

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÜRE TAYİNİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR  
GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

Kimyager Bahar DİNDAR

**FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında  
Hazırlanan**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Emine KARAKUŞ (YTÜ)**

**İSTANBUL, 2010**

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ .....	iv
KISALTMA LİSTESİ .....	v
ŞEKİL LİSTESİ .....	vi
ÇİZELGE LİSTESİ .....	viii
ÖNSÖZ.....	ix
ÖZET .....	x
ABSTRACT .....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Üre .....	2
1.1.1 Organizmada Üre Sentezi .....	2
1.1.2 Üre Tayin Yöntemleri.....	3
1.1.2.1 Direkt Yöntemler .....	3
1.1.2.2 İndirekt Yöntemler.....	3
1.1.2.3 Kolorimetrik Yöntemler .....	3
1.1.2.4 Enzimatik Yöntem .....	4
1.1.2.5 Elektrokimyasal Yöntemler .....	4
1.1.2.6 Biyosensör Esaslı Yöntemler.....	4
1.2 Üre ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	4
2. KURAMSAL TEMELLER .....	7
2.1 Biyosensörler .....	7
2.1.1 Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonları.....	8
2.1.2 Biyosensörlerin Uygulama Alanları .....	9
2.1.2.1 Gıda Sekröründe Biyosensör Kullanımı .....	10
2.1.2.2 Savunma Sektöründe Biyosensör Kullanımı .....	11
2.1.2.3 Çevresel Ölçümlerde Biyosensör Kullanımı .....	12
2.1.2.4 Tıbbi Alanda Biyosensör Kullanımı .....	13
2.1.3 Enzim Sensörleri.....	14
2.1.3.1 Enzim Sensörlerinin Genel Çalışma İlkesi .....	15
2.1.4 Enzim İmmobilizasyonu .....	16
2.1.5 İmmobilizasyon Yöntemleri .....	17
2.1.5.1 Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri .....	18
2.1.5.2 Çapraz Bağlama Yöntemleri.....	20
2.1.5.3 Kopolimerizasyon Yöntemleri.....	21
2.1.5.4 Tutuklama Yöntemi .....	21
2.1.6 Enzim Sensörlerinin Sınıflandırılması.....	22
2.1.6.1 Amperometrik Enzim Sensörleri .....	22
2.1.6.2 Potansiyometrik Enzim Sensörleri .....	23

2.1.6.3	Yarı İletkenleri Esas Alan Enzim Sensörleri .....	24
2.1.6.4	Optik Esaslı Enzim Sensörleri .....	25
2.1.6.5	Kalorimetrik Esaslı Enzim Sensörleri .....	25
2.1.6.6	Piezoelektrik Esaslı Enzim Sensörleri .....	26
2.1.7	Enzim Elektrotlarında Performans Faktörleri.....	26
2.1.7.1	Kalibrasyon ve duyarlılık: .....	26
2.1.7.2	Kararlılık:.....	26
2.1.7.3	Tayin aralığı ve tayin sınırı:.....	26
2.1.7.4	Cevap süresi:.....	27
2.1.7.5	Seçicilik: .....	27
2.1.7.6	Tekrarlanabilirlik: .....	27
2.1.7.7	Sıcaklık: .....	27
2.1.7.8	Tıbbi uygulamalarda kullanılacak biyosensörler için biyoyumluluk: .....	28
2.2	Üre Tayininde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış.....	28
2.2.1	Üreaz.....	28
2.2.1.1	Soya fasülyesi (Jack bean) Üreazı .....	28
2.2.1.2	Helicobacter pylori Üreazı.....	28
2.2.2	Nonaktin .....	29
2.2.3	Palmitik asit .....	29
2.2.4	Dioktil Sebakat (DOS).....	30
2.2.5	Glutaraldehit .....	30
2.2.6	Poli(vinilklorür) (PVC).....	30
2.2.7	1- etil – 3 - (3 - dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) .....	31
3.	MATERYAL VE METOD.....	32
3.1	Kullanılan Cihazlar .....	32
3.2	Serum Numuneleri.....	32
3.3	Kullanılan Enzimler .....	32
3.4	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	32
3.5	Kullanılan Çözeltiler.....	33
3.5.1	TRIS tampon çözeltisi .....	33
3.5.2	Amonyum klorür çözeltileri .....	33
3.5.3	Üre çözeltileri .....	34
3.5.4	Çalışma elektrodu iç dolgu çözeltisi.....	36
3.5.5	Serumda ürenin tayini için (Standart Katma Yönteminde) kullanılan çözeltiler ..	36
3.6	Amonyum - Seçici Elektrotlar .....	37
3.6.1	Amonyum - seçici elektrotların hazırlanması.....	37
3.6.2	Amonyum elektrotlarının analitik özellikleri .....	38
3.6.2.1	Çalışma aralıklarının ve eğimlerinin belirlenmesi.....	38
3.6.2.2	Tampon konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi .....	39
3.6.2.3	pH'nın etkisinin belirlenmesi .....	39
3.6.2.4	Karıştırma hızının etkisinin belirlenmesi.....	39
3.6.2.5	Cevap süresinin belirlenmesi .....	39
3.7	Üre Biyosensörleri .....	39
3.7.1	Üre biyosensörlerinin hazırlanması .....	39
3.7.2	Üre biyosensörlerinin çalışma aralıklarının ve eğimlerinin belirlenmesi.....	40
3.8	Üre Biyosensörlerinin Amonyuma ve Üreye Cevabının Belirlenmesi.....	41
3.8.1	Üre biyosensörlerinin amonyuma cevabının belirlenmesi .....	41
3.8.2	Üre biyosensörlerinin üreye cevabının belirlenmesi .....	41

3.9	Üre Biyosensörlerinin Performanslarına Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi .....	41
3.10	Üre Biyosensörlerinin Tekrarlanabilirliği.....	41
3.11	Üre Biyosensörleri ile İnsan Serumunda Üre Tayini.....	42
3.12	<i>Helicobacter Pyroli</i> 'den üreaz enziminin elde edilmesi .....	42
3.12.1	Bakteri İzolasyonu ve Çoğaltımı .....	42
3.12.1.1	Kültür İçin Biyopsi Numunelerinin Toplanması .....	42
3.12.1.2	Biyopsi Numunelerinden Bakterinin İzolasyonu.....	43
3.12.1.3	<i>H. pylori</i> Üretimi ve Hasadı.....	44
3.12.2	Bakteriden Üreaz Enziminin Ekstraksiyonu.....	44
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	47
4.1	Amonyum Elektrotları ile İlgili Sonuçlar .....	48
4.1.1	Amonyum elektrotlarının kalibrasyon grafikleri .....	48
4.1.2	Amonyum elektrodun cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi .....	49
4.1.3	Amonyum elektrodun cevabına pH'nın etkisi .....	50
4.1.4	Karıştırma hızının etkisi .....	52
4.1.5	Cevap süresi.....	52
4.2	Üre Biyosensörleri .....	52
4.2.1	Üre biyosensörlerinin amonyuma cevabı .....	56
4.2.2	Üre biyosensörlerinin kalibrasyon grafikleri .....	57
4.2.3	Tampon konsantrasyonunun etkisi .....	59
4.2.4	pH'nın etkisi .....	61
4.2.5	Sıcaklığın etkisi .....	64
4.2.6	Seçicilik katsayılarının hesaplanması .....	66
4.2.7	Karıştırma hızının etkisi .....	66
4.2.8	Cevap süresi.....	67
4.2.9	Raf Ömrü .....	67
4.2.10	Tekrarlanabilirlik .....	68
4.2.11	Serumda üre tayini.....	69
5.	SONUÇLAR.....	71
	KAYNAKLAR.....	72
	ÖZGEÇMİŞ.....	75

## SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
Dl	Desilitre
g	Gram
Log	Logaritma
mg	Miligram
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
Mv	Milivolt
M	Molar
Rpm	rounds per minute
s	Standart Sapma
sn	Saniye
U	Unite
%	Yüzde
ΔH	Molar Entalpi

## KISALTMA LİSTESİ

BOD	Biyokimyasal oksijen istemi
BSS	Bağıl Standart Sapma
CDI	Karbonildiimidazol
DOS	Bis-(2-etilhekzil)sebakat
EDC	1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]karbodiimid
FIA	Floroimmunoassay
GA	Glutaraldehit
GOD	Glukoz oksidaz
HCl	Hidroklorik asit
NC	Nitroselüloz
PVA	Polivinilalkol
PVC	Polivinilklorür
SAW	Yüzey akustik dalga
THF	Tetrahidrofuran
TRIS	Tris(hidrosimetil)aminometan

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Ürenin sentezi.....	2
Şekil 2.1 Bir biyosensörün genel şematik gösterimi .....	8
Şekil 2.2 Biyosensörlerin genel çalışma prensibi .....	9
Şekil 2.4 Enzim sensörünün genel çalışma ilkesi .....	16
Şekil 2.5 Önemli enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması.....	18
Şekil 2.6 Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri .....	20
Şekil 2.7 Amperometrik esaslı bir enzim sensörünün şematik gösterimi.....	23
Şekil 2.8 Potansiyometrik esaslı enzim sensörünün şematik gösterimi .....	24
Şekil 2.9 Nonaktin in yapısı .....	29
Şekil 2.10 Dioktil sebakat'ın yapısal formülü .....	30
Şekil 2.11 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) karbodiimid'in formülü .....	31
Şekil 3.1 Üreaz enziminin ekstraksiyon şeması (Abasıyanık, 2005) .....	46
Şekil 4.1 Membran I ile hazırlanan amonyum elektroduna ait kalibrasyon grafiği .....	48
Şekil 4.2 Membran II ile hazırlanan amonyum elektroduna ait kalibrasyon grafiği.....	49
Şekil 4.3 Amonyum elektrotlarının eğimlerinin tampon konsantrasyonu ile değişimi.....	50
Şekil 4.4 Amonyum elektrotlarının eğimlerinin pH ile değişimi .....	51
Şekil 4.5 Palmitik asit içeren PVC ve karboksilli PVC membranlarla hazırlanan üre biyosensörlerinin 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) karbodiimid ile aktive edildikten sonra üreazın membran yüzeyine bağlanması .....	53
Şekil 4.6 Üreaz molekülünün glutaraldehit ile moleküller arası (a) ve molekül içi (b) çapraz bağ oluşturması .....	54
Şekil 4.7 Membrana bağlı üreaz moleküllerinin glutaraldehit ile çapraz bağlanması ile glutaraldehitin bazı uçlarının serbest kalması.....	55
Şekil 4.8 İmmobilize olmuş enzimdeki azometin bağlarının hidrolizlenmesi .....	55
Şekil 4.9 Üre biyosensörlerinde immobilize olan üreazdaki azometin bağlarının NaBH <sub>4</sub> ile indirgenmesi.....	56
Şekil 4.10 I nolu üre biyosensörünün kalibrasyon grafiği.....	58
Şekil 4.11 II nolu üre biyosensörünün kalibrasyon grafiği .....	58
Şekil 4.12 III nolu üre biyosensörünün kalibrasyon grafiği .....	59
Şekil 4.13 IV nolu üre biyosensörünün kalibrasyon grafiği .....	59
Şekil 4.14 I ve II nolu üre biyosensörünün eğimlerinin tampon konsantrasyonu ile değişimi	60
Şekil 4.15 III ve IV nolu üre biyosensörünün eğimlerinin tampon konsantrasyonu ile değişimi..	61

Şekil 4.16 I ve II nolu üre biyosensörünün eğimlerinin pH ile değişimi .....	63
Şekil 4.17 III ve IV nolu üre biyosensörünün eğimlerinin pH ile değişimi .....	63
Şekil 4.18 I ve II nolu üre biyosensörünün eğimlerinin sıcaklık ile değişimi .....	65
Şekil 4.19 III ve IV nolu üre biyosensörünün eğimlerinin sıcaklık ile değişimi.....	65
Şekil 4.20 İki ay süresince I ve II nolu üre biyosensörlerinden elde edilen eğim değerlerindeki değişimi.....	68
Şekil 4.21 İki ay süresince III ve IV nolu üre biyosensörlerinden elde edilen eğim değerlerindeki değişme .....	68
Şekil 4.22 Üre biyosensörü ile standart katma yöntemi kullanılarak $10^{-2}$ M üre çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği.....	69
Şekil 4.23 Amonyum elektrodu ile standart katma yöntemi kullanılarak $10^{-2}$ M $\text{NH}_4\text{Cl}$ çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği .....	70



## ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1 Biyosensörler için uygulama olanakları .....	10
Çizelge 2.2 Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları .....	10
Çizelge 2.3 Enzim sensörlerinin sınıflandırılması.....	22
Çizelge 2.4 Bazı enzim katalizli reaksiyonların molar entalpi değerleri.....	25
Çizelge 3.1 Kullanılan enzimlerin adları, numaraları, kaynakları ve temin edildikleri firmalar ...	32
Çizelge 3.2 Amonyum klorür kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması.....	33
Çizelge 3.5 Üre çözeltilerinin hazırlanması .....	37
Çizelge 3.6 PVC ve palmitik asit kullanılarak hazırlanan amonyum-seçici membranların bilişimi .....	37
Çizelge 3.7 Karboksilli PVC (PVC-COOH) kullanılarak hazırlanan amonyum-seçici membranların bilişimi.....	38
Çizelge 3.8 Üre biyosensörlerinde kullanılan membran ve üreaz çeşitleri .....	40
Çizelge 4.1 25,0±1 °C’da amonyum elektrotlarının eğimleri ve çalışma aralıkları .....	48
Çizelge 4.2 25,0±1 °C’da amonyum elektrotlarının cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi	49
Çizelge 4.3 25,0±1 °C’da amonyum elektrotlarının cevabına pH’nın etkisi.....	51
Çizelge 4.4 25,0±1 °C’da üre biyosensörlerinin amonyum iyonu için doğrusal çalışma aralıkları ve elektrotların eğimleri .....	57
Çizelge 4.5 25,0±1 °C’da üre biyosensörlerinin eğimleri ve çalışma aralıkları .....	57
Çizelge 4.6 25,0±1 °C’da üre biyosensörlerinin cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi.	60
Çizelge 4.7 25,0±1 °C’da üre biyosensörlerinin cevabına pH’nın etkisi.....	62
Çizelge 4.8 Üre biyosensörlerin cevabına sıcaklığın etkisi.....	64
Çizelge 4.9 Üre biyosensörlerinin seçicilik katsayıları .....	66
Çizelge 4.10 Üre biyosensörlerinin Bağlı Standart Sapma (B.S.S.) değerleri .....	69
Çizelge 4.11 Serumda ürenin tayini için üre biyosensörü ve diyaliz merkezinden elde edilen sonuçlar .....	70

## 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 Yrd. Doç. Dr. Emine KARAKUŞ'a;

Tezimin hazırlanmasında laboratuvar olanaklarını kullanabilme fırsatını bana sunan ve jüri üyem olmayı kabul eden Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. İnci ARISAN'a;

Yaptıkları çalışma sonunda Helicobacter pylori'den saflaştırdıkları üreazı bana temin ederek, tez çalışmamda kullanmamı sağlayan ve jüri üyem olmayı kabul eden Fatih Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa Fatih ABASIYANIK'a;

Özel yaşamım ve deneysel çalışmalarımda sabırla bana yardım eden ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Sema İMAMOĞLU, Gökhan AKGÖZ, Buket BAHAR, Arş. Gör. Nilay ALTAŞ KIYMAZ ve hocam Arş. Gör. Nurdagül ORHAN'a;

Çalışmamız için gerekli olan, hemodiyaliz hastalarından alınan kan serumlarını bize temin eden RENTEK Diyaliz Merkezi ve Sayın Dr. Nurgül Güven'e;

Hayatımın her döneminde hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan beni bugünlere getiren, maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan sevgili babam Selahattin DİNDAR ve annem Tülay DİNDAR'a, her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen canım abim Bahadır DİNDAR'a;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

Biyosensörler, analiz edilecek madde ile biyoaktif maddenin biyokimyasal bir tepkimesi sonucunda oluşan değişiklikleri, uygun bir çevirici ile elektriksel sinyale çeviren analitik cihazlardır. Bir biyosensörün amacı, analiz edilecek madde miktarı ile orantılı olarak bir elektrik sinyali üretmektir. Biyosensörlerin kullanım alanları çok geniştir. Başta klinik örneklerin analizi ve tıp alanında olmak üzere, gıda güvenliği, ağır metal analizi, askeri, çevresel atık kontrolü, biyomedikal sektör, tarım, ilaç analizi gibi birçok alanlarda kullanılmaktadır. Günümüzde yaklaşık 200'e yakın biyosensör geliştirilmesine rağmen, sadece 25 kadarı ticari olarak üretilebilmiştir.

Üre, özellikle böbrek hastalıklarında kanda gözlemlenebilen bir yan üründür ve üremik toksinlerin seviyesinin değerlendirilmesinde iyi bir belirteçtir. Üreaz enzimi, ürenin dekompozisyon reaksiyonunun katalizlenmesinde büyük bir rol oynar. Toksik bir madde olan ürenin, özellikle kandaki miktarının kısa sürede analizi ve bu analizlerin ekonomik açıdan uygun olması çok önemlidir. Bu nedenlerden dolayı yeni üre biyosensörleri geliştirilmektedir.

Bu çalışmada da kanda üre tayini yapabilmek için, PVC ve palmitik asit membran elektrodları kullanılan potansiyometrik üre biyosensörü geliştirildi ve PVC-COOH membran elektrodu ile hazırlanan üre biyosensörü ile karşılaştırıldı. Soya fasulyesinden ve helicobacter pylori mikroorganizmasından izole edilen iki farklı üreaz kullanıldı. Enzim elektrodunun optimum çalışma koşullarını belirlenmesi için pH etkisi, ortamın sıcaklığı ve tampon çözeltisi konsantrasyonu için ölçülen potansiyel değerleri araştırıldı. Sonra, biyosensörün kararlılığı ve elektrot cevabına girişim yapabilecek taneciklerin etkisi belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** Üreaz, üre biyosensörü, potansiyometri, helicobacter pylori, PVC membran elektrodu, PVC-COOH membran elektrodu

## ABSTRACT

A biosensor is an analytical device that comprises two essential components - an immobilized biocomponent, in intimate contact with a transducer that converts a biological signal into a measurable electrical signal. The aim of a biosensor is to produce proportional electrical signal with the component. Biosensors are used in a wide area including, analysis of clinical samples in medicine, food safety, heavy metal analysis, military, environmental waste control, biomedical area, agriculture, drug analysis

Recently, in spite of the developing 200 biosensors, only 25 biosensors produce commercially. Urea is a by-product; which can be monitored in the blood on kidney disease and it is the best marker for evaluating the level of uremic toxins. Urease has a important role to catalyze the decomposition reaction of the urea. Specially, the short-time analyse of the urea in the blood and economical analyses are very important. For these reasons, the new urea biosensors are being devepoled.

In these study, we devepoled potantiometric urea biosensor using PVC with palmitic acid membrane electrodes for the determination of the urea in the blood and these biosensor compared with PVC-COOH membrane electrode biosensor. We used two different urease enzyme which were purficated from jack bean and *helicobacter pylori* microorganisms. For the determination of optimum working conditions of the enzyme electrode the effects of the pH, temperature of the medium, concentration of the buffer solution on the measured potential values were investigated. Then, the stability of the biosensor and the effects of the interfering species on the response of the electrode were determined.

**Keywords:** Urease, urea biosensor, potantiometric, *helicobacter pylori*, PVC membrane electrode, PVC - COOH membrane electrode

## 1. GİRİŞ

Üre tayini, biyomedikal ve klinik uygulamalar için oldukça önemlidir. Kanda üre konsantrasyonunun artması ve idrarda azalması böbrek bozukluğunun önemli bir göstergesidir. Üre tayini için de birçok yöntem kullanılmakta olup bunlardan enzimatik olanların oldukça spesifik olmalarına rağmen, bu tür analizlerin maliyeti fazla miktarda enzim kullanılmasını gerektirdiği için oldukça yüksektir. Ayrıca, yöntemlerde kullanılan reaktiflerin hazırlanmasının zaman alması, çabuk bozulması ve deneyin yapımının uzun zaman alması gibi dezavantajları da vardır.

Bu amaçla, son yıllarda üre tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensörler spesifik, ekonomik, pratik, girişim etkilerinden mümkün olduğunca uzak ve tüm laboratuvar şartlarında kullanılacak sistemler olduğu için, diğer yöntemlere göre oldukça avantajlıdır. Literatürde üre tayini için geliştirilmiş çeşitli potansiyometrik ve amperometrik enzim sensörlerine rastlanmaktadır. Bu çalışmalarda enzim immobilizasyonu için gerekli matriks ortamı olarak PVC, karboksilli PVC, polipirol ve polianilin gibi polimerler kullanılmaktadır.

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

Bu çalışmada amonyum-seçici membran elektrot üzerine belli oranlardaki üreaz enzimlerinin birlikte immobilize edilmesi ile enzimatik biosensör geliştirilerek ürenin potansiyometrik tayininin yapılması amaçlanmaktadır. Membran materyali olarak PVC ve uzun zincirli bir yağ asidi olan palmitik asit kullanılarak elde edilen membranla amonyum-seçici elektrot hazırlanmıştır. Bu elektrodun membranına enzimler immobilize edilerek kreatin biyosensörü yapılmıştır. Bu sensörle elde edilen sonuçlar aynı şekilde ama karboksilli PVC (PVC-COOH) kullanılarak elde edilen üre biyosensörü ile karşılaştırılmıştır.

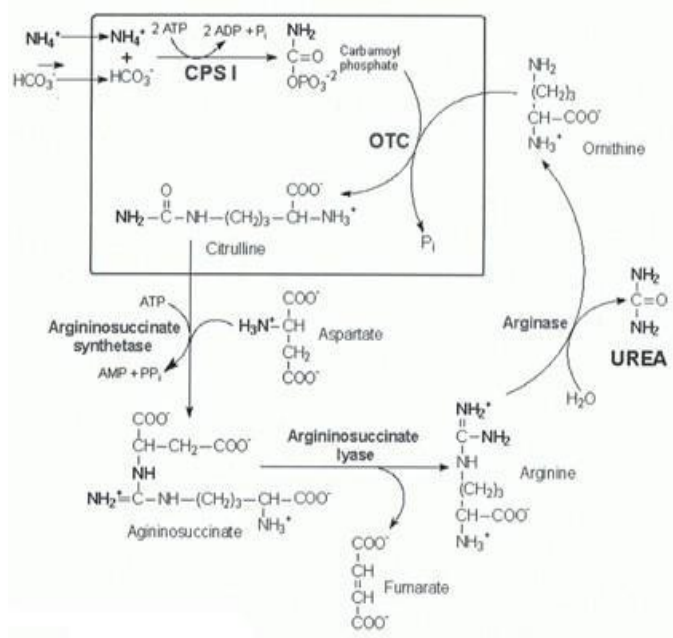
Biyosensörün en iyi çalışma koşullarını belirlemek amacı ile tampon konsantrasyonu, pH, ortam sıcaklığının elektrot cevabı üzerine etkileri incelenmiş, enzim elektrodun raf ömrü, tekrarlanabilirliği, tayin aralığı, yabancı iyon girişimi ve cevap zamanı belirlenmiştir.

## 1.1 Üre

Üre, 1773 yılında Hilaire Rouelle tarafından keşfedildikten sonra 1828 yılında Friedrich Woehler tarafından ilk defa yapay olarak sentezlenmiştir.

### 1.1.1 Organizmada Üre Sentezi

Memelilerde deamidasyon ve daha çok deaminasyon reaksiyonu sonucu oluşan amonyak, suda çözünen oldukça güçlü bir bazdır, canlı ortamın pH'ını hücre için zararlı bir düzeye çıkarabilir. Balıklar gibi suda yaşayan hayvanlar oluşan amonyağı doğrudan suya bırakırken karada yaşayan hayvanlarda amonyak karaciğerde toksik olmayan bir bileşik olan üreye dönüştürür. Oluşan amonyağın, metabolizma ürünü olarak kanda mevcut olan CO<sub>2</sub> ile karaciğerde birleşmesi sonucu üre sentezlenir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Ürenin sentezi

Oluşan ürenin % 90'ı böbreklerden idrarla, geri kalanı ise sindirim sistemi ve deriden atılır. Normal yetişkin bir insanda 24 saatte idrarla yaklaşık 30 gram kadar üre atılmaktadır. İdrar ile atılan üre miktarı, protein alımına, karaciğerdeki üre sentez hızına ve böbreklerden ürenin atım hızına bağlıdır. Bu nedenle sadece idrarla yapılan üre miktar tayini tek başına bir önem taşımaz. Ancak buna paralel olarak yapılan kan üresinin saptanmasıyla birlikte bir değer taşır. Ürenin kandaki normal değeri 10,2-49,8 mg dL<sup>-1</sup> (Eggenstein vd 1999) arasındadır. İnsanlarda serumdaki üre derişimi, akut böbrek hastalıklarında 720-900 mg dL<sup>-1</sup> ye, kronik böbrek hastalıklarında ise 300-420 mg dL<sup>-1</sup> ye kadar çıkabilmektedir (Luo and Do, 2004).

Ürenin fizyopatolojik artışı (üremi)nin nedenleri şunlardır:

- Prerenal üremi: Devamlı kusma hali, ishal, diyabet koması, kalp yetmezliği gibi nedenler sonucunda renal kan akımının azalması ile kanda üre artışı meydana gelmektedir. Toksik durumlar, yüksek ateş ve yanıklarda protein yıkımı hızlandığı için kan üresi artar. Bu durumda üre atılımını azaltan en önemli faktör olan dehidratasyon da görülür.
- Renal üremi: Nefrit gibi böbrek bozukluklarında kronik enfeksiyonlar, neoplazma (tümör) ve polikistik böbrek hastalıklarında kanda üre artışı görülmektedir.
- Postrenal üremi: Prostat, üreter taşları ve mesanede oluşan bazı kanser tiplerinde görülmektedir.

### **1.1.2 Üre Tayin Yöntemleri**

Ürenin tayini biyomedikal ve klinik uygulamalar için çok önemli bir yere sahiptir. Üre konsantrasyonunun kanda artması ve idrarda azalması böbrek bozukluğunun önemli bir göstergesidir (Hamlaoui vd 2002).

Klasik üre tayin yöntemleri enzimatik ve enzimatik olmayan spektrofotometrik yöntemlere dayanmaktadır (Caraway ve Fanger 1956, Colasanti vd 1995).

#### **1.1.2.1 Direkt Yöntemler**

Ksanthidrol yöntemi ve kolorimetrik yöntem (Diasetil monoksim = Fearon reaksiyonu)

#### **1.1.2.2 İndirekt Yöntemler**

Gazometrik yöntem (Kowarsky yöntemi); ürenin üreaz ile reaksiyonu sonucu meydana gelen amonyak veya karbondioksitin tayini ile yapılmaktadır.

#### **1.1.2.3 Kolorimetrik Yöntemler**

Berthelot reaksiyonu; ürenin üreaz enzimi ile reaksiyonu sonucu meydana gelen amonyak, sodyum nitroprussiyat ile kolorimetrik olarak tayin edilir (Fawcett and Scott, 1960). Nessler reaksiyonu ise ürenin üreaz enzimi ile reaksiyonu sonucu meydana gelen amonyak ile Nessler reaktifinin reaksiyonunu esas alan kolorimetrik bir yöntemdir.

#### 1.1.2.4 Enzimatik Yöntem

#### 1.1.2.5 Elektrokimyasal Yöntemler

Kondüktometrik ve potansiyometrik yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır.

Berthelot ve Nessler yöntemlerinde son aşama spektrofotometrik ölçüme dayanmaktadır. Her iki yöntem de enzimatik reaksiyona dayandığından dolayı enzimatik olmayanlara kıyasla oldukça spesifiktir. Fakat bu tür analizlerin maliyeti fazla miktarda enzim kullanıldığı için oldukça yüksektir. Ayrıca yöntemlerde kullanılan reaktiflerin hazırlanmasının zaman alması, çabuk bozulması ve deneyin yapımının uzun zaman alması gibi dezavantajları da vardır.

#### 1.1.2.6 Biyosensör Esaslı Yöntemler

Ürenin daha basit, ucuz, doğru ve duyarlı tayinine olanak sağlayan üreaz enziminin kullanıldığı biyosensörlerin geliştirilmesi çok önemli bir ilerlemedir. Üre tayini için çok sayıda biyosensörler geliştirilmiştir. Bunlar; termal (Xie vd 1995), amperometrik (Adeloju vd 1996), kondüktometrik (Chen vd 1994), optik (Stamm vd 1993), piezoelektrik (Xu vd 1996) ve potansiyometrik (Mascini and Palleschi 1983, Alegret and Martinez-Fabregas 1989, Glab vd 1994) yöntemlerdir.

Potansiyometrik üre biyosensörlerinde çok az alete ihtiyaç duyulması avantajdır. Bunlarda sadece iyon - seçici elektrot, pH - seçici elektrot ve iyon - seçici alan etkili transistörlere ihtiyaç duyulmaktadır. Potansiyometrik üre sensörlerinden en önemlileri şunlardır:

- Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan amonyum iyonlarının tayinine yönelik olanlar (Alegret and Martinez-Fabregas 1989, Gil vd 1992, Zamponi vd 1996).
- Amonyak gaz duyar üre sensörleri (Mascini and Palleschi 1983, Narinesingh vd 1991)
- Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen pH değişiminin tayinine yönelik olanlar (Walcerz vd 1995).

## 1.2 Üre ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Guilbault ve Montalvo 1969'da ilk amonyum iyon - seçici potansiyometrik üre biyosensörünü geliştirmiştir. Guilbault ve Shu 1972'de karbondioksit ölçümlerine dayanan üre biyosensörü geliştirmişlerdir.

Guilbault ve Nagy 1973'de üre tayini için amonyum iyonlarının belirlenmesine yönelik silikon kauçuk esaslı nonaktin içeren elektrodun üzeri poliakrilik jelde immobilize edilmiş



ürez kaplanarak biyosensör hazırlamışlardır. Silikon kauçuk ve nonaktin karıştırıp preslenerek pasta haline getirilmiştir. Bu pastadan 5 mm çapında kesilen diskler bir cam tüpün üzerine monte edilerek ürez içeren jel ile kaplanmıştır. Daha sonra iç doldurma çözeltisi olarak 0.1M amonyum klorür eklenerek 0.1M TRIS tamponunda (pH 7.0) ölçümler yapılmıştır. Biyosensörün cevap zamanı 60-180 saniye arasında olup üre konsantrasyonu ve reaksiyonun gerçekleştiği tabakanın kalınlığına bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir.

Mascini ve Guilbault 1977'de amonyak gaz membran elektrodu teflon membran üzerine yerleştirilerek ürez kimyasal olarak immobilize edilmiş ve serumda ürenin ölçümü yapılmıştır. Teflonun enzimatik reaksiyonun gerçekleşme süresini kısalttığı, elde edilen sonuçların bilinen spektroskopik yöntemlerden daha kesin olduğu ve cevap zamanının Orion NH<sub>3</sub> elektrodunun iki kat daha fazla olduğu belirtilmiştir.

Nilsson vd 1973'te cam pH elektrodu üzerine ürezin fiziksel olarak immobilize edilmesi ile pH değişimine dayanan üre sensörü geliştirmişlerdir.

Cha ve Meyerhoff 1989'da selüloz asetat membranının bir tarafındaki asetil grupları baz ile hidrolizleyerek -OH grupları bağlanmış ve membranı karbonildiimidazol ile aktive ettikten sonra bazik ortamda etilendiamin ile muamele ederek kurutmuşlardır. Membranın bu şekilde türevlendirilen yüzünü bir cam elektroda yerleştirmişlerdir. Modifiye olmamış yüzünün metilen klorür ile muamelesinden ve nonaktin ilave edildikten sonra enzim membrana glutaraldehit ile çapraz bağlanarak amonyum iyonlarının tayinine yönelik üre sensörü geliştirilmiştir.

Narinesingh vd 1991'de amonyak gaz - duyar elektrodunun hidrofobik membranı üzerine FMP ile aktive olmuş polivinil alkol (PVA) ürezin kimyasal olarak immobilize edilmesi ile amonyak tayinine yönelik sensörü geliştirmişlerdir. Elektrodun lineer çalışma aralığının 10<sup>-4</sup> - 10<sup>-1</sup>M arasında olduğunu ve 28 günde aktivitesinde %14 azalma olduğunu belirtmişlerdir.

Butt ve Cammann 1992'de modifiye edilmiş PVC, nonaktin ve dibutil sebakat esteri kullanılarak amonyak tayinine yönelik üre sensörü geliştirmişlerdir. Referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot kullanılmıştır. Elektrodun maksimum Nernst eğimi 53 mV/[NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] ve lineer çalışma aralığı 4x10<sup>-6</sup>-6x10<sup>-3</sup>M arasındadır.

Koncki vd 1994'te hidrojen iyonoforu olarak N-tridodesilamin (TDDA), karboksilli PVC (PVC-COOH), potasyum tetrakis (p-klorofenil)borat ve bis-(2-etilhekzil)sebakat (DOS) kullanarak hazırladıkları pH-membran elektroduna ürez karbonildiimidazol (CDI) ve glutaraldehit (GA) kullanarak immobilize etmişlerdir. Lineer aralığı pH 4,5-10 ve bu aralıkta

elektrodun eğimi pH birimi başına 50 mV, cevap zamanı 0,5-2 dakika arasında olan sensörün ömrünün 2 ayın üzerinde olduğu belirtilmiştir.

Walcerz vd 1995'te PVC'nin 1,4-diaminobutan ile modifiye edilmesi ile PVC'ye  $-NH_2$  grupları bağlanmış (PVC- $NH_2$ ) potasyum tetrakis (p-klorofenil)borat ve bis-(2-etilhekzil)sebakat (DOS) kullanarak oluşturdukları membranı cam elektrot gövdesine monte ederek hazırladıkları pH-membran elektroduna üreazı glutaraldehit (GA) kullanarak immobilize etmişlerdir. Çalışmalar 0.005M fosfat tamponunda (pH 6.0) yapılmıştır. Lineer aralığı pH 4.5-9.5 ve bu aralıkta elektrodun eğimi pH birimi başına 50 mV, cevap zamanı 0.5-2 dakika arasında olan sensörün ömrünün 2 ayın üzerinde olduğu belirtilmiştir.

Walcerz vd 1996'da amonyum ve hidrojen karbonatın belirlenmesine yönelik üre biyosensörleri geliştirmişlerdir. Her iki elektrodun hazırlanmasında karboksilli PVC kullanılmıştır. İyonofor olarak amonyum – seçici membranda nonaktin kullanılmıştır. Üreaz membrana karbonildiimidazol (CDI) ve glutaraldehitin (GA) kullanıldığı yöntem ile immobilize edilmiştir. Bu şekilde hazırlanmış amonyum - seçici elektrotların analitik parametreleri modifiye edilmemiş PVC ile elde edilenler ile mukayese edilmiştir. Amonyum-seçici üre biyosensörü ile 0.02M fosfat tamponunda pH 6,0'da çalışılmıştır.

Magalhaes ve Machado 1998'de amonyum-seçici çitosan membran elektrotlara üreazın immobilizasyonu ile üreazın potansiyometrik olarak tayinini gerçekleştirmiştir. PVC, bis-(2-etilhekzil)adipat ve iyonofor olarak da nonaktin içeren membran daha sonra glutaraldehit ile muamele edilmiş ve üreaz buna immobilize edilmiştir. Elektrodun lineer çalışma aralığının  $10^{-4}$ - $10^{-1}$ M arasında, eğiminin 56 mV'e kadar, cevap zamanının ise 30 saniye ve 2 dakika arasında olduğunu ve ömrünün 2 ay olduğunu belirtmişlerdir. Hazırlanan biyosensör ile kanda ürenin tayini de yapılmıştır.

Walcerz vd 1998'de membranında PVC-COOH, nonaktin ve DOS içeren amonyum-seçici membran elektrotlara üreazın immobilizasyonu ile potansiyometrik üre sensörü yapmışlardır. Ürenin tayini FIA sistemi ile yapılmıştır. Lineer çalışma aralığının 0.5-10 mM arasında, cevap zamanının 1.5-3 dakika arasında ve ömrünün 2 aya kadar olduğu bu biyosensör ile kanda ürenin tayini gerçekleştirilmiştir. Koncki vd 1999'da PVC-COOH, hidrojen iyonoforu olarak n-tridodesilamin ve plastikleştirici olarak DOS kullanarak hazırladıkları amonyum-seçici membran elektrot üzerine EDC ile üreazın immobilizasyonunu yaparak potansiyometrik üre sensörü hazırlamışlardır. FIA tekniği ile üre tayini yaparak referans yöntemlerle elde edilen sonuçlarla mukayese etmişlerdir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 Biosensörler

Hızla gelişmekte olan biyoteknoloji ve gıda işlenmesi alanlarında, klinik laboratuvarlarında, kirlilik kontrolünde ve teknolojinin daha bir çok dalında alınan örneğin istenilen özellikleri hakkında hassas ve hızlı bilgi verme özelliği olan analitik cihazlara ihtiyaç vardır. Böyle cihazların en önde geleni, bir fiziksel transduser (sinyal iletici) ve bir kimyasal tabakadan oluşan kimyasal sensörlerdir. Ayrıca konularının özelliği ve çeşitliliği nedeniyle biyokimyasal ve klinik uygulamalar oldukça ilgi çekmektedir. Biyokimyasal analizlerde karşılaşılan başlıca güçlükler şöyle sıralanabilir:

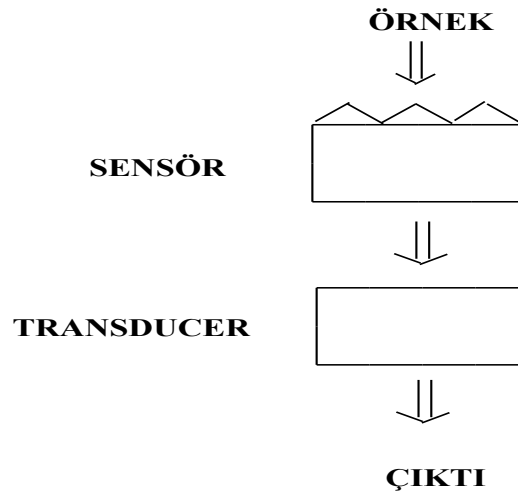
- Analizi yapılacak maddenin genellikle çok karışık bir biyolojik ortamda bulunması nedeni ile girişim veren maddelerin çokluğu, bunlardan ayırma ve saflaştırma problemleri
- Tayini yapılacak maddenin yapısal özellikleri nedeniyle çoğu kez özel ve pahalı reaktiflere gerek duyulması
- Analiz edilecek madde konsantrasyonunun bazı durumlarda çok düşük olması sebebiyle çok spesifik ve duyarlı ölçme yöntemlerinin gerekmesi
- Özellikle kan, doku vb. gibi biyolojik örneklerde, analiz için kullanılacak madde miktarının sınırlı olması

Bunlar ve benzeri sorunlar biyokimyasal analizler için spesifik, duyarlı, çabuk sonuç veren, güvenilir ve ucuz tekniklerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Enzimler çok spesifik katalizörler olduklarından biyokimyasal analizlerde kullanmaya uygundur (Guilbault et.al., 1977). Bunların elektrokimyasal ölçü aletleri ile birleştirilmesi ölçmede sürati ve duyarlılığı sağladığı için araştırmacılara çok cazip gelmiştir. Çeşitli substratlar uygun enzim ve kofaktörler vasıtasıyla membran elektrotların ölçebileceği ürünlere dönüştürülebilirse veya meydana gelen bazı yan ürünler bu elektrotlar için aktif olursa amaca erişilmiş olur. Böylece çok spesifik katalizörler olan enzimlerin yardımı ile bunların katalizlediği reaksiyonları incelemek ve bu reaksiyonlara katılan substrat, koenzim ve oluşan ürünlerin miktarlarını tayin etmek mümkün olur. Bu prensipten hareket eden Hassan ve Rechnitz (1981), L-Tirozinin, tirozin dekarboksilaz ile dekarboksilasyonunda oluşan karbondioksitin ortamdaki koenzim miktarı ile değişmesinden yararlanarak, karbondioksitin potansiyometrik ölçülmesine dayanan çok duyarlı bir piridoksal fosfat tayin yöntemi geliştirmişlerdir.

Biyosensörlerin tarihi 50'li yılların ortalarında L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O<sub>2</sub> miktarını bir elektrot ile izlemesi ile başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons'un Glukoz Oksidaz (GOD) enzimini oksijen elektrodu ile birleştirerek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başardılar (Clark ve Lyons, 1962). Böylece yeni bir analitik sistem oluştu. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifikliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiştir.

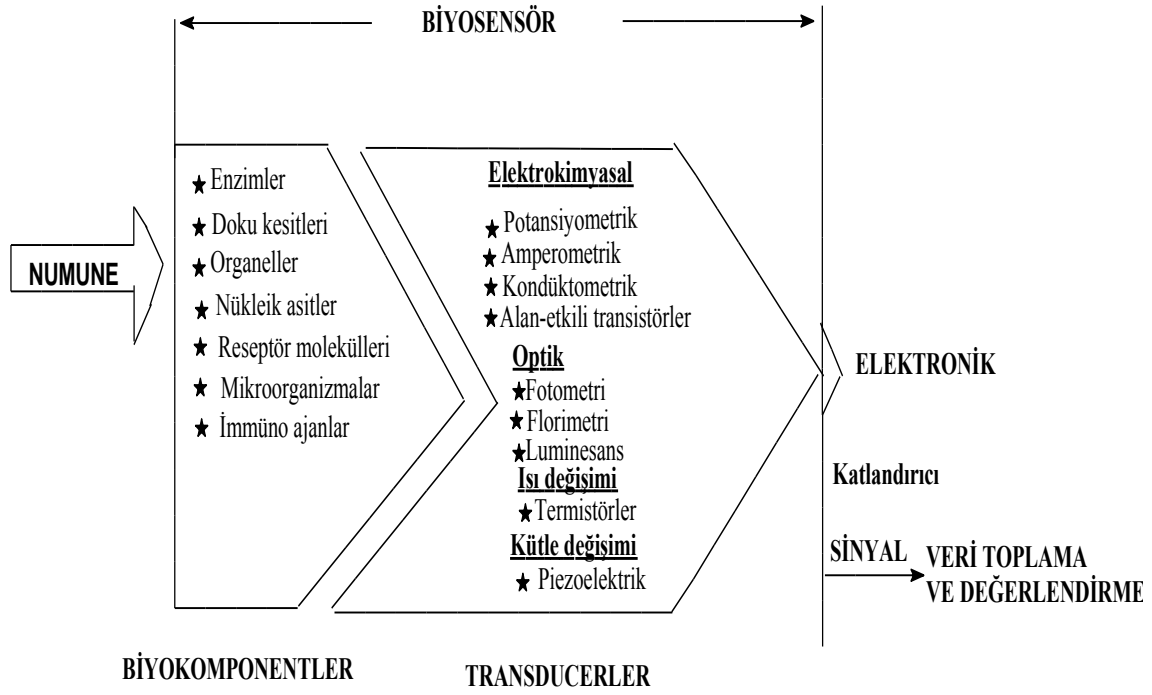
### 2.1.1 Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonları

Biyosensörler, immobilize olmuş bir biyokimyasal komponentin analit ile etkileşmesi sonucunda analitin miktar ve aktivitesi ile orantılı olarak bir sinyalin oluşmasını sağlayan cihazlar ve sistemler olarak tanımlanmaktadır. Biyosensördeki iki temel komponentten birisi bir sensör, diğeri bir transduser (sinyal iletici)dir. Sensör, örnek çözeltisinde bulunan bir biyomolekül ile etkileşen, biyolojik olarak duyarlı bir materyal ile kaplanmıştır. Bu materyalin örnekle etkileşmesi sonucunda meydana gelen değişiklikler transduser tarafından saptanır. Transduser, biyomoleküldeki bu değişimleri ölçülebilen elektrik sinyallerine çevirir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Bir biyosensörün genel şematik gösterimi

Biyosensörlerde biyokomponent olarak enzimler yanında doku kültürleri, mikroorganizmalar, organeller, antikolar ve nükleik asitler de kullanılabilen olup ölçüm tekniğine göre amperometrik, potansiyometrik, termal, piezoelektrik, akustik ve optik sensörler olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Biyosensörlerin genel çalışma prensibi

Biyosensörlerin yüksek spesifikliklerinin yanı sıra, renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir konsantrasyon alanında doğrudan ölçüme olanak sağlaması gibi üstünlükleri de vardır. Fakat kullanılan biyokomponentin pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenmesi biyosensörün kullanım ömrünü kısalttığından bir dezavantajdır (Telefoncu, 1999).

Biyosensör teknolojileri çeşitli alanlarda pek çok bilim alanındaki bilgi birikimini, gelişmeler paralelinde ve gereksinimler doğrultusunda kullanarak çok hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Biyosensörlerin klasik tayin yöntemlerine kıyasla çoğu zaman spesifik ve duyarlı sonuçların pratik ve kısa sürede alınmasını sağlamaları, tekrar kullanılabilir ya da düşük maliyetle tek kullanımlık şekilde seri olarak üretilebilmeleri ve bu türlerin çoğu zaman kullanırken özel deneyim gerektirmemeleri, onları gelecek vaat eden biyoanalitik sistemler olarak ön planda tutmaktadır.

### 2.1.2 Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü ve durum tespitinde çok önemli rol oynar (Telefoncu, 1999). (Çizelge 2.1)

Çizelge 2.1 Biyosensörler için uygulama olanakları

- 
- Klinik diyagnostik ve biyomedikal sektör
  - Proses kontrolü
  - arım ve veterinerlik
  - İlaç analizi
  - Endüstriyel atık su kontrolü,
  - Çevre koruma ve kirlilik kontrolü,
  - Maden işletmelerinde toksik gaz analizi
  - Askeri uygulamalar
- 

Biyosensörler, gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler, bazı anorganik bileşikler yanında enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları

Enzim sensörleri	Küçük molekülü organik ve anorganik maddeler (metabolitler, ilaçlar, gıda maddeleri, vitaminler, antibiyotikler, pestisitler)
Mikrobiyal sensörler	Enzim sensörünün kullanıldığı alanlar, biyolojik O <sub>2</sub> gereksinimi, toksisite, mutajenite
DNA sensörleri	Virüsler, patojen mikroorganizmalar
İmmüno-sensörler	Virüsler, patojen mikroorganizmalar, ksenobiyotikler

---

### 2.1.2.1 Gıda Sekröründe Biyosensör Kullanımı

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

Gıda analizlerinde doğal örneklerin, hammaddelerin, işlem basamaklarının, mamül ürünlerinin, taşıma adımlarında doğal bileşenlerin bozunumu, 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 fermantasyon işlemleri 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.

Gıdalardaki, doğal bileşenlerin yanı sıra biyosensörlerle analiz edilebilecek önemli bir madde grubunu, besinlere karışabilen pestisitler, toksit bileşikler, alerjenler ve mikroorganizma kontaminasyonları oluşturur. Diğer madde grubunu ise, bilinçli olarak besinlere eklenen antioksidan ve antibakteriyal maddeler oluşturur.

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

Gıdalarda tazelik kontrolü, meyvelerde alkol; yağlarda aldehid 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.

### **2.1.2.2 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 konsantrasyonu ile orantılı inhibisyonu izlenir ve sonuca ulaşılır. Hidrojen siyanür ve siyanojen klorür; toksik kimyasalların diğer önemli bir grubunu oluştururlar. Bunlar solunum zincirinde sitokrom oksidazla tepkimeye girerek işlevlerini gerçekleştirirler. Bu ilke temel alınarak, siyanür tayinine yönelik amperometrik esaslı modifiye altın elektrotu geliştirilmiştir.

Biyolojik kökenli toksinleri başlıcaları; mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal toksinlerdir. Mikrobiyal toksinlere örnek; *Clostridium botulinum* tarafından üretilen botulinum toksin A'nın, nörotransmitter salınımını inhibe eder. Bu toksinin tayini için optik esaslı bir sensör üzerinde toksin A antikorları uygun maddelerle immobilize edilerek biyosensör hazırlanmıştır. Bitkisel toksinlere örnek; hint yağı bitkisinin tohumlarından elde edilen bir glikoprotein olan Ricin verilebilir. Ricin protein sentezini inhibe eder. Ricinin analizi için de çeşitli biyosensörler hazırlanmıştır. Hayvansal toksinlerin büyük bir çoğunluğunu yılan zehirleri oluşturmaktadır.

Biyolojik silahlar kitle imha silahları içindeki en problemlili ve tehlikeli olanlarıdır. Nükleer veya kimyasal silahlara göre çok daha fazla insanı hedef alırlar. Diğer silahlara göre maliyetlerinin düşük olması, rutin güvenlik sistemleriyle tespit edilememeleri gibi değişik nedenlerle insanlık için ciddi tehdit oluştururlar. (Özmen, 2009)

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 çıkartmaktadır.

### **2.1.2.3 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. Fakat *Trichosporon cutaneum* kullanılan biyosensörlerle bu ölçüm süresi 15 dakikaya indirilebilir. BOD sensörleri genellikle oksijen elektrodu yüzeyinde tutturulmuş immobilize mikroorganizma membranlarından oluşur. *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* türleri ve karışık mikrobiyal kültürleri kullanılan birçok amperometrik oksijen elektrodu geliştirilmiştir.

Kirlilik kaynağı emisyon derecelerinin ve atmosfer kirliliğinin ölçümü için, mikrobiyal esaslı CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub>, SO<sub>2</sub> gibi gaz temelli birçok biyosensör geliştirilmiştir. Sensör üzerine enzim immobilizasyonu ile sürekli bir ölçüm sistemi oluşturulabilir ve çevresel numunelerde toksik madde tayini yapılabilir.

#### **2.1.2.4 Tıbbi Alanda Biyosensör Kullanımı**

Biyosensörlerin tıbbi analitik sistemlere üstün gelmesinin nedeni, spesifik bir metabolitin veya tedavi de kullanılan ilacın miktarının kısa bir sürede tayin edilebilmesidir. Kısa süreli tayin gerektiren bazı hastalıklar;

- Yoğun bakım ünitelerinde ve cerrahi girişimlerde hızlı doz ayarlama için ilacın kan konsantrasyonunun hızlı tespiti
- Prematür çocukların bakım ve takibi
- İmplant propların 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 elektrodların gidiş gelişini sağlayan elektron transfer mediatörlerin kullanılmasıyla enzimatik redoks işlevini elektrotla birleştiren yaklaşım en başarılı amperometrik enzim elektrotlardır. Mediatörler, oksijenden daha kolay redüklenebilen 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 çözülmüş oksijen, elektrod etrafındaki membranı geçerek elektrot 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 çözülmüş  $O_2$  ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glukozun oksidasyonu için harcanan  $O_2$  olup buradan biyolojik sıvıdaki glukoz miktarı hesaplanır.

Bir başka alanda, gaz duyarlı potansiyometrik esasa dayalı enzim elektrodlarının geliştirilmesidir. Bununla birlikte ilk potansiyometrik enzim elektrodları pH ve katyon olup, anyon seçici elektrod esasına dayanır. Bu tip biyosensörlere en güzel örnek üreye duyarlı elektrodlardır.

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 örneklerindedir. İlaçların, vücuttaki düzeylerinin ayarlanması, kötü amaçla kullanımının engellenmesi ve uyuşturucu ile mücadele için biyosensör çalışmaları yapılmaktadır. (Özdemir, 2006)

### 2.1.3 Enzim Sensörleri

Biyosensör teknolojisinin tarihsel gelişimine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleri ile başladığı görülmektedir. Biyosensör teknolojisindeki ilk örnekler özellikle amperometrik ve potansiyometrik enzim elektrotlar şeklinde ortaya çıkmıştır. Bu durumun en önemli nedeni o tarihteki bilgi birikiminin söz konusu çalışmalar için yeterli düzeye ulaşmış olmasıdır (Telefoncu 1999).

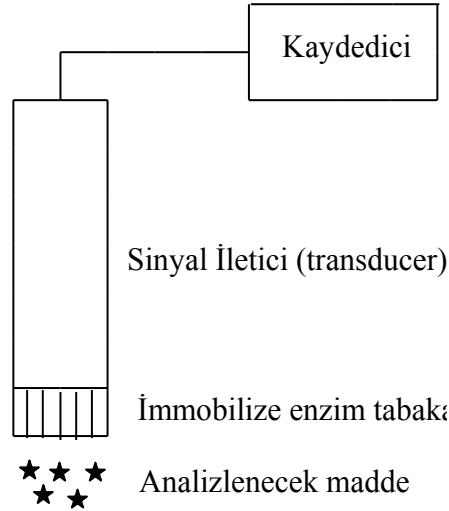
Biyosensör teknolojisinde elektrokimyasal esaslı enzim sensörlerinin tartışılmaz bir üstünlüğü vardır. Bunun en önemli nedeni canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin tayininde doğrudan ya da dolaylı olarak kullanılacak binlerce enzimin varlığıdır. Diğer biyosensörlerde olduğu gibi enzim sensörleri de biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm sisteminden oluşur. Diğer biyosensörlerden tek farkı biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimlerin yer almasıdır (Telefoncu, 1997).

Enzimler, spesifiklik ve duyarlılıklarından dolayı mükemmel analitik ajanlardır. Klinik laboratuvarlarında tedavi amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimler, insan vücudunda meydana gelen önemli biyolojik reaksiyonları çok düşük substrat

konsantrasyonlarında ( $10^{-8}$  M ve daha düşük) ve çok spesifik olarak katalizleyen biyokimyasal katalizörlerdir. Spesifiklik ve hassasiyetlerinden dolayı mükemmel analitik ajanlardır. Klinik laboratuvarlarda tedavi için çok yaygın olarak kullanılırlar. Örneğin, glukoz oksidaz (GOD) ve heksokinaz,  $\beta$ -D-glukozun analizi ile diyabet indikatörü olarak kullanılırlar. Böbrek fonksiyonu tayini, üreaz ile ürenin, kreatininaz ile kreatinin'in analizi ile yapılmaktadır. Her iki analiz yöntemi de günümüzde kabul edilmiştir. Benzer şekilde değişik enzimlerle çok sayıda tayin yapılabilmektedir (Guilbault, 1976).

Ancak, enzimin kararsızlığı, girişim, aktivatör ve inhibitörler, analizin maliyeti vb. güçlükler enzimlerin analitik amaçlarla kullanımını kısıtlamaktadır. Bu güçlükler, enzimler için çeşitli immobilizasyon teknikleri geliştirilerek azaltılmıştır. Serbest enzim immobilize edilerek katalitik aktivitesini daha fazla koruması sağlanır ve çok fazla analizde kullanılabilir.

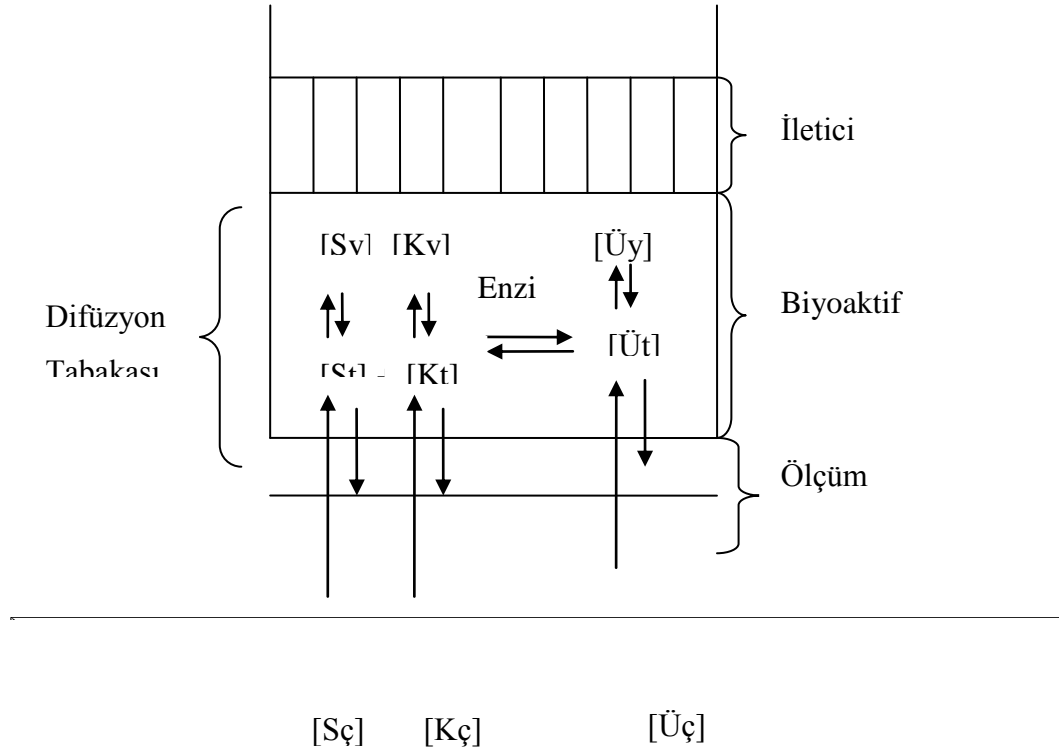
Bir enzim elektrodu, Şekil 2.3'de görüldüğü gibi bir elektrokimyasal sensör üzerine enzimin ince bir tabaka halinde immobilizasyonundan oluşmuştur.



Şekil 2.3 Bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi.

### 2.1.3.1 Enzim Sensörlerinin Genel Çalışma İlkesi

Biyosensörlerde olduğu gibi enzim sensörleri de biyoaktif tabaka, iletici ve sistemlerinden oluşur. Diğer biyosensörlerden farkı enzim sensörlerinde biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimlerin yer almasıdır. Bir enzim sensörünün çalışma ilkesi enzim veya enzimlerin immobilize edilmiş olduğu biyoaktif tabakadaki olayların biraz daha yakından incelenmesi ile daha kolay anlaşılabilir. Şekilde biyoaktif tabakada gerçekleşen olaylar açısından bir enzim sensörünün genel çalışma ilkesi özetlenmiştir.



Şekil 2.4 Enzim sensörünün genel çalışma ilkesi (S: Substrat, K: Koenzim, Ü: Ürünler, ç: Ölçüm çözeltisi içindeki, t: biyoaktif tabakadaki ve y: elektrot yüzeyindeki konsantrasyonlar)

Şekil 2.4'den görüldüğü gibi bir enzim elektrodunda enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği reaksiyona uygun bir iletim sistemi ile birleştirilmektedir. İletim sistemi biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonucu substrat ve/veya koenzim konsantrasyonundaki azalış yada ürün konsantrasyonundaki artışı tesbit edebilecek şekilde seçilebilmektedir. Konsantrasyonların dengeye daha hızlı ulaşabilmesi için ve difüzyon engelini en aza indirmek amacıyla biyoaktif tabaka kalınlığının mümkün olduğunca ince olması gerekmektedir. Ayrıca biyoaktif tabakada sabit bir substrat konsantrasyonu sağlayabilmek için ölçüm çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması gerekmektedir. Tayin edilecek türlerin ölçüm çözeltisindeki, biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka-iletici arayüzeyindeki konsantrasyonları farklı olmaktadır. İletici sistemin ölçeceği sinyal biyoaktif tabaka-iletici arayüzeyindeki konsantrasyonlara aittir.

#### 2.1.4 Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler çok spesifik katalizör olmalarına rağmen özellikle endüstriyel uygulamalarda serbest enzim reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılmadığından reaksiyonun kontrolü oldukça güçtür ve enzimin yeniden kullanılması mümkün değildir. Bu duruma enzimlerin pahalı katalizörler olması da eklenirse maliyet çok artmaktadır.

Enzimleri endüstri için daha çekici hale getirebilmek için otuz yıldan bu yana enzim immobilizasyonu üzerine çalışmalarda çok hızlı artış olmuştur.

İmmobilize enzimin serbest enzime üstünlükleri şu şekilde özetlenebilir:

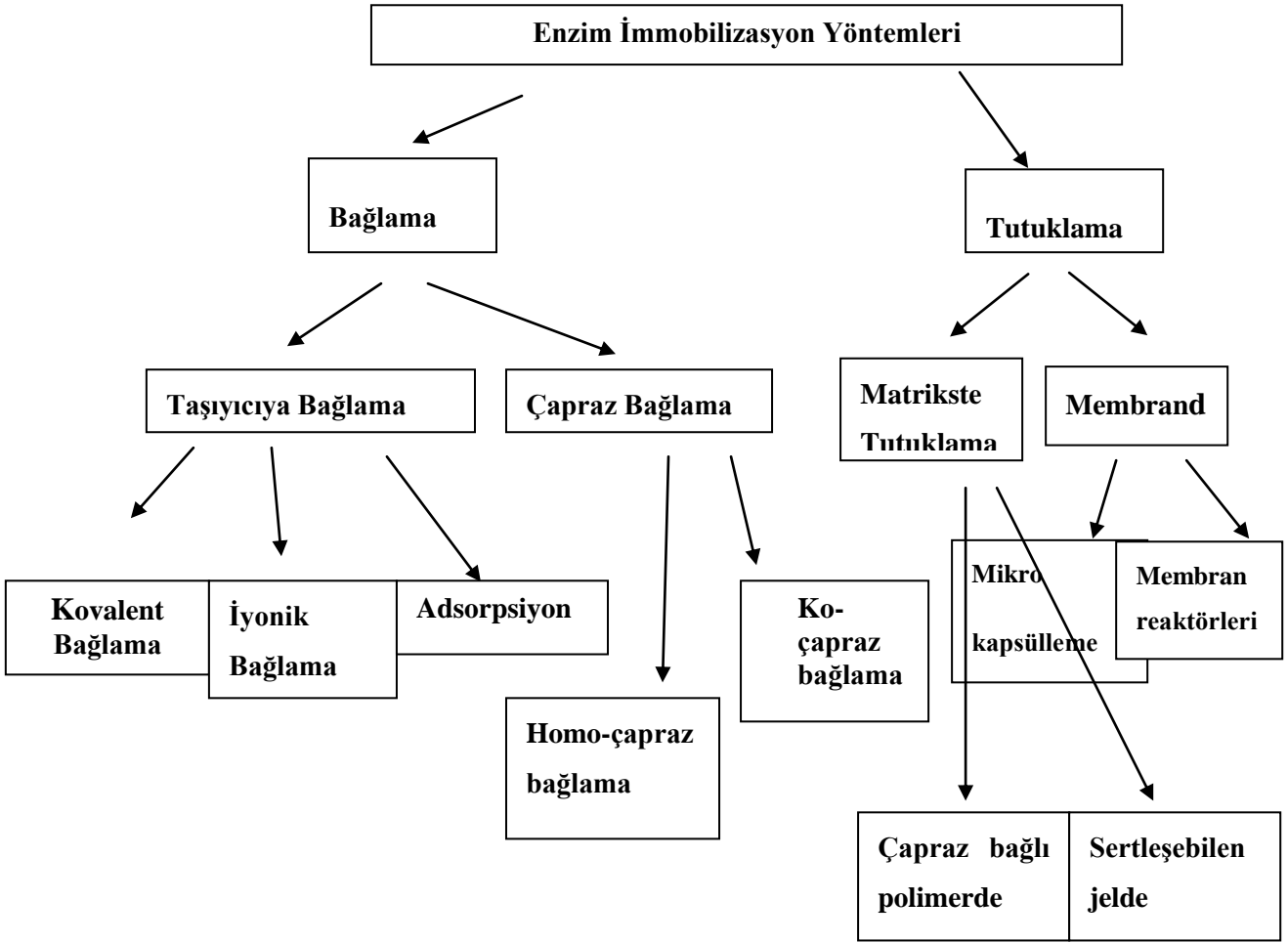
- Serbest enzimden daha karardır.
- Aktivitesini kaybetmeden defalarca kullanılabilir.
- Reaksiyon sonunda ortamdand süzme, santrifüjleme gibi yöntemlerle kolayca uzaklaştırılabilir.
- Daha geniş sıcaklık ve pH aralığında çalışılmasına imkan verir.
- Sürekli ve kesikli işlemlerde rahatlıkla kullanılabilir.
- Çok basamaklı reaksiyonlarda daha fazla mühendislik tasarımına olanak sağlar.
- Daha kararlı olduğu için mekanik çalışmalarda çok uygundur.
- Enzimatik reaksiyon sonucu ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcının aşağıdaki özellikleri taşıması gerekmektedir.

- 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,
- Mikroorganizmalara karşı dirençli olması,
- Zehirli olmaması,
- Ucuz ve yenilenebilir olması gerekmektedir.

### **2.1.5 İmmobilizasyon Yöntemleri**

İmmobilizasyon yöntemi enzimlerin kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna göre belirlenmektedir. Enzimler için uygulanan tüm immobilizasyon yöntemleri protein yapısındaki diğer biyoreseptörler için de uygulanabilir. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması Şekil 2.5. 'de verilmiştir.



Şekil 2.5 Önemli enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

Bir enzimin immobilizasyonu için çeşitli yöntemler vardır. Bunlar kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki kategoride ele alınmaktadır.

#### 2.1.5.1 Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

**Kovalent Bağlama;** enzimin çözünmez bir molekül ile kovalent olarak bağlanarak kimyasal modifikasyonu esasına dayanmaktadır (Zaborsky, 1973; Snere et al., 1976). Kovalent bağlanma, enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleştirilir. Enzimin yapısında bulunan aminoasitler üzerinden yapılmaması ve grupların sterik olarak engellenmemesi gerekir. Biyoreseptörlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonu biyosensörün pH, iyon şiddeti ve sıcaklık değişimlerine karşı direncini artırarak defalarca kullanımına olanak sağlar.

Enzimler doğrudan transdusere bağlanabileceği gibi önceden uygun bir film tabakası ile kaplanmış transdusere de kovalent olarak bağlanabilirler. Büyük molekül ağırlıklı substratların ve makromoleküllerin sterik engellemesi ve immobilizasyon sırasındaki enzim

inaktivasyonundan dolayı immobilize enzim, serbest enzime göre genellikle daha düşük aktivite göstermektedir (Axen et al., 1971). Ancak immobilize enzimin kararlılığı ve dayanıklılığı artacağı için aktivitesinde azalma ve kinetik özelliklerinde değişme olsa dahi serbest enzime göre daha üstün fiziksel ve kimyasal özellikler gösterebilmektedir (Weetall, 1988). Kimyasal olarak kovalent bağlarla immobilize edilmiş enzimlerin özellikleri genellikle bağlanma yöntemine, taşıyıcı maddenin yapısına ve immobilizasyon koşullarına bağlıdır. Kimyasal olarak immobilize edilmiş enzimler ortamdaki geri alınamayacağından bu tür immobilizasyon işlemi tersinmezdir (Zaborsky, 1973).

Kimyasal yöntemler 3 ana grupta incelenmektedir;

- Enzimin çözünmez bir polimere bağlanması
- Enzimin büyüekte olan bir polimer zincirine bağlanması
- Düşük molekül ağırlıklı bileşikler ile enzimin çapraz bağlanması

**Adsorpsiyon yöntemi;** immobilizasyonda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Adsorpsiyon yöntemi enzimin sulu çözeltisi ile adsorplama kapasitesi yüksek olan taşıyıcı maddenin etkileşmesi ile gerçekleşmektedir. Adsorpsiyon işlemi sonrası adsorplanmamış enzim yıkanarak uzaklaştırılmaktadır. Bu yöntemde pH, sıcaklık, çözücünün doğası, ortamın iyonik derişimi ile adsorban ve enzim konsantrasyonları gibi parametreler önem taşımaktadır.

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

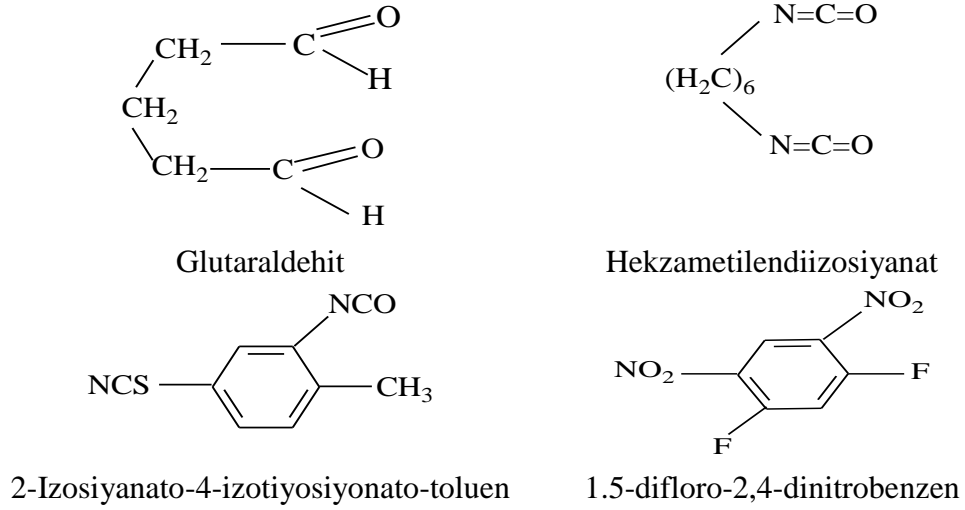
**İyonik Bağlama;** iyon değiştirme yeteneğine sahip, suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması esasına dayanır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim-taşıyıcı arasındaki bağ çok güçlü olmadığı için enzim kaçış söz konusu olabilir.

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

**Biyospesifik Bağlama;** enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak immobilizasyon gerçekleştirilir.

### 2.1.5.2 Çapraz Bağlama Yöntemleri

Bu yöntem tutuklama yöntemi ile kimyasal bağlamanın birleştirilmiş şekli olarak uygulanır. Tutuklanmış biyomolekül glutaraldehit gibi reaktiflerle film veya tabakaya kovalent olarak bağlanır. Çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehit, heksametilendiizosiyanat, diflorodinitrobenzen ve disüksinilsüberat yaygın olarak kullanılır.



Şekil 2.6 Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri

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

**Daldırma yöntemi:** Elektrot önce enzim ve reaktif polimeri veya enzim, albumin, jelatin gibi inert bir protein ve çapraz bağlayıcı reaktif içeren karışıma daldırılır, daha sonra elektrot kendi ekseni etrafında homojen bir enzim tabakası elde edilecek şekilde döndürülür. Bundan sonra elektrot glisin çözeltisine daldırılarak nötürleştirilir ve çapraz bağlayıcı ve diğer reaksiyona girmeyen maddeler yıkanarak uzaklaştırılır. Yöntem çok kolay ve özellikle küçük transduserler (sinyal ileticiler) için çok uygundur (Telefoncu 1999).

**Doğrudan bağlama yöntemi:** Bu yöntemde yaklaşık 10 µL enzim çözeltisi bir kılcal boru yardımıyla dönüştürücü yüzeyine ince bir tabaka oluşturacak şekilde damlatılır. Daha sonra çapraz bağlayıcı reaktif ilave edilir. Bu yöntemde daldırma yöntemine göre daha az madde ile çalışılabilmektedir. Özellikle kullanılacak enzimin çok pahalı olduğu durumlarda kullanılması uygundur (Telefoncu 1999).



### 2.1.5.3 Kopolimerizasyon Yöntemleri

Enzimler bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak polimer matrikse bağlanır. Bu yöntemle enzimin kaçıışı önlenir.

### 2.1.5.4 Tutuklama Yöntemi

Enzimlerin bir membran veya tabaka (matriks) içerisinde hapsedilmesidir. Bu yöntem enzimlerin yanı sıra organeller, hücreler ve antikorlar için de uygulanabilmektedir. Updike ve Hicks tarafından hazırlanan ilk enzim elektrodunda glukoz oksidaz, poliakrilamid jelinde tutuklanmıştır. Guilbault vd hazırladığı üreaz elektrodunda ise üre süspansiyonu elektrot yüzeyinde diyaliz membranı tarafından sarılarak tutuklanmıştır. Tutuklama için en yaygın kullanılan film veya matriksler nişasta, poliakrilamid, silikon lastiği, polivinil klorür ve polivinil alkoldür.

**Polimer jel matrikslerde tutuklama:** Yöntem yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması esasına dayanır. Polimerizasyon sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanarak çözeltiliye geçmeleri engellenmektedir. Polimer matriks, biyokatalizörün dışarı çıkışını engellerken, küçük substratlar ve ürün moleküllerin çıkışına izin verir. Nişasta, poliakrilamid, silikon lastiği, polivinil klorür (PVC), polivinil alkol (PVA) en çok kullanılan polimer matrikslerdir.

**Mikrokapsülleme:** Bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran mikrokapsüller içinde tutuklanmasıdır. Yarı geçirgen membranın gözenek çapları substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin çıkışına olanak verecek büyüklükte olmalıdır.

**Elektrokimyasal polimerizasyon ile tutuklama:** Elektrokimyasal polimerizasyon yöntemi ile enzim immobilizasyonu; enzim, monomer ve sulu çözelti içeren elektrokimyasal bir hücrede yapılmalıdır. Elektrot yüzeyinde iletken polimerin birikmesi sırasında enzim polimere immobilize olur. Reaksiyonun gerçekleşmesi için pH ve sıcaklık gibi parametrelerin enzim aktivitesini etkilemeyeceği şekilde ılımlı şartlar sağlanmalıdır. Son yıllarda bu amaçla kullanılan iletken polimerler polipirol, polianilin, politiyofen ve poliindoldür.

### 2.1.6 Enzim Sensörlerinin Sınıflandırılması

Enzim sensörleri enzimatik reaksiyon sonucu ortaya çıkan sinyalin iletilmesi ilkesine göre sınıflandırılır. Çizelge 2.3’de enzim sensörlerinin sınıflandırılması verilmiştir.

Çizelge 2.3 Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

---

#### 1. Elektrokimyasal esaslı enzim sensörleri

- Amperometrik esaslı enzim elektrotları
  - Birinci nesil amperometrik enzim elektrotları
  - İkinci nesil amperometrik enzim elektrotları
  - Üçüncü nesil amperometrik enzim elektrotları
- Potansiyometrik esaslı enzim elektrotları
  - Amonyum duyar potansiyometrik enzim elektrotları
  - Proton duyar potansiyometrik enzim elektrotları
  - Karbondioksit duyar potansiyometrik enzim elektrotları
  - Diğer iyon duyar potansiyometrik enzim elektrotları
- Yarı iletkenlik esaslı enzim elektrotları
  - Enzim alan etki transistor leri (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

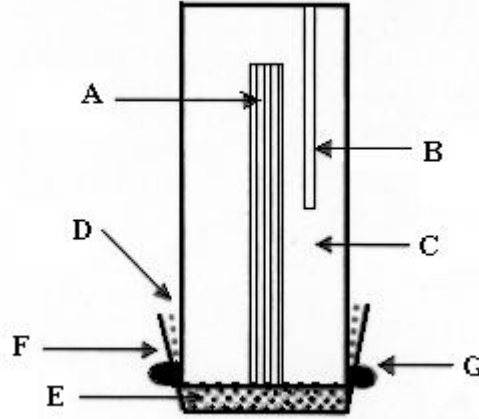
#### 4. Kalorimetrik Esaslı Enzim Sensörleri

---

##### 2.1.6.1 Amperometrik Enzim Sensörleri

Amperometri sabit bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alan sensörlerdir. Akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen veya indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir

fonksiyonudur. Sinyal, elektrot yüzeyine kütle aktarım hızına bağlıdır. Elektroaktif bir ürünün salınıvermesi ya da reaktifin biyokatalitik reaksiyona bağlı olarak tüketimi platin gibi inert bir çalışma elektrodunda doğrudan izlenebilir. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. Şekil 2.3.'de amperometrik esaslı bir enzim sensörünün şeması verilmiştir.



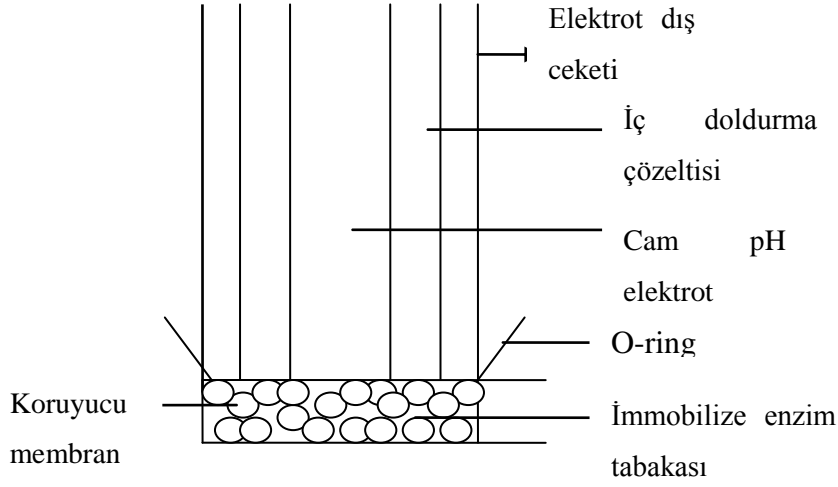
Şekil 2.7 Amperometrik esaslı bir enzim sensörünün şematik gösterimi

(A) Çalışma elektrodu (Pt), (B) Referans elektrot (Ag/AgCl), (C) Elektrolit çözelti (KCl), (D) İç gaz geçirgen membrane (Teflon), (E) İmmobilize enzimi içeren biyoaktif tabaka, (F) Dış koruyucu membrane (Selüloz asetat), (G) O-ring

Sinyal oluşturan türün sensör yüzeyinde tüketilmesi nedeniyle, iletici ile biyoaktif tabaka ara yüzeyindeki ürün derişiminin sıfır olduğu varsayılır. Bu nedenlerden dolayı, amperometrik enzim sensörlerinde denge durumundaki reaksiyon hızı, enzim içeren biyoaktif tabakanın bir yarı geçirgen membranla çevrelenmiş olduğu koşulda, substratın söz konusu membrandan difüzyon hızına eşittir (Telefoncu 1999).

#### 2.1.6.2 Potansiyometrik Enzim Sensörleri

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



Şekil 2.8 Potansiyometrik esaslı enzim sensörünün şematik gösterimi

Şekilde gösterilen sistemde cam elektrot ile gaz duyar membran arasında ince bir doldurma çözeltisi bulunur. Doldurma çözeltisi karbondioksit duyar sensörlerde sodyum bikarbonat, amonyak duyar sensörlerde amonyum klorürdür. Potansiyometrik cevap, enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan gazın ( $\text{CO}_2$  veya  $\text{NH}_3$ ) gaz geçirgen membranı geçerek doldurma çözeltisine difüzyonla geçmesi ve bir pH değişimi oluşturmasıyla belirlenir.

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

### 2.1.6.3 Yarı İletkenleri Esas Alan Enzim Sensörleri

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

#### 2.1.6.4 Optik Esaslı Enzim Sensörleri

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

1. Absorpsiyon Esaslı Optik Enzim Sensörleri
2. Flouresans Esaslı Optik Enzim Sensörleri
3. Biyoluminesans Esaslı Optik Enzim Sensörleri

#### 2.1.6.5 Kalorimetrik Esaslı Enzim Sensörleri

Enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat konsantrasyonunu belirlemekten oluşur. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır.

Biyosensörlerin temel iletici üzerinde immobilize enzim tabakası içermeye, az enzim ve substrat miktarı ile çalışma, pompa ve reaktör sistemlerine gereksinim göstermeme gibi ortak nitelikleri göz önüne alındığında termal biyoanalizör sistemlerinin ideal biyosensör olarak kabul edilmesi mümkün değildir.

Çizelge 2.4 Bazı enzim katalizli reaksiyonların molar entalpi değerleri

Substrat	Enzim	-ΔH (kJ/mol)
Hidrojen peroksit	Katalaz	100,4
Kolesterol	Kolesterol oksidaz	52,9
Glukoz	Glukoz oksidaz	80
Glukoz	Hegzokinaz	27,6
Sodyum piruvat	Laktat Dehidrogenaz	62,1
Üre	Üreaz	6,6
Ürat	Ürikaz	49,1

### **2.1.6.6 Piezoelektrik Esaslı Enzim Sensörleri**

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

Piezoelektrik esaslı enzim sensörlerinde nemlilik ve enzim hidrasyonu gibi enzimatik reaksiyon haricinde kütle artışına neden olabilecek parametrelerin girişim etkileri gözden uzak tutulmamalıdır.

### **2.1.7 Enzim Elektrotlarında Performans Faktörleri**

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

#### **2.1.7.1 Kalibrasyon ve duyarlılık:**

Duyarlılık derişimdeki bir birim değışiklik için biyosensör sinyalinin zamanla değışimi olarak tanımlanır. İdeal olarak bir biyosensörün duyarlılığı biyosensör ömrü boyunca sabit kalmalıdır. Biyosensörün duyarlılığı, analizi yapılacak maddenin bir dizi belli konsantrasyondaki çözeltilerini içeren standart çözeltiler ile yapılan ölçümler sonucu kalibrasyon grafiğı çizilerek kolaylıkla belirlenebilmektedir. Zamanla biyosensörün duyarlılığındaki değışimin belirlenebilmesi için genellikle hergün kalibrasyonun yapılması gerekmektedir (Telefoncu 1999).

#### **2.1.7.2 Kararlılık:**

Kararlılık biyosensör ömrünün uzunluğu hakkında bilgi verir. Uzun ömür aynı materyalle çok sayıda analizin yapılabileceğini anlatır. Bu durumda işgücü ve maliyet açısından önemli avantajlar sağlanır. 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 1999).

#### **2.1.7.3 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 ortamındaki düzeyi ve girişim yapabilecek başka maddelerin olması oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra biyosensör cevabını etkileyen parametreler doğrudan sensör kalibrasyonunu da etkiler. rnek olarak enzim sensörlerinde başlıca pH, sıcaklık ve bozucu türlerin sensör cevabını etkileyerek tayin aralığını değiştirebileceği görülür (Telefoncu 1999).

#### **2.1.7.4 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 1999).

#### **2.1.7.5 Seçicilik:**

İdeal bir biyosensörün sadece hedef analitin derişimindeki değişikliklere cevap vermesi ve diğer türlerin varlığından etkilenmemesi gerekir (Telefoncu 1999). Enzimatik reaksiyonun substrat ve ürünleri ile girişim yapan maddelerin bulunması durumunda sensör sinyali etkilenerek hedef analitin derişimi yanlış tayin edilir. Bu problem, girişim veren maddenin bir n işlemlerle uzaklaştırılması veya bunlardan etkilenmeyen bir sensör kullanılması ile giderilmesi ile giderilebilir.

#### **2.1.7.6 Tekrarlanabilirlik:**

Enzim sensörlerinde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesinde kullanılan enzimin aktivitesi, kararlılığı ve saflık düzeyi büyük önem taşır. Ancak karakteristik özellikleri çok iyi bilinen enzim preparatlarının kullanılması durumunda bile sensör hazırlama aşamaları ve çalışma ortam ve koşulları açısından beklenen niteliklerde büyük farklanmalar gözlenebilir. Bu nedenle hazırlanan sensörle tekrarlanabilirlik denemelerinin gerçekleştirilmesi bir zorunluluktur (Telefoncu 1999).

#### **2.1.7.7 Sıcaklık:**

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

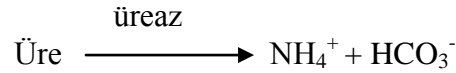
### 2.1.7.8 Tıbbi uygulamalarda kullanılacak biyosensörler için biyouyumluluk:

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

## 2.2 Üre Tayininde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış

### 2.2.1 Üreaz

Ürenin amonyum ve bikarbonat iyonlarına katalizini gerçekleştirir. Üreaz, bakteriyel lümen metabolizmasında kritik öneme sahip bir enzimdir. Üreaz, bakterilerde, mayalarda ve birçok bitkide bulunur. Potansiyometrik üre biyosensörlerinin hepsinde üreaz enzimi kullanılır.



#### 2.2.1.1 Soya fasülyesi (Jack bean) Üreazı

*Canavalia* cinsi, baklagiller familyasındandır ve yaklaşık 70-75 farklı köken içermektedir. Odun arısı gibi böcekler ile tozlaşan parlak fasülye çiçeklerine sahiptirler. Genellikle “jack bean” olarak bilinirler. *Canavalia ensidormis* (jack bean), *C. Gladiata* (Sword bean), *C. Cathartica* içeren birçok çeşidi vardır.

*Canavalia ensidormis*, glikoprotein biyokimyasında ve immunolojide ticari önemi çok fazla olan bir ayıraçtır. *Canavalia ensidormis* yüksek miktarda üreaz enzimi içerir ve üreden zararlı amonyağı serbest bırakır. Bu yüzden bilimsel araştırmalar için başlıca saf üreaz enzim kaynağıdır.

#### 2.2.1.2 Helicobacter pylori Üreazı

Helicobacter türleri insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde yaygın olarak görülen mikroaerofilik spiral şeklinde gram negatif mikroorganizmalardır. *Helicobacter pylori*, mide suyunun asitliğine rağmen mukozanın koruyucu mukus katmanının altına yerleşerek gastrit, ülser gibi klinik tabloların oluşmasında etken olan bir bakteridir.

*H.pylori* 'nin katalaz ve oksidaz reaksiyonu pozitifdir. En belirgin biyokimyasal karakteri yüksek üreaz üretmesidir. Çok güçlü bir üreaz enzimi vardır. *H.pylori* üreazı 61 kD ve 28 kD subunitlerinden oluşan bir heksadimerdir. Üreazın regülasyonu çok kompleks bir olaydır ve en azından 8 genin yer aldığı gösterilmiştir. Bu enzimden bakterinin hızlı tanısında yararlanılır. Üreaz enzimi pH: 4 – 10 arasında aktiftir. İnsan mide mukusunu bozan proteaz

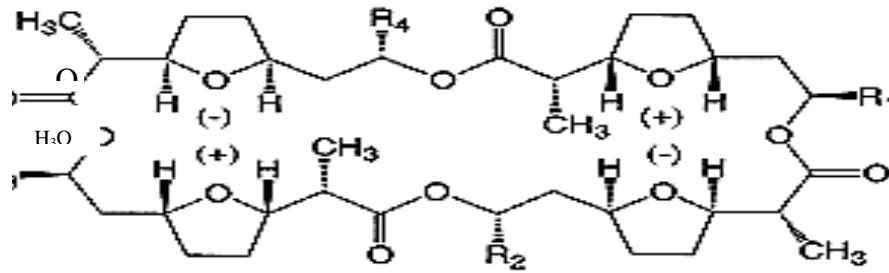


enzimi ve fosfolipaz enzimlerinde vardır.

### 2.2.2 Nonaktin

Günümüzde valinosimin ve makrotetrolit grubu antibiyotikler sırasıyla  $K^+$  ve  $NH_4^+$  kationları için en uygun nötral kompleksleştirici ligandlardır. Bunlardan bazıları ISE'da kullanılır. Kompleksleştirici molekül, çok dişli bir ligand olmalı ve içinde oyuk bulunduran kararlı bir yapıya sahip olabilmelidir. Oyuk, kasyonu içine almaya uygundur. Kasyonlar için polar koordinasyon grupları, ligand atomu olarak tercihan oksijen içermelidir. Nonaktin,  $NH_4^+$  kasyonu için en uygun liganddır, aktinomiset kültürlerinden elde edilir (Şekil 2.10). Nonaktinin dört eter oksijeni amonyum iyonu ile hidrojen bağı oluştururken dört karbonil oksijeni kasyonu dipol interaksyonu ile kararlı hale getirir.

Nonaktin, son zamanlarda amonyum gibi kasyonların mikromolar seviyesinde tayini için ticari iyon seçici elektrotlarda kullanılmaktadır. Böyle iyon-seçici sensörler, biyolojik örneklerde üre ve kreatin konsantrasyonlarının indirekt olarak ölçülmesinde faydalıdır.



- Nonaktin** :  $R_1=R_2=R_3=R_4= CH_3$   
**Monaktin** :  $R_1= CH_2CH_3, R_2=R_3=R_4= CH_3$   
**Dinaktin** :  $R_1=R_3= CH_2CH_3, R_2=R_4= CH_3$   
**Trinaktin** :  $R_1=R_2=R_3= CH_2CH_3, R_4= CH_3$

Şekil 2.9 Nonaktin in yapısı

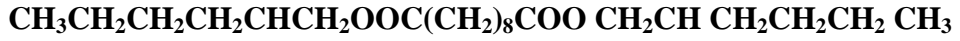
### 2.2.3 Palmitik asit

Palmitik asit (hekzadekanoik asit) bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan doymuş yağ asitlerinden biridir. Molekül formülü  $CH_3(CH_2)_{14}COOH$  olan beyaz katı görünümündedir. Adından da anlaşılacağı gibi palm yağında bulunur ancak tereyağı, peynir, süt ve ette de bulunur. Palmitik asit türevleri II. Dünya Savaşında napalm üretiminde kullanılmıştır.

### 2.2.4 Dioktil Sebakat (DOS)

Dioktil sebakat (DOS) renksiz veya açık sarı renkte ve özel bir kokuya sahip yağimsı bir sıvıdır. Hidrokarbon, alkol, ester tipi, eter, benzen ve diğer organik çözücülerde çözünür. Az buharlaşan ve plastikleştirme hızı yüksek olan DOS, soğuğa ve ışığa karşı dayanıklılık gösterir.

Genellikle PVC, kloroetilen kopolimeri, nitroselüloz (NC), etil selüloz ve sentetik kauçuk, gibi maddeler de plastikleştirici madde olarak kullanılır. Özellikle soğuğa karşı dirençli kabloların, cilt bezinin, ince film, şerit materyalleri vb yapımında kullanılmaktadır. Yapısal formülü Şekil 2.11’de verilmiştir.



Şekil 2.10 Dioktil sebakat’ın yapısal formülü

### 2.2.5 Glutaraldehit

Glutaraldehit, özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan bifonksiyonel bir reaktiftir. Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan biyoaktif materyallerin (enzim, hücre, doku, vb.), jelatin, kollajen, kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehit ile çapraz bağ oluşturması esasına dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça sık kullanılmaktadır. Yöntem kolay uygulanabilir olması yanında immobilize sistemin termal, operasyonel ve depo kararlılığını artırması bakımından tercih edilmektedir (Akyılmaz 2002).

### 2.2.6 Poli(vinilklorür) (PVC)

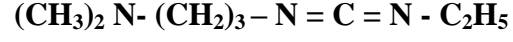
İyonoforlar ile birlikte poli(vinil klorür) (PVC) nin kullanımı (Butt and Cammann 1992, Saurina vd 1998) biyosensörlerin cevap süresinin daha kısa olması, tekrarlanabilirliğinin iyi olması ve tasarımının kolay olması gibi avantajlar sağlamaktadır.

Genellikle enzimler PVC iyon-seçici membranlara glutaraldehit çapraz bağlama reaksiyonları ile immobilize edilirler (Butt and Cammann 1992, Bilitewski vd 1992). Fakat PVC membranın hidrofobik yüzeyine enzimin immobilize edilmesi zordur. PVC membranda fonksiyonlu gruplar oluşturarak daha etkili enzim immobilizasyonu gerçekleştirilebilir. Bu amaçla Koncki vd (1994) karboksilli PVC kullanarak üreazın immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Walcerz vd (1995), PVC’yi 1,4- diaminobutan ile modifiye ederek,

PVC-NH<sub>2</sub> sentezlemişler ve üreazı buna immobilize etmişlerdir.

### **2.2.7 1- etil – 3 - (3 - dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC)**

Formülü Şekil 2.12’de görülen 1 - etil - 3 - (3 - dimetilaminopropil) karbodiimid, çalışmada poli(vinilklorür) membranı aktifleştirmek amacı ile kullanılmıştır.



Şekil 2.11 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) karbodiimid’in formülü

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Kullanılan Cihazlar

Çözeltilerin potansiyel ve pH ölçmeleri ORION 720A pH - iyonmetre ile yapıldı. Referans elektrot olarak çift temaslı gümüş - gümüş klorür elektrot kullanıldı (Orion 90-02). Bu elektroda iç dolgu çözeltisi olarak ORION 900002 ve 900003 katalog numaralı çözeltiler dolduruldu. Çözelti ilaveleri için Brand marka mikro pipetler kullanıldı. Bu çalışmada kullanılan bidestile su PURELAB Classic cihazı kullanılarak temin edildi.

#### 3.2 Serum Numuneleri

Üre tayininde kullanılan serum numuneleri **Rentek Diyaliz Merkezi**'nden temin edildi.

#### 3.3 Kullanılan Enzimler

Çalışmada kullanılan üreaz enziminin numarası, elde edildiği kaynak ve temin edildiği firma Çizelge 3.1'de verildi.

Çizelge 3.1 Kullanılan enzimlerin adları, numaraları, kaynakları ve temin edildikleri firmalar

Enzimin Adı	Numarası	Kaynağı	Firması
Üreaz (5 U/mg)	EC 3.5.1.5	Jack Beans	E. Merck (Darmstadt, FRG)

#### 3.4 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan glutaraldehit, palmitik asit, 1-etil-3,3-dimetilaminopropil karbodiimid (EDC), Trizma Bazı ve Trizma HCl Sigma'dan; nonaktin, bis-(2-etil) hekzil sebakat (DOS), poli(vinil klorür) (PVC), karboksilli poli(vinil klorür) (PVC-COOH), üre ve amonyum klorür Fluka'dan, tetrahidrofuran (THF) Merck'den temin edildi ve saflaştırılmadan kullanıldı.

### 3.5 Kullanılan Çözeltiler

#### 3.5.1 TRIS tampon çözeltisi

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

Trizma-HCl çözeltisi: 7,88 g trizma-HCl suda çözülerek hacmi 500 mL'ye tamamlanarak 0,1 M'lık stok çözelti hazırlandı.

Hazırlanan stok çözeltilerden belli oranlarda karıştırılarak pH 7,2'ye ayarlandı. Tampon çözeltiler kullanılmadıkları zaman buzdolabında saklandı.

#### 3.5.2 Amonyum klorür çözeltileri

**Stok amonyum klorür çözeltileri:** 1,0 M 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 3.2'de belirtildiği şekilde üç günde bir taze olarak hazırlandı.

Çizelge 3.2 Amonyum klorür kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Hazırlanan Amonyum klorür çözeltileri (M)	İlave edilen stok amonyum klorür çözeltileri (M) (mL)							0,1 M TRIS Tamponu (mL)
	1,0	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6}$	
$1,0 \times 10^{-1}$	5,00							5,00
$5,0 \times 10^{-2}$	2,50							5,00
$2,5 \times 10^{-2}$	1,25							5,00
$1,0 \times 10^{-2}$		5,00						5,00
$5,0 \times 10^{-3}$		2,50						5,00

$2,5 \times 10^{-3}$		1,25						5,00
$1,0 \times 10^{-3}$			5,00					5,00
$5,0 \times 10^{-4}$			2,50					5,00
$2,5 \times 10^{-4}$			1,25					5,00
$1,0 \times 10^{-4}$				5,00				5,00
$5,0 \times 10^{-5}$				2,50				5,00
$2,5 \times 10^{-5}$				1,25				5,00
$1,0 \times 10^{-5}$					5,00			5,00
$5,0 \times 10^{-6}$					2,50			5,00
$2,5 \times 10^{-6}$					1,25			5,00
$1,0 \times 10^{-6}$						5,00		5,00
$5,0 \times 10^{-7}$						2,50		5,00
$2,5 \times 10^{-7}$						1,25		5,00
$1,0 \times 10^{-7}$							5,00	5,00
pH lar 7,0'ye ayarlandıktan sonra herbir çözeltinin hacmi bidestile su ile 50,00 mL'ye tamamlandı.								

### 3.5.3 Üre çözeltileri

1,5015g üre bidestile suda çözülüp hacmi 25 mL'ye tamamlanarak 1,0 M'lık çözeltisi hazırlandıktan sonra gerekli seyreltmeler yapılarak  $1,0 \times 10^{-1}$ -  $1,0 \times 10^{-6}$  M konsantrasyon aralığında stok üre çözeltileri hazırlandı.

**Üre tayini için kalibrasyon çözeltileri:** Kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi için kullanılan üre çözeltileri Çizelge 3.3'de belirtildiği şekilde üç günde bir taze olarak hazırlandı.

Çizelge 3.3 Üre kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Hazırlanan üre çözeltileri (M)	İlave edilen stok üre çözeltileri (M) (mL)							0,1 M TRIS Tamponu (mL)
	1,0	1,0×10 <sup>-1</sup>	1,0×10 <sup>-2</sup>	1,0×10 <sup>-3</sup>	1,0×10 <sup>-4</sup>	1,0×10 <sup>-5</sup>	1,0×10 <sup>-6</sup>	
1,0×10 <sup>-1</sup>	5,00							5,00
5,0×10 <sup>-2</sup>	2,50							5,00
2,5×10 <sup>-2</sup>	1,25							5,00
1,0×10 <sup>-2</sup>		5,00						5,00
5,0×10 <sup>-3</sup>		2,50						5,00
2,5×10 <sup>-3</sup>		1,25						5,00
1,0×10 <sup>-3</sup>			5,00					5,00
5,0×10 <sup>-4</sup>			2,50					5,00
2,5×10 <sup>-4</sup>			1,25					5,00
1,0×10 <sup>-4</sup>				5,00				5,00
5,0×10 <sup>-5</sup>				2,50				5,00
2,5×10 <sup>-5</sup>				1,25				5,00
1,0×10 <sup>-5</sup>					5,00			5,00
5,0×10 <sup>-6</sup>					2,50			5,00
2,5×10 <sup>-6</sup>					1,25			5,00
1,0×10 <sup>-6</sup>						5,00		5,00
5,0×10 <sup>-7</sup>						2,50		5,00
2,5×10 <sup>-7</sup>						1,25		5,00

$1,0 \times 10^{-7}$							5,00	5,00
pH lar 7,0'ye ayarlandıktan sonra herbir çözeltinin hacmi bidestile su ile 50,00 mL'ye tamamlandı.								

### 3.5.4 Çalışma elektrodu iç dolgu çözeltisi

Amonyum, üre tayini için hazırlanan çalışma elektrotlarında iç dolgu çözeltisi olarak Çizelge 3.2'de belirtildiği gibi hazırlanan  $1,0 \times 10^{-2}$  amonyum klorür (pH 7,0) çözeltisi kullanıldı.

### 3.5.5 Serumda ürenin tayini için (Standart Katma Yönteminde) kullanılan çözeltiler

Standart katma yöntemiyle amonyum elektrodu ile üre biyosensörleri yardımıyla amonyum ve üre tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'de verildi.

Çizelge 3.4 Amonyum klorür çözeltilerinin hazırlanması

	Çözelti No.						
	1	2	3	4	5	6	7
İlave edilen $10^{-2}$ M $\text{NH}_4\text{Cl}$ çözeltisi (mL)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
0,01 M TRIS tamponu (pH 7,0) (mL)	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75
Serum ( $\mu\text{L}$ )	100	100	100	100	100	100	100
Saf su ilave edilerek çözeltiler belirlenen optimum pH'a ayarlanarak çözelti hacmi 25,0 mL'ye tamamlandı.							



Çizelge 3.5 Üre çözeltilerinin hazırlanması

	Çözelti No.						
	1	2	3	4	5	6	7
İlave edilen $10^{-2}$ M üre çözeltisi (mL)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
0,01 M TRIS tamponu (pH 7,0) (mL)	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75
Serum ( $\mu$ L)	100	100	100	100	100	100	100
	Saf su ilave edilerek çözeltiler belirlenen optimum pH'a ayarlanarak çözelti hacmi 25,0 mL'ye tamamlandı.						

### 3.6 Amonyum - Seçici Elektrotlar

#### 3.6.1 Amonyum - seçici elektrotların hazırlanması

Karboksilli PVC ve palmitik asit içeren PVC kullanılarak hazırlanan amonyum-seçici membranların bileşimleri sırasıyla Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7'de verildi

Çizelge 3.6 PVC ve palmitik asit kullanılarak hazırlanan amonyum-seçici membranların bileşimi

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

Çizelge 3.7 Karboksilli PVC (PVC-COOH) kullanılarak hazırlanan amonyum-seçici membranların bileşimi

Membran bileşenleri	Membran II	
	%	Kütle, mg
PVC-COOH	32,5	151,6
Nonaktin	3,0	12,6
Bis-(2-etil)hekzil sebakat(DOS)	64,5	257,8
Tetrahidrofuran(THF)	5 mL	

Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7’de verilen I ve II numaralı membranları hazırlamak için 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 5 mm çapında yuvarlak diskler kesilerek cam bir tüpün ucuna monte edildi. Bu tüpün içerisine iç dolgu çözeltisi olarak  $1,0 \times 10^{-2}$  M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH 7,0) 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 /  $1,0 \times 10^{-2}$  M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH 7) / 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  $25,0 \pm 1,0$  °C’de yapıldı.

### 3.6.2 Amonyum elektrotlarının analitik özellikleri

#### 3.6.2.1 Çalışma aralıklarının ve eğimlerinin belirlenmesi

Çizelge 3.2’de belirtildiği şekilde hazırlanan amonyum klorür çözeltileri kullanılarak her bir çözeltinin potansiyelleri (mV olarak) okundu ve amonyum konsantrasyonlarının logaritmasına karşı ( $\log [\text{NH}_4^+] - E$ ) grafiğe geçirilerek elektrotların doğrusal çalışma aralığı ve eğimleri belirlendi.

### 3.6.2.2 Tampon konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi

Amonyum elektrotlarının performansına tampon konsantrasyonunun etkisini incelemek için, 6 farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 mM) TRIS tamponu kullanılarak hazırlanan amonyum klorür çözeltilerinin pH'ları 7,0'ye ayarlandı. Hazırlanan amonyum elektrodunun her biri ile potansiyel ölçümleri yapılarak kalibrasyon grafikleri çizildi ve amonyum elektrotlarının eğimleri belirlendi.

### 3.6.2.3 pH'nın etkisinin belirlenmesi

Amonyum elektrotlarının performansına pH'nın etkisini incelemek için 8 farklı pH'da (6,0; 6,5; 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8 ve 8,0) ve 5 mM tampon konsantrasyonunda amonyum klorür hazırlandı ve kalibrasyon grafikleri çizilerek eğimleri belirlendi.

### 3.6.2.4 Karıştırma hızının etkisinin belirlenmesi

Amonyum elektrotlarının cevabına karıştırma hızının etkisini araştırmak amacıyla, manyetik karıştırıcının hızı 100, 250 ve 750 olmak üzere ayarlanarak üre çözeltilerinin potansiyellerinin kararlı hale gelmesi için beklendi ve kararlı potansiyele ulaşmak için geçen süre kaydedildi.

### 3.6.2.5 Cevap süresinin belirlenmesi

Amonyum elektrotlarının cevap süresini bulabilmek için Çizelge 3.2'deki gibi hazırlanan amonyum klorür kalibrasyon çözeltilerinin her birine amonyum elektrotları daldırılarak potansiyellerinin kararlı hale gelmesi için gerekli süre kaydedildi.

## 3.7 Üre Biyosensörleri

### 3.7.1 Üre biyosensörlerinin hazırlanması

Bölüm 3.6'da belirtildiği şekilde hazırlanan ve amonyuma duyarlılığının iyi olduğu belirlenen iki farklı membran kullanılarak hazırlanan amonyum elektrotların membranlarına hem ticari üreaz enzimi, hem de *Helicobacter pylori*'den elde edilen üreaz enziminin kimyasal olarak immobilize edilmesi ile üre biyosensörleri hazırlandı. Bu amaçla dört farklı immobilizasyon işlemi yapıldı:

**İşlem A:** 30 mg üreaz ve 5 mg karbodiimid 1 mL bidestile suda çözüldü. Bu çözeltiden 50 µL alınarak membranların yüzeyine kondu ve suyun uzaklaşması için bir gece buzdolabında bekletildi.

**İşlem B:** İşlem A’da hazırlanan iki farklı elektrodun membranına % 2,5’luk glutaraldehit çözeltisinden 50 µL uygulanarak yarım saat bekletildi. Daha sonra elektrot yüzeyi bidestile su ile yıkanarak glutaraldehitin aşırısı uzaklaştırıldı.

**İşlem C:** İşlem B’de hazırlanan iki farklı elektrodun membranına 50 µL üreaz çözeltisi (30 mg üreaz/mL deiyonize su) kondu ve bir gece buzdolabında bekletildi.

**İşlem D:** İşlem C’de hazırlanan iki farklı elektrot membranı 20 mL TRIS tamponu (0,1 M, pH 7,0) içine daldırıldı ve daha sonra manyetik karıştırıcı ile hızla karıştırıldı. 15 dakika sonra TRIS tamponuna küçük bir miktar sodyum tetrahidroborat (NaBH<sub>4</sub>) ilave edilerek tampon çözeltisi 15 dakika daha karıştırılarak immobilizasyon işlemi sırasında oluşan imin grupları indirgendi.

İmmobilizasyon yöntemleri sonunda 4 farklı üre biyosensörü elde ettik. Çizelge 3.8.’de her bir üre biyosensörü için kullanılan membran ve üreaz çeşidi gösterilmektedir.

Çizelge 3.8 Üre biyosensörlerinde kullanılan membran ve üreaz çeşitleri

Biyosensörün Adı	Kullanılan Membran	Kullanılan Üreaz
I	PVC + Palmitik Asit	Ticari (Jack bean) üreaz
II	PVC - COOH	Ticari (Jack bean) üreaz
III	PVC + Palmitik Asit	<i>H.pyloriden</i> saflaştırılmış üreaz
IV	PVC - COOH	<i>H.pyloriden</i> saflaştırılmış üreaz

Hazırlanan biyosensörler kullanılmadığı zaman buzdolabında saklandı.

### 3.7.2 Üre biyosensörlerinin çalışma aralıklarının ve eğimlerinin belirlenmesi

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

**Referans elektrot / üre çözeltisi /membran/ $1,0 \times 10^{-2}$  M NH<sub>4</sub>Cl (pH 7) / Ag;AgCl**

Elektrokimyasal hücredeki üre çözeltilerinin konsantrasyonu  $1,0 \times 10^{-1}$  -  $1,0 \times 10^{-6}$ M arasında değiştirildi. Üre çözeltilerinin pH’ları Trizma bazı ile optimum pH’a ayarlandı ve hazırlanan

elektrotlar için ayrı ayrı hücre potansiyelleri kaydedildi. Her bir elektrot için log [üre]'ye karşı potansiyel değerleri (mV) grafiğe geçirildi ve biyosensörlerin doğrusal çalışma aralığı ve eğimleri belirlendi.

### **3.8 Üre Biyosensörlerinin Amonyuma ve Üreye Cevabının Belirlenmesi**

#### **3.8.1 Üre biyosensörlerinin amonyuma cevabının belirlenmesi**

Hazırlanan üre biyosensörlerinin amonyuma duyarlı olup olmadığını anlamak için her bir biyosensör ile amonyum klorür kalibrasyon çözeltilerin potansiyelleri okunarak kalibrasyon grafikleri çizildi.

#### **3.8.2 Üre biyosensörlerinin üreye cevabının belirlenmesi**

Hazırlanan üre biyosensörlerinin üreye duyarlı olup olmadığını anlamak için her bir biyosensör ile Çizelge 3.3'te belirtildiği gibi hazırlanan üre çözeltilerinin potansiyelleri okunarak kalibrasyon grafikleri çizildi.

### **3.9 Üre Biyosensörlerinin Performanslarına Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi**

Üre biyosensörlerinin cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun, pH'nın, sıcaklığın, karıştırma hızının etkisi ve bu biyosensörlerin seçicilik katsayıları, cevap süresi ve ömrü tayin edildi.

#### **3.10 Üre Biyosensörlerinin Tekrarlanabilirliği**

Tekrarlanabilirlik, 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 ve elde edilen değerlerden standart sapma ve korelasyon katsayısının hesaplanmasıdır.

Aynı gün içinde aynı biyosensör ile hazırlanan üre kalibrasyon çözeltileri ile iki saatte bir, beş defa ölçüm alınarak kalibrasyon grafikleri çizilerek her bir grafiğin eğimi belirlendi. Eğim değerlerinin bağıl standart sapma (B.S.S) değerleri hesaplandı. B.S.S değeri %10 dan az ise biyosensörün tekrarlanabilirliği yüksektir.

### 3.11 Üre Biyosensörleri ile İnsan Serumunda Üre Tayini

Hazırlanan üre biyosensörleri ile hemodiyaliz hastalarının serumunda standart katma yöntemi kullanılarak üre tayini yapıldı. Bulunan sonuç, diyaliz merkezinden aldığımız sonuç ile kıyaslandı.

Üre biyosensörü ile serumda üre tayini için ilk olarak, amonyum elektrodu ile Standart katma yöntemi kullanılarak Bölüm 3.5.5.'deki gibi hazırlanan çözeltilerde ayrı ayrı potansiyel ölçümleri yapıldı ve mV-ilave edilen amonyum klorür (mL) grafiğe geçirilerek **a değeri** bulundu.

Ayrıca üre biyosensörü ile yine standart katma yöntemi kullanılarak Bölüm 3.5.6.2'deki gibi hazırlanan üre çözeltilerinde ayrı ayrı potansiyel ölçümleri yapıldı ve mV-ilave edilen üre (mL) grafiğe geçirilerek **b değeri** bulundu.

Üre biyosensörü ile hesaplanan toplam amonyum miktarından bu miktar çıkarılıp sonuç ikiye bölünerek ( $b - a / 2$ ) serumdaki üre derişimi hesaplandı (Magalhaes and Machado, 1998).

**Amonyum elektrodu ile elde edilen amonyum değeri : a**

**Üre biyosensörü ile elde edilen amonyum değeri : b ise**

**Hasta serumunda bulunan üre miktarı =  $b - a / 2$  olmaktadır.**

Diyaliz merkezinden ve standart katma yönteminden elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilerek her iki yöntemle elde edilen sonuçların birbiri ile uyumlu olup olmadığı incelendi.

### 3.12 *Helicobacter Pyroli*'den üreaz enziminin elde edilmesi

#### 3.12.1 Bakteri İzolasyonu ve Çoğaltımı

##### 3.12.1.1 Kültür İçin Biyopsi Numunelerinin Toplanması

Kültür için alınan biyopsi örneği antrum büyük kurvaturdan alındı. Ağız ve mide arasındaki bölgede çok sayıda başka bakteri olabileceğinden biyopsi alımı için aşağıda gösterilen özel bir

yöntem uygulandı (Abasıyanık, 2005).

- i) 500 ml steril su, 100 ml % 0.8'lik steril tuzlu çözelti (salin), 1.5 ml'lik steril ependorf tüpler, 20 ml %70'lik etil alkol, steril iğne ucu hazır edildi.
- ii) Biyopsi pensi ve endoskopi cihazı biyopsi alımı öncesi hemşireler tarafından 15 dakika rutin kullanılan %10'luk formalin içeren dezenfektanlarla muamele edildi.
- iii) Dezenfeksiyon sonrası endoskopi cihazının biyopsi kanalından 50 ml steril su geçirildi. Ayrıca biyopsi pensinin ucu önce alkol içine daha sonrada steril salin içersine daldırıldı.
- iv) Operasyon esnasında alınan ilk biyopsinin kültür için alınmasına dikkat edildi.
- v) Antrumdan alınan bu ilk biyopsi steril ependorf tübüne bırakılıp üstüne 2-3 damla steril salin damlatıldı.
- vi) Biyopsili tüp özel soğuk aküler içine konup 4°C'de muhafaza edildi.

Bu şekilde 4-5 saat muhafaza edilmesi halinde ciddi bir verim kaybı olmadığı gözlemlendi. Hatta, 3 gün 4°C'de saklanan biyopsilerden bile bakteri izole edildi.

### **3.12.1.2 Biyopsi Numunelerinden Bakterinin İzolasyonu**

Bu basamak sadece simptomatik hastalara ve takip programına dahil olan hastalara uygulandı.

*Helicobacter pylori*'nin biyopsi'den izolasyonu için konvansiyel yöntemlerden faydalanarak yeni bir metot geliştirildi.

- i) 4°C'de saklanan biyopsiler steril bir ortamda (laminar flow altında ) steril cam yüzeyler üzerinde steril lansetlerle parçalandı (Homojenizatör'e göre lanset kullanımının daha etkili olduğu görüldü). Bu basamakta özellikle parçalanan biyopsi kalıntılarının kurumamasına dikkat edildi.

ii) İnokülasyon özesiyle biyopsi parçaları yeni hazırlanmış (en geç 1 haftalık olmalı) tripton soya agar (%5 at kanı içeren) veya kolombiya agarlarına (%5 at kanı içeren) ekildi.

iii) Yeni ekilmiş besiyeri tabakaları CO<sub>2</sub>'lu inkübatörde (%10 CO<sub>2</sub>, 37°C, %90'ın üzerinde nemli mikroaerobik atmosfer) bir hafta inkübe edildi. Burada en çok dikkat edilen nokta inkübatörün içindeki nemin muhafaza edilmesidir. Bu amaçla inkübatörün raflarına ıslak kağıt havlu konuldu.

iv) Bir hafta sonunda besiyerlerinde bakteri olup olmadığı kontrol edildi. Bakterilerin koloni morfolojileri (gri, parlak, ufak koloniler), gram boyamaya negatif cevap vermeleri, mikroskop altında spiral yapıları, üreaz, katalaz ve oksidaz testlerine pozitif cevap vermeleri besiyerindeki bakterinin *H. pylori* olduğunu göstermekteydi.

### 3.12.1.3 *H. pylori* Üretimi ve Hasadı

Birincil (primer) üretimden sonra uygun koloniler seçildi. Bu besiyerinde farklı *H. pylori* suşları bulunabileceği ihtimalinden dolayı yeni bir besiyerine tek koloni ekimi yapıldı. Tek koloni ekimi sonucu elde edilen *H. pylori* suşu üretime alındı. Yaklaşık 40 tabaka bakteri elde edildiğinde üretim durduruldu.

Besiyerindeki bakteri kolonileri steril çubuklar kullanılarak steril fosfat tampon salin içersine aktarıldı ve hasat edildi. Agar üzerinden toplanan koloniler içinde tamponlu salin ihtiva eden 1,5 ml'lik ependorf tüp içinde toplandı. Elde edilen yaklaşık 40 ml'lik hasat immobilizasyon anına kadar -70°C'de muhafaza edildi.

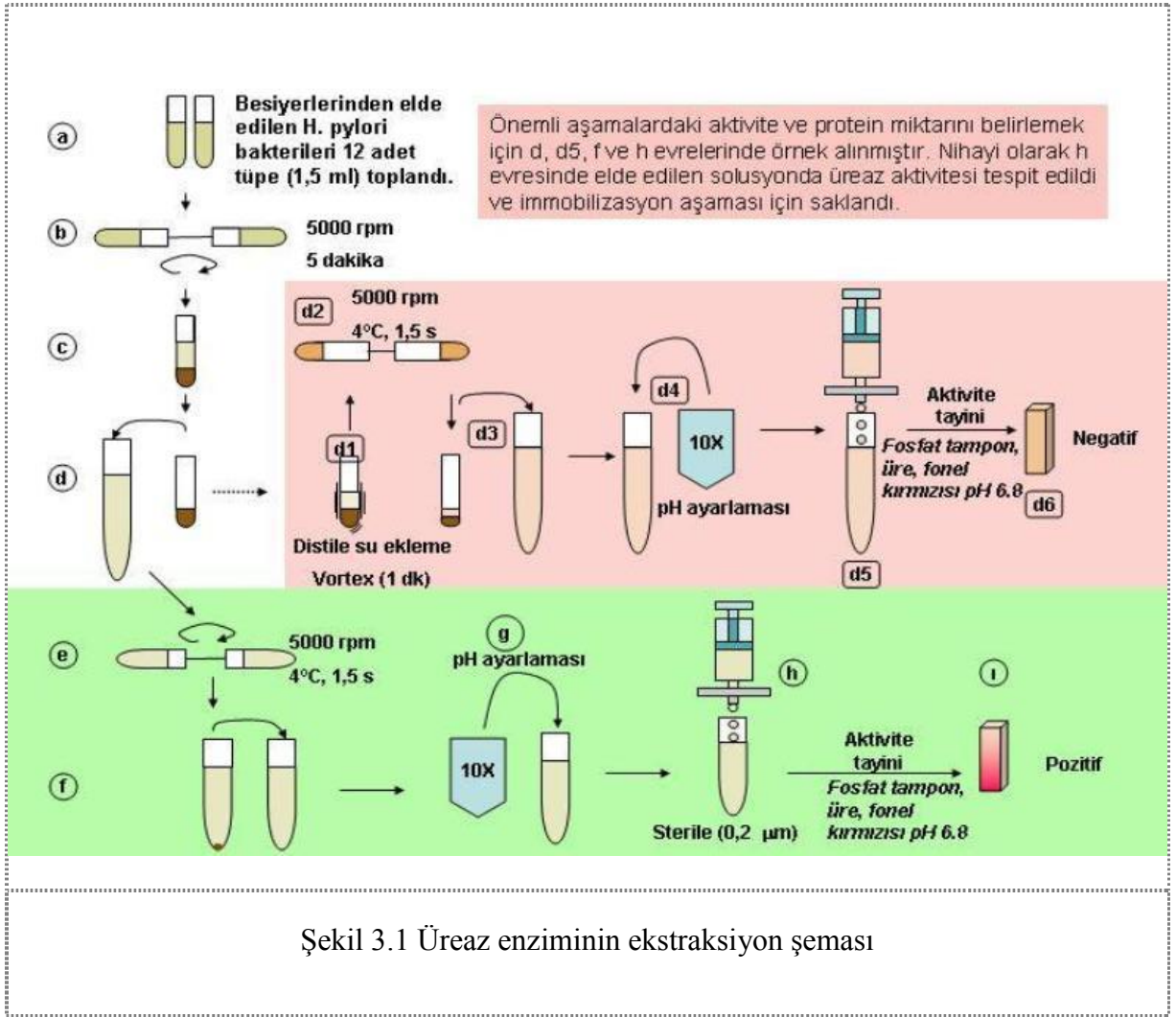
Gelecekte yapılacak çalışmalar için steril gliserinli saklama çözeltilisine alınan yarım tabaka bakteri azot tankında şokla dondurularak -20°C derin donduruda muhafaza edildi.

### 3.12.2 Bakteriden Üreaz Enziminin Ekstraksiyonu

Üreaz enzimi hücre içinde ve bakteri yüzeyinde bulunur. Araştırmamızda sadece yüzeye bağlı üreaz enzimi ekstrakte edildi. Enzimin ekstraksiyonu için, şekildeki yöntem kullanıldı (Abasıyanık, 2005). Uygulanan işlem aşağıda verilmiştir.



- i) Hasat edilip derin dondurucuda saklanan bakteri suspansiyonları oda sıcaklığında çözülüp 50 ml'lik Falkon tüpünde birleştirildi.
- ii) Toplanan süspansiyon 5000 rpm'de 5 dakika 4°C'de santrifüj edildi.
- iii) Oluşan süpernetant (S1) ve pellet (P1) ayrıldı.
- iv) S1 5000 rpm'de 90 dakika, 4°C'de tekrar santrifüj edildi.
- v) Oluşan yeni süpernetant (S2) ve pellet (P2) başka bir falkon tüpüne ayrıldı.
- vi) 10X'lik saflaştırma tamponu (pH: 7) S2'ya 1:10 oranında eklendi. Böylece son çözelti (S3) 1X'lik tampon (pH: 7) özelliği kazandı.
- vii) S3 çözeltisi 50 ml'lik şırıngaya aktarıldı ve 0.20 mm'lik şırınga filtreden süzülüp sterilize edildi.
- viii) Süzüntünün enzim aktivitesi ve protein miktarı tayin edildi. Aktivite görüldü ve enzim immobilizasyonu için 4°C'de saklandı.
- ix) P1 ve P2 distile su ile yeniden suspansiyon haline getirilip birleştirildi ve tekrar v-viii basamaklarından geçirildi. En son basamakta çözeltide enzim aktivitesi görülmedi (Şekil 3.1).



a-d basamaklarında ekstraksiyon tamamlandı.

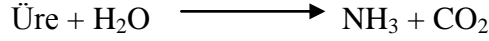
e-h basamaklarında pH ayarlaması ve sterilizasyon işlemleri yapıldı.

i basamağında enzim varlığı kontrol edildi.

A<sub>1</sub>: Ekstre veya standart absorbansı

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada üreaz enzimi kullanılarak, üreye duyarlı potansiyometrik biyosensör yapılması amaçlandı. Üreaz enzimi, üreyi amonyum ve bikarbonat iyonlarına dönüştürmektedir.



Yukarıdaki reaksiyondan da görüldüğü gibi, üreaz enzimi, bir elektrot yüzeyine immobilize edildiği zaman potansiyometrik olarak belirlenebilecek olan amonyum ve bikarbonat iyonları oluşmaktadır. Bu reaksiyona dayanarak, çalışmamızda, amonyuma duyarlı yeni bir elektrot hazırlanarak bu elektrot üzerine üreaz immobilize edilip üre biyosensörü hazırlanması düşünüldü.

Literatürde performansı en iyi olan amonyum elektrodunun, nonaktinin iyonofor olarak kullanıldığı ve matriks materyali olarak da karboksilli PVC'nin kullanıldığı amonyum elektrodu olduğu belirtilmektedir (Koncki vd 1994 ). Sadece PVC içeren amonyum elektrotlarının (Ikeda vd 1998, Fraticelli ve Meyerhoff, 1981, Eggenstein vd 1999) da amonyuma cevabı iyi olmakla birlikte bu tip elektrotların biyosensör yapımı için çok iyi olmadığı görülmektedir. Çünkü bu tip elektrotlarla biyosensör hazırlanırken enzimlerin yüzeye sadece adsorpsiyon yolu ile tutunması söz konusudur. Bu da, biyosensör cevabının çok iyi olmasına rağmen ömrünün çok kısa olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle PVC ile hazırlanacak amonyum elektrotları içerisine enzimlerin kovalent olarak bağlanabileceği aktif uçlar içeren büyük moleküllü bileşiklerin eklenmesinin uygun olduğuna karar verildi. Bu amaçla nonaktin kullanılarak hazırlanan PVC içeren membranlara 18 karbonlu uzun zincirli yağ asidi olan palmitik asit ilave edilerek Bölüm 3.5.1'de Çizelge 3.5 ve 3.6'da belirtilen amonyum duyarlı membranlar kullanılarak amonyum elektrotları hazırlandı ve bu elektrotların performansını karşılaştırmak amacıyla, ayrıca matriks materyali olarak karboksilli PVC'nin kullanıldığı amonyum elektrotları hazırlandı. Bu amonyum elektrotları üzerine üreazın immobilize edilmesi ile üre biyosensörleri oluşturuldu.

Çalışmamızda, palmitik asit içeren PVC ile hazırladığımız amonyum elektrotları üzerine *Helicobacter pylori*'den elde edilmiş üreaz enzimi immobilize edilerek hazırlanmış olduğumuz üre biyosensörleri ile bilgilere literatürde karşılaşılmamış olması, bu konunun orijinal olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar ve ilgili tartışmalar aşağıda sırasıyla verilmiştir.

## 4.1 Amonyum Elektrotları ile İlgili Sonuçlar

### 4.1.1 Amonyum elektrotlarının kalibrasyon grafikleri

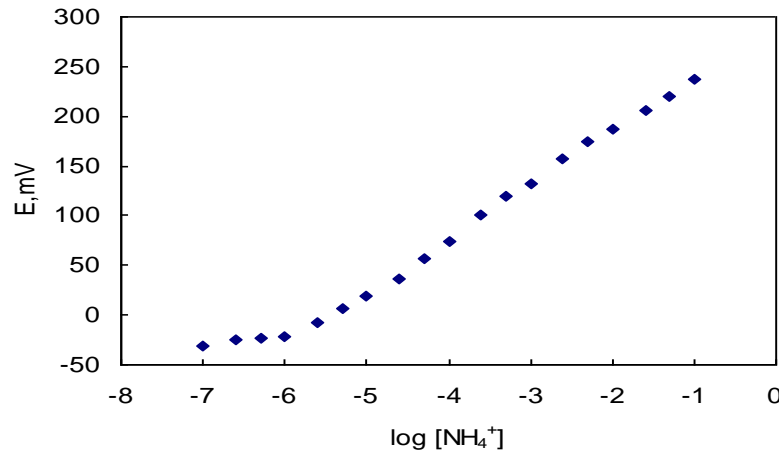
Bölüm 3.5.1’de belirtildiği gibi hazırlanan amonyum elektrotlarından her biri ile oluşturulan elektrokimyasal hücre kullanılarak bir seri amonyum klorür çözeltisi için potansiyeller (mV olarak) okundu ve kalibrasyon grafikleri çizildi (Şekil 4.3- 4.6). Bu grafiklerden amonyum elektrodu için doğrusal çalışma aralığı ve eğimleri belirlendi ve Çizelge 4.1’de verildi. Bu elektrotların kalibrasyon grafiklerinden, hazırlanan elektrotların hepsinin  $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-6}$  M amonyum konsantrasyon aralığında doğrusal cevap verdiği ve eğimlerinin  $57$ - $58$  mV/p[NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] aralığında olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.1  $25,0 \pm 1$  °C’da amonyum elektrotlarının eğimleri ve çalışma aralıkları

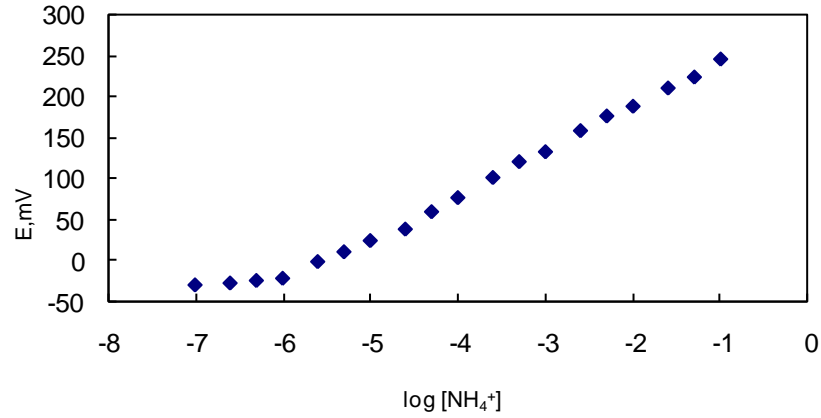
Elektrot No	Eğim <sup>*</sup> , mV/p[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] ±s	Çalışma Aralığı
I	$58,0 \pm 0,1$	$1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M
II	$57,1 \pm 0,1$	$1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M

\*s: Standart sapma.

Çizelge 4.1’de palmitik asit içeren PVC kullanılarak hazırlanan amonyum elektrodunun (I) eğimi karboksilli PVC ile hazırlanandan (II) daha iyi olduğu görülmektedir.



Şekil 4.1 Membran I ile hazırlanan amonyum elektroduna ait kalibrasyon grafiği



Şekil 4.2 Membran II ile hazırlanan amonyum elektroduna ait kalibrasyon grafiği

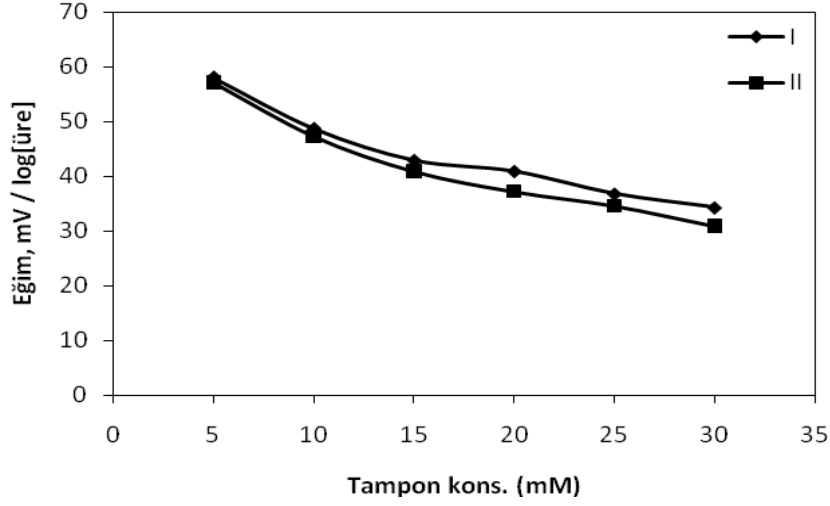
#### 4.1.2 Amonyum elektrodun cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi

Amonyum elektrotlarının performansına tampon konsantrasyonunun etkisini incelemek için, 6 farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 mM) TRIS tamponu kullanılarak hazırlanan amonyum klorür çözeltilerinde (pH 7,0), hazırlanan iki farklı elektrotla potansiyel ölçümleri yapılarak çizilen kalibrasyon grafiklerinin eğimleri belirlenerek Şekil 4.3'te tampon konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi. Her bir tampon konsantrasyonunda, elektroda ait eğimler ise Çizelge 4.2'de verildi.

Çizelge 4.2 25.0±1 °C'da amonyum elektrotlarının cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi

Tampon Konsantrasyonu (mM)	Eğim <sup>*</sup> , mV/p[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] ±s	
	I	II
5	58,0±0,1	57,1 ± 0.1
10	48,7±1,5	47,3±0.7
15	42,9±0,1	40,9±1,7
20	40,9±0,3	37,2±0,6
25	36,8±0,5	34,6±0,9
30	34,3±0.3	30,9±0,5

\*s: Standart sapma.



Şekil 4.3 Amonyum elektrotlarının eğimlerinin tampon konsantrasyonu ile değişimi

Çizelge 4.2’de amonyum elektrotlarının eğimlerinin tampon konsantrasyonu ile değişimi incelendiğinde en yüksek eğimin elde edildiği tampon konsantrasyonunun 5 mM olduğu görülmektedir. İki elektrot için elde edilen eğimler analitik amaçlarla kullanılabilir kadar yüksek ve Nernstian değer olan 59 mV’a yakın olduğundan 5 mM tampon konsantrasyonunda iki elektrodun da amonyum tayininde kullanılabilirliği söylenebilir.

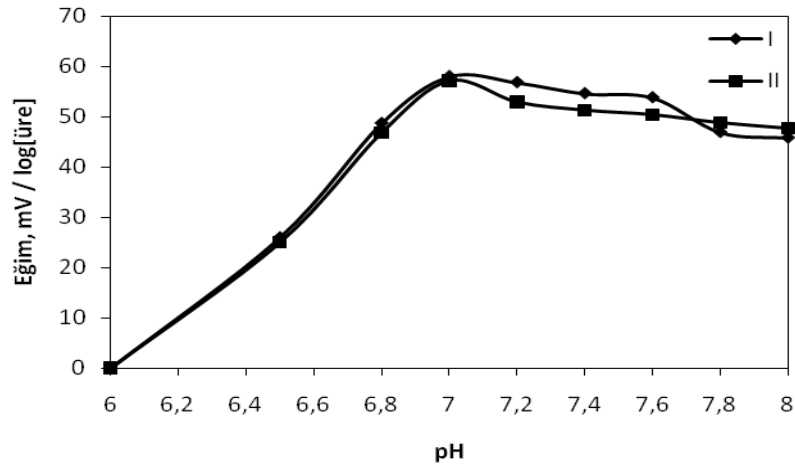
#### 4.1.3 Amonyum elektrodun cevabına pH’nın etkisi

Amonyum elektrotlarının performansına pH’nın etkisini incelemek için 8 farklı pH’da (6,0; 6,5; 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8 ve 8,0) ve 5 mM tampon konsantrasyonunda hazırlanan amonyum klorür çözeltilerinin kalibrasyon grafikleri çizilerek eğimleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3’te toplandı.

Çizelge 4.3 25,0±1 °C’da amonyum elektrotlarının cevabına pH’nın etkisi

pH	Eğim*, mV/p[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] ±s	
	I	II
6,0	-	-
6,5	26,0 ±0,6	25,0±0,1
6,8	48,7±0,9	46,8±0,7
7,0	58,0±0,1	57,1 ± 0.1
7,2	56,8±0,2	52,9±0,7
7,4	54,6±0,2	51,3±0,4
7,6	53,8±0,2	50,4±0,6
7,8	46,9±0,5	48,8±0,1
8,0	45,8±0,5	47,7±0,6

\* s : Standart sapma.



Şekil 4.4 Amonyum elektrotlarının eğimlerinin pH ile değişimi

Çizelge 4.3 ve Şekil 4.4'den görüldüğü gibi, iki farklı şekilde hazırladığımız amonyum-seçici elektrodun potansiyel cevabının pH 7-8 arasında en yüksek ve doğrusal olması, bunların üre biyosensörleri yapımında başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. Çünkü immobilize edilecek üreaz enziminin optimum pH'ı bu aralığa düşmektedir.

#### **4.1.4 Karıştırma hızının etkisi**

Amonyum elektrotlarının cevabına karıştırma hızının etkisini araştırmak amacıyla manyetik karıştırıcının hızı 100, 250 ve 750 rpm olmak üzere ayarlanarak üre çözeltilerinin potansiyelinin kararlı hale gelmesi için beklendi. Karıştırma hızının amonyum elektrodunun cevabına önemli bir etkisi olmadığı gözlemlendi.

#### **4.1.5 Cevap süresi**

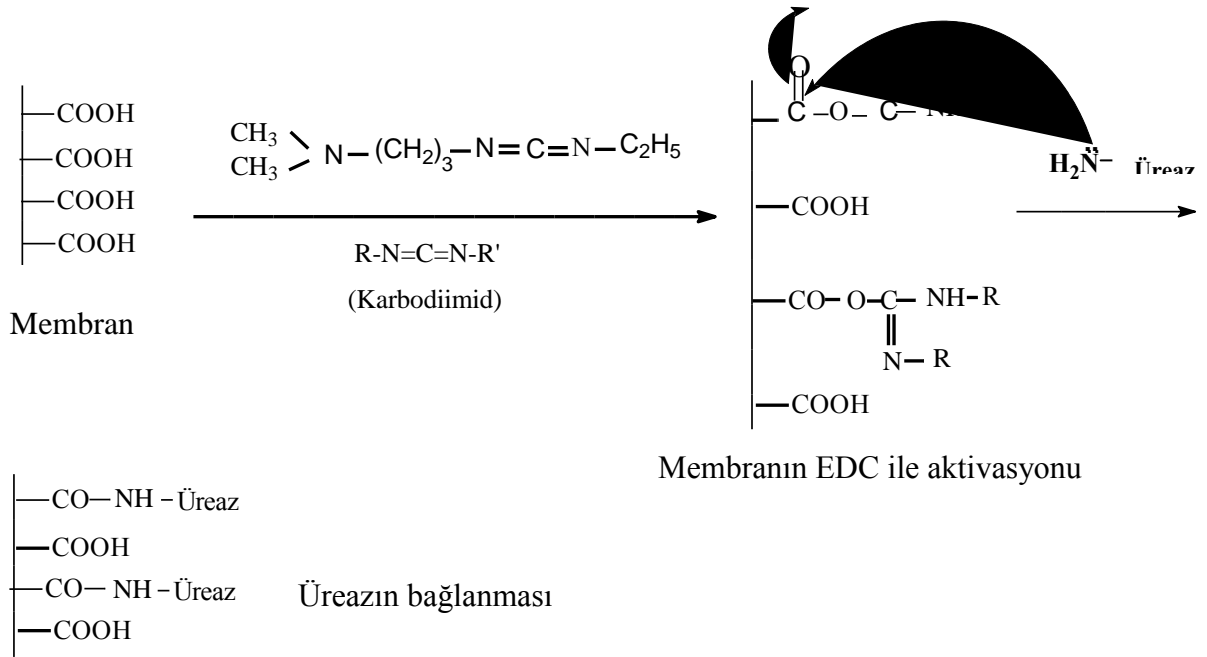
Amonyum elektrotlarının cevap süresini bulabilmek için optimum şartlarda hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki amonyum klorür çözeltilerine, amonyum elektrotları daldırılarak potansiyellerinin kararlı hale gelmesi için gerekli süre kaydedildi. Bu sürenin 30-60 saniye arasında olduğu görüldü. Düşük amonyum konsantrasyonlarında cevap süresi daha uzun (40-60 sn) iken yüksek konsantrasyonlarda daha kısa (30-40 sn) olduğu gözlemlendi.

## **4.2 Üre Biyosensörleri**

Amonyum iyonu ölçümüne dayanan biyosensör yapımında kullanılabilmesi düşünülen iki adet amonyum elektrodunun, her birinin membranına, Bölüm 3.6.1'de belirtildiği şekilde üreaz (Jack bean ve *Helicobacter pylori*) immobilize edildi. Koncki vd (1994) tarafından da kullanılan bu immobilizasyon işlemlerinin her biri Şekil 4.5 - 4.9'de verildi.

İşlem A'da palmitik asit içeren PVC ve karboksilli PVC membranları ile hazırlanan üre biyosensörlerinin EDC ile aktive edildikten sonra üreazın membran yüzeyine bağlanması sağlandı (Şekil 4.5).

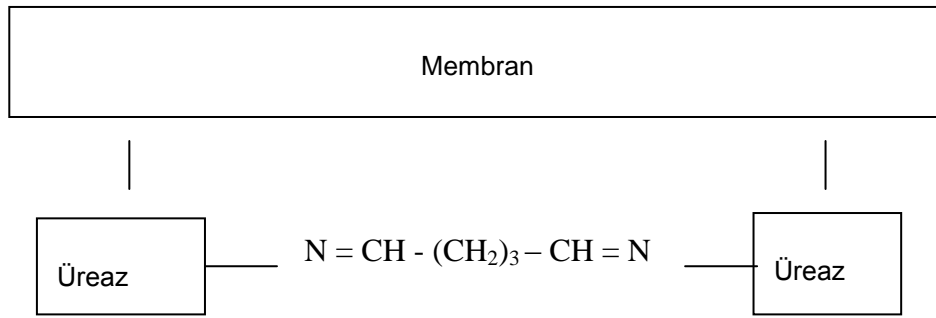
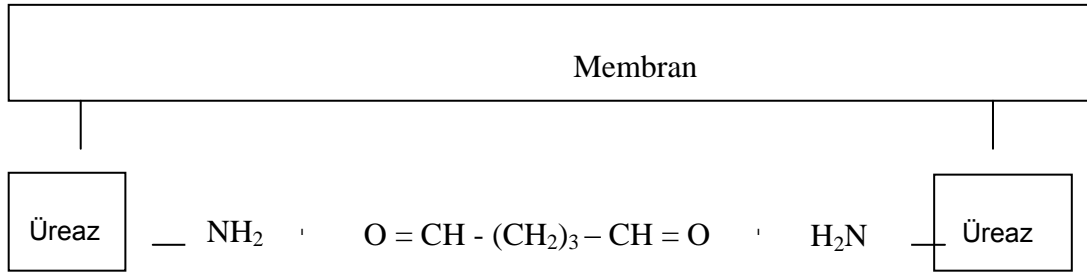




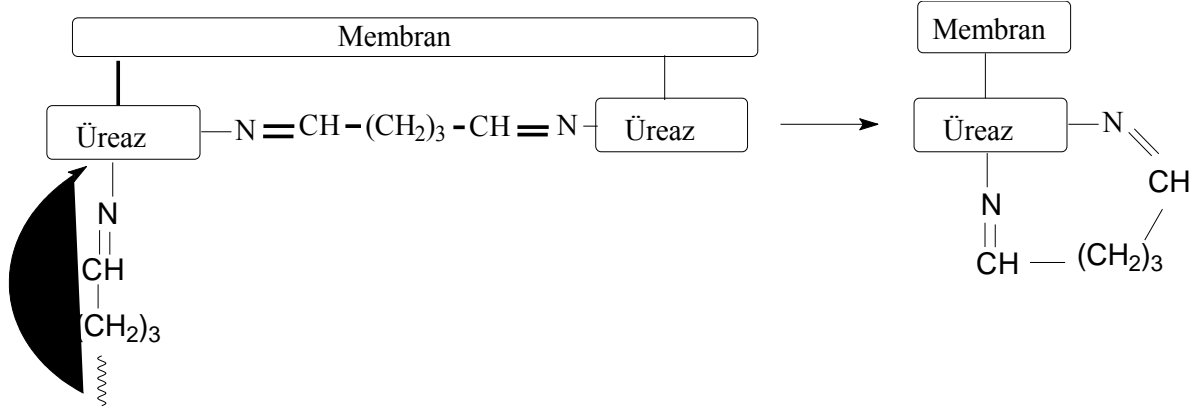
Şekil 4.5 Palmitik asit içeren PVC ve karboksilli PVC membranlarla hazırlanan üre biyosensörlerinin 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid ile aktive edildikten sonra üreazın membran yüzeyine bağlanması

İşlem B'de İşlem A'da hazırlanan dört ayrı elektrodun membranına bağlı üreaz moleküllerinin glutaraldehit ile çapraz bağlanması sağlandı. Glutaraldehit, üreaz molekülündeki amino (-NH<sub>2</sub>) grupları ile etkileşerek membrana bağlanmış olan üreaz enziminin daha sağlam bağlanması için molekül içi ve moleküller arası çapraz bağları oluşturuldu (Şekil 4.6).

(a)

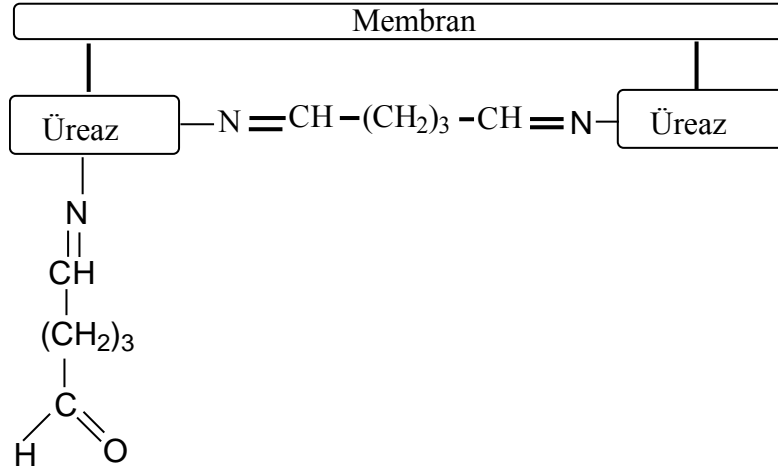


(b)



Şekil 4.6 Üreaz molekülünün glutaraldehit ile moleküller arası (a) ve molekül içi (b) çapraz bağ oluşturması

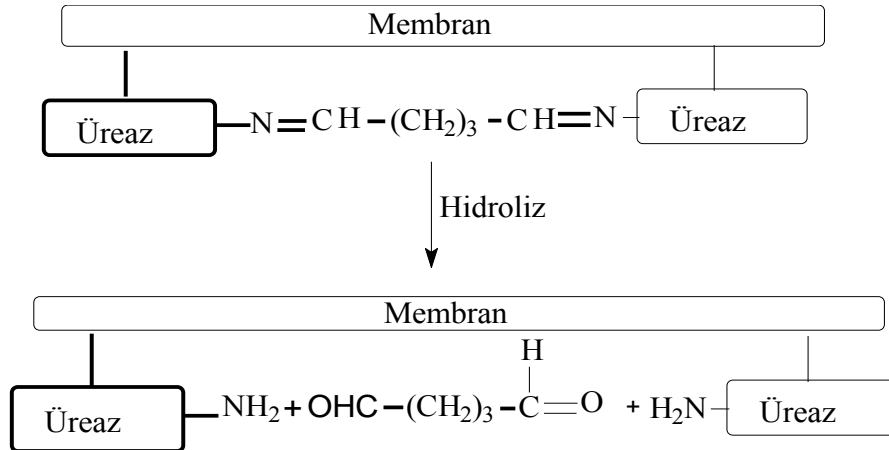
Membrana bağlı üreaz moleküllerinin glutaraldehit ile çapraz bağlanması ile glutaraldehitin bazı uçları serbest kalır (Şekil 4.7). İşlem C'de ikinci üreaz ilavesiyle üreaz molekülleri, PVC membran üzerinde glutaraldehit ile yine molekül içi ve moleküllerarası çapraz bağ yaparak (-CHO uçlarından Schiff bazı oluşturabilir) bir tabaka oluşturmaktadır.



Şekil 4.7 Membrana bağlı üreaz moleküllerinin glutaraldehit ile çapraz bağlanması ile glutaraldehitin bazı uçlarının serbest kalması

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

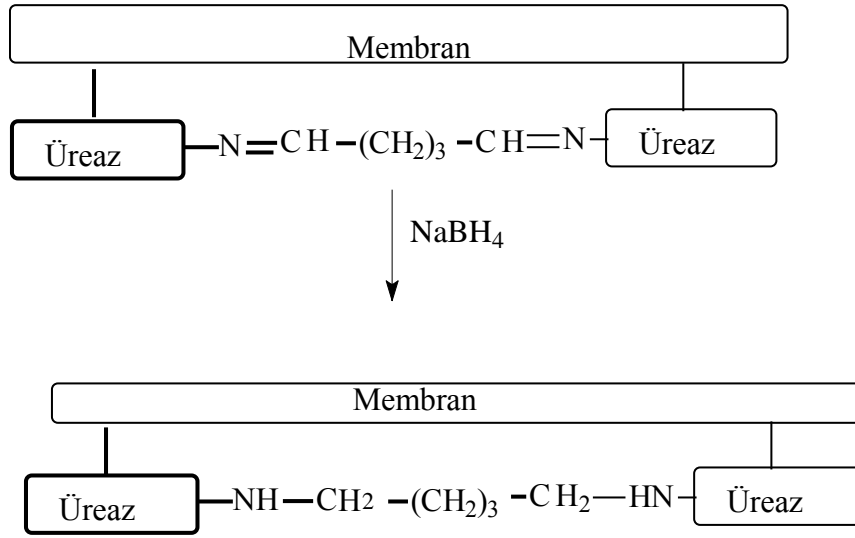
İmmobilize olmuş enzimdeki azometin bağları kararlı değildir. Asidik veya bazik ortamda hidrolizlenebilir (Koncki vd 1994) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 İmmobilize olmuş enzimdeki azometin bağlarının hidrolizlenmesi

Azometin bağlarının hidrolizine engel olmak için hazırlanan üre biyosensörlerine  $\text{NaBH}_4$  ile

indirgeme işlemi yapılmıştır (Şekil 4.9). İndirgeme işleminden sonra hazırlanan biyosensörler olarak adlandırıldı.



Şekil 4.9 Üre biyosensörlerinde immobilize olan üreazdaki azometin bağlarının NaBH<sub>4</sub> ile indirgenmesi

İşlem A ile immobilizasyonla hazırlanan üre biyosensörlerinin amonyuma cevap verip üreye cevap vermemesi, bu immobilizasyon yönteminde üreaz moleküllerinin kimyasal bağlanma sırasında aktivitesinin çok azaldığını göstermektedir. İşlem B ile ortama glutaraldehit ilavesinde ise zaten aktivitesi iyice azalmış olan üreazın serbest kalan uçlarının da glutaraldehit ile bloke edilmesi sonucu aktivite gösterecek üreaz molekülü sayısı çok azalmaktadır. Bu nedenle bu elektrotlar amonyuma cevap verirken üreye cevap verememektedir. Çalışmamızda sadece İşlem D ile hazırlanan üre biyosensörlerinin analitik özellikleri belirlenmiştir.

Deneysel çalışmalarımızda kullanılan üre biyosensörlerine verilen simgeler, Çizelge 3.8.'de gösterilmiştir.

#### 4.2.1 Üre biyosensörlerinin amonyuma cevabı

İşlem D ile hazırlanan üre biyosensörlerinin amonyuma duyarlı olup olmadığını anlamak için her bir üre biyosensörü ile amonyum klorür çözeltisinin potansiyelleri okunarak ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri çizildi. Kalibrasyon grafiklerinden amonyum iyonu için doğrusal çalışma aralığı ve elektrotların eğimleri hesaplandı ve Çizelge 4.4 'da verildi.

Çizelge 4.4  $25,0 \pm 1$  °C’da üre biyosensörlerinin amonyum iyonu için doğrusal çalışma aralıkları ve elektrotların eğimleri

Elektrot No	Eğim <sup>*</sup> ,(mV/p[üre]) ± s	Çalışma Aralığı
I	40,3±2,4	$1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M
II	35,6±2,3	$1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M
III	33,5±1,5	$1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M
IV	30,4±1,8	$1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M

\* s: Standart sapma.

Çizelge 4.4’ dan de görüldüğü gibi, enzim immobilizasyonundan sonra da bu elektrotların amonyuma duyarlılığının iyi olduğu ve  $1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-6}$  M konsantrasyon aralığında amonyuma cevabının yine doğrusal olduğu bulundu. Bu nedenle, bu şekilde hazırlanan amonyum elektrotları üre tayininde kullanılabilir.

#### 4.2.2 Üre biyosensörlerinin kalibrasyon grafikleri

Amonyuma duyarlılığının iyi olduğunu anladığımız üre biyosensörlerinin üreye karşı kalibrasyon grafikleri de çizildi (Şekil 4.11 - 4.13). Her bir biyosensör için kalibrasyon grafiklerinden çalışma aralıkları ve eğimleri belirlendi.

Çizelge 4.5  $25,0 \pm 1$  °C’da üre biyosensörlerinin eğimleri ve çalışma aralıkları

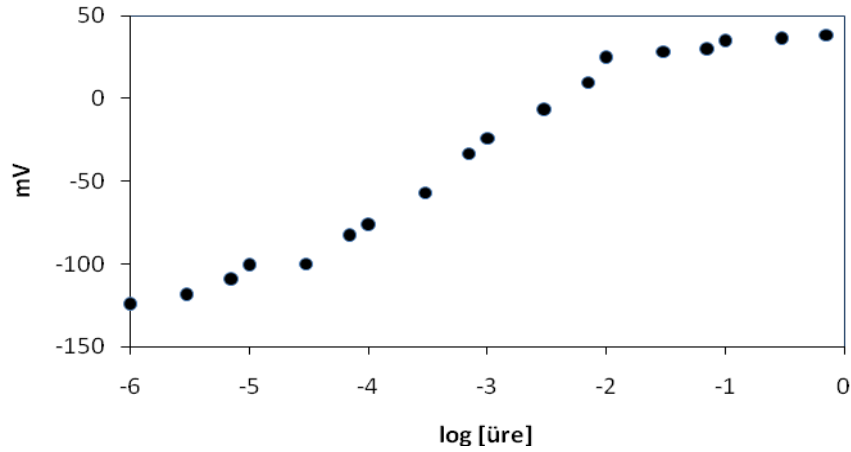
Biyosensörler	Eğim (±s) <sup>*</sup> (mV/p[üre])	Çalışma aralığı
I	33,4±0,7	$1,0 \times 10^{-2}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ M
II	22,2±0,3	$1,0 \times 10^{-2}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ M
III	18,2±0,5	$1,0 \times 10^{-2}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ M
IV	14,6 ±0,2	$1,0 \times 10^{-2}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ M

\* s: Standart sapma.

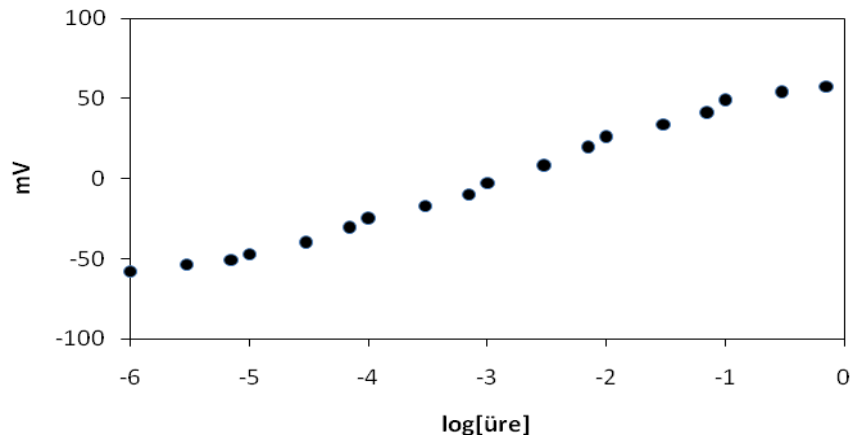
Çizelge 4.5’de görüldüğü gibi, palmitik asit içeren PVC kullanılarak hazırlanan üre biyosensörlerinin eğimleri (I) karboksilli PVC ile hazırlananlardan (II) biraz daha iyidir. Aynı şekilde *Helikobacter pyroli* üreaz biyosensörlerinin eğimlerine bakıldığında palmitik asit

içeren PVC kullanılarak hazırlanan üre biyosensörlerinin eğimleri (III) karboksilli PVC ile hazırlananlardan (IV) daha iyidir.

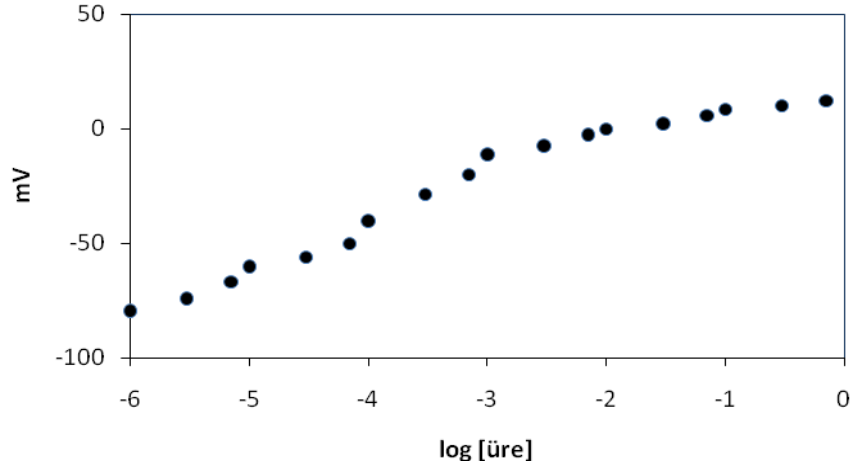
Walcerz ve arkadaşları (1996), bu çalışmadakine benzer membran bileşiminde hazırladıkları üre biyosensörlerinin çalışma aralığını  $7,0 \times 10^{-2} - 3,0 \times 10^{-4} \text{ M}$  olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise daha iyi sonuç elde edilmiştir. Butt ve Camman (1992), membran bileşimindeki karboksilli PVC yerine PVC kullanarak yaptıkları üre biyosensöründe  $1,0 \times 10^{-3} - 1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$  'lık bir çalışma aralığında serumda üre tayini yapmışlardır. Eggenstein vd (1999) ise bu değeri  $2,1 \times 10^{-2} - 7,2 \times 10^{-4} \text{ M}$  olarak bulmuşlardır. Bizim hazırladığımız üre biyosensörünün çalışma aralığı ise  $1,0 \times 10^{-2} - 1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$  olarak bulundu. Bunun sonucu matriks materyali olarak palmitik asit kullanılarak hazırlanan üre biyosensörünün fizyolojik sıvılarda ürenin tayini için avantajlı olduğunu söyleyebiliriz.



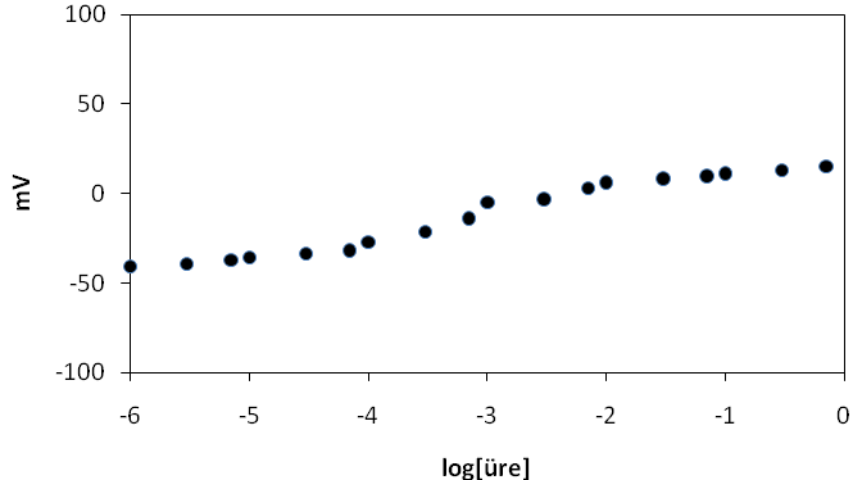
Şekil 4.10 I nolu üre biyosensörünün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.11 II nolu üre biyosensörünün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.12 III nolu üre biyosensörünün kalibrasyon grafiği



Şekil 4.13 IV nolu üre biyosensörünün kalibrasyon grafiği

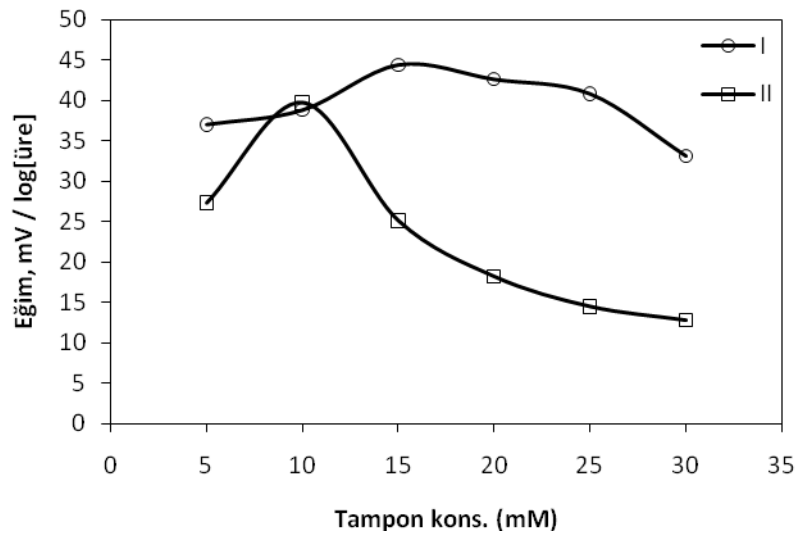
### 4.2.3 Tampon konsantrasyonunun etkisi

Üre biyosensörlerinin performansına tampon konsantrasyonunun etkisini incelemek için, 6 farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 mM) TRIS tamponu kullanılarak hazırlanan üre çözeltilerinde (pH 7,0) tüm biyosensörlerle potansiyel ölçümleri yapılarak kalibrasyon grafikleri çizildikten sonra belirlenen biyosensörlerin eğimleri Çizelge 4.6'de verildi. Ayrıca tampon konsantrasyonuna karşı eğim değerleri grafiği de Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de verildi.

Çizelge 4.6 25,0±1 °C'da üre biyosensörlerinin cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi

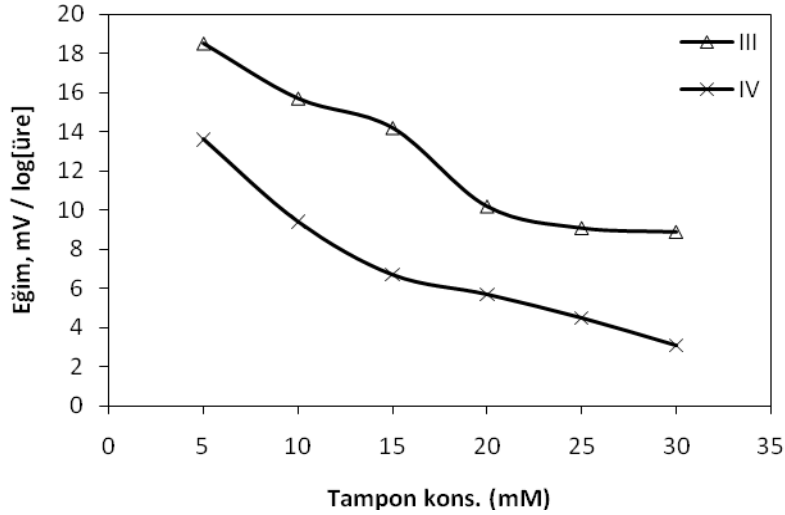
<b>Eğim<sup>*</sup>, (mV/p[üre])±s</b>				
<b>Tampon</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
<b>Kons.</b>				
<b>(mM)</b>				
5	37,0±5,6	27,3±4,4	18,5±1,3	13,6±1,4
10	38,8±4,7	39,7±5,2	15,7±2,4	9,4±0,8
15	44,4±5,3	25,1±3,0	14,2±1,6	6,7±0,3
20	42,6±4,3	18,2±1,6	10,2±0,8	5,7±0,3
25	40,8±5,1	14,5±2,4	9,1±0,5	4,5±0,6
30	33,1±5,5	12,8±1,5	8,9±0,7	3,1±0,5

\*s: Standart sapma.



Şekil 4.14 I ve II nolu üre biyosensörünün eğimlerinin tampon konsantrasyonu ile değişimi





Şekil 4.15 III ve IV nolu üre biyosensörünün eğimlerinin tampon konsantrasyonu ile değişimi

Çizelge 4.6 ile Şekil 4.14'den de görüleceği gibi, I ve II nolu üre biyosensörleri için en yüksek eğimin elde edildiği optimum tampon konsantrasyonunun 10 mM olduğu bulundu. 5 mM'dan daha düşük tampon konsantrasyonlarında, çözeltinin tamponlama kapasitesi düşük olduğundan çalışılmadı. Çizelge 4.6 ile Şekil 4.15'den de görüleceği gibi, III ve IV nolu üre biyosensörleri için en yüksek eğimin elde edildiği optimum tampon konsantrasyonunun 5 mM olduğu bulundu.

Koncki ve arkadaşları (1994) hazırladıkları üre biyosensörü ile yaptıkları çalışmada 1, 5 ve 25 mM tampon konsantrasyonunda çalışmışlar ve tampon konsantrasyonunun artması ile biyosensörün duyarlılığının azaldığını ve tayin sınırının arttığını belirtmişlerdir. Bu bizim sonuçlarımızla uyumludur. Bu çalışmada da tampon konsantrasyonunun artması ile biyosensörlerin cevabında azalma görülmüştür.

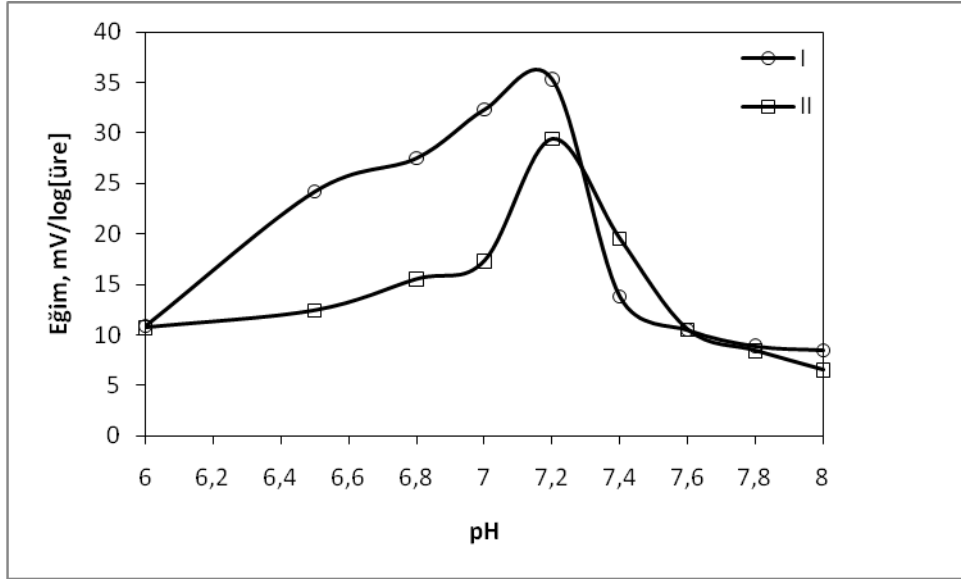
#### 4.2.4 pH'nın etkisi

Üre biyosensörlerinin performansına pH'nın etkisini incelemek için 8 farklı pH'da (6,0; 6,5; 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8 ve 8,0) ve optimum tampon konsantrasyonunda üre çözeltileri hazırlandıktan sonra kalibrasyon grafikleri çizilerek eğimleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'da toplu olarak verildi.

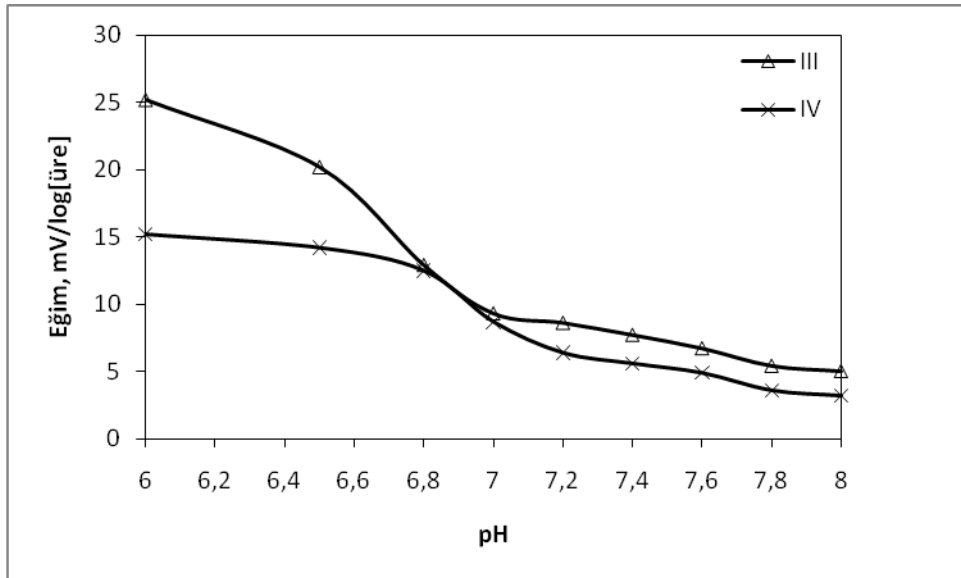
Çizelge 4.7 25,0±1 °C'da üre biyosensörlerinin cevabına pH'nın etkisi

pH	Eğim <sup>*</sup> ,(mV/p[üre])±s			
	I	II	III	IV
6,0	10,9±1,5	10,7±2,2	25,2±1,9	15,2±0,7
6,5	24,2±3,6	12,4±3,5	20,2±2,1	14,2±1,9
6,8	27,5±1,4	15,5±2,8	12,9±0,9	12,5±1,1
7,0	32,3±2,8	17,3±3,5	9,3±1,4	8,7±0,2
7,2	35,3±3,9	29,4±3,5	8,6±1,2	6,4±0,8
7,4	13,8±2,5	19,5±2,0	7,7±0,6	5,6±1,0
7,6	10,5±2,3	10,5±1,6	6,7±0,7	4,9±0,9
7,8	8,9±2,1	8,4±1,6	5,4±0,3	3,6±0,4
8,0	8,5±1,5	6,5±0,9	5,0±0,4	3,2±0,6

\*s: Standart sapma.



Şekil 4.16 I ve II nolu üre biyosensörünün eğimlerinin pH ile değişimi



Şekil 4.17 III ve IV nolu üre biyosensörünün eğimlerinin pH ile değişimi

Çizelge 4.7 ile Şekil 4.16 görüldüğü gibi, pH 7,2'e kadar I ve II nolu üre biyosensörlerinin eğiminin, dolayısı ile duyarlılığının, kademeli olarak arttığı ve sonra düştüğü gözlemlendi. Dolayısıyla optimum çalışma pH'sı olarak 7,2 seçildi. pH 7,0'nin üzerinde üreazın aktif merkezinden proton ayrılacağından enzim denatüre olabilir (Adeloju et.al., 1996) ve bu pH değeri dışında üreaz maksimum aktivite ile üreyi  $\text{NH}_4^+$  ve  $\text{HCO}_3^-$  hidrolizleyememektedir. Ru-Qin vd (2000) de potansiyometrik sensör sistemlerinin en önemli performans özelliklerinden biri olan tampon pH'sının artması sonucu biyosensörün cevabının azaldığını belirtmişlerdir.

Çizelge 4.7 ile Şekil 4.17 görüldüğü gibi ise pH 6,0'dan itibaren III ve IV nolu üre biyosensörlerinin eğiminin, dolayısı ile duyarlılığının, düştüğü gözlemlendi. Böylece optimum çalışma pH'ı 6,0 olarak belirlendi.

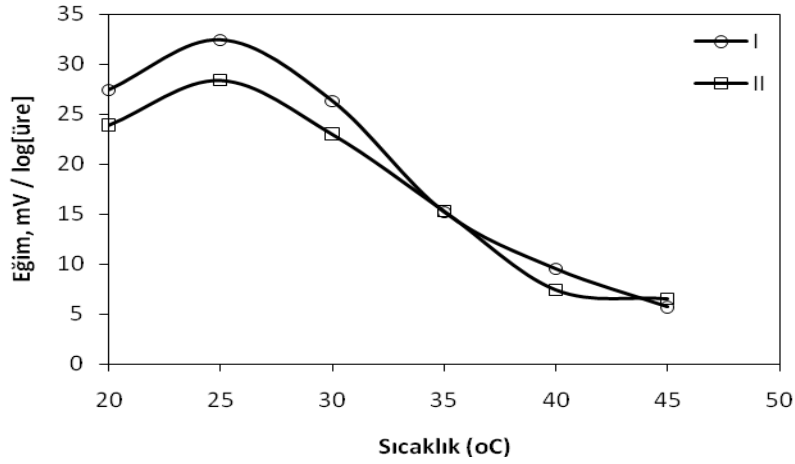
#### 4.2.5 Sıcaklığın etkisi

Üre biyosensörlerine sıcaklığın etkisini incelemek için, 6 farklı sıcaklıkta (20, 25, 30, 35, 40 ve 45<sup>0</sup>C), her bir biyosensör için optimum tampon konsantrasyonunda ve optimum pH'da hazırlanan üre çözeltileri ile ayrı ayrı potansiyel ölçümleri yapılarak kalibrasyon grafikleri çizilerek eğimler belirlendi (Çizelge 4.8).

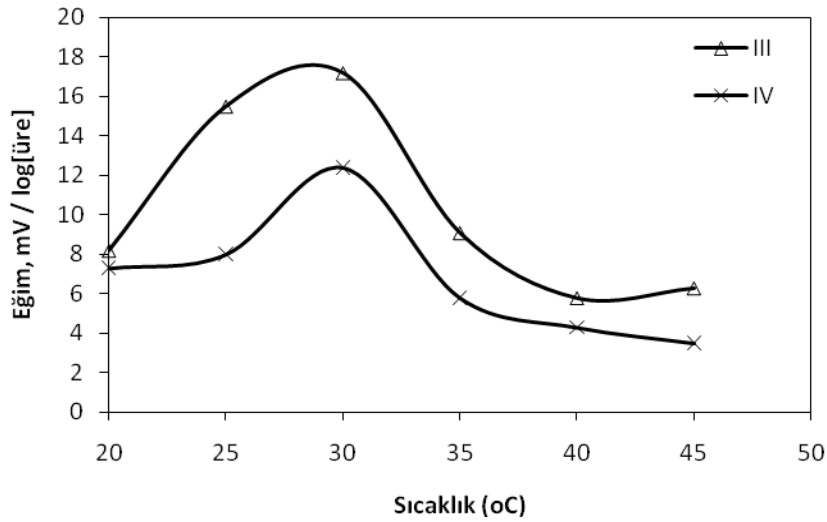
Çizelge 4.8 Üre biyosensörlerin cevabına sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Eğim <sup>*</sup> , (mV/p[üre])±s			
	I	II	III	IV
20	27,4±3,1	23,9±2,2	8,2±0,4	7,3±1,0
25	32,4±2,5	28,4±1,5	15,5±1,8	8,0±1,2
30	26,3±3,2	23,0±2,1	17,2±1,3	12,4±0,9
35	15,2±1,5	15,3±2,0	9,1±0,5	5,8±1,0
40	9,5±1,5	7,4±1,4	5,8±0,6	4,3±0,3
45	5,7±0,9	6,5±1,1	6,3±0,9	3,5±0,4

\*s: Standart sapma.



Şekil 4.18 I ve II nolu üre biyosensörünün eğimlerinin sıcaklık ile değişimi



Şekil 4.19 III ve IV nolu üre biyosensörünün eğimlerinin sıcaklık ile değişimi

Çizelge 4.8 ile Şekil 4.18'de görüldüğü gibi, I ve II nolu üre biyosensörleri için 20-25°C aralığında eğimin fazla değişmediği görüldü ve bu nedenle üre tayinlerinin oda sıcaklığında yapılabileceği düşünüldü. 25°C'dan sonra eğimdeki düşüş, biyosensördeki immobilize edilmiş üreazın aktivitesinin düşmüş olduğunu göstermektedir. Literatürde üre biyosensörleri ile yapılan çalışmalarda genellikle 20-25 °C sıcaklıkta çalışılmıştır (Koncki vd 1994, Walcerz vd 1996, Magalhaes ve Machado, 1998). Ancak üreazın farklı yöntemler kullanılarak immobilize edilmesi ile hazırlanan üre biyosensörünün optimum çalışma sıcaklığının 37°C olduğu bulunmuştur (Karube et.al., 1986). Çizelge 4.8 ile Şekil 4.19'de görüldüğü gibi, III ve IV nolu üre biyosensörleri için optimum çalışma sıcaklığı 30 °C olarak bulunmuştur.

#### 4.2.6 Seçicilik katsayılarının hesaplanması

Biyolojik ortamlarda en çok bulunabilen iyonların ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Ca}^{+2}$ ) üre biyosensörlerinin cevabına etkisini belirlemek amacıyla bu biyosensörlerin sözkonusu iyonlar için seçicilik katsayıları ayrı çözelti yöntemi ile tayin edildi.

Çizelge 4.9 Üre biyosensörlerinin seçicilik katsayıları

İyon	Seçicilik katsayısı, $K_{\text{NH}_4, X}$			
	I	II	III	IV
$\text{Na}^+$	$1,2 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-2}$	$4,7 \times 10^{-2}$	$9,4 \times 10^{-2}$
$\text{K}^+$	$1,1 \times 10^{-1}$	$5,6 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-1}$	$1,3 \times 10^{-1}$
$\text{Ca}^{2+}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^{-3}$	$8,4 \times 10^{-3}$

Bu sonuçlar, üre biyosensörleri üzerine  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarının bozucu etkisinin az olduğunu göstermektedir. En fazla bozucu etkisi olan tür ise  $\text{K}^+$  iyonudur. Walcerz ve arkadaşları (1996) aynı katyonlar için seçicilik katsayılarını tespit etmişler ve bu katyonlar arasında bozucu etkisi en fazla olan katyonun  $\text{K}^+$  olduğunu belirtmişlerdir. Koncki ve arkadaşları (1994) da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  iyonlarının biyosensör performansına etkisini incelemişler ve bu iyonların girişim etkilerinin ihmal edilecek düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim sonuçlarımız da literatür verileri ile uyum içindedir.

#### 4.2.7 Karıştırma hızının etkisi

Üre biyosensörlerinin cevabına karıştırma hızının etkisini araştırmak amacıyla manyetik karıştırıcının hızı 100, 250 ve 750 rpm olmak üzere üç farklı hıza ayarlanarak üre çözeltilerinin potansiyelinin kararlı hale gelmesi için beklendi. Amonyum elektrotlarında olduğu gibi üre biyosensörlerinde de 100 ve 750 rpm karıştırma yapıldığında kararlı potansiyele ulaşmak için geçen süre, 250 rpm hızda karıştırıldığında geçen süreden daha uzun olduğu bulundu. Bu nedenle manyetik karıştırıcının hızı yaklaşık 250 rpm'e ayarlandı ve bütün çalışmalarda çözeltiler bu hızda karıştırıldı.

Karıştırma hızının artmasının biyosensörlerin potansiyeline herhangi bir etkisinin olmadığı, ancak cevap zamanında bir artışa neden olduğu görülmüştür. Bu durum, düşük karıştırma

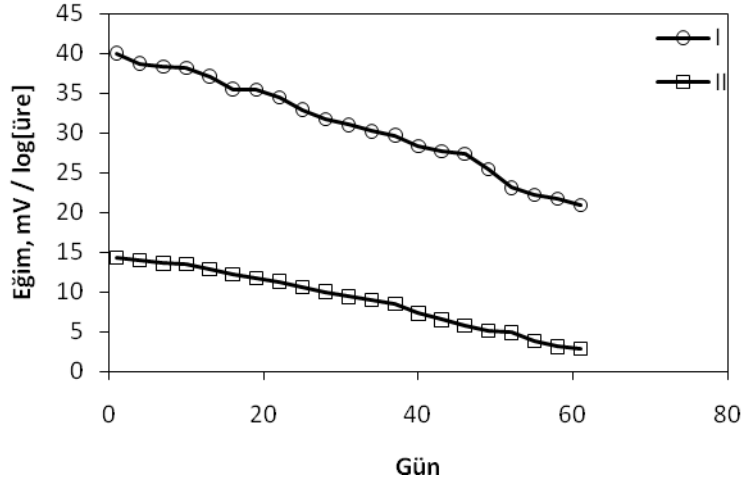
hızlarında enzimatik reaksiyonun yavaş olduğu, yüksek karıştırma hızlarında ise enzimin konformasyonu bozulacağından enzimatik reaksiyonun gerçekleşme olasılığının azaldığı şeklinde açıklanabilir. Bu nedenle 250 rpm en uygun karıştırma hızı olarak bulundu. Walcerz ve arkadaşları (1995) biyosensörün analitik özelliklerine karıştırma hızının etkisinin ihmal edilebilir düzeyde olduğunu belirtmişlerdir.

#### **4.2.8 Cevap süresi**

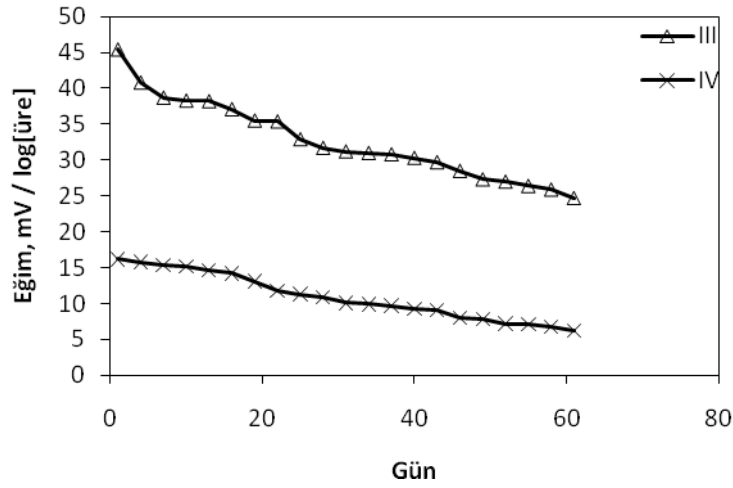
İdeal bir biyosensör kısa sürede sonuç verebilmelidir. Üre elektrotlarının cevap süresini bulabilmek için optimum şartlarda hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki üre çözeltilerine üre biyosensörleri ve referans elektrot daldırılarak potansiyellerinin kararlı hale gelmesi için geçen süre kaydedildi. Cevap zamanı ile belirtilen, biyosensörün analizlenecek maddenin bulunduğu ortama temas ettiği andan itibaren ölçüm düzeneğinden sonucun okunduğu ana kadar geçen süredir. Biyosensörler için cevap zamanı 5 dakikaya kadar olan değerler uygun kabul edilirken, 10 dakika uzun bir süre olarak görülür (Çubuk, 2001). I ve II nolu üre biyosensörlerinin cevap zamanları, yaklaşık 1 – 2 dakika arasındadır. III ve IV nolu üre biyosensörlerinin cevap zamanları ise 1 – 5 dakika arasında değişmektedir. Bu sonuçlar literatürde pek çok üre biyosensörünün cevap süresinden daha kısadır (Walcerz et.al.,1996; Butt and Camman,1992; Eggenstein et.al., 1999).

#### **4.2.9 Raf Ömrü**

Üre biyosensörlerinin ömürlerini belirlemek amacıyla, 2 ay boyunca haftada iki defa üre biyosensörleri için kalibrasyon eğrileri çizildi (Şekil 4.20 ve 4.21) ve çalışma aralığı ve eğimleri belirlendi. Çalışma aralığı değişmeksizin eğim değerinde 2 ay sonunda I nolu üre biyosensöründe % 47,5, II nolu üre biyosensöründe % 75,8, III nolu üre biyosensöründe % 44, IV nolu üre biyosensöründe ise % 62,5 değerlerinde düşme olduğu gözlemlendi. Üre biyosensörlerinin eğimleri 60 günden sonra dereceli olarak azaldı. Sonuçlardan da görüldüğü gibi, palmitik asit kullanılarak hazırlanan üre biyosensörlerinin raf ömrü, karboksilli PVC kullanılarak hazırlanan üre biyosensörlerinin raf ömrüne göre daha iyidir.



Şekil 4.20 İki ay süresince I ve II nolu üre biyosensörlerinden elde edilen eğim değerlerindeki değişimi



Şekil 4.21 İki ay süresince III ve IV nolu üre biyosensörlerinden elde edilen eğim değerlerindeki değişimi

#### 4.2.10 Tekrarlanabilirlik

Üre biyosensörlerinin tekrarlanabilirliğini belirlemek için aynı günde aynı biyosensör ile 5 defa kalibrasyon grafiği çizilerek her bir biyosensörün eğimi belirlendi. Eğim değerlerinin bağıl standart sapmaları hesaplandı. Biyosensörlerin bağıl standart sapma değerleri Çizelge 4.10'de gösterilmektedir.



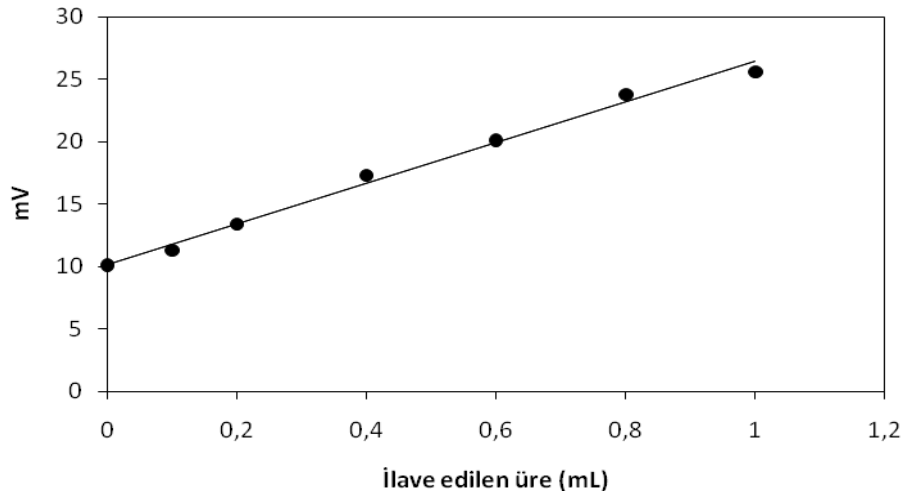
Çizelge 4.10 Üre biyosensörlerinin Bağlı Standart Sapma (B.S.S.) değerleri

	I	II	III	IV
Bağlı Standart Sapma (B.S.S.)	0,08	0,05	0,2	0,25

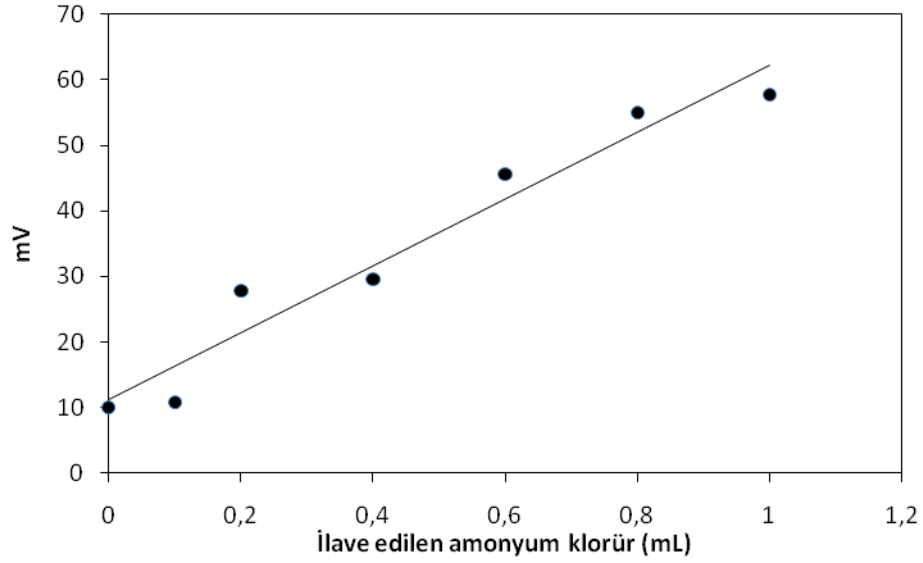
Bağlı standart sapma değerleri % 10 değerinden az olduğunda membranın tekrarlanabilirliği yüksek olduğuna göre, membranlarımızın tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu söyleyebiliriz.

#### 4.2.11 Serumda üre tayini

Hazırladığımız palmitik asit içeren PVC membranlı üre biyosensörünün biyolojik ortamlarda üre tayininde kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldı. Bu amaçla, üç hemodiyaliz hastasından alınan serumlarda üre tayini standart katma yöntemi kullanılarak yapıldı. Standart katma yönteminde elde edilen üre çözeltileri için kalibrasyon grafiklerine birer örnek Şekil 4.22.'te verildi. Bu tip grafiklerden yararlanarak üç hasta için kan serumundaki toplam amonyum miktarları hesaplandı. Üre miktarının hesaplanabilmesi için, serumda bulunan amonyum miktarının da belirlenmesi gereklidir. Bunun için de, aynı şartlarda hazırlanan amonyum elektrodu kullanılarak standart katma yöntemi yardımıyla serumdaki amonyum miktarları belirlendi (Şekil 4.23). Üre elektrodu ile belirlenen toplam amonyum miktarından, amonyum elektrodu ile belirlenen amonyum miktarı çıkarılarak her bir hasta için serumdaki üre miktarları tayin edildi ve Çizelge 4.11.'de verildi.



Şekil 4.22 Üre biyosensörü ile standart katma yöntemi kullanılarak  $10^{-2}$  M üre çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği



Şekil 4.23 Amonyum elektrodu ile standart katma yöntemi kullanılarak  $10^{-2}$  M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.11 Serumda ürenin tayini için üre biyosensörü ve diyaliz merkezinden elde edilen sonuçlar

Hasta No	Diyaliz Merkezi	Üre miktarı (mg/dL)			
		I	II	III	IV
1	114	112,7	108,1	69,3	65,2
2	122	119,5	111,7	82,9	73,9
3	149	158,2	136,9	97,3	91,9

Üre biyosensörü ile elde edilen sonuçlar, hastane laboratuvarında elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı ve sonuçların uyum içinde olduğu gözlemlendi. Her bir biyosensör için, o biyosensörü için daha önceden belirlemiş olduğumuz optimum şartlar kullanıldı.

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada kanda üre tayini yapabilmek için, uzun zincirli bir yağ asidi olan palmitik asit içeren PVC membran elektrotları kullanılarak üre biyosensörü geliştirildi ve geliştirilen bu biyosensör PVC – COOH membran elektrodu kullanılarak hazırlanan üre biyosensörü ile karşılaştırıldı.

Bölüm 4.'teki sonuçlara bakıldığında palmitik asit içeren PVC membran elektrodunun, PVC – COOH içeren membran elektroduna göre birçok parametrede üstünlük sağladığını görmekteyiz.

Üre biyosensörümüzü hazırlarken iki farklı üreaz kullandık. Bu üreazlardan biri ticari olarak temin edilen Jack bean üreazı, diğeri ise *Helicobacter pylori*'den saflaştırılan üreazdır.

Bölüm 4.'te göüldüğü gibi, *Helicobacter pylori* ile yapılan araştırmalarda, ticari üreaz ile yapılan çalışmalar kadar iyi sonuç alınamamış olmamıza rağmen biyosensörümüzün üreye karşı düşük de olsa bir cevap vermesi çalışmanın başarılı olduğunu göstermektedir. *Helicobacter pylori* üreazı ile hazırlanan biyosensörlerin düşük eğim değerleri vermesinin nedeni, enzimin aktivitesinin düşüklüğünden kaynaklanmaktadır.

Daha önce üre biyosensörü geliştirilmesine yönelik birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, bizim çalışmamızda kullandığımız *Helicobacter pylori* üreazı önceki çalışmalarda kullanılmamıştır. Bu da bizim çalışmamıza orjinallik katmaktadır.

**KAYNAKLAR**

- Abasıyanık, M.F., “*Helicobacter pylori* CagA, VacA ve üreaz proteinlerinin peptik ülser hastalıklarının oluşumundaki rolleri ve *H. pylori* üreazının immobilizasyonu”, 2005, GYTE.
- Adeloju, S.B., Shaw, S.J., Wallace, G.G., 1996. Polypyrrole-based amperometric flow injection biosensor for urea. *Anal.Chim.Acta.*, 323; 107-113.
- Akyılmaz, E. 2002. Alkol tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi. Doktora Tezi. Bornova-İZMİR.
- Alegret, S., Martinez-Fabregas, E.M. 1989. Biosensors based on conductind filled polymer all-solid-state PVC matrix membrane electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 4; 287-297.
- Axe'n, R. and Ernback, S. 1971. Chemical fixation of enzyme to cyanogen halide activated polysacxharide carriers. *Eur. J. Biochem.* 18; 351-357.
- Bilitewski, U., Chemnius, G.C., Ruger, P., Schinid, R.D. 1992, *Sens. Actuators B.* 7; 351.
- Bişkin, E., “Sağlık için Biyoteknoloji”, *Biyotek Dergisi*, No:06 V:1-2, 2002.
- Butt, S.B., 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.
- Caraway,W.T ve Fanger, H., 1956, *Am. J. Clin. Path.* 26; 1475-1480.
- Cha, S.G., Meyerhoff, M.E. 1989. Potentiometric ion- and bio-selective electrodes based on asymmetric cellulose acetate membranes. *Talanta.* 36; 271.
- Chen, K., Liu,D., Nie, L., Yao, S., 1994. Determination of urea in urine using a conductivity cell with surface acoustic wave resonator-based measurement circuit. *Talanta*, 41; 2195-2200.
- Clark, L.C.,Lyons, C. (1962). “Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery”. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 102; 29.
- Colasanti, G., Arrigo, G., Santaro, A., et.al. 1995. Biochemical aspects and clinical perspectives of continuous urea monitoring in plasma ultrafiltrate; Preliminary results of a multicenter study. *The Int, J, Artificial Organs.* 1-3; 370-376.
- Çubuk, O., “Yeni tip potansiyometrik üre biyosensörlerin hazırlanması ve biyolojik numunelere uygulanması”, Ondokuz Mayısı Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2001.
- Dhawan, G., Sumana, G., Malhotra, B.D., “Recent developments in urea biosensors”, *Biochemical Engineering Journal*, Vol.44, 2009, 42–52.
- Dinçkaya, E. “Enzim Sensörleri”, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Kuşadası – Aydın, 1999, 81 – 142.
- Eggstein,C., Borchardt,M., Diekmann,C., Gründig,B., Dumschat,C., Cammann,K., Knoll,M., Spener,F., 1999. A disposable biosensor for urea determination in blood based on an ammonium-sensitive transducer. *Biosens.Bioelectron.* 14; 33-41.
- Fawcett, F.K., Scott, J.E. 1960. A rapid and precise method for the determination of urea. *J. Clin. Pathol.*, 13; 156-160.

- Gil, M.H., Piedade, A.P., Alegret, S., Alonso, J., Martinez-Fabregas, E.M., Orellana, A. 1992. Covalent binding of urease on ammonium-selective potentiometric membranes. *Biosens. Bioelectron.* 7; 645-652.
- Glab, S., Koncki, R., Kopczewska, E., Walcerz, I., Hulanicki, A. 1994. Urea sensors based on PVC membrane pH electrode. *Talanta.* 41; 1201-1205.
- Guilbault, G.G ve Shu, F.R. 1972. Enzyme electrodes based on the use of a carbon dioxide sensor: Urea and L-Tyrosine Electrodes. *Anal. Chem.* 44; 2161.
- Guilbault, G.G. 1976. *Handbook of Enzymatic Methods of Analysis* Marcel Dekker, New York.
- Guilbault, G.G., Montalvo, J.G., 1969. A urea specific enzyme electrode. *J.Am. Chem. Soc.* 91; 2164-2165.
- Guilbault, G.G., Nagy, G. 1973. An improved Urea Electrode. *Anal. Chem.* 45; 417.
- Guilbault, G.G., Sadar, M.H. 1977. 'Analytical uses of Enzymes' In the Proceedings of the Analytical Division of the Chemical Society, London, 14; 302.
- Gürsoy, H.,E. M. "Biyosensör nedir?", *bilgiustam.com*, 2008.
- Hassan, S.S. and Rechnitz, G.A., 1981. Enzyme Amplification for Trace Level Determination of Pyridoxal 5'-Phosphate with a pCO<sub>2</sub> Electrode, *Anal. Chem.* 53, 512-15.
- Hamlaoui, M. L., Reybier, K., Marrakchi, M., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Kherrat, R., Walcarius, A. 2002. Development of a urea biosensor based on a polymeric membrane including zeolite. *466; 39-45.*
- Koncki, R., Chudvick, A., Walcerz, I., 1999. Urea determination using pH-enzyme electrode. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21; 51-57.
- Koncki, R., Kopczewska, E. and Glab, S. 1994. Comparison of pH-membrane enzyme electrode for urea with covalently bound enzyme. *Anal.Lett.* 27(3); 475-486.
- Luo, Y., Do, J. 2004. Urea biosensor based on PANI (urease)-Nafion/Au composite electrode. *20; 15-23.*
- Magalhaes, J.M.C.S., Machado, A.A.S.C. 1998. Urea potentiometric biosensor based on urease immobilized on chitosan membranes. *Talanta,* 47; 183-191.
- Mascini, M., Guilbault, G.G. 1977. Urease coupled ammonia electrode for urea determination in blood serum. *Anal. Chem.* 49(6); 795-798.
- Mascini, M., Palleschi, G. 1983. A flow-through detector for simultaneous determination of glucose and urea in serum samples. *Anal. Chim.* 145; 213-217.
- Narinesingh, D., Mungal, R., Ngo, T.T. 1991. Urease coupled to poly(vinyl alcohol) activated by 2-fluoro-1-methylpyridinium salt: preparation of a urease potentiometric electrode and application to the determination of urea in serum. *Anal. Chim. Acta.* 249; 387-393.
- Nilsson, H., Akerlund, A., Masbach, K. 1973. Determination of glucose, urea and penicillin using enzyme-pH electrodes. *Biochem. Biophys. Acta.* 320; 529.
- Özmen, N. "Biyosensörler", *EMO Teknik dergisi*, Antalya, Ocak 2009, 20 - 22.
- Singh, M., Verma, N., *Urea biosensors, Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008, 7-14.

- Saurina, J., Hernandez-Cassou, S., Fabregas, E., Alegret, S. 1998 *Anal. Chim. Acta* 71; 49.
- Snere, P.A., Uyeda, K. 1976. Functional groups on enzyme suitable for binding to matrices, *Methods in Enzymol.*, Edited by Mosbach, K., 44; 11-19, Academic Press, Inc., New York.
- Stamm, C., Seiler, K., Simon, W. 1993. Enzymatic biosensor for urea based on an ammonium ion-selective bulk optode membrane. *Anal. Chim. Acta.* 282; 229-237.
- Telefoncu, A, 1997, *Enzimoloji*, Lisansüstü Yaz Okulu, Aydın-Türkiye.
- Telefoncu, A. 1999, *Biyosensörler*, 81-142 Ege Üniversitesi, İzmir.
- Umezawa, Y., Umezawa, K., Sato, H., "Selectivity Coefficients for ion-selective electrodes : recommended methods for reporting  $K_{A,B}^{pot}$  values", *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 67, No. 3, 1995, 507-518.
- Walcerz, I., Koncki, R., Leszczynska, E., Glab, S., 1995. Enzyme biosensors for urea determination based on an ionophore free pH membrane electrode. *Anal. Chim. Acta.*, 315; 289-296.
- Walcerz, I., Koncki, R., Leszczynska, E., Salamonowicz, B. and Glab, S., 1996. Enzyme biosensors for urea determination based on an ionophore free pH membrane electrode. *Anal. Lett.* 29 (11); 1939-1953.
- Weetall, H.H. 1988. Enzymes immobilized on inorganic supports, *Anal. Uses Imm. Biol. Comp. Det. Med. Ind. Uses*, 1-16.
- Xie, B., Mecklenburg, M., Danielsson, B., Öhman, O., Norlin, P., Winqvist, F. 1995. Development of an integrated thermal biosensor for the simultaneous determination of multiple analytes. *Analyst.* 120; 155-160.
- Xu, Y.J., Lu, C.Y., Hu, Y., Nie, L.H., Yao, S.Z. 1996. Preparation of urea sensors with a series piezoelectric crystal device. *Anal. Lett.* 29; 1069-1080.
- Zaborsky, O. 1973. *Immobilized enzymes*, Edited by Zaborsky, O., CRC Press, Cleveland, Ohio, 1-103.
- Zamponi, S., Lo Cicero, B., Mascini, M. Della Ciana, L., Sacco, S. 1996. Urea solid-state biosensor suitable for continuous dialysis control. *Talanta*, 43; 1373-1377.

**ÖZGEÇMİŞ**

Doğum tarihi	24.10.1985	
Doğum yeri	Bakırköy / İstanbul	
Lise	2000-2003	Büyükşehir Hüseyin Yıldız Anadolu Lisesi
Lisans	2003-2007	Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	2007-	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı