

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

**POTANSİYOMETRİK ESASLI GLUTAMİN BİYOSENSÖRÜ
TASARLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

DİDEM BEGÜM BAĞRIYANIK

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

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. EMİNE KARAKUŞ**

İSTANBUL, 2011

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

**POTANSİYOMETRİK ESASLI GLUTAMİN BİYOSENSÖRÜ
TASARLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

DİDEM BEGÜM BAĞRIYANIK

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

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. EMİNE KARAKUŞ**

İSTANBUL, 2011

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POTANSİYOMETRİK ESASLI GLUTAMİN BİYOSENSÖRÜ
TASARLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Didem Begüm BAĞRIYANIK tarafından hazırlanan tez çalışması 27/07/2011 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

Prof. Dr. Ayşe OGAN

Marmara 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 Demet YILMAZ ve Canda ULUTÜRK'e;

Çalışmalarımız için gerekli olan Beyin Omurilik Sıvısı numunelerini bize temin eden İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı ve Sayın Laborant Sema KORKMAZ TAHBERER'e;

Hayatımın her döneminde hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan beni bugünlere getiren, maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan sevgili babam Murat BAĞRIYANIK ve annem Nurten BAĞRIYANIK'a, her zaman yanımda olan canım kardeşim Emirhan Kemal BAĞRIYANIK'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs, 2011

Didem Begüm BAĞRIYANIK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	1
1.3 Hipotez	2
BÖLÜM 2	
AMİNO ASİTLER.....	3
2.1 Amino Asitlerin Sınıflandırılması.....	4
2.2 Amino asitlerin metabolizması	5
2.2.1 Amino asitlerin yıkımı.....	6
2.3 Glutamin	7
2.3.1 Glutaminin Fonksiyonları.....	8
2.3.2 Glutamin Tayin Yöntemleri.....	10
2.3.2.1 Biyosensör Esaslı Glutamin Tayin Yöntemleri.....	11
2.4 Glutamin ile İlgili Yapılan Çalışmalar	13
BÖLÜM 3	
BİYOSENSÖRLER	17
3.1 Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu.....	19

3.1.1	Biyokomponentler	20
3.1.2	Transduserler	21
3.1.3	Biyosensörlerde Analizlenebilecek Unsurlar	22
3.1.4	Biyosensörlerde Kullanılan Biyoaktif Yapılar	22
3.1.5	Biyosensörlerde Yararlanılan İletim ve Ölçüm Sistemleri.....	23
3.1.6	Biyosensör Çeşitleri	24
3.1.6.1	Elektrokimyasal Sensörler	24
3.1.6.2	Potansiyometrik biyosensörler	24
3.1.6.3	Voltametrik biyosensörler.....	24
3.1.6.4	Amperometrik Biyosensörler	24
3.1.6.5	Optik Sensörler.....	25
3.1.6.6	Termal Sensörler	25
3.1.6.7	Kütle Hassas Sensörler	25
3.1.7	Biyosensörlerin Uygulama Alanları.....	26
3.1.7.1	Gıda Sektöründe Biyosensör Kullanımı	27
3.1.7.2	Savunma Sektöründe Biyosensör Kullanımı	27
3.1.7.3	Çevresel Ölçümlerde Biyosensör Kullanımı.....	28
3.1.7.4	Tıbbi Alanda Biyosensör Kullanımı.....	29
3.1.8	Enzim Sensörleri	30
3.1.8.1	Enzim Sensörlerin Genel Çalışma İlkesi	32
3.1.9	Enzim İmmobilizasyonu.....	33
3.1.10	İmmobilizasyon Yöntemleri	34
3.1.10.1	Kovalent Bağlama.....	35
3.1.10.2	Tutuklama.....	38
3.1.10.3	Adsorpsiyon.....	38
3.1.10.4	Çapraz Bağlama.....	39
3.1.11	Enzim Sensörlerinin Sınıflandırılması	40
3.1.11.1	Potansiyometrik Esaslı Enzim Sensörleri.....	41
3.1.12	Enzim Elektrotlarında Performans Faktörleri.....	45
3.1.12.1	Kalibrasyon ve Duyarlılık	46
3.1.12.2	Kararlılık.....	46
3.1.12.3	Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı.....	46
3.1.12.4	Cevap Süresi	47
3.1.12.5	Seçicilik	47
3.1.12.6	Tekrarlanabilirlik	48
3.1.12.7	Sıcaklık.....	48
3.1.12.8	Tıbbi Uygulamalarda Kullanılacak Biyosensörler İçin Biyouyumluluk	49
3.2	Glutamin Tayininde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış	49
3.2.1	Glutaminaz.....	49
3.2.2	Nonaktin	49
3.2.3	Palmitik asit	50
3.2.4	Dioktil Sebakat (DOS)	50
3.2.5	Glutaraldehit	50
3.2.6	Poli(vinilklorür) (PVC)	51
3.2.7	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC)	51

BÖLÜM 4

MATERYAL VE METOD.....	52
4.1 Kullanılan Cihazlar	52
4.2 Kullanılan Numuneler	52
4.2.1 GNC L-Glutamin Kapsülü.....	52
4.2.2 Serum Numunesi.....	52
4.2.3 Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) Numuneleri	52
4.3 Kullanılan Enzimler	53
4.4 Kullanılan Kimyasal Maddeler	53
4.5 Kullanılan Çözeltiler	53
4.5.1 TRIS tampon çözeltisi	53
4.5.2 Amonyum Klorür Çözeltileri.....	54
4.5.3 Glutamin Çözeltileri.....	55
4.5.4 Çalışma Elektrodu İç Dolgu Çözeltisi.....	57
4.5.5 GNC L-Glutamin Kapsülünde Glutaminin Tayini İçin (Standart Katma Yönteminde) Kullanılan Çözeltiler	57
4.5.6 Serumda Glutamin Tayini İçin (Standart Katma Yönteminde) Kullanılan Çözeltiler	57
4.5.7 Beyin Omurilik sıvısı (BOS)’ta Glutamin Tayini için (Standart Katma Yönteminde) Kullanılan Çözeltiler	58
4.6 Amonyum – Seçici Elektrotlar.....	59
4.6.1 Amonyum – Seçici Elektrotların Hazırlanışı.....	59
4.7 Glutamin Biyosensörleri.....	60
4.7.1 Glutamin Biyosensörlerinin Hazırlanması	60
4.7.2 Glutamin Biyosensörünün Çalışma Aralıklarının ve Eğiminin Belirlenmesi.....	60
4.8 Glutamin Biyosensörünün Performansına Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi ..	61
4.9 Glutamin Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği	61

BÖLÜM 5

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	62
5.1 Glutamin Biyosensörü	62
5.1.1 Glutamin biyosensörünün amonyuma cevabı.....	64
5.1.2 Glutamin biyosensörünün kalibrasyon grafiği.....	65
5.1.3 Tampon konsantrasyonunun etkisi.....	66
5.1.4 pH’ın etkisi	68
5.1.5 Sıcaklığın Etkisi	70
5.1.6 Seçicilik Katsayılarının Hesaplanması.....	71
5.1.7 Amino Asitlerin Girişim Etkisi	71
5.1.8 Karıştırma hızının etkisi	72
5.1.9 Cevap Süresi	73
5.1.10 Raf Ömrü	73
5.1.11 Tekrarlanabilirlik	74
5.1.12 Enzim Kinetik Parametrelerinin (Km ve Vmax değerleri) Belirlenmesi....	75
5.2 Gerçek Numunelerde Glutamin Tayini	76

5.2.1	GNC L-Glutamin Kapsülünde Glutamin Tayini	76
5.2.2	Serumda Glutamin Tayini	77
5.2.3	Beyin Omurilik Sıvısı (BOS)'ta Glutamin Tayini	78
BÖLÜM 6		
SONUÇ VE ÖNERİLER.....		82
KAYNAKLAR		83
ÖZGEÇMİŞ		88

SİMGE LİSTESİ

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

KISALTMA LİSTESİ

BOS	Beyin omurilik sıvısı
PVC	Polivinilklorür
TCA	Trikarboksilik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
GC	GasChromatography
MS	Mass Spectroscopy
LIF	Laser Induced Fluorecence
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
Gln	Glutamin
GlnBP	Glutamin bağlayıcı protein
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
GOD	Glukoz oksidaz
BOD	Biyokimyasal oksijen sistemi
ISE	İyon seçici elektrot
DOS	Bis(2-etilhekzil)-sebakat, Dioktil sebakat
EDC	1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil] karbodiimid
THF	Tetrahidrofuran
TRIS	Tris(hidroksimetil)aminometan
HCl	Hidroklorik asit

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Glukojenik ve ketojenik amino asitler	6
Şekil 2.2	Amino asitlerin karbon iskeletlerinin yıkımı	7
Şekil 2.4	Glutaminin üre döngüsüne katılması	10
Şekil 3.1	Doğal ve en mükemmel biyosensörük sistemler	17
Şekil 3.2	Biyosensörün yapısı	19
Şekil 3.3	Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması	20
Şekil 3.4	Bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi (A : Analizlenecek madde, B : immobilize enzim tabakası, C : iletici ve D : Ölçüm sistemi)	31
Şekil 3.5	Bir biyosensör sisteminde bulunan bileşenler	32
Şekil 3.6	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)	33
Şekil 3. 7	Enzim molekülünün glutaraldehid ile çapraz bağlanması.....	37
Şekil 3. 8	Enzim molekülünün jel içinde veya polimer matrikste tutuklanması.....	38
Şekil 3. 9	Enzim molekülünün elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu	39
Şekil 3.10	Enzim molekülünün film veya tabakaya çapraz bağlanması.....	39
Şekil 3. 11	Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri	40
Şekil 3. 12	Potansiyometrik ölçüm sisteminin sematik olarak gösterimi	42
Şekil 3.13	Nonaktin'in yapısı.....	50
Şekil 3.14	Dioktil Sebakat'ın yapısı	50
Şekil 3.15	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC)'in formülü ve yapısı ..	51
Şekil 5.1	Glutaminaz molekülünün glutaraldehit ile moleküler arası(a) ve molekül içi (b) çapraz bağ oluşturmaları.....	63
Şekil 5.2	Membrana bağlı glutaminaz moleküllerinin glutaraldehit ile çapraz bağlanması ile glutaraldehitin bazı uçlarının serbest kalması	64
Şekil 5.3	Glutamin biyosensörünün amonyuma cevabı.....	65
Şekil 5.4	Glutamin biyosensörünün kalibrasyon grafiği.....	66
Şekil 5.5	Glutamin biyosensörünün eğiminin tampon konsantrasyonu ile değişimi ..	67
Şekil 5.6	Glutamin biyosensörünün eğiminin pH ile değişimi	69
Şekil 5.7	Glutamin biyosensörünün eğiminin sıcaklık ile değişimi	70
Şekil 5.8	75 gün sonunda glutamin biyosensörünün elde edilen eğim değerindeki değişme.....	74
Şekil 5.9	Glutamin biyosensörünün 10 kez alınan ölçüm sayısına karşılık yüzde bağlı cevabı.....	75

Şekil 5.10	Glutamin biyosensöründeki glutaminaz için Lineweaver-Burk grafiği.....	76
Şekil 5.11	Glutamin biyosensörü ile standart katma yönetimi kullanılarak 10^{-3} M glutamin çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği	77
Şekil 5.12	Glutamin biyosensörü ile standart katma yönetimi kullanılarak 5×10^{-4} M glutamin çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği	78
Şekil 5.13	I no'lu hasta için, glutamin biyosensörü ile standart katma yönetimi kullanılarak 10^{-4} M glutamin çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği	80
Şekil 5.14	II no'lu hasta için, glutamin biyosensörü ile standart katma yönetimi kullanılarak 10^{-4} M glutamin çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği	80

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1	Esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler	5
Çizelge 3.2	Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz olanakları.....	26
Çizelge 3.3	Enzim immobilizasyonunda kullanılan maddelerde (taşıyıcı) bulunan reaktif gruplar ve reaksiyona girdikleri amino asitlerin fonksiyonel grupları.....	36
Çizelge 3.4	Enzimlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonunda bağ oluşumuna katılan aminoasitlerin reaktif grupları	37
Çizelge 3.5	Enzim sensörlerinin sınıflandırılması	41
Çizelge 4.1	Kullanılan enzimlerin adları, numaraları, kaynakları ve temin edildikleri firmalar.....	53
Çizelge 4.2	Amonyum klorür kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması	55
Çizelge 4.3	Glutamin kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması.....	56
Çizelge 4.4	Glutamin çözeltilerinin hazırlanması.....	57
Çizelge 4.5	Glutamin çözeltilerinin hazırlanması.....	58
Çizelge 4.6	Glutamin çözeltilerinin hazırlanması.....	58
Çizelge 4.7	PVC ve palmitik asit kullanılarak hazırlanan amonyum-seçici membranların bileşimi	59
Çizelge 5.1	25,0 ± 1,0 °C 'da glutamin biyosensörünün amonyum elektrodu için doğrusal çalışma aralığı ve eğimi	64
Çizelge 5.2	25,0±1,0°C'da glutamin biyosensörünün eğimi ve çalışma aralıkları.....	65
Çizelge 5.3	25,0±1,0°C'da glutamin biyosensörünün cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi.....	67
Çizelge 5.4	25,0±1,0°C'da glutamin biyosensörünün cevabına pH'nın etkisi.....	68
Çizelge 5.5	Glutamin biyosensörünün cevabına sıcaklığın etkisi	70
Çizelge 5.6	Glutamin biyosensörünün seçicilik katsayıları	71
Çizelge 5.7	Glutamin biyosensörüne askorbik asit ve bazı amino asitlerin girişim oranları	72
Çizelge 5.8	Hazırladığımız glutamin biyosensörü ile GNC L-glutamin kapsülü örneğinde glutamin tayini ile elde edilen sonuç	77
Çizelge 5.9	Serumda glutamin tayini için glutamin biyosensörü ve Centro laboratuvarından elde edilen sonuçlar	78
Çizelge 5.10	BOS örneklerinde glutamin tayini için glutamin biyosensöründen elde edilen sonuçlar	80

ÖZET

POTANSİYOMETRİK ESASLI GLUTAMİN BİYOSENSÖRÜ TASARLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Didem Begüm BAĞRIYANIK

Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emine KARAKUŞ

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. Günümüzde yaklaşık 200'e yakın biyosensör geliştirilmesine rağmen, bunlardan sadece 25 kadarı ticari olarak üretilenmiştir. Bu da, ticari biyosensör üretimine temel teşkil edecek çalışmaların yapılmasının ne kadar önemli olduğu açık bir şekilde göstermektedir.

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 membran materyali olarak; uzun zincirli bir yağ asidi olan palmitik asit kullanılarak elde edilen membranla amonyum-seçici elektrot hazırlanmıştır. Bu elektrodun membranına glutaminaz enzimi immobilize edilerek glutamin biyosensörü yapılmıştır. Biyosensörün optimum çalışma koşullarını belirlemek amacı ile tampon konsantrasyonu, tampon pH'sı, enzim miktarı ve ortam sıcaklığının elektrot cevabı üzerine etkileri incelenmiş, enzim elektrodunun raf ömrü, tekrarlanabilirliği, duyarlılığı, tayin aralığı ve tayin sınırı belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, hazırlanan glutamin biyosensörü ile beyin omurilik sıvısında (BOS), GNC L-glutamin kapsülünde ve

serumda glutamin tayini standart katma yöntemi ile yapılarak elde edilen sonuçlar referans değerleri ile karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör, glutamin, glutaminaz, potansiyometrik, amonyum seçici elektrot, glutamin biyosensörü

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF POTENTIOMETRIC BASED GLUTAMINE BIOSENSOR

Didem Begüm BAĞRIYANIK

Department of Chemistry
MSc. Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

Biosensors play an important role in many industrial areas; medicine, agriculture, pharmaceutical, environmental pollution and defence. The main purpose of biosensor technology is development of the commercial sensor, which will allow to practical and economic analysis. Recently, in spite of the developing 200 biosensors, only 25 biosensors produce commercially.

Glutamine, creates %60 of amino acid pool in muscles and %20 of total amino acid cycle in the body. The benefits of glutamine as a basis, to help secretion of growth hormone, enhance nitrogen uptake of cells, increase protein synthesis, cell hydration, maximize cell recovery, prevent the destruction of muscles, clean up toxic substance formed on 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 infection and increases strength of all muscles. Glutamine plays an important role in protein metabolism and it is the most important amino acid for the developers of the body builders.

In this study, as the membrane material, palmitic acid which is uses a long-chain fatty acid, and amonium-selective electrode was prepared with obtained from the membrane. The glutamine biosensor was prepared bu immobilizing glutaminase enzyme was onto this membrane electrode. To determine the optimum working conditions of the biosensor, we examined the effect of buffer concentration, buffer pH, the amount of enzyme and media temperature on the electrode response. We also determined shelf life, repeatability, sensitivity, interval of determination (designated range) and detection limit of our glutaminase enzyme electrode. The results obtained for determination of glutamine by using standart addition method with our prepared glutamine biosensor in

cerebrospinal fluid (CSF), GNC L-glutamine capsule and serum were compared with reference values.

Key Words: Biosensor, glutamine, glutaminase, potentiometric, amonium selective elektrode, glutamine biosensor

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

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, biyolojik örneklerde glutaminin tayininde kullanılmak üzere, hazırlanmış olduğumuz palmitik asit kullanılarak elde edilen amonyum-seçici PVC membran elektrot üzerine glutaminaz enziminin kimyasal olarak immobilize edilmesi ile potansiyometrik esaslı glutamin biyosensörü tasarlanması amaçlanmıştır. Biyosensörün 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 belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, hazırlanan glutamin biyosensörü ile GNC L-glutamin kapsülünde, serumda ve beyin omurilik sıvısında (BOS) glutamin tayini yapılarak elde edilen sonuçlar standart yöntem ile karşılaştırılması da amacımızdır.

1.3 Hipotez

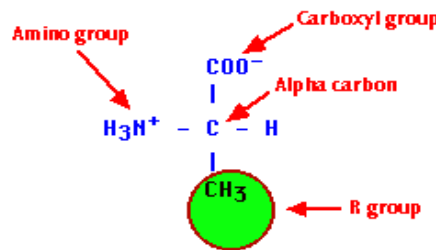
Yapılan tüm çalışmalarımız amacına ulaşarak, biyosensörümüzün optimum koşullarını zorlanmadan belirledik ve gerçek numunelerde glutamin tayinini gerçekleştirebildik. Literatürde potansiyometrik esaslı glutamin biyosensörüne rastlanmamış olması çalışmamızın özgün olduğunu göstermektedir. Tez çalışmamızda glutaminaz enziminin immobilize edilmesi ile potansiyometrik esaslı glutamin biyosensörü başarı ile hazırlanarak analitik özellikleri incelenmiş ve biyosensörün gerçek örneklerde bozucu türlerin önemli bir girişim etkisi olmaksızın uygulanabilirliği ispat edilmiştir.

BÖLÜM 2

AMİNO ASİTLER

Amino asitler, yapılarında amino (-NH₂) ve karboksilik asit (-COOH) gruplarını içeren moleküllerdir ve canlılarda çok değişik fonksiyonlara sahiptirler. Genelde biz onları sadece proteinlerin monomerleri olarak biliriz ama doğada bulunan 300 amino asidin yalnızca 20'si proteinlerde bulunur.

Proteinlerin yapısında bulunan bu 20 amino asit L- α -amino asit olarak adlandırılırlar. Buradaki α ön eki, moleküldeki α - karbonuna hem amino hem de karboksilik asit gruplarının bağlı olduğunu gösterir. L-ön ekiyse, daha ziyade molekülün stereokimyasıyla alakalıdır. Aşağıdaki şekilde gördüğünüz üzere α karbonuna -H, -NH₂, -COOH ve bir de -R grubu bağlıdır ve bu karbon R grubunun -H olduğu glisin dışında diğer tüm amino asitlerde, 4 farklı grubun bağlı olduğu bir stereojenik merkezdir. Bu yüzden bu α -amino asitler kiraldır ve L ön eki sola çeviren anlamına gelen *Levarotatory*'den gelir; molekülün de L-gliseraldehit ile aynı mutlak konfigürasyona sahip olduğunu gösterir [3].



Amino asitler suda çözünürler, alkol ve eterde çözünmezler. Erime noktaları 200°C 'nin üzerindedir, çünkü iyonik bağlara sahiptir. Amfoterik özellik taşırlar. Glisin dışında

tüm amino asitler optik aktivite gösterirler. Amino asitler, besinlerle alınan proteinlerden türevlenirler ya da hücre içi ara ürünlerden elde edilirler. Amino asitler, metabolik enerjinin üretimini sağlayan önemli bir biyomolekül grubudur [4].

2.1 Amino Asitlerin Sınıflandırılması

Amino asitler yan zincirlerine (R) göre isim alırlar. Amino asitleri yan zincirlerine göre, yük taşıyan (pozitif ya da negatif yüklü); aromatik halka taşıyan; alifatik zincir taşıyan amino asitler olarak sınıflandırmak olasıdır.

Alifatik yan zincir taşıyan amino asitler: Glisin, Alanin, Valin, Lösin, İzölösin bu grupta yer alır.

Hidroksil grubu (-OH) taşıyan amino asitler: Serin ve Treonin bu gruptadır. Tirozin de bu gruba dahildir, ancak aromatik halka taşıdığı için başka grupta yer alır.

Kükürt içeren amino asitler: Sistein ve Metionin

Asit grupları ve amidlerini içeren amino asitler: Aspartik asit, Asparagin, Glutamik asit, Glutamin bu grupta yer alır.

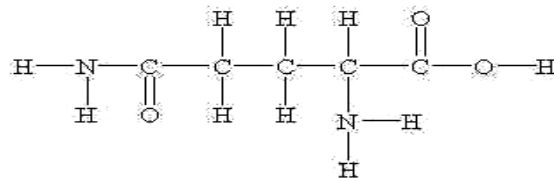
Bazik grup içeren amino asitler: Arginin, Lizin, Histidin

Aromatik halka içeren amino asitler: Histidin, Fenilalanin, Tirozin, Triptofan

İmino asitler: Prolin Diğer bir sınıflama ise;

Apolar yan zincire sahip olanlar: Glisin, alanin, valin, lösin, izölösin, metionin, prolin, fenilalanin ve triptofan bu grupta yer alır.

Yüksüz polar zincire sahip olanlar: Serin, treonin, tirozin sistein ve **glutamin** bu grupta yer alır. **Glutaminin** açık yapısı aşağıdaki şekildedir;



Yüklü polar zincire sahip olanlar: Lizin, arjinin, histidin, aspartik asit ve glutamik asittir [3].

E.coli gibi bakteriler, 20 amino asidin tamamını sentezleyebildikleri halde insanda ise ancak yarısı sentezlenir. Sentezlenemeyen aminoasitlerin diyetle alınması gerekir. Esansiyel veya eksojen amino asitler olarak da isimlendirilen bu amino asitlerin listesi esansiyel olmayan amino asitlerle birlikte Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler

Besinsel olarak Esansiyel Amino Asitler	Besinsel olarak Esansiyel olmayan Amino asitler
Histidin	Alanin
İzolösin	Arjinin
Lizin	Asparajin
Metionin	Aspartik asit
Fenilalanin	Sistein
Treonin	Glutamik asit
Triptofan	Glutamin
Valin	Glisin
Lösin	Prolin
	Serin
	Tirozin (Hidroksiprolin)
Histidin ve arjinin besinsel olarak yarı esansiyel de olabilir.	

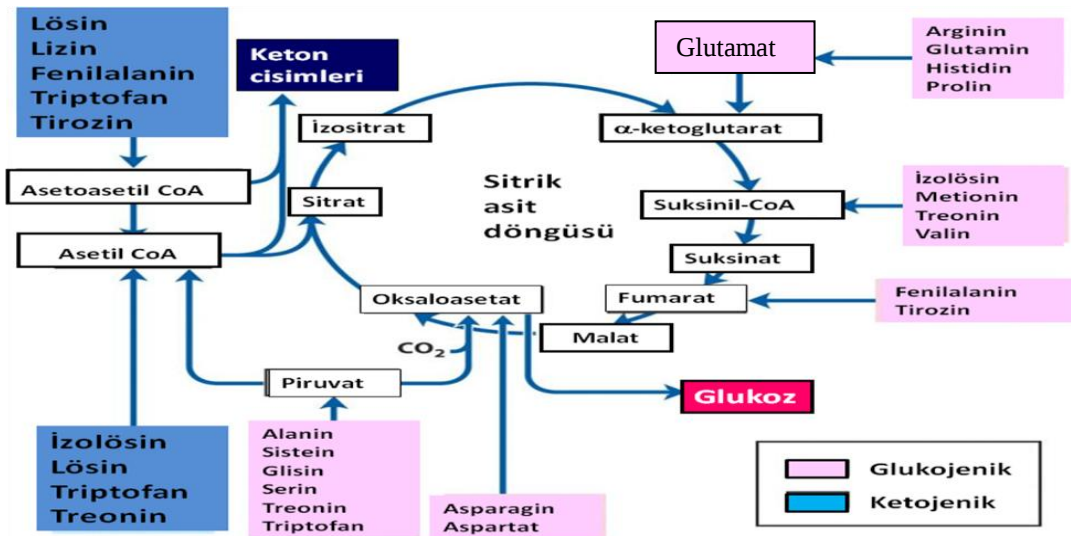
2.2 Amino asitlerin metabolizması

Amino asitler, metabolik enerjinin üretimini sağlayan önemli bir biyomolekül grubudur. Besinlerle alınan proteinlerden türevlenirler ya da hücre içi ara ürünlerden elde edilirler. Hayvanlarda amino asitler üç farklı metabolik durumda oksidatif parçalanmaya gider:

Hücresel proteinlerin normal sentez ve yıkımı sırasında protein yıkımıyla salınan bazı amino asitler, eğer yeni protein sentezi için gerekli değilse oksidatif yıkıma uğrarlar. Besinler proteinlerce zengin olduğunda ve amino asitler vücudun protein sentezinden daha fazla miktarda alındıysa depolanmazlar ve yıkıma uğrarlar. Şiddetli açlık ya da diabetes mellitus sırasında, karbohidratlar da mevcut değilse, vücut proteinleri yakıt olarak görev yapar [4].

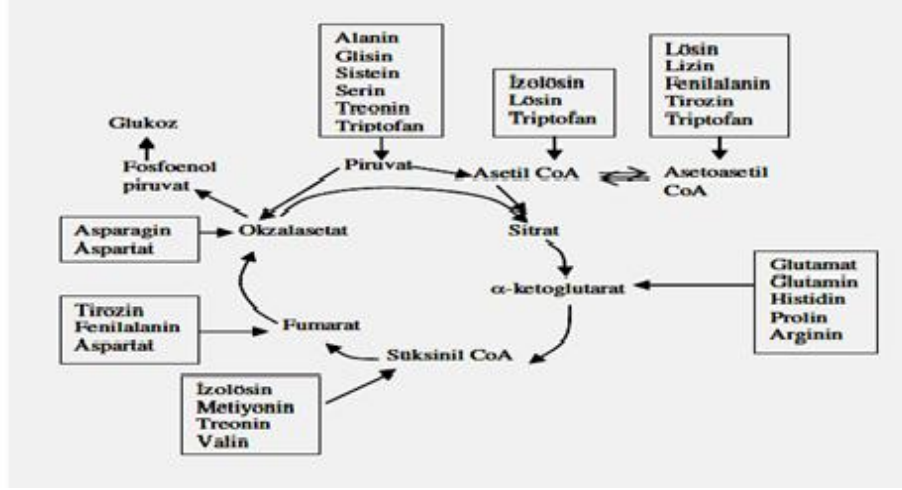
2.2.1 Amino asitlerin yıkımı

Aminoasitlerin yıkımında α -amino grubu, transaminasyon ve oksidatif deaminasyon reaksiyonları ile uzaklaştırılıp çoğu üreye çevrilirken, geride kalan karbon iskeletleri de asetil CoA, asetoasetil CoA, piruvat veya TCA devrinin ara bileşiklerinden birisine dönüştürülür. Asetil CoA, sitrik asit döngüsüne katılmakta ya da asetoasetil CoA üzerinden keton cisimlerine dönüşmektedir. Asetil CoA ve asetoasetil CoA üzerinden keton cisimlerine dönüşen amino asitlere ketojenik, piruvat ve sitrik asit siklusu ara ürünleri (α -ketoglutarat, suksinil-CoA, fumarat ve oksaloasetat) aracılığı ile glukoneogenez yoluyla glukoz ve glikojene dönüşebilen amino asitlere ise glikojenik amino asitler adı verilir. Çünkü, açlık durumunda bu TCA devri ara bileşikleri ve piruvat, fosfoenol piruvata ve daha sonra glukozla dönüştürülmektedir. Memelilerde asetil CoA veya asetoasetil CoA'dan glukoz sentezi yolları kapalıdır [5]. Şekil 2.1'de glikojenik ve ketojenik amino asitler görülmektedir.



Şekil 2.1 Glukojenik ve ketojenik amino asitler

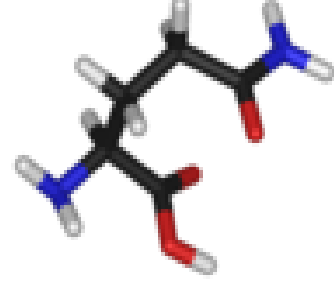
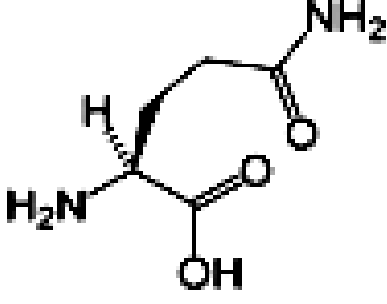
Amino asitlerin karbon iskeletlerinin yıkımı; α -Amino grubu uzaklaştırılmış amino asitlerin geride kalan karbon iskeletleri, glukozla çevrilebilen veya sitrik asit devri tarafından yükseltgenebilen ara bileşiklere dönüştürülür. Gerçekten yirmi amino asidin karbon iskeletleri yedi çeşit moleküle çevrilir. Bunlar; piruvat, asetil CoA, asetoasetil CoA, α -ketoglutarat, süksinil CoA, fumarat, ve oksaloasetattır. Burada, metabolik dönüşümlerin ne kadar ekonomik yürüdüğüne bir örneği daha görülmektedir [5].



Şekil 2.2 Amino asitlerin karbon iskeletlerinin yıkımı

2.3 Glutamin

Glutamin (Gln), proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biridir. Molekül formülü $C_5H_{10}N_2O_3$ 'dür ve molekül ağırlığı 146.15 g/mol'dür. Sistematik adı (2S)-2-amino-4-carbamoyl-butanoik asittir. Yan zinciri, glutamik asidin hidroksil yan zincirinin amin fonksiyonel grubuyla değişmesiyle oluşan amit grubudur. Kodu CAA ve CAG şeklindedir[6]. Polar özelliktedir, ancak fizyolojik pH'da yüksüzdür. Çünkü yüksüz R grubu taşıyan aminoasitlerden birisidir. Kaslarda amino asit havuzunun %60'ını ve vücutta toplam amino asit döngüsünün %20'sini Glutamin oluşturur. Diğer amino asitlerin aksine sadece Glutamin'in 2 nitrojen atomu vardır ve nitrojen mekiği olarak bilinir. Vücudun en çok hangi bölgesinde gereksinim varsa o bölgeye nitrojen taşır. Nitrojen, yeni kas dokularının oluşumunda ve mevcut kas dokularının büyümesi ve tamirinde önemli bir rol oynar. En fazla kas büyümesini sağlayabilmek için, vücutta en fazla miktarda nitrojen takviyesi yapmak gerekmektedir [7]. Glutamin tüm amino asitler içinde en çok fonksiyona sahip olan temel bir amino asittir. Pürin ve pirimidin sentezi ve amino gruplarının plazmada taşınmasında rol oynar. Böbrek tübülüs hücresinde serbest amonyak oluşturur. Bu reaksiyon glutaminaz tarafından katalizlenir ve asit-baz düzenlenmesinde yer alır [8]. Metabolik asidozda, glutaminden amonyum oluşumu artar, alkalozda azalır. Glutamin, aminoşeker sentezinde amino grubu vericisi olarak yer alır. Esansiyel olmayan ve glokojenik bir aminoasittir. Molekül formülü ve 3 boyutlu yapısı aşağıda gösterilmektedir [9].



2.3.1 Glutaminin Fonksiyonları

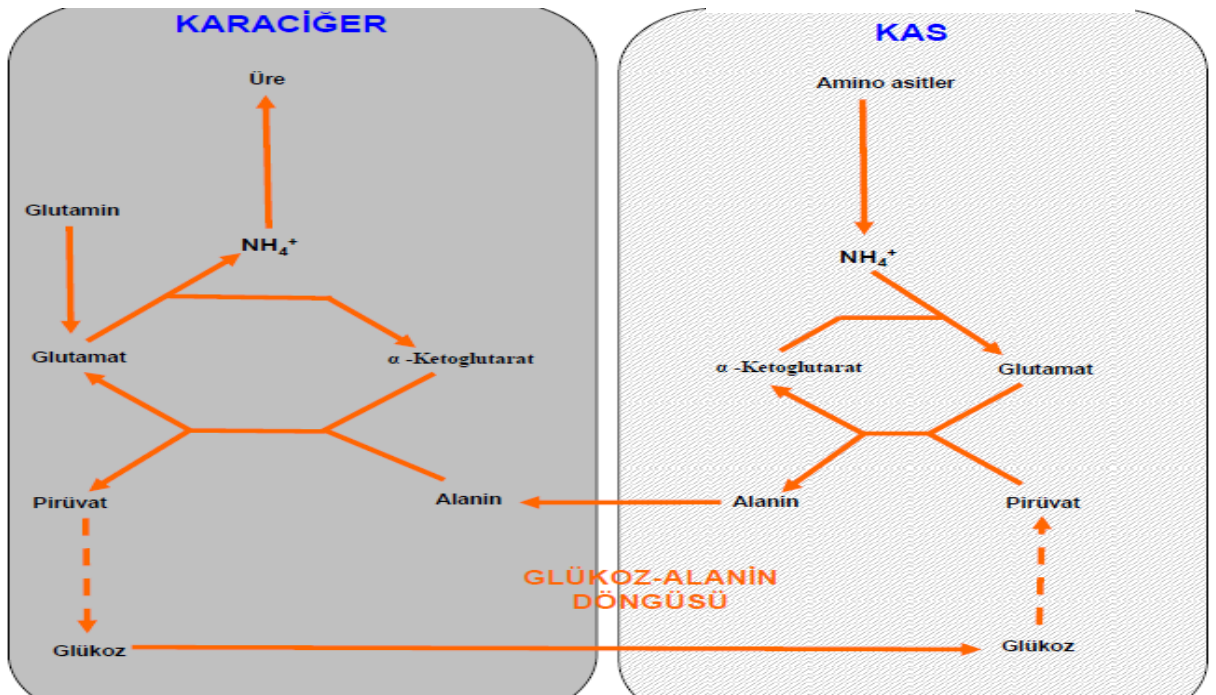
Glutaminin bir çok biyokimyasal fonksiyonu vardır;

- DNA sentezinde substrattır.
- 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 hücrelerinden fotosintata dönüşür.
- Beyinden kana ulaşan tek aminoasittir [6].

Glutamin'in temel olarak sağladığı faydalar; büyüme hormonunun salgılanmasına yardımcı olmak, hücrelerin nitrojen alımını zenginleştirmek, protein sentezini artırmak, hücre hidrasyonunu artırmak, hücre iyileşmesini maksimize etmek, kas yıkımını engellemek, glükoz fonksiyonunu optimize etmek, vücutta oluşan toksin maddeleri temizlemek, kaslarda protein azalmasını önlemek, hücrelere nitrojen 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

Glutamin'dir. Sinir ve psikoloji sağlığını destekler. Ayrıca glutamin amonyağın taşınmasında rol oynar ve üre döngüsüne katılır [10].

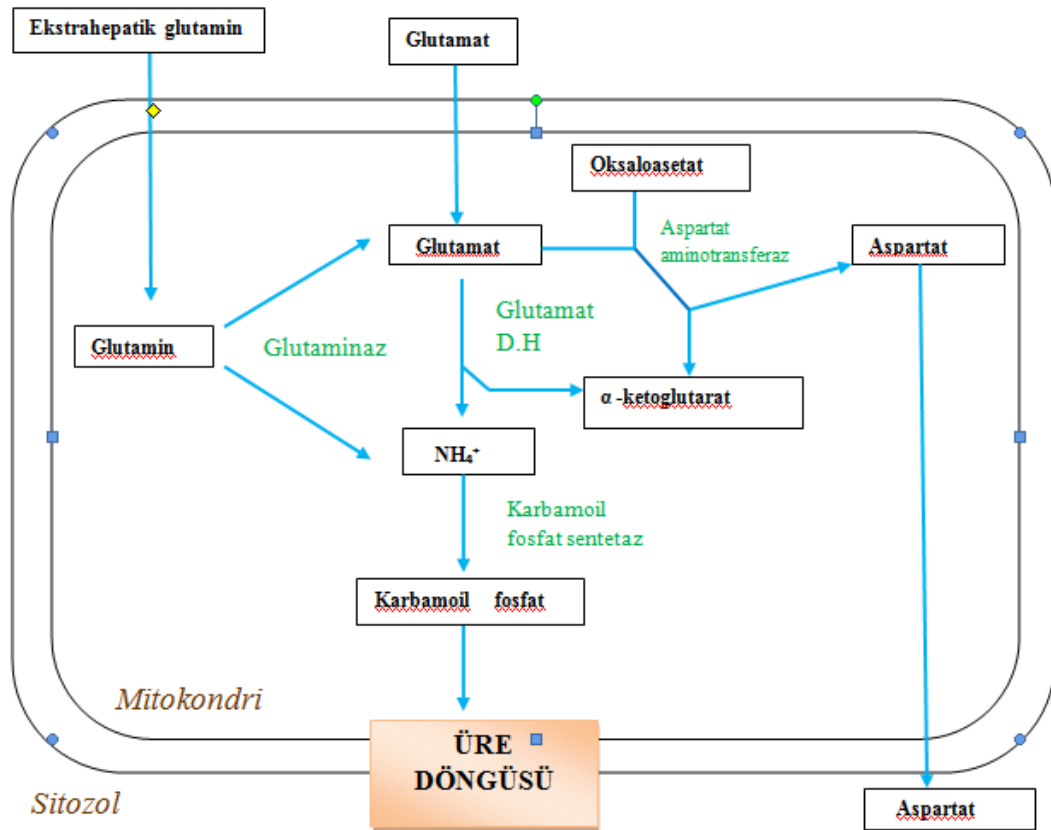
Amino asitlerin amino grupları genellikle, ilk olarak karaciğer hücrelerinin sitosolünde α -ketoglutarata taşınır ve glutamat oluşturulur. Glutamat mitokondriye taşınır. Sadece burada amino grup NH_4^+ oluşturmak üzere uzaklaştırılır. Glutamin karaciğerden toksin madde amonyağın atılmasına yardımcı olur. Bir çok dokuda oluşturulan amonyağın fazlası glutaminin amid azotuna dönüşür ve karaciğer mitokondrisine aktarılır. Karaciğerde bulunan fazla nitrojen amonyağa dönüşeceğine glutamik asite bağlanarak glutamine dönüşür. Şekil 2.3'te görölmektedir [11].



Şekil 2.3 Glukoz-Alanin döngüsü

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. 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, ordan da idrar ile vücuttan atılır. Amaç toksik amonyağın daha az toksik olan üre dönüştürölmesidir. Arginaz enzimi yalnızca

karaciğerde bulunduğu için bu döngü karaciğerde gerçekleşir. Glutaminin üre döngüsüne katılması ise Şekil 2.4'deki gibi olur;



Şekil 2.4 Glutaminin üre döngüsüne katılması

2.3.2 Glutamin Tayin Yöntemleri

Glutamin, ökaryotik hücre kültürlerinde kullanılan önemli enerji ve azot kaynağıdır [12], [13]. Glutamin yıkımı, hücre büyümesinde toksik olabilen ve böylece büyümeyi inhibe eden amonyak yapımına yol gösterdiği için izlenen glutamin konsantrasyonları en önemli basamaktır [14], [15]. Üre ve glutamin metabolizması yakından ilgili olduğundan, amonyak zehirlenmesi, hiperamonya ve protein intoleransı gibi amonyak dengesizliğine yol açan hastalıklar da glutamin seviyelerini etkiler [16], [17]. Vücutta önemli fonksiyonu olmasına ve çok fazla bulunmasına rağmen glutaminin klinik laboratuvarlarda tayini yapılamamaktadır. Çünkü glutamin için henüz standart bir metot geliştirilememiştir. Glutamin, iyon değişim kromatografisi ve HPLC metotları ve kararlı izotropik zenginleştirme sonrası GC-MS kullanarak tayin edilmiştir [17], [18], [19], [20], [21], [22], [23], [24], [25], [26], [27], [28].

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.

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 güçlüğü bulunmasının yanı sıra, askorbik asit, ürik asit, glukoz, ketonlar ve sefalosporin türü antibiyotiklerin kanda yüksek konsantrasyonda bulunması halinde bunlar girişim etkisi yapabilir.

Glutaminaz, L-glutamini glutamik aside dönüştüren reaksiyonu katalizleyen önemli bir enzimdir. Glutamin, sulu ortamda glutaminaz enziminin etkisi ile glutamik asit ve NH_4^+ iyonları verecek şekilde reaksiyon verir. Bu reaksiyon sonucunda açığa çıkan NH_4^+ iyonları, sensör geliştirilmesine zemin hazırlayacak önemli bir elektroaktif üründür.

2.3.2.1 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].

Optik Sensörler

Son yıllarda doğal ilgi ve özgünlüğü temel alan floresans sensörleri geliştirilmiştir [29], [30]. Bu yöntem bölge yönetilmiş mutagenез ve aminoasit dizilerinde değişikliklere olanak sağlayamıştır ve sonuçta oluşan protein bağlama sabitlerindeki ve haberci grup

izlenmesi için yeni boyutlarda değişiklere de yol göstermiştir. Genetik protein mühendisliği kullanarak glutaminin optik hücre kültürlerinde glutamin konsantrasyonlarının tayini için optik biyosensör geliştirilmiştir (Dattelbaum ve Lakowicz [31]).

Amperometrik Sensörler

Genel anlamda amperometri, bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Amperometrik biyosensörlerde, oksijen ve H₂O₂ elektrotları en popüler olanlarıdır. Hidrojen peroksit tayinine dayalı amperometrik glutamin elktrodu yapılmıştır (Villarta vd [32]). Ayrıca glutaminaz ve glutamat oksidazın jelde tutuklamasıyla immobilize edilmesiyle, glutamin ve glutamat biyosensörleri ince film teknolojisiyle üretildi ve ölçüm hidrojen peroksidin anodik reaksiyonuna dayanmaktadır (Moser vd [33]).

Kapiler Elektroforez Yöntemi

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

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 (Tucci vd [34]).

Potansiyometrik sensörler

Potansiyometrik glutamin enzim elektrotları, bakteri, doku ve enzimlerin immobilize edilerek kullanılmasıyla amonyak tayinine dayanır [35], [36], [37]. 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 (Villarta vd [32]). Yine yapılan amperometrik çift enzim sensöründe; glutamat sensör okumasıyla birlikte glutamat oksidazın yan aktivitesi olarak aspartik asit ve asparajinazın girişim yaptığı gözlenmiştir (Moser vd [33]). 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 (Villarta vd [32]). Yapılan tüm optimizasyon çalışmalarımızda, ölçümlerimizi doğru bir şekilde alarak, en iyi çalışma koşullarımızı zorlanmadan belirleyebildik.

2.4 Glutamin ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Eagle ve arkadaşları ilk defa 1956'da glutaminin hücre çoğalması için gerekli, takip eden çalışmalarda glutaminin pürin ve pirimidin biyosentezi için prekürsör olduğunu göstermişlerdir [38].

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'ı 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 $1,27 \text{ mM}$, standart sapma $0,12$ ve yüzde iyileşme de $\% 104$ olarak belirtilmiştir [32].

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 sensörü 10 mM’a kadar, glutamat sensörü 5 mM’a kadar doğrusal olduğu; glutamin için tayin sınırının 50 mM, glutamat için tayin sınırının ise 10 mM olduğu belirtildi. Yani sensör cevabı 50 mM’dan 100 mM glutamin/L’deki konsantrasyon aralığında lineerdir. Glutamat sensör okumasıyla birlikte glutamat oksidazın yan aktivitesi olarak aspartik asit ve asparajinazın girişim yaptığı gözlemlendi. Tüm girişim maddelerinin okuma hatası 0-3mm glutamin eşdeğeri idi ve sensör üzerine glutamat sensörü entegre edilmesiyle, farklı ölçümlerle girişimin elimine edilmiştir. Sensörlerin kararlılıklarının oldukça iyi olduğu ve performansında herhangi bir değişim olmadan en az 300 ölçüm için kullanılabildiği de belirtilmiştir [33].

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 40µL örnek boyutunda tayin edildiği bulunmuştur. Glutamin membran cevabının; 5mM glutamat +5mM glutamin karışımında (50µL 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 gözlenmiştir [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’dan 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 yanılığının 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 [34].

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 [39].

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 [31].

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 yapabilmişlerdir. Biyosensörlerin çok duyarlı cihazlarla entegre edileceğini belirterek, modifiye elektrotların yüksek kaliteli biyolojik cihazlarla entegre edilmesiyle verime karşı hassasiyetin azaldığı gözlenmiştir [40].

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 [41].

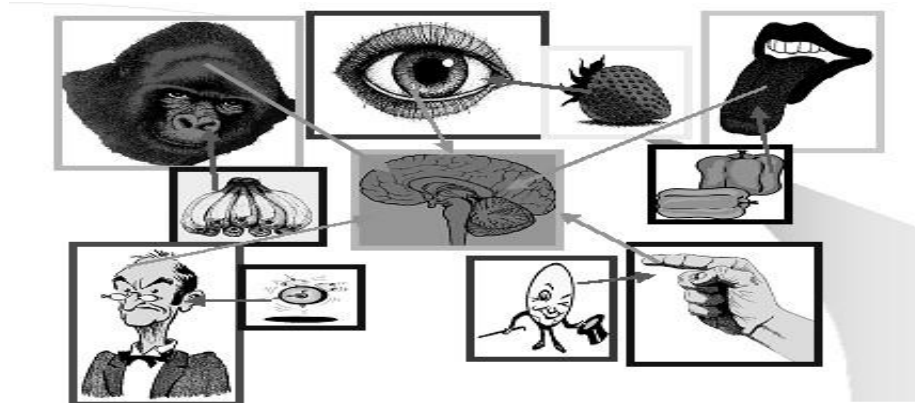
Stefano ve arkadaşları 2006’da E.Coli’den glutamin bağlayıcı protein ve L-Glutamin arasındaki moleküler bağlanmayla gözenekli silikon nano teknolojisine dayanan biyosensör üretmişlerdir. Glutamin için moleküler prob olarak rol oynayan glutamin bağlayıcı proteini (Gln BP) gözenekte silikon matriksinin deliklerine bağlamışlar, böylece gözenekli geçirgen tabaka yüzeyinin önışlevsel 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 göznekli 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; $9\text{-}36\mu\text{g l}^{-1}$ aralığında dahi ölçüldüğü belirtilmiştir [42].

BÖLÜM 3

BIYOSENSÖRLER

Genel anlamda biyosensörler, biyoloji, fizik, kimya, biyokimya, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden multidisipliner bir anlayış çerçevesinde yararlanılarak ve biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlar olarak tanımlanabilirler.

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.

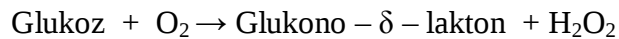


Şekil 3.1 Doğal ve en mükemmel biyosensörük sistemler

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 [5].

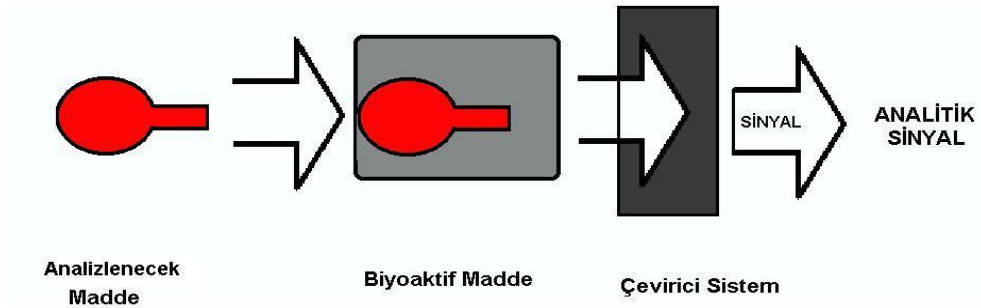
Elektrokimyasal sensörler (elektrokimyasal algılayıcı sistemler) Analitik Kimya’da oldukça yaygın kullanımı olan cihazlardır. Bu cihazlara IUPAC tarafından getirilen tanım şu şekildedir: “Kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve konsantrasyona bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlara elektrokimyasal sensörler “denir. Bu sensörler, yapılarına enzim, hücre, doku, antikor, DNA, vb. biyolojik maddelerin eklenmesiyle BİYONSENSÖR 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, birbirini içine geçmiş iki çeviriciden oluşan algılayıcı cihaz” olabilir. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek onu tanımdır. 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 [43].

Biyosensörlerin tarihi 50li yılların ortalarında L.C. Clark’ın Cincinnati hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O₂ miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında clark ve lyons glukozoksidaz (GOD) enzimini O₂ 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.



Bir biyolojik sıvıdaki glukoz ve çözünmüş oksijen elektrod etrafındaki membranı geçerek elektrod yüzeyine ulaştığında glukoz oksitlenerek glukonik aside dönüşür ve bu sırada O₂ harcanır. Ortamdaki glukoz bittiğinde O₂ tüketimi durur. O₂ elektrodu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözünmüş O₂ ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glukozun oksidasyonu için harcanan O₂ 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. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine BİYOSENSÖRLER adı verilir [44]. Şekil 3.2’de biyosensörün en genel yapısı görülmektedir.

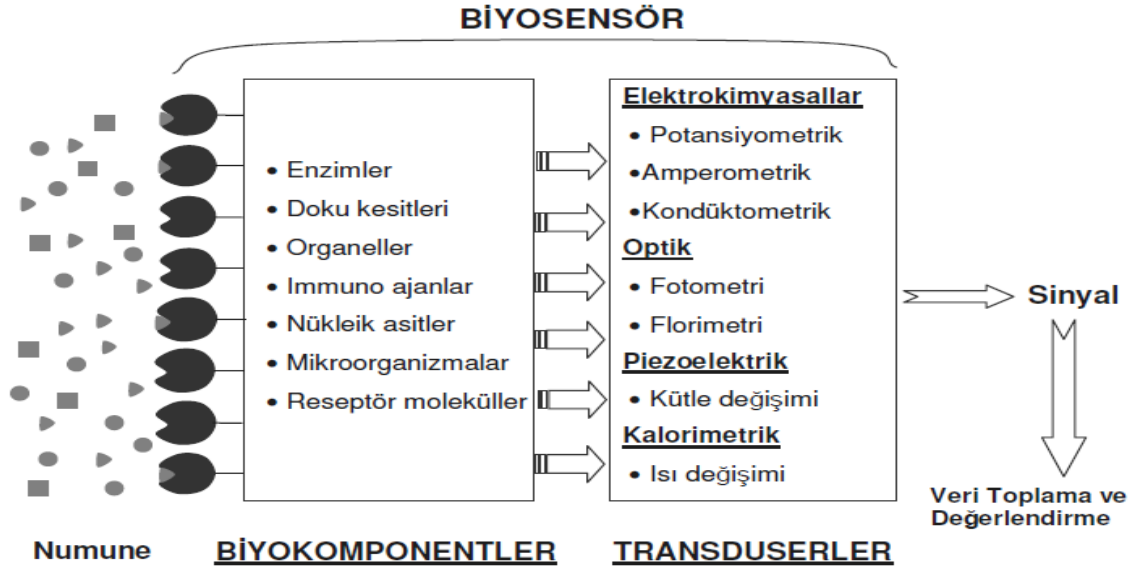


Şekil 3.2 Biyosensörün yapısı

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 [44].

3.1 Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu

Bir biyosensör; biyolojik algılayıcı elementin seçiciliği ile hedef analitin konsantrasyonu ile orantılı olarak sinyal üreten transduserin (çevirici) kombinesinden oluşan bir cihazdır. Bu sinyal; proton konsantrasyonundaki değişimden, amonyak ve oksijen gibi gazların salınması yada yükseltgenmesi, ışık emisyonu, absorpsiyon yada 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. Prensip olarak 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 3.3’de biyosensörlerin genel çalışma mekanizması görülmektedir [5].



Şekil 3.3 Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması

3.1.1 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 [5].

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 [45]. 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 [46]. 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 [45]. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir.

3.1.2 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, absorpsiyon, pH değişimiyle, kondüktivite, sıcaklık yada kütledeki değişimle izlenebilmektedir. Optik sensörlerde hedef; ışık, piezoelektrik sensörlerde ise kristalin salınım rezonansının 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

3.1.3 Biyosensörlerde Analizlenebilecek Unsurlar

Analizlenecek madde ve yapılar genel olarak analit olarak adlandırılırlar [47].

ANALİTLER
Anorganik ve organik maddeler, makromoleküller, virüs ve mikroorganizmalar
Metal iyonları
Substratlar
Aktivatörler, İnhibitörler
Enzimler, Koenzimler
Hormonlar
Antikorlar, Antijenler
Nükleik Asitler,
Virüsler, Mikroorganizmalar

3.1.4 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 [47].

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

3.1.5 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 [47].

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)	

3.1.6 Biyosensör Çeşitleri

3.1.6.1 Elektrokimyasal Sensörler

Bu başlık altında en yaygın olarak potansiyometrik, amperometrik, voltametrik ve alan etkili biyosensörlere rastlanmaktadır [48].

3.1.6.2 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 [48].

3.1.6.3 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 [48].

3.1.6.4 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 eşi 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 [48].

3.1.6.5 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 bağılı 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 [48].

3.1.6.6 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 [48].

3.1.6.7 Kütle Hassas Sensörler

Çevirici olarak piezoelektrik kristallerin kullanıldığı kütle hassas biyosensörler, rezonans frekanstaki değişime dayanarak santimetrekarede nanogram seviyesinde kütle değişimini ölçebilen ve bu yüzden de antikor-antijen etkileşimlerinde sıkça kullanılan biyosensörlerdir. Kütle hassas biyosensörlerin çalışma prensibi piezoelektrik etkiye dayanır [48].

3.1.7 Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Biyosensörler tıp, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespit ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar. Bugüne kadar 180’den fazla farklı madde için biyosensör hazırlanmış olup bunlardan ancak 25 kadarı ticari olarak üretilmektedir. Biyosensörler için mümkün uygulama alanları şunlardır :

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

Biyosensörler; gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler, bazı organik bileşikler yanında enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar. Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları Çizelge 3.2’de gösterilmektedir [5].

Çizelge 3.2 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
İmmünosensörler	Virüsler, patojen mikroorganizmalar, ksenobiyotikler

3.1.7.1 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, hammadelerin, işlem basamaklarının, mamül ürünlerinin, taşıma adımlarında doğal bileşenlerin bozumu, mikrobiyal kontaminasyon ve bunu önlemek için kullanılan katkı maddelerinin tayini önemlidir. Bunların tayinlerinde HPLC ve gaz kromatografisi duyarlı analiz imkanı sağlamasına rağmen bunlar çok masraflı yöntemlerdir. İmmunoassay teknikleri ise zaman alıcı olmaları, ölçüm sistemiyle doğrudan bağlantılı olmamaları ve laboratuvar ortamı gereksinimlerinden dolayı gıda sektöründe kullanışlı değildirler. Bu olumsuzlukların yanında, biyosensör teknolojisi, gıda analizlerinde büyük alternatifler sağlamaktadır. Ancak gıda sektörü için, ticari olarak pazarlanabilir biyosensörlerin sayısı çok azdır. Bunlar, glukoz, L-laktat, galaktoz ve alkol tayinine yönelik biyosensörlerdir.

Şekerlerin meyve ve sebzelerde, süt ve bal gibi ürünlerde, kola, şarap, meyve sularında üretim ve fermentasyon işlemlerini tayinleri önemlidir. Bu işlemlerin, duyarlı, pratik, ekonomik ve kısa sürede gerçekleşmesi için çeşitli biyosensörler geliştirilmiştir. Bu biyosensörlerin büyük kısmı, hidrojen peroksit veya oksijen duyarlı amperometrik sensörleri esas alan enzim elektrotlarıdır.

Pestisit atıklarının belirlenmesinde özellikle organofosfat pestisitlerinin inhibitör olarak etki ettiği asetilkolinesteraz ve butirilkinesteraz enzimlerinin immobilizasyonu ile hazırlanan biyosensörlerden yararlanılır.

Gıdalarda tazelik kontrolü, meyvelerde alkol; yağlarda aldehit ve balıklarda histamin tayiniyle yapılır. Gıdalarda alkol tayini, alkollü içeceklerin olgunlaşma işlemlerinin izlenmesi ile önem kazanır. Alkol tayininde daha çok alkol oksidaz immobilize edilmiş amperometrik esaslı enzim sensörleri kullanılır.

3.1.7.2 Savunma Sektöründe Biyosensör Kullanımı

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 konsantrasyonuyla 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.

3.1.7.3 Çevresel Ölçümlerde Biyosensör Kullanımı

Çevresel ölçümler insan sağlığı ve ekosistemin korunması açısından önemlidir. Hava, su, toprak kirliliği ölçümleri, endüstriyel ve tarımsal atık kontrolü ve arıtma etkinliğinin saptanması gibi alanlarda kullanılırlar.

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.

3.1.7.4 Tıbbi Alanda Biyosensör Kullanımı

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

Enzim ve elektrot yüzeyi arasında elektrotların gidiş gelişini sağlayan elektron transfer mediatörlerin kullanılmasıyla enzimatik redoks işlevini elektrotla birleştiren yaklaşım en başarılı enzim elektrotlardır. Mediatörler, oksijenden daha kolay redüklenabilen bileşiklerdir. Bunlar oksijenden bağımsız olarak çalışma imkanı sunarlar ve numune çözeltisinde çözünür halde ve elektrot yüzeyinde immobilize edilerek bulunabilirler.

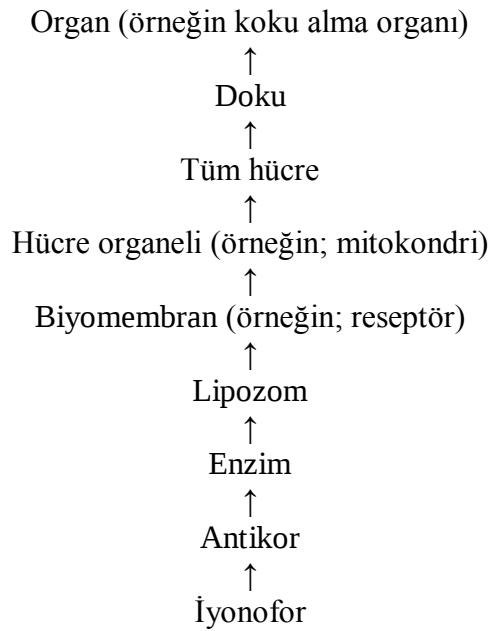
Günümüzde en başarılı mediatörle birlikte kullanılan enzim elektrodu, diyabet teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayinini mümkün kılan amperometrik glukoz biyosensörüdür. Glukoz biyosensöründe, bir biyolojik sıvıdaki glukoz ve çözünmüş oksijen, elektrod etrafındaki membranı geçerek elektrod yüzeyine 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.

İnsan vücuduna yerleştirilen biyosensörler sayesinde, biyolojik sıvılar vücut dışına alınmadan ve tüketilmeden analiz edilebilmektedir. In vivo ölçümlerde, beyin veya diğer dokularda sürekli analiz ve izleme yapılabilen, enzimlerin değiştirilebildiği ve bu sayede farklı maddelerin de analizine imkan veren iğne tip mikrodializ biyosensörleri de son yılların ilginç örneklerindendir. İlaçların, vücuttaki düzeylerinin ayarlanması,

kötü amaçla kullanımının engellenmesi ve uyuşturucu ile mücadele için biyosensör çalışmaları yapılmaktadır.

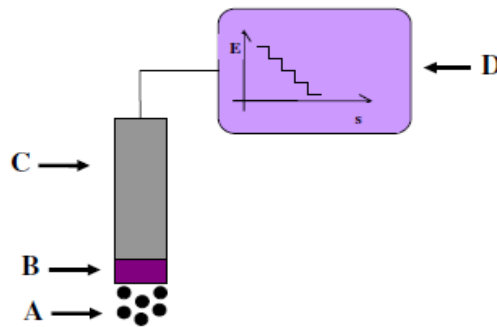
3.1.8 Enzim Sensörleri

Biyosensör teknolojisinin tarihsel geçmişine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleriyle başladığı görülmektedir. 1962’de Clark ve Lyons ve 1967 de Updike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik glukoz oksidaz enzim elektrodları bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır. Biyosensör teknolojisindeki ilk örnekler özellikle amperometrik ve potansiyometrik temelli enzim elektrodları şeklinde ortaya çıkmışlardır. Bu durumun en önemli nedeni o tarihteki bilgi ve teknolojik birikimin söz konusu çalışmalar için yeterli düzeye ulaşmış olmasıdır. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyolojik materyaller artan komplekslik niteliklerine göre sıralandıklarında; iyonoforlar, antikorlar, enzimler, lipozomlar, biyomembran parçaları (örn.:reseptör), hücre organelleri (örn.:mitokondri) doku veya tüm hücreler ve organlar (örn.: görme ve koklama) şeklinde sınıflandırılabilirler.



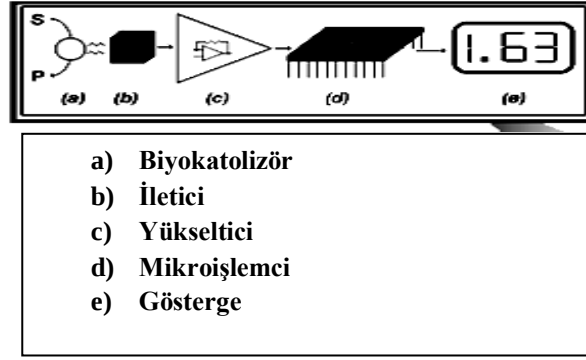
Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal hiyerarşisinde enzimlerin yeri 1960’lı yıllarda biyoloji ve biyokimya bilimlerindeki tarihsel gelişme paralelinde tüm bu yapılar içinde fonksiyonları nispeten daha ayrıntılı bir biçimde tanımlanan en önemli grubu enzimler oluşturmaktaydı. Bunun yanı sıra elektrokimya alanındaki gelişmeler , özellikle amperometrik ve potensiyometrik esaslı sensörlerin pratik uygulamalarda rahatlıkla kullanılabileceği zemini oluşturmuştu. Çeşitli maddelerin çok sayıdaki duyarlı

ve pratik analizlerine duyulan gereksinimin de artmasıyla ilk enzim elektrodlarıyla ilgili bilimsel çalışmalar başlamış oldu. 1960'lerden bu yana iletim ve ölçüm teknolojilerindeki gelişmeler elektrokimyasal esasların yanısıra kalorimetrik, optik ve akustik temelli sistemlerde de çok önemli gelişmelere yol açmıştır. Temel bilimlerdeki ilerlemeler enzimler yanısıra diğer biyolojik materyallerin fonksiyonlarının da çok daha ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmasına imkan vermiştir. Bu ilerlemelerin doğal bir sonucu olarak farklı biyolojik materyallerin ve iletim sistemlerinin kombinasyonuyla çok çeşitli biyosensörler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Bugünkü 13 sonuca bakıldığında hangi temel iletim sistemi sözkonusu olursa olsun ki elektrokimyasal esaslı olanların tartışılmaz bir ağırlığı söz konusudur, pratik ve ticari uygulamalarda enzim elektrodlarının büyük bir üstünlüğü göze çarpmaktadır. Bu sonuçtaki en büyük etmen canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin doğrudan veya dolaylı olarak analizinde kullanılabilecek binlerce enzimin varlığıdır. Bilinen enzimlerin yanı sıra bilinmeyenlerin potansiyel varlığı, piyasada yüzlerce ticari enzim preparatının bulunabilirliği ve bu sayının her geçen gün yükselmesi enzim sensörlerinin tartışılmaz üstünlüğünün devam edeceğinin bir göstergesidir. Son yıllarda organik faz enzimolojisi konusundaki bulgular, enzimler ile organik fazda oldukça farklı analizlerin yapılabilirliğini ortaya koymuştur. Söz konusu bulgular hem tasarlanabilecek enzim sensörlerinin sayısında artışa hem de uygulama alanlarının yaygınlaşmasına katkı sağlayacak niteliktedir (Telefoncu [44]). Şekil 3.4'te bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi verilmektedir.



Şekil 3.4 Bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi (A : Analizlenecek madde, B : immobilize enzim tabakası, C : iletici ve D : Ölçüm sistemi)

Şekil 3.5'te görüldüğü gibi sistemin özelliğine bağlı olarak yükseltici, mikroişlemci, dijital görüntüleyici gibi kısımlar sistem içinde yer alabilirler.

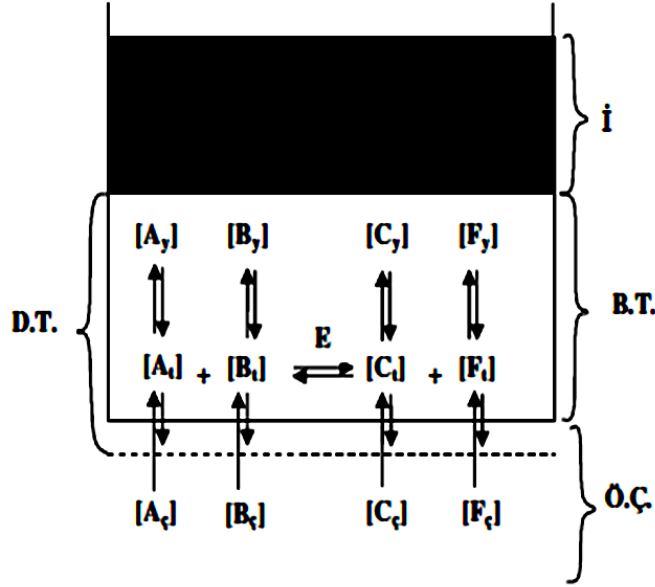


Şekil 3.5 Bir biyosensör sisteminde bulunan bileşenler

3.1.8.1 Enzim Sensörlerin Genel Çalışma İlkesi

En genel anlamda bakıldığında diğer biyosensörlerde olduğu gibi enzim sensörleri de; biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm sisteminden oluşur. Diğer biyosensörlerden tek fark biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimlerin yer almasıdır. Buna karşılık diğer biyosensörlerde olduğu gibi biyoaktif tabakanın iç ve dış yüzeylerinde membranlar, iletici ile ölçüm düzeneği arasında sinyal yükselticiler, mikroişlemciler veya ölçüm düzeneğiyle bağlantılı kaydedici veya bilgisayar sistemleri gereksinimlerine göre eklenen unsurlardır (Telefoncu [44]).

Bir enzim sensörünün çalışma ilkesi, enzim veya enzimlerin immobilize edilmiş olduğu biyoaktif tabakadaki olayların biraz daha yakından incelenmesiyle daha kolay anlaşılabilir. Şekil 3.6' da biyoaktif tabakada gerçekleşen olaylar açısından bir enzim sensörünün genel çalışma ilkesi özetlenmiştir [49].



Şekil 3.6 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)

Şekil 3.6'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.

3.1.9 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. Immobilize enzimin doğal (serbest) enzime üstünlükleri şu şekildedir; Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme v.b.) 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 [5].

3.1.10 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 [5].

Adsorpsiyon: 1gün,

Membranda tutuklama: 1 hafta,

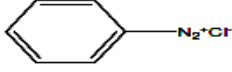
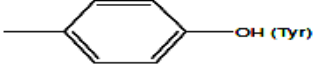
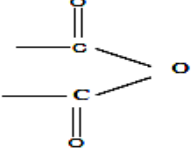
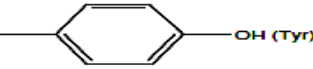
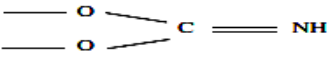
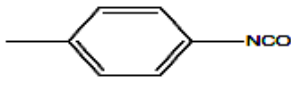
Fiziksel tutuklama: 3-4 hafta,

Kovalent bağlama: 4-14 ay.

3.1.10.1 Kovalent Bağlama

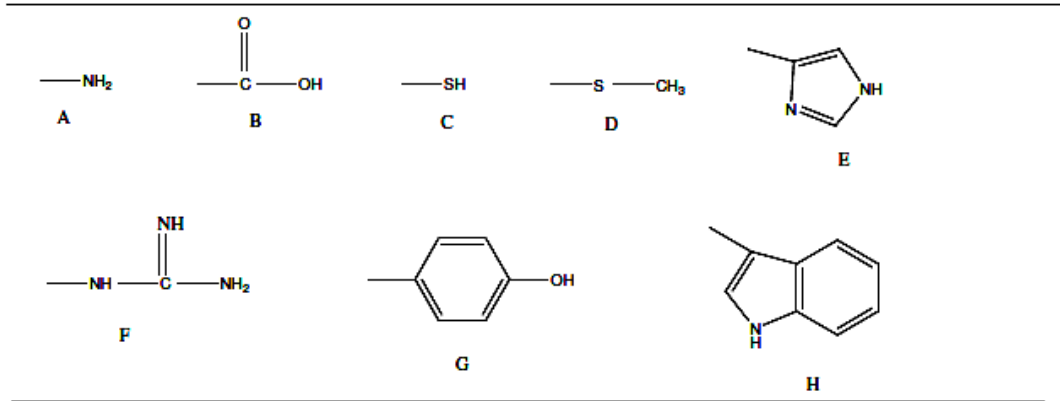
Enzimler doğrudan transdusere veya önceden uygun bir film veya tabaka ile kaplanmış transdusere kovalent olarak bağlanabilirler. Enzimler aktive edilmiş transduser yüzeylerine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanarak immobilize edilen enzim preparatı transduser yüzeyinde bir film veya tabaka oluşturularak da biyosensör hazırlanabilir. Enzimlerin kovalent bağlanmasında kullanılabilecek taşıyıcıların içermesi gereken reaktif gruplar ve bunların enzimdeki hangi aminoasitlerle etkileşime girdikleri Çizelge 3.3' te verilmiştir.

Çizelge 3.3 Enzim immobilizasyonunda kullanılan maddelerde (taşıyıcı) bulunan reaktif gruplar ve reaksiyona girdikleri amino asitlerin fonksiyonel grupları

Taşıyıcının reaktif grubu	Enzimdeki fonksiyonel grup ve ilgili amino asit
 Diazonyum tuzu	— NH₂ (Lys, N-Terminal) — SH(Cys)  — OH (Tyr)
— R — NCS izotiyosiyanat  Asit anhidrit	— NH₂ (Lys, N-Terminal) — NH₂ (Lys, N-Terminal)
CH₂CON₃ Açıl azid	— NH₂ (Lys, N-Terminal) — SH(Cys)  — OH (Tyr)
 imidokarbonat	— NH₂ (Lys, N-Terminal)
 izosiyanat	— NH₂ (Lys, N-Terminal)
— CH₂COCl Açıl klorür	— NH₂ (Lys, N-Terminal)

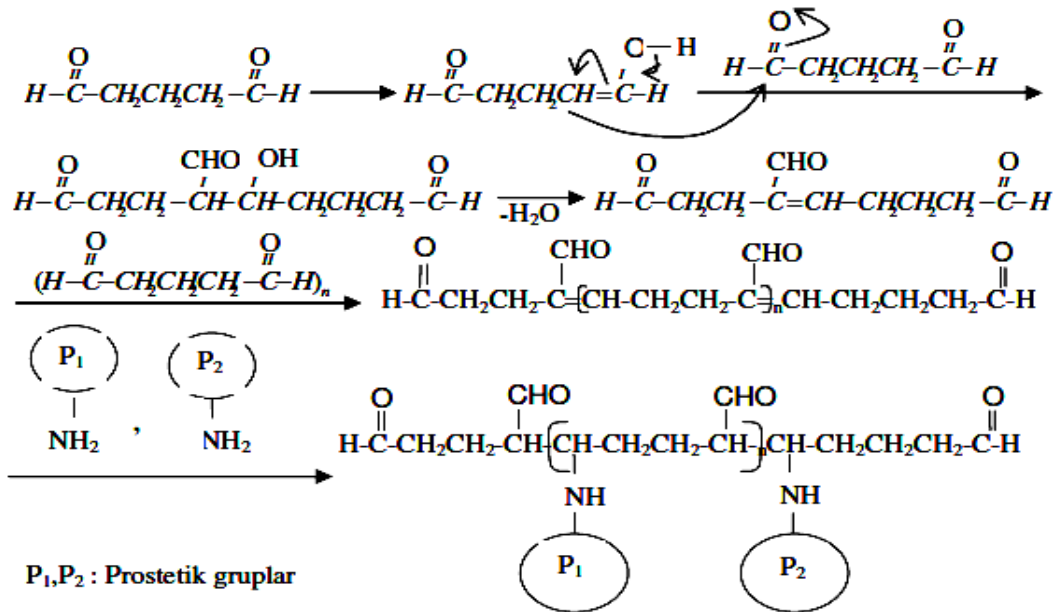
Enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için esansiyel olan aminoasitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların bağlanma sırasında sterik olarak rahatsız edilmemesidir. Çizelge 3.4'te görüldüğü gibi kovalent bağlanma enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir.

Çizelge 3.4 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.

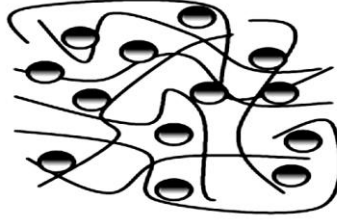
Enzim immobilizasyonu çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) yapılmalıdır [50].



Şekil 3. 7 Enzim molekülünün glutaraldehid ile çapraz bağlanması

3.1.10.2 Tutuklama

Enzimler makromoleküler yapılı proteinler olup polimer jel matrislerde Şekil 3.8'deki gibi tutuklanabilirler Bu yöntem enzimler yanında organeller, hücreler ve antikolar için de uygulanabilir. Updike ve Hicks, tarafından hazırlanan, ilk enzim elektrotunda glukoz oksidaz (GOD) poliakrilamid jelinde tutuklanmıştır [51].



Şekil 3. 8 Enzim molekülünün jel içinde veya polimer matrisde tutuklanması

Guilbault ve arkadaşlarının hazırladığı üreaz elektrotunda ise üreaz süspansiyonu elektrot yüzeyinde diyaliz membranı tarafından sarılarak tutuklanmıştır [49], [52], [53], [54]. Çözeltide enzim aktivitesi hızla düştüğünden fiziksel tutuklama yerine kimyasal kovalent bağlama tercih edilir. Tutuklama için en yaygın kullanılan film veya matrisler nisasta, poliakrilamid, silikon lastiği, polivinil klorür ve polivinil alkoldür.

3.1.10.3 Adsorpsiyon

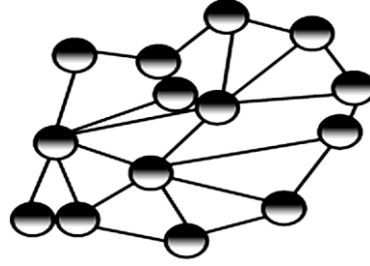
İmmobilizasyonda kullanılan en eski ve en basit yöntemlerdendir. Örneğin, glukoz oksidaz adsorplanmış polietilen membranı ilk olarak 1962 yılında glukoz biyosensörü için önerilmiştir [55]. Genelde, enzim veya biyoreseptör çözeltisine yüzeyi membran veya film ile kaplanmış transduser daldırılır ve belirli 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 [49]. Şekil 3.9'da enzim molekülünün elektrot yüzeyine adsorpsiyonu görülmektedir.



Şekil 3. 9 Enzim molekülünün elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu

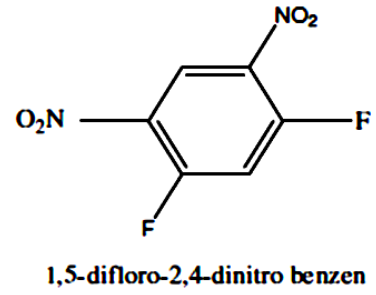
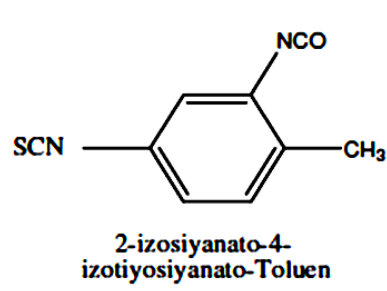
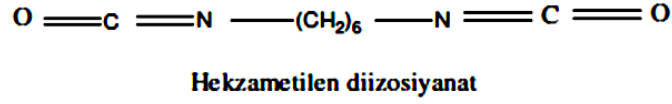
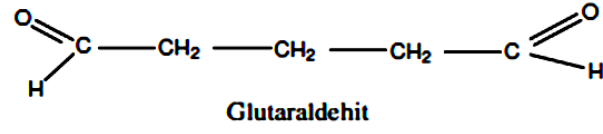
3.1.10.4 Çapraz Bağlama

Bu yöntem biyosensör hazırlanmasında daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin birleştirilmesi şeklinde uygulanır. Şekil 3.10'da enzim molekülünün film veya tabakaya çapraz bağlanması görülmektedir.



Şekil 3.10 Enzim molekülünün film veya tabakaya çapraz bağlanması

Çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehid, heksametilen diizosiyanat, diflorodinitro benzen, bismaleimido hekzan, disüksinil suberat sık kullanılan reaktiflerdir. Bazı çapraz bağlayıcı reaktiflerin formülleri Şekil 3.11'de verilmiştir. Glutaraldehit en sık kullanılan bifonksiyonel reaktiftir. Ortamdaki konsantrasyonu %2-5 (w/w) olmalıdır [56].



Şekil 3. 11 Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri

3.1.11 Enzim Sensörlerinin Sınıflandırılması

Enzim sensörlerinin sınıflandırılması genel olarak, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sinyalin belirlenme ilkesine göre yapılmaktadır. Bu çerçevede Çizelge 3.5’de söz konusu sınıflandırma özetlenmektedir [49].

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

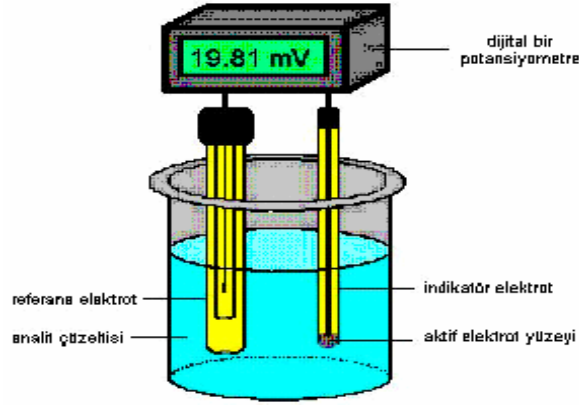
- Absorpsiyon esaslı optik enzim sensörleri
- Flouresans esaslı optik enzim sensörleri
- Biyoluminesans esaslı optik enzim sensörleri

3.Piezoelektrik esaslı enzim sensörleri

4.Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri

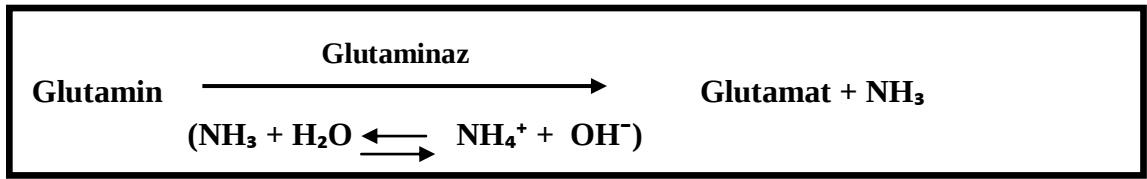
3.1.11.1 Potansiyometrik Esaslı Enzim Sensörleri

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 bazılarını 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 3.12’de potansiyometrik bir ölçüm sistemi şematik olarak görülmektedir.

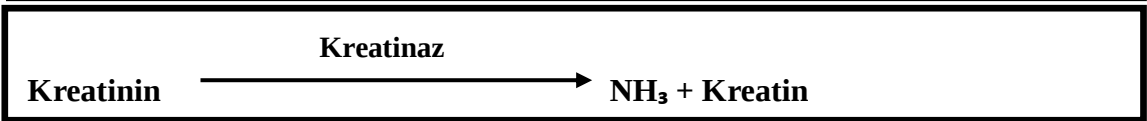
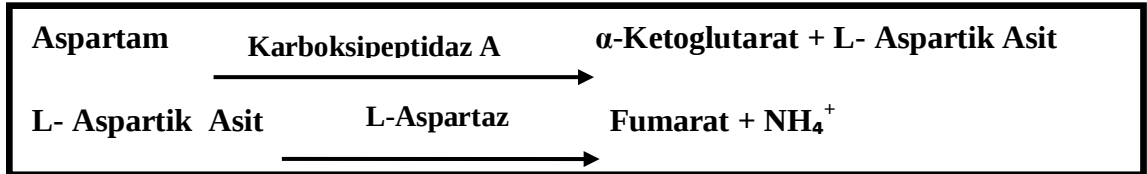


Şekil 3. 12 Potansiyometrik ölçüm sisteminin sematik olarak gösterimi

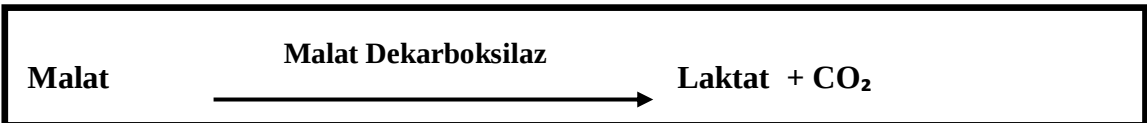
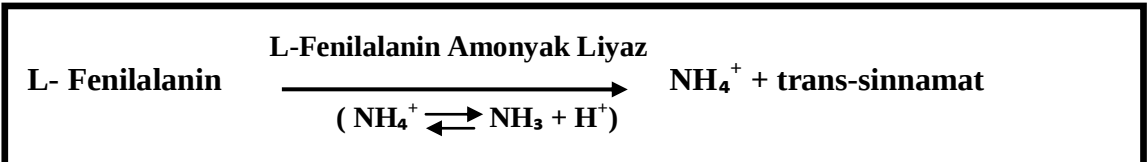
İçte ve dışta bulunan çözeltilerde analizi yapılacak türün derişimi açısından bir fark varsa membranın iç yüzeyi ve dış yüzeyi arasında bir gerilim farkı oluşur. Bu gerilim farkının değeri analizi yapılan türe ve derişimine bağılı olduğu gibi, membranın cinsine ve çözeltilerde bulunan öteki bileşenlerin tür ve miktarlarına da bağılıdır. İyon seçici elektrotlar olarak adlandırılan bu elektrotların en çok bilineni, H^+ iyonlarına karşı seçicilik gösteren ve ince bir cam zarın membran olarak kullanıldığı cam elektrottur. Bir iyon seçici elektrotla ölçülen gerilim değeri, elektrodun seçicilik 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 [47].



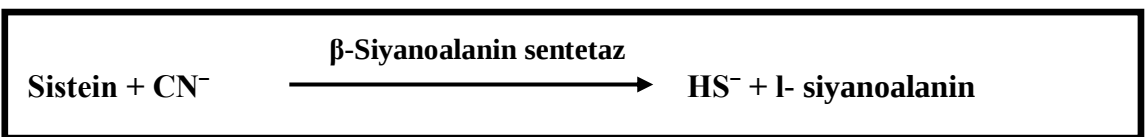
Amonyum Duyar Sensör



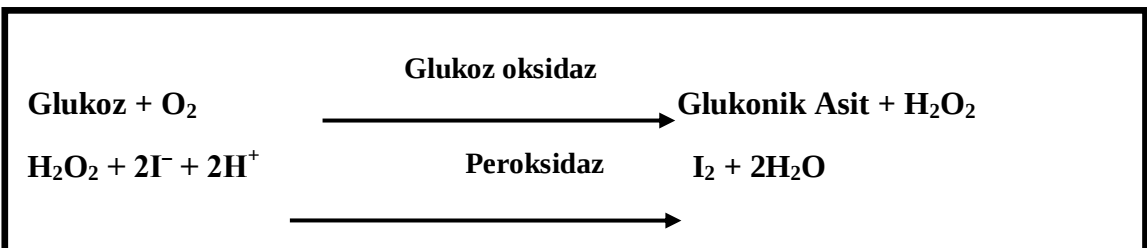
Amonyok Duyar Sensör



Karbondioksit Sensörü

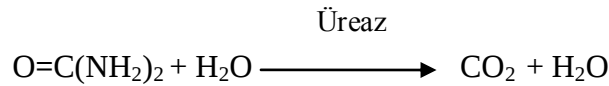


Siyanür Sensörü



İyon Duyar Elektrot

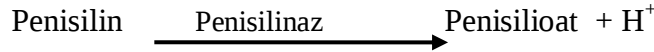
pH Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotları: Proton konsantrasyonundaki değişmeyi belirlemek amacıyla tasarlanan bu tür enzim elektrotlarında temel sensör olarak en yaygın bir şekilde klasik cam elektrotları kullanılır [52]. Bunların yanısıra antimon elektrotunda olduğu gibi H^+ iyonlarına duyar bazı metalik elektrotlarında kullanılması mümkündür. Temel ilke proton konsantrasyonundaki küçük farkların belirlenmesidir. Potansiyometrik enzim sensörlerine verilebilecek en klasik örnek üre tayinine yönelik sensördür.



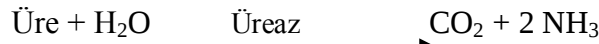
pH Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotlarının Bazı Uygulamaları

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

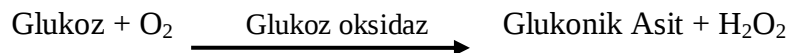
1) Penisilin Tayini [52]



2) Üre Tayini [52]



3) Glukoz Tayini [57], [58]



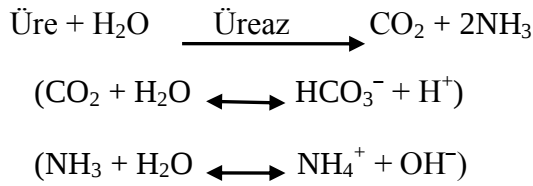
Amonyum Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotları: Amonyum iyonlarına duyar temel sensör ile enzimin birleştirilmesiyle hazırlanan bu elektrotlar genelde H^+ , K^+ ve Na^+ gibi tek yüklü katyonlara da duyarlık gösterdikleri için ölçüm ortamlarında benzer

maddelerin bulunması durumunda girişim problemleri ortaya çıkmaktadır. Girişim etkilerini azaltmak için değişik yöntemler kullanılmaktadır [5].

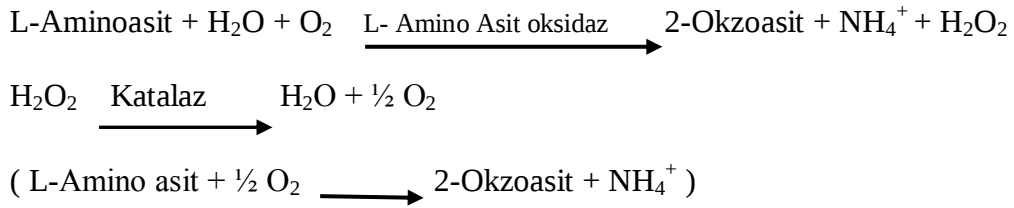
Amonyum Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotlarının Bazı Uygulamaları

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

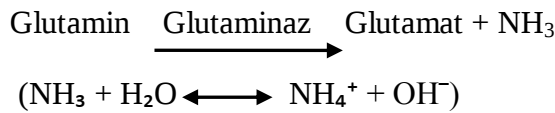
1) Üre Tayini



2) L-Amino Asit Tayini



3) Glutamin Tayini



3.1.12 Enzim Elektrotlarında Performans Faktörleri

Hazırlanan biyosensörün hedeflenen amaçlar çerçevesinde kullanılır olup olmadığına, ancak performans faktörlerinin ayrıntılı bir şekilde belirlenmesinden sonra karar verilebilir (Telefoncu [59]).

3.1.12.1 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 (Telefoncu [59]).

3.1.12.2 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 sağlar. 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 (Telefoncu [59]).

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 olabileceği, kofaktör veya aracı içeren sistemlerde bunların kaybının aktivite düşüşüne yol açacağı unutulmamalıdır.

3.1.12.3 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 yanısıra biyosensör cevabını etkileyen parametreler doğrudan sensör kalibrasyonunu da etkiler. Örnek olarak enzim sensörlerinde başlıca pH, sıcaklık ve bozucu türlerin sensör cevabını etkileyerek tayin aralığını değiştirebileceği görülür (Telefoncu [59]).

3.1.12.4 Cevap Süresi

Cevap zamanı biyosensörün analizlenecek maddenin bulunduğu ortama temas ettiği andan sinyalin kararlı hale geldiği ana kadar geçen süredir. Çok sayıda numunenin söz konusu olduğu analizlerde en kısa sürede elde edilen sonuç büyük önem taşıdığından biyosensörün cevap süresinin kısa olması istenir (Telefoncu [59]).

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;

1. Etkili karıştırma (veya akış hızının artırılması),
2. Membran yüzeyinden kirliliklerin uzaklaştırılması veya çok küçük membran yüzeyli mikro-elektrotlar kullanılması,
3. 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;

- | | |
|---------------------------------|---|
| 1. İyon ekstraksiyon kapasitesi | 2. Difüzyona karşı direnç |
| 3. Membran kalınlığı | 4. Membrandaki çözücünün polaritesi de cevap zamanını etkileyen faktörlerdir. |

3.1.12.5 Seçicilik

İdeal bir biyosensörün sadece hedef analitin derişimindeki değişikliklere cevap vermesi ve diğer türlerin varlığından etkilenmemesi gerekir (Telefoncu [59]). 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 iyonla duyarlı 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 [14].

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

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 iyonla duyarlılığı 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.

3.1.12.6 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 (Telefoncu [59]).

3.1.12.7 Sıcaklık

Enzim katalizli reaksiyonların hızları sıcaklığa çok duyarlıdır. Enzimin optimum sıcaklığından uzaklaşılması durumunda özellikle termal kararlılığı düşük olan

enzimlerin tersinmez denatürasyonuna neden olarak sensör cevabını olumsuz yönde etkiler.

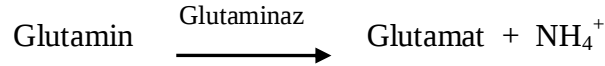
3.1.12.8 Tıbbi Uygulamalarda Kullanılacak Biyosensörler İçin Biyouyumluluk

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

3.2 Glutamin Tayininde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış

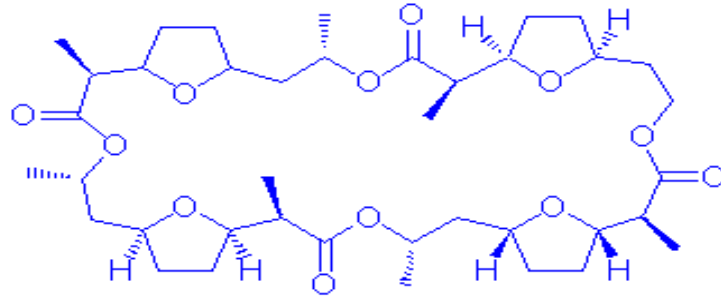
3.2.1 Glutaminaz

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



3.2.2 Nonaktin

Günümüzde valinosimin ve makrotetrolit grubu antibiyotikler sırasıyla K^+ ve NH_4^+ katyonları için en uygun kompleksleştirici ligandlardır. Bu antibiyotikler düzenli sıralanmış oksijen atomu içeren boşluklu yapılardır. Kompleksleştirici molekül, çok dişli bir ligand olmalı ve içinde oyuk bulunduran kararlı bir yapıya sahip olabilmelidir. Oyuk, katyonu içine almaya uygundur. Katyonlar için polar koordinasyon grupları, ligand atomu olarak tercihen oksijen içermelidir. Nonaktin; sodyum (Na^+) ve potasyum (K^+)'nın her ikisinin de bulunduğu bir ortamda sadece K^+ iyonlarını yakalayarak, hücre duvarlarından içeri sızdırır, bu esnada Na^+ iyonlarının geçişi mümkün olmamaktadır [60]. Nonaktin, NH_4^+ katyonu için en uygun liganddır, aktinomiset kültürlerinden elde edilir. Nonaktinin dört eter oksijeni amonyum iyonu ile hidrojen bağı oluştururken dört karbonil oksijeni katyonu dipol interaksyonu ile kararlı hale getirir. Son zamanlarda amonyum gibi katyonların mikromolar seviyede tayini için ticari iyon seçici elektrotlarda kullanılmaktadır. Böyle iyon-seçici sensörler, biyolojik örneklerde üre ve kreatin konsantrasyonlarının indirekt olarak ölçülmesine faydalıdır. Nonaktinin yapısı Şekil 3.13'de görülmektedir [60].



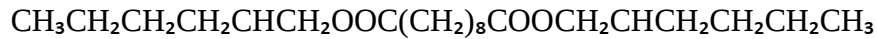
Şekil 3.13 Nonaktin'in yapısı

3.2.3 Palmitik asit

Palmitik asit IUPAC adlandırma sisteminde hekzadekanoik asit olarak adlandırılır. Bitki ve hayvanlarda bulunan en yaygın doymuş yağ asitidir. Molekül formülü $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ tür ve beyaz katı görünümündedir. Adından da anlaşılacağı gibi palmiye ağacının yağında ve palmiye çekirdeğinde bulunur. Ayrıca tereyağı, peynir, süt ve ette de bulunur. Palmitik asit türevleri II. Dünya Savaşı'nda napalm üretiminde kullanılmıştır [61].

3.2.4 Dioktil Sebakat (DOS)

Dioktil sebakat (DOS) renksiz veya açık sarı renkte ve özel kokuya sahip yağimsı bir sıvıdır. Hidrokarbon, alkol, ester tipi, eter, benzen ve diğer organik çözücülerde çözünür. Az buharlaşan ve plastikleştirme hızı yüksek olan DOS; soğuğa ve ışığa karşı dayanıklılık gösterir. Genellikle PVC, kloroetilen kopolimeri, nitroselüloz ve sentetik kauçuk, gibi maddeler de plastikleştirici madde olarak kullanılır. Özellikle soğuğa karşı dirençli kabloların, cilt bezinin, ince film, şerit materyalleri vb. yapımında kullanılmaktadır. Yapısal formülü Şekil 3.14'de verilmiştir.



Şekil 3.14 Dioktil Sebakat'ın yapısı

3.2.5 Glutaraldehit

Glutaraldehit, özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan biyofonksiyonel bir reaktiftir. Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan biyoaktif materyallerin (enzim, hücre, doku, vb), jelatin, kollajen, kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehit ile çapraz bağ oluşturmaya esasına dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça sık kullanılmaktadır. Yöntem kolay uygulanabilir

olmasının yanında immobilize sistemin termal, operasyonel ve depo kararlılığını arttırması bakımından tercih edilmektedir (Akyılmaz [62]).

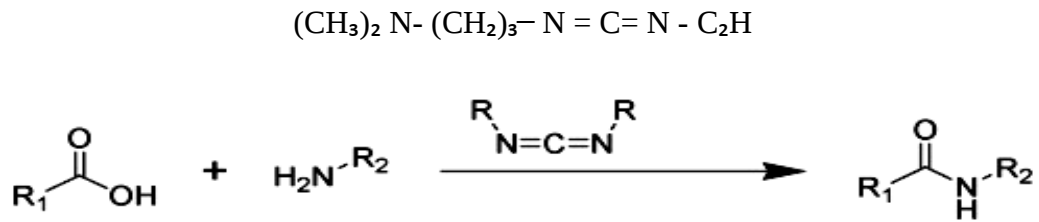
3.2.6 Poli(vinilklorür) (PVC)

Oldukça geniş kullanımı olan bir plastiktir. Kimyasal endüstrisinde en değerli ürünlerden biridir. PVC; amorf plastiklerin başında gelir, beyaz veya açık sarı renkli toz polimerdir. Son yıllarda, PVC geleneksel yapı malzemeleri olan ahşap, beton ve kilin birçok alanda yerini almıştır. İyonoforlar ile birlikte poli(vinilklorür) (PVC) nin kullanımı biyosensörlerin cevap sürelerinin daha kısa olması, tekrarlanabilir, liğinin iyi olması ve tasarımının kolay olması gibi avantajlar sağlamaktadır (Butt and Cammann 1992 [63]), (Saurina vd [64]).

Genellikle enzimler PVC iyon-seçici membranlara glutaraldehit çapraz bağlama reaksiyonları ile immobilize edilirler (Butt and Cammann [63]), (Bilitewski vd [65]). Fakat PVC membranın hidrofobik yüzeyine enzimin immobilize edilmesi zordur. PVC membranda fonksiyonlu gruplar oluşturarak daha etkili enzim immobilizasyonu gerçekleştirilebilir.

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

1- etil – 3- (3 – dimetilaminopropil) karbodiimid, çalışmada poli(vinilklorür) membranı aktifleştirmek amacı ile kullanılmıştır.



Şekil 3.15 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC)’in formülü ve yapısı

BÖLÜM 4

MATERYAL VE METOD

4.1 Kullanılan Cihazlar

Çözeltilerin potansiyel ölçümleri ORION 4Star 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.

4.2 Kullanılan Numuneler

4.2.1 GNC L-Glutamin Kapsülü

GNC Live Well firmasından satın alınmıştır.

4.2.2 Serum Numunesi

Yıldız Teknik Üniversitesi Sağlık Merkezi'nden temin edilmiştir.

4.2.3 Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) Numuneleri

Glutamin tayininde kullanılan BOS numuneleri İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Biyokimya Laboratuvarı'ndan temin edilmistir.

4.3 Kullanılan Enzimler

Çalışmada kullanılan glutaminaz enziminin numarası, elde edildiği kaynak ve temin edildiği firma Çizelge 4.1’de verildi.

Çizelge 4.1 Kullanılan enzimlerin adları, numaraları, kaynakları ve temin edildikleri firmalar

Enzimin Adı	Numarası	Kaynağı	Firması
Glutaminaz (10 U/mg)	E.C. 3.5.1.2	E. coli	Sigma

4.4 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan glutaraldehit, palmitik asit, 1-etil-3,3-dimetilaminopropil karbodiimid (EDC), Trizma Bazı, Trizma HCl, glutamin ve amonyum klorür Sigma’dan; nonaktin, bis-(2-etil) hekzil sebakat (DOS), poli(vinil klorür) (PVC) Fluka’dan, tetrahidrofuran (THF) Merck’den temin edildi ve saflaştırılmadan kullanıldı. Kullanılan amino asitler ise, L-Alanin Fluka’dan, L-Arjinin, L-Valin, L-Askorbik Asit, L-Lizin monohidrat, L-Histidin, L-Metiyonin, L-Serin, L-Glisin ve L-Sistein Sigma’dan temin edildi.

4.5 Kullanılan Çözeltiler

4.5.1 TRIS tampon çözeltisi

Trizma bazı çözeltisi: Hassas terazide tartılan 6,055 g Trizma bazı suda çözülerek hacmi 500mL’ye tamamlanarak 0,1 M’lık stok çözelti hazırlandı.

Trizma-HCl çözeltisi: Hassas terazide tartılan 7,88 g Trizma –HCl suda çözülerek hacmi 500mL’ye tamamlanarak 0,1 M’lık stok çözelti hazırlandı.

Hazırlanan stok çözeltilerden belli oranlarda karıştırılarak pH 7,4’e ayarlandı. Tampon çözeltiler kullanılmadıkları zaman buzdolabında saklandı.

4.5.2 Amonyum Klorür Çözeltileri

Stok amonyum klorür çözeltileri: 1,0M standart amonyum klorür çözeltileri kullanılarak $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M konsantrasyon aralığında bir seri stok amonyum klorür çözeltileri hazırlandı.

Amonyum klorür kalibrasyon çözeltileri: Kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi için kullanılan amonyum klorür çözeltileri Çizelge 4.2’de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 4.2 Amonyum klorür kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Hazırlanan Amonyum klorür çözeltileri (M)	İlave edilen stok amonyum klorür çözeltileri (M) (mL)							0,1M TRIS Tamponu (mL)
	1,0	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6}$	
$1,0 \times 10^{-1}$	2,50							2,50
$5,0 \times 10^{-2}$	1,25							2,50
$2,5 \times 10^{-2}$	0,625							2,50
$1,0 \times 10^{-2}$		2,50						2,50
$5,0 \times 10^{-3}$		1,25						2,50
$2,5 \times 10^{-3}$		0,625						2,50
$1,0 \times 10^{-3}$			2,50					2,50
$5,0 \times 10^{-4}$			1,25					2,50
$2,5 \times 10^{-4}$			0,625					2,50
$1,0 \times 10^{-4}$				2,50				2,50
$5,0 \times 10^{-5}$				1,25				2,50
$2,5 \times 10^{-5}$				0,625				2,50
$1,0 \times 10^{-5}$					2,50			2,50
$5,0 \times 10^{-6}$					1,25			2,50
$2,5 \times 10^{-6}$					0,625			2,50
$1,0 \times 10^{-6}$						2,50		2,50
$5,0 \times 10^{-7}$						1,25		2,50
$2,5 \times 10^{-7}$						0,625		2,50
$1,0 \times 10^{-7}$							2,50	2,50
pH'lar 8,5'e ayarlandıktan sonra her bir çözeltinin hacmi bidestile su ile 25,00 mL'ye tamamlandı.								

4.5.3 Glutamin Çözeltileri

3,6537 g glutamin bidestile suda çözülüp hacmi 25 mL'ye tamamlanarak 1,0 M'lık çözeltisi hazırlandıktan sonra gerekli seyreltmeler yapılarak $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında stok glutamin çözeltileri hazırlandı.

Glutamin tayini için kalibrasyon çözeltileri: Kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi için kullanılan L-glutamin çözeltileri Çizelge 4.3'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 4.3 Glutamin kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Hazırlanan L- Glutamin Çözeltileri (M)	<i>İlave edilen stok L-glutamin çözeltileri (M) (mL)</i>						0,1M TRIS Tamponu (mL)
	1,0	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5}$	
$1,0 \times 10^{-1}$	2,5						
$5,0 \times 10^{-2}$	1,25						
$2,5 \times 10^{-2}$	0,625						
$1,0 \times 10^{-2}$		2,5					
$5,0 \times 10^{-3}$		1,25					
$2,5 \times 10^{-3}$		0,625					
$1,0 \times 10^{-3}$			2,5				
$5,0 \times 10^{-4}$			1,25				
$2,5 \times 10^{-4}$			0,625				
$1,0 \times 10^{-4}$				2,5			
$5,0 \times 10^{-5}$				1,25			
$2,5 \times 10^{-5}$				0,625			
$1,0 \times 10^{-5}$					2,5		
$5,0 \times 10^{-6}$					1,25		
$2,5 \times 10^{-6}$					0,625		
$1,0 \times 10^{-6}$						2,5	
pH'lar 7,4'e ayarlandıktan sonra her bir çözeltinin hacmi bidestile su ile 25,00 mL'ye tamamlandı.							

4.5.4 Çalışma Elektrodu İç Dolgu Çözeltisi

Amonyum, glutamin tayini için hazırlanan çalışma elektrotlarında iç dolgu çözeltisi olarak Çizelge 4.2’de belirtildiği gibi hazırlanan $1,0 \times 10^{-2} \text{M}$ amonyum klorür (pH 7,0) çözeltisi kullanıldı.

4.5.5 GNC L-Glutamin Kapsülünde Glutaminin Tayini İçin (Standart Katma Yönteminde) Kullanılan Çözeltiler

Standart katma yöntemiyle glutamin biyosensörü yardımıyla L-glutamin tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması Çizelge 4.4’de verildi

Çizelge 4.4 Glutamin çözeltilerinin hazırlanması

	Çözelti No						
	1	2	3	4	5	6	7
İlave edilen 10^{-3}M L-glutamin çözeltisi (mL)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
0,01M TRIS tamponu (pH 7,4) (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
GNC L-glutamin kapsül (μL)	100	100	100	100	100	100	100
	Saf su ilave edilerek çözeltiler belirlenen optimum pH’a ayarlanarak çözelti hacmi 25,0 mL’ye tamamlandı.						

4.5.6 Serumda Glutamin Tayini İçin (Standart Katma Yönteminde) Kullanılan Çözeltiler

Standart katma yöntemiyle glutamin biyosensörü yardımıyla L-glutamin tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması Çizelge 4.5’de verildi.

Çizelge 4.5 Glutamin çözeltilerinin hazırlanması

	Çözelti No				
	1	2	3	4	5
İlave edilen 5×10^{-4} M L-glutamin çözeltisi (mL)	0	0,1	0,2	0,4	0,6
0,01 M TRIS tamponu (pH 7,4) (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Serum (μ L)	175	175	175	175	175
	Saf su ilave edilerek çözeltiler belirlenen optimum pH'a ayarlanarak çözelti hacmi 25,0 mL'ye tamamlandı.				

4.5.7 Beyin Omurilik sıvısı (BOS)'ta Glutamin Tayini için (Standart Katma Yönteminde) Kullanılan Çözeltiler

Standart katma yöntemiyle glutamin biyosensörü yardımıyla L-glutamin tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması Çizelge 4.6'de verildi.

Çizelge 4.6 Glutamin çözeltilerinin hazırlanması

	Çözelti No.				
	1	2	3	4	5
İlave edilen 10^{-4} M L-glutamin çözeltisi (mL)	0	0,1	0,2	0,4	0,6
0,01 M TRIS tamponu (pH 7,4) (mL)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
BOS-1 ve BOS-2 numuneleri (μ L)	100	100	100	100	100
	Saf su ilave edilerek çözeltiler belirlenen optimum pH'a ayarlanarak çözelti hacmi 25,0 mL'ye tamamlandı.				

4.6 Amonyum – Seçici Elektrotlar

4.6.1 Amonyum – Seçici Elektrotların Hazırlanışı

Palmitik asit içeren PVC kullanılarak hazırlanan amonyum-seçici membranın bileşimi Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7 PVC ve palmitik asit kullanılarak hazırlanan amonyum-seçici membranların bileşimi

Membran bileşenleri	Membran	
	%	Kütle, mg
PVC	30,0	118,0
Palmitik asit	3,0	13,6
Nonaktin	3,0	12,6
Bis-(2-etil)hekzil sebakat (DOS)	64,0	255,8
Tetrahidrofur (THF)	5mL	

Membranı hazırlamak için, herbiri ayrı ayrı hassas terazide tartılmış olan, toplam 400 mg civarındaki membran bileşenleri 5 mL THF’de çözüldü ve 45 mm’lik cam halkaya dökülüp 24 saat THF’nin uzaklaşması için bekletildi. Oluşan membrandan 5mm çapında yuvarlak diskler kesilerek cam bir tüpün ucuna monte edildi. Bu tüpün içerisine iç dolgu çözeltisi olarak $1,0 \times 10^{-2} \text{M}$ NH_4Cl (pH 7,0) çözeltisi dolduruldu ve içine AgCl ile kaplanmış gümüş tel daldırılarak amonyum-seçici elektrotlar hazırlandı.

Çift temaslı gümüş-gümüş klorür referans elektrot kullanılarak oluşturulan elektrokimyasal hücrenin şeması şöyledir:

Referans elektrot / deney çözeltisi / membran / $1,0 \times 10^{-2} \text{M}$ NH_4Cl (pH 7,0) / Ag;AgCl

Elektrotlar deney çözeltisine 1,5 cm kadar daldırıldı ve çözelti manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve kararlı potansiyel değerleri elde edildikten sonra MV değerleri okundu. Tüm deneysel çalışmalar $25,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ ’de yapıldı.

4.7 Glutamin Biyosensörleri

4.7.1 Glutamin Biyosensörlerinin Hazırlanması

Bölüm 4.6.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan ve amonyuma duyarlılığı iyi olduğu belirlenen membran kullanılarak hazırlanan amonyum elektrodu membranlarına ticari glutaminaz enzimi kimyasal olarak immobilize edilmesi ile glutamin biyosensörleri hazırlandı. Bu amaçla 3 farklı immobilizasyon işlemi yapıldı:

İşlem A: 1000 µL suda çözülen 10U (0,31 mg) glutaminaz enziminden 200 µL alınarak, üzerine 1mg karbodiimid eklendi ve vorteks ile çözeltinin homojen olması sağlandı. Bu çözeltiden 20 µL alınarak membran yüzeyine kondu ve suyun uzaklaştırılması için bir gece buzdolabında bekletildi.

İşlem B: İşlem A’da hazırlanan elektrodun membranına % 2,5’luk glutaraldehit çözeltisinden 16µL uygulanarak 25 dakika bekletildi. Daha sonra elektrot yüzeyi bidestile su ile yıkanarak glutaraldehitin aşırısı uzaklaştırıldı.

İşlem C: İşlem B’de hazırlanan elektrodun membranına 20 µL glutaminaz çözeltisi (0,31 mg glutaminaz/mL deiyonize su) kondu ve bir gece buzdolabında bekletildi.

4.7.2 Glutamin Biyosensörünün Çalışma Aralıklarının ve Eğiminin Belirlenmesi

Üç farklı işlemle hazırlanan glutamin biyosensörünün analitik özelliklerini incelemek amacı ile, glutamin elektrodu ile aşağıda verilen elektrokimyasal hücre oluşturuldu ve sıcaklık $25,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ ’ta ayarlandı.

Referans elektrot / deney çözeltisi / membran / $1,0 \times 10^{-2} \text{ M NH}_4\text{Cl}$ (pH 7,0) / Ag;AgCl

Elektrokimyasal hücredeki glutamin çözeltilerinin konsantrasyonu $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ arasında değiştirildi. Glutamin çözeltilerinin pH’ları Trizma bazı ile optimum pH’a ayarlandı ve hazırlanan elektrotlar için ayrı ayrı hücre potansiyelleri kaydedildi. Her bir elektrot için $\log [\text{glutamin}]$ ’ e karşı potansiyel değerleri (mV) grafiğe geçirildi ve biyosensörlerin çalışma aralığı ve eğimleri belirlendi.

4.8 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.

4.9 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^{-1}M - 10^{-4}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

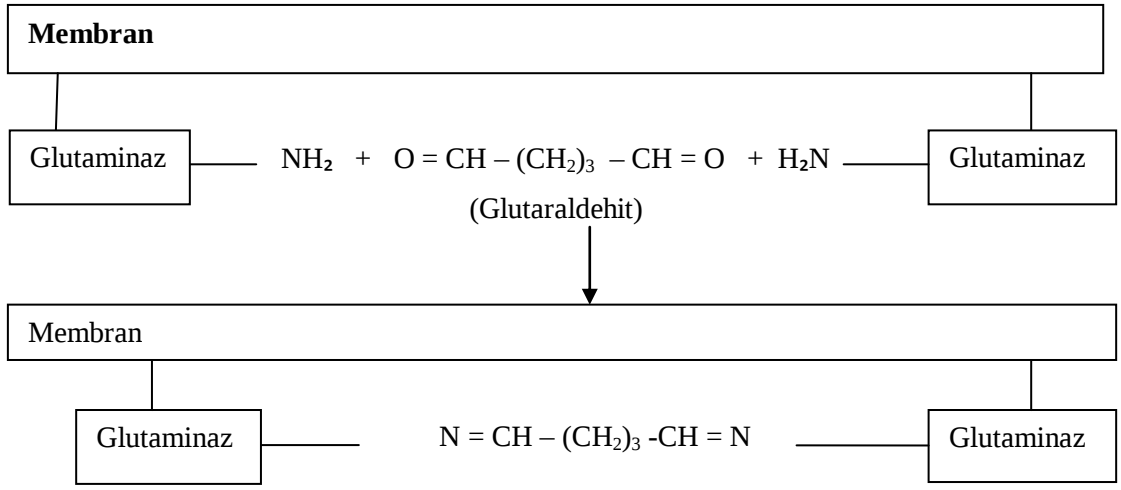
5.1 Glutamin Biyosensörü

Amonyum iyonu ölçümüne dayanan ve biyosensör yapımında kullanılabileceği düşünülen amonyum elektrodunun membranına Bölüm 4.6.1’de belirtildiği şekilde glutaminaz (*Escherichia coli*) immobilize edildi. İmmobilizasyon işlemlerinin herbiri Şekil 5.1 ve 5.2’de verilmiştir.

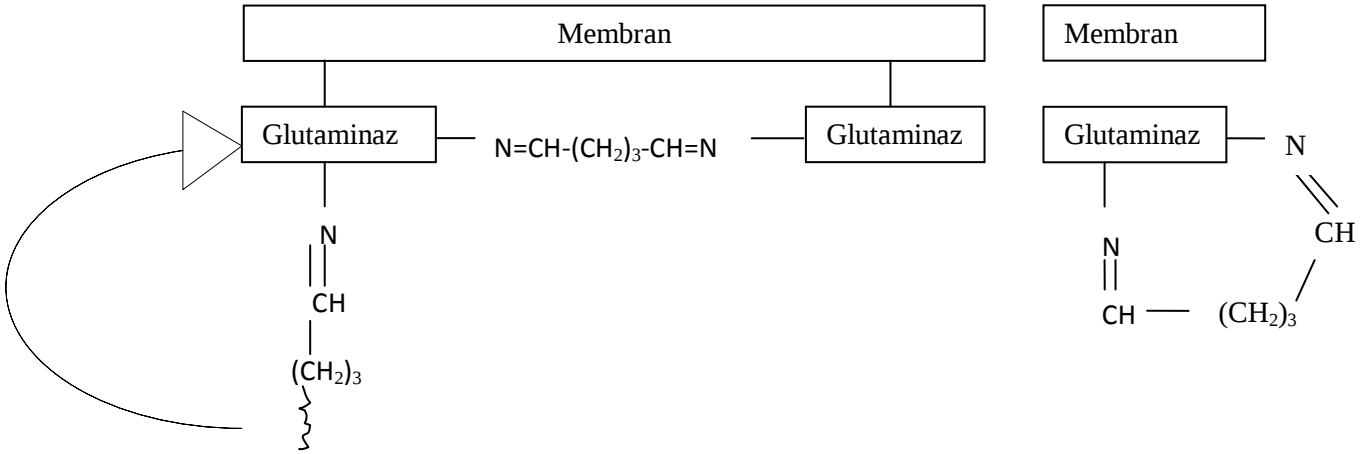
İşlem A’da palmitik asit içeren PVC membranı ile hazırlanan glutamin biyosensörünün EDC ile aktive edildikten sonra glutaminazın membran yüzeyine bağlanması Şekil 5.1’deki gibi sağlandı.

İşlem B’de İşlem A’da hazırlanan elektrodun membranına bağlı üreaz moleküllerinin glutaraldehit ile çapraz bağlanması sağlandı. Glutaraldehit, glutaminaz molekülündeki amino ($-NH_2$) grupları ile etkileşerek membrana bağlanmış olan glutaminaz enziminin daha sağlam bağlanması için molekül içi ve moleküler arası çapraz bağları Şekil 5.1’de de görüldüğü gibi oluşturdu.

(a)

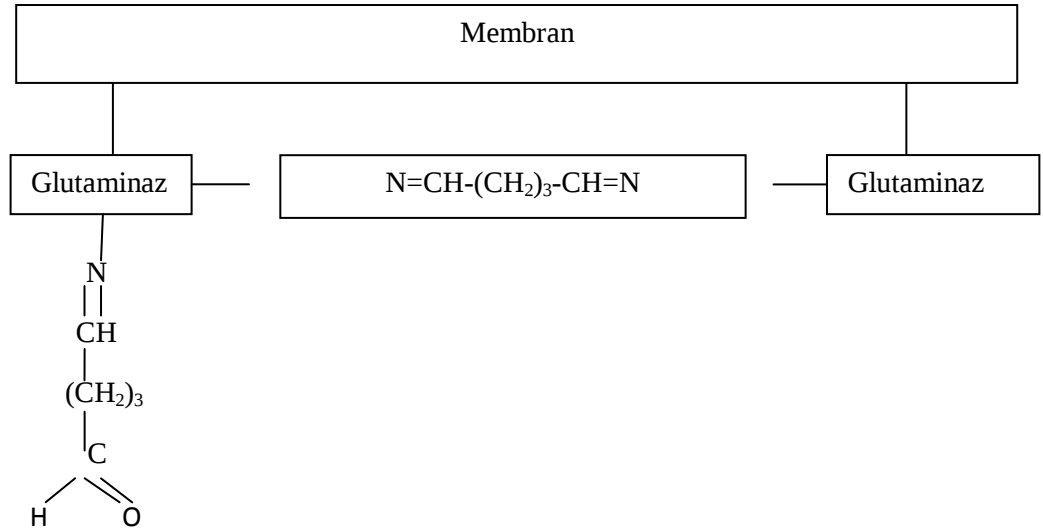


(b)



Şekil 5.1 Glutaminaz molekülünün glutaraldehit ile moleküler arası(a) ve molekül içi (b) çapraz bağ oluşturma

Membrana bağlı glutaminaz molekülünün glutaraldehit ile çapraz bağlanması ile glutaraldehitin bazı uçları Şekil 5.2'deki gibi serbest kalır İşlem C'de ikinci glutaminaz ilavesiyle glutaminaz molekülü, PVC membran üzerinde glutaraldehit ile yine molekül içi ve moleküler arası çapraz bağ yaparak (-CHO uçlarından Schiff bazı oluşturabilir) bir tabaka oluşturmaktadır.



Şekil 5.2 Membrana bağlı glutaminaz moleküllerinin glutaraldehit ile çapraz bağlanması ile glutaraldehitin bazı uçlarının serbest kalması

Bu çalışmada glutaraldehit kullanmamızın amacı, bağlanmış glutaminaz molekülleri arasında molekül içi ve moleküler arası çapraz bağ oluşturarak immobilize enzim tabakasını daha kararlı hale getirmek ve birinci glutaminaz tabakasını destek molekül tabakası olarak kullanarak ikinci glutaminaz tabakasını buna bağlamaktır.

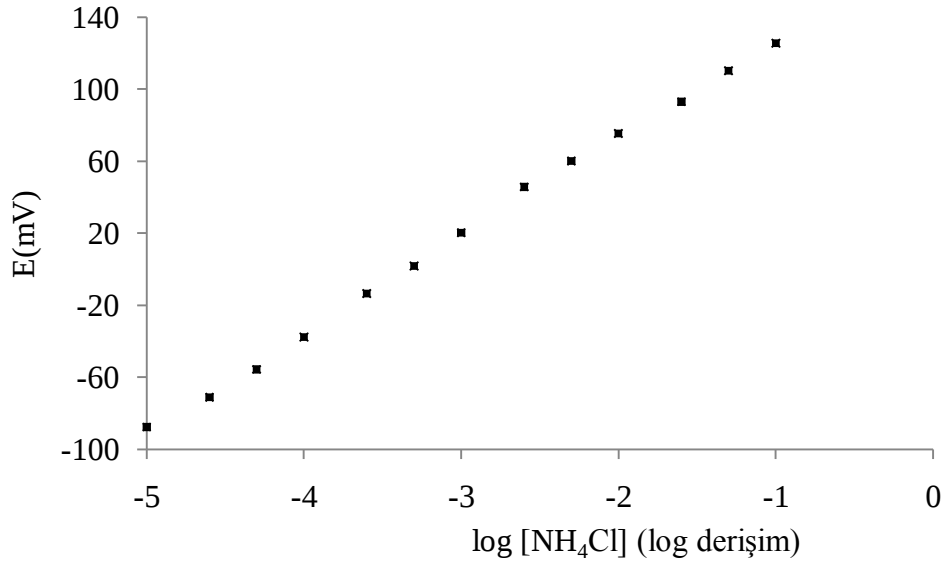
5.1.1 Glutamin biyosensörünün amonyuma cevabı

Hazırlanan glutamin biyosensörünün amonyuma duyarlı olup olmadığını anlamak için glutamin biyosensörü ile amonyum klorür çözeltisinin potansiyelleri okunarak kalibrasyon grafiği çizildi. Kalibrasyon grafiğinden amonyum iyonu için doğrusal çalışma aralığı ve eğim hesaplandı ve Çizelge 5.1’ de verildi.

Çizelge 5.1 $25,0 \pm 1,0$ °C ’da glutamin biyosensörünün amonyum elektrodu için doğrusal çalışma aralığı ve eğimi

Eğim ,(mV/p[glutamin])	Çalışma aralığı
54,62	$1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M

Çizelge 5.1’den de görüldüğü gibi, enzim immobilizasyonundan sonra da bu elektrotların amonyuma duyarlılığının iyi olduğu ve $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında amonyuma cevabının yine doğrusal olduğu bulundu. Bu nedenle, bu şekilde hazırlanan amonyum elektrotları glutamin tayininde kullanılabilir.



Şekil 5.3 Glutamin biyosensörünün amonyuma cevabı

5.1.2 Glutamin biyosensörünün kalibrasyon grafiğı

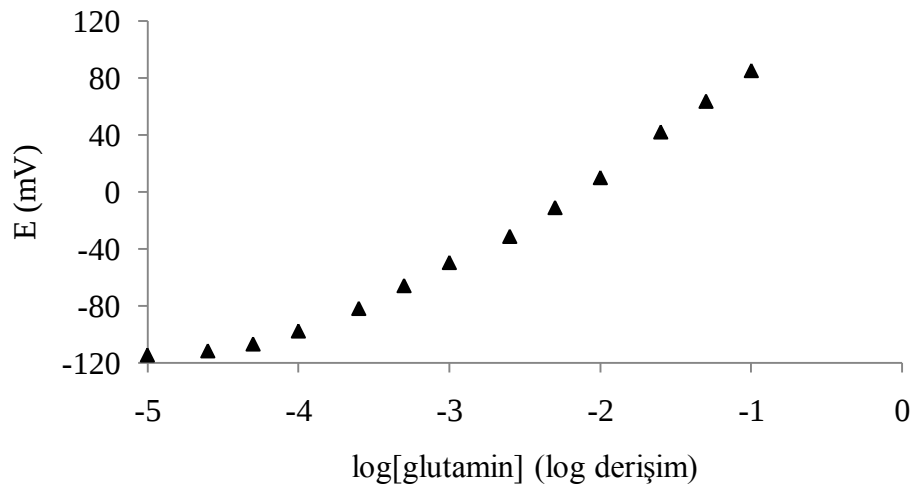
Hazırladığımız amonyum klorür çözeltilerinin ölçümleri sonucu çizilen kalibrasyon grafiğı ve bunun eğimiyle amonyuma duyarlılığının iyi olduğunu anladığımız glutamin biyosensörünün Şekil 5.4'te görüldüğü gibi glutamin çözeltilerinde kalibrasyon grafiğı de çizildi. Biyosensör için kalibrasyon grafiğınden çalışma aralığı ve eğim belirlendi. Çizelge 5.2'de glutamin biyosensörünün eğim ve çalışma aralığı görülmektedir.

Çizelge 5.2 25,0±1,0°C'da glutamin biyosensörünün eğimi ve çalışma aralıkları

Eğim ,(mV/p[glutamin])	Çalışma aralığı (M)
52,14	1,0x10 ⁻¹ - 1,0x10 ⁻⁵

Villarta ve arkadaşları (1992), glutamat oksidaz ve glutaminaz enzimlerini tekrar aktive edilmiş immobilon –AV affinite membran üzerine birlikte immobilize ederek geliştirdikleri amperometrik glutamin biyosensörünün çalışma aralığını 1x10⁻⁶ M- 7,5x10⁻⁴ M olarak tespit etmişlerdir [32]. Moser ve arkadaşları (1995), fotomodelli poli (2-hidroksi-etil metakrilat) (pHEMA) hidrojel membranı içinde glutaminaz ve glutamat oksidazın birlikte immobilize edilmesiyle hazırladıkları glutamin bienzim biyosensörünün çalışma aralığını 50µM – 10mM olarak belirlemişlerdir [33].

Bizim hazırladığımız PVC membran esaslı palmitik asit içeren potansiyometrik glutamin biyosensörünün çalışma aralığı ise $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ M olarak bulundu. Bunun sonucu olarak matriks materyali olarak palmitik asit kullanılarak hazırlanan PVC membrana glutaminazın immobilize edilmesi ile hazırlamış olduğumuz glutamin biyosensörünün fizyolojik sıvılarda glutaminin tayini için çok daha avantajlı olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 5.4 Glutamin biyosensörünün kalibrasyon grafiği

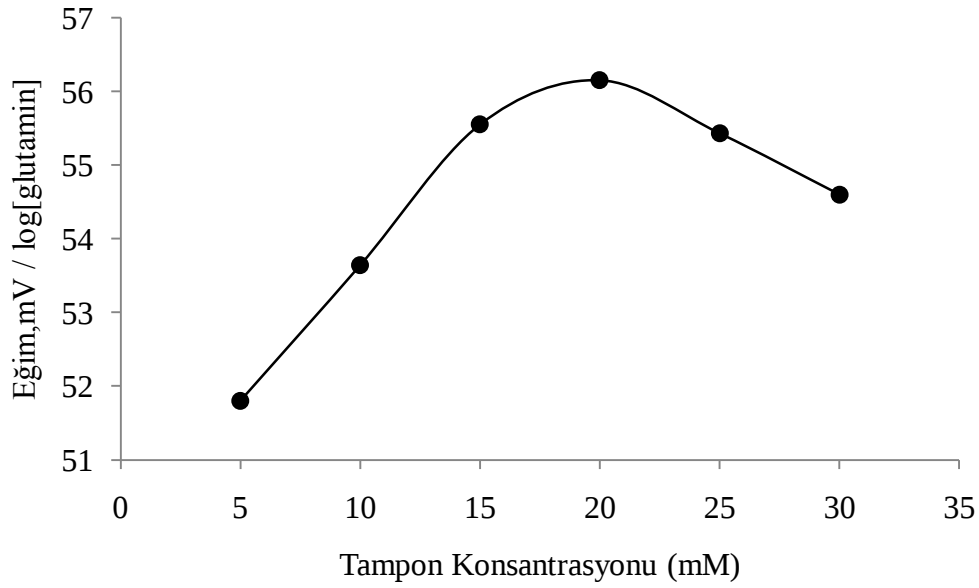
5.1.3 Tampon konsantrasyonunun etkisi

Glutamin biyosensörlerinin performansına tampon konsantrasyonunun etkisini incelemek için, 6 farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 mM) TRIS tamponu kullanılarak hazırlanan glutamin çözeltilerinde (pH 7,0) biyosensörle yapılan potansiyel ölçümleri yapılarak kalibrasyon grafikleri çizildikten sonra belirlenen biyosensör eğimleri Çizelge 5.3'de verildi. Ayrıca tampon konsantrasyonuna karşı eğim değerleri grafiği de Şekil'5.5de verildi.

Çizelge 5.3 25,0±1,0°C’da glutamin biyosensörünün cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi

Tampon Konsantrasyonu (mM)	Eğim, (mV/p[glutamin])±s
5	51,80 ± 0,0
10	53,64 ± 3,11
15	55,55 ± 0,37
20	56,15 ± 0,21
25	55,43 ± 1,31
30	55,24 ± 0,11

s:Standart sapma



Şekil 5.5 Glutamin biyosensörünün eğiminin tampon konsantrasyonu ile değişimi

Çizelge 5.3 ve Şekil 5.5’den de görüleceği gibi, glutamin biyosensörü için en yüksek eğimin elde edildiği optimum tampon konsantrasyonunun 20mM olduğu bulundu. 5mM’den daha düşük tampon konsantrasyonlarında, çözeltinin tamponlama kapasitesi düşük olduğundan çalışılmadı.

Moser ve arkadaşları (1995), hazırladıkları glutamin bienzim sensörü ile bütün ölçümleri 0,067M fosfat tamponunda yapmışlardır [33]. Diğer bir literatür çalışmasında ise; optimum pH çalışmalarını asetat ve fosfat tamponunda yapmışlar ve elektodun asetat tamponunda daha kararlı olduğunu fark etmişlerdir (Villarta vd [32]). Bu çalışmada ise fosfat tamponu denenmiş ancak iyi sonuç alınamamıştır, optimum tampon konsantrasyonu olarak da 20 mM elde edilmiş, tampon konsantrasyonu arttığında ise sonuçlarda azalma olduğu görülmüştür.

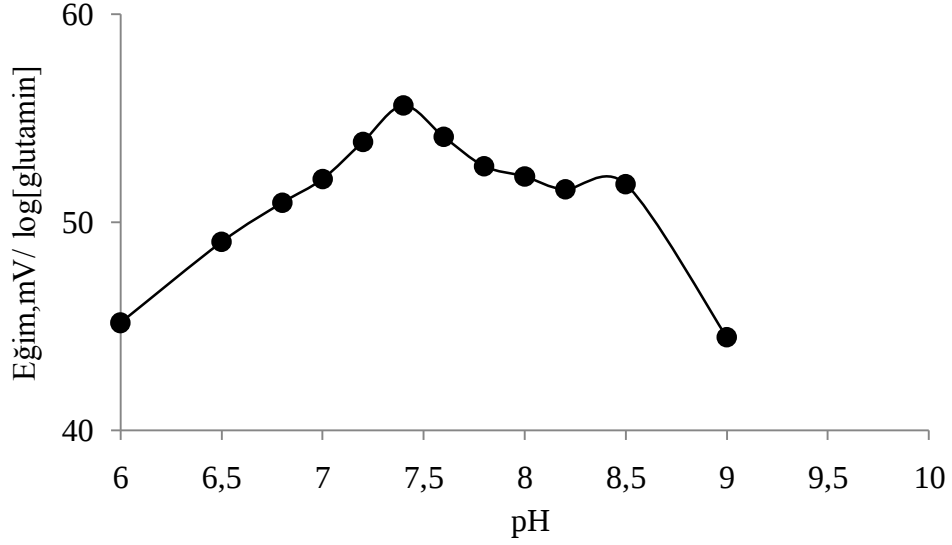
5.1.4 pH'nın etkisi

Glutamin biyosensörünün performansına pH'nın etkisini incelemek için 12 farklı pH'da (6,0; 6,5; 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8; 8,0; 8,2; 8,5 ve 9,0) ve optimum tampon konsantrasyonunda glutamin çözeltileri hazırlandıktan sonra kalibrasyon grafikleri çizilerek eğimleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 5.4'te toplu halde verildi.

Çizelge 5.4 25,0±1,0°C'da glutamin biyosensörünün cevabına pH'nın etkisi

pH	Eğim (mV/p[glutamin])±s
6,0	45,17 ± 2,84
6,5	49,05 ± 0,54
6,8	50,94 ± 0,66
7,0	52,08 ± 0,66
7,2	53,87 ± 1,49
7,4	55,61 ± 0,0
7,6	54,11 ± 0,25
7,8	52,7 ± 0,09
8,0	51,21 ± 1,35
8,2	51,58 ± 0,085
8,5	51,84 ± 0,66

s:Standart sapma



Şekil 5.6 Glutamin biyosensörünün eğiminin pH ile değişimi

Çizelge 5.4 ile Şekil 5.6’da görüldüğü gibi, pH 7,4’e kadar glutamin biyosensörünün eğiminin, dolayısı ile duyarlılığının, kademeli olarak arttığı ve pH 7,4’ten sonra pH 8,0’e kadar düştüğü, sonra tekrardan pH 8,5’a kadar daha az bir şekilde arttığı ve pH 9,0’da keskin bir şekilde azalış gösterdiği gözlemlendi. Dolayısıyla optimum çalışma pH’sı 7,4 olarak seçildi.

Wakayama ve arkadaşları (2005), glutaminaz enziminin pH 8,0’de daha kararlı olduğunu belirlemişler, Moser ve arkadaşları (1995) ise, nötral pH’sından dolayı glutaminazı seçmişler, ancak maksimum okumayı glutaminin izoelektrik noktası olan 5,7 de elde etmişlerdir [66], [33]. Villarta ve arkadaşları (1992), yaptıkları pH çalışmasında pH 3,5 ve 7,0 aralığında çalışmışlardır [32]. Glutamin sensör cevabının pH’a oldukça bağımlı olduğunu, pH 7,0 üzerinde ve 3,7 altında enzimin neredeyse inaktif olduğunu optimum pH’ın ise 5,5 olduğunu belirlemişlerdir. Bizim hazırladığımız glutamin biyosensörü ile, literatürde çalışılan pH aralıklarından çok daha geniş bir pH aralığında ölçümlerimizi alarak optimum pH değerini 7,4 olarak belirledik. pH 9,0’da bile sensörümüzle düşük de olsa cevap alabildik.

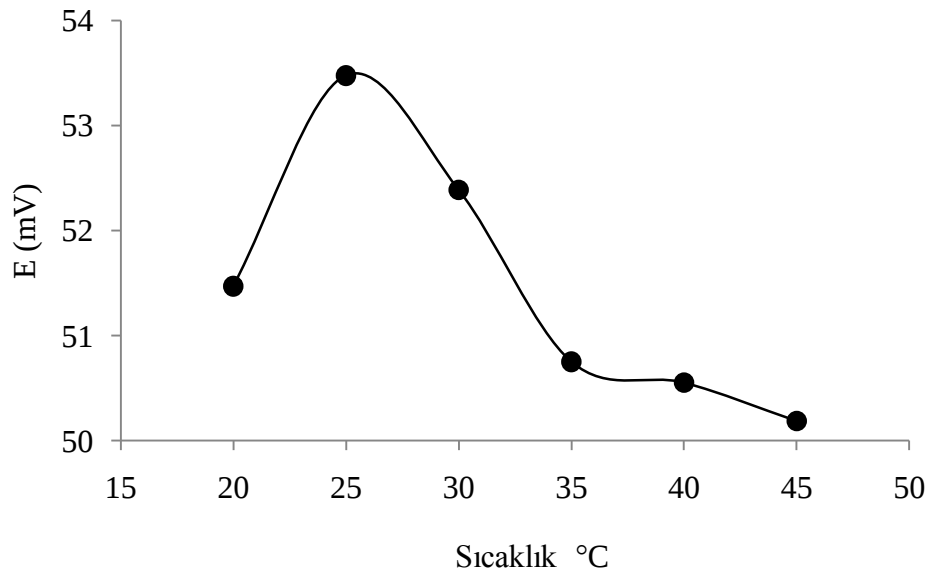
5.1.5 Sıcaklığın Etkisi

Glutamin biyosensörüne sıcaklığın etkisini incelemek için, 6 farklı sıcaklıkta (20, 25, 30, 35, 40 ve 45 °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 5.5'te verildi.

Çizelge 5.5 Glutamin biyosensörünün cevabına sıcaklığın etkisi

Sıcaklık(°C)	Eğim ,(mV/p[glutamin]±s
20	51,47 ± 1,67
25	53,47 ± 0,42
30	52,38 ± 0,25
35	50,75 ± 0,54
40	50,55 ± 0,61
45	50,18 ± 0,76

s:Standart sapma



Şekil 5.7 Glutamin biyosensörünün eğiminin sıcaklık ile değişimi

Çizelge 5.5 ve Şekil 5.7'den görüldüğü gibi, glutamin biyosensörü için 25°C'ye kadar eğimdeki artış, glutamin tayinlerinin oda sıcaklığında yapılabileceğini düşündürdü. 25°C'dan sonra eğimdeki düşüş, biyosensördeki immobilize edilmiş glutaminazın aktivitesinin düşmüş olduğunu göstermektedir. Şekil 5.7 ve Çizelge 5.5'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 (Villarta vd [32]), Moser vd [33]). Yoshimune ve arkadaşları (2006) da glutaminaz enziminin 37°C'den daha düşük sıcaklıklarda enzimatik reaksiyonunu gerçekleştirdiğini belirlemişlerdir [67].

5.1.6 Seçicilik Katsayılarının Hesaplanması

Biyolojik ortamlarda en çok bulunabilen Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} iyonlarının amonyum-seçici glutamin biyosensörünün cevabına etkisini belirlemek amacıyla, ayrı çözelti yöntemi ile her bir iyonun çözeltisinde potansiyel ölçümü yapılmış ve her bir iyon için seçicilik katsayıları tayin edilmiştir.

Çizelge 5.6 Glutamin biyosensörünün seçicilik katsayıları

İyon	Seçicilik katsayısı, KNH_4, x
Na^+	$1,2 \times 10^{-2}$
K^+	$1,4 \times 10^{-2}$
Ca^{2+}	$3,7 \times 10^{-2}$

Çizelge 5.6'da glutamin biyosensörü için her bir iyonun seçicilik katsayıları hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, glutamin biyosensörü üzerine Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} iyonlarının bozucu etkisinin az olduğunu göstermektedir. En fazla bozucu etkisi olan tür ise Ca^{2+} iyonudur.

5.1.7 Amino Asitlerin Girişim Etkisi

Glutamin biyosensörüne amino asitlerin girişim etkisinin belirlenmesi amacıyla, 11 farklı amino asitin ve glutaminin 10^{-2} M stok çözeltileri hazırlanmıştır. Glutamin ve amino asit konsantrasyonunun aynı konsantrasyonda olduğu çözeltilerde (10^{-3} M, pH 7,4) biyosensörümüzün optimum koşullarında mV ölçümleri yapılmıştır. Bu değerler, sadece glutamin çözeltisinde (10^{-3} M, pH 7,4) mV okuması yapılarak elde edilen değere göre oranlandı. Bu şekilde, amino asitlerin girişim etkisi yüzde olarak belirlenmiş ve Çizelge 5.7'de verilmiştir.

Çizelge 5.7 Glutamin biyosensörüne askorbik asit ve bazı amino asitlerin girişim oranları

Aminoasitler	Aminoasitlerin %'de girişim etkisi
L-Askorbik Asit	0,0
Metiyonin	0,0
Serin	0,0
Histidin	0,0
Alanin	0,32
Glisin	0,65
Lizin	0,65
Monosodyum Glutamat	2,26
Valin	3,88
Arginin	5,17
Sistein	11,97

Çizelge 5.7'den görüldüğü gibi en çok girişimi sırasıyla sistein, arginin ve valin yapmıştır. Literatürde yaygın olarak verilen ve girişim etkisi olabileceği belirtilen askorbik asidin herhangi bir girişim etkisine rastlanmamıştır.

Villarta ve arkadaşları (1992), hazırladıkları amperometrik glutamin elektroduna askorbik asit ve glutamatın girişim yaptığını belirtmişlerdir (Villarta vd [32]). Yine yapılan amperometrik çift enzim sensöründe; glutamatın girişim yaptığı gözlenmiştir (Moser vd [33]). Çalışmamızda, hazırlamış olduğumuz potansiyometrik glutamin biyosensörü girişim yapabileceğini düşündüğümüz glutamatın önemli bir girişim etkisinin olmadığını tespit ettik.

5.1.8 Karıştırma hızının etkisi

Glutamin biyosensörünün cevabına karıştırma hızının etkisini belirlemek amacıyla manyetik karıştırıcının hızı 100, 250 ve 750 rpm olmak üzere üç farklı hıza ayarlanarak

glutamin çözeltilerinin potansiyelinin kararlı hale gelmesi için beklendi. 100 ve 750 rpm hızlarında karıştırma yapıldığında kararlı potansiyele ulaşmak için geçen süre, 250 rpm hızda karıştırıldığında geçen süreden daha uzun olduğu bulundu. Bu nedenle manyetik karıştırıcının hızı 250 rpm'e ayarlanarak bütün çalışmalarda çözeltiler bu hızda karıştırıldı.

Karıştırma hızının artmasının biyosensörün potansiyeline herhangi bir etkisinin olmadığı, ancak cevap zamanda 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.

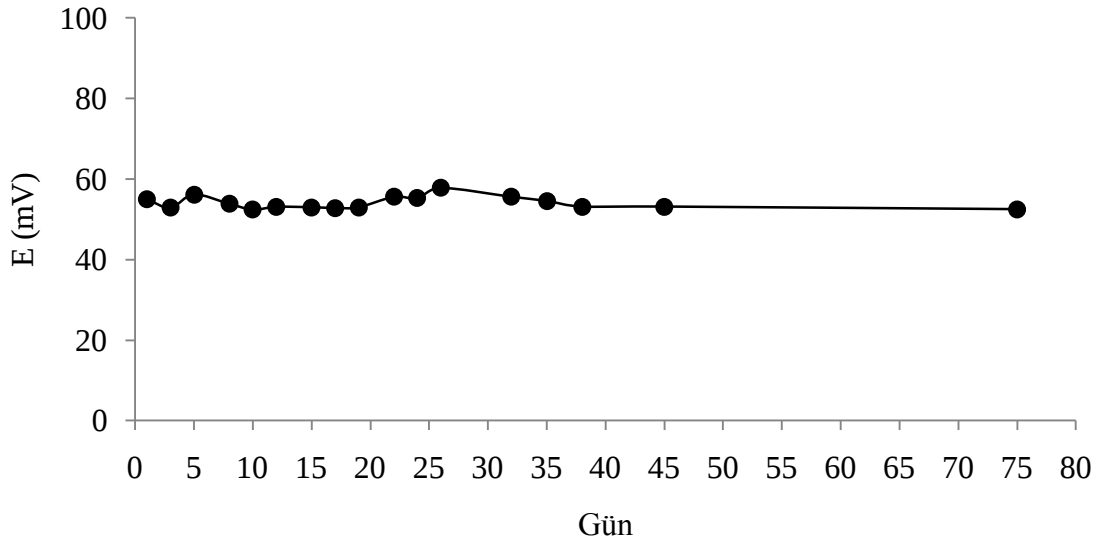
5.1.9 Cevap Süresi

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 (Çubuk [68]). Glutamin biyosensörünün cevap zamanı, yaklaşık 1-2 dakika arasındadır, 1 dakikadan daha kısa sürede sonuç verdiği de gözlenmiştir. Bu sonuç, biyosensörün cevap zamanının oldukça kısa olduğunu göstermektedir.

5.1.10 Raf Ömrü

Glutamin biyosensörünün raf ömrünü belirlemek amacıyla 75 gün süresince haftada 2 veya 3 defa glutamin çözeltilerinde mV ölçümü yapılarak kalibrasyon grafikleri çizildi ve çalışma aralığı ile eğimler belirlendi. İlk 45 gün düzenli olarak mV ölçümü yapıldıktan sonra kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi ile belirlenen eğim değerlerinde herhangi bir azalma görülmedi. Bu nedenle hazırlamış olduğumuz glutamin biyosensörü ölçüm yapılmaksızın 1 ay süresince +4°C'de depolanmış ve 1 ayın sonunda eğim

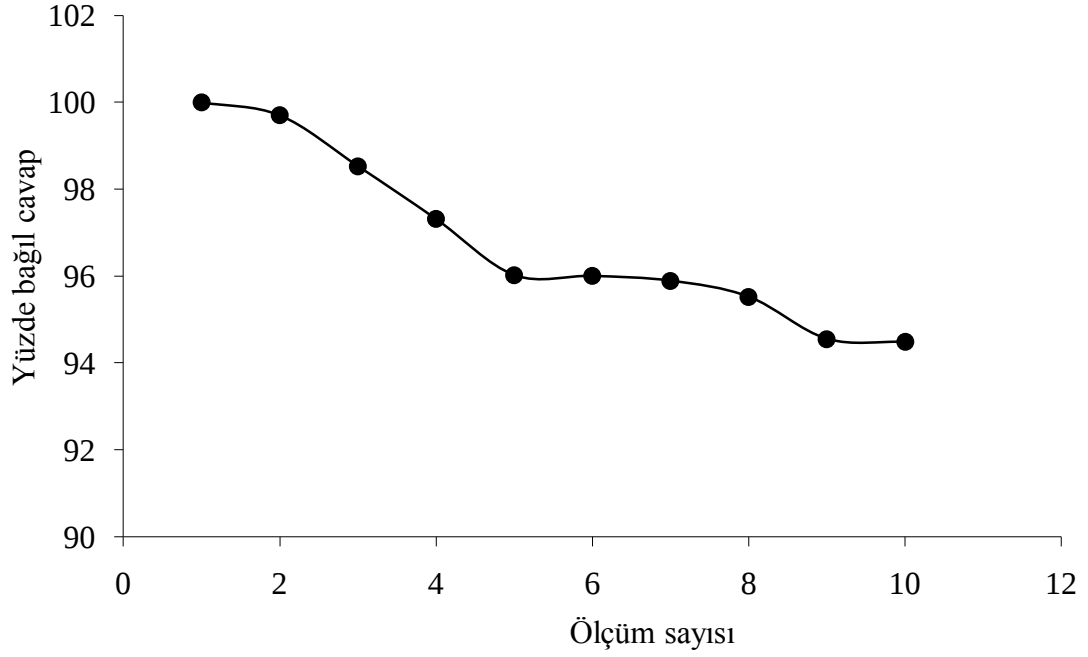
değerleri aynı şekilde belirlenmiştir. 75 gün sonunda glutamin biyosensörünün çalışma aralığının değişmediği ancak eğim değerinde sadece %16'lık bir düşme olduğu belirlenmiştir. Hazırladığımız palmitik asit içeren PVC membran temelli glutamin biyosensörünün raf ömrünün oldukça uzun olması, onun biyoanalitik çalışmalarda rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir. Şekil 5.8'de 75 gün sonunda glutamin biyosensörünün eğim değerindeki değişim verilmektedir.



Şekil 5.8 75 gün sonunda glutamin biyosensörünün elde edilen eğim değerindeki değişim

5.1.11 Tekrarlanabilirlik

Glutamin biyosensörünün tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla aynı gün içerisinde aynı biyosensör ile hazırlanan 10 seri glutamin kalibrasyon çözeltilerinde (pH:7,4) 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. En düşük eğimin yüzdesi de %95 olarak bulundu. Bütün sonuçlar ve çizilen kalibrasyon grafiği doğrultusunda elektrodumuzun katalitik aktivitesinde önemli bir düşüş olmaması, tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Şekil 5.9'da glutamin biyosensörü için, ölçüm sayısına karşılık yüzde bağıl cevabı görülmektedir.



Şekil 5.9 Glutamin biyosensörünün 10 kez alınan ölçüm sayısına karşılık yüzde bağıl cevabı

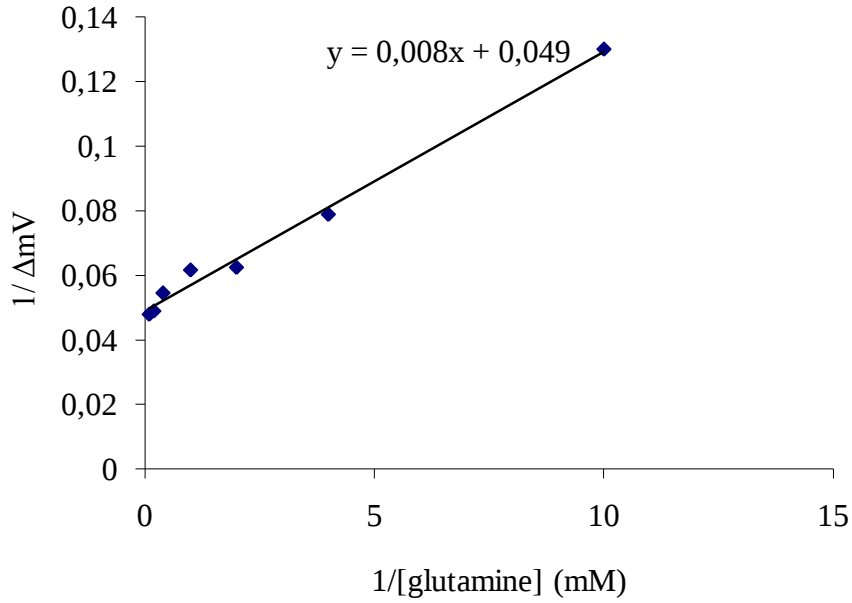
5.1.12 Enzim Kinetik Parametrelerinin (K_m ve V_{max} değerleri) Belirlenmesi

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].

Glutamin biyosensöründe immobilize olmuş glutaminaz enziminin K_m sabitini 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. İlgili verilerden yararlanılarak $1/[glutamin]$ - $1/\Delta mV$ grafiği çizilmiş ve elde edilen Şekil 5.10'daki Lineweaver-Burk

grafifinden, glutaminaz enziminin K_m değeri 0,163 mM, V_{max} değeri ise 20,41 mV/dakika olarak bulunmuştur.

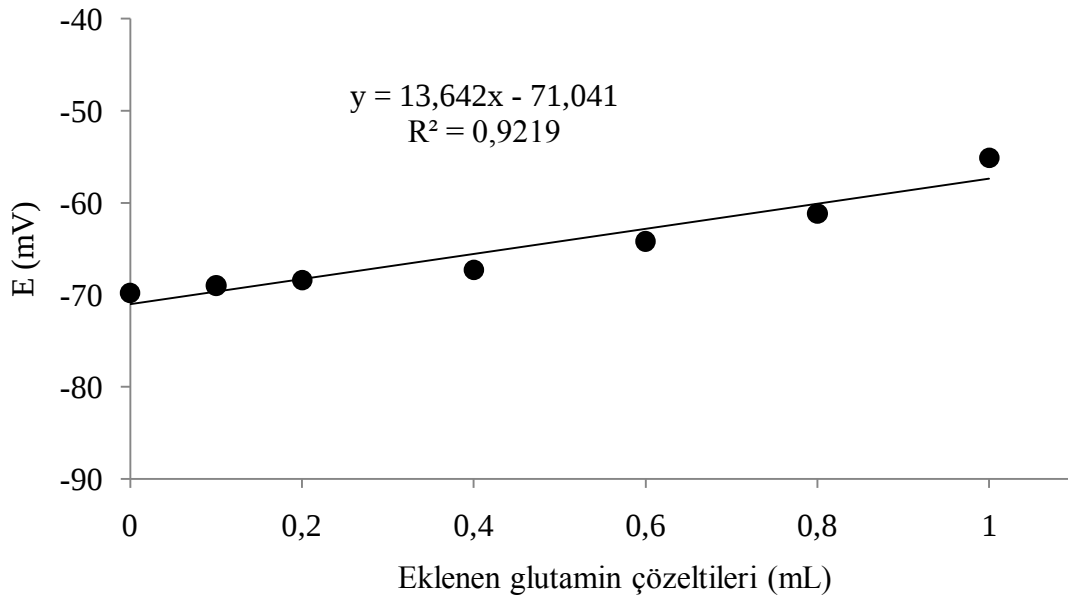


Şekil 5.10 Glutamin biyosensöründeki glutaminaz için Lineweaver-Burk grafiği

5.2 Gerçek Numunelerde Glutamin Tayini

5.2.1 GNC L-Glutamin Kapsülünde Glutamin Tayini

Hazırladığımız palmitik asit içeren PVC membranlı glutamin biyosensörünün gerçek numunelerde glutamin tayininde kullanıp kullanılamayacağı araştırıldı. Bu amaçla, GNC Live Well firmasından satın alınan L-glutamin kapsülünde glutamin tayini standart katma yöntemi kullanılarak yapıldı. Bölüm 4.5.5’de belirtildiği şekilde hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılan standart katma yönteminde elde edilen grafik Şekil 5.11’da verilmiştir.



Şekil 5.11 Glutamin biyosensörü ile standart katma yönetimi kullanılarak 10^{-3} M glutamin çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği

Çizelge 5.8 Hazırladığımız glutamin biyosensörü ile GNC L-glutamin kapsülü örneğinde glutamin tayini ile elde edilen sonuç

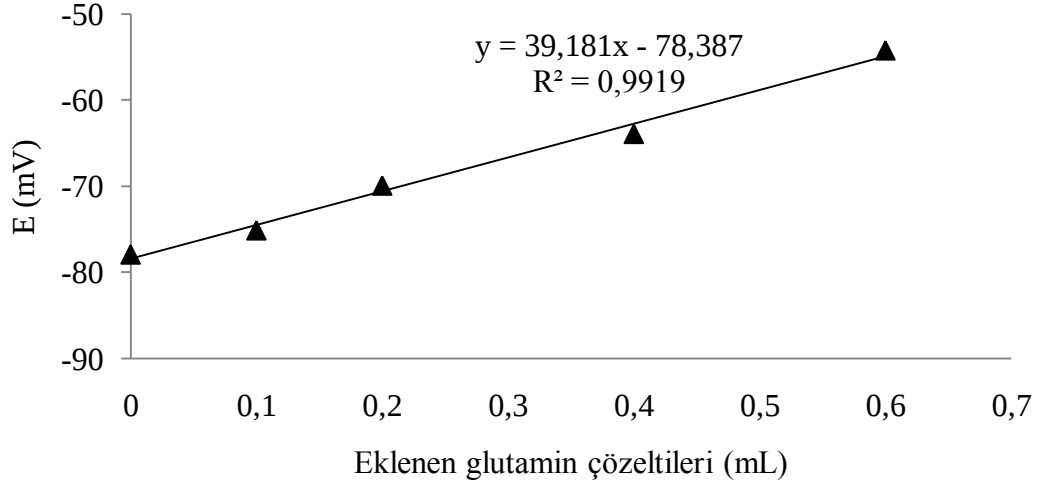
Glutamin miktarı (mg / 100µL)	
GNC L-Glutamin kapsülünde bulunan	Glutamin Biyosensörü
0,083 (500/ 1 kapsül)	0,076

Çizelge 5.8’de görüldüğü gibi, GNC L-glutamin kapsülü örneğinde glutamin miktarı ile hazırladığımız biyosensör ile bulduğumuz sonuç birbirine çok yakın olması glutamin tayininin sensörümüzle başarılı bir şekilde yapıldığını ortaya koymaktadır.

5.2.2 Serumda Glutamin Tayini

Kan serumu örneği Yıldız Teknik Üniversitesi Sağlık Merkezi’nden temin edildi. Serumdaki glutamin tayini, laboratuvar koşullarında hazırlamış olduğumuz potansiyometrik glutamin biyosensörü ile standart katma yöntemi kullanılarak yapıldı ve standart katma yönteminde elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 5.12’de verildi. Standart katma yöntemi ile yapmış olduğumuz deneyde, öncelikle amonyum elektroduyla glutamin çözeltilerinde okuma yapıldı ve daha sonra da hazırlamış

olduğumuz glutamin biyosensörüyle aynı çözeltilerde mV ölçümleri alındı. İki ayrı okuma arasındaki fark alınarak, ortamda bulunabilecek amonyum sonuca yansıtılmamış ve bu şekilde kalibrasyon grafiği çizilmiş oldu. Biyosensörümüz ile yaptığımız ölçümler sonucu bulduğumuz glutamin değeri, aynı zamanda Centro laboratuvarlarında HPLC yöntemi ile tayin yapılarak elde edilen değer ile mukayese edildi.



Şekil 5.12 Glutamin biyosensörü ile standart katma yönetimi kullanılarak 5×10^{-4} M glutamin çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği

Çizelge 5.9 Serumda glutamin tayini için glutamin biyosensörü ve Centro laboratuvarından elde edilen sonuçlar

Serumda Glutamin miktarı (mg / L)	
Centro Laboratuvarı	Glutamin Biyosensörü
85,5	83,5

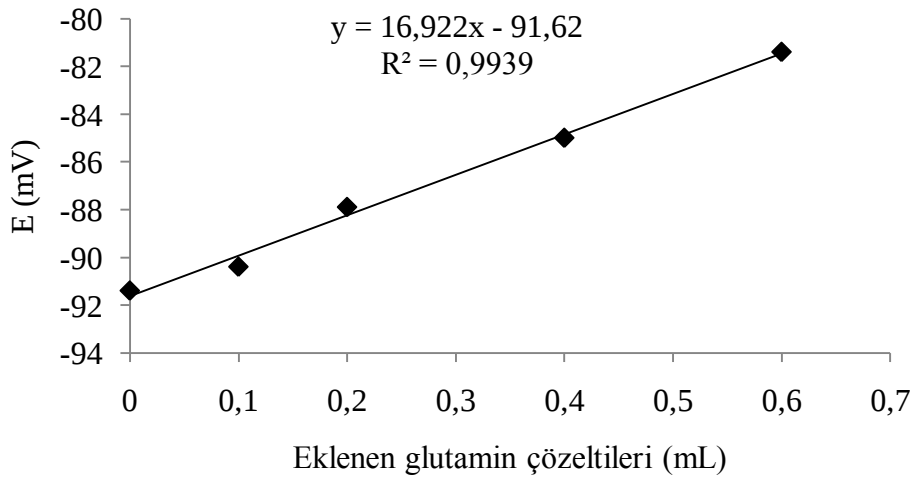
Çizelge 5.9’da, insan serumu örneğinde Centro Laboratuvarı tarafından HPLC yöntemi ile elde edilen glutamin miktarı ile hazırladığımız biyosensör ile bulduğumuz sonuç görülmektedir. Sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu açıkça görülmektedir.

5.2.3 Beyin Omurilik Sıvısı (BOS)’ta Glutamin Tayini

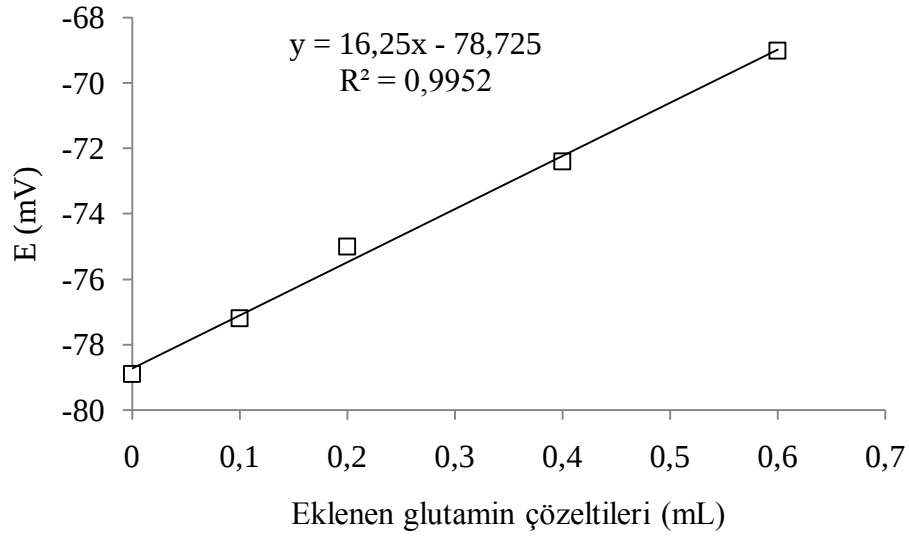
Beynin küçük boşluklarında, kılcal kan damarları tarafından salgılanan, su kıvamında berrak sıvıya beyin-omurilik sıvısı (cerebral spinal fluid) denir. BOS, beyin ve omuriliği dış travmalardan koruyan, beynimiz ile kafatası arasındaki bir sıvıdır. Bu sıvı

beynimizden çıkan ve omuriliğimizin içerisinde kaslara taşınan sinirleri de dışarıdan gelecek darbelere karşı korumaktadır. Beyin-omurilik sıvısı doğal koşullarda berraktır ve içinde çok az hücre, madensel tuzlar, glikoz ve protein vardır. Yaklaşık olarak miktarı 150 gr. kadardır. Bazı hastalıklarda, miktarında, basıncında ve içindeki maddelerde değişimler olur. Bu sıvının incelenmesi beyin hastalıklarında önemlidir. İnsanlarda BOS, lumbal ponksiyon ile elde edilir. BOS Fonksiyonları; beyin dokusuna mekanik destek sağlamak, beyini akut kan basıncı değişikliklerine karşı korumak, metabolik atıkların uzaklaştırılması, kimyasal haberci maddelerin taşınmasını sağlamak ve beyin çevresindeki kimyasal ortamı dengede tutmaktır [71], [72].

BOS glutamin düzeyi BOS'ta aşırı amonyak varlığının indirek testidir. Glutamin ölçümünün amonyak ölçümüne tercih edilmesinin nedeni, örnekte glutaminin amonyağa göre daha stabil olmasıdır. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı Biyokimya Laboratuvarı'nda 2 hastadan alınan 2 farklı BOS örneğinde glutamin tayini, laboratuvar koşullarında hazırlamış olduğumuz potansiyometrik glutamin biyosensörü ile standart katma yöntemi kullanılarak yapıldı. Bu yöntemde, öncelikle amonyum elektroduyla glutamin çözeltilerinde okuma yapıldı ve daha sonra da hazırlamış olduğumuz glutamin biyosensörüyle aynı çözeltilerde mV ölçümleri alındı. İki ayrı okuma arasındaki fark alınarak ortamda bulunabilecek amonyum sonuca yansıtılmamış ve bu şekilde kalibrasyon grafikleri çizilmiş oldu. Standart katma yönteminde elde edilen glutamin çözeltileri için kalibrasyon grafikleri Şekil 5.13. ve 5.14'te verilmiştir.



Şekil 5.13 I no'lu hasta için, glutamin biyosensörü ile standart katma yönetimi kullanılarak 10^{-4} M glutamin çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği



Şekil 5.14 II no'lu hasta için, glutamin biyosensörü ile standart katma yönetimi kullanılarak 10^{-4} M glutamin çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği

Elde edilen sonuçlar, Çizelge 5.10'da verilmiştir. Normal yetişkin bir insanda BOS'ta bulunan glutamin miktarı 7,6-9,6 mg/dL arasındadır. Bu değeri, Düzen Laboratuvarı 375-1010 μ M olarak vermektedir. Hazırlamış olduğumuz glutamin biyosensörü ile BOS'taki glutamin miktarını I. ve II. hasta için sırası ile 7,91 ve 7,08 olarak belirledik.

Çizelge 5.10 BOS örneklerinde glutamin tayini için glutamin biyosensöründen elde edilen sonuçlar

Hasta No	Glutamin miktarı (mg/dL)
I	7,91
II	7,08

Literatürde yapılan çalışmalardan birinde Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisinde Beyin Omurilik sıvısını analiz etmişlerdir, 550 μ L BOS örneğinde ve 21 örneğin ortalamasında glutamin miktarını 0,48 mM olarak bulmuşlardır [73]. Yine Tucci ve arkadaşları tarafından yapılan farklı bir çalışmada ise; çocuklardaki menenjit hastalığının beyin-omurilik sıvısı (BOS) içinde lazer bağlı floresans tayini ve kapiler elektroforeziyle (CZE-LIFD) glutamin ve glutamat ölçümünü gerçekleştirdiler. 100 μ L BOS içerisinde, kontrol grubunda 3,89mM, viral menenjit grubunda 3,48 mM,

bakteriyal menenjit grubunda ise, 2.63 mM konsantrasyonunda glutamin tayin etmişlerdir. Bakteriyal ve viral menenjitli çocukların beyin omurilik sıvısında glutamin ölçüm sonuçlarında, menenjitli hastaların kontrol grubundan daha düşük glutamin konsantrasyonlarına sahip olduğunu belirtmişlerdir. Enfeksiyon ve inflamasyon sırasında glutaminin karaciğerde tutunmasının arttığını kısmen açıklamışlardır [34].

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, biyolojik örneklerde glutaminin tayininde kullanmak üzere, palmitik asit kullanarak elde ettiğimiz amonyum-seçici PVC membran elektrot üzerine glutaminaz enziminin kimyasal olarak immobilize edilmesi ile potansiyometrik esaslı glutamin biyosensörü tasarlanmış ve yapımı gerçekleştirilmiştir.

Biyosensörümüzün analitik özellikleri olan, çalışma aralığını 10^{-1} - 10^{-4} M, optimum tampon konsantrasyonunu 20mM; tampon pH'sını 7,4 ve ortam sıcaklığının glutamin biyosensörüne olan etkisini inceleyerek optimum sıcaklığını 25°C olarak belirledik. Biyosensörümüzün tekrarlanabilirliğinin yüksek, 1-2 dakika, hatta 1 dakikadan daha kısa sürede de sonuç vermesiyle cevap süresinin oldukça kısa, 75 gün süresince alınan ölçümlerle raf ömrünün oldukça uzun olduğunu gözlemledik. Ayrıca bu çalışmada, hazırlanan glutamin biyosensörü ile GNC L-glutamin kapsülünde, serumda ve beyin omurilik sıvısında (BOS) glutamin tayini yaparak, elde ettiğimiz sonuçları standart yöntem ile karşılaştırdık. Gerçek numunelerde yapmış olduğumuz miktar tayininde sonuçlarımızın referans aralığına oldukça yakın olduğunu başarı ile belirlemiş olduk.

Yapılan tüm çalışmalarımız amacına ulaşarak, biyosensörümüzün optimum koşullarını zorlanmadan belirledik ve gerçek numunelerde glutamin tayinini gerçekleştirebildik. Literatürde potansiyometrik esaslı glutamin biyosensörüne rastlanmamış olması çalışmamızın özgün olduğunu göstermektedir. Tez çalışmamızda glutaminaz enziminin immobilize edilmesi ile potansiyometrik esaslı glutamin biyosensörü başarı ile hazırlanarak analitik özellikleri incelenmiş ve biyosensörün gerçek örneklerde bozucu türlerin önemli bir girişim etkisi olmaksızın uygulanabilirliği ispat edilmiştir.

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] Amino Asitler, www.kimyasal.net, 15.Nisan 2011.
- [4] Amino Asitler, www.scribd.com, 10 Nisan 2011.
- [5] Turna, Ö., (2006). “Aminoasit Biyosensörlerinin Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- [6] Glutamin, www.hammadeler.com, 10 Mart 2011.
- [7] Sporcu Besin Alışverişi, www.bilgiindir.net, 10 Mart 2011.
- [8] Altınışık, M., Aminoasit Metabolizması, [http://www.mustafaaltinisik.org.ukls-o-Aminoasit Metabolizması.ppt](http://www.mustafaaltinisik.org.ukls-o-Aminoasit%20Metabolizması.ppt), 15 Nisan2011.
- [9] Vikipedi Özgür Ansiklopedi, Glutamin, [http:// tr.wikipedia.org/wiki/Glutamin](http://tr.wikipedia.org/wiki/Glutamin), 11 Mart 2011.
- [10] L-Glutamine, www.superalem.com/l-glutamine.html, 10 Mart 2011.
- [11] Üre Siklusu, [www.ctf.edu.tr/anabilimdallari/pdf/157/Ure Siklusu pdf](http://www.ctf.edu.tr/anabilimdallari/pdf/157/Ure_Siklusu_pdf), 22 Nisan 2011.
- [12] Thomas, J.N., (1986). “in Mammalian Cell Technology” (Thilly, W. G., Ed.), 109-130, Butterworths, Boston.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Oh, G. S., Izuishi, T., Inoue, T., W. S., H., and Yoshida, T. J. (1996). *J. Ferment. Bioeng.* 81:329–336.

- [16] 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.
- [17] Glasgow, A.M. and Dhiensiri, K., (1974). "Improved Assay for Spinal Fluid Glutamine, and Values for Children with Reye's Syndrome" Clin. Chem., 20: 642-644.
- [18] Verjee, Z.H., Sherwood, W.G., (1984). Clin. Chem., 30: 944.
- [19] Allen, I.C., Greive, A. and Griffiths R., Neurochem J., (1986). "Differential changes in the content of amino acid neurotransmitters in discrete regions of the rat brain prior to the onset and during the course of homocysteine-induced seizures", Journal of Neurochemistry, 46(5): 1582–1592.
- [20] Roth, E., Zoch, G., Schulz, F., Karner, J., Muhlbacher, F., Hamilton, G., Mauritz, W., Sporn, P. and Funovics, J., (1985). "Amino acid concentrations in plasma and skeletal muscle of patients with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis", Clin. Chem., 31: 1305-1309.
- [21] Askanazi, J., Carpantier, Y. A., Michelsen, C. B., Elwyn, D. H., Furst, P., Kantrowitz, L. R., Gump, F. E. and Kinney, J. M., (1980). "Muscle and Plasma Amino Acids Following Injury: Influence of Intercurrent Infection", Ann. Surg. 192(1):78-85.
- [22] Corradetti, R., Moneti, G., Moroni, F., Pepeu, G. and Wieraczko, A., (1983). J. Neurochem., 41:1518.
- [23] Perry, T. L., Hansen, S. and Kennedy, J., (1975). "CSF amino acids and plasma-CSF amino acid ratios in adults", J. Neurochem., 24(3):587-589.
- [24] Morineau, G., Azoulay, M. and Frappier, F., (1989). "Reaction of o-phthalaldehyde with amino acids and glutathione. Application to high-performance liquid chromatography determination", J. Chromatog., 467(1):209-16.
- [25] Alfredsson, G., Wiesel, F.A. and Lindberg, M. (1988). "Glutamate and glutamine in cerebrospinal fluid and serum from healthy volunteers--analytical aspects", J Chromatog., 424(2):378–384.
- [26] Godel, H., Graser, T., Foldi, P., Pfaender, P. and Furst P., (1984), "Measurement of free amino acids in human biological fluids by HPLC", J. Chromatog., 297: 49.
- [27] Kapetanovic, I. M., Yonekawa, W. D. and Kupferberg H. J., (1987). "Determination of 4-aminobutyric acid, aspartate, glutamate and glutamine and their carbon-13 stable-isotopic enrichment in brain tissue by gas chromatography - mass spectrometry", J. Chromatog. 414:265-274.
- [28] Darmaun, D., Manary, M. J. and Matthews, D. E., (1985). AnalBioch., 147: 92.
- 4. Sorochinskii, V. V., and Kurganov, B. I. (1997). Appl. Biochem. Microbiol. 33, 515–529.
- [29] Coulet, P. R. and Bardeletti, G. (1991). "Biosensor-based instrumentation", Biochem. Soc. Trans. 19:1–4.
- [30] Hellinga, H. W., and Marvin, J. S., (1998). "Protein engineering and the development of generic biosensors" Trends Biotechnol., 16:183–189.

- [31] Dattelbaum, J. D. and Lakowicz, J., R., (2001). "Optical Determination of Glutamine Using a Genetically Engineered Protein", *Analytical Biochemistry*, 29:89–95.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] Guilbault, G. G. and Shu, F. R. (1971). "An electrode for the determination of glutamine", *Anal. Chim.Acta*, 56:333-338.
- [36] 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.
- [37] Rechnitz, G. A.; Riechel, T. L.; Kobos, R. K.; Meyerhoff, M. E., (1978). "Glutamine-Selective Membrane Electrode", 199(4327):440-441.
- [38] Eagle, H., Oyama, V.I., Levy M., Horton C.L. and Fleischman R., (1956). "The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-Glutamine and L-Glutamic acid", *J. Biol Chem.*, 218:607-616.
- [39] Konyalıoğlu, S. ve Özyer, A. (2000). "Plazma glutamin düzeylerinin iki yöntem ile değerlendirilmesi", *Ege Tıp Dergisi*, 39 (1): 1 – 4.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] Fen Bölümü Yarışma Projesi,
<http://www.egelisesi.k12.tr/Basarilarimiz/Projeler/Proje%202008-2009/Proje33.pdf>, 5 Mart 2011.
- [44] Telefoncu, A., (1999). *Biyosensörler* (Telefoncu A., Ed.), s.1, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir.
- [45] Mehrvar, M., Bis, C., Scharer, J. M., Moo-Young, M. ve Luong, J. H., (2000). "Fiber-optic biosensors-Trends and advances", *Analytical Science*, 16:677-692.

- [46] 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.
- [47] Biyosensörler, <http://www.scribd.com/doc/9380782/Biyosensorler-2>, 3 Mart 2011.
- [48] Biyosensör ve Medikal Uygulamaları, http://makinecim.com/bilgi_8078_BIYOSENSOR-ve-MEDIKAL-UYGULAMALARI, 4 Mart 2011.
- [49] Telefoncu, A., (1997). Enzimoloji (Telefoncu, A., Ed.), 380, Ege Üniversitesi, İzmir.
- [50] Guilbault, G. G., and Kauffman, J. M. (1987). "Enzyme-based Electrodes as Analytical Tools", Biotechnol. Appl. Biochem., 9:95-113.
- [51] Updike, S. J., Hicks, G. P., (1967). "The Enzyme Electrode", Nature, 214: 986-988.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] Guilbault, G. G., and Kauffman, J. M. (1987). "Enzyme-based Electrodes as Analytical Tools", Biotechnol. Appl. Biochem., 9:95-113.
- [55] Clark, L. C., Lyons, C., (1962). "Electrode System for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery." Ann. NY Acad. Sci., 102:29-45.
- [56] Telefoncu, A.(1997). Biyosensörler (Telefoncu, A., Ed.) 193-248, Ege Üniversitesi, İzmir.
- [57] Tran-Minh, C. (1993). Biosensors, Chapman and Hall, London.
- [58] Eggins, B.R. (1996). Biosensor: an Introduction, John Wiley and Sons Ltd. and B.G. Teubner, West Sussex.
- [59] Telefoncu, A., (1999). Biyosensörler (Telefoncu A., Ed.) 81-142 Ege Üniversitesi, İzmir.
- [60] Eterler ve Epoksitler, <http://w3.balikesir.edu.tr/~hnamli/okdn9/okdn9.htm>, 12 Mart 2011.
- [61] Vikipedi Özgür Ansiklopedi, http://tr.wikipedia.org/wiki/Palmitik_asit, 12 Mart 2011.
- [62] Akyılmaz, E., (2002). Alkol tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova- İzmir.
- [63] Butt, S.B. and Camman, K. (1992). "Enzyme urea biosensor based on a modified potentiometric PVC-nonactin membrane electrode for assay of urea in blood", Anal. Lett. 25(9):1597-1615.

- [64] Saurina, J., Hernandez- Cassou, S., Fabregas, E. and Allegret, S., (1998). *Anal. Chim Acta.* 282:229-237.
- [65] Bilitewski, U., Chemnius, G.C., Ruger, P. and Schinid, R.D., (1992). *Sens. Actuators B.*, 7:351.
- [66] Wakayama, M., Yamagata, T., Kamemura, A., Bootim, A., Yano, S., Tachiki, T., Yoshimune, K. and Moriguchi, M., (2005) “Characterization of salt-tolerant glutaminase from *Stenotrophomonas maltophilia* NYW-81 and its application in Japanese soy sauce fermentation”, *Society for Industrial Microbiology*, 32:383-390.
- [67] 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.
- [68] Çubuk, O., Yeni tip potansiyometrik üre biyosensörlerin hazırlanması ve biyolojik numunelere uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2001.
- [69] Kimyasal kinetik ve enzimler, <http://www.scribd.com/doc/8419276/Kimyasal-Kinetik-ve-Enzimler>, 4 Mayıs 2011.
- [70] Enzim Kinetiği, <http://www.ctf.istanbul.edu.tr/anabilimdallari/pdf/160/EnzimlerEnzimKinetiği>, <http://www.ctf.istanbul.edu.tr/anabilimdallari/pdf/160/Enzimler.pdf>, 3 Mayıs 2011.
- [71] Bos nedir? <http://www.ms-life.org/bos-nedir/bos-nedir.html>, 3 Mayıs 2011.
- [72] BOS <http://www.genelsaglikbilgileri.com/beyin-omurilik-sivisi/>, 3 Mayıs 2011.
- [73] Kolokolova, T. NSavel’ev, O. Yu., Sergeev, N. M., Shpigun, O. A., Sokolov, K. V. and Skvortsova, V. I., (2010). “Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Solving the Analytical Problems of Medicine: Analysis of Cerebrospinal Fluid”, *Journal of Analytical Chemistry*, 65(10):1073–1081.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Didem Begüm Bağrıyanık
Doğum Tarihi ve Yeri :31.05.1985
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :didem_begum@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyokimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2011
Lisans	Kimya	Dokuz Eylül Üniversitesi	2009
Lise	Fen-Matematik	Bahçeşehir Atatürk Lisesi (YDA)	2003