülünün jel içinde veya polimer matrikste tutuklanması.....	44
Şekil 4.8	Enzim molekülünün elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu	45
Şekil 4.9	Enzim molekülünün film veya tabakaya çapraz bağlanması	46
Şekil 4.10	Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri.....	46
Şekil 4.11	Kitosan'ın kimyasal yapısı	48
Şekil 5.1	Clark'ın enzim elektrodu	51
Şekil 5.2	Biyosensörün yapısı	51
Şekil 5.3	Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması	52
Şekil 5.4	Bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi (A: Analizlenecek madde, B: immobilize enzim tabakası, C: iletici ve D: Ölçüm sistemi).	62
Şekil 5.5	Bir biyosensör sisteminde bulunan bileşenler.....	63
Şekil 5.6	Enzim sensörünün genel çalışma ilkesi (A: Substrat, B: Kosubstrat veya Koenzim, C ve F: Ürünler, ç: Ölçüm çözeltisi içindeki, t: Biyoaktif tabakadaki ve y: Elektrot yüzeyindeki konsantrasyonlar; D.T.: Difüzyon tabakası, Ö.Ç.: Ölçüm çözeltisi, B.T.: Biyoaktif tabaka, İ: iletici).	63
Şekil 5.7	Potansiyometrik ölçüm sisteminin sematik olarak gösterimi	66
Şekil 6.1	Nanorodların SEM görüntüsü.	78

Şekil 6.2	<i>Hypocria jecorina</i> 'dan üretilen glutaminaz enzimi ve ZnO nanorodlar kullanarak hazırlanan glutamin biyosensörü. Glutaminaz (♥), ZnO nanorod (⊖) and chitosan (■).	80
Şekil 6.3	Glutamin biyosensörü' nün hazırlanma şeması	80
Şekil 7.1	Glutamin biyosensörünün kalibrasyon grafiği.....	82
Şekil 7.2	Glutamin biyosensörünün eğiminin tampon konsantrasyonu ile değişimi.....	83
Şekil 7.3	Glutamin biyosensörünün eğiminin pH ile değişimi	84
Şekil 7.4	Glutamin biyosensörünün eğiminin sıcaklık ile değişimi.....	86
Şekil 7.5	45 gün sonunda glutamin biyosensörünün elde edilen eğim değerindeki değişme	89
Şekil 7.6	Glutamin biyosensörünün 10 kez alınan ölçüm sayısına karşılık yüzde bağıl cevabı	90
Şekil 7.7	Glutamin biyosensöründeki glutaminaz için Lineweaver-Burk grafiği.....	92
Şekil 7.8	Glutamin biyosensörü ile standart katma yönetimi kullanılarak 10^{-5} M glutamin çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği.....	93

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1	ZnO'in fiziksel özellikleri..... 24
Çizelge 4.1	Glutaminaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar 38
Çizelge 4.2	İmmobilizasyon yöntemine göre biyosensörün ortalama ömürleri41
Çizelge 4.3	Enzim immobilizasyonunda kullanılan maddelerde (taşıyıcı) bulunan reaktif gruplar ve reaksiyona girdikleri amino asitlerin fonksiyonel grupları 42
Çizelge 4.4	Enzimlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonunda bağ oluşumuna katılan aminoasitlerin reaktif grupları 43
Çizelge 5.1	Biyosensörde tayin edilebilen maddeler 55
Çizelge 5.2	Biyosensörlerde kullanılabilen biyoaktif bileşenler 56
Çizelge 5.3	Biyosensörlerde kullanılan ölçüm sistemleri 56
Çizelge 5.4	Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz olanakları 59
Çizelge 5.5	Enzim sensörlerinin sınıflandırılması 65
Çizelge 6.1	Glutamin kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması 76
Çizelge 6.2	Glutamin çözeltilerinin hazırlanması 77
Çizelge 7.1	25,0±1,0°C'da hazırlanan glutamin biyosensörünün eğimi ve çalışma aralıkları 82
Çizelge 7.2	25,0±1,0°C'da kitosan kullanılarak hazırlanmış glutamin biyosensörünün cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi 83
Çizelge 7.3	25,0±1,0°C'da Glutamin biyosensörünün cevabına pH'nın etkisi..... 84
Çizelge 7.4	Glutamin biyosensörünün cevabına sıcaklığın etkisi 85
Çizelge 7.5	Glutamin biyosensörüne askorbik asit ve bazı amino asitlerin girişim oranları 87
Çizelge 7.6	Hazırladığımız glutamin biyosensörü ile GNC L-glutamin tozu örneğinde glutamin tayini ile elde edilen sonuç..... 93

ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜL TEMELLİ GLUTAMİN BİYOSENSÖRÜ TASARLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Dilruba ALBAYRAK

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emine KARAKUŞ

Tıp, eczacılık, biyoteknoloji ve çevre alanlarında bir takım maddelerin hızlı, ucuz, kısa zamanda, pahalı analitik cihazlara ihtiyaç duymadan ve güvenilir olarak tayin edilebilmeleri için yapılan çeşitli çalışmalar büyük önem taşımaktadır.

Son yıllarda metal oksit yarı iletkenler, gösterdikleri performans nedeniyle elektronik alanda sensör tasarlanmasında ve biyomedikal bilimler gibi oldukça geniş alanlarda kullanılmaktadır. Bu tür yarı iletken nanoyapıların elektron transfer kinetikleri ve adsorpsiyon kapasiteleri yüksek olduğu için biyomoleküllerin immobilizasyonu ve biyosensör tasarlanmasında kullanımı uygundur. Metal oksit yarı iletkenler arasında çinko oksit (ZnO), günümüzde biyoyumlu, biyobozunur ve biyogüvenli olması nedeniyle biyoteknolojik ve medikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Glutamin, kaslarda amino asit havuzunun %60'ını ve vücutta toplam amino asit döngüsünün %20'sini oluşturur. Glutamin'in temel olarak sağladığı faydalar; büyüme hormonunun salgılanmasına yardımcı olmak, hücrelerin azot alımını zenginleştirmek, protein sentezini artırmak, hücre hidrasyonunu artırmak, hücre iyileşmesini maksimize etmek, kas yıkımını engellemek, vücutta oluşan toksin maddeleri temizlemek, hücrelere azot taşımak, bağışıklık sistemini güçlendirmek ve enerji vermektir. Genel sağlık açısından ele alındığında; glutamin, yara veya yanıkların iyileşmesini hızlandırır, enfeksiyon oluşumunu engeller ve tüm kaslarda dayanıklılığı artırır. Glutamin, protein metabolizmasında önemli bir rol alır, vücut geliştirenler için en önemli amino asittir ve kas yıkımının önlenmesi için gereklidir.

Bu çalışmada öncelikle gümüş tel üzerine çinko oksit nanorod kaplanarak elektrot hazırlanmıştır. Çinko oksit nanorod kaplanan elektrot yüzeyine, glutaminaz enziminin

kitosan kullanarak immobilizasyonu ile glutamin biyosensörü hazırlandı. Biyosensörlerin optimum çalışma koşullarını belirlemek amacı ile tampon konsantrasyonu, tampon pH'sı ve ortam sıcaklığının elektrot cevabı üzerine etkileri incelenmiş, enzim elektrodunun raf ömrü, tekrarlanabilirliği, tayin aralığı belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, hazırlanan glutamin biyosensörü ile GNC L-glutamin tozunda glutamin tayini standart katma yöntemi ile yapılarak elde edilen sonuç referans değeri ile karşılaştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: Biyosensör, biyomedikal, biyomolekül, glutamin, glutaminaz, çinko oksit nanorod, kitosan, potansiyometrik, glutamin biyosensörü.

ABSTRACT

CONSTRUCTION and CHARACTERIZATION OF GLUTAMINE BIOSENSOR BASED ON ZINC OXIDE NANOPARTICLE

Dilruba ALBAYRAK

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

The demand for fast, reliable, and continuous measurements of chemical species in medicine, biotechnology and environmental sciences has evolved the need for small, easy to handle, and inexpensive analytic devices.

Recently, nanomaterials have attracted tremendous interest due to their important performance. Metal oxide semiconductors have attracted much interest because of its broad range of applications in electronics, sensors, transducers, and biomedical sciences. These nanostructures also show high electron transfer kinetics and strong adsorption capability, providing suitable microenvironments for the immobilization of biomolecules and improved biosensing characteristics. Among them, zinc oxide (ZnO) nanoparticle is one of the most important nanomaterials for nanotechnology because it is biocompatible, biodegradable, and biosafe for biotechnological and medical applications in today's research.

Glutamine, creates % 60 of amino acid pool in muscles and % 20 of the total amino acid cycle in the body. The benefits of glutamine as a basis; to help secretion of growth hormone, to enhance nitrogen uptake of cells, increase protein synthesis, to increase cell hydration, to maximize cell recovery, prevent the destruction of muscle, clean up toxic substance which form in the body, move nitrogen to cells, boost the immune system and give energy. Taken in terms of general health; glutamine accelerates healing of wounds or burns, prevents the formation of infection and increases strength all muscles. Glutamine is an important role in protein metabolism and it is the most important amino acid for the developers of the body.

In this study, first of all, the electrode was prepared with coating zinc oxide nanorod on silver wire. The glutamine biosensor was prepared immobilization of glutaminase enzyme by using chitosan on the zinc oxide-coated electrode surface. with using chitosan to immobilization of enzyme glutaminase on zinc oxide coated electrode surface. To determine the optimum working conditions of the biosensor; examined the effect of buffer concentration, buffer pH, and media temperature on the electrode response and determined shelf life, repeatability and determination range. Additionally, the glutamine assay in GNC L-glutamine powder was also carried out with our prepared glutamine biosensor. The obtained results was compared with reference value.

Key words: Biosensor, biomolecules, biomedical, glutamine, glutaminase, zinc oxide nanorod, chitosan, potentiometric, glutamine biosensor.

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Maddeyi atomik ve moleküler seviyede kontrol edebilen nanoteknoloji birçok alanı kapsayan bir bilim dalıdır. Nanoteknoloji sayesinde daha az yer kaplayan, daha az enerji harcayan ürünler daha az maliyetle daha fazla üretilebilmektedir. Bu sebeple günümüzde bilim araştırmacıları, nanoteknoloji alanında birçok çalışmalar yapmaktadır.

Çinko Oksit nanopartikül temelli glutamin biyosensörümüzde kullanılan ZnO nanorodlar, yüksek spesifiklik, yüzey alanı, toksik olmama, kimyasal stabilite, elektrokimyasal aktivite ve yüksek elektron iletkenliği gibi özelliklere sahiptir. Bu özellikleri sebebiyle ZnO nanorodlar, biyosensör uygulamalarında geniş kullanım alanına sahiptir.

Biyosensörler, tıp, tarım, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel alanda önemli rol oynar. Biyosensör teknolojisinin temel amacı, pratik ve ekonomik analize imkan verecek ticari sensör geliştirilmesidir. Glutamin için uygun, bugünkü biyosensörler, glutaminaz enziminin immobilizasyonuna dayanır [1], [2]. Glutamin genellikle, standart yöntemler olan ve enzimatik reaksiyona dayalı HPLC, spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerle tayin edilebilmektedir. Literatürde, biyosensör esaslı glutamin tayin yöntemleri olarak, amperometrik ve optik biyosensörler geliştirilmiş ancak glutamin tayini için potansiyometrik biyosensörlere rastlanmamıştır.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada, ticari olarak satılan GNC L-glutamin tozunda glutamin tayini için kullanılmak üzere, hazırlamış olduğumuz ZnO nanorod yüzeyine glutaminaz enziminin elektrostatik olarak immobilize edilmesi ile potansiyometrik esaslı glutamin biyosensörü hazırlanması amaçlanmıştır. Biyosensörümüzün optimum çalışma koşullarını belirlemek amacı ile tampon konsantrasyonu, tampon pH'sı, enzim miktarı ve ortam sıcaklığının elektrot cevabı üzerine etkileri incelenerek, enzim elektrodun raf ömrü, tekrarlanabilirliği, duyarlılığı, tayin aralığı ve tayin sınırı belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu çalışmada, hazırlanan glutamin biyosensörü ile GNC L-glutamin tozunda glutamin tayini yapılarak elde edilen sonuçlar standart yöntem ile karşılaştırılması da tezin kapsamı dahilindedir.

1.3 Hipotez

Tez çalışmamızda, elektriksel, optik, fiziksel ve fotokatalist özelliğinden dolayı bilim dünyasının ilgi odağı olan, biyoyumluluğu ve toksik olmaması nedeniyle de biyoteknolojik araştırmalarda tercih edilen ZnO nanorod kullanılarak hem elektriksel sinyalin daha iyi iletilmesi hem de glutaminaz enziminin elektrot yüzeyine immobilizasyonu sağlanmıştır. Bu yöntem kitosan kullanımı ile geliştirilerek analitik özellikleri daha iyi olan bir glutamin biyosensörü geliştirilmiştir ve biyosensörün gerçek numunede bozucu türlerin önemli bir girişim etkisi olmaksızın uygulanabilirliği ispat edilmiştir. Yapılan tüm çalışmalarımız amacına ulaşarak, biyosensörümüzün optimum koşullarını belirledikten sonra gerçek numunelerde glutamin tayinini başarı ile gerçekleştirebildik. Literatürde potansiyometrik esaslı glutamin biyosensörüne rastlanmamış olması çalışmamızın özgün olduğunu göstermektedir.

BÖLÜM 2

GLUTAMİN

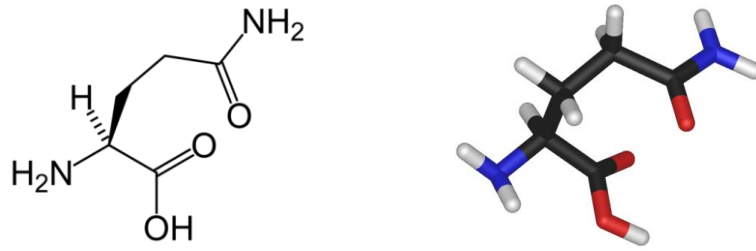
Glutamin (Gln), proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biridir. Molekül formülü $C_5H_{10}N_2O_3$ 'dür ve molekül ağırlığı 146,15 g/mol'dür. Sistemik adı (2S)-2-amino-4-carbamoyl-butanoik asittir. Glutamin doğada en çok bulunan ve esansiyel olmayan polar yüksüz bir aminoasittir [3].

Yan zincirinde karboksamit grubu içerir. Polar özelliktedir, ancak fizyolojik pH'da yüksüzdür. Pürin ve pirimidin sentezi ve amino gruplarının plazmada taşınmasında rol oynar [4]. Böbrek tübülüs hücresinde serbest amonyak oluşturur. Bu reaksiyon glutaminaz tarafından katalizlenir ve asit-baz düzenlenmesinde yer alır. Metabolik asidozda glutaminden amonyum oluşumu artar, alkalozda azalır. Glutamin, aminoşeker sentezinde amino grubu vericisi olarak yer alır [5]. L-glutamin sığır etinde, tavuk, balık, yumurta, süt ve süt ürünlerinde, lahana, pancar, ıspanak, fasulye ve maydonozda bulunur. L-glutamin, aynı zamanda sebze sularında ve fermente gıdalarda az miktarda bulunur.

Glutamin, vücutta azot taşınmasına da yardımcı olur. Azot, kas kazanımı için gereklidir ve glutamin vücut boyunca bu hareketi destekler. Ayrıca glutaminin adalenin glikojen depolama yeterliğine de etkisi vardır. Kaslarda amino asit havuzunun %60'ını ve vücutta toplam amino asit döngüsünün %20'sini glutamin oluşturur. Diğer amino asitlerin aksine sadece glutamin'in 2 azot atomu vardır ve nitrojen mekiği olarak bilinir. Vücudun en çok hangi bölgesinde gereksinim varsa o bölgeye azot taşır. Azot, yeni kas dokularının oluşumunda ve mevcut kas dokularının büyümesi ve tamirinde önemli bir rol oynar. En fazla kas büyümesini sağlayabilmek için, vücuda en fazla miktarda azot takviyesi yapmak gerekmektedir. Glutamin tüm amino asitler içinde en çok fonksiyona sahip olan temel bir amino asittir. Vücudun proteinlerinin yapısal içeriği olmasının yanı

sıra, sistemden fazla amonyağın atılması için de bir araç görevi görür. Esasnsiyel aminoasitler arasında anılmasada, L-glutamin başta beyin olmak üzere vücut için bir yakıt kaynağıdır.

Glutamin, gastrointestinal sistemin sağlığında da önemli bir role sahiptir. Hücrelerin ince bağırsak boyunca ve kan dolaşımına doğru su absorbe etmesine yardımcı olur. Bu durum, dehidrasyon, ishal, vitamin, mineral ve gerekli besin kaybını önler [6]. Glutamin esansiyel olmayan ve glokojenik bir aminoasittir. Molekül formülü ve 3 boyutlu yapısı aşağıda gösterilmektedir [7]. (Şekil 2.1)



Şekil 2.1 Glutamin ve üç boyutlu yapısı

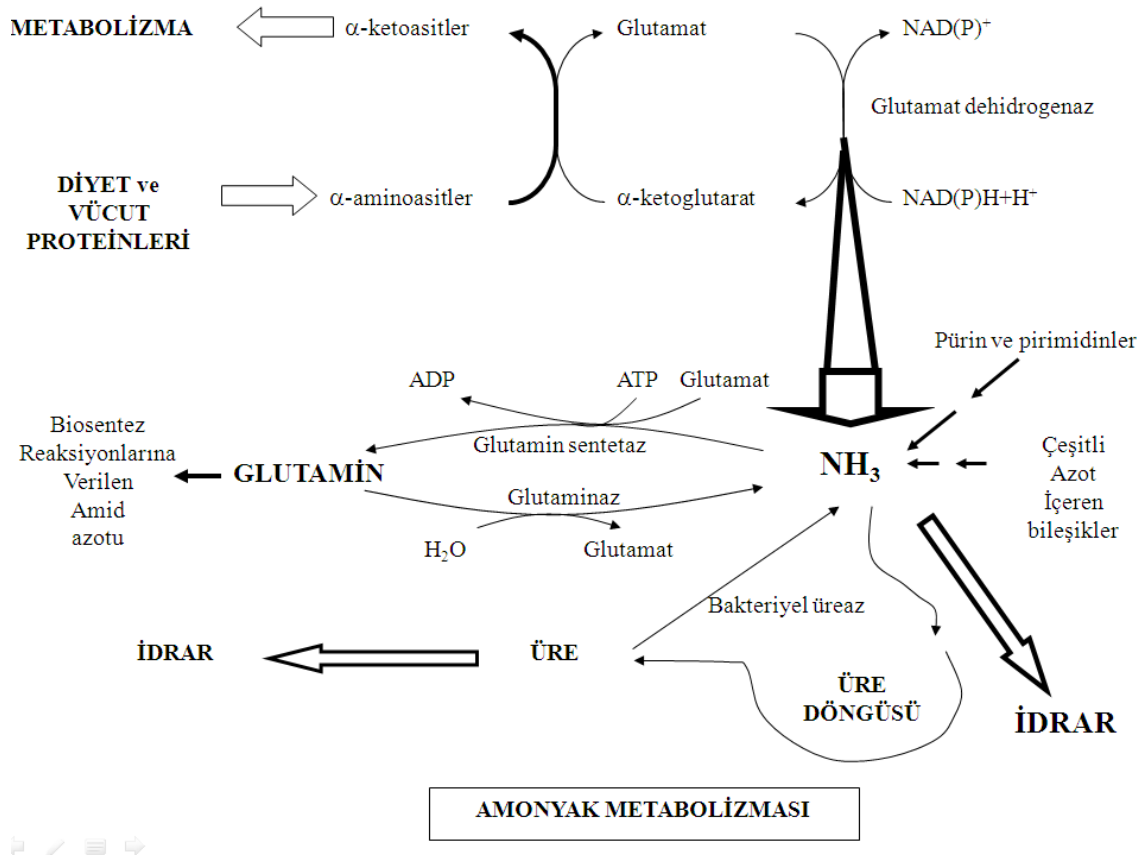
2.1 Glutaminin Fonksiyonları

Glutaminin birçok biyokimyasal fonksiyonu vardır. Bunlardan bazıları;

- DNA sentezinde substrattır. Özellikle nükleotit sentezinde, glutamat sentezinde ve antioksidan savunmada önemi olan glutatyon sentezinde, glikoneogenezde görev alır.
- Protein sentezinde önemli bir role sahiptir.
- Enterositler (ince bağırsak hücreleri) için birincil yakıt kaynağıdır.
- Hızlı bölünen bağışıklık hücreleri uyarıcısıdır ve böylece bağışıklık sisteminin çalışmasına yardımcı olur.
- Amonyum üreterek, böbreklerde asit-baz dengesini düzenler.
- Beyin için alternatif yakıt kaynağıdır ve kortizol-indüklenmiş protein katabolizmasını durdurmaya katkıda bulunur.

- Heterositler sayesinde sabit bir nitrojen formu olarak, değişmemiş siyanobakteri hücresinden fotosintata dönüşür.
- Beyinden kana ulaşan tek aminoasittir.
- Metabolizmasının beyne olumlu yönde etkisi vardır. Amonyanın zehirli etkisini giderir.
- Bağırsak zarını korur ve bağışıklık sistemini güçlendirir [3].
- Glutamin, kırmızı kan hücreleri ve gliadan oluşan ve beyni kandaki toksinler, bakteriler ve virüslerden koruyan, kan-beyin bariyerini direkt olarak geçebilen tek amino asittir [8].

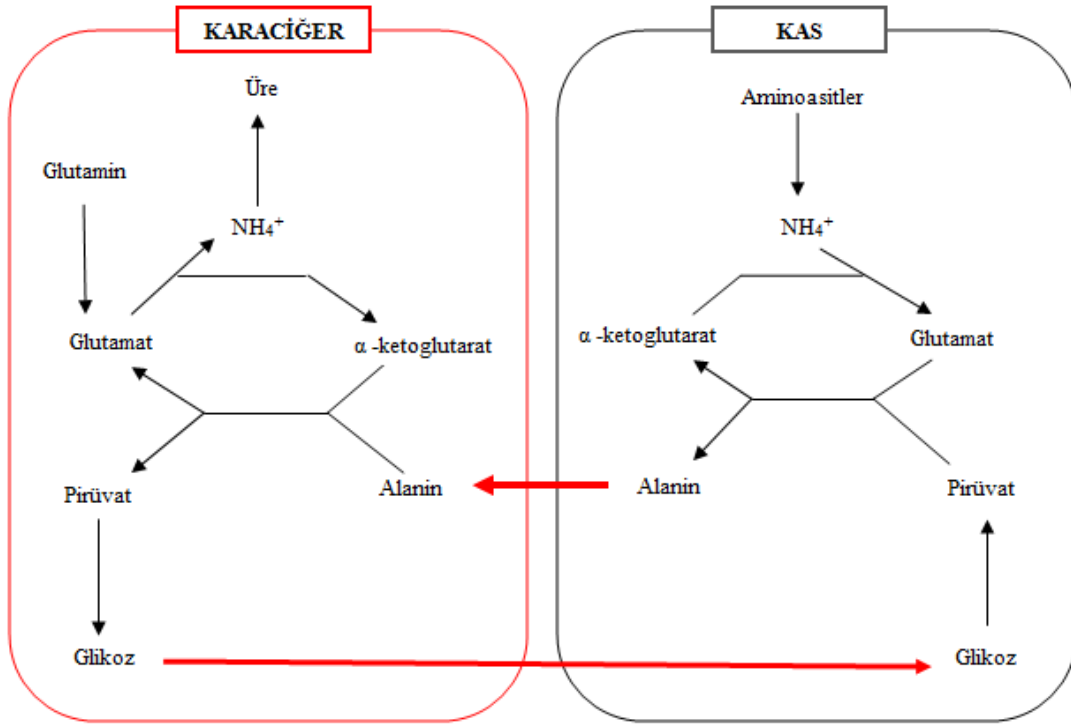
Glutamin'in temel olarak sağladığı faydalar; büyüme hormonunun salgılanmasına yardımcı olmak, hücrelerin azot alımını zenginleştirmek, protein sentezini artırmak, hücre hidrasyonunu artırmak, hücre iyileşmesini maksimize etmek, kas yıkımını engellemek, glikoz fonksiyonunu optimize etmek, vücutta oluşan toksin maddeleri temizlemek, kaslarda protein azalmasını önlemek, hücrelere azot taşımak, asit dengesini sağlamak, bağışıklık sistemini güçlendirmek ve enerji vermektir. Kısacası glutamin, hem anabolik hem de anti katabolik bir amino asittir. Genel sağlık açısından glutamin ele alındığında; yara veya yanıkların iyileşmesini hızlandırır ve enfeksiyon oluşumunu engeller. Bu sebepten dolayı ameliyat sonrasında hastalara glutamin takviyesi verilir. Ayrıca bağırsakların sağlıklı olmasında temel madde yine glutamindir. Sinir ve psikoloji sağlığını destekler. Ayrıca glutamin amonyanın taşınmasında rol oynar ve üre döngüsüne katılır. Diyetle alınan vücut proteinleri metabolize olarak alfa-ketoasitlere dönüşür ve toksik olan amonyanın zehirsizleştirilmesinde rol oynar aynı zamanda üre döngüsüne de katılır [9]. (Şekil 2.2)



Şekil 2.2 Amonyak metabolizmasında glutaminin yeri [10]

Toksik bir madde olan amonyaktan glutamin sentez edilerek zararsız bir bileşik halinde vücutta dolaşması sağlanır.

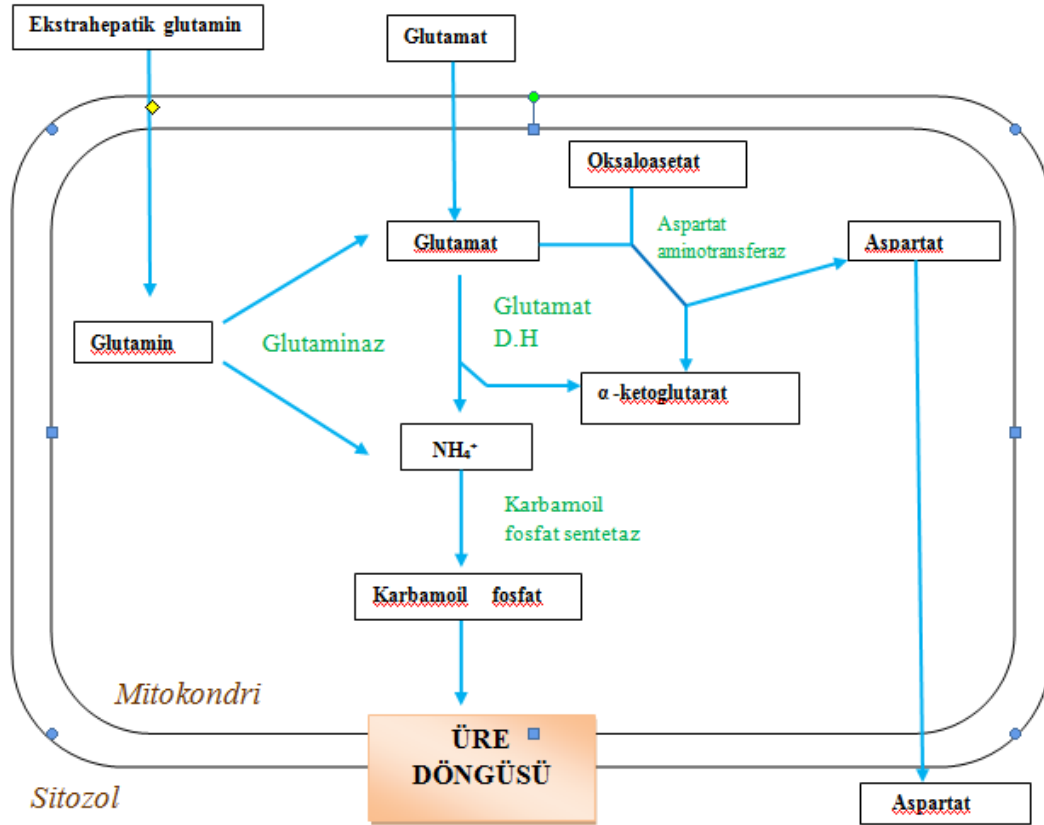
Amonyanın vücuttaki taşınma yöntemlerinden diğeri ise Glikoz-Alanin döngüsüdür. Amino asitlerin amino grupları genellikle, ilk olarak karaciğer hücrelerinin sitosolünde α -ketoglutarata taşınır ve glutamat oluşturulur. Glutamat mitokondriye taşınır. Sadece burada glutaminin amino grubu NH_4^+ oluşturmak üzere uzaklaştırılır. Glutamin bu şekilde karaciğerden toksik bir madde olan amonyağın atılmasına yardımcı olur. Birçok dokuda oluşturulan amonyağın fazlası glutaminin amid azotuna dönüşerek karaciğer mitokondrisine aktarılır. Karaciğerde bulunan fazla azot amonyağa dönüşeceğine glutamik asite bağlanarak glutamine dönüşür [11], [12]. (Şekil 2.3)



Şekil 2.3 Glukoz-Alanin döngüsü

Glikoz-alanin döngüsünde, kas dokusunda transaminasyonla pirüvattan oluşan alanin, kan yolu ile karaciğere taşınarak yeniden pirüvata çevrilir. Karaciğerde pirüvattan glikoneogenez ile oluşan glukoz, kan dolaşımı ile kas dokusuna gelir. Karaciğerde transaminasyonla alaninden pirüvat oluşurken α -ketoglutarata aktarılmış olan amonyak daha sonra serbest bırakılır. Böylece kas dokusundaki amino asit azotu, üre sentezinde kullanılmak üzere karaciğere taşınmış olur [11].

Ekstrahepatik glutamin mitokondriye gelerek, glutaminaz enzimiyle glutamata ve amonyuma, glutamat ise mitokondride glutamat dehidrogenaz ile amonyuma ve α -ketoglutarata çevrilir, amonyum da karbamoil fosfat sentetaz ile karbamoil fosfata çevrilerek üre döngüsüne katılır [12]. (Şekil 2.4)



Şekil 2.4 Glutaminin üre döngüsüne katılması

Üre döngüsü; karaciğerde gerçekleşir ve toksik bir madde olan amonyağın daha az toksik bir madde olan üreye çevrilmesini sağlar. Daha sonra üre kana verilerek böbreğe gönderilir, oradan da idrar ile vücuttan atılır. Amaç toksik amonyağın daha az toksik olan üre dönüştürülmesidir. Arginaz enzimi yalnızca karaciğerde bulunduğu için bu döngü karaciğerde gerçekleşir [12].

2.2 Glutamin Sentez ve Yıkımı

Vücutta glutamin sentezi özellikle iskelet kası ve beyinde, yıkımı ise barsaklar ve böbrekte olmaktadır. İskelet kasında serbest intraselüler amino asitlerin %60'ı glutamindir ve glutamin diğer dokular için başlıca kaynak yeridir [13].

2.2.1 Glutamin sentezi

Glutamin birçok dokuda sentezlenmektedir. Ancak malnütrisyon, yedi günden uzun süren açlık, katabolik durumlar, ameliyat yaralarının iyileşmesi, travma, sepsis ve yanık

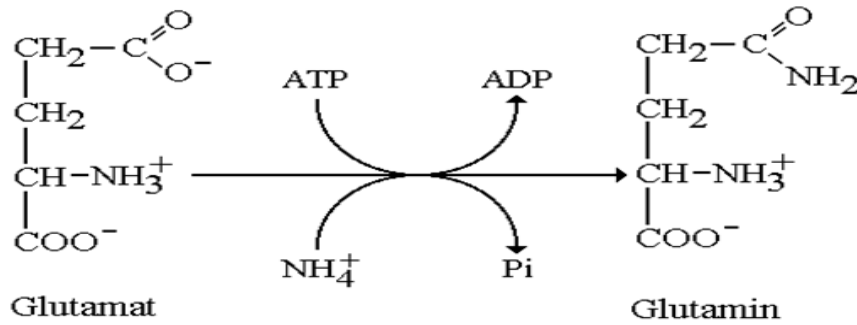
gibi stresli durumlarda vücut ihtiyacı sentez kapasitesini aşmaktadır. Bu durumda glutaminin hücre içi konsantrasyonunda ve plazma seviyesinde sırasıyla normalden %50 ve %30 kadar azalma görülür. Bu da glutaminin "duruma göre esansiyel bir amino asit" olduğunu göstermektedir [13].

Amonyakın uzaklaştırılması üç şekilde meydana gelir:

1. Üre sentezi
2. Glutamat sentezi
3. Glutamin sentezi

Serbest amonyak, glutamin haline dönüştükten sonra toksik özelliği ortadan kalkmaktadır. Amonyak bu şekilde depolanır ve taşınır. Glutamin sentezi başlıca karaciğer, böbrek ve kasda gerçekleşir. Glutamin beyin için de çok önemlidir. Bu yüzden dolaşımda diğer amino asitlerden daha fazla miktarda bulunur. Böbrekler tarafından alınıp, glutaminaz ile deamine edilir [14].

Glutamin, glutamatın amidi olup, glutamat ve amonyaktan, glutamin sentetaz enziminin katalitik etkisiyle ve ATP'den sağlanan enerji ile tersinmez bir reaksiyonla oluşur [15]. (Şekil 2.5)



Şekil 2.5 Glutamin biyosentezi [15]

2.2.2 Glutamin Yıkımı

Böbreklere gelen glutamin, burada glutaminaz ve glutamat dehidrogenaz enzimleri ile parçalanarak 2 mol serbest amonyak elde edilir. Bu amonyak asit-baz düzenlenmesinde kullanılır [16].

Karaciğer ve böbrek problemi olanlar, Reye sendromu hastaları ve kanda amonyak birikmesine neden olacak hastalığı olanlar glutamin takviyesi kullanmamalıdır. Glutamin takviyesi bu hastalıkları şiddetlendirebilir [8]. Reye sendromu; nezle ya da su çiçeği gibi virüsten kaynaklanan bir hastalıktan sonra görülebilen, nadir rastlanan; fakat ciddi bir hastalıktır. Reye sendromu birçok farklı organa zarar verebilir; ancak çoğunlukla karaciğeri ve beyni etkiler ve bazen de beyne zarar verip ölümlere neden olabilir [17].

2.3 Glutamin Tayin Yöntemleri

Glutamin insan vücudunda en yüksek düzeyde bulunan amino asit olup, amonyak metabolizmasında önemli role sahiptir. Glutamin, ökaryotik hücre kültürlerinde kullanılan önemli enerji ve azot kaynağıdır [18], [19]. Glutamin yıkımı, hücre büyümesinde toksik olabilen ve böylece büyümeyi inhibe eden amonyak yapımına yol gösterdiği için izlenen glutamin konsantrasyonları en önemli basamaktır [20], [21]. Üre ve glutamin metabolizması yakından ilgili olduğundan, amonyak zehirlenmesi, hiperamonya ve protein intoleransı gibi amonyak dengesizliğine yol açan hastalıklar da glutamin seviyelerini etkiler [22], [23].

Patolojik olgularda tanıyı destekleme ve hastalığın seyrini izleme, ayrıca glutaminin girdiği normal veya patolojik metabolik olayların mekanizmalarını aydınlatma açısından glutamin tayini önem kazanmaktadır. Biyolojik sıvılarda ve gıda örneklerinde birtakım maddelerin düzeylerinin doğru ve hassas olarak belirlenmesi hastalık teşhislerinde ve gıdaların kalite kontrollerinde gerekli parametreler olduklarından bunların hızlı ve basit bir şekilde belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla son yıllarda biyosensörlerin kullanımı gündeme gelmiştir.

Günümüzde amino asit tayinlerinde ince tabaka kromatografisi (İTK)'den çok, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC), anyon ve katyon değiştirici kromatografiler ile kombine çalışan amino asit analizörleri, fluorometrik ve radyoaktif metodlar gibi ileri teknoloji gerektiren yöntemler uygulanmaktadır. Yine de İTK kısa, ucuz ve basit olduğu için günümüzde hala kullanılabilir [24],[25],[26]

Glutamin genellikle, standart yöntemler olan ve enzimatik reaksiyona dayalı HPLC, spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerle tayin edilebilmektedir. Ancak biyolojik örneklerde ve gıdalarda bulunan bazı maddelerin tayini için çeşitli yöntemler

kullanılmasına rağmen, bunların tayini için kullanılan HPLC ve kromatografik yöntemlerinin ekipmanlarının pahalı olması, aletlerin kullanımının uzmanlık gerektirecek düzeyde dikkat ve itina istemesi ve laboratuvar şartlarında uygulanabilirliğinin sınırlı olması gibi faktörler bu yöntemlerin cazibesini azaltmaktadır.

Enzimatik-spektrofotometrik esaslı yöntemler ise, çeşitli reaktiflerle reaksiyon sonucu oluşan renkli bileşiğin absorpsiyonunun ölçümüne dayanmaktadır. Ancak bu yöntemlerde, düşük miktardaki örnekleri tayin etme gücü bulunmasının yanı sıra, askorbik asit, ürik asit, glukoz, ketonlar ve sefalosporin türü antibiyotiklerin kanda yüksek konsantrasyonda bulunması halinde bunlar girişim etkisi yapabilir.

2.3.1 Biyosensör Esaslı Glutamin Tayin Yöntemleri

Glutaminin daha basit, ucuz, doğru ve duyarlı tayinine olanak sağlayan biyosensörlerin geliştirilmesi çok önemli bir ilerlemedir. Glutamin için uygun, bugünkü biyosensörler, glutaminaz enziminin immobilizasyonuna dayanır [1], [2].

2.3.1.1 Optik Sensörler

Son yıllarda doğal ilgi ve özgülüğü temel alan floresans sensörleri geliştirilmiştir [27], [28]. Bu yöntem mutagenез ve aminoasit dizilerinde değişikliklere olanak sağlamıştır. Genetik ve protein mühendisliği kullanarak glutaminin optik hücre kültürlerinde glutamin konsantrasyonlarının tayini için optik biyosensör geliştirilmiştir [29].

2.3.1.2 Amperometrik Sensörler

Genel anlamda amperometri, bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Amperometrik biyosensörlerde, oksijen ve H_2O_2 elektrotları en popüler olanlarıdır. Hidrojen peroksit tayinine dayalı amperometrik glutamin elektrodu yapılmıştır [30]. Ayrıca glutaminaz ve glutamat oksidazın jelde tutuklanmasıyla immobilize edilmesiyle, glutamin ve glutamat biyosensörleri ince film teknolojisiyle üretildi ve ölçüm hidrojen peroksidin anodik reaksiyonuna dayanmaktadır [31].

2.3.1.3 Kapiler Elektroforez Yöntemi

Elektroforez, iletken bir çözelti içindeki yüklü/yüksüz parçacıkların veya moleküllerin bir elektriksel alan varlığında göç etmesidir.

2.3.1.4 Laser Induced Fluorecence (LIF)

Bu yöntem, molekülleri elektromagnetik radyasyonun adsorpsiyonuyla uyarılmış halden yüksek enerji seviyelerine optik emisyonunu esas alır. Çocuklardaki menenjit hastalığının teşhisi için, beyin omurilik sıvısı (BOS) içinde glutamin ve glutamat tayini, LIF ve kapiler elektroforez (CZE-LIF) yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir [32].

2.3.1.5 Potansiyometrik Sensörler

Potansiyometrik glutamin enzim elektrotları, bakteri, doku ve enzimlerin immobilize edilerek kullanılmasıyla amonyak tayinine dayanır [33], [34], [35]. Potansiyometrik glutamin biyosensörlerinde çok az alete ihtiyaç duyulması avantaj vardır. Bunlarda sadece iyon- seçici elektrot, pH - seçici elektrot ve iyon - seçici alan etkili transistörlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Literatürde glutaminin tayini için potansiyometrik-esaslı biyosensörlere rastlanmamış olması tez çalışmamızın özgün olduğunu göstermektedir. Ayrıca, amperometrik enzim elektrodu kullanılarak yapılan biyosensörlerde glutamatın girişim yapması nedeniyle çift enzim sensörleri kullanılmıştır. Glutamin elektroduna endojen amonyağın, glutamatın ve askorbik asitin girişim yaptığı belirtilmiştir [30]. Yine yapılan amperometrik çift enzim sensöründe; glutamat sensör okumasıyla birlikte glutamat oksidazın yan aktivitesi olarak aspartik asit ve asparajinazın girişim yaptığı gözlenmiştir [31]. Bu ve bunun gibi sıkıntıları yapmış olduğumuz bu çalışma esnasında yaşayacağımızı düşünmüştük. Ancak glutaminaz enziminin tek başına immobilize edilmesi sonucu hazırlamış olduğumuz potansiyometrik glutamin biyosensörü ile almış olduğumuz ölçümlerde, bu tarz bir sorunla karşılaşmadık. Glutamat girişimini önleyecek herhangi bir dış tabakaya ihtiyaç duymadık, askorbik asit girişimini engellemek için de bir iç membran kullanmadık [30]. Yapılan tüm optimizasyon çalışmalarımızda, ölçümlerimizi doğru bir şekilde alarak, en iyi çalışma koşullarımızı zorlanmadan belirleyebildik.

2.4 Glutamin ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Villarta ve arkadaşları 1992'de glutamat oksidaz ve glutaminaz enzimlerini tekrar aktive edilmiş immobilon –AV affinite membran üzerine birlikte immobilize ederek amperometrik enzim elektrodu geliştirdi. Amperometrik glutamin elektrodu Clark tipi enzim elektroduydü ve prob üretilen hidrojen peroksida duyarlı platin elektrodan oluşur. Biyosensörün optimum çalışma şartlarını; pH'sı 5.5 olarak bulmuşlar, bu şartlarda doğrusallığı $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 'dan $7.5 \times 10^{-4} \text{M}$ 'a kadar, tayin sınırını da $2.4 \times 10^{-4} \text{M}$ 'dan yüksek bulmuşlardır ve eğim 91nA/mM 'dır. Koruyucu membranların eklenmesiyle akım cevabının 10nA/mM 'a azaldığı, doğrusallığın ise $1.3 \times 10^{-4} \text{M}$ glutamine genişletildiği gözlenmiştir. Glutamin elektroduna; endojen amonyağın, glutamatın ve askorbik asitin girişim yaptığı belirtilmiştir. Glutamat girişimi; glutamat oksidaz/katalaz dış membranı dahil edilmesiyle elimine edilmiştir. Önemli askorbat girişimini engellemek içinse, selüloz asetat iç membranı kullanmışlardır. Hazırlanan biyosensörle; 6 sağlıklı yetişkin gönüllünün serum örneklerindeki glutamin içeriği ölçüldü. Glutamin konsantrasyonu 1.27mM , standart sapma 0.12 ve yüzde iyileşme de %104 olarak belirtilmiştir [30].

Male ve arkadaşları 1993'de hücre kültürlerinde glutamini belirlemek için akış enjeksiyon analizi (FIA) biyosensör sistemi geliştirmişlerdir. Gözenekli aminopropil cam boncuklar üzerine glutamat oksidaz ve glutaminaz enzimlerinin kovalent olarak immobilize edilmesiyle enzim kolonu oluşturmuşlardır. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksit + 0.7V akım uygulanarak amperometrik olarak tayin edilmiştir. Test edilen çeşitli anyon değiştirme reçineleri arasında endojen glutamatın, asetat anyon değiştirme reçineleri üzerine tamamen absorbe olduğu gözlenmiştir. Bu tip bir iyon değitiricinin aynı zamanda, aspartik asit, ürik asit ve askorbik asiti de absorbe ettiği gözlenmiştir. FIA biyosensörünün, $10 \mu\text{M}$ alt sapma limiti ile 1mM glutamin konsantrasyonuna kadar doğrusal olduğu, aynı zamanda $\pm 1.2\%$ 'lik bağıl hata ile iyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Her bir analiz, 17 saatlik bir verime karşılık gelen, numune alma ve yıkama da dahil olmak üzere 3.5 dakika içinde yapılmış. Anyon değiştirme kolonu 12 saat boyunca 200 analiz için kullanılabilmiştir. İmmobilize enzim kolonu'nun aktivite kaybı olmaksızın en az 500 kez tekrarlanan analiz için stabil olduğu belirtilmiştir. Bu biyosensör sistemi, böcek hücresi ve memeli hücresinde glutamin tayini için uygulandığında elde edilen sonuçlar HPLC ile karşılaştırılmıştır [36].

Moser ve arkadaşları 1995’de glutaminaz ve glutamat oksidazın jel tutuklamayla birlikte immobilize edilmesiyle, glutamin ve glutamat biyosensörlerini ince film teknolojisiyle üretti. Nötral pH aralığında optimum aktiviteye sahip glutaminaz nedeniyle glutaminin doğrudan izlemesini yapabildiler. Glutamin enzim sensörü hidrojel membran içinde glutamat oksidaz ile glutaminazın co-immobilizasyonu ile hazırlandı. Sensör cevabının 50 μ mol’den 10 mmol glutamin/L’deki konsantrasyon aralığı içinde lineer olduğu belirtilmiştir. Glutamat sensör okumasıyla birlikte glutamat oksidazın yan aktivitesi olarak aspartik asit ve asparajinazın girişim yaptığı gözlemlendi. Sensör üzerine glutamat sensörü entegre edilmesiyle, farklı ölçümlerle girişim elimine edilmiştir. Sensörlerin kararlılıklarının oldukça iyi olduğu ve performansında herhangi bir değişme olmadan en az 300 ölçüm için kullanılabildiği de belirtilmiştir [31].

Madaras ve arkadaşları 1997’de endojen glutamat sinyalini önleyerek amperometrik ölçümler için glutamin membranları tanımlamışlardır. Hücre kültürleri gibi kompleks örneklerde glutamat varlığında glutamini ölçmüşlerdir. Glutaminaz ve glutamatın birlikte immobilizesine dayalı tabakanın glutamat oksidaz ve katalaz immobilize edilmesiyle oluşan tamamlayıcı anti-glutamat tabakasının kullanılmasıyla glutamat girişimini oldukça azaltmışlardır. Glutamin seviyeleri 0.7-5 mM arasındaki konsantrasyonlarda eklenir, glutamat seviyeleri 0.07 ve 0.7 mM arasındadır. Tüm membranların 1 günde 5nA akım veren 40 μ L örnek boyutunda tayin edildiği bulunmuştur. Glutamin membran cevabının; 5mM glutamat +5mM glutamin karışımında (50 μ L örnek boyutuyla) elde edildiği belirtildi. En iyi glutamin kararlılığı; lineerlik, hassasiyet ve tekrarlanabilirliğinin en az 10mM glutamin konsantrasyonunda olduğu belirtilmiştir. Glutamat ve glutamin eşzamanlı ölçümleri için 5 günlük yarı ömür ve ± 4 ’lük hassasiyet gözlemlenmiştir [2].

Tucci ve arkadaşları 1998’de çocuklardaki menenjit hastalığının beyin-omurilik sıvısı (BOS) içinde lazer bağlı floresans tayini ve kapiler elektroforeziyle (CZE-LIFD) glutamin ve glutamat ölçümünü gerçekleştirdiler. Glutamin için türevlendirmeyi uygun hale getirmede 3 test yaptıktan sonra glutamin çözeltisini 10^{-3} M’den 10^{-9} M’a türevlendirdiler. Türevlendirilmiş BOS’taki 10^{-5} ’den 10^{-3} mol/L arasındaki glutamin lineer bağlantıyı gösterir. Glutaminin 10^{-6} M çözeltisi CZE-LIFD’le kolayca ölçülebildiğini gözlemlemişler. Standart hatalar; metodun yanılmasının pik yükseklikleri için yaklaşık %1’den az olduğunu önerir. Gerçek standart sapma pik yüksekliği için

%3.36 ve güç aşaması için %8.97 dir. Bakteriyel ve viral menenjitli çocukların beyin omurilik sıvısında glutamin ve glutamat ölçüm sonuçlarında, menenjitli hastaların kontrol grubundan daha düşük glutamin konsantrasyonlarına sahip olduğu, bakteriyel menenjitteki konsantrasyonun da viral menenjitteki konsantrasyona göre daha düşük olduğu belirtilmiştir. Enfeksiyon ve inflamasyon sırasında glutaminin karaciğerde tutunmasının arttığını kısmen açıklamışlardır. Glutamat konsantrasyonlarının ise; menenjitli hastalarda kontrol grubuna göre yükseldiği belirtilmiştir [32].

Konyalıoğlu ve Özyer 2000’de plazma glutamin düzeylerini iki yöntem ile değerlendirmişlerdir. Kan plazması glutamin analizinde kullanılan ince tabaka kromatografisi ile kombine bir spektrofotometrik yöntem (İTKSPK) bilinmektedir. Bu yöntem ile ince tabaka kromatografisinde özel okuyucu (İTK-Okuyucu) yardımıyla geliştirdikleri yöntemi kıyaslamışlardır. Bu amaçla, 35 sağlıklı bireyden kan alınıp plazmaları ayırmışlar, ekstraksiyondan sonra, ince tabaka kromatografisi ile ayrılmış glutaminle spektrofotometrik ve İTK-okuyucu aletinde miktar tayinleri yapmışlardır. Sağlıklı kişilerden alınan kan plazma örneklerinin İTK-okuyucu ve spektrofotometrik yöntemle bulunan glutamin düzeyleri arasında uygunluk bulduklarını belirtmişlerdir. (korelasyon katsayısı, r: 0.883). Böylece, ince tabaka kromatografisi ve İTK-okuyucusu ile kombine olarak geliştirdikleri yöntemin, plazmada glutamin tayininde kullanılabilecek bir yöntem olduğunu söyleyebilmişlerdir [37].

Dattelbaum ve Lakowicz 2001’de genetik protein mühendisliği kullanarak glutaminin optik tayinini gerçekleştirdiler. Glutamin için favori duyarlılık ve hassasiyet nedeniyle, optik biyosensörler için Gln BP seçtiler. Gln BP ‘nin X-Ray kristal yapısı hem ligand bağlı hem de ligandsız yapılarda tayin edilmiştir. E.coli kullanılan glutamin için ilk reaktifsiz optik dizi üretimi sunmuşlardır. Hücre kültürü ortamında glutamin konsantrasyonlarının 0,2’den 5mM’a çeşitlendirdiklerini belirtmişlerdir [29].

Moser ve arkadaşları 2002’de glukoz, laktat, glutamin ve glutamat konsantrasyonlarının eşzamanlı ölçümleri için çoklu biyosensörleri, ince film teknolojisi kullanılarak üretmişlerdir. Glukoz, glutamin, laktat ve glutamat eşzamanlı ölçümleri için bir biyosensör diziyi mikroakış sistemine uygulamışlardır. Kaçak sinyal olmayan, uzun vadeli kararlı biyosensörler; elektrokimyasal dönüştürücülerin modifiye edilmesiyle ve fotomodelli (photopatternable) enzim membranlarının kullanılmasıyla üretilmiştir. Kullandıkları uygun minyatür teknoloji ile tüm kan ve fermentasyon sıvı besiyerlerinde

hücre içi ve hücre dışı uygulamalar için kütle üretebilen yöntemlere yol göstermişlerdir. Nötr pH aralığında aktivite gösteren glutaminaz nedeniyle glutaminin tam ve eşzamanlı ölçümünü glukoz, laktat ve glutamat ile birlikte yapabilmışlerdir. Biyosensörlerin çok duyarlı cihazlarla entegre edileceğini belirterek, modifiye elektrotların yüksek kaliteli biyoalgılayıcı cihazlarla entegre edilmesiyle verime karşı hassasiyetin azaldığı gözlenmiştir [38].

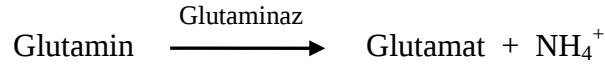
Kadıoğlu, 2005’de uzmanlık tezinde yaptığı çalışmada tıkanma sarılığı oluşturdukları kontrol grubu, ursodeoksikolik asit ve glutamin verdikleri deney grubu arasındaki farkları ortaya koymuştur. Bu sonuçları istatistiksel olarak yorumlamışlardır. Sonuç olarak tıkanma sarılığı oluşturduğumuz ratlarda bakteriyel translokasyon ve karaciğerdeki hasarlanmada Ursodeoksikolik asit ve Glutamin’in morbidite ve mortalite üzerinde istatistiksel olarak olumlu etkileri olduğunu saptamışlardır. Tıkanma sarılığı tanısı konan hastalarda, tanı konduğu andan itibaren Ursodeoksikolik asit ve Glutamin’in operasyon öncesi ve sonrasında kullanılmasının morbidite ve mortaliteyi azaltacağını savunmuşlardır [39].

Stefano ve arkadaşları 2006’da E.Coli’den glutamin bağlayıcı protein ve L-Glutamin arasındaki moleküler bağlanmayla gözenekli silikon nano teknolojisine dayanan biyosensör üretmişlerdir. Glutamin için moleküler prob olarak rol oynayan glutamin bağlayıcı proteini (Gln BP) gözenekte silikon matriksinin deliklerine bağlamışlar, böylece gözenekli geçirgen tabaka yüzeyinin önişlevsel sürecini önlemişlerdir. Aşındırılmış olan gözenekli silikon tabakasının FT-IR spektrumunu kaydettiler; 650cm^{-1} ve 2100cm^{-1} ’de Si-H bağlarının karakteristik piklerini $1050\text{-}1100\text{cm}^{-1}$ ’de Si-O-Si pikleri sunulmadığı zaman gözenekli silikon yüzeyi (PSi) hidrofobik bağın kuvvetini test ettiler. Proteinle kaplanmış PSi yüzeyi silikon doğrultusunda iyi kararlılık gösterdiğini blirtmişlerdir. Glutamin tayini için gözneli nanoteknolojiye dayanan protein temelli optik mikrosensörün gelişimi için önveriler sundular ve gözenekli silikonu oldukça kullanışlı çevirici olarak gösterdiler. Üstelik gözenekli silikon tabakada, Si-H bağlarının varlığından dolayı yüzeysel işlevlendirme süreci kullanmadılar. Protein konsantrasyonuna sinyal cevap; $9\text{-}36\mu\text{gl}^{-1}$ aralığında dahi ölçüldüğü belirtilmiştir [40].

2.5 Glutamin Tayininde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış

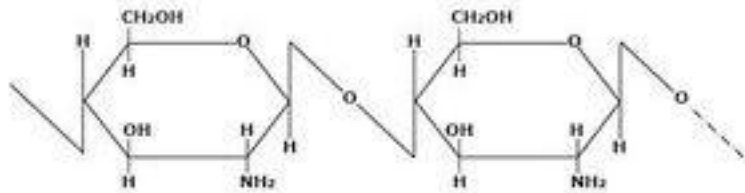
2.5.1 Glutaminaz

Glutaminin; glutamat ve amonyum iyonlarına dönüşümünü katalize eder. Oluşan amonyumun pek çoğu üreye dönüştürülür.



2.5.2 Kitosan

Tez çalışmamızda kitosan, glutaminaz enziminin elektrot yüzeyine daha iyi immobilizasyonunu sağlamak ve elektrot yüzeyinden enzim kaybını önlemek için kullanılmıştır. Kitosan, kitinden kısmi deasetilasyon yoluyla elde edilen, reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip; kimyasal yapı olarak seluloza benzeyen doğal bir biyopolimerdir [41]. (Şekil 2.6)



Şekil 2.6 Kitosanın kimyasal yapısı [41]

2.5.3 Çinko Oksit Nanorod

ZnO nanorodlar, yüksek spesifik yüzey alanı, toksik olmaması, kimyasal stabilitesi, elektrokimyasal aktivitesi, yüksek elektron iletkenliğine sahiptir. Ayrıca yaklaşık 9,5'lik yüksek izoelektrik noktası sayesinde proteinlerin ZnO nanorod yüzeyine elektrostatik olarak immobilize olmasını sağlamaktadır [42]. Bu özellikleri sebebiyle biyosensör uygulamalarında geniş kullanım alanına sahiptir.

BÖLÜM 3

NANOTEKNOLOJİ

Nanoteknoloji maddeyi atomik ve moleküler seviyede kontrol etme bilimidir. Genel olarak 100 nm ve daha küçük boyutta malzeme, aygıt geliştirmekle ilgilidir [43]. 1 nm, metrenin milyarda biridir (yaklaşık olarak ard arda dizilmiş 5 ila 10 atom). İnsan saç telinin çapının yaklaşık 100.000 nanometre olduğu düşünülürse ne kadar küçük bir ölçekten bahsedildiği daha rahat anlaşılır [44].

Nanoteknoloji birçok alanı kapsayan bir bilim dalıdır. Aygıt fiziği, malzeme bilimi, elektronik, kimya, biyoloji gibi dallardan bilim araştırmacıları, nanoteknoloji çalışmaları yapmaktadır [43].

“Nano” kelimesi Yunanca *nannos* kelimesinden gelir ve “küçük yaşlı adam veya cüce” demektir. Nanoteknolojinin etkileri üzerinde çok tartışma olmuştur. Nanoteknolojinin tıp, elektronik ve enerji üretimi gibi alanlarda uygulanma potansiyeli vardır. Bunun yanında, her yeni teknolojide olduğu gibi, nanomalzemelerin de sağlık ve çevre üzerindeki etkileri merak edilmektedir [45].

Nanoteknolojiyi bu kadar ilginç kılan unsur, malzemeler nano-boyutta makrodünyadan farklı davranmalarıdır. Külçe şeklindeki altın başka maddelerle reaksiyona girmek istemezken, nanoboyuttaki altında bu durumun tam tersi gözlemlenmektedir. Kuantum etkileri yüzünden maddeler, nanoboyutta farklı özellikler göstermektedir. Bu özellik yüzünden, bilim adamları malzemelerin nanoboyuttaki hallerini araştırıp, sorunlara çözüm bulmaya çalışmaktadırlar [43].

Malzemenin büyüklüğü nanometre ölçütlerine inildiği zaman, kuvantum davranışları bilinen klasik davranışların yerini almakta ve fiziksel özellikleri kesikli bir değişim göstermeye başlamaktadır. Kimyasal ve fiziksel özellikler, yapının büyüklüğüne ve

atom yapısının ayrıntılarına, dışardan sisteme bağlanan yabancı bir atomun cinsine ve yerine göre çok farklı ve olağanüstü davranışlar sergilemektedirler. Şöyle ki, mevcut nanoyapıya yabancı bir atomun yapışması, elektronik özellikleri, örneğin elektrik iletkenliği farkedilebilir şekilde değiştirmektedir. Bu yabancı bir atom geçiş elemanı olduğunda yapıştırdığı bir nanoyapıya manyetik özellikler kazandırabilmektedir. Kısaca, bir nanoyapının fiziksel özellikleri, bağ yapısı ve dolayısı ile mukavemeti onun büyüklüğüne ve boyutuna bağlı olarak önemli değişimler gösterebilmektedir. Örneğin, karbon atomlarından oluşan elmas kristali iyi bir yalıtkan olduğu halde, bir boyutlu karbon atom zinciri, altın ve gümüş zincirlerinden bile daha iyi bir iletken olabilmektedir. **Nanobilim**, nanometre ölçütlerinde ortaya çıkan bu yeni davranışları kuantum kuramı yardımı ile anlamamızı sağlar. **Nanoteknoloji** ise ya yeni nanoyapılar tasarlayıp sentezlemeyi, ya da nanoyapılara yeni olağanüstü özellikler kazandırmayı ve bu özellikleri yeni işlevlerde kullanmayı amaçlar [46].

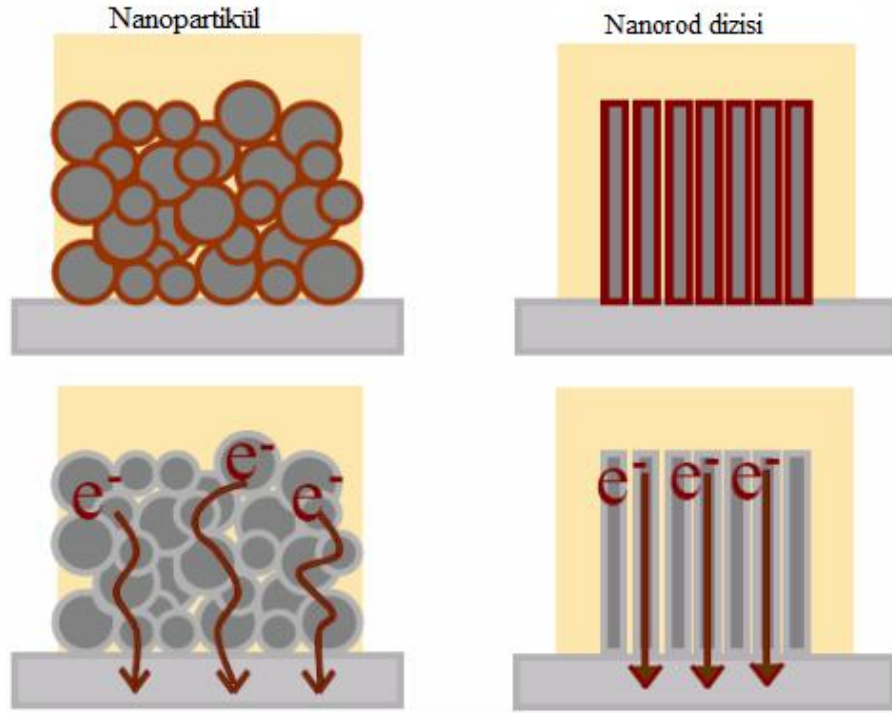
Peki neden boyutların küçültülmesi için uğraş verilmektedir? Transistörlerde elektrodlar arası mesafeye kanal genişliği denir. Kanal genişliği bir transistörün açma kapama hızını belirlemesi açısından önemlidir. Kanal genişliği ne kadar dar ise transistör o kadar hızlı çalışmaktadır. Buna ek olarak transistör boyutlarının küçülmesiyle birlikte, bir çip içine yerleştirilebilen transistör sayısı da artmaktadır. Hem daralan kanal genişliğiyle hem de artan transistör sayısı ile elektronik aygıtların performansı kat kat artmaktadır. Son 50 yıl içinde araştırmacıların minyatürleştirme çabalarındaki başarısının göstergesi, 50 yıl önce üretilen tek bir transistörle aynı boyutlara sahip bir çip içine şimdilerde 100 milyon transistörün yerleştirilebilmesidir. Dolayısıyla elektronik aygıtların kalbi olan transistörlerin performansındaki artış doğrudan mikroelettronik endüstrisini etkilemektedir. Mikroelettronik endüstrisindeki yukarıdan aşağıya üretim modelindeki bu hızlı ilerleyişin bilimsel ve ekonomik nedenlerden dolayı 2010-2020'ye kadar süreceği tahmin edilmektedir. Bu gibi sınırlamalar şu an mikroelettronik endüstrisinde baskın konumdaki silisyum esaslı elektronik üretime alternatif yeni bir üretim modeli gerektirmektedir. Aşağıdan yukarı (bottom-up) üretim modeli olarak adlandırılan bu yeni üretim modelinde; doğadan esinlenerek, protein ve diğer makro moleküllerden biyolojik sistemlerin oluşturulması gibi, kimyasal metotlarla elde edilen hassasiyetle kontrol edilip ayarlanabilen kimyasal bileşim, yapı, morfoloji ve büyüklükte nanoboyutlu yapı taşlarının bir araya getirilip, bunlardan fonksiyonel aygıtların üretilmesi hedeflenmektedir. Şu an piyasada bulunan, silisyum esaslı bir ürün

olan Pentium 4 işlemcilerde kanal genişliği 180 nm civarında iken, kimyasal metotlarla üretilen karbon nanotüplerden oluşan organik bir transistörde bu mesafe 1-2 nm civarındadır [47].

Transistör teknolojisindeki gelişimden de anlaşılabileceği gibi nanoteknolojinin biyosensör teknolojisi ile birleşmesi, makro boyutta üretilen sensörlerin minyatürleşmesini sağlar. Kullanılan nanomateryaller sayesinde sensörün duyarlılığı, hassasiyeti, ölçüm aralığı, kullanım ömrü ve cevap süresi gibi parametrelerin gelişmesi ve düşük maliyetli sensörlerin üretilmesi sağlanır. Nanoteknolojinin sensör teknolojisi ile birlikte gelişmesi bu açıdan önemlidir. Bu sebeple son yıllarda yapılan biyosensör çalışmalarında nanomateryaller ve nanoteknolojik yöntemler uygulanmaktadır.

Nanomalzemeler, 0-boyutlu, 1- boyutlu ve 2- boyutlu olmak üzere 3 grupta incelenir [48]. İzotropik küreler, yirmiyüzlüler (icosahedrons) ve küpler 0-boyutlu nanomateryal olarak sınıflandırılabilir. Bunlar nanodünyasında en iyi bilinen şekillerdir. Yarı iletkenler, nanoküreler ve C-60 bu gruptadır. Çubuklar, poligon şeklindeki silindirler ve teller 1-boyutlu nanomateryallerin örnekleridir. 2- boyutlu nanomateryallere ise İnce filmler gibi çoğunlukla optik kaplamalarda, korozyon korunmasında ve yarı iletken ince film cihazlarda kullanılan nanomateryaller örnek verilebilir [49]. 1D nanomateryal olan ZnO nanorodlar sahip olduğu olağanüstü materyal özellikleri ve elektronik, optik, fotonik performansı sayesinde geniş kullanım alanına sahiptir [48].

Nanopartiküllerin aksine nanorodlar elektron transferini güçlendirmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Nanopartiküllerde partikülden diğerine geçerek karşı tarafa ulaşır. Bu şekilde elektronların transferi daha zor ve daha uzun sürede gerçekleşir. Ancak nanorod düzeninde elektron çok daha rahat bir şekilde transfer edilir. (Şekil 3.1)



Şekil 3.1 Nanopartikül ve nanorodlarda elektron transferi [49]

Bunun sonucu olarak ZnO nanorod başta güneş pillerinde olmak üzere benzer uygulama alanlarında gelecek vaadeden bir materyaldir. ZnO çok fazla çaba gerektirmeden değişik sentez metotları kullanılarak farklı kristal yapılarında sentezlenebilme özelliğine sahiptir [49].

3.1 Nanoyapıların Sentezleme Teknikleri

Farklı boyut ve kalitedeki nanoyapıların elde edilebilmesi için farklı üretim hızı ve maliyete sahip birçok sentez yöntemi bulunmaktadır. Bu yöntemler yukarıdan-aşağıya ve aşağıdan-yukarıya olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. Yukarıdan- aşağıya tekniklerinde nanoyapılar, külçe malzemenin fiziksel ya da kimyasal olarak işlenmesiyle istenilen boyutta elde edilir. Aşağıdan-yukarıya büyütme teknikleri, atom ya da moleküllerden başlayarak nanoyapıların sentezlenmesini sağlar. Fiziksel buhar çöktürme (Physical Vapor Deposition-PVD), kimyasal buhar çöktürme (Chemical Vapor Deposition-CVD) ve sol-gel bu yöntemlerden en yaygın kullanılanlardır [50].

3.1.1 Fiziksel Buhar Çöktürme (PVD)

PVD yönteminde çöktürülmek istenen malzeme katı fazdan buhar fazına, termal buharlaştırma ya da sıçratma gibi metotlarla dönüştürülür. Buhar, kaynaktan altlık üzerine taşınır ve altlık üzerinde yoğunlaşır. Termal buharlaştırmada kaynak malzeme bir pota içerisine yerleştirilir ve vakum ortamında erime noktasına kadar ısıtılarak buhar haline getirilir. Sıçratma metodunda ise kaynak olarak bir hedef kullanılır. Vakum ortamında yüksek enerjili iyonlar üretilir ve hedefle çarpıştırılır. Uyarım sonucunda atom ya da moleküller hedeften çıkarak altlık üzerinde birikir [50].

3.1.2 Kimyasal Buhar Çöktürme (CVD)

CVD, nanoyapıların sentezlenmesinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Tipik bir CVD sürecinde, taşıyıcı asal gazlarla seyreltilen reaktan gazlar ya da başlangıç maddeleri reaksiyon hücresine girer. Süreç ve çalışma koşullarına bağlı olarak reaktan gazlar arasında yüzeye çarpmadan önce, buhar fazında homojen kimyasal reaksiyonlar gerçekleşir ve daha düşük sıcaklık bölgesinde bulunan altlık üzerinde yoğunlaşma süreci ile bir film şekillenir. Reaksiyon kimyası ve çöktürme şartlarının kontrolüyle çok farklı morfolojilerde yapılar elde edilebilir. İstenen yapının büyütülebilmesi için sıcaklık, basınç, başlangıç konsantrasyonları, akış hızı ve reaktör geometrisi gibi parametrelerin kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu kategori içerisinde Buhar-Sıvı-Katı (Vapor-Liquid-Solid-VLS) ve Buhar-Katı (Vapor-Solid-VS) yöntemleri geniş bir yere sahiptir. VLS mekanizmasında buhar haldeki malzeme asal bir gazla daha düşük sıcaklıktaki altlık üzerine taşınarak çekirdeklenir, çöker ve büyür. Büyütme işlemi için altlık üzerine kaplanmış bir katalizör sayesinde çekirdeklenme damlacıklar halindeki katalizör üzerinde gerçekleşir. Katalizör yüzeyinde adsorbe olmuş malzeme doyuma ulaştığında çökme ve büyüme gerçekleşir. Yapıların boyutları kullanılan katalizörün boyutuna bağlıdır. VS yönteminde nanoyapılar katalizör kullanılmadan, direkt olarak buhar fazından daha düşük sıcaklıkta tutulan altlık üzerinde yoğunlaşırlar. Literatürde VLS ve VS yöntemleriyle büyütülmüş tel, şerit, kemer, tüp gibi değişik morfolojilerde ZnO nanoyapılara sıklıkla rastlanmaktadır [50].

CVD ve PVD yöntemleri yüksek sıcaklık ve düşük basınçlarda çalışmayı gerektiren, kullanılan cihazlar nedeniyle maliyeti oldukça yüksek ve az miktarda malzemenin elde edilebildiği yöntemlerdir. Ayrıca CVD yönteminde başlangıç maddeleri çoğu zaman tehlikeli ve zehirlidir. Değişik morfolojilerde nanoyapılar elde etmek mümkündür,

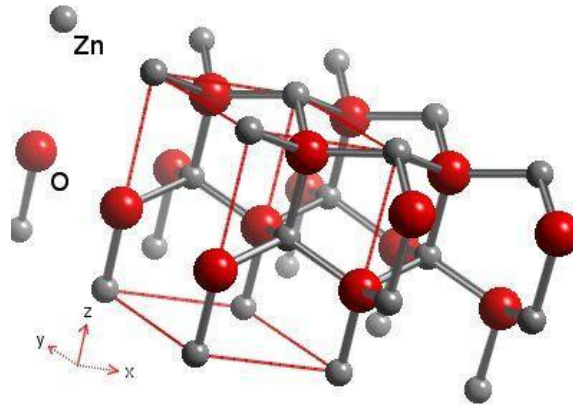
ancak yöntemin çok fazla parametre içermesi nedeniyle çok kontrollü çalışılmalıdır [50].

3.1.3 Sol-gel Yöntemi

Sol-gel yöntemi ise alkoksit bazlı başlangıç maddelerinin hidroliz ve yoğunlaşma reaksiyonlarıyla, klasik yüksek sıcaklık yöntemlerine kıyasla daha saf ve homojen malzemelerin düşük sıcaklıklarda üretimini sağlar [50].

3.2 Çinko Oksit'in Özellikleri

Çinko oksit (ZnO) II-VI grubu yarı iletkenlerin önemli bir üyesidir [47]. Oda sıcaklığında 3.4eV geniş iletim bant aralığına ve 60meV gibi büyük bir bağlanma enerjisine, 0.4- 2 μ optik dalga boyu aralığında yüksek geçirgenliğe sahiptir. 3.4eV daha büyük iletim bant aralığına sahip bileşikler bulunsada, 60meV gibi bir bağlanma enerjisi değerine sahip olması, optik pompalama için düşük eşik değerine sahip olması, radyasyon direnci ve biyo-uyumluluğu gibi özellikleriyle birçok aygıt yapımı için ideal bir adaydır. Ergime noktası yaklaşık 1975°C, atom ağırlığı 81.408 g/mol, yoğunluğu 5.606 g/cm³ ve ısı kapasitesi 40.3J/mol K'dir. Hekzagonal kristal yapıdaki ZnO'nun şematik görünümü Şekil 3.2'de verilmektedir [51].



Şekil 3.2 Hekzagonal ZnO yapısı [51]

ZnO, a ve c olan iki örgü parametresi içeren wurzit yapıda olup ile hekzagonal birim hücrelerine sahiptir ($c/a = 8/3 = 1.633$) [52]. Çinko oksitin diğer özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. (Çizelge 3.1)

Çizelge 3.1 ZnO'in fiziksel özellikleri [47]

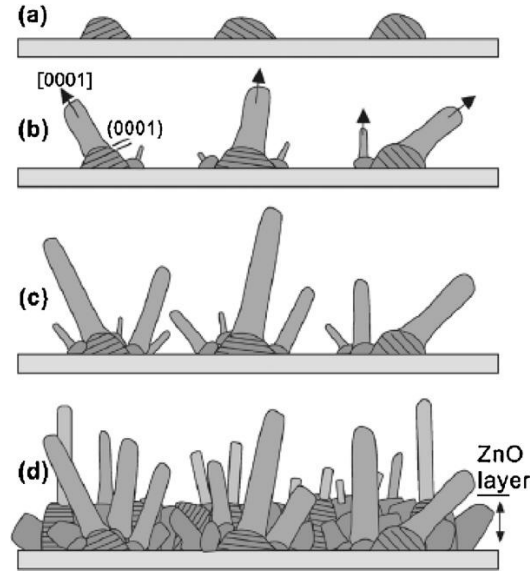
Örgü Yapısı	Hegzagonal wurtzit
Örgü Sabiti	$a=3.24\text{\AA}$, $c=5.13\text{\AA}$, $c/a=1.60$
Molekül ağırlığı	Zn=65.38, O=16, ZnO=81.38
Yoğunluğu	5.66 gr/cm ³
Erime noktası	1975 C°
Yasak enerji aralığı	3.436 eV (0 K°), 3.20 eV (300 K°)
Eksiton bağlanma enerjisi	60 meV
Örgü enerjisi	965 kcal/mol

Elektronik, optik ve fotonik özelliklerinden dolayı ZnO nanorodların, UV-lazer, LED, güneş pilleri, nanojeneratörler, gaz sensörleri, foto dedektörler ve fotokatalist olarak kullanımı ilgi çekmektedir [48].

3.3 Çinko Oksit Nanorod Sentez Mekanizması

ZnO nanorod bir yüzeyden bağımsız ya da bağımlı olarak büyütülebilir ve yüzey üzerinde sıralı dikey büyümesi fotokatalitik uygulamalarda avantaj sağlar. ZnO kristal yapısının anizotropisi nanorod büyümesini desteklemektedir. Nanorodların anizotropik büyümesi $[0\ 0\ 0\ 2]$ yönünde c-eksen boyunca yer alır. Hidrotermal koşullarda büyüme hızları $V(0001) > V(1011) > V(1010)$ şeklinde değişik yönlerde olur [48].

ZnO kristalinin çoğunlukla c-eksen $[0\ 0\ 0\ 2]$ yönelimli büyümesinin sebebi, hegzagonal çubuğun $[0\ 0\ 0\ 1]$ bazal düzleminin polar olmasıdır. Dolayısıyla diğer düzlemlere oranla yüksek yüzey enerjisine sahiptir [53]. ZnO nanorodların silisyum yüzey üzerinde VS metodu ile büyüme mekanizması Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3 ZnO nanorodların silisyum yüzey üzerinde VS metodu ile büyüme mekanizması

3.4 ZnO Nanorodların Sentez Metotları

3.4.1 Elektrokaplama Metodu

Elektrokaplama ZnO nanoparçacıkların ince filmler halinde elde edilmesinde kullanılan yaygın metotlardan bir tanesidir. Başlangıç maddelerini içeren çözelti içerisinde oksijen çözülmesi ve ardından voltaj uygulanmasıyla ZnO film halinde büyütülmektedir. Bu metotta akım yoğunluğu, kaplama zamanı ve banyo sıcaklığı gibi parametreler değiştirilerek farklı çaplarda ve boyutlarda ZnO yapılar elde edilebilmektedir. Ayrıca band aralığı da elektrokaplama potansiyeline bağlı olarak değişmekte ve potansiyelin artırılmasıyla band aralığı artmaktadır. Bu metod kullanılarak nanogözenekli ZnO, nanokolumnar (kolon biçimli) ZnO, ZnO nanorod filmleri elde edilmektedir [49].

3.4.2 Buhar-Sıvı-Katı (VLS) Metodu

ZnO nanoyapıların sentezinde kullanılan diğer bir yöntem de buhar-sıvı-katı (vapor-liquid-solid, VLS) prosesidir. Bu proses 1960'lı yıllarda mikrometre mertebesinde whiskler üretmek için Wagner ve Ellies tarafından geliştirildi [54]. Tipik bir VLS prosesi bir metal katalizörün nanoboyutlardaki sıvı damlacığında gaz fazındaki reaktantların çözülmesiyle başlamaktadır. VLS prosesi yaygın bir şekilde ZnO nanorodlar ve nanoteller hazırlanmasında kullanılmaktadır [49].

3.4.3 Kimyasal Banyo Kaplama (CBD) Metodu

Kimyasal banyo kaplama (CBD) metodu ile ZnO nanorodlar elde edilmektedir. Diğer film kaplama yöntemleriyle kıyaslandığında, bu yöntem basit, yeniden üretilebilen, kirlenici olmayan ve ekonomik bir yöntemdir. Ayrıca kompleks ekipmanlar gerektirmeden büyük miktarlarda ince filmler oluşturma özelliğine sahiptir [49].

3.4.4 Metal-Organik Kimyasal Buhar Kaplama (MOCVD)

Bir diğer yöntem de metal-organik kimyasal buhar kaplama (MOCVD) yöntemidir. Bu yöntem yarıiletken ince filmlerin proseslerinde yaygın olarak kullanılmakta ve ayrıca ZnO nanorodları büyütmek için de kullanılmaktadır. ZnO ince film ve kuantum noktaların MOCVD kullanılarak kolaylıkla hazırlanmasına rağmen, ZnO nanorodların bu yöntemle büyütülmesi son zamanlarda daha çok gerçekleştirildi [47]. Yi ve ekibi katalizör kullanmadan MOCVD yöntemini ZnO nanorod ve nanoneedle büyütmek için kullandı [53]. Bu bulgudan sonra MOCVD yöntemine dayalı benzer çalışmalar değişik gruplar tarafından yapılmaktadır [49].

3.4.5 Sol-gel Metodu

Tek boyutlu nanoyapılar elde etmek için kullanılan bir yöntem de sol-jel tekniğidir [49].

3.4.6 Mikrodalga Isıtma Metodu

Son yıllarda ZnO nanoyapıların sentezinde mikrodalga ısıtma yöntemi kullanılmaya başlanmaktadır. Bu yöntem kullanılarak ZnO nanotüpler, çiçeğe benzer (flower-like) ve iğneye benzer (needle-like) şeklinde ZnO yapılar, nanorod ve diğer farklı ZnO kristallerin sentezinde kullanılmaktadır [49].

3.4.7 Hidrotermal Sentez Metodu

Hidrotermal metod toz halinde ZnO nanoyapılar hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan bir metottur. Bu metod ile ZnO nanorodlar, nanopartikül ve nanoyapraklar, ZnO nanoteller ve nanokuşaklar, ZnO çiçek görümlü (flower) yapılar elde edilmektedir [49].

Hidrotermal metod çoğunlukla 1D nanomateryallerin sentezinde kullanılmaktadır. Diğer yöntemlerle kıyaslandığında hidrotermal yöntemle oluşturulmuş ZnO nanorodlar

oksijen boşluklarından dolayı kristal bozukluklarına sahiptir ve sahip oldukları bu doğal bozukluklar ile geçiş metalleriyle katkılandırılmadan fotokatalitik görünür ışık sergileyebilmektedir. Hidrotermal metotla yüzey üzerinde ZnO nanorod büyümesi aşağıdaki basamakları takip eder.

- A. ZnO nanopartikülleri ince tabaka yüzey üzerinde çekirdeklenir. Çekirdek tabakası, azalan termodinamik bariyerden dolayı nanorodların büyümesinin çekirdeklenmesini destekler.
- B. Alkali reaktifler (NaOH ya da HMT gibi) ve Zn^{2+} tuzunun ($Zn(NO_3)_2$, $ZnCl_2$, gibi) sulu çözeltisi öncül olarak kullanılır.
- C. ZnO çekirdeklenen yüzey kesin bir sıcaklık ve zamanda büyüme çözeltisinde tutulur.
- D. Son olarak oluşan yüzey yıkanır ve kurutulur.

HMT ve $Zn(NO_3)_2$ öncül olarak seçildiğinde, kimyasal reaksiyon aşağıdaki eşitliklerle özetlenebilir.

Bozulma reaksiyonu:



Hidrotermal besleme reaksiyonu:



Aşırı doymunluk reaksiyonu:



ZnO nanorod büyüme reaksiyonu:



ZnO nanorodların büyüme parametrelerinden biri olan reaktanların aşırı doymunluğu, kontrol edilebilmektedir. Yüksek aşırı doymunluk düzeyleri kristal büyümesini desteklemektedir. Eğer kısa zamanda hidroksil iyonu fazla olursa, çözeltideki çinko iyonları yüksek pH'dan dolayı çökmekte ve ZnO nanorod üretiminde çinko iyonlarının etkisi azalmaktadır. Besleyici maddenin hızlı tüketimi daha fazla nanorod üretimini

önlemektedir. Çözeltideki hidroksil iyonu konsantrasyonu bütün nanorod üretimi boyunca düşük aşırı doygunluk sağlanması için kontrol edilmelidir [48].

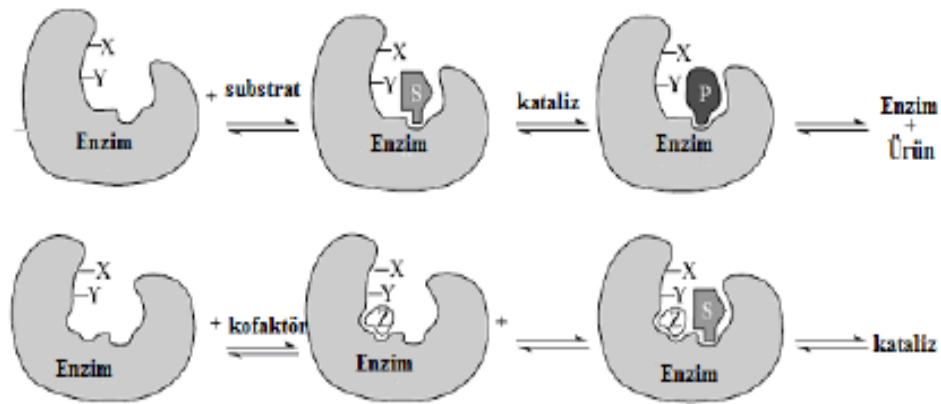
ZnO nanorodların hidrotermal sentezi sırasında HMT dışında ortama hidroksil iyonu sağlayan NaOH, KOH veya Na_2CO_3 gibi reaktifler mevcuttur. ZnO nanorodların sentezinde alkali reaktif olarak NaOH, KOH, ya da Na_2CO_3 seçilirse reaksiyon sıcaklığı artar ($>100^\circ\text{C}$) ve teflon-kaplı pas tutmayan otoklav içinde basınç oluşturulmasıyla nanorodlar sentezlenir. HMTA, amonyum ya da etilendiamin alkali reaktif olarak seçilirse düşük sıcaklıklarda ($<100^\circ\text{C}$) ve atmosferik koşullarda ZnO nanorodlar sentezlenir. HMTA reaksiyon sırasında birçok görev üstlenmektedir. Birincisi, HMTA termal bozunma ile çöktürme reaksiyonu için hidroksil iyonu sağlamasıdır. İkincisi, HMTA termal bozunma sırasında azalan hidroksil iyonlarına karşı pH tamponu görevi görmesidir. HMTA'nın hidroliz oranı artan pH ile ters bir etki ile azalır. Üçüncüsü, HMTA ZnO nanorodların polar olmayan yüzeylerine tutunarak onları çinko iyonlarını (001) polar yüzeyinden epitaksiyel büyüme için korumasıdır [48].

BÖLÜM 4

ENZİMLER

Kataliz yapan yani kimyasal tepkimelerin hızını artıran biyomoleküllerdir. Neredeyse tüm enzimler proteindir. Proteinler aminoasitlerden oluşmuş makro moleküllerdir. Tüm diğer hücre içi proteinler gibi enzimler de DNA dizisindeki bilgilerin aminoasit dizisine dönüştürülmesi ile sentezlenirler. Aminoasitler yapılarında karboksil grubu ($-\text{COOH}$), amino grubu ($-\text{NH}_2$) ve değişken bir R grubuna sahiptirler [55]. Bilinen 20 çeşit aminoasit vardır. Enzimlerin birbirinden farklı olmalarının nedeni aminoasit dizilimlerinin farklı olmasıdır [56].

Enzimler biyolojik katalizörlerdir. Enzim tepkimelerinde, bu sürece giren moleküllere ise substrat denir ve enzim bunları farklı moleküllere, ürünlere dönüştürür. Enzimler substratlarına belirli mekanizma ile bağlanırlar. Bazı enzimler substratın yanında kofaktör de kullanırlar Enzim-substrat ve enzim-substrat kofaktör ilişkisi şematik olarak Şekil 4.1’de görülmektedir.



Şekil 4.1 Enzimin substratla bağlanma şekilleri: Enzim-substrat ve enzim-substrat kofaktör ilişkisi [57]

Bir canlı hücredeki tepkimelerin neredeyse tamamı yeterince hızlı olabilmek için enzimlere ihtiyaç duyar. Enzimler substratları için son derece seçici oldukları ve pek çok olası tepkimeden sadece birkaçını hızlandırdıklarından dolayı, bir hücredeki enzimlerin kümesi o hücrede hangi metabolik yolların bulunduğunu belirler [58].

Her katalizör gibi enzimler de bir tepkimenin aktivasyon enerjisini (E_a veya $\Delta G^\ddagger$) azaltarak çalışır ve böylece tepkime hızını çarpıcı şekilde artırır. Çoğu enzim tepkimesi, ona karşılık gelen ve katalizlenmeyen tepkimeden milyonlarca kere daha hızlıdır. Diğer katalizörler gibi enzimler de katalizledikleri tepkime sonucunda tükenmez ve bu tepkimelerin dengesini değiştirmez. Ancak, diğer çoğu katalizörden farklı olarak enzimler çok daha spesifiktir. Enzimlerin 4000'den fazla biyokimyasal tepkimeyi katalizlediği bilinmektedir. Enzimlerin büyük çoğunluğu protein olmakla beraber, ribozim adlı bazı RNA molekülleri de tepkimeleri katalizler, bunun en iyi bilinen örneği ribozomu oluşturan bazı RNA'lardır.

Enzimlerin etkinliği başka moleküller tarafından etkilenebilir. İnhibitörler enzim aktivitesini azaltan moleküllerdir, aktivatörler ise enzim aktivitesi artıran moleküllerdir. Etkinlik ayrıca sıcaklık, kimyasal ortam (örneğin pH) ve substrat konsantrasyonu tarafından etkilenir. Bazı enzimler endüstriyel amaçla kullanılırlar, örneğin antibiyotik sentezinde [58].

Günümüzde enzimler mikrobiyoloji, biyokimya, tıp, mühendislik, botanik, temizlik maddeleri ve tarım gibi birçok alanda kullanılmaktadır [59]. Enzimler atık suların bertarafında, iyileştirilmesinde, renk gideriminde, tekstil atık sularının arıtımında, aktif çamur sisteminde ve ipek endüstrisinde biyoaktif peptidlerin parçalanması gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır [60].

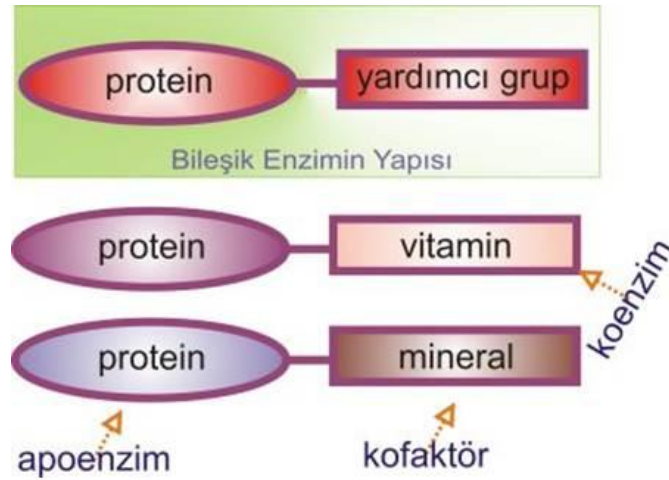
4.1 Enzimlerin Yapıları ve Mekanizmaları

Enzimler genelde küresel proteinlerdir, büyüklük olarak 62 amino asitten (4-oksaloakrotonat totomeraz'ın monomeri) 2500 amino asitten fazlasına (hayvan yağ asit sentaz) kadar uzanırlar. Az sayıda RNA-temelli biyolojik katalizörler de mevcuttur, bunların en yaygın olanı ribozomdur, bunlara ya RNA-enzim veya ribozim denir. Enzimlerin etkinliği onların üç boyutlu yapısı tarafından belirlenir. Çoğu enzim etki ettikleri substratlardan çok daha büyüktür ve enzimin sadece ufak bir bölümü (3-4 aminoasit kalıntısı) doğrudan kataliz ile doğrudan ilişkilidir. Bu katalitik amino asit

kalıntıların bulunduğu, substrata bağlanan ve tepkimeyi yürüten bölge aktif merkez (veya aktif bölge) olarak adlandırılır. Enzimlerde ayrıca kataliz için gerekli olan kofaktörlerin bağlandığı konumlar da mevcuttur. Bazı enzimlerde ayrıca katalizlenen tepkimenin indirekt substrat veya ürünleri olan küçük moleküllerin bağlandığı başka yerler vardır. Bu bağlanma enzimin aktivitesini artırabilir veya azaltabilir, bu da geri beslemeli bir düzenleme yoludur.

Çoğu protein gibi enzimler de uzun aminoasit zincirlerinden oluşur, bunlar katlanır ve üç boyutlu bir yapı oluşturur. Her aminoasit dizisi, kendine has özellikleri olan özgül bir yapı oluşturur. Tek başına protein zincirleri bazen gruplanarak protein kompleksleri oluşturabilir. Çoğu enzim ısı veya bazı kimyasal etmenlerle denatüre olur, yani proteinin üç boyutlu yapısının bozulması sonucu katlanmış hali açılır ve inaktive olur. Enzime bağlı olarak denatürasyon tersinir olabilir veya olmayabilir [58].

Enzimler protein yapısına sahip olup aktivite gösterebilmeleri için kofaktör adı verilen bir mineral ve koenzim adı verilen genellikle bir vitamin türevidir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Enzimin Yapısı [58]

4.1.1 Aktif bölge

Enzim moleküllerinde aktif bölge denilen özel bir cep veya yuva bulunur. Substrat enzimin aktif bölgesine bağlanır. Enzimlerin aktif bölgesinde yer alan aminoasitler:

genellikle lizin-histidin-sistein-serin-tirozin'dir. Aktif bölgedeki elektrofilik (elektron alıcısı) gruplar ise Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+3} gibi metaller ve NH_3^+ gruplarıdır [58].

4.1.2 Kofaktörler

Bazı enzimlerin aktif hale gelmeleri için protein yapısında bulunmayan metal iyonlarından oluşan ve kofaktör adı verilen yan gruplara ihtiyaç duyulur. Kalsiyum, magnezyum, potasyum, çinko gibi mineraller kofaktör olarak bazı enzimlerin aktiviteleri için şarttır. Örneğin DNA-polimeraz enzimi için çinko, üreaz enzimi için ise nikel yan grup olarak gereklidir. Bir enzimin aktifliği için gerekli olan, proteine gevşek ya da sıkıca bağlı olan (prostetik grup), bir metal iyonu (aktivatör) ya da organik bir molekül (koenzim) gibi protein olmayan bir maddedir [58].

4.1.3 Koenzimler

Koenzim, organik ya da inorganik, çoğunlukla fosfat içeren ve protein kısmına göre çok daha küçük moleküllü kısımdır. Enzimde faaliyet gösteren ve esas işi yapan bu kısımdır. Koenzim kısmı, genellikle protein kısmından ayrılabilir. Yapılan analizlerde birçok vitamini bünyesinde bulundurduğu saptanmıştır. Bazı vitaminler vücut hücrelerinde koenzimlerin parçası olarak işlev görürler. Yani koenzimler, apoenzimi aktif hale getiren, enzimin protein yapıda olmayan bileşenidir [58].

4.1.4 Özgüllük

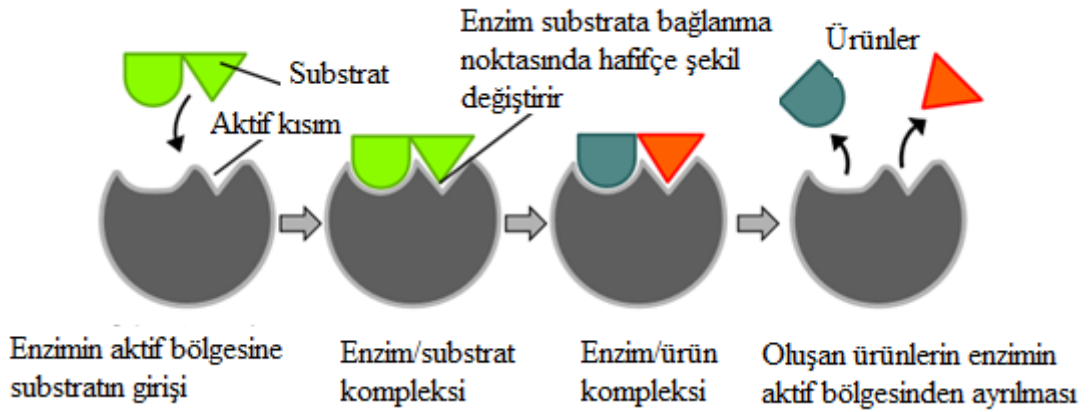
Enzimler genelde hangi tepkimeleri katalizledikleri ve bu tepkimelerdeki substratlar konusunda çok özgüdürler. Enzim ve substratlarının birbirini tamamlayıcı şekil, yük ve hidrofilik/hidrofobik özellikleri bu özgüllüğü meydana getirir. Enzimler ayrıca stereoizomerik, yönsele ve kimyasal özgüllük de gösterebilirler.

En yüksek seviyede özgüllük ve doğruluk gösteren enzimler genomun kopyalanması ve ifadesi ile ilişkilidir. Bu enzimlerin "prova okuma" mekanizmaları vardır. DNA polimeraz gibi bir enzim, ilk aşamada bir reaksiyonu katalizler, ikinci aşamada da ürünün doğruluğunu kontrol eder. Bu iki adımlı süreç sayesinde yüksek sadakatli polimerazlarda ortalama hata oranı 100 milyon reaksiyonda 1'den az olur. Benzer prova-okuma mekanizmaları RNA polimeraz, aminoasil tRNA sentetaz ve ribozomlarda da vardır.

İkincil metabolit üreten bazı enzimler ayırım gözetmediği söylenir, çünkü göreceli olarak geniş bir substrat grubuna etki edebilirler. Substrat spesifitesindeki bu genişlik sayensinde yeni metabolik yolların evrimleşebildiği öne sürülmüştür [58].

4.1.5 Anahtar Kilit Modeli

Enzimler hangi tepkimeyi katalizledikleri ve bu tepkimeye hangi substratın girdiğine çok büyük bir özgülük gösterirler. 1894'te Emil Fischer bunun nedeninin, enzim ve substratının birbirine tam uyan tamamlayıcı geometrik şekilleri olmasından dolayı olduğunu öne sürmüştür. Bu fikre sıkça "anahtar kilit" modeli olarak değinilir. Bu model enzim özgülüğünü açıklasa da geçiş halinin enzim tarafından stabilizasyonunu açıklamaz. "Anahtar ve kilit" modeli artık yetersiz sayılmaktadır, "indüklenmiş uyum" modeli halen en yaygın kabul gören enzim-substrat-koenzim şeklidir [58]. (Şekil 4.3)



Şekil 4.3 Enzimlerde indüklenmiş uyum modeli [58]

4.2 Enzimlerin Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB), enzimleri katalizledikleri reaksiyon tipine göre altı ana sınıfa ayırır. Bu sınıflarda yer alan her enzim, EC olarak kısaltılmış ve dört rakamdan oluşan kod numarası ile karakterize edilmiştir. Enzimlerin altı ana sınıfı kısaca şöyledir;

1. Oksidoredüktazlar: Redoks reaksiyonlarını katalizlerler. Sistematik ismin oluşturulmasında “donör: akseptör oksidoredüktaz” şeklinde bir düzenleme yapılır.

2. Transferazlar: Metil, açıl, amino, glikozil yada fosfat gibi spesifik bir gurubun bir maddeden digerine transferini katalizleyen enzimlerdir. Sistematik ismin olusturulmasında “donör: akseptör gruptransferaz” seklinde bir düzenleme yapılır.
3. Hidrolazlar: C-O, C-N, C-C gibi bagların hidrolitik yıkımını katalizler. Sistematik ismin olusturulmasında “substrat gruphidrolaz” sekinde bir düzenleme yapılır.
4. Liyazlar: C-C, C-O, C-N gibi bagların eliminasyon yoluyla yıkımını katalizler. Sistematik ismin olusturulmasında “substrat grupliyaz” sekinde bir düzenleme yapılır.
5. İzomerazlar: İzomerazlar bir molekül içindeki geometrik ya da yapısal yeniden düzenlenmeyi katalizlerler. Sistematik ismin olusturulmasında “substrat grupizomeraz” sekinde bir düzenleme yapılır [61].

4.3 Enzimlerin Aktivitesine Etki Eden Faktörler

4.3.1 Sıcaklık

Sıcaklık artışı bütün kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi enzim kataliz reaksiyonlarında artırıcı etki yapmaktadır. Ancak protein yapısındaki enzimlerin sıcaklık artışı denatürasyon olasılığında arttırır. Sıcaklığın etkisiyle oluşan denatürasyon, saflaştırılmış enzim çözeltilerini saflaştırılmamış enzim çözeltilerine kıyasla daha fazla etkilemektedir [62].

4.3.2 pH

Enzimler pH değişimlerine duyarlıdır ve kendi optimum pH aralıklarında en büyük aktivite değerini gösterirler. pH etkisi enzimlerin yapılarındaki aminoasitlerin ve substratların yapılarındaki iyonik kısımların değişmesinden kaynaklanır. Yüklerdeki bu değişiklikler substratın bağlanmasını ve reaksiyonun gerçekleşme oranını değiştirir. Farklı substratlarda enzim reaksiyonlarının optimum pH'sı farklılık gösterebilir [62].

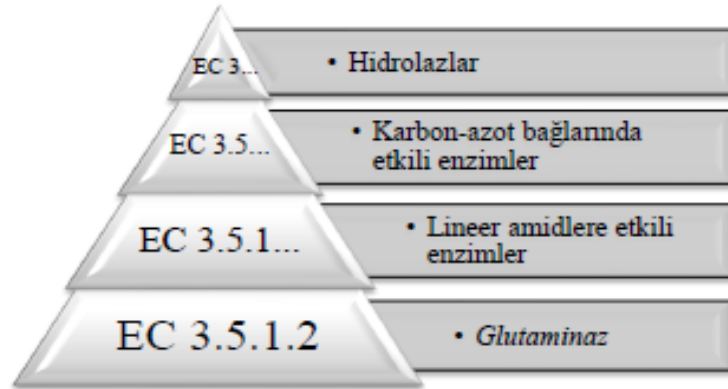
4.3.3 Substrat Konsantrasyonu

Bir enzimin aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini inceleyen deneysel çalışmaların sonuçları tutarlılık gösterir. Düşük substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı azalırken, yüksek substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı artar.

Yüksek substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı belli bir süre sonra sabitlenmeye başlar ve sonunda aşağı yukarı sabit olur [62].

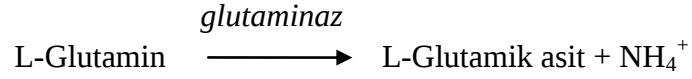
4.4 Glutaminaz Enzimi

Sistemik olarak glutamin aminohidrolaz olarak isimlendirilen enzimin diğer isimlendirme şekilleri de glutaminaz, glutaminaz I ve L-glutaminaz'dır [63], [64], [65]. Glutaminaz enzimi, serin bağımlı beta-laktamaz ve penisilin bağlayıcı proteinler ailesine aittir [66]. Glutaminaz, katalizlediği kimyasal reaksiyona bağlı olarak enzim numaralandırma sistemine göre ise EC 3.5.1.2 şeklinde isimlendirilir. Uluslararası biyokimya ve moleküler biyoloji birliği (IUBMB) enzimlerin her birinin sayısız alt grup içeren altı ana sınıfa bölündüğü bir isimlendirme sistemi geliştirmiştir [67]. Her enzime sistematik kod numarası verilmiştir. Bu numara EC harflerinden sonra art arda gelen dört rakamdan meydana gelir. EC numarasını oluşturan dört rakamdan ilk rakam enzimin bağlı olduğu sınıfı gösterirken, ikinci rakam alt sınıfı, üçüncü rakam alt-alt sınıfı ve dördüncü ise alt-alt sınıftaki seri numarasını gösterir. Glutaminazın ait olduğu enzim sınıfı şematize edilmiştir [59], [68]. (Şekil 4.4)

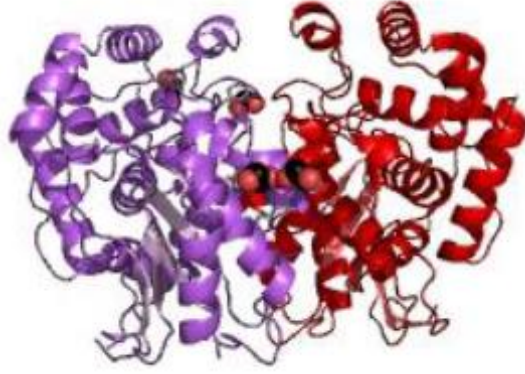


Şekil 4.4 Glutaminaz enziminin dahil olduğu enzim sınıfı [66]

Glutaminaz enzimi, azot metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Son yıllarda terapötik ve endüstriyel kullanım alanlarından dolayı bu enzime olan ilgi oldukça artmıştır. Terapötik açıdan anti lösemik ajan olarak görev almasının yanı sıra fermente gıdalarda da tat artırıcı özellik göstermekte rolü bulunmaktadır. Glutaminaz aktivitesi yaygın olarak bitkilerde, hayvansal dokularda ve bakteri, maya ve küfleri kapsayan mikroorganizmalarda gözlenmiştir.



Glutaminaz enzimi glutamini glutamik asit ve amonyum iyonuna dönüştüren reaksiyonu katalizleyen önemli bir enzimdir. Enzim, katalizlediği reaksiyon sonucu açığa çıkan glutamik asitten dolayı gıdalarda tat artırıcı özelliğe sahiptir bundan dolayı gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılır. Bunun yanında ilaç sektöründe de yaygın kullanım alanına sahiptir. Glutaminaz enziminin üç boyutlu yapısı Şekil 4.5'te görüldüğü gibidir [67], [69], [70], [71].



Şekil 4.5 Glutaminaz enziminin yapısı [66]

4.4.1 Glutaminaz Enziminin Kullanım Alanları ve Fonksiyonları

Glutaminaz aktivitesi geniş olarak bitkilerde, hayvansal dokularda ve bakteri, maya ve küfleri kapsayan mikroorganizmalarda gözlenmiştir. Mikrobiyal L-glutaminazın antitümör aktivite özelliği fark edildiğinden beri bu maddeye karşı ilgi ve önem artmıştır.

L-glutaminaz fermente gıdalarda glutamik asit içeriğinin artmasına sebep olur bu da gıdalarda lezzet artışını sağlar. L-glutaminaz glutamik asit sentezinde aktivite gösteren bir enzimdir bu da Shoyu Koji' nin enzimik sindiriminde önemli bir katkı maddesidir. Çin yemeklerinde tat arttırıcı olarak kullanılan mono sodyum glutamatın (MSG; glutamik asidin endüstriyel kullanım formu) yerini L-glutaminaz almıştır. Bunun en

büyük nedeni bazı insanların glutamata karşı alerjik fonksiyon göstermesidir [72]. Mono sodyum glutamat bazı insanlarda hırıltı, kalp atış hızında değişimler ve nefes alma zorluğu gibi negatif etkilere sebep olduğuna dair tartışmalar bulunmaktadır [73].

Glutaminaz genellikle soya sosu gibi fermente gıdalarda lezzetli tadı denetleyen önemli bir enzim olarak kabul edilmektedir. Soya sosu yapımında lezzetli bir tat elde edebilmek için glutamik asit düzeyinin yüksek olması önemlidir. Gıdalarda ortamın glutamik asit konsantrasyonunu artırarak tat verici özelliğinden dolayı gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılır [72], [74], [75].

Glutaminaz enziminin endüstriyel uygulamasının yanı sıra terapötik kullanım alanı da bulunmaktadır. Bu enzim kuvvetli antilösemik ajan özelliği ile sağlık alanında kullanımı söz konusudur [72]. Klinik alanda yapılan çalışmalarda fosfat-aktive edilmiş glutaminaz enziminin antineoplastik yani timör hücrelerinin gelişimini önleyen özellik gösterdiği rapor edilmiştir [73].

Glutaminaz enzimi fonksiyonlarının önemini özetlemek gerekirse, L-glutaminaz enzimi antiretroviral yani HIV virüsünün vücutta çoğalmasını ve etkinleşmesini engelleyen, tedavi eden ajan olarak, γ -glutamil transfer reaksiyonları ile theanine gibi bazı özel kimyasalların sentezinde, L-glutamin miktarının tayini için biyosensör uygulamalarında ve gıda endüstrisinde tat ve aroma artırıcı olarak geniş kullanım alanına sahiptir [70], [76].

4.4.2 Glutaminaz Enziminin Eldesi

Glutaminaz enziminin literatürde farklı mikroorganizma türlerinden üretimi gerçekleştirilmiştir. Bunlardan bazıları Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1 Glutaminaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Kaynaklar	Mikroorganizma	Kaynaklar
Bakteriler		Fungi	
<i>Azotobacter agilis</i>	[77]	<i>Aspergillus flavus</i>	[83]
<i>Bacillus flavum</i>	[77]	<i>Aspergillus nidulans</i>	[84]
<i>Bacillus subtilise</i>	[78]	<i>Aspergillus oryzae</i>	[85]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	[73], [79]	<i>Aspergillus sp.</i>	[86]
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	[74]	<i>Beauveria bassiana</i>	[87],[88]
<i>Pseudomonas sp</i>	[78]	<i>Beauveria sp.</i>	[69]
<i>Rhizobium etli</i>	[79]	<i>Debaryomyces spp.</i>	[89],[90]
<i>Micrococcus luteus</i>	[80]	<i>Trichoderma koningii</i>	[70]
<i>Micrococcus glutamicus</i>	[77]	<i>Tilachlidum humicola</i>	[67]
<i>Vibrio costicola</i>	[81]	<i>Verticillium malthousei</i>	[77]
<i>Vibrio sp.</i>	[82]	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	[72],[76]

Kashyap ve arkadaşları (2002), *Zygosaccharomyces rouxii* mikroorganizmasını kullanarak katı ortam fermantasyonu metodu ile L-glutaminaz enzimi üretmişlerdir. Bu doğrultuda; agro-endüstriyel kaynakların (buğday kepeği, susam yağı vb.), eklenen substratların nem içeriklerinin (%37.5–%75), aşılana mikroorganizma konsantrasyonunun (0.5–3mL), karbon kaynaklarının (glukoz, sukroz, maltoz, laktoz, mannitol vb.), azot kaynaklarının (NaNO₃, NH₄Cl, Malt ekstrakt, Pepton vb.), L-glutamin konsantrasyonunun (%0.25–%3) ve inkübasyon sıcaklıklarının (25°C–50°C) enzim üretimine etkilerini çalışmıştır. Yaptıkları çalışmalar sonucu elde edilen optimum değerler şöyledir: agro-endüstriyel kaynak içeriği %64, karbon kaynağı olarak glukoz ve maltoz, optimum sıcaklık 30 °C olarak bulunmuştur [72].

Prasanth Kumar ve arkadaşları (2009), halofilik *Aspergillus sp.* Mikroorganizmasını kullanarak ekstraselüler L-glutaminaz enzimini üretmişlerdir. Bu doğrultuda; aşılana mikroorganizma konsantrasyonunun (0.5–3mL), karbon kaynaklarının (glukoz, maltoz, laktoz, galaktoz vb.), azot kaynaklarının (NaNO₃, Malt ekstrakt, Pepton vb.), L-

glutamin konsantrasyonunun (%0.5–%3.5) ve inkübasyon sıcaklıklarının (26°C –36°C) enzim üretimine etkilerini çalışmıştır. Çalışma sonucu elde ettikleri optimum değerler şöyledir: Optimum inkübasyon sıcaklığı 28°C, optimum pH değeri 6.0, karbon kaynağı olarak laktozu bulmuşlardır. Bunun yanında azot kaynağının halofilik *Aspergillus* sp. kullanılarak L-glutaminaz enzimi üretimine negatif etkisi olduğu da yine çalışmalarında yer almaktadır [81].

Sabu ve arkadaşları (2000), *Beauveria* sp. mikroorganizmasını kullanarak katı ortam fermentasyonu metodu ile L-glutaminaz enzimi üretmişlerdir. Çalışma sonucu elde ettikleri optimum değerler şöyledir: Optimum sıcaklık 27°C, optimum pH değerleri 6.0 ve 9.0 ve karbon kaynağı olarak glukozdur [69].

4.5 Enzim İmmobilizasyonu

Kelime anlamı olarak immobilizasyon hareketi sınırlandırma demektir. İmmobilize edilmiş enzimlerin de gerçekten hareketleri sınırlandırılmış olmaktadır. Enzimlerin endüstriyel alanda kullanımını artırmak için, özellikle son otuz yılda enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bu alanda yapılan yayınların sayısı da yıldan yıla artmaktadır. Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak immobilize edilebilirler. Suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyon reaksiyonuna enzim molekülünün monomer olarak katılması ve suda çözünmeyen bir matriks veya mikrokapsüllerde tutuklanmasıyla immobilizasyon gerçekleştirilir. İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime üstünlükleri şu şekildedir; Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz. Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vs.) karşı daha dayanıklıdır. Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir. Sürekli işlemlere uygulanabilir. Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır. Ürünün oluşumu kontrol altında tutulabilir. Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur. Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcının suda çözünmemesi, yapısının gözenekli olması, hidrofilik olması, mekanik kararlılık göstermesi, kimyasal ve termal kararlılık göstermesi, kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar enzimle kovalent bağ oluşturabilecek fonksiyonel gruplar taşıması, mikroorganizmalar karşı dirençli olması, zehirli olmaması,

ucuz ve yenilenebilir olması gerekmektedir. Gerçek anlamda ilk enzim immobilizasyon denemelerinin sonuçları 1950’li yıllarda birçok çalışma grubu tarafından aynı anda yayınlanmıştır. Daha sonra bu alandaki çalışmalara dünyanın her alanında büyük bir ilgi duyulup enzimler değişik amaçlarla immobilize edilmiştir [82].

4.5.1 İmmobilizasyon Yöntemleri

Yukarıda da bahsedildiği gibi biyosensörler farklı özellikteki iki elemanın (transduser ve biyoreseptör) birleştirilmesiyle oluşurlar. Uygun biyoreseptör ve transduser seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması aşılması gereken en önemli sorundur. Bu bağlama işlemini biyosensörlerin immobilizasyonu olarak tanımlıyoruz. Bağlama işleminde çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen transduser ve biyoreseptöre göre belirlenir. Enzimler hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden proteinlerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata girmişlerdir. Pek çok endüstriyel, analitik ve klinik proseslerde enzimler, substrat çözeltisi ile karıştırılırlar ve ürüne dönüşüm gerçekleştirildikten sonra ekonomik olarak geri kazanılamazlar. Enzimlerin sadece bir kere kullanılmaları, pahalı olmaları nedeni ile büyük masraflara neden olmaktadır. Bu nedenle immobilize edilerek defalarca kullanılmaları ekonomik olarak daha makul olmaktadır. Günümüzde çok sayıda immobilize enzim endüstride kullanılmaktadır. İmmobilizasyon biyosensörlerin kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. Biyosensör immobilizasyonunda baslıca dört yöntem kullanılmaktadır.

a) Kovalent Bağlama: Biyoreseptörün transduser yüzeyine kimyasal bir reaksiyon sonucu bağlanmasıdır.

b) Tutuklama: Biyoreseptörün bir membran veya tabaka (matriks) içerisinde hapsedilmesidir.

c) Çapraz Bağlama: Tutuklama yöntemi ile kimyasal bağlamanın birleştirilmiş şekli olarak uygulanır. Tutuklanmış biyoreseptör glutaraldehid gibi bifonksiyonel reaktiflerle film veya tabakaya kovalent bağlanır.

d) Adsorpsiyon: Biyoreseptörün film veya tabaka ile hidrofobik, hidrofilik ve/veya iyonik etkileşim sonucu assosiyasyonudur. Biyoreseptörlerin kimyasal yapısı ve fiziksel

durumuna göre immobilizasyon yöntemi belirlenir. Enzimler için uygulanan tüm immobilizasyon yöntemleri protein yapısındaki diğer biyoreseptörler için de uygulanabilir. Örneğin; Hayvan ve bitki dokuları membran yapısında olduklarından farklı immobilizasyon yöntemleri uygulamak gerekir. İmmobilizasyon yöntemine göre biyosensörün ortalama ömürleri aşağıda verilmiştir [82]. (Çizelge 4.2)

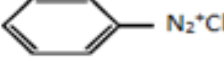
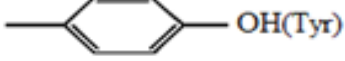
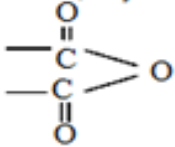
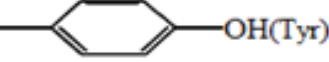
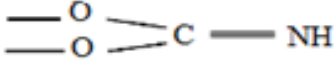
Çizelge 4.2 İmmobilizasyon yöntemine göre biyosensörün ortalama ömürleri

İmmobilizasyon Yöntemi	Biyosensör Ömrü
Adsorpsiyon	1 gün
Fiziksel tutuklama	3-4 hafta
Membranda tutuklama	1 hafta
Kovalent bağlama	4-14 ay

4.5.1.1 Kovalent Bağlama

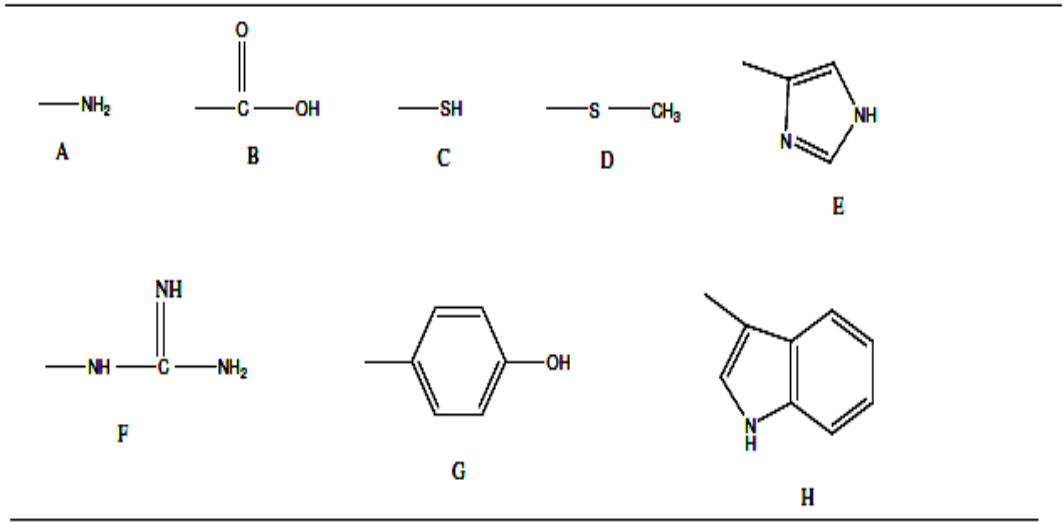
Enzimler doğrudan transdusere veya önceden uygun bir film veya tabaka ile kaplanmış transdusere kovalent olarak bağlanabilirler. Enzimler aktive edilmiş transduser yüzeylerine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanarak immobilize edilen enzim preparatı transduser yüzeyinde bir film veya tabaka oluşturularak da biyosensör hazırlanabilir. Enzimlerin kovalent bağlanmasında kullanılabilecek taşıyıcıların içermesi gereken reaktif gruplar ve bunların enzimdeki hangi aminoasitlerle etkileşime girdikleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3 Enzim immobilizasyonunda kullanılan maddelerde (taşıyıcı) bulunan reaktif gruplar ve reaksiyona girdikleri amino asitlerin fonksiyonel grupları

Taşıyıcının Reaktif Grubu	Enzimdeki Fonksiyonel Grup ve İlgili Aminoasit
 Diazonyum tuzu	 — NH ₂ (Lys, N- Terminal) — SH(Cys)
— R — NCS izotiyosiyanat	— NH ₂ (Lys, N- Terminal)
 Asit anhidrit	— NH ₂ (Lys, N- Terminal)
CH ₂ CON ₃ Açıl azid	 — NH ₂ (Lys, N- Terminal) — SH(Cys)
 imidokarbonat	— NH ₂ (Lys, N- Terminal)
 izosiyanat	— NH ₂ (Lys, N- Terminal)
— CH ₂ COCl Açıl klorür	— NH ₂ (Lys, N- Terminal)

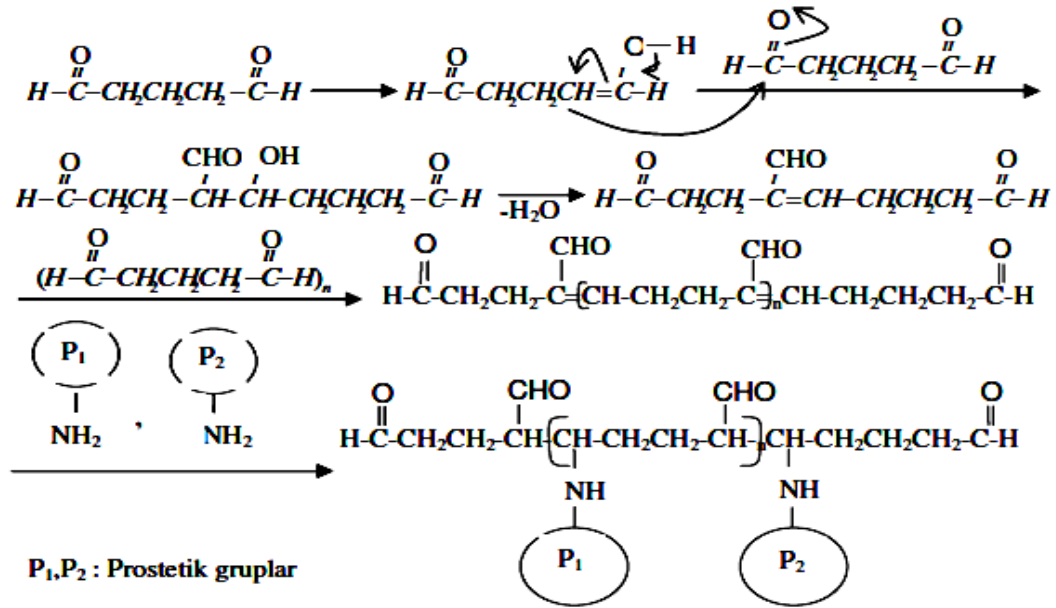
Enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için esansiyel olan aminoasitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların bağlanma sırasında sterik olarak rahatsız edilmemesidir. Kovalent bağlanma enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir. (Çizelge 4.4)

Çizelge 4.4 Enzimlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonunda bağ oluşumuna katılan aminoasitlerin reaktif grupları



- (A): N-terminal aminoasitlerin amino grubu ve lizinin μ -amino grubu,
(B): C-terminal aminoasitlerin ve aspartik ve glutamik asidin serbest karboksil grupları,
(C): Sisteinin sülfhidril grubu,
(D): Metiyoninin tiyoeter grubu,
(E): Histidinin imidazol grubu,
(F): Argininin guanidil grubu,
(G): Tirozinin fenolik grubu,
(H): Triptofanın indolil grubu.

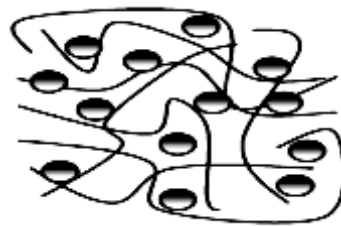
Enzim immobilizasyonu çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) yapılmalıdır [83]. Enzim molekülünün glutaraldehid ile çapraz bağlanması Şekil 4.6’da görülmektedir.



Şekil 4.6 Enzim molekülünün glutaraldehid ile çapraz bağlanması

4.5.1.2 Tutuklama

Bu yöntem enzimlerin yanında organeller, hücreler ve antikorlar için de uygulanabilir. Updike ve Hicks, tarafından hazırlanan, ilk enzim elektrotunda glukoz oksidaz (GOD) poliakrilamid jelinde tutuklanmıştır. Enzimler makromoleküler yapıları proteinler olup polimer jel matrislerde tutuklanabilirler [84]. (Şekil 4.7)



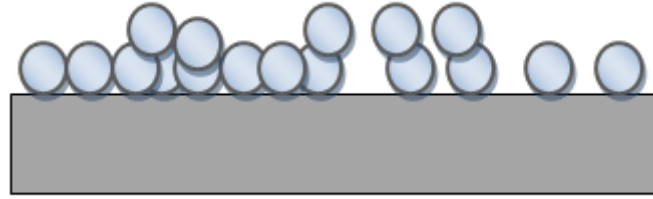
Şekil 4.7 Enzim molekülünün jel içinde veya polimer matrikste tutuklanması

Guilbault ve arkadaşlarının hazırladığı üreaz elektrotunda ise üreaz süspansiyonu elektrot yüzeyinde diyaliz membranı tarafından sarılarak tutuklanmıştır [85], [86], [87], [83]. Çözeltide enzim aktivitesi hızla düştüğünden fiziksel tutuklama yerine kimyasal

kovalent bağlama tercih edilir. Tutuklama için en yaygın kullanılan film veya matriksler nisasta, poliakrilamid, silikon lastiği, polivinil klorür ve polivinil alkoldür.

4.5.1.3 Adsorpsiyon

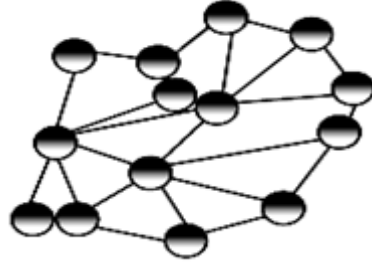
İmmobilizasyonda kullanılan en eski ve en basit yöntemlerdendir. Örneğin, glukoz oksidaz adsorplanmış polietilen membranı ilk olarak 1962 yılında glukoz biyosensörü için önerilmiştir [88]. Genelde, enzim veya biyoreseptör çözeltisine yüzeyi membran veya film ile kaplanmış transduser daldırılır ve belirli bir süre beklenir. Membran veya film, immobilize edilecek reseptöre göre hidrofilik veya hidrofobik karakterde seçilebilir. Enzimler durumunda daha çok hidrofilik membranlar kullanılır. En çok kullanılan adsorbanlar; selüloz asetat membranları, polistiren, polivinil klorür ve silikadır. Sorpsiyon tersinir bir olay olduğundan adsorpsiyon ile immobilizasyon güvenilir bir yöntem değildir ama yine de biyosensörlerde başarılı uygulamaları vardır [85]. Şekil 4.8’de enzim molekülünün elektrot yüzeyine adsorpsiyonu görülmektedir.



Şekil 4.8 Enzim molekülünün elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu

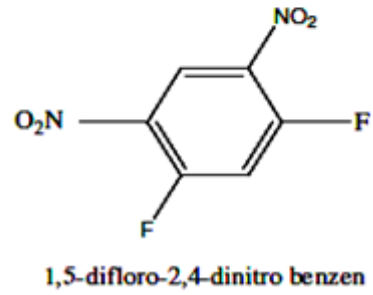
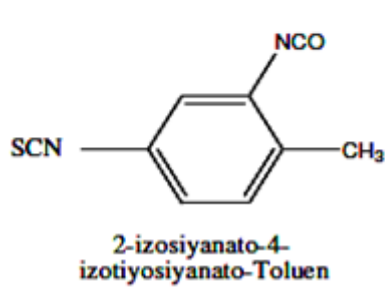
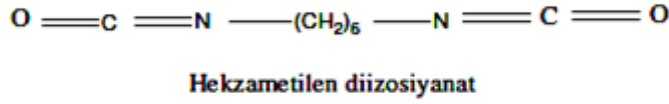
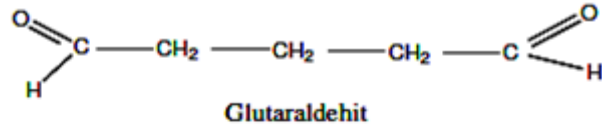
4.5.1.4 Çapraz Bağlama

Bu yöntem biyosensör hazırlanmasında daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin birleştirilmesi şeklinde uygulanır. Şekil 4.9’da enzim molekülünün film veya tabakaya çapraz bağlanması görülmektedir.



Şekil 4.9 Enzim molekülünün film veya tabakaya çapraz bağlanması

Çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehid, hekzametilen diizosiyanat, diflorodinitro benzen, bismaleimido hekzan, disüksinil suberat sık kullanılan reaktiflerdir. Glutaraldehit en sık kullanılan bifonksiyonel reaktifdir. Ortamdaki konsantrasyonu %2-5 (w/w) olmalıdır. Bazı çapraz bağlayıcı reaktiflerin formülleri Şekil 4.10’da verilmiştir [89].



Şekil 4.10 Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri

4.6 Kitosan

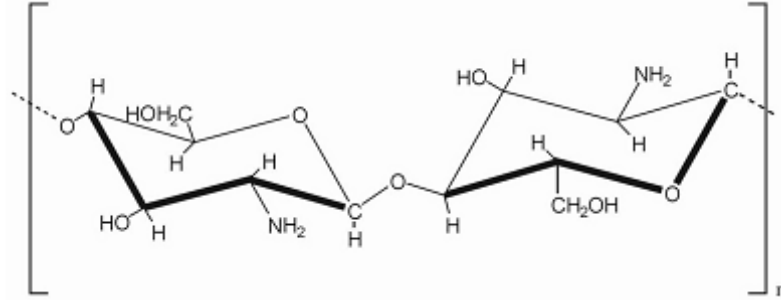
Kitosan, yengeç ve karides gibi kabuklu deniz ürünlerinin dış iskeletlerinde, kelebeklerin kanatlarında, mantarların hücre duvarlarında vb. bulunan doğal bir

polisakkarit olan kitinden kısmi deasetilasyon yoluyla elde edilen, reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip; kimyasal yapı olarak seluloza benzeyen ve doğada selulozdan sonra en sık rastlanan biyopolimerdir. Beyaz renkte, kokusuz ve tatsız, yarı şeffaf partikül veya toz halinde bir madde olan kitosan sindirim enzimlerine dayanıklıdır. Buna karşın bazı bakteriler tarafından parçalanır. Suda çözünmez. Sadece asidik çözücülerde (<6.0 pH) çözünür. Çözündürmek için asetik asit, formik asit, laktik asit gibi organik asitler kullanılır. İnorganik asitlerde çözünme sınırlıdır (% 1 hidroklorik asitte çözünür; sülfirik ve fosforik asitte çözünmez). Kitosan solüsyonlarının pH 7.0 ve üzerinde stabilitesi bozulur. Aynı şekilde oda sıcaklığında uzun süre muhafaza kitosan solüsyonlarının stabilitesini olumsuz etkilemektedir [62].

Doğal bir biyopolimer olan kitosan, özellikle son 50 yıldır araştırmacılar için ilginç bir materyal olarak yerini korumaktadır. Kitine göre birçok avantaja da sahip olan kitosan başta gıda, kozmetik, ziraat, tıp, kağıt ve tekstil olmak üzere birçok endüstri dalında kullanım alanı bulmuştur. In-vivo testler, kitosanın insan vücuduna herhangi bir yan etkisi bulunmadığını biyoyumlu olduğunu göstermiştir. Kitosan yara tedavisinde doku sağlanması için oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, medikal yapay deri, cerrahi dikiş iplikleri, yapay kan damarları, kontrollü ilaç salımı, kontakt lens yapımı, yara bandı, sargı bezi, kolesterol kontrolü (yağ bağlayıcı), tümör inhibitörü, antifungal, antibakteriyel ve hemostatik etki göstermesi vb. şekilde sıralanabilmektedir [90]. Sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilememesi, yüksek viskozitesi, jel oluşturma ve yüksek su bağlama yeteneği vb. nedenlerle bitkisel diyetetik liflere benzerlik göstermektedir ve canlı organizmada benzer etkiler oluşturmaktadır. Bağırsak hareketlerinin ve sindirim faaliyetlerinin düzenlenmesi, bağırsak mikroflorasının (bifidobakterilerin) desteklenmesi, kan kolesterol seviyesinin düzenlenmesi (LDL kolesterolün düşürülmesi, HDL kolesterolün artırılması), kan basıncının düşürülmesi, karaciğer fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi fonksiyonel etkilerinin yanı sıra sindirim yoluyla alındığında ya da emilimini azaltarak (pozitif yüklü bir bileşik olmasından dolayı negatif yüklü olan yağ asitlerine bağlanarak) kilo kaybını desteklemesi oldukça ilgi çekmiştir [62]. Kitosanın pozitif iyonik yüke sahip olması bahsedilen bu özellikleri göstermesinde büyük önem taşır. Kitosan kimyasal yapısı, ucuz ve biyoyumlu olması sebebiyle biyosensör uygulamalarında enzim immobilizasyonu için kullanılmaktadır [91].

4.6.1 Kimyasal Yapısı ve Reaksiyonu

Bir polisakkarit olan kitin kimyasal olarak 2-asetamido-2-deoksi-β-D-glukoz (N-asetil glukozamin)'den oluşmaktadır. (Şekil 4.11)



Şekil 4.11 Kitosan'ın kimyasal yapısı

Şekil 4.11'den de görüldüğü gibi Kitosan, her tekrarlayan birimdeki primer (C-6), ve sekonder (C-3) hidroksil grupları ile amin (C-2) grubu olmak üzere toplam üç tane reaktif gruba sahiptir. Bu reaktif gruplar kolayca kimyasal modifikasyona uğrayabilmekte ve kitosanın mekaniksel ve fiziksel özellikleri ile çözünürlüğünü değiştirmektedir [90].

Kitin'in düşük derecede deasetilasyonu yoluyla elde edilen kitosan ise (1→4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoz (glukozamin) olarak bilinmektedir. Kitosan, 3 çeşit reaktif fonksiyonel gruba sahiptir. C-3, C-6 pozisyonunda birer hidroksil ve C-2 pozisyonunda ise bir amino grubu bulunmaktadır [62].

BÖLÜM 5

BİYOSENSÖRLER

Biyosensörler, analiz edilecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu madde ile etkileşimi sonucu ortaya çıkardığı sinyalin, ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bu etkileşim ürünlerinin bir ölçüm sistemi ile ölçülmesi olarak tanımlanabilir. Daha genel bir ifadeyle biyosensörler biyolojik tepkimelerde hedef analitleri denetlemek için kullanılan algılayıcılardır.

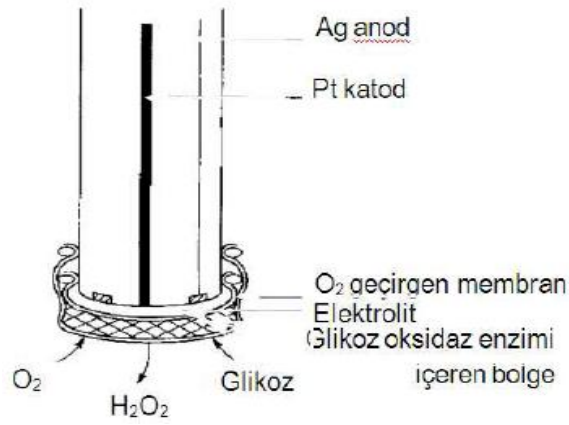
Son yıllarda bilim ve teknolojiadaki hızlı gelişmeler biyosensör kavram ve tanımlarında da önemli genişlemelere yol açmıştır. Canlı yaşamın önemli unsurlarından olan görme, işitme, koklama, tad alma, dokunma gibi algılama mekanizmaları doğal ve en mükemmel biyosensörük sistemler olarak düşündürüldükleri için biyosensör çalışmalarına güzel örnekler oluşturmaktadırlar.

Günümüzde görme, işitme gibi yeteneklerini kaybetmiş kişilerin bu yeteneklerini tekrar yerine koyacak yapay sistemler üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Tıp alanındaki bilim adamlarıyla da ortak çalışmayı gerektiren bu araştırmalar da biyosensör alanına dahil edilebilirler. Bununla birlikte, bugün biyosensörlerden bahsedilince ilk akla gelen daha genel ve yaygın kullanım imkanı bulmuş, analiz amacına yönelik biyoanalitik sistemler olmaktadır [92].

Elektrokimyasal sensörler (elektrokimyasal algılayıcı sistemler) Analitik Kimya’da oldukça yaygın kullanımı olan cihazlardır. Bu cihazlara IUPAC tarafından getirilen tanım şu şekildedir: “Kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve konsantrasyona bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlara elektrokimyasal sensörler “denir. Bu sensörler, yapılarına enzim, hücre, doku, antikor, DNA, vb. biyolojik maddelerin eklenmesiyle BİYOSENSÖR adını almışlardır. Nitel ve nicel analiz yapabilen biyosensörler, “biyo” (biyolojik kökenli) ve “sensör”

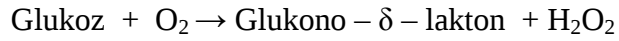
(algılayıcı) kelimelerinden oluşmaktadır. Diğer bir tanım ise; “Biri biyokimyasal, diğeri ise elektrokimyasal özellikte, birbiri içine geçmiş iki çeviriciden oluşan algılayıcı cihaz” olabilir. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek onu tanımadır. Bu tanıma olayının sonucunda bir biyokimyasal ürün de oluşabilmektedir. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise; bu tanıma olayını okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmekle görevlidir [93].

Biyosensörlerin tarihi 50’li yılların ortalarında L.C. Clark’ın Cincinnati hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O_2 miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. Clark ve Lyons (1962) ilk defa biyosensör terimini ifade etmişlerdir. Enzim-elektrot kompleksini imal eden ikili, bu kompleksi glikoz sensörü olarak kullanmışlardır. Sensör, oksido-reduktaz enzim olan glikoz oksidazın platinyum elektroduna immobilize olmasından ibarettir 1962 yılında Clark ve Lyons glukozoksidaz (GOD) enzimini O_2 elektrodu ile konbine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başardılar. Böylece yeni bir analitik sistem oluştu. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifikliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrod) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur. İşte basitçe bu prensibe göre çalışan tarihin ilk biyosensörü 1974 yılında piyasada Yellow Springs Instrument (YSI) olarak görülmüştür. YSI sensörünün geliştirilmesinde ana özellik yeni nesil membranlardır. Clark burada sandviç membran kullanmıştır. Enzim nükleopor polikarbonat membran ve selüloz asetat membran arasına hapsolmuştur. Bu membranlar normalde ortamın potansiyel yapısını etkileyecek olan diğer faktörleri elimine etmekte ve cihazın duyarlılığını ve özgünlüğünü artırmaktadır. Mesela, Clark’ın kullandığı membran H_2O_2 ’i diffüze ederken askorbat ve diğer parazitik kimyasalların geçişini engellemektedir. (Şekil 5.1)

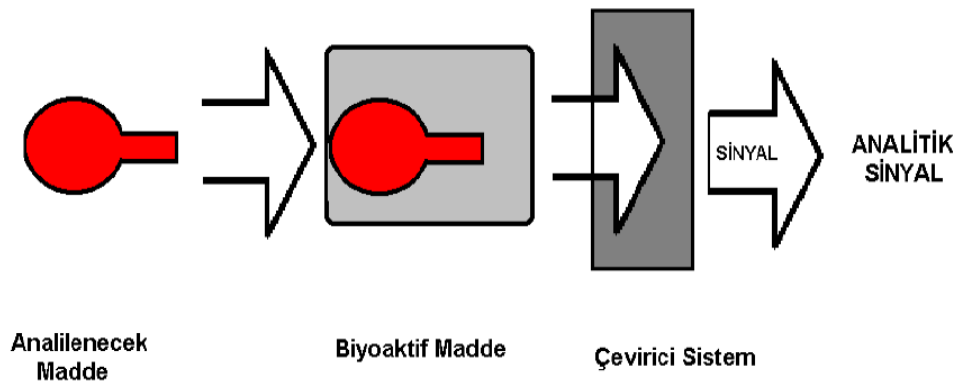


Şekil 5.1 Clark'ın enzim elektrodu

Glukoz oksidaz enzimi glukozun oksidasyonunu katalizler.



Bir biyolojik sıvıdaki glukoz ve çözünmüş oksijen elektrod etrafındaki membranı geçerek elektrod yüzeyine ulaştığında glukoz oksitlenerek glukonik aside dönüşür ve bu sırada O_2 harcanır. Ortamdaki glukoz bittiğinde O_2 tüketimi durur. O_2 elektrodu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözünmüş O_2 ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glukozun oksidasyonu için harcanan O_2 olup buradan biyolojik sıvıdaki glukoz miktarı hesaplanır. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalinde katılmasıyla diğer birçok maddenin tayini mümkündür [94]. Şekil5.2'de biyosensörün en genel yapısı görülmektedir.

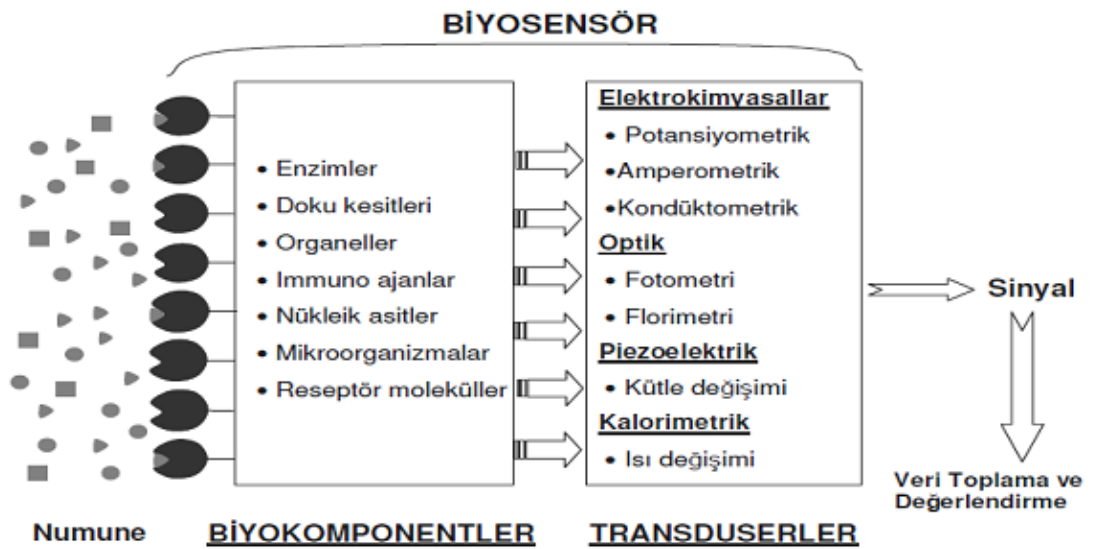


Şekil 5.2 Biyosensörün yapısı

Biyosensörlerin yüksek spesifiklik yanında; renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir konsantrasyon aralığında doğrudan ölçüme olanak sağlamak gibi üstünlükleri vardır. Fakat reseptör olarak adlandırılan biyokomponentlerin pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenmesi biyosensörün kullanım ömrünü azalttığından bir dezavantajdır [94].

5.1 Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu

Bir biyosensör; biyolojik algılayıcı elementin seçiciliği ile hedef analitin konsantrasyonuyla orantılı olarak sinyal üreten transduserin (çevirici) kombinesinden oluşan bir cihazdır. Bu sinyal; proton konsantrasyonundaki değişimden, amonyak ve oksijen gibi gazların salınması ya da yükseltgenmesi, ışık emisyonu, absorpsiyon ya da reflektans, ısı emisyonu, kütle değişimi ve bunun gibi değişimlerden kaynaklanır. Sinyal; transduser yardımıyla akım, potansiyel, sıcaklık değişimi, ışığın absorpsiyonu, ya da elektrokimyasal, termal, optik olarak ya da piezoelektrik anlamda kütle artışıyla ölçülebilir forma dönüştürülür. Sinyal ayrıca ileriki analizler için güçlendirilebilir, işlenebilir ya da depolanabilir. Prensipinde herhangi bir reseptör; herhangi bir transduserle birleştirilip işleyen bir biyosensör üretilebilir. Biyosensörlerde, biyoaktif bileşenin tayin edilecek madde ile etkileştiğinde oluşan sinyalin iletim ve ölçümünde, genel olarak, elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ve kalorimetrik esaslı sistemler kullanılır. Şekil 5.3'te biyosensörlerin genel çalışma mekanizması görülmektedir [92].



Şekil 5.3 Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması

5.1.1 Biyokomponentler

Biyosensörlerin yapısında yer alan biyokomponentler (biyokimyasal bileşenler) çoğu kez biyoreseptör (biyolojik algılayıcı) olarak da adlandırılırlar. Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar, nükleik asitler ve biyolojik membranlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler sensörlerde biyokomponent (biyoreseptör) olarak kullanılırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılanlar; enzimler ve antikorlardır. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratırlar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler transduser tarafından algılanır.

Teorik olarak reseptör ve transduserlerin birçok değişik şekilde birleştirilmesi mümkün olmasına rağmen bu bileşimler bir elektrik sinyali oluşturamazlarsa biyosensör fonksiyon göstermez [92].

Biyoreseptör; bir analitin tanınmasında biyosensörün biyolojik hassasiyete sahip kısmıdır. Biyosensörün hassasiyeti ve seçiciliğinde etkilidir. Bu reseptörler tek bir partiküler substratı bağlayacak ve diğer substratlara bağlanmayacak özellikte olmalıdır; temel olarak biyoreseptörler 3 grup (biyokatalitik, biyoaffinite ve hibrit reseptörleri) altında toplanırlar.

Biyokatalitik reseptörler, analiti belirlenmeyen formdan belirlenebilir forma dönüştürerek transduserle kaydedilebilir ve belirlenebilir kılar [96]. Biyokatalitik tanıma elementleri enzim (mono veya multi enzim) içeren sistemler, hücreler (mikroorganizmalar, örn; bakteriler, mantarlar, ökaryotik hücreler, mayalar), hücre organelleri ve bitki hayvan doku parçalarından oluşur [96]. Enzimler biyosensörlerde kullanılan ilk biyokomponentlerdir. Antibadiler, nükleik asitler, lektinler, boyalar, hücre membran reseptörleri ve diğer spesifik bağlayıcı ajanlar gibi biyolojik komponentler biyoaffinite reseptörlerine örnektir. Hormonlar, ilaçlar, virüsler, tümör antijenleri, bakteri antijenleri ve diğer birçok protein gibi maddelerin belirlenmesi ve ölçümü, immunolojik teknikler vasıtasıyla düşük konsantrasyonlar da bile başarılabilmektedir. Affinite bazlı biyosensörler; belirli bir ligantı termodinamik olarak stabil kompleks formuna dönüştüren seçici etkileşimler oluştururlar. Hibrit reseptörlerde biyosensör uygulamalarında nükleik asit kullanımı rapor edilmiştir. Bu sensörlerin kullanım alanları DNA’da meydana gelen zararları kimyasal olarak belirleme ve DNA’nın türe özgü diziliminin hibridizasyonu ile mikroorganizmaların belirlenmesidir [95]. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir.

5.1.2 Transduserler

Biyolojik ve biyokimyasal sinyalleri veya cevabı belirlenebilir sinyale dönüştürebilen sistemlere transduser denir. Transduserler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyonun özelliğine göre transduserler kullanılır. Elektrotlar amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde kullanılır. Burada amaç; O₂ elektrodunda çözünmüş O₂'yi, pH elektrodunda H⁺ iyonunu ölçmektir. Bir substrat için komponentin aktivitesi; O₂ tüketimiyle, H₂O₂ oluşumuyla, NADH konsantrasyonundaki değişimle, floresans, absorbsiyon, pH değişimiyle, kondüktivite, sıcaklık ya da kütledeki değişimle izlenebilmektedir. Optik sensörlerde hedef; ışık, piezoelektrik sensörlerde ise kristalin salınım rezonansı'nın kütle yüklenimi sebebiyle değişmesidir. Bunların dışında transistörler ve termistörler de transduser olarak kullanılmaktadır.

Transduserler temelde dört grup altında toplanırlar;

1- Elektrokimyasal transduserler

- Amperometrik
- Potansiyometrik
- Kondüktometrik

2- Optik transduserler

3- Akustik transduserler

4- Termal transduserler

5.1.3 Biyosensörlerde Analizlenebilecek Unsurlar

Analizlenecek madde ve yapılar genel olarak analit olarak adlandırılırlar. Biyosensörlerde tayin edilebilen maddeler örnekleriyle birlikte Çizelge 5.1'de verilmiştir.

Çizelge 5.1 Biyosensörde tayin edilebilen maddeler [97]

Analizi Yapılan Maddeler	Örnekler
Amino Asitler	Alanin, arginin, asporjin, aspartik asit, sistein, glutamin, glutamik asit, glutatyon, histidin, levsin, lisin, metionin, fenilalenin, sarkosin, serin, tayrosin, teitofan, valin
Gazlar	NH ₃ , H ₂ , CH ₄ , SO ₂ , NO
Kofaktörler	AMPT, ATP, NAD(P)H
Amidler ve aminler	Aminopirin, anilin, aromatik aminler, asetil kolin, kreatin, kreatinin, guanidin, guanosin, penisilin, spermin, ürik asit, üre, zantin
Karboksilik asitler	Asetik asit, formik asit, glukonik asit, izositrik asit, askorbik asit, laktik asit, malik asit, okzalik asit, piruvik asit, süksinik asit
Kompleks maddeler	Antibiotikler, mutojenler, vitaminler
İnorganik iyonlar	F ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₃ ⁻² , SO ₃ ⁻² , SO ₄ ⁻² , Hg ⁺² , Zn ⁺²

5.1.4 Biyosensörlerde Kullanılan Biyoaktif Yapılar

Biyosensörlerde kullanılan ve analizlenecek madde ile spesifik bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bileşenler, komplekslik hiyerarşisine göre basitten karmaşığa doğru bir sıralama yapıldığında, iyonoforlar, antikorlar, enzimler, nükleik asitler, lipozomlar, biyomembranlar (örneğin; membran reseptörleri), hücre organelleri (örneğin; mitokondri), tüm hücreler, doku kesitleri ve homojenatları ve organlar (örneğin; koku alma organı) olarak sınıflandırılabilirler [98]. (Çizelge 5.2)

Çizelge 5.2 Biyosensörlerde kullanılabilen biyoaktif bileşenler

Biyoaktif Tabaka Bileşenleri		
Organlar (Örneğin; koku alma organı)		Doku Kesitleri Tüm Hücreler
	Hücre Organalleri (Örneğin; mitokondri)	
Biyomembranlar (Örneğin; resptör)		Lipozomlar Nükleik Asitler
	Enzimler	
Antikorlar		İyonoforlar

5.1.5 Biyosensörlerde Yararlanılan İletim ve Ölçüm Sistemleri

Biyosensörlerde, biyoaktif bileşenin tayin edilecek madde ile etkileştiğinde oluşan sinyalin iletim ve ölçümünde, genel olarak, elektrokimyasal, optik, kalorimetrik ve piezoelektrik esaslı sistemler kullanılır [98]. (Çizelge 5.3)

Çizelge 5.3 Biyosensörlerde kullanılan ölçüm sistemleri

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

Bu başlık altında en yaygın olarak potansiyometrik, amperometrik, voltametrik ve alan etkili biyosensörlere rastlanmaktadır [99].

5.1.6 Biyosensör Çeşitleri

5.1.6.1 Elektrokimyasal Sensörler

Bu başlık altında en yaygın olarak potansiyometrik, amperometrik, voltametrik ve alan etkili biyosensörlere rastlanmaktadır [99].

5.1.6.2 Potansiyometrik Biyosensörler

Potansiyometri, bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas almaktadır ve belirlenen elektrot potansiyeli doğrudan analit derişimini tanımlamaktadır. Potansiyometrik sensörlerin düşük hassasiyet, spesifik olmayan etkileşimlere ait ve aletsel sinyal alınması gibi büyük problemleri vardır. Özellikle sinyal/gürültü oranı analitik problemlere sebep olabilmektedir [99].

5.1.6.3 Voltametrik Biyosensörler

Mikrobiyolojik reaksiyonlar, genellikle iletkenlik ve kapasitansta artma, empedansta azalmaya sebep olmaktadır. Buna dayanarak rezistans, kapasitans, iletkenlik ya da empedanstaki değişimin ölçümünü esas alan sensörler bu grupta yer almaktadır. Klinik örneklerdeki bakteri tespitinde, spesifik patojen tespitinde, endüstriyel mikrobiyal proses kontrolünde bu sensörlerden faydalanılmaktadır. Modern elektroanalitik sistemler oldukça düşük tespit limitlerine sahip olup (10^{-9}) küçük hacimde örneklerin kullanılmasına (1-2µl) olanak tanımaktadır. Bununla birlikte elektrot sistemi ölçüm ortamından sürekli alınan sinyalin (online) takibine izin verir. Elektrokimyasal analiz için gereken malzeme, diğer analitik metotlarla karşılaştırıldığında çok daha ucuz ve basittir. Ayrıca elektrokimyasal sensörler optik esaslı sensörlere göre de bulanık ortamda çalışabilme, karşılaştırılabilir enstrümental duyarlılık, minyatürleşmeye uygunluk gibi avantajlara sahiptir [99].

5.1.6.4 Amperometrik Biyosensörler

Genel anlamda amperometri, bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü esasına dayanır. Amperometrik biyosensörlerde akım şiddeti, çalışma elektrotunda yükseltgenen veya

indirgenen elektroaktif türlerin derişiminin bir fonksiyonudur. Referans elektrot olarak görev yapan ikinci bir elektrot vasıtasıyla akım şiddetinden analiz edilecek türlerin derişimlerinin belirlenmesinde yararlanılır. Elektrokimyasal reaksiyonlarda çoğu analitlerin redoks eşı olarak hareket edememesinden dolayı direkt olarak analiz edilebilecek az miktarda uygulama vardır. Bu yüzden algılayıcı elektrot üzerinde analitin elektrokimyasal reaksiyonu için elektrokimyasal aktif etiketler (direkt veya enzimatik reaksiyon sonucu ürün olarak) gereklidir. Oksijen ve H₂O₂ elektrotlar en popüler olanlarıdır [99].

5.1.6.5 Optik Sensörler

Optik çeviricilerin kullanıldığı durumda iki genel sınıf vardır. Birincisinde, ışığın iletimindeki değişimin ölçülmesi, ikincisinde ise floresansın ölçülmesi söz konusudur. Işığın iletimindeki değişimin ölçülmesine dayalı, optik esaslı sensörlerde, ölçüm sistemi, madde derişimine bağlı olarak absorbans veya luminesansta değişim gösteren bir boya içerir veya CO₂, O₂ veya pH değişimi gibi bir fizikokimyasal özellikten faydalanılır. Bu sensörlerde en önemli etken fiber boyunca ışık iletiminin etkinliğidir. İkinci sınıf, fiberin kendi özelliklerindeki (intrensek) değişimleri kapsar ve arka alan (evanescent) biyosensörler ve yüzey plazmon rezonans biyosensörler olarak iki gruba ayrılır [99].

5.1.6.6 Termal Sensörler

Temel prensipleri; bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanılarak substrat derişiminin belirlenmesine dayanır. Bütün biyolojik reaksiyonlar ekzotermiktir. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır. Sıcaklık değişimleri termal olarak yalıtılmış ortamdaki termistörler veya termofiller aracılığıyla izlenir. Kullanılan termistörler çok küçük sıcaklık değişimlerine bile duyarlıdır. Dolayısıyla çok düşük miktardaki substrat derişiminin ölçümüne (10⁻⁵M) olanak tanır [99].

5.1.6.7 Kütle Hassas Sensörler

Çevirici olarak piezoelektrik kristallerin kullanıldığı kütle hassas biyosensörler, rezonans frekanstaki değişime dayanarak santimetre-karede nanogram seviyesinde kütle değişimini ölçebilen ve bu yüzden de antikor-antijen etkileşimlerinde sıkça kullanılan

biyosensörlerdir. Kütle hassas biyosensörlerin çalışma prensibi piezoelektrik etkiye dayanır [99].

5.1.7 Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Biyosensörler birçok alanda kullanılmaktadır. Biyosensörler tıp, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespit ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar.

Biyosensörler; gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler, bazı organik bileşikler yanında enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar. Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları Çizelge 5.4’te gösterilmektedir [92].

Çizelge 5.4 Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz olanakları

Biyosensör grubu	Kapsadığı analiz alanı
Enzim Sensörleri	Küçük moleküllü organik ve anorganik maddeler (ilaçlar, gıda maddeleri, vitaminler, antibiyotikler, pestisitler)
Mikrobiyal Sensörler	Enzim sensörlerinin kullanıldığı alanlar, biyolojik O ₂ gereksinimi, toksisite, mutajenite.
DNA-Sensörleri	Virüsler, patojen mikroorganizmalar
İmmüno-sensörler	Virüsler, patojen mikroorganizmalar, ksenobiyotikler

5.1.7.1 Tıbbi Alanda Biyosensör Kullanımı

Metabolitlerin ölçülmesi, insulin eksikliği belirtilerinin ölçülmesi, hastane koşullarının gözlenmesi, yapay pankreasın çalışma koşullarının kontrolü, vb. Biyosensörlerin tıbbi analitik sistemlere üstün gelmesinin nedeni, spesifik bir metabolitin veya tedavide kullanılan ilacın miktarının kısa bir sürede tayin edilebilmesidir. Kısa süreli tayin gerektiren bazı hastalıklar;

- Yoğun bakım ünitelerinde ve cerrahi girişimlerde hızlı doz ayarlamak için ilacın kan konsantrasyonunun hızlı tespiti

- Prematüre çocukların bakım ve takibi
- İmplant problemlerin yerleştirilmesi sırasında, ilacın kanda uzun süreli konsantrasyonunun tayini
- Hemodiyaliz
- Yapay pankreas
- Canlıya transplante edilmeden organların canlılığını korumak ve işlevlerini değerlendirmek üzere organın prezervasyonu

5.1.7.2 Endüstriyel Alanda Biyosensör Kullanımı

Endüstriyel proses kontrollerinde gereklidir. Biyoreaktörlerin kontrolü, giren hammadde ve çıkan ürünlerin ölçülmesi, vb.

5.1.7.3 Çevresel Denetimlerde Biyosensör Kullanımı

Çevre Koruma Ajansı (ing: EPA (Environmental Protection Agency) EPA tarafından hava ve su düzenli olarak izlenmektedir. Ayrıca yerel idari mercilerin de bölgesel izleme birimleri bulunmaktadır. Bu birimler düzenli olarak hava ve suyu tahlil etmektedirler.

Biyosensör hazırlanmasında, aktif biyolojik materyalin, kararlılığını koruyarak immobilize edilmesi gerekir. Bu nedenle genellikle jelde tutuklama yöntemi kullanılır. Biyomateryal olarak, uzun yaşam süreleri, ucuz ve kararlı olmaları, pH ve sıcaklık gibi dış etkenleri tolere etme özelliklerinden dolayı mikroorganizmalar; enzimlere ve antikorlara göre daha kullanışlıdır.

Biyokimyasal oksijen istemi (BOD) atık sularda organik kirliliğin ölçüsüdür ve ölçüm genellikle 5 gün sürmektedir. BOD sensörleri genellikle oksijen elektrodu yüzeyinde tutturulmuş immobilize mikroorganizma membranından oluşur. Kirlilik kaynağı emisyon derecelerinin ve atmosfer kirliliğinin ölçümü için, mikrobiyal esaslı CO₂, NO₂, NH₃, CH₄, SO₂ gibi gaz temelli birçok biyosensör geliştirilmiştir. Sensör üzerine enzim immobilizasyonu ile sürekli bir ölçüm sistemi oluşturabilir ve çevresel numunelerde toksik madde tayini yapılabilir.

5.1.7.4 Savunma Alanında Biyosensör Kullanımı

Askeri ve sivil savunma alanında kullanılmak üzere birçok sensör ve biyosensör dizaynı ve imalatına, son körfez krizi ve 11 Eylül sonrasında hız verilmiştir. Herhangi bir biyoterör ve biyosaldırı sonrası erken tesbit ve analiz için çok güçlü ve taşınabilir biyosensörler en elzem cihazlardandır.

Kimyasal ve biyolojik silahlar, insan yaşamına yanlış yansıyan uygulamalardan biridir. Çok sıkı denetim altında olmalarına rağmen kimyasal ve biyolojik silahların tehlikeleri her zaman sürmektedir. Sentetik kimyasallar, bitki, hayvan ve mikroorganizma kaynaklı toksinler, bakteri ve virüsler biyolojik silahların ana materyalleridir.

Kimyasal silahların toksik kimyasal reaktifleri; organofosfor ve siyanür türevleridir. Organofosfor bileşikleri asetilkolinesteraz inhibisyonu ile etki ederler ve bu yüzden “sinir gazı” olarak adlandırılırlar. Temel sensör olarak bir pH elektrodunun kullanılan sistemlerde asetilkolinesteraz immobilize edilir. Bu biyosensörlerde organofosfor bileşiklerinin konsantrasyonu ile orantılı inhibisyonu izlenir ve sonuca ulaşılır. Hidrojen siyanür ve siyanojen klorür; toksik kimyasalların diğer önemli bir grubunu oluştururlar. Bunlar solunum zincirinde sitokrom oksidazla tepkimeye girerek işlevlerini gerçekleştirirler. Bu ilke temel alınarak, siyanür tayinine yönelik amperometrik esaslı modifiye altın elektrotu geliştirilmiştir.

Biyolojik silahların temelini, canlılarda hastalık ve ölüme yol açabilecek bakteri, virüs ve mantarlar oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar yüzeylerinde önemli düzeyde antijenik determinantlara sahiptir. Bu özellik, mikroorganizma tayinine yönelik biyosensör hazırlanmasında immunojenik ilkeleri ön plana çıkarmaktadır.

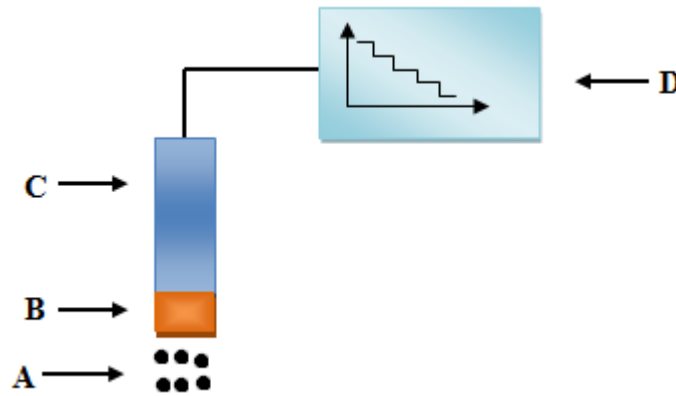
5.1.7.5 Gıda Sektöründe Biyosensör Kullanımı

Gıdalara yönelik kantitatif analizler başlıca kalite ve güvenlik konularına açıklık getirmeyi hedef alır. Renk, aroma, vitamin ve kimyasal miktarlarının yanında zararlı mikroorganizmaların, toksinlerin, alerjenlerin gıdaya etkisine dikkat edilmelidir. Biyosensörler, gıda analizlerinde besinin doğal bileşenlerinin, ortama karışan maddelerin izin verilen sınırlar içinde olup olmadığının belirlenmesinde büyük önem taşır. Gıda analizlerinde doğal örneklerin, hammaddelerin, işlem basamaklarının, mamül

ürünlerinin, taşıma adımlarında doğal bileşenlerin bozumu, mikrobiyal kontaminasyon ve bunu önlemek için kullanılan katkı maddelerinin tayini önemlidir.

5.1.8 Enzim Sensörleri

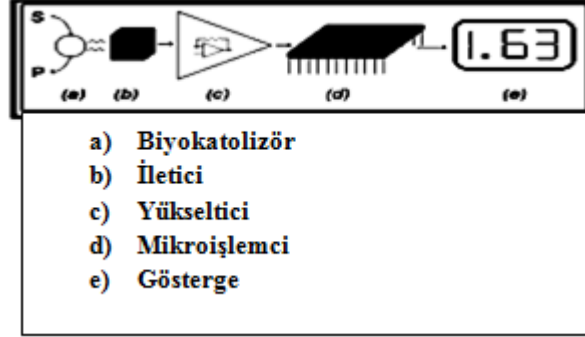
En genel anlamda bakıldığında bir enzim sensörü; iletici, ince bir enzim tabakası ve ölçüm kombinasyonundan oluşmaktadır. Diğer biyosensörlerden tek fark biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimler bulunmaktadır. Şekil 5.4'te bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi verilmektedir.



Şekil 5.4 Bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi (A: Analizlenecek madde, B: immobilize enzim tabakası, C: iletici ve D: Ölçüm sistemi).

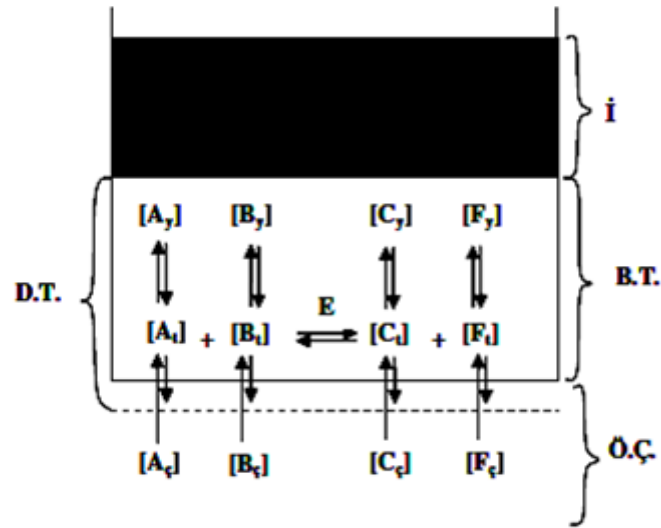
Bir enzim elektrodunda enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği tepkimeye uygun bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir iletici ile birleştirilmektedir. İletim sistemi biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan ürünün miktarındaki artışı tespit edebilecek şekilde seçilmelidir. Biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka iletici ara yüzeyindeki derişimlerin hızlı bir şekilde dengeye ulaşabilmesi için difüzyon engelini en aza indirmek amacıyla biyoaktif tabaka kalınlığının mümkün olduğunca ince olması gerekmektedir. Bunun yanı sıra biyoaktif tabakada sabit bir substrat derişimi sağlayabilmek için ölçme çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması gerekmektedir. İletici sistemin ölçme sistemine gönderdiği sinyal biyoaktif tabaka ile iletici ara yüzeyindeki derişimlerdeki değişikliğe bağlıdır. Ancak söz konusu derişimler denge halinde ölçme çözeltisindeki derişimlerle orantılı olduğu için çoğu zaman kalibrasyon grafiği çizilerek sonuca varılır [100].

Şekil 5.5'te görüldüğü gibi sistemin özelliğine bağlı olarak yükseltici, mikroişlemci, dijital görüntüleyici gibi kısımlar sistem içinde yer alabilirler.



Şekil 5.5 Bir biyosensör sisteminde bulunan bileşenler.

Bir enzim sensörünün çalışma ilkesi, enzim veya enzimlerin immobilize edilmiş olduğu biyoaktif tabakadaki olayların biraz daha yakından incelenmesiyle daha kolay anlaşılabilir. Şekil 5.6'da biyoaktif tabakada gerçekleşen olaylar açısından bir enzim sensörünün genel çalışma ilkesi özetlenmiştir [85].



Şekil 5.6 Enzim sensörünün genel çalışma ilkesi

- (A): Substrat
(B): Kosubstrat veya Koenzim
(C ve F): Ürünler
(ç): Ölçüm çözeltisi içindeki
(t): Biyoaktif tabakadaki
(y): Elektrot yüzeyindeki konsantrasyonlar

(D.T.): Difüzyon tabakası
(Ö.Ç.): Ölçüm çözeltisi
(B.T.): Biyoaktif tabaka
(İ): iletici

Şekil 5.6'dan da görüldüğü gibi bir enzim elektrodunda enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği reaksiyona uygun bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir iletici ile birleştirilmektedir. İletim sistemi, biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonucu substrat, kosubstrat (veya koenzim) konsantrasyonundaki azalış ya da ürün konsantrasyonundaki artışı tespit edebilecek şekilde seçilebilir. Konsantrasyonların hızlı bir şekilde dengeye ulaşabilmesi için difüzyonu azaltmak amacıyla biyoaktif tabaka kalınlığının mümkün olduğunca ince olması gerekmektedir. Bunun yanı sıra biyoaktif tabakada sabit bir substrat konsantrasyonu sağlayabilmek için ölçüm çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması da gerekmektedir. Doğal olarak tayin edilecek türlerin ölçüm çözeltisindeki, biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka-iletici ara yüzeyindeki konsantrasyonları farklı olur. İletici sistemin ölçeceği sinyal biyoaktif tabaka-iletici ara yüzeyindeki konsantrasyonlara ilişkindir.

5.1.8.1 Enzim Sensörlerinin Sınıflandırılması

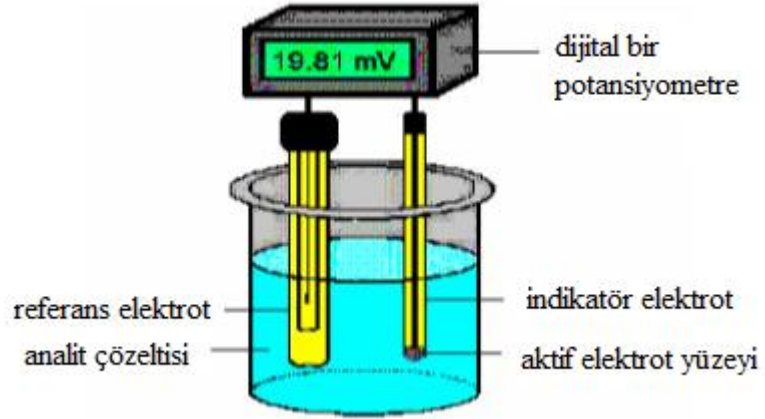
Enzim sensörlerinin sınıflandırılması genel olarak, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sinyalin belirlenme ilkesine göre yapılmaktadır. Bu çerçevede Çizelge 5.5'te söz konusu sınıflandırma özetlenmektedir [85].

Çizelge 5.5 Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

1. Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensörleri Amperometrik esaslı enzim sensörleri • Birinci nesil amperometrik enzim elektrodları • İkinci nesil amperometrik enzim elektrodları • Üçüncü nesil amperometrik enzim elektrodları Potansiyometrik enzim sensörleri • Proton duyar potansiyometrik enzim elektrodları • Amonyum duyar potansiyometrik enzim elektrodları • Karbondioksit duyar potansiyometrik enzim elektrodları • Diğer iyon duyar potansiyometrik enzim elektrodları • Yarı iletkenleri esas alan enzim sensörler • Enzim alan etki transistörleri (ENFET)
2. Optik esaslı enzim sensörleri • Absorpsiyon esaslı optik enzim sensörleri • Flouresans esaslı optik enzim sensörleri • Biyoluminesans esaslı optik enzim sensörleri
3. Piezoelektrik esaslı enzim sensörleri
4. Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri

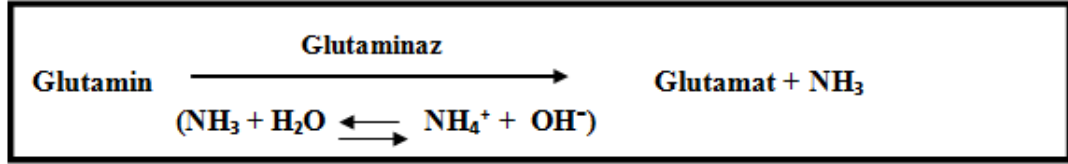
Potansiyometrik Esaslı Enzim Sensörleri

Akımın çok az geçtiği veya hiç geçmediği sistemlerde, indikatör elektrodun referans elektroda karşı gösterdiği, konsantrasyon değişimine bağlı olarak değişen potansiyelin ölçüldüğü tayin yöntemine **potansiyometri** denir. Çalışma elektrodu, çözeltideki türlerden bazılarına seçimlilik gösteren ve iç kısmında bir başka karşılaştırma elektrodu ile nicel analizi yapılacak türün belli derişimdeki çözeltisi bulunan ve bir membran ile analizi yapılacak çözeltiden ayrılmış bir elektrottur. Analizi yapılacak çözeltiye daldırılan bu elektrot ile aynı çözelti ile temasta olan bir karşılaştırma elektrodu arasında oluşan gerilim değeri ile analizi yapılan tür arasında logaritmik bir ilişki vardır. Bu hücre geriliminin ölçümü sırasında iki elektrot arasında uygun bir devre yardımıyla bir akımın geçmemesi sağlanır. Şekil 5.7’de potansiyometrik bir ölçüm sistemi şematik olarak görülmektedir.

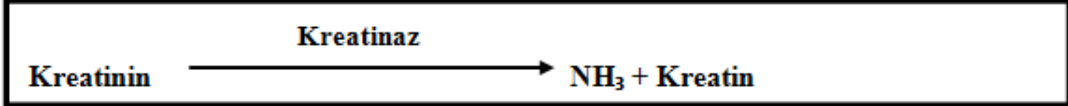
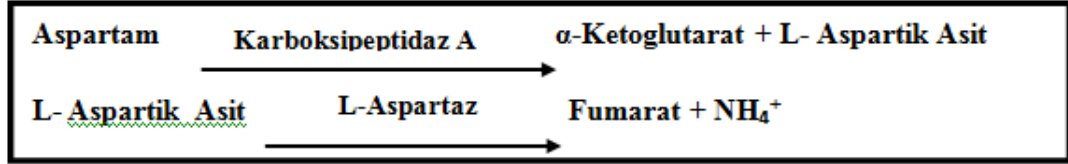


Şekil 5.7 Potansiyometrik ölçüm sisteminin sematik olarak gösterimi

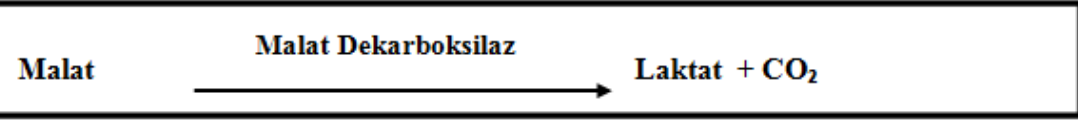
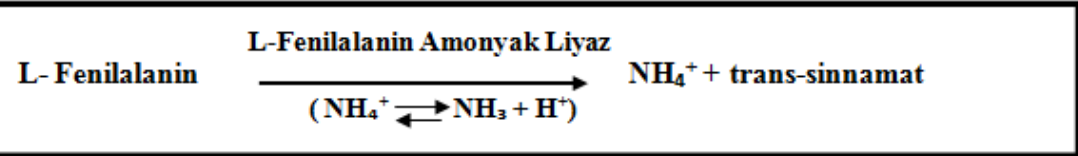
İçte ve dışta bulunan çözeltilerde analizi yapılacak türün derişimi açısından bir fark varsa membranın iç yüzeyi ve dış yüzeyi arasında bir gerilim farkı oluşur. Bu gerilim farkının değeri analizi yapılan türe ve derişimine bağı olduğu gibi, membranın cinsine ve çözeltilerde bulunan öteki bileşenlerin tür ve miktarlarına da bağıdır. İyon seçici elektrotlar olarak adlandırılan bu elektrotların en çok bilineni, H^+ iyonlarına karşı seçimlilik gösteren ve ince bir cam zarın membran olarak kullanıldığı cam elektrottur. Bir iyon seçici elektrotla ölçülen gerilim değeri, elektrodun seçimlilik gösterdiği türe ek olarak çözeltilerde bulunan diğer türlerden de etkilenir. Potansiyometrik sensörlerin duyarlı, kararlı, dayanıklı olması ve hızlı cevap üretmesi istenir. Potansiyometri esaslı ve biyoaktif bileşen olarak enzimlerin kullanıldığı bazı biyosensörlere ilişkin örnekler aşağıda verilmiştir [98].



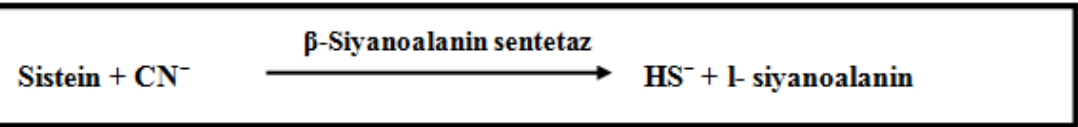
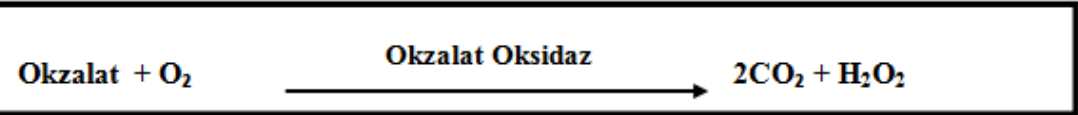
Amonyum Duyar Sensör



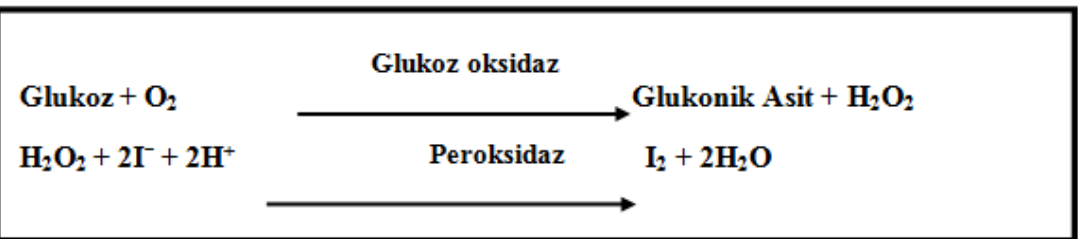
Amonyok Duyar Sensör



Karbondioksit Sensörü



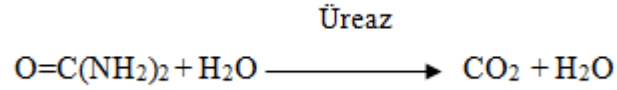
Siyanür Sensörü



İyon Duyar Elektrot

pH Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotları: Proton konsantrasyonundaki değişmeyi belirlemek amacıyla tasarlanan bu tür enzim elektrotlarında temel sensör

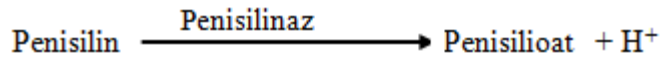
olarak en yaygın bir şekilde klasik cam elektrotları kullanılır [94]. Bunların yanısıra antimon elektrotunda olduğu gibi H^+ iyonlarına duyar bazı metalik elektrotlarında kullanılması mümkündür. Temel ilke proton konsantrasyonundaki küçük farkların belirlenmesidir. Potansiyometrik enzim sensörlerine verilebilecek en klasik örnek üre tayinine yönelik sensördür.



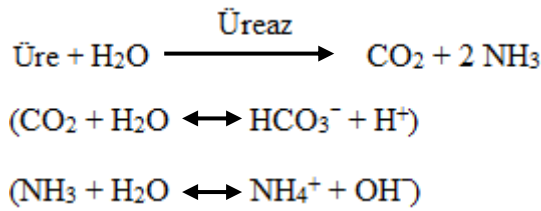
pH Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotlarının Bazı Uygulamaları

pH duyar potansiyometrik enzim elektrotlarına ilişkin seçilmiş örnekler aşağıda verilmiştir. Bu tür enzim sensörlerinde temel iletici olarak genelde cam pH duyar elektrotlar kullanılır.

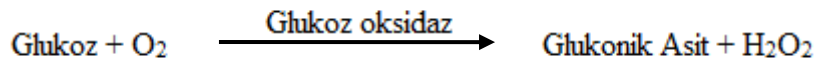
1) Penisilin Tayini [86]



2) Üre Tayini [86]



3) Glukoz Tayini [101], [102]



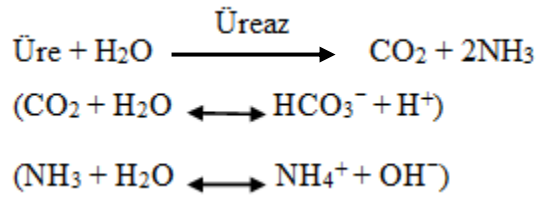
Amonyum Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotları: Amonyum iyonlarına duyar temel sensör ile enzimin birleştirilmesiyle hazırlanan bu elektrotlar genelde H^+ , K^+ ve Na^+ gibi tek yüklü katyonlara da duyarlık gösterdikleri için ölçüm ortamlarında benzer

maddelerin bulunması durumunda girişim problemleri ortaya çıkmaktadır. Girişim etkilerini azaltmak için değişik yöntemler kullanılmaktadır [82].

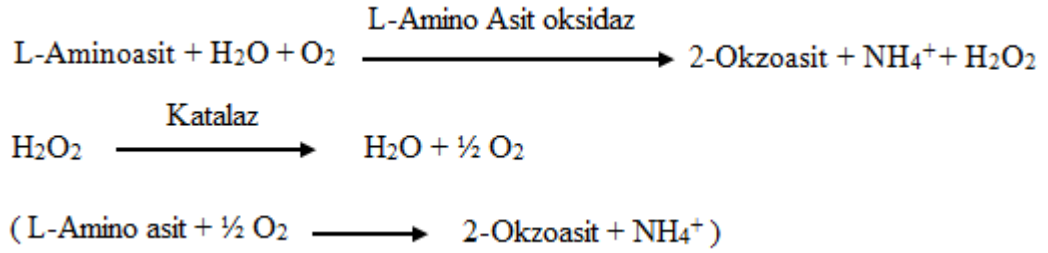
Amonyum Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotlarının Bazı Uygulamaları

Amonyum duyar potansiyometrik enzim elektrotlarına ilişkin seçilmiş örnekler aşağıda verilmiştir. Bu tür enzim sensörlerinde temel iletici olarak NH_4^+ duyar elektrotlar kullanılır.

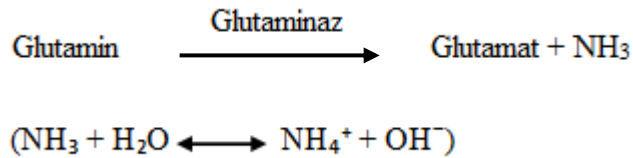
1) Üre Tayini



2) L-Amino Asit Tayini



3) Glutamin Tayini



5.1.9 Enzim Elektrotlarında Performans Faktörleri

Hazırlanan biyosensörün hedeflenen amaçlar çerçevesinde kullanılır olup olmadığına, ancak performans faktörlerinin ayrıntılı bir şekilde belirlenmesinden sonra karar verilebilir [94].

5.1.9.1 Kalibrasyon ve Duyarlılık

Duyarlılık derişimdeki bir birim değişiklik için biyosensör sinyalinin zamanla değişimi olarak tanımlanır. İdeal olarak bir biyosensörün duyarlılığın 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 kolayca belirlenebilmektedir. Zamanla bir biyosensörün duyarlılığındaki değişimin belirlenmesi için genellikle hergün kalibrasyonunun yapılması gerekmektedir [94].

5.1.9.2 Kararlılık

Kararlılık biyosensör ömrünün uzunluğu hakkında bilgi verir. Uzun ömür aynı materyalle çok sayıda analizin yapılabileceğini anlatır. Bu durumda işgücü ve maliyet açısından önemli avantajlar sağlanır. Söz konusu ömür, onların saklama ve çalışma koşulları açısından başlıca iki durumda incelenir. Doğal olarak kullanılmadan ideal koşullarda saklandığındaki ömür ile sürekli çalışma koşullarındaki ömür farklı olacaktır. Biyolojik materyal açısından biyosensörün kararlılığı incelendiğinde enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi gibi parametreler önem taşır. Genellikle fiziksel immobilizasyon yöntemlerinin kullanılması durumunda biyosensör ömrü kimyasal yöntemlere göre daha kısadır [94].

Biyolojik materyal açısından enzim sensörünün kararlılığı incelendiğinde enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi gibi parametrelerin önem taşıdığı görülür. Çalışma koşulları açısından bakıldığında, analiz için yeterli koşulları sağlıyorsa nispeten düşük sıcaklıklarda çalışmak biyosensör ömrünü uzatır. Saklama açısından bakıldığında +4 °C’de mikrobiyal üremeye izin vermeyecek ortamlarda saklama aynı yönde bir katkı sağlayacaktır. Bütün bunlarla birlikte reaksiyon ürünlerinin bazı durumlarda enzim inaktivasyonuna neden olabileceğı, kofaktör veya aracı içeren sistemlerde bunların kaybının aktivite düşüşüne yol açacağı unutulmamalıdır.

5.1.9.3 Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı

Kalibrasyon grafiğinde substrat derişimi ile sensör cevabı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu derişim aralığına “doğrusal çalışma aralığı” denir. Bu doğrusal grafiğin en alt sınırı; tayin sınırı olarak tanımlanır. Doğrusal tayin aralığının ve tayin sınırının

uygunluğu için, analizlenecek maddenin analiz ortamdaki düzeyi ve girişim yapabilecek maddelerin olması oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra biyosensör cevabını etkileyen parametreler doğrudan sensör kalibrasyonunu da etkiler. Örnek olarak enzim sensörlerinde başlıca pH, sıcaklık ve bozucu türlerin sensör cevabını etkileyerek tayin aralığını değiştirebileceğı görülür [94].

5.1.9.4 Cevap Süresi

Cevap zamanı biyosensörün analizlenecek maddenin bulunduğu ortama temas ettiğı andan sinyalin kararlı hale geldiğı ana kadar geçen süredir. Çok sayıda numunenin söz konusu olduğı analizlerde en kısa sürede elde edilen sonuç büyük önem taşıdığından biyosensörün cevap süresinin kısa olması istenir [94].

Girişim yapan iyonlar, bir Nernst potansiyel farkı oluşması için taşınması gereken iyonların aktif elektrot yüzeyine ulaşmalarını geciktirir ve cevap zamanını etkiler.

- Cevap zamanı aşağıdaki işlemlerle azaltılabilir;
- Etkili karıştırma (veya akış hızının artırılması),
- Membran yüzeyinden kirliliklerin uzaklaştırılması veya çok küçük membran yüzeyli mikro-elektrotlar kullanılması,
- Ölçüm sırasında çözelti konsantrasyonunun seyreltikten derişige doğru olması. Nötral taşıyıcı membranlarda, aktif maddeye (ligand veya kompleks) çözeltideki iyonun tutunma hızı, cevap zamanını etkileyen en önemli faktördür. Bunun dışında;
 - İyon ekstraksiyon kapasitesi
 - Difüzyona karşı direnç
 - Membran kalınlığı
 - Membrandaki çözücünün polaritesi de cevap zamanını etkileyen faktörlerdir.

5.1.9.5 Seçicilik

İdeal bir biyosensörün sadece hedef analitin derişimindeki değişikliklere cevap vermesi ve diğer türlerin varlığından etkilenmemesi gerekir [94]. Enzimatik reaksiyonun substrat ve ürünleri ile girişim yapan maddelerin bulunması durumunda sensör sinyali etkilenecek hedef analitin derişimi yanlış tayin edilir. Bu problem, girişim veren

maddenin bir ön işlemle uzaklaştırılması veya bunlardan etkilenmeyen bir sensör kullanılması ile giderilmesi ile giderilebilir.

Sadece tek bir iyonduyarlı bir elektrot yoktur. X iyonunu ölçmek için kullanılan bir elektrot Y iyonuna da duyarlı olabilir. Diğer iyonların varlığı elektrot performansını önemli ölçüde zayıflatır. Bu iyonların girişimi, elektrot membranının yapısına bağlı olarak çeşitli şekillerde olabilir. Seçicilik ilk kez Nicolsky tarafından hidrojen ve sodyum iyonlarına duyarlılık gösteren cam elektrot için kullanılmış ve aşağıdaki eşitlikle verilmiştir. Pek çok iyon seçici elektrot (ISE) çoğunlukla aşağıdaki eşitliğe uygun davranır [20].

$$E = E^0 + \frac{0,0592}{n} \log \left[a_x + \sum (k_{x,y}^{pot} a_y^{n_x/n_y}) \right]$$

a_x = Ölçülecek iyonun aktivitesi

a_y = Girişim yapan iyonun aktivitesi

n_x, n_y = Her bir türün yükü

$k_{x,y}^{pot}$ = Seçicilik katsayısı

Denklem, bir elektrotun ölçülecek X iyonu ve bütün girişim yapan iyonlara cevabını gösterir. Elektrotun farklı iyonik türlere karşı duyarlılığı seçicilik katsayısı ile belirlenir. Seçicilik katsayısı büyüdükçe elektrotun ölçülecek iyonduyarlılığı azalır.

Seçicilik katsayısı; ayrı çözelti metodu, ana iyonun girişim yapan iyon çözeltisine ilavesi metodu, girişim yapan iyonun ana iyon çözeltisine ilavesi metodu ile hesaplanabilir. Seçicilik katsayısının hesaplanmasında metotlardan herhangi birisi kullanılabilir.

5.1.9.6 Tekrarlanabilirlik

Enzim sensörlerinde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesinde kullanılan enzim aktivitesi, kararlılığı ve saflık düzeyi büyük önem taşır. Ancak karakteristik özellikleri çok iyi bilinen enzim preparatlarının kullanılması surumunda bile sensör hazırlama aşamaları ve çalışma ortam ve koşulları açısından beklenen niteliklerde büyük farklanmalar gözlenebilir. Bu nedenle hazırlanan sensörle tekrarlanabilirlik denemelerinin gerçekleştirilmesi bir zorunluluktur [94].

5.1.9.7 Sıcaklık

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

5.1.9.8 Tıbbi Uygulamalarda Kullanılacak Biyosensörler İçin Biyouyumluluk

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

MATERYAL VE METOD

6.1 Kullanılan Cihazlar

Çözeltilerin potansiyel ölçümleri ORION 4 Star Benchtop pH-iyonmetre ile yapıldı. pH ölçümleri ise; Sartorius PB-11 pH metre kullanıldı. Referans elektrot olarak çift temaslı gümüş-gümüş klorür elektrot kullanıldı (Orion 90-02). Bu elektroda iç dolgu çözeltileri olarak ORION 900002 ve 900003 katalog numaralı çözeltiler dolduruldu. Çözelti ilaveleri için Brand marka mikropipetler kullanıldı. Çalışmalar süresince kullanılan bidestile su PURELAB Classic cihazı kullanılarak temin edildi. Hazırlanan çinko oksit nanorodlar, Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan EVO LS-10 Zeiss markalı Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak görüntülendi.

6.2 Kullanılan Numuneler

6.2.1 GNC L-glutamin Tozu

GNC Live Well firmasından satın alınmıştır.

6.3 Glutaminaz Enzimi

Çalışmada daha önceden *Hypocrea jecorina*'dan üretimini gerçekleştirip optimum çalışma koşullarını belirlediğimiz glutaminaz enzimi kullanılmıştır [103].

6.4 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan, glutamin, kitosan, L-askorbik asit, sodyum fosfat dibazik ve sodyum fosfat monobazik Sigma'dan; ürik asit Fluka'dan, nanorod sentezi için kullanılan hekzametilentetramin ve çinko nitrat tetrahidrat Merck'den temin edildi ve

saflaştırılmadan kullanıldı. Kullanılan aminoasitler ise, L-Valin, L-Askorbik Asit, L-Lizin monohidrat, L-Histidin, L-Metiyonin, L-Serin, L-Prolin, L-Glutamik asit, L-Lösin, L-İzolösin, Monosodyum glutamat, Ürik asit ve L-Sistein Sigma'dan temin edildi.

6.5 Kullanılan Çözeltiler

6.5.1 0.15M Fosfat Tamponu Çözeltisi (pH 7.4)

Monobazik sodyum fosfat (NaH_2PO_4) çözeltisi: 2.3996 g NaH_2PO_4 hassas terazide tartıldıktan sonra suda çözülüp hacmi bidestile su ile 100 mL'ye tamamalanarak 0.2 M'lık stok çözeltisi hazırlandı. 2.1294 g Na_2HPO_4 tartılarak bir miktar suda çözüldükten sonra, daha önce hazırlanan 0.2M'lık monobazik sodyum fosfat çözeltisi ile karıştırılarak çözeltinin pH'sı 7.4 olarak ayarlandıktan sonra çözelti hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Tampon çözeltileri kullanılmadıkları zaman buzdolabında saklandı.

6.5.2 Kitosan Çözeltisi

50 mg kitosan, 10 mL %1' lik asetik asit çözeltisinde oda sıcaklığında 3 saat karıştırılarak %5'lik kitosan çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltinin pH'sı 0.1M NaOH çözeltisiyle 7.4'e ayarlandı. Hazırlanan çözelti kullanılmadığı zaman +4°C'de saklandı.

6.5.3 Yüzey Bağımsız ZnO Nanorod/Kitosan Çözeltisi

2 mg ZnO nanorod, 1 mL kitosan çözeltisine (6.5.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan) eklenerek vortekslenerek karıştırıldı. Hazırlanan çözelti kullanılmadığı zaman +4°C'de saklandı.

6.5.4 Glutaminaz/Kitosan Çözeltisi

1 mL kitosan çözeltisine (6.5.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan) 0.5 mL glutaminaz enzimi eklenerek hazırlandı. Hazırlanan çözelti kullanılmadığı zaman -20°C'de saklandı.

6.5.5 Glutamin Çözeltileri

3.6537 g glutamin bidestile suda çözülüp hacmi 25 mL'ye tamamlanarak 1.0 M'lık çözeltisi hazırlandıktan sonra gerekli seyreltmeler yapılarak 1.0×10^{-1} - 1.0×10^{-6} M konsantrasyon aralığında stok glutamin çözeltileri hazırlandı.

6.5.6 Glutamin Tayini İçin Kalibrasyon Çözeltileri

Kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi için kullanılan L-glutamin çözeltileri Çizelge 6.1'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 6.1 Glutamin kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Hazırlanan L-Glutamin Çözeltileri (M)	İlave edilen stok L-glutamin çözeltileri (M) (mL)						0,15M Fosfat Tamponu (mL)
	1.0×10^{-1}	1.0×10^{-2}	1.0×10^{-3}	1.0×10^{-4}	1.0×10^{-5}	1.0×10^{-6}	
1.0×10^{-2}	2.5						2.5
5.0×10^{-3}	1.25						2.5
2.5×10^{-3}	0.625						2.5
1.0×10^{-3}		2.5					2.5
5.0×10^{-4}		1.25					2.5
2.5×10^{-4}		0.625					2.5
1.0×10^{-4}			2.5				2.5
5.0×10^{-5}			1.25				2.5
2.5×10^{-5}			0.625				2.5
1.0×10^{-5}				2.5			2.5
5.0×10^{-6}				1.25			2.5
2.5×10^{-6}				0.625			2.5
1.0×10^{-6}					2.5		2.5
5.0×10^{-7}					1.25		2.5
2.5×10^{-7}					0.625		2.5
1.0×10^{-7}						2,5	2.5
pH'lar 7.4'e ayarlandıktan sonra her bir çözeltinin hacmi bidestile su ile 25.0 mL'ye tamamlandı.							

6.5.7 GNC L-glutamin Tozunda Glutaminin Tayini İçin (Standart Katma Yönteminde) Kullanılan Çözeltiler

Standart katma yöntemiyle glutamin biyosensörü yardımıyla L-glutamin tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması Çizelge 6.2’de verildi.

Çizelge 6.2 Glutamin çözeltilerinin hazırlanması

	Çözelti No						
	1	2	3	4	5	6	7
İlave edilen 10^{-5} M L-glutamin çözeltisi (mL)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
0,15M Fosfat tamponu (pH 7,4) (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
GNC L-glutamin tozu (μ L)	200	200	200	200	200	200	200
	Saf su ilave edilerek çözeltiler belirlenen optimum pH’a ayarlanarak çözelti hacmi 25,0 mL’ye tamamlandı.						

6.6 Glutamin Biyosensörleri

6.6.1 Glutamin Biyosensörlerinin Hazırlanması

Gümüş tel kullanılarak hazırlanmış çinko oksit nanorodlara glutaminaz enzimini immobilize ederek ve glutaminaz enziminin nanorod yüzeyine daha iyi immobilize olmasını sağlamak için kitosan kullanılarak glutamin biyosensörü hazırlanmıştır. Biyosensör hazırlanmadan önce ilk olarak çinko oksit nanorod hazırlanmıştır.

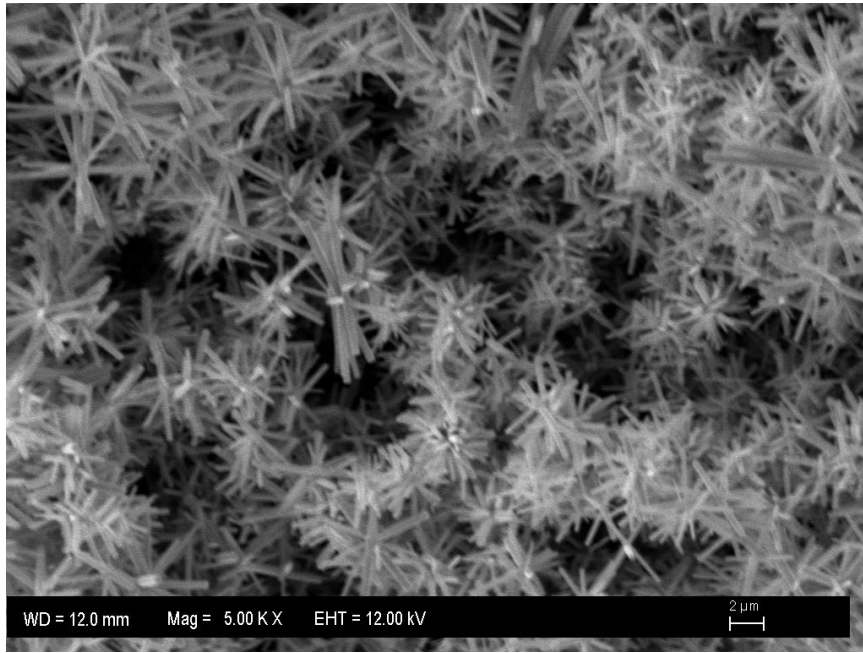
6.6.1.1 Hidrotermal Yöntemle Çinko Oksit Nanorod Hazırlanışı

Çinko oksit nanorodlar bir yüzeye (gümüş, altın tel veya levha, vb.) gibi bir yüzeye bağımlı veya yüzeyden bağımsız olarak oluşturulabilir.

Tez çalışmamızda yüzey-bağımlı ve yüzey-bağımsız her iki yöntemle de ZnO nanorod sentezi gerçekleştirilmiştir.

- **Yüzey Bağımlı ZnO Nanorod Sentezi**

Gümüş tel aseton, etanol ve saf suda yıkandıktan sonra 25'er mL hacimlerde 0.025M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ve 0.025M hekzametilen tetraminin (HMT) içeren 95°C'deki çözeltiye daldırıldı ve çözeltinin buharlaşması için yaklaşık 2-4 saat bekletildi. Gümüş tel yüzeyinde beyaz renkli tabakanın görülmesi ile ZnO nanorodların oluştuğunu anlaşıldı. Kaplanan tel saf su ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek kurutuldu. Oluşan nanorodların SEM görüntüsü alınarak kaplamanın en iyi şekilde gerçekleştiğinden emin olundu. (Şekil6.1)



Şekil 6.1 Nanorodların SEM görüntüsü.

- **Yüzey Bağımsız ZnO Nanorod Sentezi**

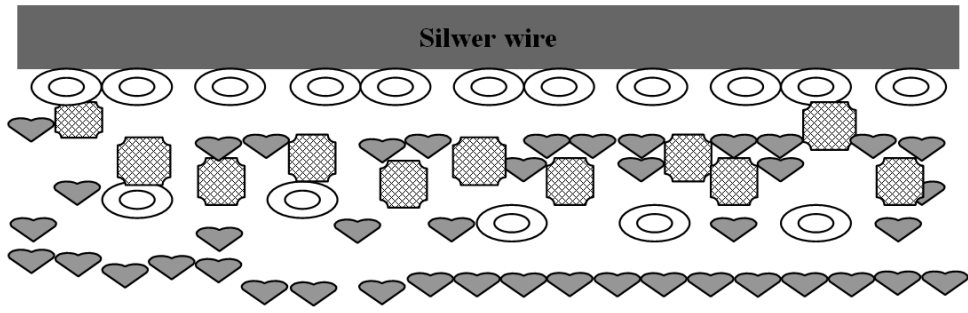
Bu amaçla 25'er mL hacimlerde 0.025M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ve 0.025M hekzametilen tetraminin (HMT) karıştırılıp hazırlanmasından oluşan 95°C'deki çözelti tamamen buharlaştırılarak beherin dibinde kaplanmış beyaz renkli ZnO nanorod tabakası kazınarak alınması sureti ile yüzey-bağımsız ZnO nanorod sentezi gerçekleştirilmiştir.

6.6.1.2 Glutamin Biyosensörünün Hazırlanması

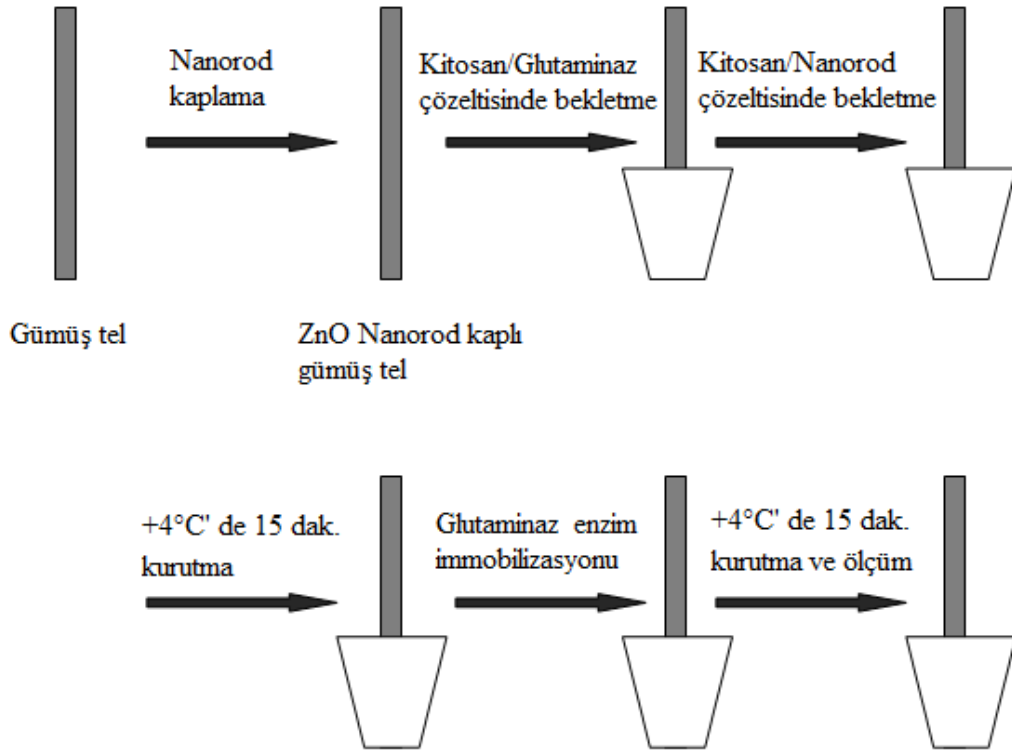
Glutamin biyosensörünün hazırlanması için, Bölüm 6.6.1.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan yüzey bağımlı ve yüzey-bağımsız ZnO nanorodların her ikisi de kullanılmıştır.

- Yüzey-bağımlı ZnO nanorod, 0.15M fosfat tamponunda (pH 7.4) 5 dakika bekletilerek nanorod üzerinde hidrofilik yüzeylerin oluşması sağlandıktan sonra nanorod, 1mL kitosan / 0.5 mL glutaminaz enzimi içeren (pH 7.4) çözeltiye (Bölüm 6.5.4) daldırılarak 30 dakika bekletildi.
- Daha sonra elektrot, 1 mL kitosan çözeltisi içinde 2 mg yüzey-bağımsız ZnO nanorodun karıştırılmasıyla elde edilen çözeltide (Bölüm 6.5.3) 15 dak bekletilerek yüzey-bağımsız ZnO nanorod partiküllerinin elektrot yüzeyine tekrar tutunması ve yüzeyin kitosan tabakasıyla kaplanması sağlandı. Böylece, hazırlamış olduğumuz glutamin biyosensörünün iletkenliğinin daha da artması ve glutaminaz enzimin yüzeye daha iyi immobilize olması gerçekleştirildi.
- Hazırlanan glutamin biyosensörü, +4°C'de 15 dakika bekletilerek kurutuldu.
- Kuruyan glutamin biyosensörü 1 saat boyunca 1mL glutaminaz enzim çözeltisinde bekletildi. Böylece enzimin nanorod yüzeyine elektrostatik olarak immobilize olması sağlandı.
- Hazırlanan glutamin biyosensörü kuruması için +4°C'de 15 dakika bekletildi.

Tez çalışmamızda *Hypocria jecorina*'dan üretilen glutaminaz enzimi ve ZnO nanorodlar kullanarak hazırlanan glutamin biyosensörü ve hazırlanma prosedürü şematik olarak Şekil 6.2 ve Şekil 6.3'te görülmektedir.



Şekil 6.2 *Hypocria jecorina*'dan üretilen glutaminaz enzimi ve ZnO nanorodlar kullanarak hazırlanan glutamin biyosensörü. Glutaminaz (♥), ZnO nanorod (◎) and chitosan (◻).



Şekil 6.3 Glutamin biyosensörü'nün hazırlanma şeması

6.6.2 Glutamin Biyosensörünün Çalışma Aralıklarının ve Eğiminin Belirlenmesi

Hazırlanan glutamin biyosensörünün analitik özelliklerini incelemek amacı ile aşağıda verilen elektrokimyasal hücreler oluşturuldu ve sıcaklık $25.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 'ta ayarlandı.

Referans elektrot / deney çözeltisi / kitosan / glutaminaz/ ZnO nanorod kaplı gümüş tel / Ag; AgCl

Elektrokimyasal hücredeki glutamin çözeltilerinin konsantrasyonu 1.0×10^{-1} - 1.0×10^{-7} M arasında değiştirildi. Glutamin çözeltilerinin pH'ları fosfat tamponu ile optimum pH'a ayarlandı ve hazırlanan elektrotlar için ayrı ayrı hücre potansiyelleri kaydedildi. Her bir elektrot için $\log[\text{glutamin}]$ 'a karşı potansiyel değerleri (mV) grafiğe geçirildi ve biyosensörlerin çalışma aralığı ve eğimleri belirlendi.

6.6.3 Glutamin Biyosensörünün Performansına Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi

Hazırlanan glutamin biyosensörünün cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun, pH'nın, sıcaklığın, karıştırma hızının etkisi, seçicilik katsayısı, cevap süresi, amino asitlerin girişim etkisi belirlenerek raf ömrü tayin edildi.

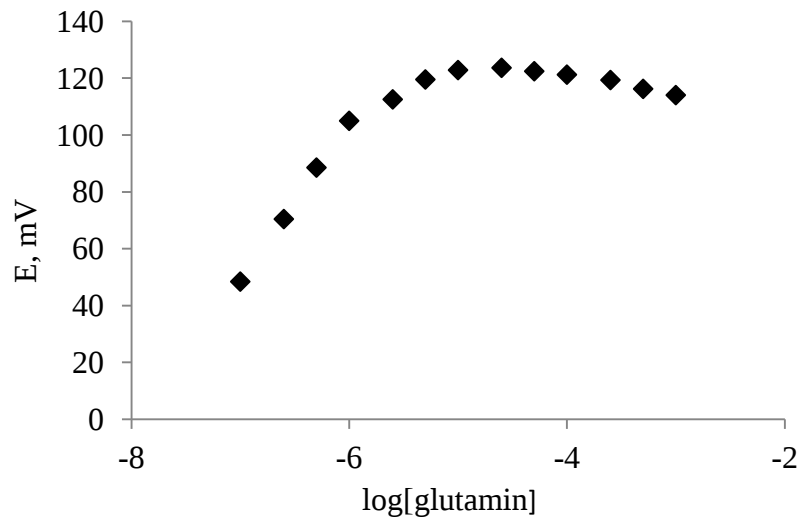
6.6.3.1 Glutamin Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği

Tekrarlanabilirlik, biyosensör için karakterize edici bir parametredir. Enzim preparatının aktivitesi, kararlılığı, saflık düzeyi hazırlanacak enzim sensörü ile tekrarlanabilir sonuçlar alınmasında 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 ardı ardına ölçüm yapılması, elde edilen değerlerden eğimlerin hesaplanarak her bir eğim değerinin yüzdeye çevrilerek grafiğe geçirilmesidir.

Aynı gün içerisinde aynı biyosensör ile hazırlanan glutamin kalibrasyon çözeltileri (10^{-5} M- 10^{-7} M arasında 10 seri) ile 15 dakikada bir defa mV ölçümü yapıp kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve her bir grafiğin eğimi belirlenmiştir. Eğim değerlerinin sayısal olarak en büyüğü 100 kabul edilip diğer eğim değerleri ona göre hesaplanarak grafiğe geçirildi.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA**7.1 Glutamin Biyosensörünün Kalibrasyon Grafiği**

Glutamin biyosensörü için kalibrasyon grafiği Şekil 7.1'de görüldüğü gibi glutamin çözeltilerinde çizildi. Biyosensör için çizilen kalibrasyon grafiğinden çalışma aralıkları ve eğimleri belirlendi. (Çizelge 7.1)



Şekil 7.1 Glutamin biyosensörünün kalibrasyon grafiği

Çizelge 7.1 25.0±1.0°C’da hazırlanan glutamin biyosensörünün eğimi ve çalışma aralıkları

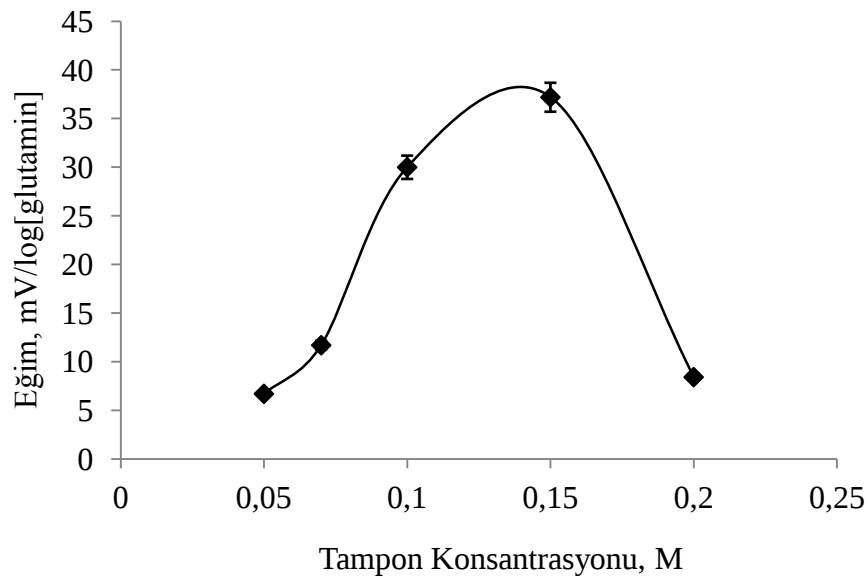
Eğim, (mV/p[glukoz])	Çalışma aralığı (M)
37.2	1.0x10 ⁻⁵ - 1.0x10 ⁻⁷

7.2 Tampon Konsantrasyonunun Etkisi

Glutamin biyosensörlerinin performansına tampon konsantrasyonunun etkisini incelemek için 5 farklı konsantrasyonda (0.05, 0.07, 0.10, 0.15 ve 0.20 M) fosfat tamponu kullanılarak hazırlanan glutamin çözeltilerinde (pH 7.4) biyosensörle potansiyel ölçümleri yapılarak kalibrasyon grafikleri çizildi ve tampon konsantrasyonuna karşı eğim değerleri grafiği de Şekil 7.2’de verildi. Glutamin biyosensörü için elde edilen eğim değerleri Çizelge 7.2’de verildi.

Çizelge 7.2 25.0±1.0°C’da kitosan kullanılarak hazırlanmış glutamin biyosensörünün cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi

Tampon Konsantrasyonu (M)	Eğim, (mV/p[glutamin])
0.05	6.7
0.07	11.7
0.10	30.0
0.15	37.2
0.20	8.4



Şekil 7.2 Glutamin biyosensörünün eğiminin tampon konsantrasyonu ile değişimi

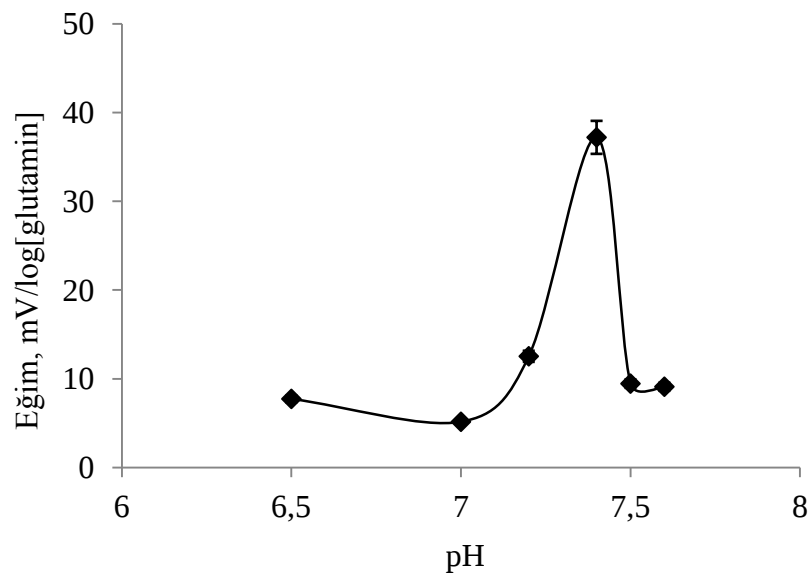
Çizelge 7.2 ve Şekil 7.2 'den de görüleceği gibi, glutamin biyosensörü için en yüksek eğimin elde edildiği optimum tampon konsantrasyonunun 0.15M olduğu bulundu.

7.3 pH'ın Etkisi

Glutamin biyosensörünün performansına pH'nın etkisini incelemek için 6 farklı pH'da (6.5, 7.0, 7.2, 7.4, 7.5 ve 7.6) ve optimum tampon konsantrasyonunda glutamin çözeltileri hazırlandıktan sonra kalibrasyon grafikleri çizilerek eğimleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.3 ve Şekil 7.3'te toplu halde verildi.

Çizelge 7.3 25.0±1.0°C'da glutamin biyosensörünün cevabına pH'nın etkisi

pH	Eğim (mV/p[glutamin])
6.5	7.73
7.0	13.63
7.2	12.53
7.4	37.20
7.5	9.45
7.6	9.10



Şekil 7.3 Glutamin biyosensörünün eğiminin pH ile değişimi

Çizelge 7.3 ile Şekil 7.3'te görüldüğü gibi, pH 7.4'e kadar glutamin biyosensörünün eğimini, dolayısı ile duyarlılığı, artmış, pH 7.4'ten sonra azalmıştır. Bu durum pH 7.4'ten sonra biyosensör yapısında bulunan glutaminaz enziminin hızla denatüre olduğu şeklinde yorumlanabilir Dolayısıyla optimum çalışma pH'sı 7.4 olarak seçildi.

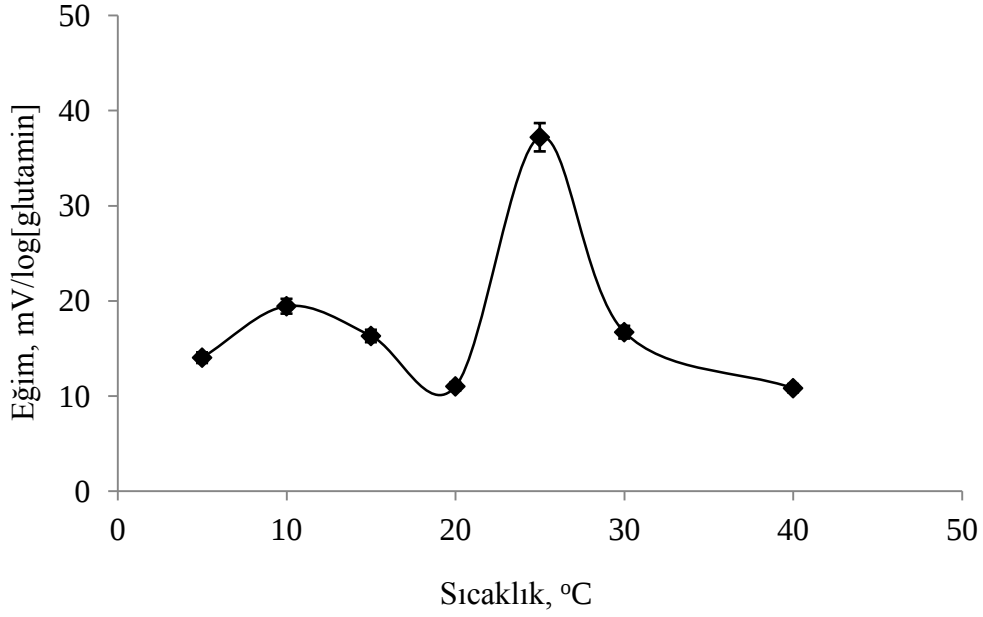
Wakayama ve arkadaşları, (2005), hazırladıkları glutaminaz temelli glutamin biyosensöründe, pH 8.0'da maksimum aktivite olduğunu görmelerine rağmen glutamin biyosensörleri ile yapılan çalışmalarda genellikle nötral pH seçilmiştir [30], [31], [104].

7.4 Sıcaklığın Etkisi

Glutamin biyosensörüne sıcaklığın etkisini incelemek için, 7 farklı sıcaklıkta (5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 40 °C), biyosensörün optimum tampon konsantrasyonunda ve optimum pH'da hazırlanan glutamin çözeltileri ile ayrı ayrı potansiyel ölçümleri yapılarak kalibrasyon grafikleri çizildi ve eğim değerleri Çizelge 7.4'te verildi.

Çizelge 7.4 Glutamin biyosensörünün cevabına sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Eğim, (mV/p[glutamin])
5	14.02
10	19.43
15	16.30
20	11.00
25	37.20
30	16.70
40	10.81



Şekil 7.4 Glutamin biyosensörünün eğiminin sıcaklık ile değişimi

Çizelge 7.4 ve Şekil 7.4'ten görüldüğü gibi, glutamin biyosensörü için 10°C'ye kadar eğimde küçük bir artış, daha sonra 20°C'ye kadar biraz azalma görülmüştür. 25°C'de biyosensörün eğimi optimum değere çıkmıştır ve 25°C'dan sonra eğimdeki düşüş, biyosensördeki immobilize edilmiş glutaminazın aktivitesinin düşmüş olduğunu göstermektedir. Şekil 7.4 ve Çizelge 7.4'te görüldüğü üzere glutamin biyosensörünün optimum çalışma sıcaklığı 25°C olarak bulunmuştur.

Literatürde glutamin biyosensörleri ile yapılan çalışmalar genellikle oda sıcaklığında, 20-25°C sıcaklıkta çalışılmıştır [30],[31]. Yoshimune ve arkadaşları, (2006), glutaminaz enziminin 37°C'den daha düşük sıcaklıklarda enzimatik reaksiyonunu gerçekleştirdiğini belirlemişlerdir [105].

7.5 Girişim Etkisinin İncelenmesi

Hazırlamış olduğumuz ZnO nanorod temelli glutamin biyosensörünün çalışmasına bazı türlerin (ürik asit, askorbik asit ve 11 farklı amino asit) girişim etkisi yapıp yapmadığını belirlemek amacıyla, 10^{-6} M glutamin kalibrasyon çözeltisi (pH:7.4) kullanılarak ortamdaki girişimci maddelerin 3 farklı konsantrasyonda olacağı şekilde kalibrasyon çözeltileri (pH:7.4) hazırlanmıştır. Sadece glutamin içeren ve glutamin ile girişimci

madde içeren kalibrasyon çözeltilerinde ayrı ayrı mV ölçümleri yapılmış, sonuçlar Çizelge 7.5’de sunulmuştur.

Çizelge 7.5 Glutamin biyosensörüne askorbik asit ve bazı amino asitlerin girişim oranları

Girişimci Madde	Konsantrasyon (M)	Girişim Etkisi (%)
L-askorbik asit	10^{-2}	0.0
	10^{-3}	0.0
	10^{-4}	0.0
Ürik asit	10^{-2}	0.0
	10^{-3}	5.7
	10^{-4}	13.5
L-serin	10^{-2}	0.0
	10^{-3}	0.0
	10^{-4}	0.0
L-histidin	10^{-2}	16.5
	10^{-3}	14.1
	10^{-4}	3.6
L-prolin	10^{-2}	10.2
	10^{-3}	11.5
	10^{-4}	4.3
L-glutamik Asit	10^{-2}	14.3
	10^{-3}	15
	10^{-4}	2.8
L-lösin	10^{-2}	3.2
	10^{-3}	0.0
	10^{-4}	0.0
Monosodyum glutamat	10^{-2}	0.0
	10^{-3}	23.6
	10^{-4}	8.4
L-valin	10^{-2}	7.3
	10^{-3}	4.5
	10^{-4}	0.0
L-izolösin	10^{-2}	25.2
	10^{-3}	18
	10^{-4}	4.4
L-sistein	10^{-2}	0.0
	10^{-3}	0.0
	10^{-4}	0.0
L-metiyonin	10^{-2}	0.0
	10^{-3}	0.0
	10^{-4}	0.0
L-lizin monohidrat	10^{-2}	13
	10^{-3}	12
	10^{-4}	5.2

Çizelge 7.5 incelendiğinde, hazırladığımız ZnO nanorod temelli glutamin biyosensörüne en çok girişim etkisi yapan türlerin 10^{-2} M L-izolösin, 10^{-2} M ve 10^{-3} M L-histidin, 10^{-3} M monosodyum glutamat, 10^{-2} M ve 10^{-3} M glutamik asit, 10^{-4} M ürik asit, 10^{-2} M ve 10^{-3} M L-lizin olduğu görülmektedir. L-askorbik asit, L-metiyonin, L-serin, L-sisteinin hazırladığımız glutamin biyosensörüne herhangi bir girişim etkisi olmadığı ortaya çıkmıştır. Diğer amino asitlerin ise ihmal edilecek düzeyde etkileri olmuştur.

Villarta ve arkadaşları (1992), hazırladıkları amperometrik glutamin elektroduna askorbik asit ve glutamatın girişim etkisi yaptığını belirtmişlerdir [30]. Yine yapılan amperometrik çift enzim sensöründe; glutamatın girişim yaptığı gözlenmiştir [31].

7.6 Karıştırma Hızının Etkisi

Glutamin biyosensörünün cevabına karıştırma hızının etkisini belirlemek amacıyla manyetik karıştırıcının hızı 100, 250 ve 750rpm olmak üzere üç farklı hıza ayarlanarak glutamin çözeltilerinin potansiyelinin kararlı hale gelmesi için beklendi. 100 ve 750rpm hızlarında karıştırma yapıldığında kararlı potansiyele ulaşmak için geçen süre, 250rpm hızda karıştırıldığında geçen süreden daha uzun olduğu bulundu. Bu nedenle manyetik karıştırıcının hızı 250rpm'e ayarlanarak bütün çalışmalarda çözeltiler bu hızda karıştırıldı.

Karıştırma hızının artmasının biyosensörün potansiyeline herhangi bir etkisinin olmadığı, ancak cevap zamanında bir artışa neden olduğu görülmüştür. Bu durum, düşük karıştırma hızlarında enzimatik reaksiyonun yavaş olduğu, yüksek karıştırma hızlarında ise enzimin konformasyonu bozulacağından enzimatik reaksiyonun gerçekleşme olasılığının azaldığı şeklinde açıklanabilir. Ayrıca çok yüksek karıştırma hızlarında çözelti içinde sıçramalar meydana gelebileceği için ortalama karıştırma hızlarında cevap alabilmek istenmeyen durumları engellemektedir.

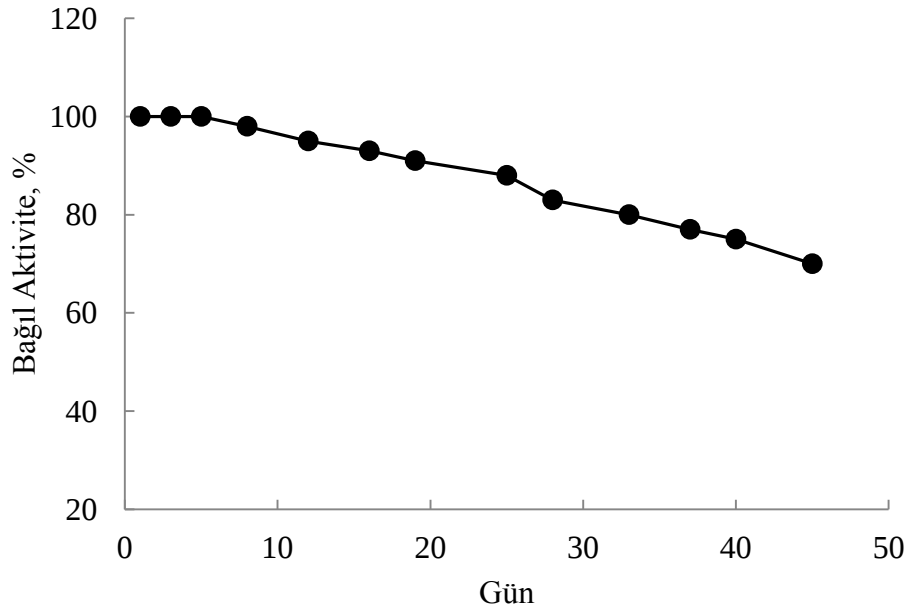
7.7 Cevap Süresi

Biyosensör için cevap zamanı oldukça önemlidir, ideal bir biyosensör kısa sürede sonuç verebilmelidir. Glutamin biyosensörünün cevap süresini bulabilmek için optimum şartlarda hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki glutamin çözeltilerine glutamin biyosensörü ve referans elektrot daldırılarak yapılan ölçümlerde 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 [68]. Glutamin biyosensörünün cevap zamanı, yaklaşık 1-4 dakika arasındadır, 1 dakikadan daha kısa sürede sonuç verdiği de gözlenmiştir. Bu sonuç, biyosensörün cevap zamanının oldukça kısa olduğunu göstermektedir.

7.8 Raf Ömrü

Glutamin biyosensörünün raf ömrünü belirlemek amacıyla 45 gün süresince haftada 2 veya 3 defa glutamin çözeltilerinde mV ölçümü yapılarak kalibrasyon grafikleri çizildi ve çalışma aralığı ile eğimler belirlendi. İlk 25 gün düzenli olarak mV ölçümü yapıldıktan sonra kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi ile belirlenen eğim değerlerinde fazla bir azalma görülmedi. Daha sonra 45 gün sonunda yapılan ölçümler sonucu glutamin biyosensörünün çalışma aralığının değişmediği ancak eğim değerinde %30'luk bir düşme olduğu belirlenmiştir. Hazırladığımız glutamin biyosensörünün raf ömrünün uzun olması, onun biyoanalitik çalışmalarda rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir.

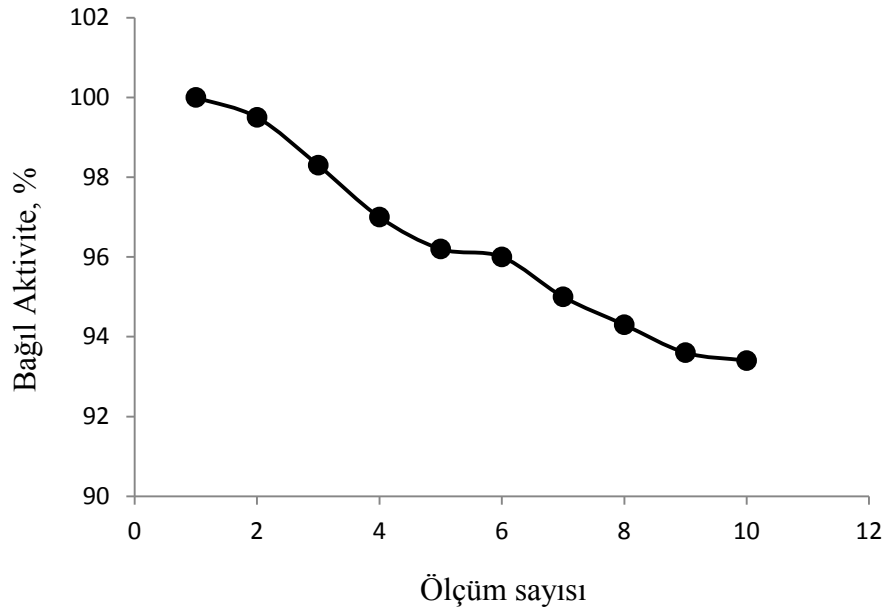


Şekil 7.5 45 gün sonunda glutamin biyosensörünün elde edilen eğim değerindeki değişme

7.9 Tekrarlanabilirlik

Glutamin biyosensörünün tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla aynı gün içinde aynı biyosensör ile hazırlanan 10 seri glutamin kalibrasyon çözeltilerinde mV okumaları yapıldı ve her ölçüm için kalibrasyon grafiği çizilerek eğimleri belirlendi. Sayısal olarak en büyük eğim değeri %100 olarak kabul edilerek diğer eğim değerleri de ona göre hesaplandı.

Ölçüm sayısına karşı hesaplanan bağıl aktivite değerleri grafiğe geçirildi. En düşük eğimin yüzdesi de %93 olarak bulundu. (Şekil 7.6)



Şekil 7.6 Glutamin biyosensörünün 10 kez alınan ölçüm sayısına karşılık bağıl cevabı

Bütün sonuçlar ve çizilen kalibrasyon grafiği doğrultusunda elektrodumuzun katalitik aktivitesinde önemli bir düşüş olmaması, tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.

Glutamin biyosensörü için yapılan uygulama aşamaları 2 saat 15 dakika sürmektedir. Biyosensörlerle çalışma yaptıktan sonra, nanorod kaplı elektrotlar zımparalanıp tekrar biyosensör hazırlanmasında kullanılabilmesi, biyosensör hazırlama yönteminin

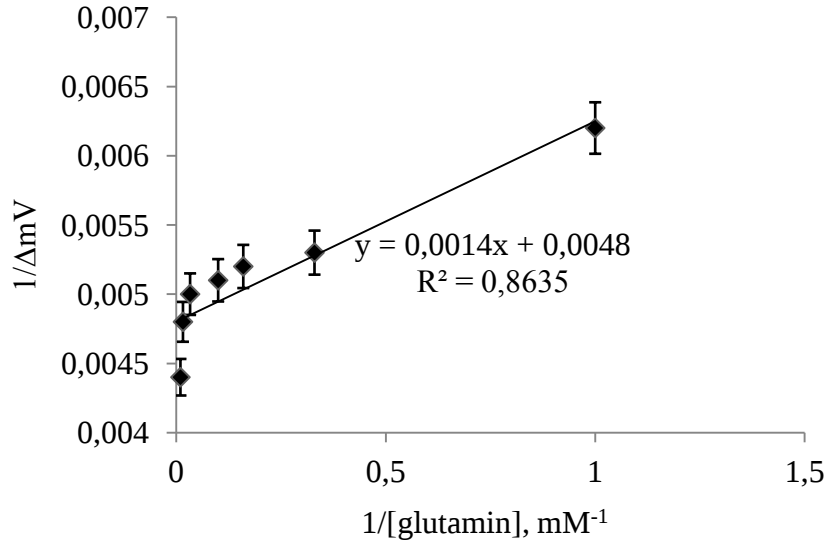
maliyetini oldukça düşürmektedir. Geliştirmiş olduğumuz biyosensörün raf ömrü ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, biyosensör hazırlamasının kolay, pratik ve maliyetinin düşük olması ona üstün avantajlar sağlamaktadır.

7.10 Enzim Kinetik Parametrelerinin (K_m ve V_{max} değerleri) Belirlenmesi

Reaksiyonların hızları, mekanizmaları ve hıza etki eden faktörlerin neler olduğunu inceleyen fizikokimya alt dalına kimyasal kinetik denir [69]. Biyokimyasal reaksiyonlar için enzimlerin kinetik parametrelerinin (K_m ve V_{max} değerleri) belirlenmesi, enzimle yapılan çalışmalarda, enzim biyosensörlerinde enzimin çalışması hakkında önemli bilgi sağlaması bakımından çok önemlidir.

Maksimum hız, V_{max} , enzimatik katalizin ulaşabileceği en yüksek hız değeridir. Enzim bölgeleri substrat ile tam doygunluğa geçince maksimum hıza (V_{max}) ulaşır. Michaelis-Menten sabiti, K_m , en yüksek hız değerinin yarısına ulaşmak için gerekli substrat miktarıdır, enzime ve substrata özgüdür, enzimin substrata olan ilgisini yansıtır. K_m 'si düşük olan bir enzim, substratına yüksek ilgi (affinite) gösterir [70].

Hazırladığımız ZnO nanorod temelli glutamin biyosensöründe immobilize olmuş glutaminaz enziminin K_m değerini bulmak amacıyla glutamin konsantrasyonuna karşı potansiyel değişimi verilerinden yararlanılarak Lineweaver-Burk grafiği ($1/[glutamin]$ - $1/\Delta mV$ grafiği) çizilmiş ve bu grafikten enzimin K_m ve V_{max} değeri belirlenmiştir. (Şekil 7.7)



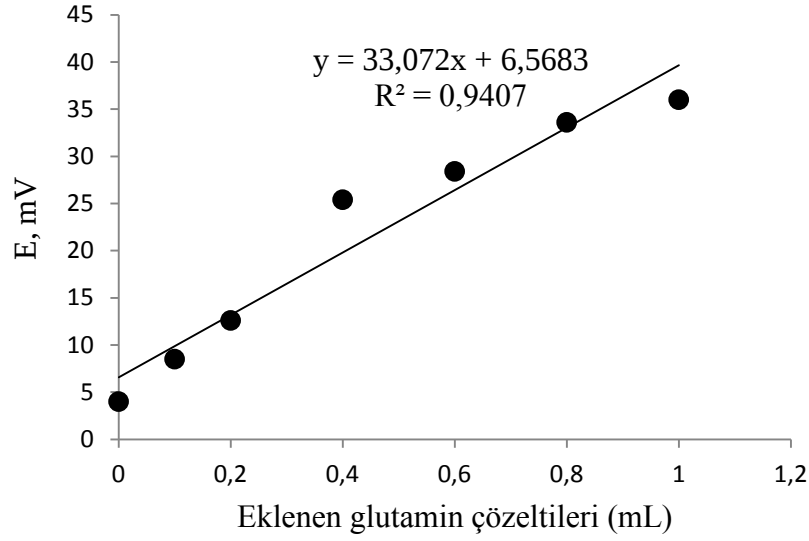
Şekil 7.7 Glutamin biyosensöründeki glutaminaz için Lineweaver-Burk grafiği

İlgili verilerden yararlanılarak Şekil 7.7’de verilen 1/[glutamin]-1/ΔmV grafiği çizilerek elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinden, glutaminaz enziminin Km değeri 0.29 mM, Vmax değeri ise 208.3 mV/dakika olarak bulunmuştur.

7.11 Gerçek Numunelerde Glutamin Tayini

7.11.1 GNC L-glutamin Tozunda Glutamin Tayini

Hazırladığımız glutamin biyosensörünün gerçek numunelerde glutamin tayininde kullanıp kullanılamayacağı araştırıldı. Bu amaçla, GNC Live Well firmasından satın alınan L-glutamin tozunda glutamin tayini standart katma yöntemi kullanılarak yapıldı.



Şekil 7.8 Glutamin biyosensörü ile standart katma yönetimi kullanılarak 10^{-5} M glutamin çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği

Bölüm 6.5.7’de belirtildiği şekilde hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılan standart katma yöntemi kullanılması sonucu elde edilen değer Çizelge 7.6’da verilmiştir.

Çizelge 7.6 ZnO nanorod temelli glutamin biyosensörü ile GNC marka L-glutamin tozu örneğinde glutamin tayini ile elde edilen sonuç

Glutamin miktarı ($\mu\text{g} / 200\mu\text{L}$)	
GNC L-glutamin tozunda bulunan referans değer	Glutamin biyosensörü
29.2	29.0

Çizelge 7.6’da görüldüğü gibi, GNC L-glutamin tozu örneğinde glutamin miktarı ile hazırladığımız biyosensör ile bulduğumuz sonuç birbirine çok yakın olması glutamin tayininin sensörümüzle başarılı bir şekilde yapıldığını ortaya koymaktadır.

BÖLÜM 8

SONUÇ

Bu çalışmada, GNC-L glutamin tozu örneğindeki glutamin miktarının tayininde kullanabilmek için, ZnO nanorod kaplanmış gümüş tel üzerine *Hypocrea Jecorina*’dan daha önceden üretmiş olduğumuz glutaminaz enziminin kitosan kullanarak immobilizasyonu ile potansiyometrik esaslı gltamin biyosensörü hazırlanmış ve optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Hazırladığımız glutamin biyosensörünün analitik özellikleri belirlenmiş, biyosensörün çalışma aralığı 10^{-5} - 10^{-7} M, optimum tampon konsantrasyonu 0.15M ve optimum sıcaklığı 25°C olarak bulunmuştur. Optimum pH değeri hazırladığımız glutamin biyosensörü için 7.4 olarak belirlenmiştir. Biyosensörümüzün tekrarlanabilirliğinin yüksek ve 45 gün süresince alınan ölçümlerle raf ömrünün oldukça uzun olduğu gözlemlenmiştir. Elektrotların kullanıldıktan sonra tekrar biyosensör yapımında kullanılabileceği ve kısa sürede tekrar ölçüm alınabileceği görülmüştür. Biyosensörün cevap süresinin 1 dakikadan daha az olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, hazırlanan glutamin biyosensörü ile GNC L-glutamin tozunda glutamin tayini yapılmış, elde edilen sonuçlar standart yöntem ile karşılaştırılmıştır. Gerçek numude yapmış olduğumuz miktar tayininde sonuçlarımızın referans aralığına oldukça yakın olduğu görüldüğünden biyosensörümüzün glutamin tayininde başarı ile kullanılabileceği söylenebilir. Çalışmamızda hazırladığımız glutamin biyosensörünün biyoanalitik karakterizasyonları başarı ile yapılmış, girişim etkisi yapabilecek maddelerin biyosensör cevabına etkisi incelenmiş ve biyosensörün gerçek örneklerde bulunabilecek bozucu türlerin glutamat ve izolözin amino asitleri dışında, önemli bir girişim etkisi olmaksızın uygulanabilirliği ispat edilmiştir. Hazırladığımız tez çalışmamız, **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology** dergisinde kabul edildi ve şu anda basım işlemleri yapılmaktadır.

Literatürde *Hypocrea Jecorina*'dan üretilen glutaminaz enzimi ve ZnO nanorod kullanılarak hazırlanan glutamin biyosensörüne rastlanamış olması çalışmamızın özgün olduğunu göstermektedir. Bu nedenle tez çalışmamızda, hazırlamış olduğumuz glutamin biyosensörünün ZnO nanorod, *Hypocrea Jecorina*'dan ürettiğimiz glutaminaz enzimi ve kitosan kullanılarak hazırlanması literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

-
- [1] Sorochinskii, V.V., Kurganov, B.I., (1997). “Biosensors for detecting organic compounds: I. Sensors for amino acids, urea, alcohols, and organic acids”, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 33(6):515-529.
 - [2] Madaras, M. B., Spokane, R. B., Johnson, J. M., and Wookward, J. R., (1997). “Glutamine Biosensors for Biotechnonology Applications, with Suppression of the Endogenous Glutamate Signal”, *Anal. Chem.* 69:3674–3678.
 - [3] Glutamin, www.hammadeler.com, 5 Mart 2014.
 - [4] Drauz K., Kleemann A., (2007). Amino acids, in Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wily-VCH Verlang GmbH, Weinheim.
 - [5] Altınışık, M., Aminoasit Metabolizması, [http://www.mustafaaltinisik.org.ukls-o-Aminoasit Metabolizması.ppt](http://www.mustafaaltinisik.org.ukls-o-Aminoasit%20Metabolizması.ppt), 10 Mart 2014.
 - [6] Sporcu Besin Alışverişi, www.bilgiindir.net, 10 Mart 2014.
 - [7] Vikipedi Özgür Ansiklopedi, Glutamin, [http:// tr.wikipedia.org/wiki/Glutamin](http://tr.wikipedia.org/wiki/Glutamin), 11 Mart 2011.
 - [8] Çubuk, O., (2001). Yeni tip potansiyometrik üre biyosensörlerin hazırlanması ve biyolojik numunelere uygulanması, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
 - [9] L-Glutamine, www.superalem.com/l-glutamine.html, 10 Mart 2014.
 - [10] Akın, O., Aminoasit Metabolizması, Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı, Powerpoint Sunusu.
 - [11] Tıp Ders Notları, Amino asitler, <http://tipdersnotlari.blogspot.com.tr/>, 12 Nisan 2014.
 - [12] Üre Siklusu, [www.ctf.edu.tr/anabilimdallari/pdf/157/Ure Siklusu pdf](http://www.ctf.edu.tr/anabilimdallari/pdf/157/Ure_Siklusu_pdf), 12 Nisan 2014.
 - [13] Yurdakök, K., Yalçın, S. ve Tezcan, İ., (2001). “Akut Gastroenterit Vakalarında Glutamin Suplementasyonunun İshal Süresi ile İnterlökin-8 ve Sekretuvar İga Düzeyleri Üzerine Etkisi”, Proje No: SBAG-2203.
 - [14] Kolancı, Ç., (2009). Temel ve Klinik Biyokimya, Birinci Baskı, İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul.
 - [15] Altınışık, M., (2009). “Amino Asitlerin Biyosentezi ve Anaplerotik Reaksiyonlar”, ADÜTF Biyokimya AD.

- [16] Oğuz, M., (1998). “Glutamin ve Beslenmedeki Önemi”, Türk Klinikleri Cerrahi Dergisi, 3: 120 – 125.
- [17] Genel Sağlık Bilgileri.com, Reye Sendromu, <http://www.genelsaglikbilgileri.com/reye-sendromu/>, 30 Nisan 2014.
- [18] Thomas, J.N., (1986). “in Mammalian Cell Technology” (Thilly, W. G., Ed.), 109-130, Butterworths, Boston.
- [19] Zielke, H. R., Zielke, C. L., and Ozand, P. T. (1984). “Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells”, Fed. Proc. 43:121–125.
- [20] Ozturk, S. S., and Palsson, B.O., (1990). “Chemical Decomposition of Glutamine in Cell Culture Media: Effect of Media Type, pH, and Serum Concentration” Biotechnol. Progr., 6(2):121–128.
- [21] Oh, G. S., Izuishi, T., Inoue, T., W. S., H., and Yoshida, T. J. (1996). J. Ferment. Bioeng. 8: 329–336.
- [22] Scriver, C.R., Altman in P.L. and Katz, D.D., (1977). “Human Health and Disease, Federation of American Societies for Experimental Biology”, Maryland, 100.
- [23] Glasgow, A.M. and Dhiansiri, K., (1974). “Improved Assay for Spinal Fluid Glutamine, and Values for Children with Reye's Syndrome” Clin. Chem., 20: 642-644.
- [24] Halavva I, Baig S, Oureshi GA, Use of high performance liquid chromatography in defining the abnormalities in the free amino acid patterns in the cerebrospinal fluid of patients with aseptic meningitis. Biomed Chromatogr 1991; 5(5): 216-20.
- [25] Bhagavon NV, A Comprehensive Review, New York, JB Lipincott Company, 1974.
- [26] Williams BD, Chinkes DL, Volfe RR, Alanine and glutamine kinetics at rest and during exercise in humans. Med Sci Sports Exerc 1998; 30(7): 1053-58.
- [27] Coulet, P. R. and Bardeletti, G. (1991). “Biosensor-based instrumentation”, Biochem. Soc. Trans. 19:1–4.
- [28] Hellinga, H. W. and Marvin, J. S., (1998). “Protein engineering and the development of generic biosensors” Trends Biotechnol., 16:183–189.
- [29] Dattelbaum, J. D. and Lakowicz, J., R., (2001). “Optical Determination of Glutamine Using a Genetically Engineered Protein”, Analytical Biochemistry, 29: 89–95.
- [30] Villarta, R.L., Palleschi, G., Suleiman, A. and Guilbalt, G.G., (1992). “Determination of glutamine in serum using an amperometric enzyme electrode”, Electroanalysis, 4: 27-31.
- [31] Moser, I., Jobst, G., Aschauer, E., Svasek, P., Varahman, M. and Urban, G., (1995). “Miniaturized thin film glutamate and glutamine biosensors”, Biosens. Bioelectron., 10:527-532.
- [32] Tucci, S., Pinto, C., Goyo, J., Rada, and P., Hernandez, L., (1998). “Measurement of glutamine and glutamate by capillary electrophoresis and

- laser induced florescence detection in cerebrospinal fluid of menengitis sick children”, *Clinical Biochemistry.*, 31:143-150.
- [33] Guilbault, G. G. and Shu, F. R. (1971). “An electrode for the determination of glutamine”, *Anal. Chim. Acta*, 56:333-338.
- [34] Arnold, M. A. and Rechnitz G. A., (1980). “Determination of glutamine in cerebrospinal fluid with a tissue-based membrane electrode”, *Anal. Chim. Acta*, 113(2): 351-354.
- [35] Rechnitz, G. A.; Riechel, T. L.; Kobos, R. K.; Meyerhoff, M. E., (1978). “Glutamine-Selective Membrane Electrode”, 199(4327):440-441.
- [36] Male, K.B., Luong J. H. T., Tom, R. and Marcille, S., (1993). “Novel FIA amperometric biosensor system for the determination of glutamine in cell culture systems”, *Enzyme and Microbial Technology*, 15: 26-32.
- [37] Konyalıoğlu, S. ve Özyer, A. (2000). “Plazma glutamin düzeylerinin iki yöntem ile değerlendirilmesi”, *Ege Tıp Dergisi*, 39 (1): 1 – 4.
- [38] Moser, I., Jobst, G. and Urban, G., A., (2002). “Biosensor arrays for simultaneous measurement of glucose, lactate, glutamate, and glutamine”, *Biosensors & Bioelectronics*, 17: 297-302.
- [39] Kadioğlu, M., B., (2005). Tıkanma sarılığı oluşturulan modelde ursodeoksikolik asit ve Glutamin’in bakteriyel translokasyon, karaciğer fonksiyon testleri ve karaciğer histopatolojisine olan etkileri, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
- [40] Stefano, L.D., Rotiroti, L., Rendina, I., Moretti, L., Scognamiglio, V., Rossi, M. and D’Auria, S., (2006). “Porous silicon-based optical microsensor for the detection of L-glutamine” *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 1664-1667.
- [41] Kitosan, http://www.sciencelearn.org.nz/var/sciencelearn/storage/images/media/images/nanoscience-images/chitosan/763226-2-eng_NZ/Chitosan_gallery_large.jpg, 15.05.2014.
- [42] Yang, Z., Ye, Z., Zhao, B., Zong, X. and Wang, P., (2010). “A Rapid Response Time and Highly Sensitive Amperometric Glucose Biosensor Based on ZnO Nanorod Via Citric Acid-assisted Annealing Route”, *Physica E.*, 42:1830–1833.
- [43] Vikipedi Özgür Ansiklopedi, Nanoteknoloji, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Nanoteknoloji>, 15 Mayıs 2014.
- [44] Çıracı, S., Özbay, E., Gülseren, O., Demir, V. H., Bayındır, M., Oral, A., Seger, T., Aydın, A., ve Dana, A., (2005), Türkiye’de Nanoteknoloji www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/turkiyenano.pdf, 14 Nisan 2014.
- [45] Nanoteknoloji nedir? www.cocuk.anadolu.edu.tr/veriler/dokumanlar/dok_80.pdf, 25 Nisan 2014.
- [46] Çıracı, S., Süzer, Ş., Erdemir, A., Dağ, Ö., Bengü, E., Bayındır, M., İlday, Ö., Senger, T., Dana, A., Aydın, A., Gemici, Z., Yılğör, İ., Özgür, H., Yeşilyurt, Ö., Durgun, E., Kocabaş, A., Köylü, Ö., ve Gürsen, İ., (2006), Türkiye’de Nanoteknoloji www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/nanoteknoloji.pdf, 25 Nisan 2014.

- [47] Dulda, A., “II-VI Grubu Nanoyapıların Sentezlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006.
- [48] Zhang, Y., Ram, M. K., Stefanakos, E. K., and Goswami, D. Y. (2012). “Synthesis, Characterization, and Applications of ZnO Nanowires”, Journal of Nanomaterials 2012:1–22.
- [49] Çoğal, S., (2009). Mikrodalga ve Otoklava Dayalı Farklı Kristal Yapılarında ZnO Nanoparçacıkların Sentezi ve Optik-elektronik Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [50] Aşar, N., “Çinko oksit (ZnO) Nanoyapıların Sentezlenmesi ve Sensör Özelliklerinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011.
- [51] Arığ, E., “Nanoyapıda çinko oksit partiküllerinin üretimi ve karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010.
- [52] Tüzmen, Ş, E., “ZnO ince filmlerinin eldesi ve aygıt üretimi için parametrelerinin optimizasyonu”, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
- [53] Kahraman, S., “ZnO Yarıiletken Yapıların Üretilmesi ve Karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010.
- [54] Wagner, R.S., Ellies, W.C., (1969). “Vapor-liquid-solid mechanism of single crystal growth”, Applied Physics Letters, 4: 89.
- [55] Dilsiz, N., (2004). Moleküler Biyoloji, Palme Yayıncılık, Ankara.
- [56] Tan, İ., (2008). Bazı Ağır Metal ve Organik Kirleticilerin Laktat Dehidrogenaz Enzimi Üzerindeki Engelleme Etkilerinin Belirlenmesi ve Enzim İnhibisyonuna Dayalı Biyosensör Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- [57] Bugg, T. D. H., (2004). Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry, İkinci Baskı, Blackwell Publishing.
- [58] Vikipedi Özgür Ansiklopedi, Enzimler, [http:// tr.wikipedia.org/wiki/Enzimler](http://tr.wikipedia.org/wiki/Enzimler), 11 Mayıs 2014.
- [59] Dinçkaya, E., (1997). Enzimolojiye Genel Bakış: Enzimoloji Konulu Lisansüstü Yaz Okulu Kitabı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- [60] Jin-Hong W., Zhang, W., ve Shi-Ying X., (2007). “Enzymatic production of bioactive peptides from sericin recovered from silk industry wastewater”, Process Biochemistry, 43: 480–487.
- [61] İçli, N., (2008). İmmobilize Glukoz oksidaz Enziminin Özellikleri ve Enzim Aktivitesinin Artırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [62] Çolak, U., (2011). İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin Kitosan Üzerine İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- [63] GenomeNet, Glutaminase, http://www.genome.jp/dbget bin/www_bget? ec:3.5.1.2, 19 Mayıs 2014.
- [64] Enzyme Data Base, Glutaminase, <http://www.enzymedatabase.org/query.php? ec=3.5.1.2>, 19 Mayıs 2014.
- [65] Brenda, Glutaminase, http://www.brendaenzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.5.1.2, 5 Mayıs 2014.
- [66] Brown, G., Singer, A., Proudfoot, M., Skarina, T., Kim, Y., Chang, C., Dementieva, I., Kuznetsova, E., Gonzalez, C. F., Joachimiak, A., Savchenko, A. ve Yakuninn, A. F., (2008). “Functional and structural characterization of four glutaminases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilise*”, *Biochemistry*, 47(21):5724–5735.
- [67] Champe, P. C., ve Harvey, R. A., (1997). Lippincott Illustrated Reviews Biochemistry, İkinci Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- [66] European Bioinformatics Institute, Enzyme Structures Database, <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>, 15 Mayıs 2012.
- [67] Nandakumar, R., Yoshimmune, K., Wakayama, M. ve Moriguchi, M., (2003). “Microbial glutaminase: biochemistry, molecular approaches and applications in the food industry”, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 23: 87–100.
- [68] Keha, E. ve Küfrevioğlu, İ. (2011). *Biyokimya*, Sekizinci Baskı, Aktif Yayınevi, İstanbul.
- [69] Sabu, A., Keerthi, T. R., Rajeev Kumar, S. ve Chandrasekaran, M., (2000). “L-glutaminase production by marine *Beauveria* sp. Under solid state fermentation”, *Process Biochemistry*, 35: 705–710.
- [70] El-Sayed, A. S. A., (2009). “L-Glutaminase Production by *Trichoderma Koningii* Under Solid State Fermentation”, *Indian J Mikrobiol*, 49: 243–250.
- [71] Koibuchi, K., Nagasaki, H., Yuasa, A., Kataoka, J., ve Kitamoto, K.,(2000). “Molecular cloning and characterization of a gene encoding glutaminase from *Aspergillus oryzae*”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 59–68.
- [72] Kashyap P., Sabu A., Pandey A., Szakacs G. ve Soccol C. R., (2002). “Extracellular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solidstate fermentation”, *Prosess Biochemistry*, 38: 307–312.
- [73] Jeon, J-M., Lee, H-I., Han, S-H., Chang, C-S. ve So, J-S., (2010). “Partial Purification and Characterization of Glutaminase from *Lactobacillus reuteri* KCTC3594”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162: 146–154.
- [74] Weingand-Ziadé, A., Gerber-Décombaz, C. ve Affolter, M., (2003). “Functional characterization of salt-and termotolerant glutaminase from *Lactobacillus rhamnosus*”, *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 862–867.
- [75] Suzuki, H., Izuka, S., Miyakawa, N., Kumagai, H., (2002). “Enzymatic production of theanine, an “umami” component of tea from glutamine and ethylamine with bacterial γ -glutamyltranspeptidase”, *Enzyme Microbiology Technology*, 31: 884–889.

- [76] Iyer, P. ve Singhal, R. S., (2008). "Production of glutaminase (E.C.3.2.1.5) from *Zygosaccharomyces rouxii*: Statistical optimization using response surface methodology", *Bioresource Technology*, 99: 4300–4307.
- [77] Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K. ve Isono, M., (1973). "Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organism", *Journal of General Microbiology*, 76: 85–99.
- [78] Minami, H., Suzuki, H., ve Kumagai, H., (2003). "Salt-tolerant γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* 168 with glutaminase activity", *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 431–438.
- [79] Jeon, J-M., Lee, H-I. ve So, J-S., (2009). "Glutaminase activity of *Lactobacillus reuteri* KCTC3594 and expression of the activity in other *Lactobacillus* spp. By introduction of glutaminase gene", *African Journal of Microbiology*, 3(10): 605– 609.
- [78] Kumar, S. R. ve Chandrasekaran, M., (2003). "Continuous production of Lglutaminase by an immobilized marine *Pseudomonas* sp BTMS-51 in a packed bed reactor", *Process Biochemistry*, 38: 1431–1436.
- [79] Huerto-Saquero, A., Calderón-Flores, A., Diaz-Villaseñor, A., Du Pont, G. Ve Durán, S., (2004). "Regulation of transcription and activity of *Rhizobium etli* glutaminase A", *Biochimica Biophysica Acta* 1673: 201–207.
- [80] Yano, S., Kamemura, A., Yoshimune, K., Moriguchi, M., Yamamoto, S., Tachiki, T. ve Wakayama, M., (2006). "Analysis of Essential Amino Acid Residues for Catalytic Activity of Glutaminase from *Micrococcus luteus* K-3", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(4): 362–364.
- [81] Parasanth Kumar K., Parabhakar T., Sathish T., Girija Sankar G., Feleke M., Swarajya Lakshmi G. ve Ramana H., (2009). "Studies on Extracellular Lglutaminase Production by Halophilic *Aspergillus* sp.", *Journal of Pharmacy and Chemistry*, 3(1): 4 7.
- [82] Turna, Ö., (2006). "Aminoasit Biyosensörlerinin Geliştirilmesi", Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- [83] Guilbault, G. G., and Kauffman, J. M. (1987). "Enzyme-based Electrodes as Analytical Tools", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 9: 95-113.
- [84] Updike, S. J., Hicks, G. P., (1967). "The Enzyme Electrode", *Nature*, 214: 986-988.
- [85] Telefoncu, A., (1997). *Enzimoloji* (Telefoncu, A., Ed.), 380s., Ege Üniversitesi, İzmir.
- [86] Seki, A., Ikeda S., Kubo, I., and Karube, I., (1998). "Biosensors Based on Light- Addressable Potentiometric Sensors for Urea, Penicilin and Glucose", *Anal. Chim. Acta*, 373: 9-13.
- [87] Fabre B. and Simonet J. , (1998). "Electractive Polymers Containing Crown Ether or Polyether Ligands as Cation-Responsive Materials", *Coordination Chemistry reviews*, 178-180, 1211-1250.
- [88] Clark, L. C., Lyons, C., (1962). "Electrode System for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery." *Ann. NY Acad. Sci.*, 102: 29-45.

- [89] Telefoncu, A.(1997). Biyosensörler (Telefoncu, A., Ed.) s. 193-248, Ege Üniversitesi, İzmir.
- [90] Demir, A., ve Seventekin, N., (2009). “Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları” Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi, 3(2): 92–103.
- [91] Lu, Y., Yang, M., Qu, F., Shen, G. and Yu, R., (2007). “ Enzyme-functionalized Gold Nanowires for the Fabrication of Biosensors ”, Bioelectrochemistry 71: 211–216.
- [92] Turna, Ö., (2006). Aminoasit Biyosensörlerinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- [93] Fen Bölümü Yarışma Projesi,
<http://www.egelisesi.k12.tr/Basarilarimiz/Projeler/Proje%202008%202009/Proje33.pdf>, 15 Mayıs 2014.
- [94] Telefoncu, A., (1999). Biyosensörler (Telefoncu A., Ed.), s.1, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir.
- [95] Mehrvar, M., Bıs, C., Scharer, J. M., Moo-Young, M. ve Luong, J. H., (2000). “Fiber-optic biosensors-Trends and advances”, Analytical Science, 16: 677-692.
- [96] Mello, L. D. ve Kubota, L. T., (2002). “Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries”, Food Chemistry, 77: 237-256.
- [97] Yavuz, A. G., (2005). Polivinil Ferrosen Modifiye Elektrodunu Temel Alan Glukoz Biyosensörünün Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [98] Biyosensörler, <http://www.scribd.com/doc/9380782/Biyosensorler-2>, 14 Mart 2014.
- [99] Biyosensör ve Medikal Uygulamaları, [http://makinecim.com/bilgi_8078 BIYOSENSOR-ve-MEDIKAL UYGULAMALARI](http://makinecim.com/bilgi_8078_BIYOSENSOR-ve-MEDIKAL_UYGULAMALARI), 14 Mart 2014.
- [100] Ustabaş, S., “Glukoz Tayini için Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması”, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010.
- [101] Tran-Minh, C. (1993). Biosensors, Chapman and Hall, London.
- [102] Eggins, B.R. (1996). Biosensor: an Introduction, John Wiley and Sons Ltd. and B. G. Teubner, West Sussex.
- [103] Bülbül, D., (2012). “*Hypocrea jecorina* Saf Kültürü ve *Trichoderma reesei* 1a Mutant Suşundan Glutaminaz Enziminin Üretimi”, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [104] Wakayama, M, Yamagata T, Kamemura A, Bootim A, Yano S, Tachiki T, Yoshimune K & Moriguchi M. (2005). Society for Industrial Microbiology. 32, 383-390.
- [105] Yoshimune, K., Abe, T. and Moriguchi, M., (2006). “A Combination of Glutaminase and pH Control Prevents The Nonenzymatic Conversion of l-Glutamine into l-2-pyrrolidine-5-carboxylic acid in Food Processing”, 874: 8501.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Dilruba ALBAYRAK
Doğum Tarihi ve Yeri : 15.10.1989
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : dilruba-s@msn.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyokimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2014
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2012
Lise	Fen-Matematik	Üsküdar Ahmet Keleşoğlu Anadolu Lisesi (YDA)	2007