

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

**GLUTAMATIN POTANSİYOMETRİK TAYİNİ İÇİN  
BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

**DEMET YILMAZ**

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

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. EMİNE KARAKUŞ**

**İSTANBUL, 2011**

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

**GLUTAMATIN POTANSİYOMETRİK TAYİNİ İÇİN BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ VE  
KARAKTERİZASYONU**

**DEMET YILMAZ**

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

**DANIŞMAN**  
*DOÇ. DR. EMİNE KARAKUŞ*

**İSTANBUL, 2011**

# GLUTAMATIN POTANSİYOMETRİK TAYİNİ İÇİN BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Demet YILMAZ tarafından hazırlanan tez çalışması ... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

## Tez Danışmanı

Doç. Dr. Emine KARAKUŞ

Yıldız Teknik Üniversitesi

## Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Emine KARAKUŞ

Yıldız Teknik Üniversitesi

---

Prof. Dr. İnci Arısan

Yıldız Teknik Üniversitesi

---

Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK

Yıldız Teknik Üniversitesi

---

## ÖNSÖZ

---

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

Tezimin hazırlanmasında laboratuvar olanaklarını kullanabilme fırsatını bana sunan Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma;

Özel yaşamım ve deneysel çalışmalarımda sabırla bana yardım eden ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Didem Begüm BAĞRIYANIK, Araş. Gör. Nilay ALTAŞ KIYMAZ'a;

Hayatımın her döneminde hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan beni bugünlere getiren, maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan sevgili babam Hasan YILMAZ ve annem Meryem YILMAZ'a, her zaman yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Sedat ERSOY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs, 2011

Demet YILMAZ

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
<b>BÖLÜM 1</b>	
GİRİŞ.....	1
1.1    Literatür Özeti.....	1
1.2    Tezin Amacı.....	1
1.3    Hipotez.....	1
<b>BÖLÜM 2</b>	
AMİNOASİTLER.....	2
2.1    Aminoasitler.....	2
2.1.1    Aminoasitlerin Yıkımı.....	3
2.1.2    Amino Asitlerin Karbon İskeletlerinin Yıkımı.....	3
2.2    Glutamat.....	4
2.2.1    MSG'ın Ticari Olarak Üretimi.....	8
2.2.2    Gıdalara Katılma Şekilleri.....	9
2.2.3    Katıldıkları Gıda Grupları.....	9
2.2.4    Sağlık Açısından Önemi.....	10
2.2.5    MSG'ın Yan Etkileri.....	10
2.2.6    Glutamatın Tayin Yöntemleri.....	11
2.3    MSG ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	13
<b>BÖLÜM 3</b>	
KURAMSAL TEMELER.....	19
3.1    Biyosensörler.....	19
3.1.1    Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonları.....	21
3.1.2    Biyokomponentler.....	22

3.1.3	Transduserler .....	22
3.1.4	Biyosensörlerin Uygulama Alanları .....	23
3.1.5	Biyosensörlerin Avantaj ve Dezavantajlarını Belirleyen Temel Özellikler .....	24
3.1.6	Enzim Sensörleri .....	25
3.1.7	Enzim İmmobilizasyonu .....	27
3.1.8	Enzim İmmobilizasyon Metotları .....	29
3.1.9	Biyosensörlerde Yararlanılan İletim ve Ölçüm Sistemleri .....	36
3.1.10	Enzim Elektrotlarında Performans Faktörleri .....	42
3.2	Glutamat Tayininde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış .....	44
3.2.1	Glutamat Oksidaz. ....	44
3.2.2	Nonaktin .....	44
3.2.3	Palmitik asit .....	45
3.2.4	Dioktil Sebakat (DOS) .....	45
3.2.5	Glutaraldehit .....	46
3.2.6	Polivinil klorür (PVC) .....	46
3.2.7	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) .....	46

## BÖLÜM 4

MATERYAL METOD .....	47	
4.1	Kullanılan Cihazlar .....	47
4.2	Kullanılan Enzimler .....	47
4.3	Kullanılan Gerçek Numuneler .....	48
4.3.1	Multiopower Aminoasit Karışımı .....	48
4.3.2	Knorr Tavuk Bulyon .....	48
4.4	Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	48
4.5	Kullanılan Çözeltiler .....	49
4.5.1	TRIS tampon çözeltisi .....	49
4.5.2	Amonyum klorür çözeltileri .....	49
4.5.3	Monosodyum glutamat çözeltileri .....	50
4.5.4	Çalışma elektrodu iç dolgu çözeltisi .....	51
4.5.5	Multipower aminoasit karışımında glutamik asit tayini için (Standart Katma Yönteminde) kullanılan çözeltiler .....	52
4.5.6	Knorr tavuk bulyon tabletinde monosodyum glutamat tayini için (Standart Katma Yönteminde) kullanılan çözeltiler .....	52
4.6	Amonyum-Seçici Elektrotlar .....	53
4.6.1	Amonyum-seçici elektrotların hazırlanışı .....	53
4.7	Glutamat oksidaz biyosensörleri .....	54
4.7.1	Glutamat oksidaz biyosensörlerinin hazırlanması .....	54
4.7.2	Glutamat oksidaz biyosensörlerinin çalışma aralıklarının ve eğimlerinin belirlenmesi .....	55
4.8	Glutamat Oksidaz Biyosensörünün Amonyuma ve Glutamata Cevabının Belirlenmesi .....	56
4.8.1	Glutamat oksidaz biyosensörünün amonyuma cevabının belirlenmesi .....	56
4.8.2	Glutamat oksidaz biyosensörünün glutamata cevabının belirlenmesi .....	56
4.9	Glutamat Oksidaz Biyosensörlerinin Performanslarına Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi .....	56
4.10	Glutamat Oksidaz Biyosensörlerinin Tekrarlanabilirliği .....	56

## BÖLÜM 5

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	57
5.1 Glutamat Oksidaz Biyosensörleri.....	57
5.1.1 Glutamat Oksidaz Biyosensörlerinin Amonyuma Cevabı.....	58
5.1.2 Glutamat oksidaz biyosensörlerinin kalibrasyon grafikleri.....	59
5.1.3 Tampon konsantrasyonunun etkisi .....	60
5.1.4 pH'nın etkisi .....	62
5.1.5 Sıcaklığın etkisi .....	63
5.1.6 Seçicilik katsayılarının hesaplanması .....	65
5.1.7 Amino asitlerin girişim etkisi .....	65
5.1.8 Karıştırma hızının etkisi .....	66
5.1.9 Cevap süresi.....	66
5.1.10 Raf ömrü .....	67
5.1.11 Tekrarlanabilirlik .....	68
5.2 Glutamat Biyosensöründe Kinetik Parametrelerin (Km ve Vmax değerleri) Belirlenmesi .....	69
5.3 Gerçek Numunelerde Glutamat Tayini.....	71
5.3.1 Multipower aminoasit karışımında glutamik asit tayini .....	71
5.3.2 Knorr tavuk bulyonunda glutamat tayini.....	72

## BÖLÜM 6

SONUÇ VE ÖNERİLER.....	74
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ.....	80

## SİMGE LİSTESİ

---

°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
g	Gram
mg	Miligram
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
DL	Desilitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
Mv	Milivolt
M	Molar
sn	Saniye
%	Yuzde
s	Standart sapma
U	Unite

## KISALTMA LİSTESİ

---

PVC	Polivinilklorur
TRIS	Tris(hidroksimetil)aminometan
PVA	Polivinilalkol
DOS	Bis-(2-etilhekzil)sebakat
CDI	Karbonildiimidazol
GA	Glutaraldehit
EDC	1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil]karbodiimid
HCl	Hidroklorik asit
THF	Tetrahidrofuran
GLOD	L-Glutamat oksidaz
GDH	Glutamat dehidrogenaz
GDC	Glutamat dekarboksilaz
MSG	Monosodyum glutamat

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Aminoasitlerin sitrik asit çevrimine giriş basamakları.....	4
Şekil 2.2 Glutamik asitin açık yapısı .....	4
Şekil 2.3 Glutamatın transaminasyon reaksiyonu sonucunda oluşan $\text{NH}_4^+$ 'un metabolik yolu .....	6
Şekil 2.4 Glukoz-Alanin döngüsü .....	6
Şekil 2.5 Üre döngüsü ile sitrik asit çevriminin bağlantısı.....	7
Şekil 3.1 Doğal ve en mükemmel biyosensörük sistemler.....	20
Şekil 3.2 Genel anlamda bir biyosensör ve bileşenleri.....	21
Şekil 3.3 Bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi.....	26
Şekil 3.4 Enzim sensörünün genel çalışma ilkesi.....	27
Şekil 3.5 Biyomoleküllerin immobilizasyon metotları .....	29
Şekil 3.6 Önemli enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması .....	31
Şekil 3.7 Çapraz bağlamada sık kullanılan kimyasalların formülleri.....	34
Şekil 3.8 Glutaraldehitle çapraz bağlama reaksiyonu .....	34
Şekil 3.9 Potansiyometrik esaslı enzim sensörünün şematik gösterimi .....	38
Şekil 3.10 Nonaktin'in yapısı .....	45
Şekil 3.11 Dioktil sebakat'ın yapısal formülü .....	45
Şekil 3.12 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid'in formülü .....	46
Şekil 4.1 $\text{NH}_4^+$ seçici elektrot .....	54
Şekil 4.2 Hazırlanan glutamat oksidaz biyosensörü.....	55
Şekil 5. 1 Glutamat oksidaz biyosensörünün amonyum iyonu için kalibrasyon grafiği .....	59
Şekil 5.2 Glutamat oksidaz biyosensörünün kalibrasyon grafiği .....	60
Şekil 5.3 Glutamat oksidaz biyosensörünün eğiminin tampon konsantrasyonu ile değişimi.....	61
Şekil 5.4 Glutamat oksidaz biyosensörünün eğiminin pH ile değişimi.....	63
Şekil 5.5 Glutamat oksidaz biyosensörünün eğiminin sıcaklık ile değişimi .....	64
Şekil 5.6 Glutamat oksidaz biyosensöründen elde edilen eğim değerindeki değişme .....	67
Şekil 5.7 Glutamat oksidaz biyosensörünün tekrarlanabilirlik grafiği.....	68
Şekil 5.8 Glutamat biyosensöründe yer alan glutamat oksidaz için Lineweaver-Burk grafiği. ....	70
Şekil 5.9 Glutamat biyosensörü ile standart katma yöntemi kullanılarak $10^{-1}$ M MSG çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği. ....	71
Şekil 5.10 Glutamat biyosensörü ile standart katma yöntemi kullanılarak $10^{-2}$ M MSG çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği. ....	72

## ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1	Esansiyel ve esansiyel olmayan aminoasitler.....2
Çizelge 3.1	Biyosensörler için uygulama alanları .....23
Çizelge 3.2	Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları .....23
Çizelge 3.3	Enzim immobilizasyonunda kullanılan maddelerde (taşıyıcı) bulunan reaktif gruplar ve reaksiyonlara girdikleri aminoasitlerin fonksiyonel grupları .....30
Çizelge 3.4	Enzimlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonunda bağ oluşumuna katılan aminoasitlerin reaktif grupları .....32
Çizelge 3.5	Enzim sensörlerinin sınıflandırılması.....37
Çizelge 3.6	Potansiyometrik enzim biyosensörleri .....41
Çizelge 4.1	Kullanılan enzimlerin adları, numaraları, kaynakları ve temin edildikleri firmalar .....47
Çizelge 4.2	Çalışmada kullanılan aminoasitler .....48
Çizelge 4.3	Amonyum klorür kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması .....50
Çizelge 4.4	MSG kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması .....51
Çizelge 4.5	MSG çözeltilerinin hazırlanması.....52
Çizelge 4.6	MSG çözeltilerinin hazırlanması.....52
Çizelge 4.7	PVC ve palmitik asit kullanılarak hazırlanan amonyum-seçici membranların bileşimi.....53
Çizelge 5.1	25,0±1,0°C’da glutamat oksidaz biyosensörünün amonyum iyonu için doğrusal çalışma aralığı ve elektrodun eğimi.....58
Çizelge 5.2	25,0±1,0°C’da glutamat oksidaz biyosensörünün eğimi ve çalışma aralığı.....59
Çizelge 5.3	25,0±1,0°C’da glutamat oksidaz biyosensörlerinin cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi .....61
Çizelge 5.4	25,0±1,0°C’da glutamat oksidaz biyosensörlerinin cevabına pH’nın etkisi .....62
Çizelge 5.5	25,0±1,0°C’da glutamat oksidaz biyosensörlerinin cevabına sıcaklığın etkisi ..64
Çizelge 5.6	Glutamat biyosensörünün seçicilik katsayıları.....65
Çizelge 5.7	Glutamat biyosensörüne askorbik asit ve bazı amino asitlerin girişim oranları 66
Çizelge 5.8	Hazırladığımız glutamat biyosensörü ile MULTIPower aminoasit karışımında glutamik asitin tayini ile elde edilen sonuç. ....71
Çizelge 5.9	Knorr tavuk bulyonunda MSG’ın tayini için glutamat biyosensörü ile elde edilen sonuçlar.....72

# GLUTAMATIN POTANSİYOMETRİK TAYİNİ İÇİN BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Demet YILMAZ

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emine KARAKUŞ

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.

*L-glutamatın tayini*, klinik ve gıda örneklerinde önemlidir. Glutamat, merkezi sinir sisteminde aminoasit nörotransmitterdir, beyin fonksiyonlarının birçok türünde majör rol oynamaktadır. Aşırı salınması epilepsi, şizofreni, kalp krizi, iskemi, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarına neden olmaktadır. Monosodyum glutamat (MSG), özellikle fast food türü gıdalarda tat artırıcı olarak kullanılır. Ayrıca konserve ve paketlenmiş gıdalarda katkı maddesi olarak da kullanılır. Çin mutfağında çok kullanılır. Bu nedenle biyolojik ve gıda örneklerinde glutamatın tayini için hızlı ve hassas tekniklerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada hazırlanmış olduğumuz, uzun zincirli bir yağ asidi olan palmitik asit kullanılarak elde edilen PVC amonyum-seçici membran elektrot üzerine belli miktarda glutamat oksidaz enziminin immobilize edilmesi ile hazırlanan biyosensör ile glutamatın potansiyometrik tayininin yapılması amaçlanmıştır. Biyosensörün en iyi çalışma koşullarını belirlemek amacı ile tampon konsantrasyonu, tampon pH'sı, enzim miktarı, enzim oranı ve ortam sıcaklığının elektrot cevabı üzerine etkileri incelenmiş, enzim elektrodun raf ömrü, tekrarlanabilirliği, duyarlılığı, tayin aralığı ve tayin sınırı belirlenmiştir. Ayrıca hazırlanan glutamat biyosensörü

ile tavuk bulyonu ve multipower aminoasit karışımı glutamatın tayini yapılmış ve elde edilen sonuçlar standart yöntem veya referans değerler ile karşılaştırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Glutamat oksidaz, glutamat biyosensörü, potansiyometri, PVC membran

## ABSTRACT

---

# BIOSENSOR DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION FOR POTENTIOMETRIC DETERMINATION OF GLUTAMATE

Demet YILMAZ

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

Biosensors containing enzyme as biologically active material basically immobilized translated electrochemical signals an electrode and include enzyme or enzymes on this electrode. Ion-selective electrodes immobilized on one or more enzyme which determination of various substrate quite importance in recent years.

The detection of L-glutamate is of importance in both clinical and food samples. It is an excitatory amino acid neurotransmitter in the mammalian central nervous system, playing a major role in a wide variety of brain functions and its excessive release may cause neuronal death associated with wide range of neurological disorders ranging from epilepsy, schizophrenia, stroke, ischemia to Alzheimer's and Parkinson's diseases. Common fast foods are well known to contain mono sodium glutamate. MSG is also used as additive in processed, canned and packed foods. Most cooked Chinese dishes contained MSG. So, a simple and accurate method has been need development to determination in food and biologic materials for monosodium glutamate.

In this study, firstly ammonium-selective membrane electrode was prepared and a certain amount of the enzyme was immobilized on the glutamate oxidase. In this way, potentiometric determination of glutamate is to be with prepared enzyme biosensor. To determine the optimum working conditions of the biosensor; examined the effect of buffer concentration, buffer pH, the amount of enzyme, ratio of enzyme and media temperature on the electrode response and determined shelf life, repeatability, sensitivity, interval of determination (designated range) and detection limit of enzyme electrode. The results obtained by the

determination of glutamate with prepared glutamate biosensor in multipower aminoacid mix, chicken bouillon compared with standart method.

**Key Words:** Glutamate oxidase, glutamate biosensor, potantiometric, PVC membrane

#### 1.1 Literatür Özeti

Literatürde glutamat oksidaz, glutamat dehidrogenaz, glutamat dekarboksilazın kullanıldığı daha çok amperometrik esaslı glutamat biyosensörleri bulunmaktadır. Glutamatın potansiyometrik asalsa tayinine rastlanmamış olması çalışmamızın özgün olduğunu göstermektedir.

#### 1.2 Tezin Amacı

Tavuk bulyonu ve ticari multipower amino asit karışımı örneklerinde bulunan glutamatın tayini için potansiyometrik esaslı biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Amonyuma duyarlı membran ile hazırlanan amonyum elektrodunun membranına glutamat oksidaz enziminin immobilize edilmesi ile hazırladığımız biyosensör ile enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan amonyum iyonlarının potansiyometrik olarak ölçülmesi sonucu elde edilen amonyum miktarından çözeltideki glutamat miktarı tayin edilmiştir.

#### 1.3 Hipotez

Glutamat biyosensörünün hazırlanması, optimum çalışma koşullarının belirlenmesi ve daha sonra tavuk bulyon ve ticari olarak satılan aminoasit karışımı numunelerinde glutamatın tayininin yapılmasıdır.

## BÖLÜM 2

### AMİNOASİTLER

#### 2.1 Aminoasitler

Protein, bazı hormon, vitamin ve antibiyotikler gibi önemli bileşiklerin yapısını oluşturan amino asitler, dokuların yenilenmesi, büyüme ve kas yapımı için metabolizmanın kullandığı en önemli maddelerdendir. DNA tarafından kodlanarak protein yapısına giren 20 çeşit amino asit bulunmaktadır. E.coli gibi bakteriler, 20 amino asidin tamamını sentezleyebildikleri halde insanda ise ancak yarısı sentezlenir. Sentezlenemeyen aminoasitlerin diyetle alınması gerekir. Esansiyel veya eksojen amino asitler olarak da isimlendirilen bu amino asitlerin listesi esansiyel olmayan amino asitlerle birlikte Çizelge 2.1' de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Esansiyel ve esansiyel olmayan aminoasitler

<b>Esansiyel olmayan</b>	<b>Esansiyel (diyetle alınan)</b>
Alanin	Arginin
Asparagin	Histidin
Aspartat	İzolösin
Sistein	Lösin
Glutamat	Lizin
Glutamin	Metiyonin
Glisin	Fenilalanin
Prolin	Treonin
Serin	Triptofan
Tirozin	Valin

Canlı yapısındaki aminoasitler, yağlar veya karbonhidratlar gibi depolanmazlar. Vücutta sentezlenen her protein molekülü fonksiyoneldir ve hiçbir zaman aminoasit deposu değildir.

Fakat, uzun süreli açlıkta kas proteinleri, amino asit sağlamak amacıyla değil de, kan glukozunu normal seviyede tutmak için amino asitlerinden glukozun sentezlenmesi maksadıyla yıkılır. Süt ve yumurta proteinleri istisna olarak aminoasit deposu fonksiyonu görürler. Aminoasitler öncelikle, vücutta ihtiyaç duyulan proteinler ve diğer biyomoleküllerin sentezinde kullanılırlar. Amino asitlerin fazlası atılmaz ve depolanmazlar, bunlar hücre içinde yakıt metabolizmasına dahil olmak üzere yıkılırlar.

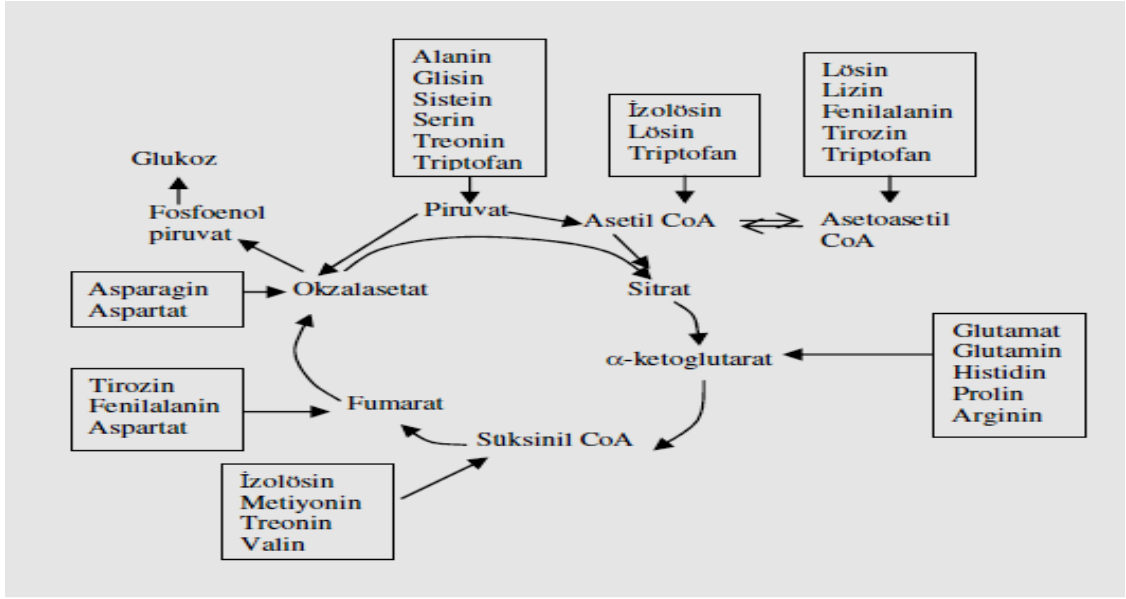
### 2.1.1 Aminoasitlerin Yıkımı

Aminoasitlerin yıkımında  $\alpha$ -amino grubu, transaminasyon ve oksidatif deaminasyon reaksiyonları ile uzaklaştırılıp çoğu üreye çevrilirken, geride kalan karbon iskeletleri de asetil CoA, asetoasetil CoA, piruvat veya TCA devrinin ara bileşiklerinden birisine dönüştürülür. Yani, amino asitlerin söz konusu olan iskeletleri ya  $\text{CO}_2$  ve  $\text{H}_2\text{O}$ ' ya kadar oksitlenerek organizmaya enerji sağlar veya yağ asitlerine, keton cisimlerine ve glukozla dönüştürülür. Memelilerde amino asit yıkımının meydana geldiği en önemli organ karaciğerdir.

### 2.1.2 Amino Asitlerin Karbon İskeletlerinin Yıkımı

$\alpha$ -Amino grubu uzaklaştırılmış aminoasitlerin geride kalan karbon iskeletleri, glukozla çevrilebilen veya sitrik asit devri tarafından yükseltgenen ara bileşiklere dönüştürülür. Gerçekten 20 aminoasidin karbon iskeletleri yedi çeşit moleküle çevrilir: piruvat, asetil CoA, asetoasetil CoA, a-ketoglutarat, süksinil CoA, fumarat, ve okzalasetat (Sekil 2.1). Burada, metabolik dönüşümlerin ne kadar ekonomik yürüdüğüne bir örneği daha görülmektedir.

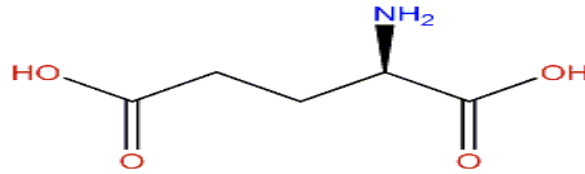
Karbon iskeletleri yalnız asetil CoA veya asetoasetil CoA' ya yıkılan amino asitlere **ketojenik aminoasitler** adı verilir. Çünkü, açlıkta yıkıldıkları zaman, keton cisimlerinin artışına sebep olurlar. Piruvat,  $\alpha$ -ketoglutarat, süksinil CoA, fumarat, veya okzalasetata çevrilen aminoasitlere de **glukojenik aminoasitler** denir. Çünkü, açlık durumunda bu TCA devri ara bileşikleri ve piruvat, fosfoenol piruvata ve daha sonra glukozla dönüştürülmektedir. Memelilerde asetil CoA veya asetoasetil CoA' dan glukoz sentezi yolları kapalıdır.



Şekil 2.1 Aminoasitlerin sitrik asit çevrimine giriş basamakları

## 2.2 Glutamat

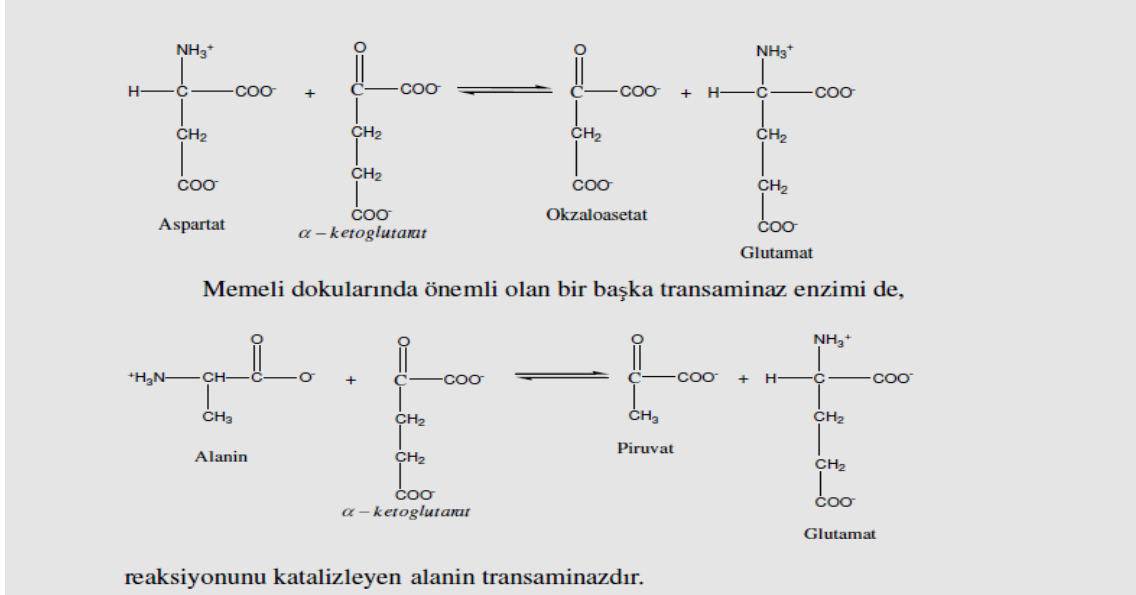
Glutamik asit (Glu, E) proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biridir. Besinsel açıdan bakıldığında elzem olmayan bir amino asittir, yani vücudumuzda sentezlenebilir. Glutamat olarak da bilinir. 1 amino ve 2 karboksil grubu içerir. Polar, asidik aminoasittir. Fizyolojik pH'da iyonize olup negatif yüklüdür. Non esansiyel ve glukojeniktir. Molekül formülü  $C_5H_9NO_4$ 'tür ve molekül ağırlığı 147.13 g/mol'dür. Sistematik adı (2S)-2-aminopentanedioik asittir. Kodonları GAA ve GAG şeklindedir. Glutamik asidin karboksilat anyonu glutamat olarak bilinir. pKa' sı 4.1'dir ve bu fizyolojik pH'ta baskındır.



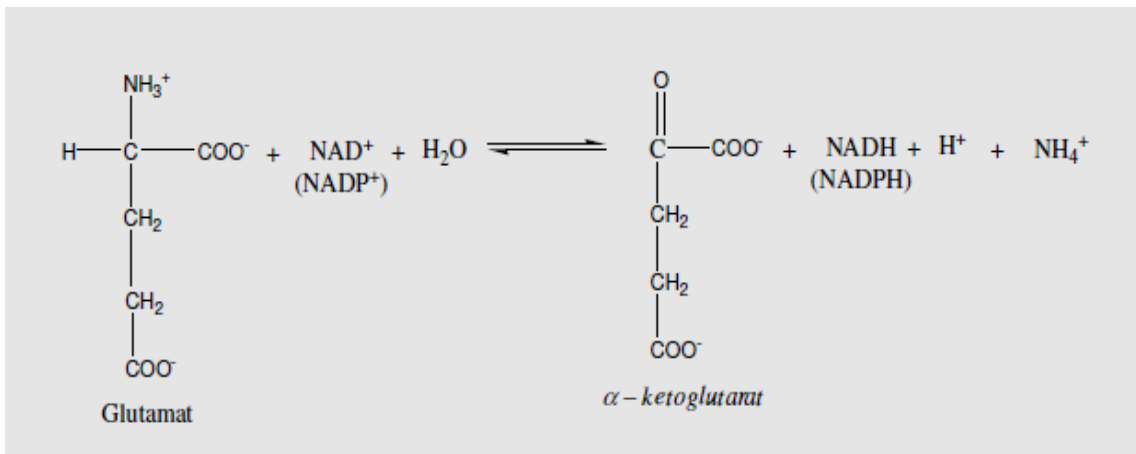
Şekil 2.2 Glutamik asitin açık yapısı

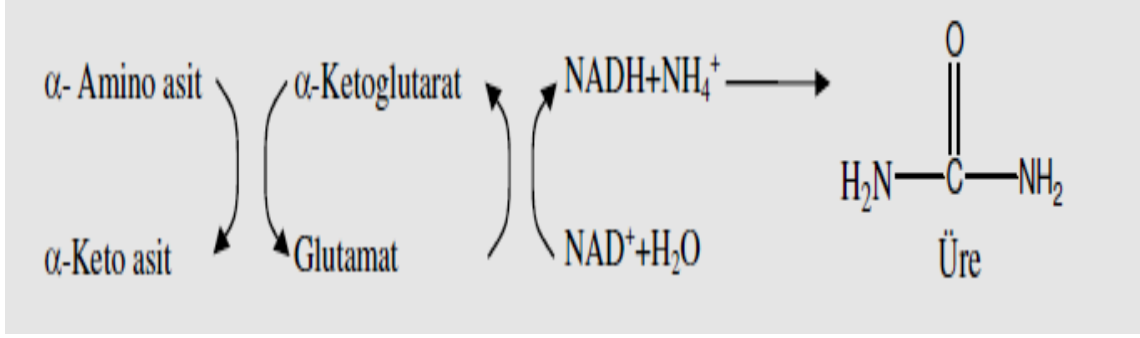
Bir çok amino asidin  $\alpha$ -amino grupları glutamat oluşturmaya üzere  $\alpha$ -ketoglutarata aktarılır. Bu olaya transaminasyon adı verilir. Bir  $\alpha$ -amino asitten bir  $\alpha$ -keto aside,  $\alpha$ - amino grubunun transferini katalizleyen enzimler transaminazlar veya amino transferazlardır. Bu enzimler

genelde, stoplazmada ve biraz da mitokondri de bulunur. Memeli dokularında iki transaminaz enzimi öne çıkar. Bunlardan en önemlisi olan aspartat transaminaz olup, aspartat yapısındaki bir amino grubunun  $\alpha$ -ketoglutarata aktarılması reaksiyonunu katalizler:



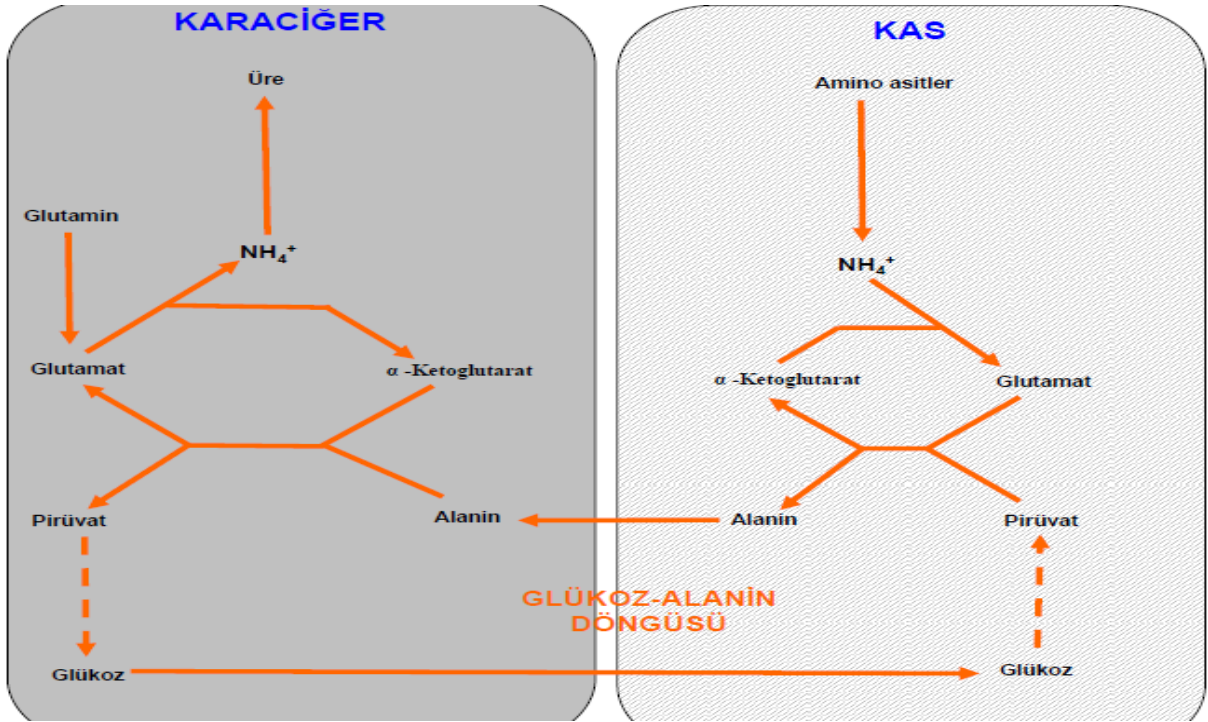
Transaminasyon sonucu oluşan, glutamatın oksidatif deaminasyonu, koenzim olarak hem  $\text{NAD}^+$  hem de  $\text{NADP}^+$  kullanan glutamat dehidrogenaz enzimi tarafından gerçekleştirilir. Bu bir mitokondri enzimidir ve birçok doku mitokondrilerinde belirlenmiş olup karaciğerde çok aktiftir. Reaksiyonu çift yönlü katalizlemesine rağmen, olayın dengesi glutamat sentezi lehinedir. Yemek sonrası glutamat seviyesi yükseldiği zaman, oksidatif deaminasyonu gerçekleştirir.





Şekil 2.3 Glutamatın transaminasyon reaksiyonu sonucunda oluşan  $\text{NH}_4^+$ 'un metabolik yolu

Amino asitlerin amino grupları genellikle, ilk olarak karaciğer hücrelerinin sitosolünde  $\alpha$ -ketoglutarata taşınır ve glutamat oluşturulur. Glutamat mitokondriye taşınır. Sadece burada amino grup  $\text{NH}_4^+$  oluşturmak üzere uzaklaştırılır. Birçok dokuda oluşturulan amonyağın fazlası glutaminin amid azotuna dönüşür ve karaciğer mitokondrisine aktarılır. Karaciğerde bulunan fazla nitrojen amonyağa dönüşeceğine glutamik asite bağlanarak glutamine dönüşür.

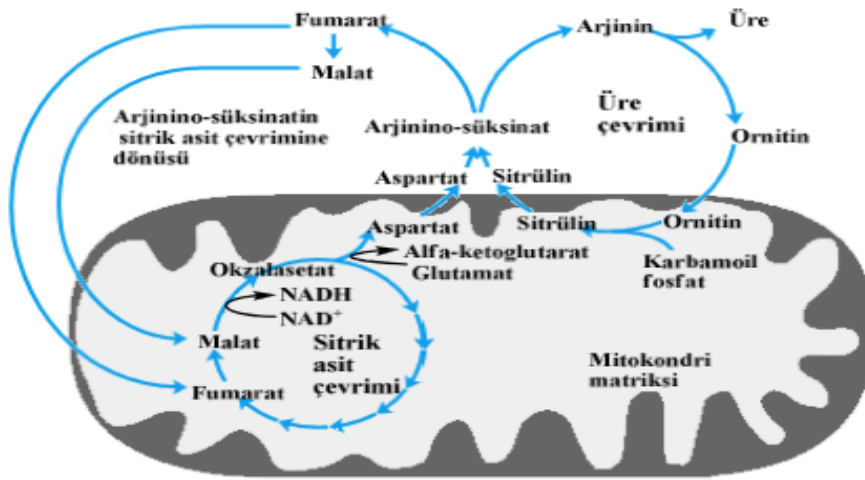


Şekil 2.4 Glukoz-Alanin döngüsü

Glutamat mitokondride glutamat dehidrogenaz ile amonyuma ve  $\alpha$ -ketoglutarata çevrilir, amonyum da karbamoil fosfat sentetaz ile karbamoil fosfata çevrilerek üre döngüsüne katılır. Şekil 2.5'de görüldüğü gibi sitrik asit çevriminde, okzaloasetattan aspartat oluşurken, glutamatın amin grubu transaminasyon reaksiyonları ile okzaloasetata aktarılır. Oluşan

aspartat, mitokondride karbamoil fosfattan oluşan sitrüllin ile birleşerek arjinino-süksinatı oluşturur ve bu da arjinine dönüşür ve üre olarak vücuttan dışarı atılır.

Üre döngüsü; karaciğerde gerçekleşir ve toksik bir madde olan amonyağın daha az toksik bir madde olan üreye çevrilmesini sağlar. Daha sonra üre kana verilerek böbreğe gönderilir, oradan da idrar ile vücuttan atılır. Amaç toksik amonyağın daha az toksik olan üreye dönüştürülmesidir. Arginaz enzimi yalnızca karaciğerde bulunduğu için bu döngü karaciğerde gerçekleşir. Üre döngüsü ile sitrik asit çevriminin bağlantısı ise aşağıdaki gibidir:



Şekil 2.5 Üre döngüsü ile sitrik asit çevriminin bağlantısı

Glutamat, ökaryotik ve memeli hücrelerde önemli enerji ve azot kaynağı olarak bilinen bir aminoasittir. Merkezi sinir sisteminde eksitator nörotransmitter olarak davranır ve öğrenme, hafıza, sinir gelişimi ve sinaptik esneklik gibi temel süreçlerden sorumludur [1-2]. Kan beyin bariyeri (kanda taşınan maddelerin beyin hücrelerine geçmesindeki kontrol bariyeri) glutamatın geçmesine izin vermez. Bundan dolayı beyin kendi glutamatını diğer amino asitlerden ve glikozdan kendisi sentezler. Beyin ve omurilikle ilgili sıvılarda glutamat seviyesi arttığında, epilepsi, şizofreni, kalp krizi, felç, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi nörolojik hastalıklara neden olmaktadır [3-4]. Glutamat, insan metabolizmasında merkezi noktalarda bulunduğu için önemli

fonksiyonları vardır. Örneğin; protein sentezinde substrat, glutaminin prekürsörü, azot taşınmasında ve daha bir çok yerde önemli bir rol oynar.

Monosodyum glutamat, glutamik asidin bir tuzudur. Monosodyum glutamat gıda endüstrisinde tat arttırıcı olarak geniş bir alanda kullanılmaktadır. Dünyada en çok bilinen ve kullanılan lezzet arttırıcı olup, proteinlerin yapı taşı olan L-glutamik asidin sodyum tuzudur. MSG ( $C_5H_8NNaO_4H_2O$ ), birçok gıdada ve insan vücudunda proteinlerin yapı taşı olan amino asit formunda veya serbest halde bulunmaktadır. MSG ile ilgili araştırmalarda söz konusu amino asidin sadece L-formunun lezzet arttırıcı aktiviteye sahip olduğu, D-formunun ise aktivitesinin olmadığı saptanmıştır. MSG işlenmiş, konserve ve paketlenmiş gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılır. Aynı zamanda, birçok çin yemeği MSG içermekte ve MSG'ın aşırı miktarda vücuda alınması 'Çin Lokantası Sendromu' olarak bilinmektedir.

MSG'ın ekstra tüketimi; göğüs ağrısı, hissizlik, baş ağrısı ve terleme gibi semptomların oluşmasına neden olur. Ama yine de, yiyecek endüstrisindeki MSG'a talepten dolayı, yıllık üretimi her yıl 900000 tona ulaşmakta ve her geçen gün artmaktadır [5]. Bu yüzden, glutamat seviyesinin ölçümü için yöntem geliştirilmesi çeşitli uygulamalarda önemli araştırma alanı haline gelmiştir.

### **2.2.1 MSG'ın Ticari Olarak Üretimi**

MSG esas olarak şeker sanayinin bir yan ürünü olmakla birlikte, günümüzde fermantasyonla üretilmektedir. Fermantasyonun avantajı ise lezzet arttırıcı özelliği olan L-izomerinin üretilmesidir.

İlk defa 1865'de meydana çıkartılmış bir aminoasittir. Monosodyum glutamatın ticari üretimi 1909 yılında başlamıştır. Günümüzde bakteriyel fermantasyon yolu ile üretilmektedir. Bakteri (*Corynebacterium Glutamicus*) fermantasyon substratı olarak şeker, melas ya da nişasta içeren sıvı bir ortamda üretilir. Bakteriler, fermantasyon yoluyla glutamik asit üretir ve ortama verirler. Glutamik asit ortamda birikir ve daha sonra filtrasyonla ayrıştırılır, saflaştırılır ve nötralizasyon ile MSG' a dönüştürülür. Daha sonra ekstra bir saflaştırma, kristalizasyon ve kurutma ile beyaz bir toz haline getirilir ve aroma arttırıcı olarak kullanılır [6].

### 2.2.2 Gıdalara Katılma Şekilleri

MSG'nin pH 5.5 – 8 arasındaki gıda sistemlerinde en etkili lezzet artırıcı olduğu ve ısı işlemlere karşı duyarlı olduğu bilinmektedir. Isı etkisiyle glutamik asit 1 molekül su kaybederek laktan formunu oluşturmakta böylece lezzet artırıcı özelliğini kaybetmektedir. Ayrıca glutamik asit Maillard reaksiyonuna girerekte kayba uğrayabilmektedir.

Tavuk suyuna glutamik asit ve tuzlarının katılması ile gerçekleştirilen diğer bir çalışmada MSG'nin tuzlu tadı artırdığı, tavuk lezzetini kuvvetlendirdiği, tükürük salgısını ve iştah arttırdığı belirlenmiştir. Hazır çorba tipi ürünlerde MSG kullanımı ile ilgili gerçekleştirilen bir çalışmada katılan sodyum klorür miktarının da azaltılabileceği saptanmıştır. Söz konusu çalışmada, sebze, kremalı sebze, kremalı mantar, şehriye ve yayla çorbalarına 6 – 8 g/L olacak şekilde MSG katılmasının lezzet kabul edilebilirliğini arttırdığı saptanırken, NaCl miktarının da 7g/L'den 4g/L'ye düşürebileceği gözlenmiştir. Gıdalarda kullanılan glutamatın miktarı, gıdanın % 0,1 ile % 0,8'i arasındadır. Bu miktar geleneksel gıdalarda doğal olarak bulunan glutamat seviyesinin benzeridir. Glutamat tadı kendini sınırlandırır. Bunun anlamı; yemeğe uygun miktardan daha fazla eklendiğinde tada çok fazla bir katkıda bulunmaz, hatta tat dengelerine zarar bile verebilir [7].

### 2.2.3 Katıldıkları Gıda Grupları

Çin ve Japon mutfaklarının vazgeçilmez aroması Monosodyum Glutamat, hazır gıdalarda Türkiye de dahil bir çok ülkede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. MSG lezzet arttırıcılar arasında en çok kullanılan madde olup; hemen hemen tüm cipslerde, bazı katı ve ekmek üstü yağlarda, et sularında, hazır çorbalarda, hazır soslarda, tatlı tuzlu hazır ürünlerin bazılarında, bulyonlarda, kürlenmiş etlerde, işlenmiş et ürünlerinde, işlenmiş balık ve tavuklarda, mayonezlerde, baharat karışımlarında, sebzelerin işlenme aşamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Glutamatın meyve, meyve suları, şekerleme ve diğer tatlı gıdalarda etkili olmadığı ve hoş gitmeyen lezzete neden olduğu bildirilmektedir. Bu gıda maddelerinin %95 'inde MSG bulunmaktadır. MSG gıda ambalajlarında, lezzet arttırıcı, kıvam arttırıcı, doğala özdeş aroma, E 621, vb. isimler ile de adlandırılır [6-7].

#### **2.2.4 Sağlık Açısından Önemi**

MSG'nin çok düşük akut toksisiteye sahip olduğu bilinmektedir. Farelerde LD50 değerinin vücut ağırlığı başına 16600 mg/kg olduğu bildirilmiştir [8]. Uzun süre besleme sonucunda, değişik hayvanlarda MSG'nin olumsuz etkisine rastlanmamış, ancak MSG'a bağlı yüksek sodyum alımıyla ilgili problemler oluşabileceği bildirilmiştir.

Günümüzde MSG'nin insan sağlığı üzerine olan etkileri konusunda yapılan pek çok araştırma devam etmekte ve bu konuda birçok görüş bulunmakla beraber MSG kullanımının yasaklanmasını gerektirecek derecede ciddi bilimsel kanıtlar bulunmamaktadır. Ancak pek çok insan için, MSG'nin zararlı etkilerinin olabileceğinin tartışılıyor olması dahi zararsız olduğu da tam olarak kanıtlanamadığı için kullanımında çekincelere neden olmaya yetmektedir.

#### **2.2.5 MSG'nin Yan Etkileri**

MSG'nin aşırı derecede alımı sonucu baş ağrısı, bulantı, ishal, terleme, göğüste sıkışma, boyun arkasında yanma görülmektedir. Astımlı hastalarda MSG tüketimi sonucu ağır astım atakları oluşabilmektedir.

Nörotoksin bir madde olan MSG, sinir hücrelerine zarar vermektedir. Buna bağlı olarak Alzheimer, Parkinson, Huntington ve Sara (Epilepsi) hastalıkları oluşmasına neden olur. Ayrıca retinal dejenerasyon (göz retina tabakası hasarı), obezite (yağ birikimi, doyma metabolizmasına bozukluk), büyüme hormonunun baskılanması, Pankreas hasarı sonucu insülinde artış olmasına bağlı olarak diyabet oluşumu, böbrek ve karaciğer hasarı meydana gelmektedir [8].

Hamilelerde plasenta bariyerini geçerek bebeklerin de aynı etkilere maruz kalmasına neden olmaktadır.

Monosodyum glutamattan başka diğer aroma artırıcılarda kullanılmaktadır. Bazıları yine glutamat kaynaklıdır. Bunlar; monopotasyum glutamat, kalsiyum diglutamat, monoamonyum glutamat ve magnezyum diglutamattır. Glutamat kaynaklı olmayan ancak aynı tat özelliklerini verenler ise guanilik asit, disodyum guanilat, dipotasyum guanilat, kalsiyum guanilat, inosinik asit, disodyum inosinat, dipotasyum inosinat, kalsiyum inosinat, kalsiyum 5'-ribonükleotidaz ve disodyum 5'-ribonükleotidaz [6].

## **2.2.6 Glutamatın Tayin Yöntemleri**

L-glutamat, memelilerde sık rastlanan eksitator aminoasit nörotransmitterdir, çok çeşitli beyin fonksiyonlarında önemli rol oynar [9-11]. İskemi ve sinir hücrelerinin ölümü gibi çeşitli hastalıklarda rol oynadığı rapor edilmiştir [12-13]. Glutamat aynı zamanda birçok gıdada gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Gıda prosesleri sırasında yüksek konsantrasyonlarda glutamat kullanılması da nörolojik hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır [14]. Bu nedenle glutamatın tayini çok önemlidir.

Glutamat tayini için; kromatografik teknikler[15], spektrofotometrik [16-17], fluorometrik teknikler [18] kapiler elektroforez [19-20] mikrodializ, biyosensörler ve enzimatik yöntemler gibi birçok teknik geliştirilmiştir [21-22].

### **2.2.6.1 Kromatografik yöntemler**

L-glutamat, kromatografik metodlarla (Kondrat vd. [23]; Hanco ve Rohrer [24]) ölçülebilir ancak bu metod karmaşık, zaman alıcı ve ön işleme ihtiyaç duyar. İyon değişim kromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi aminoasitlerin tayininde sıklıkla kullanılan metodlardır[25-28]. Her iki metotta aminoasitlerin kalitatif ve kantitatif tayininde kullanılırlar. Biyolojik örneklerde ve gıdalarda bulunan bazı maddelerin tayini için kullanılan HPLC, ekipmanlarının pahalı olması, aletlerin kullanımının uzmanlık gerektirecek düzeyde dikkat ve itina istemesi ve laboratuvar şartlarında uygulanabilirliğinin sınırlı olması gibi faktörler nedeniyle cazibesini yitirmektedir. Aminoasitlerin tayininde kullanılan diğer analitik metodlar; gaz kromatografisi (GC) [25], ince tabaka kromatografisi (TLC) [25], kapiler elektroforez (CE) [29], [30], gaz kromatografi-kütle spektrometri (GC-MS) [31], sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS) [32], tandem kütle spektrometri (MS-MS) [33] ve sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometri (LC-MS-MS) [34]'dir.

### **2.2.6.2 Spektrofotometrik yöntemler**

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

### **2.2.6.3 Mikrodiyaliz**

Son 10-20 yıldır çok yaygın şekilde kullanılan mikrodiyaliz metodlar, L-glutamatın dakika başı ölçümlerini vermiştir. Fakat L-glutamatın ve diğer nörotransmitterlerin hızlı dinamikleri, saniye temelinde ölçüm yapan bir tekniğe ihtiyaç doğurmuştur. Cevap zamanının 1-20 dk arasında değişmesi bu yöntemin dezavantajıdır [35].

### **2.2.6.4 Kapiler elektroforez**

Kısa analiz süresi, küçük numune hacmi (1-10 $\mu$ L), az miktarda çözelti harcaması, ucuz, kullanım alanının geniş olması (proteinler, peptidler, aminoasitler, nükleik asitler, inorganik iyonlar, organik bazlar ve asitler) gibi avantajları vardır [36].

### **2.2.6.5 Biyosensörler**

Biyosensörler, glutamat için en hızlı gelişen teknik olmuştur. Glutamatın daha basit, ucuz, doğru ve duyarlı tayinine olanak sağlayan glutamat oksidaz enziminin kullanıldığı biyosensörlerin geliştirilmesi çok önemli bir ilerlemedir. Gıda prosesleri (Moser vd [37]), hücre kültürleri (Castillo vd [38]) ve hücre dışı beyin sıvıları (McMahon ve O'Neill [39]) gibi glutamatın çeşitli uygulamalarının tayininde amperometrik biyosensörlerin çeşitli tipleri üretilmiştir. Amperometriğe (Pasco vd [40], Alvarez-Crespo vd [41]), optiğe (Doong vd [42]), etkili alan transistörlerine (Braeken [43]) örnek verilebilir.

Potansiyometrik glutamat biyosensörlerinde çok az alete ihtiyaç duyulması avantajdır. Bunlarda sadece iyon-seçici elektrot, pH seçici elektrot ve iyon-seçici alan etkili transistörlere ihtiyaç duyulmaktadır.

### **Enzim modifiye elektrotlar (mikroelektrotlar)**

Glutamat oksidazla modifiye edilen karbon fiber ya da metal kablolu mikroelektrotlar, L-glutamatın beyin dokularında tayinini sağlar [44-45]. KCl ve elektrik uyarılarının sonucu olarak L-glutamatın arttığı rapor edilmiştir. Enzim modifiye elektrotlar; hızlı cevap zamanı ve küçük alanlarda ölçüm yapabilme yeteneğine sahiptir [46].

Mikroelektrotların kayıt bölgesi, çevresindeki küçük bir dokuda analiz yapabilir. Bu durum küçük ve katmanlı yapıların analizinde (sıçan ile farenin beyin ve omuriliği gibi) avantaj sağlar. Mikroelektrotların çoklu kayıt yüzeyi 2 veya daha fazla beyin bölgesinden analit (tayini istenen madde) ölçüm imkanı sağlar. Ayrıca mikroelektrotlar, amperometrik

tekniklerle birleştirilince, ilgilenilen maddenin ölçümünü hızlı zaman dilimlerinde (1-1000 ms) yapabilir. Bu durumda nörotransmitter alımının veya salınımının kinetikleri ölçülebilir [35].

### **On-line sensörler**

On-line L-glutamat sensörler, şırınga pompası, mikrodializ örnek probu, enzimatik reaktör ve akış hücreli elektrot içerirler [47-49]. On-line sensörler yüksek kararlılıklarından dolayı L-glutamatın in vivo tayini için kullanışlıdır. Ölçümler tekrarlanabilir ancak on-line sensör cevabı mikroelettrot sensörden daha yavaştır ve geniş örnek probuna sahiptir. (genellikle 1-3 mm uzunlukta ve birkaç yüz µm çapında) On-line sensörler; yüksek duyarlılık ve uzun süren kararlılıklarına rağmen, yavaş cevap zamanı, geniş örnek probu ve geçici çözünürlükleri vardır [49].

### **2.3 MSG ile İlgili Yapılan Çalışmalar**

Zhang, Mullens ve Gorski 2006'da kitosan enzim filmine dayalı amperometrik glutamat biyosensörü yapmışlardır. Bu method, platin elektrodun yüzeyinde kitosanın polikasyonik zincirleri ile polianyonik enzim L-glutamat oksidazın kompleksinin çökmesine dayanmıştır. CHIT+GmOx bazlı biyosensör düşük tayin sınırı  $1 \times 10^{-7}$  M MSG,  $2 \times 10^{-4}$  M doğrusal aralık ( $R^2=0.991$ ),  $85 \text{ nA/Mcm}^2$  duyarlılık ve kısa cevap zamanı ( $t_{90\%}=2\text{s}$ ) sergilemiştir. Biyosensörler, iyi bir işlevsel kararlılık göstergesi olan %80 oranında MSG sinyallerini korumayı 11 saatlik sürekli kullanım sonrasında bile sağlamış ve kararlılık çalışmaları, sinyal kaybının en büyük sebebinin çözelti içindeki glutamatın redox inaktif piroglutamata dönüşümünden kaynaklandığını göstermiştir.  $4^\circ\text{C}$ 'de suda 4 aylık bekletmeden sonra, CHIT+GmOx filmler MSG'ye karşı aktivitelerini %80-90 oranında devam ettirmişlerdir. CHIT+GmOx filmleri glutamat için basit ve güvenilir kromatografik dedektörün geliştirilmesinde gelecek vaat etmektedir.

Bu çalışmada, güçlü enzim immobilizasyonu, biyopolimer kitosanların L-glutamat oksidaz enzimiyle non kovalent jelleşmesiyle sağlanmıştır. Bu durum ve benzer kompozit filmlerin platin yüzeye yapışkanlığı yüksek performanslı amperometrik glutamat biyosensörlerin yapılmasını sağlamıştır. Özetle bu biyosensörler, yüksek duyarlılık, düşük tayin sınırı, hızlı cevap zamanı, iyi işlevsel ve uzun dönemli kararlılık göstermektedir [50].

Doong ve Shih 2006'da titanyum dioksit sol-jel matrikste glutamat dehidrogenazın immobilizasyonuna dayanan glutamat optik biyosensörü yapmışlar. SNARF-1-dekstran ile bağlı optik biyosensör, basit ve yeni titan sol jelden, glutamatın su ve biyolojik örneklerde tayini için floresan boya ile üretilmiştir. NADH bağımlı glutamat dehidrogenaz, buhar çökme metodu ile hazırlanan titan sol jelden türetilen matrikste tutulmuştur. SEM ve AFM, çukurların yüzey morfolojisini karakterize etmek için kullanılmıştır. Titan biyosensörün, su örnekleriyle iyi analitik sonuçlar verdiğini açıklamışlardır. Dinamik aralık 0,04 ve 10 mM aralığında ve tayin sınırı 5,5  $\mu\text{M}$ 'da gözlenmiştir. Biyolojik örneklerde glutamata cevap iyi performans göstermiş ve dinamik aralık ve tayin sınırı sırasıyla 0,02-10 mM ve 6,7  $\mu\text{M}$  olmuştur. Bağıl standart sapma ile su ve biyolojik örneklerde doğruluk sırasıyla %4,2 ve 10,7 olarak ispatlanmış ve biyosensörlerin, 1 aydan daha fazla süre yüksek depolama kararlılığı gösterdiğini açıklamışlardır. Sonuç olarak bu çalışmada, glutamatın su ve biyolojik örneklerde optik tayini için uygun glutamat biyosensörlerinin üretiminde şeffaf titan sol-jel film başarıyla, basit buhar çökme metoduyla kullanılmıştır [42].

Pan ve Arnold 1995'te glutamat için Nafion/glutamat oksidaz biyosensörünün seçiciliğini geliştirmişler. pH 7,4 ve 37°C de çalışma sonuçları 800 $\mu\text{M}$ 'a kadar doğrusallık göstermiştir ve tayin sınırı 0,3  $\mu\text{M}$ 'dır. Seçiciliğin artması, Nafion tabakasının kalınlığına bağlıdır. Cevaptaki girişimler, Nafion tabakasının max. kalınlığında bile ortadan kaldırılamamıştır. Doğru olmayan sonuçların, glutamat konsantrasyonuna girişim yapan türlerden 10 kat daha az olduğunda, askorbat gibi okside olabilen anyonik türlerden ileri geldiğini açıklamışlardır. Sonuç olarak, bu elektrodun bilinen askorbat seviyesinin glutamattan fazla olduğu zamanlarda birçok nörokimyasal deneyde istenilen seçiciliği sağlamadığı ancak glutamat oksidaz sisteminin kolay kuruluşu ve basit olmasıyla alternatif bir avantaj sunduğu vurgulanmıştır [51].

Moser ve arkadaşları, 1995'te glutamat ve glutaminin tayini için akış sensörünü küçülttüler. Akış kanallı platin filmini enzimle kapladılar ve tayin limitini glutamin ve glutamat için sırasıyla 50 ve 100  $\mu\text{M}$  olarak buldular. Ancak, bu tayin limitleri beyindeki L-glutamatın fizyolojik konsantrasyonundan çok fazladır [52].

Xin ve arkadaşları 1996'da kronoamperometrik metodla, Glutamat dehidrogenazın kinetiğine Lantanit iyonlarının etkisini çalıştılar. Kronoamperometrik metod, cam karbon elektrotta azalan NADH'nin oksidasyonuna dayanır. Reaksiyon başladığında kısa zaman aralıklarıyla elektrottaki NADH oksidasyonunun akım ve NADH konsantrasyonu düşer. Enzim katalizli

reaksiyon hızı akımdaki düşüşten hesaplanabilir. Bu metod, salatalık kökünden ham ekstrat ve karaciğer ekstraktının saflaştırılmasında, enzim aktivitesinin doğru tayininde güvenilirdir. Bu metodun en büyük avantajı, değişen koenzim konsantrasyonunun sürekli ve gerçek zamanlı ölçümünü sağlamasıdır, bu yüzden reaksiyonun başlangıç hızı  $V_0$  tayin edilebilir. Bu metod,  $La^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Yb^{3+}$  ve  $Zn^{2+}$  iyonlarının enzim aktivitesine etkisini tayin etmek için kullanıldı. Sonuç olarak, Lantanit iyonlarının enzimin glutamat sentezinin aktivitesini arttırdığı ve  $Zn^{2+}$ 'nin enzime potansiyel bir inhibitör gibi davrandığını bulmuşlardır [53].

Ryan ve arkadaşları, 1997'de, L-glutamat oksidaz enzimini kullanarak bir nörotransmitter olan L-glutamik asit için amperometrik biyosensör tasarladılar. L-glutamik asitin amperometrik biyosensörü, L-glutamat oksidazın (Glutamat oksidaz, 200 U mL<sup>-1</sup>, fosfat tamponu, pH 7.4) 60 µm çaplı teflonla çevrili Pt tel üzerine kaplanmasıyla yapıldı. Enzim yüzeye o-fenilendiaminin elektropolimerizasyonu ile tutturuldu ve ayrıca elektroaktif türlerin girişimi engellendi. Bu prosedür ile, çözümden immobilize enzimin klasik yaklaşım ile karşılaştırıldığında elektrotlarda benzer substrat duyarlılığı elde edildi ve biyosensör normal enzimden yaklaşık 10000 kat daha fazla verim elde edildi. Pt/PPD/Gluox sensörde, duyarlılık ve seçicilik SCE'ye karşı 0,7 V'ta elde edildi. Sensörün, hızlı cevap zamanı, glutamata karşı yüksek duyarlılığı ve yaklaşık 0.3 µmol<sup>-1</sup> LOD değeri ile biyolojik dokularda in vivo tayinlerde kullanılabileceği öngörülmüştür [54].

Niwa ve arkadaşları 1998'de ekstrasellüler glutamatın sürekli ölçümü için mikro boyutlardaki teknikler kullanılarak on-line sensör geliştirdiler. Sensör iki cam plakanın birbirine bağlanmasıyla yapıldı. Plakalardan biri dikdörtgen şeklinde akış kanalına sahip ve bu hem örneği hem de kapileri birbirine bağladı. Diğer karbon filmine dayalı elektrokimyasal hücre, polimer film ile çevrili enzim modifiye elektrot içerir, ince tabaka kanal akış hücresinin formudur. Sensör, hücre yapısına rağmen yüksek analit dönüştürme yeterliliğine sahiptir. Sonuç olarak, 44 nm'lik düşük tayin limiti gözlemlenildi (S/N=3). Katodik akım, 2µL/dak akış hızında örnek girişinden 10 s sonra artmaya başladı. Sensörü kullanarak, KCl ve γ-aminobütirik asit (GABA) uyaranlarına karşı hücre dışı L-glutamatın artışı gözlemlendi [46].

İsa ve Ghani 2006'da glutamat duyarlılığı için farklı plastikleştiriciler kullanılarak, heterojen kitosan membranları geliştirmişler. Çalışmanın tayin sınırı,  $1,0 \times 10^{-6} M$ ,  $1,0 \times 10^{-5}$ - $1,0 \times 10^{-1} M$  aralığında lineer cevap elde etmişlerdir. Elektrot performansı 25 °C de pH 4,0-8,0 aralığında alınmıştır. Cevap zamanı 5-35 s ve elektrotun 4 aydan daha fazla zaman için elverişli olduğunu açıklamışlardır. 2-nitrofeniloktiletler (2-NPOE), bis(2-etil(hekzil)adipat) (BEHA) ve

dioktilfosfonat (DOPP) gibi plastikleştiricilerin membrana eklenmesinin membran performansını önemli ölçüde değiştirmedğini ancak en iyi sonucun DOPP ile elde edildiğini açıklamışlardır [55].

Han, Boo, Park ve Chung 2005'te, nanogözenekli platin ince filmde hidrojen peroksitin elektrokimyasal davranışını ve elektrot üzerine enzim immobilizasyonu reaksiyonunu incelemişler. Tüm elektrokimyasal testler pH 7,4 ve 37°C'de 0,15 M NaCl içeren 0,1 M 10 ml fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir. Enzim tabakasının altında olan nanogözenekli Pt, heksakloroplatinik asit, bir non-iyonik yüzey aktif madde, oktaetilenglikol monoheksadesileter (C<sub>16</sub>EO<sub>8</sub>) içeren çözelti içinde, Pt-Ir alaşım mikroelevtrodu üzerine elektrokimyasal olarak kaplanmıştır. Nanogözenekli Pt mikroelevtrodunun glutamat oksidaz tabakasına 1,3-fenilendiamin elektropolimerizasyonu süresince glutamat oksidaz tutuklanmış ve yapılan glutamat mikrosensörü düz yüzey Pt ile karşılaştırılmıştır. Pt-Ir alaşım telleri kullanılarak 25 µM, 76 µM ve 178 µM olarak 3 farklı çapta mikroelevtrota hazırlanmıştır. Ticari düz yüzey Pt mikroelevtrota 25 µM çapında satın alınmış ve yapılan çalışma sonucunda, nanogözenekli yüzey üzerinde immobilize enzim, enzimatik mikrosensöre pratik uygulamaların yararlılığını arttırmıştır [56].

Hamdi, Wang, Walker, Maidment ve Monbouquette 2006'da dopamine karşı seçici elektroenzimatik L-glutamat mikrobiyosensörünü yapmışlar. Enzimatik olarak üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin elektrokimyasal tayinine dayanan amperometrik L-glutamat biyosensörü dizayn edilmiş ancak anahtar sorun yükseltgenen girişimcilere karşı seçicilikte oluşmuştur, mikromolar seviyesinde tayin yapılmış ve saniyede veya daha az sürede cevap elde edilmiştir. Glutamat mikrosensörü 125µM çapında elektrobirikimli Pt black (PtBlk) içermektedir. Pt tel ile seçici film elektropolimerleştirilmiş, oksitlenen polipirol (OPP) ve L-glutamat oksidaz tabakası glutaraldehitte çapraz bağlanmıştır. PtBlk'ın pürüzlülük mikroskalası elektrodun yüzey alanını etkin şekilde arttırmış ve düşük potansiyelde elektrokimyasal olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşmuştur. Bu mikrobiyosensör 450 mV'ta Ag/AgCl'e karşı L-glutamata yüksek duyarlılık (80+<sub>-</sub>10 nA µM<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup>) göstermiştir. Tanımlanan L-glutamat biyosensörü mükemmel cevap zamanı (~1-2 s) ve geçici kararlılık (~3 hafta) göstermiştir. Ayrıca, bu mikrobiyosensörün L-glutamata hızlı cevap verilmesi gereken, yaşayan beyin dokuları için yeterli olduğunu fakat dopamine karşı duyarsız olduğunu açıklamışlardır [57].

Maalouf ve arkadaşları 2006'da Nafyona dayalı amperometrik glutamat biyosensörünü ve metil viyolenle modifiye edilmiş cam karbon elektrodunu yapmışlar. Elektrokimyasal

biyosensör, metil viyolen ve florlanmış katyon değişim polimeri nafyon ile kimyasal olarak modifiye edilen cam karbon elektroda dayanmıştır. Enzim, bovin serum albümin (BSA), metil viyolen ve Nafyon varlığında glutaraldehitte çapraz bağlanarak immobilize edilmiştir. Enzim/BSA oranı, glutaraldehitte çapraz bağlama zamanı, metil viyolen ve nafyon yüzdeleri gibi değişiklikler biyosensör seçiciliğini önemli ölçüde etkiler. Glutamat biyosensörünün, elektrokimyasal direnç spektroskopisi amperometri ve siklik voltametri ile elektrokimyasal özellikleri incelenmiş ve optimum parametreler kullanılarak biyosensör yapılmıştır. Glutamat biyosensörü 20µM tayin sınırı ve lineer doğrusal aralık 0,75 mM olarak vermiştir. 25 µM asetaminofen, 20 µM ürik asit ve 200 µM askorbik asit ile seçiciliği 15 farklı aminoasit ile test edilmiş ve girişim yapan türlere karşı hiçbir amperometrik cevap elde edilmemiştir. Bu durum, biyolojik örneklerde, analitin ön ayrıştırması olmadan glutamat tayinine izin verir [58].

Schuvailo ve arkadaşları 2006'da glukoz, laktat ve glutamatın canlı dokulardaki ölçümleri için yüksek seçicilikte mikrobiyosensörler yapmışlardır. Amperometrik biyosensörlerin üretimine alternatif bir yaklaşım, kovalent bağlı enzimlerle fenilendiamin filminin elektropolimerizasyonu olduğunu açıklamışlardır. +0,4 V'ta Ag/AgCl'e karşı hidrojen peroksitin duyarlı tayinini sağlamışlardır. Tayin sınırı 0,5 µM, s/n=3, karbon fiber elektrotlar (30 µM çapında ve 500 µM uzunluğunda) rutenyum ile kaplanmıştır. Farklı girişimcilerin varlığında (askorbik asit, ürik asit gibi) hidrojen peroksitin yüksek seçicilikte tayinini sağlamışlar ve enzimatik seçici tabakalar, askorbat oksidazın varlığında glutaraldehit tarafından BSA ile glukoz oksidaz, laktat oksidaz ve glutamat oksidaz enzimlerinin kovalent çapraz bağlanmasıyla yapılmıştır. Biyosensörlerin dinamik aralığı, glukoz için 4 mM, laktat için 1,75 mM ve glutamat için 0,25 mM olarak bulunmuştur. Mikrobiyosensörlerin akış enjeksiyon sistemlerinde, 36 °C'de ve pH 7,4'te 10saat boyunca kararlı kaldığını ve bu mikrobiyosensörlerin canlı dokulardaki ölçümlerde kullanıldığını vurgulamışlardır [59].

McMahon ve arkadaşları (2007), 125µm çapında Pt tel elektrotlar üzerine polikasyon polietilenimin (PEI), stereoseçici L-glutamat oksidaz enzimi ve yarıseçici poli-o-fenilendiamin (PPD) bariyerini sırası ile uygulayarak (Pt/PEI/GluOx/PPD) nötral pH da glutamat biyosensörü hazırlamışlardır. Biyosensörün 0,7 V da SCA a karşı amperometrik olarak kalibrasyonunu yapmışlar, enzim substratın (L-glutamat, kosubstrat olarak da dioksijen) Michael-Menten parametrelerini belirlemişlerdir. Polietileniminin bulunması durumunda glutamat için tayin sınırınının 10 kat arttığı belirtilmiştir [60].

Alvarez-Crespo ve arkadaşları (1997) tarafından, dehidrogenaz-NAD<sup>+</sup> ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot üzerine o-fenilendiaminin elektropolimerizasyonu ile geliştirilen amperometrik glutamat biyosensörünün glutamata cevabı 0V (Ag/AgCl) a yakın potansiyelde, oluşan NADH'ın elektrokatalitik oksidasyonu ile belirlendi. Karbon pasta bileşiminin optimizasyonundan sonra biyosensörün doğrusal amperometrik cevabı  $5,0 \times 10^{-6}$ -  $7,8 \times 10^{-5}$ M, tayin sınırı ise  $3,8 \times 10^{-6}$  M dır. Hazırlanan biyosensörle tavuk bulyonu tabletlerinde glutamatın tayini yapılmış, elde edilen sonuçların, referans olarak çalışılan enzimatik spektrofotometrik yöntemle elde edilenlerle uyumlu olduğu bulunmuştur [41].

### KURAMSAL TEMELLER

#### 3.1 Biyosensörler

Tüm canlılar yaşadıkları ortamlardaki değişimleri hızlı bir şekilde algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin *in vitro*(hücre dışı) kullanımı için temel oluşturmuştur. Canlılar teknologların hayal bile edemeyeceği duyarlılık performansı gösterirler. Örneğin, bazı köpeklerin koku almaları insanlardan 100.000 kat daha duyarlıdır. Yılan balıkları, tonlarca su içerisine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi hemen algırlar. Kelebekler partnerlerinin yaydığı birkaç molekül bile hissederler. Algiler ise zehirli maddelere karşı çok duyarlıdır. İşte canlılara bu uyarıları algılamayı mümkün kılan biyolojik maddelerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi sonucunda biyosensörler ortaya çıkmıştır. Genel anlamda biyosensörler, biyoloji, fizik, kimya, biyokimya, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden multidisipliner bir anlayış çerçevesinde yararlanılarak ve biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlar olarak tanımlanabilirler.

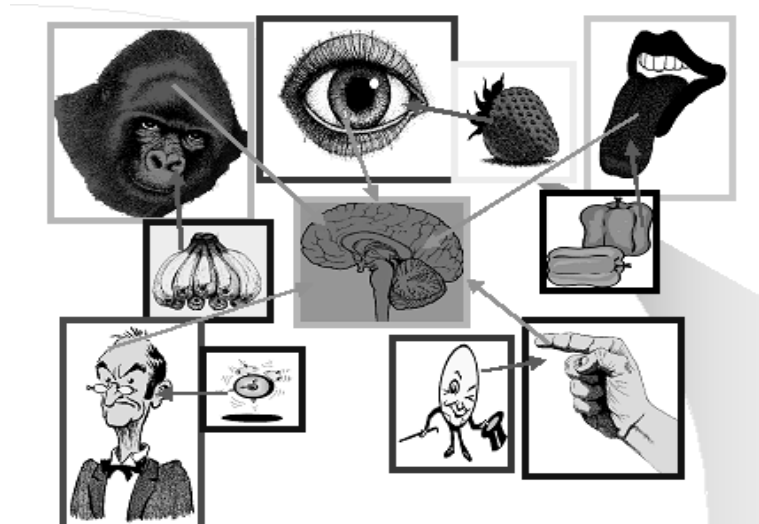
Biyosensörlerin tarihi 50'li yılların ortalarında L.C.Clark'ın Cincinnati hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O<sub>2</sub> miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons glukozoksidaz (GOD) enzimini O<sub>2</sub> elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başardılar. Böylece yeni bir analitik sistem oluştu. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifikliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrod) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur.



Bir biyolojik sıvıdaki glukoz ve çözülmüş oksijen elektrod etrafındaki membranı geçerek elektrod yüzeyine ulaştığında glukoz oksitlenerek glukonik aside dönüşür ve bu sırada O<sub>2</sub> harcanır. Ortamdaki glukoz bittiğinde O<sub>2</sub> tüketimi durur. O<sub>2</sub> elektrodu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözülmüş O<sub>2</sub> ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glukozun oksidasyonu için harcanan O<sub>2</sub> olup buradan biyolojik sıvıdaki glukoz miktarı hesaplanır. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalinde katılmasıyla diğer birçok maddenin tayini mümkündür. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine BİYOSENSÖRLER adı verilir.

Biyosensörlerin yüksek spesifiklik yanında; renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir konsantrasyon aralığında doğrudan ölçüme olanak sağlamak gibi üstünlükleri vardır. Fakat reseptör olarak adlandırılan biyokomponentlerin ph, sıcaklık, iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenmesi biyosensörün kullanım ömrünü azalttığından bir dezavantajdır (Telefoncu [61]).

Biyosensörlerde biyokomponent olarak enzimler yanında doku kültürleri, mikroorganizmalar, organeller, antikolar ve nükleik asitler de kullanılabilmekte olup ölçüm tekniğine göre amperometrik, potansiyometrik, termal, piezoelektrik, akustik veya optik sensörler olarak adlandırılırlar. Canlı hayatının önemli unsurlarından olan görme, koklama, işitme, dokunma, tat alma gibi algılama mekanizmaları doğal ve en mükemmel biyosensörük sistemler oldukları için biyosensör çalışmalarına en güzel örnekleri oluşturmaktadır (Şekil 3.1).

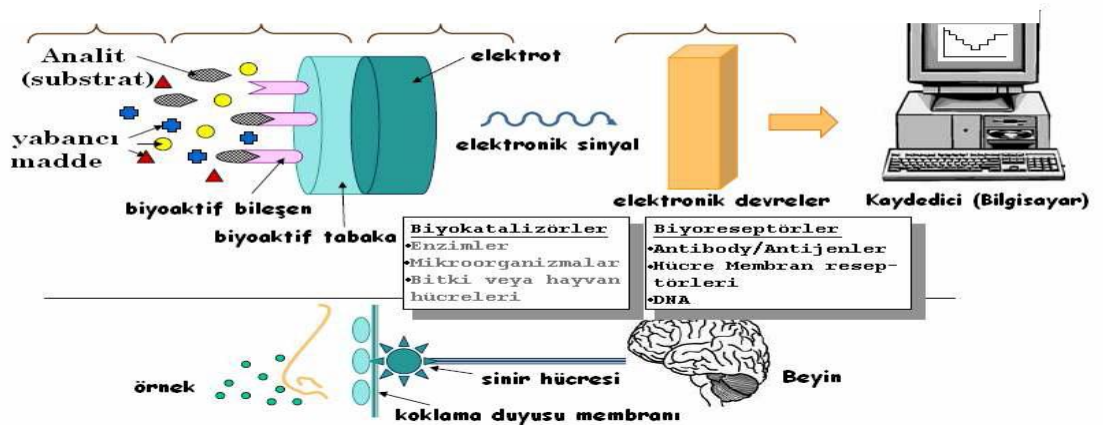


Şekil 3.1 Doğal ve en mükemmel biyosensörük sistemler

Aslında her bir canlı türü mükemmel biyosensörler sahibi olarak yaratılmıştır. Meselâ bes duyumuz; görme, isitme, dokunma, koklama, ve tat almamız yine alıcılar tarafından hissedilen verilerin kimyasal ve elektriksel sinyallere dönüştürülüp, beynin değerlendirilmesine sunulmasıdır. Modern teknolojinin ürünü olan biyosensörler ile bir ya da birkaç molekülü tanımaya, algılamaya çalışırken, sizlerin şu anda bir yandan gözleriniz dergiye bakıp her an sinyalleri beyne gönderiyor; diğer yandan kulağınız radyodan gelen hafif müziğin sinyallerini göndermekle mesgul; derginin sayfalarını hisseden parmaklarınız sinirlere uyarılar veriyorlar; burnunuz bardaktaki meyve çayını koklamak ve yine uyarıları beyne göndermekle mesgul; öteki yanda antikorlarınız yabancı madde avında ve buldukları anda gereken bilgileri beyne gönderip savunma mekanizmasını harekete geçirmeye çalışıyorlar.

### 3.1.1 Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonları

Biyosensörler biyokomponent(reseptör)' ler ile fiziksel komponent(transduser)'ler den oluşurlar. Biyosensörler, genel olarak analizlenecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemiyle kombinasyonu ile oluşturulurlar. Biyosensörlerde, biyoaktif bileşenin tayin edilecek madde ile etkileştiginde oluşan sinyalin iletim ve ölçümünde, genel olarak, elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ve kalorimetrik esaslı sistemler kullanılır. Şekil 3.2' de bir biyosensörün çalışma prensibi şematize edilmiştir.



### 3.1.2 Biyokomponentler

Biyosensörlerin yapısında yer alan biyokomponentler (biyokimyasal bileşenler) çoğu kez biyoreseptör (biyolojik algılayıcı) olarak da adlandırılırlar. Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar, nükleik asitler ve biyolojik membranlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler, sensörlerde biyokomponent (biyoreseptör) olarak kullanılırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılanlar enzimler ve antikorlardır. Biyoreseptörler, analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratarlar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler transduser tarafından algılanır. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir. Biyolojik reaksiyonları katalizleyen maddelerdir. Enzimler A substratının bulunduğu reaksiyonu katalizleyerek B ürününün oluşmasını hızlandırmaktadır. Enzimler katalizledikleri reaksiyonun substratına karşı çok özgüdürler. Bu özgülük biyosensörlerin seçici olmasını sağlar. Üreaz enzimini kullanan biyosensör sadece üre miktarı hakkında sonuç vermektedir. Kimyasal olarak diğer maddelerle ilişkili bile olsa diğer maddeleri tanımaz. Enzim kullanılarak hazırlanan biyosensörlere glukoz sensörü için glukoz oksidaz, etanol için alkol oksidaz, laktat sensörü için laktat oksidaz ve üre için üreaz verilebilir.

Teorik olarak reseptör ve transduserlerin birçok değişik şekilde birleştirilmesi mümkün olmasına rağmen bu bileşimler bir elektrik sinyali oluşturmazlarsa biyosensör fonksiyon göstermez. Örneğin; transduser olarak bir termistörün kullanılması durumunda substratın dönüşüm reaksiyonu sonucu entalpide bir değişim olmaz ise biyosensör çalışmaz.

### 3.1.3 Transduserler

Transduserler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyonun özelliğine göre transduserler kullanılır. Elektrotlar amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde kullanılır. Burada amaç; O<sub>2</sub> elektrodunda çözülmüş O<sub>2</sub>'yi, pH elektrodunda H<sup>+</sup> iyonunu ölçmektir. Optik sensörlerde hedef; ısı, piezoelektrik sensörlerde ise kristalin salınım rezonansının kütle yüklenimi sebebiyle değişmesidir. Bunların dışında transistörler ve termistörler de transduser olarak kullanılmaktadır.

### 3.1.4 Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel alanlarda özellikle otomasyon ve kalite kontrolünde çok önemli rol oynarlar [61].

Biyosensörlerin uygulama alanları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Biyosensörler için uygulama alanları

- Klinik diyagnostik, biyomedikal sektör
- Tarla tarımı, bağ-bahçe tarımı ve veterinerlik
- Bakteriyal ve viral diyagnostik
- İlaç analizi
- Endüstriyel atık kontrolü
- Çevre koruma ve kirlilik kontrolü
- Maden işletmelerinde toksik gaz analizleri
- Askeri uygulamalar

Biyosensörler; gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler, bazı anorganik bileşikler yanında enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar. Bunların dışında, biyolojik oksijen gereksinimi (BOD), toksisite ve mutajenite testlerinde de başarı ile uygulanmaktadır. Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları Çizelge 3.2.’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları

<b>Biyosensör Grubu</b>	<b>Kapsadığı Analiz Alanı</b>
Enzim Sensörleri	Küçük molekülü organik ve inorganik maddeler (metabolitler, ilaçlar, gıda maddeleri, vitaminler, antibiyotikler, pestisidler vb.)
Mikrobiyal Sensörler	Enzim sensörlerinin kapsadığı alanlar+BOD, toksisite, mutajenite
DNA Sensörleri	Virüsler, patojen mikroorganizmalar
İmmuno Sensörleri	Virüsler, patojen mikroorganizmalar+ ksanabiyotikler

Biyosensörler en çok biyomedikal sektörde uygulama imkanı bulmuştur. Bu alanda uygulama imkanı bulan ilk biyosensörler enzim sensörleridir. Ticari olarak üretilen ilk biyosensör ise, şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayinini mümkün kılan glukoz

biyosensörüdür. Bunu renal fonksiyon testleri için geliştirilen üre ve kreatinin biyosensörleri ile kas gücünü ölçmeye yönelik laktat biyosensörü izlemiştir. İnsan vücuduna yerleştirilebilen biyosensörler de geliştirilmiş olup bunlar biyolojik sıvılar vücut dışına alınmadan ve tüketilmeden analiz imkanı verirler ki, özellikle ameliyat sırasında bu bilgilerin kesintisiz sağlanması çok önemlidir. Biyosensörlerin, ilaçların vücuttaki düzeylerinin ayarlanması ve kontrolünde kullanılması yakın bir gelecekte gerçekleştirilebilecektir. Biyosensörlerin gelecekte önemli uygulamalarından biri de süper oksit ve nitrik oksit gibi kısa ömürlü, hormonlar ve nörotransmitterler gibi düşük konsantrasyonlu maddelerin *in vivo* tayinidir. Biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde basta glukoz olmak üzere bir çok monosakkarit, amino asitler, organik asitler(laktik asit), üre ve alkol tayinlerinde enzim sensörleri kullanılmaktadır. Ayrıca gıdalardaki yabancı maddeler (pestisitler, toksinler ve yabancı hormonlar vb.) yanında aroma ve tazelik gibi kompleks parametreler için de biyosensörler hazırlanabilmektedir. İlaçların kötü amaçla kullanımı ve uyusturucu ile mücadelede biyosensörler kullanılabilir. Uyusturucu arayan köpeklerin yerini biyosensörler alabilir. Böylece özellikle gümrüklerde, karakollarda zaman kazanılacaktır. Toprak, hava ve su kirliliğinin kontrolünde mikrobiyal sensörler ve enzim sensörleri kullanılmaktadır.

### **3.1.5 Biyosensörlerin Avantaj ve Dezavantajlarını Belirleyen Temel Özellikler**

- Biyosensörlerdeki biyoaktif bileşen spesifik ve kararlı olmalıdır. Biyoaktif bileşenin spesifik olması girişim yapabilecek türleri içeren karmaşık içerikli ölçüm ortamlarında detaylı ön işlem yapılmaksızın analize imkan verir. Biyoaktif bileşenin kararlı olması ise çok sayıda analize imkan vereceği için biyosensörün ekonomik olmasına zemin hazırlar.
- Biyosensörlerdeki temel reaksiyonun fiziksel parametrelerden olabildiğince az etkilenmesi istenir. Bu özellik fiziksel koşulların değişebildiği laboratuvar dışı koşul ve ortamlarda da güvenilir analizlerin yapılabilmesine imkan verir.
- Biyosensör cevaplarının doğru, duyarlı ve tekrarlanabilir olması büyük önem taşır. Cevapların doğruluğu beklenen esas parametredir. Duyarlılık, biyolojik sistemlerden gelen unsurlar kullanıldığı için genelde çoğu klasik yöntemden daha iyidir. Tekrarlanabilir sonuçlar alınması ise bir ölçüde daha önce sözü edilen parametrelerle de ilişkilidir. Cevap zamanının kısa olması ise genelde biyosensörlerin tercihli olarak kullanımlarına yol açan en önemli faktörlerden biridir.

- Biyosensörlerde algılayıcı elementin küçük ve bazen biyoyumlu olması beklenir. Küçük ve biyoyumlu sistemlerin özellikle *in vivo* ölçümlere uyarlamada önemli üstünlükleri vardır.
- Ölçüm ünitesinin ucuz ve taşınabilir olması değişik alanlarda yaygın kullanımına imkan verir.

Doğal olarak tüm biyosensörlerin bu özelliklerin tümünü taşıması söz konusu değildir. Ancak doğru, duyarlı ve tekrarlanabilir cevaplar kesinlikle beklenen özelliklerdir. Bunların dışındaki parametrelerdeki değişiklikler biyosensörlerin diğer yöntemlere avantaj ve dezavantajları olarak karşımıza çıkmaktadır.

### 3.1.6 Enzim Sensörleri

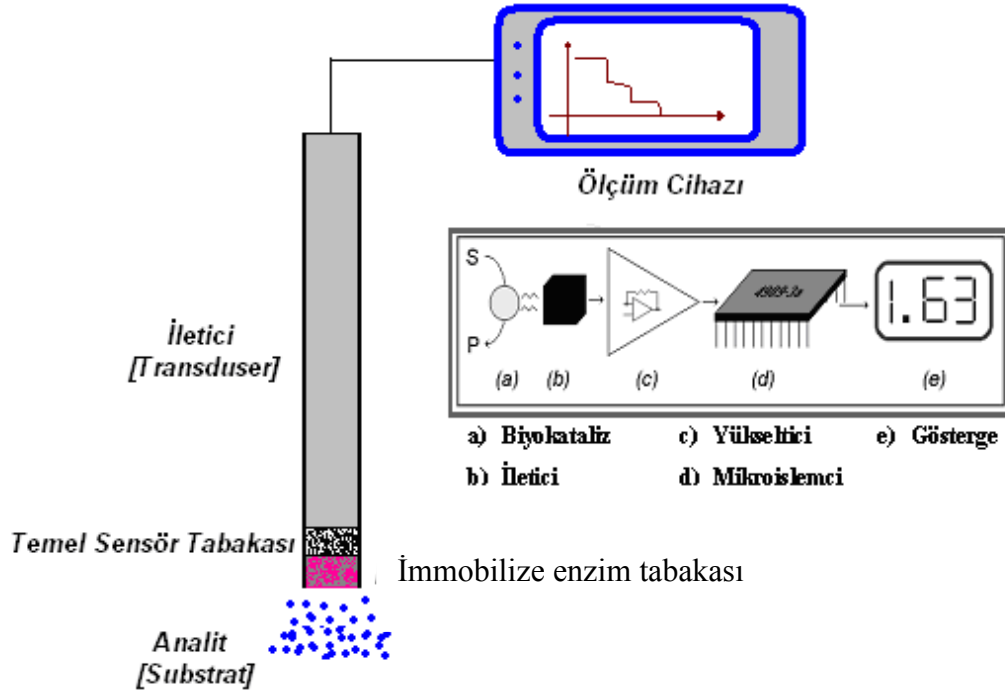
Biyosensör teknolojisinin tarihsel gelişimine bakıldığında bu alandaki ilk çalışmaların enzim biyosensörleriyle başladığı görülmektedir. Biyosensör teknolojisindeki ilk örnekler özellikle amperometrik ve potansiyometrik temelli enzim elektrodları şeklinde ortaya çıkmışlardır [61].

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 [62].

Enzimler, spesifiklik ve duyarlılıklarından dolayı mükemmel analitik ajanlardır. 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 laboratuvarlarında tedavi amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, glukoz oksidaz (GOD) ve heksokinaz,  $\beta$ -D-glukozun analizi ile diyabet indikatörü olarak kullanılırlar.

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 3.3'de görüldüğü gibi bir elektrokimyasal sensör üzerine enzimin ince bir tabaka halinde immobilizasyonundan oluşmuştur.

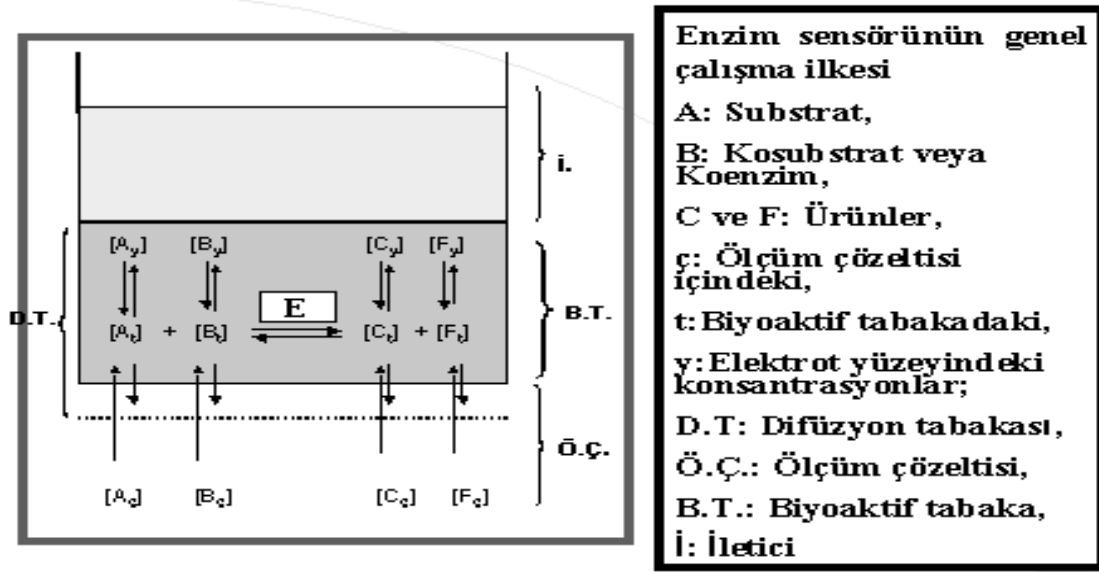


Şekil 3.3 Bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi

Sistemin özelliğine bağlı olarak yükseltici, mikroislemci, dijital görüntüleyici gibi kısımlar sistem içinde yer alabilirler.

### 3.1.6.1 Enzim sensörlerinin genel çalışma ilkesi

En genel anlamda bakıldığında diğer biyosensörlerde olduğu gibi enzim sensörleri de biyoaktif tabaka , iletici ve ölçüm sisteminden oluşur. Diğer biyosensörlerden tek fark biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimlerin yer almasıdır. 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 3.4 Enzim sensörünün genel çalışma ilkesi

Şekil 3.4'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 ya da ürün konsantrasyonundaki artışı tespit 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 ölçüleceği sinyal biyoaktif tabaka-iletici arayüzeyindeki konsantrasyonlara aittir.

### 3.1.7 Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, sulu ortamlarda veya immobilize edilerek farklı yüzeylerde biyolojik fonksiyonlarını sürdürebilirler. Enzimler için “immobilize” kelimesi bir yüzey üzerine yerleştirilmiş ve aynı zamanda biyolojik özelliklerini koruyan anlamına gelmektedir. immobilize enzimler, serbest halde bulunan enzimlere göre çok az dezavantajlara sahiptir.

İmmobilize enzimlerin ve immobilizasyon metotlarının avantajları;

-Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.

- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vs.) karşı daha dayanıklıdır.

- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.

- Sürekli işlemlere uygulanabilir.

- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.

- Ürünün oluşumu kontrol altında tutulabilir.

- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.

- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcının 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,

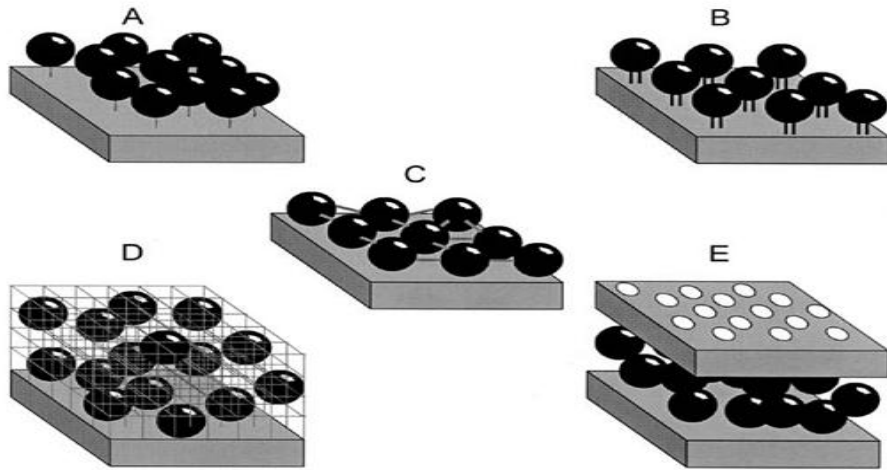
– Zehirli olmaması,

– Ucuz ve yenilebilir olması gerekmektedir.

### 3.1.8 Enzim İmmobilizasyon Metotları

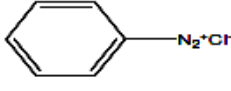
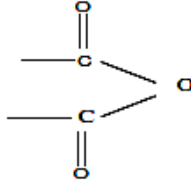
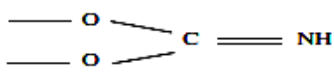
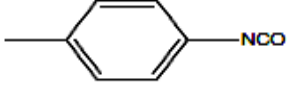
İmmobilizasyon tekniklerinde en önemli adım enzimin ve elektrot yüzeyinde bulunan matriksin fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenerek doğru metodun seçilmesidir. İmmobilizasyon sonrasında enzimin kararlılığında ve kinetik özelliklerinde değişiklikler gözlemlenir. Bunun nedeni matriks yüzeyine yerleştirilmiş olmaları ve reaksiyon sonucunda açığa çıkan ürünlerdir. Enzimlerin immobilizasyon sonrası genellikle aktivitelerinde çözünemediklerinden dolayı azalma meydana gelirken matriks bir yapının içerisinde bulunmalarından dolayı denaturasyona uğramaları gecikmektedir (Guisan [63]).

Biosensörlerin yüzeyine enzim immobilizasyon yöntemleri fiziksel ve kimyasal metodlar başlığı altında incelenmektedir. Bu metotlardan dört tanesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar; 1. Adsorbsiyon, 2. Tutuklama, 3. Kovalent bağlanma 4. Çapraz bağlama ve 5. Biyolojik bağlama. Şekil 3.5’de immobilizasyon metotlarından beş tanesinin yapısı gösterilmiştir Çapraz bağlama metodu kolay uygulanabilirliği ve maliyetinin düşük olması nedeniyle en çok kullanılan yöntemdir. Enzim immobilizasyonunda kullanılan maddelerde bulunan reaktif gruplar ve reaksiyona girdikleri amino asitler Çizelge 3.3’de gösterilmiştir.

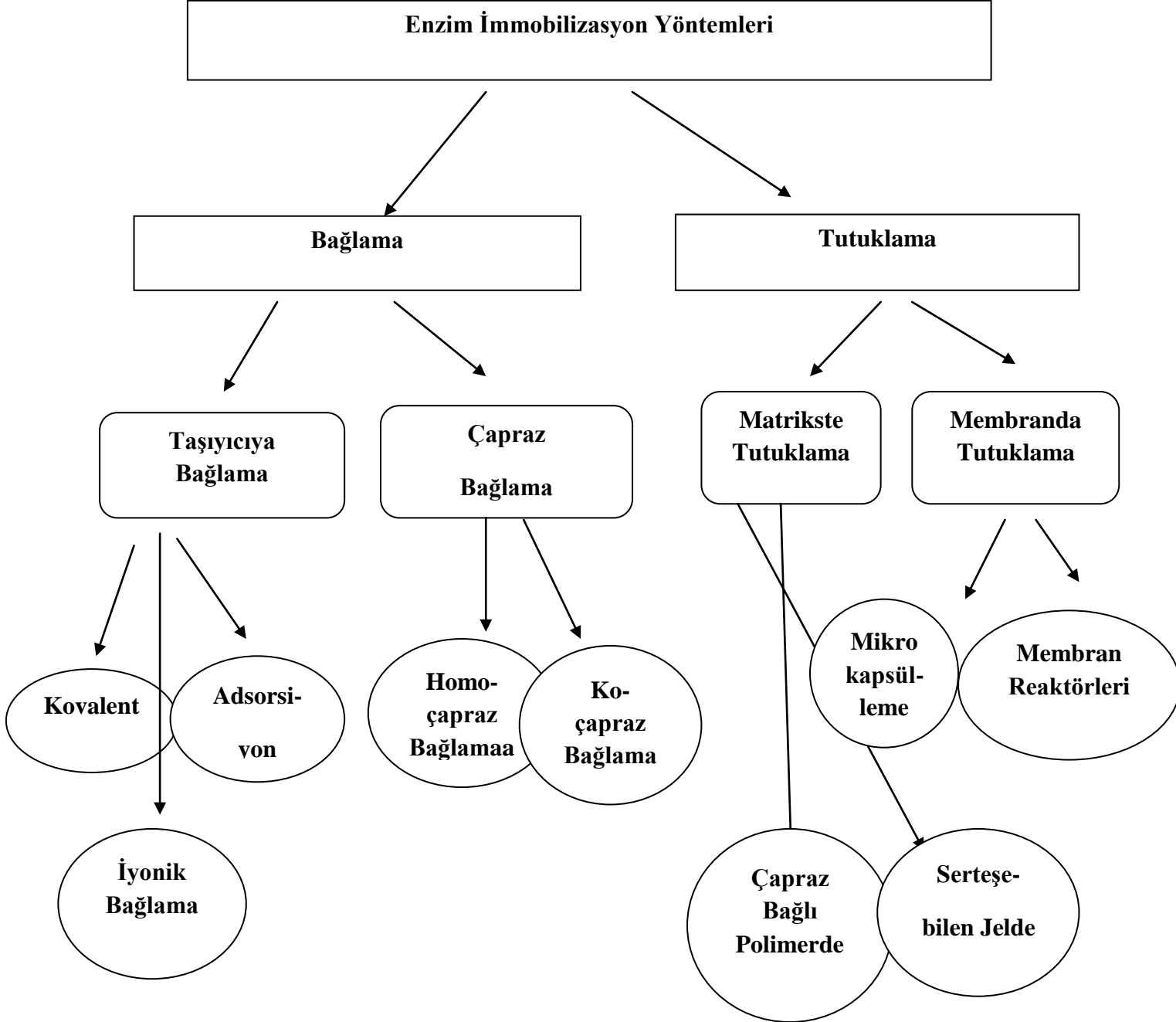


Şekil 3.5 Biyomoleküllerin immobilizasyon metotları. A Adsorpsiyon, kovalent olmayan zayıf elektrostatik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler. B Kovalent Bağlanma. Güçlü kimyasal bağlar sayesinde biyomoleküller kararlı bir şekilde yüzeye bağlanırlar. C Çapraz bağlama moleküller birbiri arasında ve elektrot yüzeyine kovalent bağlanırlar. D Tutuklama biyomoleküller polimer ağına içerisine hapsedilir. E Dış membrana tutuklama

Çizelge 3.3 Enzim immobilizasyonunda kullanılan maddelerde (taşıyıcı) bulunan reaktif gruplar ve reaksiyonlara girdikleri aminoasitlerin fonksiyonel grupları

Taşıyıcının reaktif grubu	Enzimdeki fonksiyonel grup ve ilgili amino asit
 <p>Diazonyum tuzu</p>	<p>— NH<sub>2</sub> (Lys, N-Terminal)</p> <p>— SH(Cys)</p> <p>— OH (Tyr)</p>
<p>— R — NCS</p> <p>izotiyosiyanat</p>  <p>Asit anhidrit</p>	<p>— NH<sub>2</sub> (Lys, N-Terminal)</p> <p>— NH<sub>2</sub> (Lys, N-Terminal)</p>
<p>CH<sub>2</sub>CON<sub>3</sub></p> <p>Açıl azid</p>	<p>— NH<sub>2</sub> (Lys, N-Terminal)</p> <p>— SH(Cys)</p> <p>— OH (Tyr)</p>
 <p>imidokarbonat</p>	<p>— NH<sub>2</sub> (Lys, N-Terminal)</p>
 <p>izosiyanat</p>	<p>— NH<sub>2</sub> (Lys, N-Terminal)</p>
<p>— CH<sub>2</sub>COCl</p> <p>Açıl klorür</p>	<p>— NH<sub>2</sub> (Lys, N-Terminal)</p>

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 3.6’da verilmiştir.

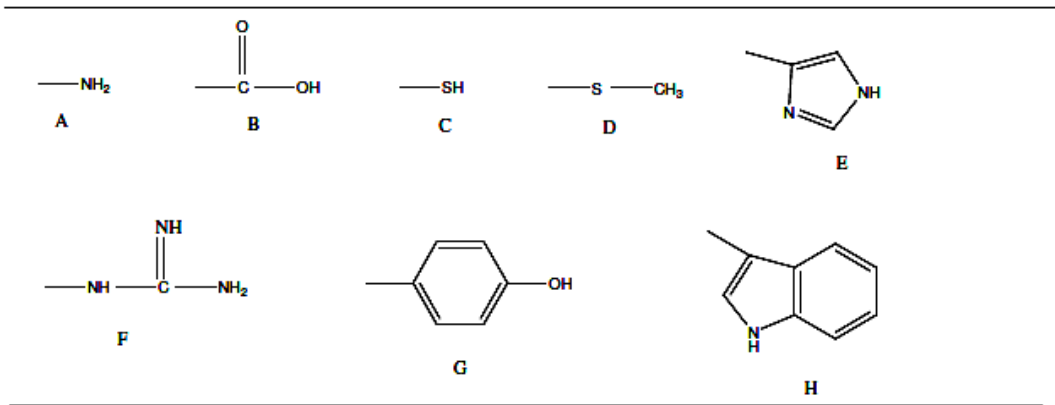


Şekil 3.6 Önemli enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması. Bir enzimin immobilizasyonu için çeşitli yöntemler vardır. Bunlar fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki kategoride ele alınmaktadır.

### 3.1.8.1 Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

**Kovalent Bağlama:** Çok yaygın olarak kullanılan bu yöntemde enzim ile elektrot yüzeyinde bulunan matriks arasında kovalent bağ meydana gelir. Bu bağ enzim ve matriksde bulunan fonksiyonel gruplar arasında meydana gelir. Enzimin aktif bölgesinin kovalent bağ oluşumuna katılmaması gerekir bu nedenle kovalent bağlanma işlemi sırasında çözeltiliye enzim inhibitörleri ilave edilir. Uygun koşullar altında proteinlerin fonksiyonel grupları kovalent bağlanabilmektedirler. Örneğin zincirin  $\alpha$ -amino grupları, lizin ve arjinin  $\epsilon$ - grupları, zincirin  $\alpha$ -karboksil grupları, aspartik asit ve glutamik asitlerin  $\beta$ - ve  $\gamma$ - karboksil grupları, tirozinin fenol halkası, sisteinin tiyol grubu, serin ve treoninin hidroksil grupları, histidinin imidazol grubu ve tritofanın indol grubu. Enzimlerin kovalent bağlanmasında kullanılacak aktif gruplar Çizelge 3.4’de verilmiştir [63].

Çizelge 3.4 Enzimlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonunda bağ oluşumuna katılan aminoasitlerin reaktif grupları.



Protein üzerinde bulunan amino grupları ve fenolik kısımlar hariç diğer fonksiyonel gruplar reaksiyonlarla bir araya gelebilmektedir (Zhang vd [64]). Amino etil selüloz, karboimidli bir ortamda enzimdeki karboksil gruplarıyla bağ oluşturur. Proteindeki tiol kısımları yükseltgenerek N-akriol-sistein ve çapraz bağlayıcı akrilamid kopolimerleriyle bağ oluşturmaktadır. Birçok ticari aktive edilmiş membranlar kovalent olarak enzim immobilizasyonunda kullanılmaktadır (Mulchandam vd [65]).

**Adsorpsiyon Yöntemi:** İmmobilizasyonda kullanılan en eski ve basit yöntemdir [61]. Katı matriks üzerine enzim kolay ve hızlı bir şekilde fiziksel adsorpsiyon yöntemi kullanılarak immobilize edilmektedir. Bu metotta enzim ile matriks arasında van der Waals gibi zayıf

bağlar ile hidrofobik, hidrofilik veya iyonik etkileşimlerle meydana gelmektedir. Enzimin aktif bölgesi bu bağlanmadan etkilenmez ve aktivitesini korur [65].

Birçok enzimin immobilizasyonu adsorbsiyon yöntemine göre gerçekleştirilmektedir. Çözünmeyen enzimler için adsorbsiyon yönteminin temel avantajı kimyasal madde kullanmaya gerek olmaması ve hazırlanması basit birkaç adımda gerçekleştirilebilmesidir. Sonuç olarak adsorbsiyon ucuz, kolay uygulanabilir ve enzimleri etkilemeyen metottur [66]. Zayıf bağlar nedeniyle protein desorpsiyonu (pH, sıcaklık ve iyon yükünün değişmesinden kaynaklanan) problem olarak görülmektedir. Diğer bir dezavantajı ise spesifik bir adsorbsiyon olmadığından diğer protein yapısındaki biyolojik maddelerde yüzey de girisim yapabilmektedir [63-64].

Selüloz asetat membranları, polistiren, polivinilklorür (PVC), silika en çok kullanılan adsorbanlar arasındadır.

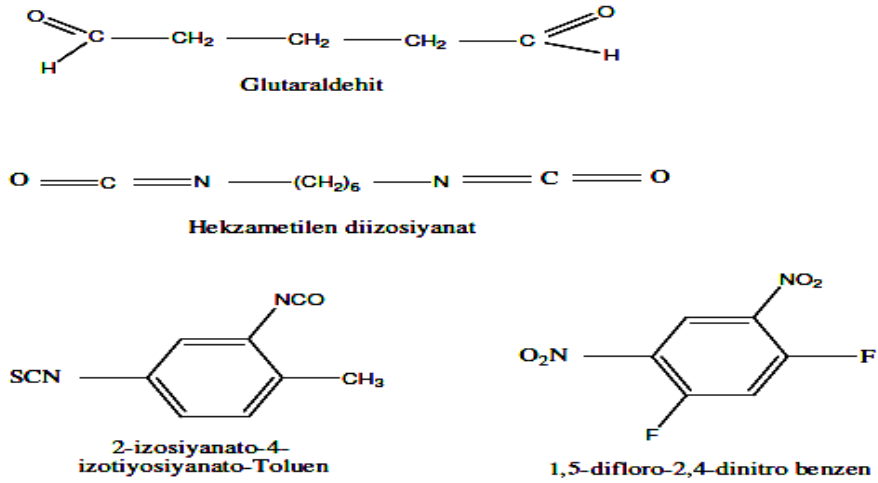
**İyonik Bağlama:** İyon değiştirme yeteneğine sahip, suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması esasına dayanır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim-taşıyıcı arasındaki bağ çok güçlü olmadığı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

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

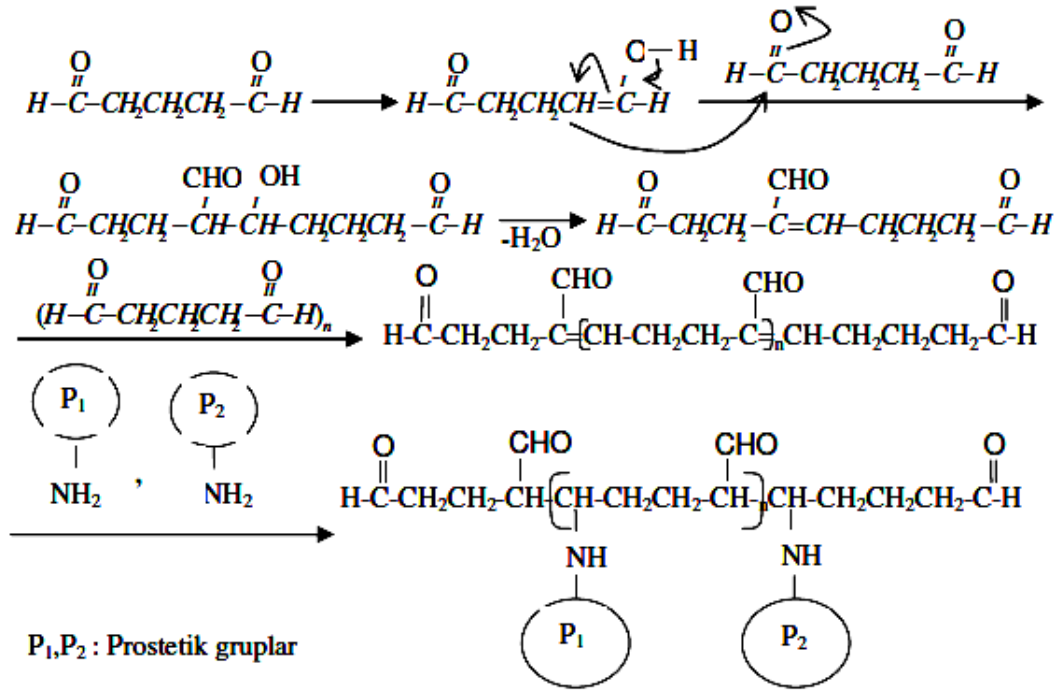
**Biyospesifik Bağlama:** Enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak immobilizasyon gerçekleştirilir.

### 3.1.8.2 Çapraz Bağlama Yöntemleri

Bu yöntem de tutuklama ve kovalent bağlama metotlarının birlikte uygulanmasıyla biyosensör hazırlanır. Çapraz bağlamada sık olarak kullanılan kimyasallar; glutaraldehid, 1,5 difloro-2,4 dinitrobenzen, 2-izosiyanato-4-izotiyosiyanato-toluen, heksametilen diizosiyanat ve disüksinil suberattır [66]. Bazılarının formülleri Şekil 3.7’de verilmiştir [62]. Glutaraldehit ile çapraz bağlama reaksiyonu Şekil 3.8’de gösterilmiştir [67].



Şekil 3.7 Çapraz bağlamada sık kullanılan kimyasalların formülleri



Şekil 3.8 Glutaraldehitle çapraz bağlama reaksiyonu

**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 eksenini etrafında homojen bir enzim tabakası elde edilecek şekilde döndürülür. Bundan sonra elektrot glisin çözeltisine daldırılarak nötrleştirilir ve çapraz bağlayıcı ve diğer

reaksiyona girmeyen maddeler yıkanarak uzaklaştırılır. Yöntem çok kolay ve özellikle küçük transduserler (sinyal ileticiler) için çok uygundur [61].

**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 [61].

### 3.1.8.3 Kopolimerizasyon Yöntemleri

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

### 3.1.8.4 Tutuklama Yöntemi

Polimerleşme sırasında enzim diyaliz membranlarına ya da gözenekli jel matrikslerine tutuklanarak enzim immobilizasyonu yapılır. Düşük molekül ağırlıklı substratlarla reaksiyon ürünlerinin difüze olması bazı yapılarda mümkündür. Poliakrilamid jeller, polivinil alkoller, yüklü polimerler, katyonik ve anyonik gruplar gibi çok sayıda materyal enzim tutuklama metodunda kullanılır (Rusling [68]).

Genellikle bu immobilizasyon metodu bütün enzim türleri (dehidrogenazlar, alkol oksidazlar, kolinesterazlar, kolin oksidazlar, glukoz oksidazlar ve tirozinazlar) için uygundur. Bununla birlikte diğer sistemlere göre kolay uygulanabilir ve ucuzdur. Bu metodun dezavantajları ise ortamda serbest radikaller bulunduğu veya enzim immobilizasyonu sağlandıktan sonra polimerizasyonu tamamlamak için elektroda ultraviyole radyasyon uygulandığında enzim aktivitesini kaybedebilmektedir [66]. Bu problemler biyosensörün cevap zamanını ve kararlılığını etkilemektedir. Son zamanlarda jel matriks temelli immobilizasyon metotları yaygın olarak biyosensör yapımında kullanılmaktadır. Çünkü jel materyalleri spesifik özelliklere sahip olmaları nedeniyle biyosensörlerin sağlamlık, ısıya dayanıklılık, çözücü ortamlarından etkilenmeme, organik ve sulu ortamlarda çalışabilme gibi özellikleri kazanmasını sağlamıştır [63-64].

**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 üzerinde 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.

### **3.1.9 Biyosensörlerde Yararlanılan İletim ve Ölçüm Sistemleri**

Biyosensörlerde, biyoaktif bileşenin tayin edilecek madde ile etkileştiğinde oluşan sinyalin iletim ve ölçümünde, genel olarak, elektrokimyasal, optik, kalorimetrik ve piezoelektrik esaslı sistemler kullanılır.

## **1. Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensörleri**

### **1) Elektrokimyasal esaslı enzim sensörleri**

#### **Amperometrik esaslı enzim sensörleri**

- Birinci nesil amperometrik enzim elektrodları
- İkinci nesil amperometrik enzim elektrodları
- Üçüncü nesil amperometrik enzim elektrodları

#### **Potansiyometrik enzim sensörleri**

- Proton duyar potansiyometrik enzim elektrodları
- Amonyum duyar potansiyometrik enzim elektrodları
- Karbondioksit duyar potansiyometrik enzim elektrodları
- Diğer iyon duyar potansiyometrik enzim elektrodları

#### **Yarı iletkenleri esas alan enzim sensörler**

- Enzim alan etki transistörleri (ENFET)

### **2) Optik esaslı enzim sensörleri**

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

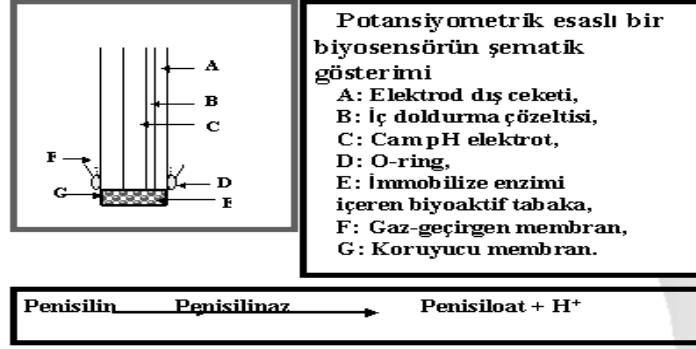
### **2) Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri**

### **3) Piezoelektrik esaslı enzim sensörleri**

#### **3.1.9.1 Elektrokimyasal Esaslı Biyosensörler**

##### **3.1.9.1.1 Potansiyometrik Enzim Sensörleri**

Potansiyometri bilindiği gibi en genel anlamda bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlar. Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörler pH yada tek değerlikli iyonlara duyar cam elektrotlar, anyon yada katyonlara duyar iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit yada amonyağa yönelik gaz duyar elektrotlardır.



Şekil 3.9 Potansiyometrik esaslı enzim sensörünün şematik gösterimi

Şekil 3.9'da şematize edilen sistemde cam elektrod ile gaz duyar membran arasında ince bir doldurma çözeltisi bulunur.(Bu çözelti gaz duyar sensörde sodyum bikarbonat, amonyak duyar sensörde amonyum klorürdür.) Potansiyometrik cevap, enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan gazın(CO<sub>2</sub> veya NH<sub>3</sub>) gaz geçirgen membranı geçerek doldurma çözeltisine difüzenmesi ve bir pH değişimi meydana getirmesiyle belirlenir.

Potansiyometrik esaslı enzim sensörlerinde genel olarak standart kalomel elektrodun (SCE) referans elektrot olarak kullanıldığı durumlarda potansiyel ölçümü gerçekleştirilir.

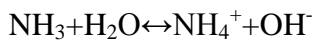
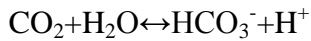
### pH Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrodları

- Proton konsantrasyonundaki farklanmayı belirlemek amacıyla tasarlanan bu tür enzim elektrodlarında temel sensör olarak en yaygın bir şekilde klasik cam elektrodlar kullanılır.
- Temel ilke proton konsantrasyonundaki küçük farkların belirlenmesidir.
- En klasik örnek üre tayinine yönelik sensördür.

#### Üreaz



Üreazın opt aktivite gösterdiği pH:7 civarında ürünler dissosiyasyon olurlar.



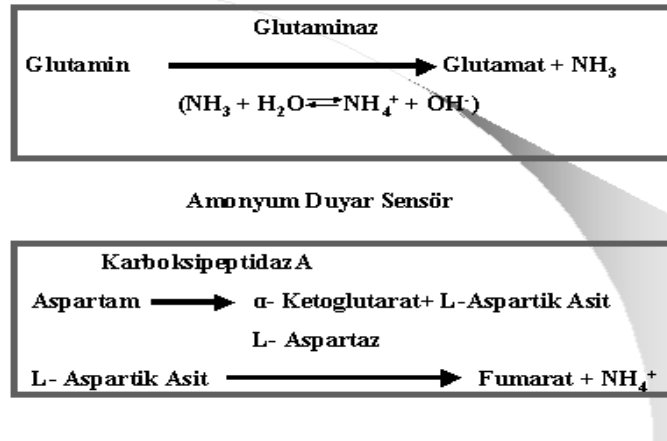
- Penisilin tayininde buna örnektir.

## Penisilinaz

- Penisilin → penisiloat + H<sup>+</sup>

### Amonyum duyar potansiyometrik enzim elektrodları

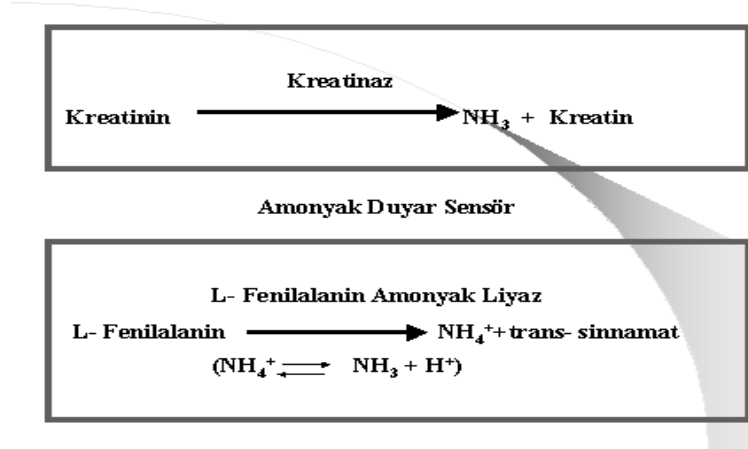
- Amonyum iyonlarına duyar temel sensör ile enzimin birleştirilmesiyle hazırlanan bu elektrodlar genelde H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup> gibi tek değerlilik katyonlara da duyarlılık gösterdikleri için ölçüm ortamlarında benzer maddelerin bulunması durumunda girişim problemlerine açıktırlar.
- Bu nedenlerden dolayı elektrod kalibrasyonunda fosfat tamponları kullanılmazken Tris-HCl benzeri tamponlardan yararlanılabilir.
- Bu tür enzim sensörlerinde temel iletici olarak amonyum duyar cam elektrodlar kullanılır.



### Amonyak duyar potansiyometrik enzim elektrodları

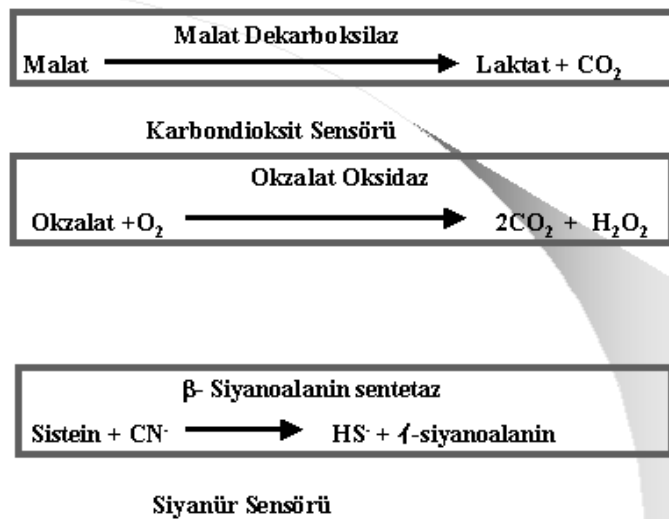
- Amonyak duyar elektrodalarda enzim (ürez), temel sensörü çevreleyen gaz geçirgen bir hidrofobik membran üzerine uygun immobilizasyon yöntemleriyle monte edilir. Temel sensör elektrolit olarak NaHCO<sub>3</sub> içerir.
- Hidrofobik membranın yalnızca gaz geçirgen olması kan gibi karmaşık biyolojik örneklerde bile ön işleme gerek olmaksızın spesifik analizler yapılabilmesine imkan verir. Bu özellik amonyum iyonlarına duyar üre elektrodlarına nazaran önemli bir üstünlük olarak ortaya çıkmaktadır.

- Bu tür enzim sensörlerinde temel iletici olarak gaz duyar amonyak elektrodları kullanılır.



### Karbondioksit duyar potansiyometrik enzim elektrodları

- Karbondioksit duyar bir enzim elektrodunda ölçüm ilkesinin temeli enzimatik reaksiyon uyarınca oluşan karbondioksitin disosiyasyon dengesi uyarınca açığa çıkan  $\text{H}^+$  iyonlarının neden olduğu asidik doğadır.
- Kullanılan temel sensör  $\text{NaHCO}_3$  ve  $\text{NaCl}$  içeren bir cam elektroddur.
- Enzim, temel sensörü çevreleyen hidrofobik membran üzerine immobilize edilir. Bu sayede çözeltideki iyonik etkilerden korunabilir. Ancak uçucu asidik ve bazik türlerin girişim etkilerinin gözden uzak tutulmaması gerekir.
- Bu tür enzim sensörlerinde temel iletici olarak gaz duyar karbondioksit elektrodları kullanılır.



### Diğer potansiyometrik enzim elektrodları

- Bu başlık altında bazı potansiyometrik esaslı iyon seçimli enzim elektrodları örnek olarak verilebilir.
- Oksidoredüktazların katalizlediği pek çok enzimatik reaksiyonda açığa çıkan hidrojen peroksitin peroksidaz katalizörlüğünde ve iyodür varlığında indirgenmesinin iyodür duyar elektrotlar ile iyodür konsantrasyonundaki azalmadan gidilerek belirlenmesi mümkündür.



İyodür Duyar Elektrod

Çizelge 3.6 Potansiyometrik enzim biyosensörleri [66]

Enzim	Substrat (Tayin edilen madde)	Kullanılan Elektrot
Üreaz	Üre	Katyon, pH, gaz (NH <sub>3</sub> )
Glukoz oksidaz	Glukoz	pH, I <sup>-</sup>
L-aminoasit oksidaz	L-Aminoasit	Katyon NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , I <sup>-</sup>
L-Tirozin dekarboksilaz	L-Tirozin	Gaz (CO <sub>2</sub> )
Glutaminaz	L-Glutamin	Katyon
Glutamat dehidrogenaz	L-Glutamik asit	Katyon
Asparajinaz	L-Asparajin	Katyon
D-aminoasit oksidaz	D-aminoasit	Katyon
Penisilinaz	Penisilin	pH
B-Glukozidaz	Amigladin	CN <sup>-</sup>
Nitrat redüktaz Nitrit redüktaz	Nitrat	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Nitrit redüktaz	Nitrit	Gaz (NH <sub>3</sub> )

### 3.1.10 Enzim Elektrotlarında Performans Faktörleri

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

**3.1.10.1 Kalibrasyon ve duyarlılık:** Duyarlılık derişimdeki bir birim değişiklik için biyosensör sinyalinin zamanla değişimi olarak tanımlanır. İdeal olarak bir biyosensörün duyarlılığı biyosensör ömrü boyunca sabit kalmalıdır. Biyosensörün duyarlılığı, analizi yapılacak maddenin bir dizi belli konsantrasyondaki çözeltilerini içeren standart çözeltiler ile yapılan ölçümler sonucu kalibrasyon grafiği çizilerek kolaylıkla belirlenebilmektedir. Zamanla biyosensörün duyarlılığındaki değişimin belirlenebilmesi için genellikle hergün kalibrasyonun yapılması gerekmektedir [61].

**3.1.10.2 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 [61].

**3.1.10.3 Tayin aralığı ve tayin sınırı:** İyon-seçici elektrotların tayin limiti, membran ara fazında ölçülebilir bir potansiyel farkı meydana getiren en düşük iyon konsantrasyonu olarak tanımlanır. Çogu iyon-seçici elektrot için tayin limiti  $10^{-5}$  molL<sup>-1</sup> civarındadır. Bazılarında ise  $10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>'e kadar düşebilir. Bu limitler, ortamda bulunan girişim yapan iyonlar ve moleküller ile ters yönde etkilenebilir. Aynı zamanda, enzim sensörlerinde başlıca pH, sıcaklık ve bozucu türlerin sensör cevabını etkileyerek tayin aralığını değiştirebileceği görülür [61].

**3.1.10.4 Cevap süresi:** İyon-seçici elektrotlarda cevap zamanı elektrodun fiziksel yapısıyla ilgili bir özelliktir. Cevap zamanı, genel olarak membranın duyarlı kısmıyla çözeltideki iyonun dengeye gelmesi için geçen zaman olarak tarif edilmektedir. Girişim yapan iyonlar, bir Nernst potansiyel farkı oluşması için taşınması gereken iyonların aktif elektrot yüzeyine ulaşmalarını geciktirir ve cevap zamanını etkiler.

Genel olarak cevap zamanı aşağıdaki işlemlerle azaltılabilir;

1. Etkili karıştırma (veya akış hızının artırılması),

2. Membran yüzeyinden kirliliklerin uzaklaştırılması veya çok küçük membran yüzeyli mikroelektrotlar kullanılması,

3. Ölçüm sırasında çözelti konsantrasyonunun düşükten yükseğe doğru olması.

Nötral taşıyıcı membranlarda, aktif maddeye (ligant veya kompleks) çözeltideki iyonun tutunma hızı, cevap zamanını etkileyen en önemli faktördür. Bunun dışında;

1. İyon ekstraksiyon kapasitesi

2. Difüzyona karşı direnç

3. Membran kalınlığı

4. Membrandaki çözücünün polaritesi de cevap zamanını etkileyen faktörlerdir [69].

**3.1.10.5 Seçicilik:** İdeal olarak sadece tek bir iyonla duyarlı bir elektrot yoktur. X iyonunu ölçmek için kullanılan bir elektrot Y iyonuna da duyarlı olabilir. Diğer iyonların varlığı elektrot performansını önemli ölçüde etkiler. Bu iyonların girişimi, elektrot membranının yapısına bağlı olarak çeşitli şekillerde olabilir.

Seçicilik ilk kez Nicolsky tarafından hidrojen ve sodyum iyonlarına duyarlılık gösteren cam elektrot için kullanılmış ve aşağıdaki eşitlikle verilmiştir. Pek çok ISE çoğunlukla aşağıdaki eşitliğe uygun davranır [70].

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

**$a_x$  = Ölçülecek iyonun aktivitesi**

**$a_y$  = Girişim yapan iyonun aktivitesi**

**$n_x, n_y$  = Her bir türün yükü**

**$k_{x,y}^{\text{pot}}$  = Seçicilik katsayısı**

Denklem, bir elektrodun ölçülecek iyonu X'e ve bütün girişim yapan iyonlara cevabını gösterir. Elektrodun farklı iyonik türlere karşı duyarlılığı seçicilik katsayısı ile belirlenir. Seçicilik katsayısı ( pot x,y k ) büyüdükçe elektrodun ölçülecek iyonla duyarlılığı azalır ve log  $a_x$ -potansiyel grafiği yataya doğru gider. Örneğin; kalsiyum seçici bir elektrot için  $\text{Na}^+$  girişimi söz konusu ise ve  $k_{\text{CaNa}}=10^{-3}$  ise elektrot  $\text{Ca}^{2+}$  iyonuna  $\text{Na}^+$  iyonundan 1000 kez daha duyarlı olduğu sonucu çıkarılır. Girişim yapan iyonun yokluğunda Nernst değişimi gözlenir.

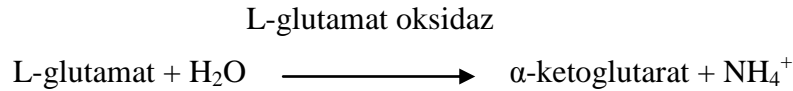
**3.1.10.6 Tekrarlanabilirlik:** Enzim sensörlerinde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesinde kullanılan enzim aktivitesi, kararlılığı ve saflık düzeyi büyük önem taşır. Ancak karakteristik özellikleri çok iyi bilinen enzim preparatlarının kullanılması durumunda bilesensör hazırlama aşamaları ve çalışma ortam ve koşulları açısından beklenen niteliklerde büyük farklanmalar gözlenebilir. Bu nedenle hazırlanan sensörle tekrarlanabilirlik denemelerinin gerçekleştirilmesi bir zorunluluktur [61].

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

**3.1.10.8 Tıbbi uygulamalarda kullanılacak biyosensörler için biyouyumluluk:** Hastalık tedavisinde veya biyosensörün insan vücuduna uzun süreli implantasyonlarında önem kazanmaktadır. Biyosensörün bulunduğu biyolojik elementlerin aktivitesini etkilememesi gerekmektedir.

## 3.2 Glutamat Tayininde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış

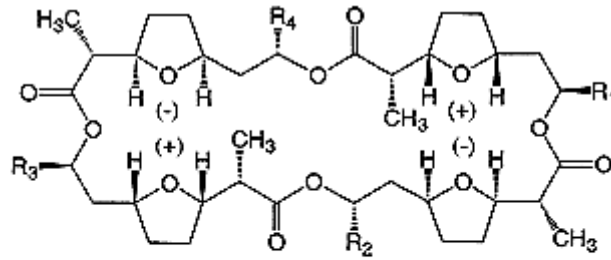
**3.2.1 Glutamat Oksidaz:** Glutamat oksidaz, L-glutamatın oksidatif deaminasyonunu katalizler. L-glutamatın,  $\alpha$ -ketoglutarat ve  $\text{NH}_4^+$  iyonlarına katalizini gerçekleştirir. Glutamat dehidrogenaz (GDH) ve glutamat dekarboksilaz (GDC)'da L-glutamatın tayininde rol alır. (Shi ve Stein, [71]; Liu vd. [72]; Ling vd. [73]; Oliveira vd. [74]; Qhobosheane vd. [75]; Rodriguez vd. [76]). Ancak, GDC ve GDH zayıf substrat özgülüğü ve  $\text{NAD}^+$  gibi pahalı koenzimlere ihtiyaç duyması gibi bazı dezavantajlara sahiptir. L-glutamat oksidaz, yüksek bağlı substrat özgülüğü ve ek olarak bir koenzime ihtiyaç duymadığından GDH ve GDC yerine kullanılır.



**3.2.2 Nonaktin:** Günümüzde valinosimin ve makrotetrolit grubu antibiyotikler sırasıyla  $\text{K}^+$  ve  $\text{NH}_4^+$  katyonları için uygun nötral kompleksleştirici ligandlardır. Bunlardan bazıları ISE'da kullanılır. Kompleksleştirici molekül, çok dişli bir ligand olmalı ve içinde oyuk bulduran kararlı bir yapıya sahip olabilmelidir. Oyuk, katyonu içine almaya uygundur. Katyonlar için polar koordinasyon grupları, ligand atomu olarak tercihen oksijen içermelidir. Nonaktin,  $\text{NH}_4^+$  katyonu için en uygun ligandır, aktinomiset kültürlerinden elde edilir (Şekil 3.10). Nonaktinin

dört eter oksijeni amonyum iyonu ile hidrojen bağı oluştururken dört karbonil oksijeni katyonu dipol interaksyonu ile kararlı hale getirir.

Nonaktin, son zamanlarda amonyum gibi katyonların mikromolar seviyesinde tayini için ticari iyon seçici elektrotlarda kullanılmaktadır.



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

Şekil 3.10 Nonaktin'in yapısı

**3.2.3 Palmitik asit:** Palmitik asit (heksadekanoik asit) bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan doymuş yağ asitlerinden biridir. Molekül formülü  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$  olan beyaz katı görünümündedir. Adından da anlaşılacağı gibi palm yağında bulunur ancak tereyağı, peynir, süt ve ette de bulunur. Palmitik asit türevleri 2. Dünya Savaşı'nda napalm üretiminde kullanılmıştır.

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

Genellikle PVC, kloroetilen kopolimeri, nitroselüloz (NC), etil selüloz ve sentetik kauçuk, gibi maddelerde plastikleştirici madde olarak kullanılır. Özellikle soğuğa karşı dirençli kabloların, cilt bezinin, ince film, şerit materyalleri vb yapımında kullanılmaktadır. Yapısal formülü Şekil 3.11'de verilmiştir.



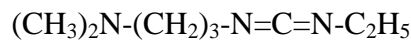
Şekil 3.11 Dioktil sebakat'ın yapısal formülü

**3.2.5 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.

**3.2.6 Polivinil klorür (PVC):** İyonoforlar ile birlikte polivinil klorür (PVC) nin kullanımı, (Butt ve Cammann [77], Saurina vd [78]) 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 [77], Bilitewski vd [79]). Fakat PVC membranın hidrofobik yüzeyine enzimin immobilize edilmesi zordur. PVC membranda fonksiyonlu gruplar oluşturarak daha etkili enzim immobilizasyonu gerçekleştirilebilir.

**3.2.7 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC):** Formülü Şekil 3.12’de görülen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid, çalışmada polivinil klorür membranı aktifleştirmek amacı ile kullanılmıştır.



Şekil 3.12 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid’in formülü

### MATERYAL VE METOD

#### 4.1 Kullanılan Cihazlar

Çözeltilerin potansiyel ölçmeleri ORION 4 star Benchtop pH/ISE meter ile yapıldı. Referans elektrot olarak çift temaslı gümüş-gümüş klorür elektrot kullanıldı (Thermo scientific 900200). Bu elektroda iç dolgu çözeltisi olarak 900002 ve 900003 katalog numaralı çözeltiler dolduruldu. Çözelti ilaveleri için BRAND ve PROLINE PLUS markalı mikro pipetler kullanıldı. Çözeltilerin pH okumaları ise Sartorius PB-11 pH-metre ile yapıldı. Bu çalışmada kullanılan bidestile su PURELAB Classic cihazı kullanılarak temin edildi.

#### 4.2 Kullanılan Enzimler

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

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

Enzimin Adı	Numarası	Kaynağı	Firması
Glutamat Oksidaz (5 U/mg)	G5921	Escherichia coli	Sigma

### 4.3 Kullanılan Gerçek Numuneler

#### 4.3.1 Multiopower Aminoasit Karışımı

Multiopower firmasından temin edilmiştir.

#### 4.3.2 Knorr Tavuk Bulyon

Marketten satın alınmıştır.

### 4.4 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) heksil 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. Aynı zamanda çalışmada kullanılan aminoasitler özelliklerine birlikte Çizelge 4.2'de verildi.

Çizelge 4.2 Çalışmada kullanılan aminoasitler

Aminoasidin Adı	Numarası	Firması	Formülü	Molekül ağırlığı (g/mol)
Glisin	50046	SIGMA	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75,07
L-serin	84959	SIGMA	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	105,09
L-arginin	11009	SIGMA	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	174,2
L-askorbik asit	A5960	SIGMA	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	176,12
L-sistein	30089	SIGMA	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	121,16
L-valin	94619	SIGMA	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	117,15
L-lizinmonohidrat	L9037	SIGMA	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	146,19
L-alanin	05129	FLUKA	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	89,09
L-histidin	53319	SIGMA	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	155,15
L-metiyonin	64319	SIGMA	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	149,21
L-glutamik asit	G1626	SIGMA	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NNaO <sub>4</sub>	169,1
L-glutamin	G3126	SIGMA	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	146,15

## 4.5 Kullanılan Çözeltiler

### 4.5.1 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 8,5'e ayarlandı. Tampon çözeltileri kullanılmadıkları zaman buzdolabında saklandı.

### 4.5.2 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 4.3'de belirtildiği şekilde üç günde bir taze olarak hazırlandı.

Çizelge 4.3 Amonyum klorür kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

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

#### 4.5.3 Monosodyum glutamat çözeltileri

4,2275 g monosodyum glutamat bidestile suda çözülüp hacmi 25 mL'ye tamamlanarak 1,0 M'lık çözeltisi hazırlandıktan sonra gerekli seyreltmeler yapılarak 1,0-1,0×10<sup>-2</sup>M konsantrasyon aralığında stok monosodyum glutamat çözeltileri hazırlandı.

**Monosodyum glutamat tayini için kalibrasyon çözeltileri:** Kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi için kullanılan MSG çözeltileri Çizelge 4.4’de belirtildiği şekilde üç günde bir taze olarak hazırlandı.

Çizelge 4.4 MSG kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

<b>Hazırlanan MSG çözeltileri (M)</b>	<b>İlave edilen stok MSG çözeltileri (M) (mL)</b>			<b>0,1 M TRIS Tamponu (mL)</b>
	<b>1,0</b>	<b><math>1,0 \times 10^{-1}</math></b>	<b><math>1,0 \times 10^{-2}</math></b>	
$1,0 \times 10^{-1}$	2,50			2,50
$5,0 \times 10^{-2}$	1,25			2,50
$2,5 \times 10^{-2}$	0,625			2,50
$1,0 \times 10^{-2}$		2,50		2,50
$5,0 \times 10^{-3}$		1,25		2,50
$2,5 \times 10^{-3}$		0,625		2,50
$1,0 \times 10^{-3}$			2,50	2,50
pH’lar 8,5’e ayarlandıktan sonra her bir çözeltinin hacmi bidestile su ile 25,00 mL’ye tamamlandı.				

#### 4.5.4 Çalışma elektrodu iç dolgu çözeltisi

Amonyum, MSG tayini için hazırlanan çalışma elektrotlarında iç dolgu çözeltisi olarak Çizelge 3.3’de belirtildiği gibi hazırlanan  $1,0 \times 10^{-2}$ M amonyum klorür (pH 7,0) çözeltisi kullanıldı.

#### 4.5.5 Multipower aminoasit karışımında glutamik asit tayini için (Standart Katma Yönteminde) kullanılan çözeltiler

Standart katma yöntemiyle glutamat oksidaz biyosensörleri yardımıyla MSG tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı Çizelge 4.5’de verildi.

Çizelge 4.5 MSG çözeltilerinin hazırlanması

	Çözelti No.						
	1	2	3	4	5	6	7
İlave edilen $10^{-1}$ M MSG çözeltisi (mL)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
0,01 M TRIS tamponu (pH 8,5) (mL)	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Multipower ( $\mu$ 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.							

#### 4.5.6 Knorr tavuk bulyon tabletinde monosodyum glutamat tayini için (Standart Katma Yönteminde) kullanılan çözeltiler

Standart katma yöntemiyle glutamat oksidaz biyosensörleri yardımıyla MSG tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanışı Çizelge 4.6’da verildi.

Çizelge 4.6 MSG çözeltilerinin hazırlanması

	Çözelti No.						
	1	2	3	4	5	6	7
İlave edilen $10^{-1}$ M MSG çözeltisi (mL)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
0,01 M TRIS tamponu (pH 8,5) (mL)	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Tavuk bulyon numunesi ( $\mu$ 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.							

## 4.6 Amonyum-Seçici Elektrotlar

### 4.6.1 Amonyum-seçici elektrotların hazırlanışı

Palmitik asit içeren PVC kullanılarak amonyum seçici membranların bileşimi Çizelge 4.8’de verilmiştir.

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

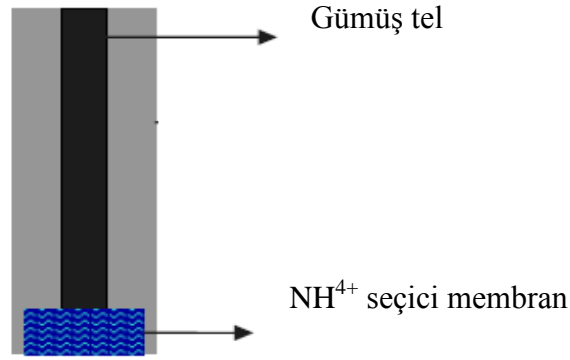
Membran bileşenleri	Membran	
	%	Kütle, mg
PVC	30,0	118,0
Palmitik asit	3,0	13,6
Nonaktin	3,0	12,6
Bis-(2-etil)hekzil sebakat(DOS)	64,0	255,8
Tetrahidrofuran(THF)	5 mL	

Çizelge 4.8’de verilen membranı 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 7,0)/Ag;AgCl***

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



Şekil 4.1  $\text{NH}_4^+$  seçici elektrot

## 4.7 Glutamat oksidaz biyosensörleri

### 4.7.1 Glutamat oksidaz biyosensörlerinin hazırlanması

Çizelge 4.8’de belirtildiği şekilde hazırlanan ve amonyuma duyarlılığı iyi olduğu belirlenen PVC-palmitik asit membranı kullanılarak hazırlanan amonyum elektrotlarının membranlarına ticari glutamat oksidaz enziminin kimyasal olarak immobilize edilmesi ile glutamat oksidaz biyosensörleri hazırlandı. Bu amaçla dört farklı basamakta işlem yapıldı:

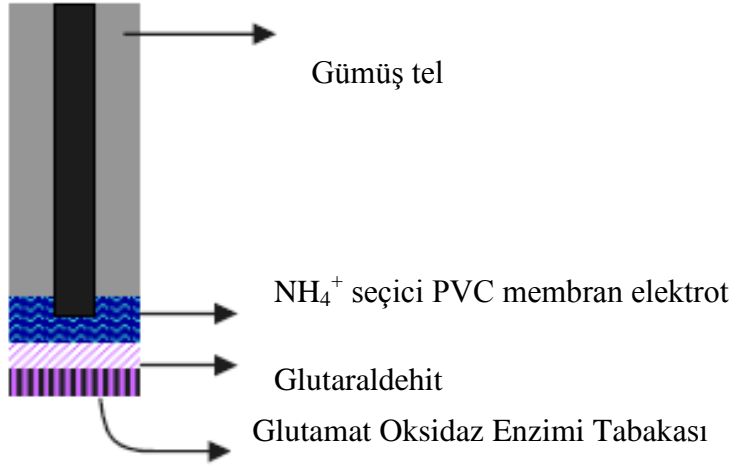
**İşlem A:** 5U glutamat oksidaz enzimi 1 mL bidestile suda çözüldü ve enzim suda çözüldükten sonra bu çözeltilerden 200  $\mu\text{L}$  alındı ve 1 mg karbodiimid ile karıştırıldı. Bu enzim+karbodiimid çözeltilerinden 50 $\mu\text{L}$  alınarak membranların yüzeyine kondu ve suyun uzaklaşması için bir gece buzdolabında bekletildi.

**İşlem B:** İşlem A’da hazırlanan elektrodun membranına %2,5’luk glutaraldehit çözeltilerinden 40  $\mu\text{L}$  uygulanarak 25 dk bekletildi. Daha sonra elektrot yüzeyi bidestile su ile yıkanarak glutaraldehitin aşırısı uzaklaştırıldı.

**İşlem C:** İşlem B’de hazırlanan elektrodun membranına 50  $\mu\text{L}$  glutamat oksidaz çözeltilerinden (5U/mL deiyonize su) kondu ve bir gece buzdolabında bekletildi.

**İşlem D:** İşlem C’de hazırlanan elektrot kullanılmadan önce  $1,0 \times 10^{-2}$  M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH 7,0) ile dolduruldu ve bu çözelti içinde yarım saat şartlandırıldı.

İmmobilizasyon yöntemi sonunda glutamat oksidaz biyosensörü elde ettik. Hazırlanan biyosensörler kullanılmadığı zaman buzdolabında saklandı



Şekil 4.2 Hazırlanan glutamat oksidaz biyosensörü

#### 4.7.2 Glutamat oksidaz biyosensörlerinin çalışma aralıklarının ve eğimlerinin belirlenmesi

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

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

Elektrokimyasal hücredeki MSG çözeltilerinin konsantrasyonu  $1,0 \times 10^{-1}$  -  $1,0 \times 10^{-3}$  M arasında değiştirildi. MSG çözeltilerinin pH'ları Trizma bazı ile optimum pH'a ayarlandı ve hazırlanan elektrot için hücre potansiyelleri kaydedildi. Elektrot için  $\log[\text{glutamat}]$ 'a karşı potansiyel değerleri (mV) grafiğe geçirildi ve biyosensörlerin doğrusal çalışma aralığı ve eğimleri belirlendi.

## **4.8 Glutamat Oksidaz Biyosensörünün Amonyuma ve Glutamata Cevabının Belirlenmesi**

### **4.8.1 Glutamat oksidaz biyosensörünün amonyuma cevabının belirlenmesi**

Hazırlanan glutamat oksidaz biyosensörünün amonyuma duyarlı olup olmadığını anlamak için biyosensör ile amonyum klorür kalibrasyon çözeltilerinin potansiyelleri okunarak kalibrasyon grafikleri çizildi.

### **4.8.2 Glutamat oksidaz biyosensörünün glutamata cevabının belirlenmesi**

Hazırlanan glutamat oksidaz biyosensörünün glutamata duyarlı olup olmadığını anlamak için biyosensör ile çizelge 4.4'te belirtildiği gibi hazırlanan MSG çözeltilerinin potansiyelleri okunarak kalibrasyon grafikleri çizildi.

## **4.9 Glutamat Oksidaz Biyosensörlerinin Performanslarına Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi**

Glutamat oksidaz biyosensörlerinin cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun, pH'nın, sıcaklığın, karıştırma hızının etkisi ve bu biyosensörlerin seçicilik katsayıları, cevap süresi, diğer aminoasitlerin girişim etkisi, tekrarlanabilirliği ve raf ömrü tayin edildi.

### **4.10 Glutamat Oksidaz Biyosensörlerinin Tekrarlanabilirliği**

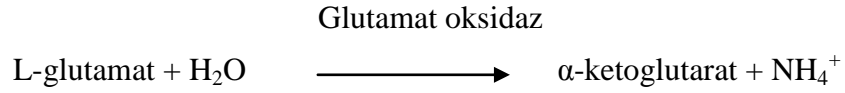
Tekrarlanabilirlik, karakterize edici bir parametredir. Enzim preparatının aktivitesi, kararlılığı, saflık düzeyi hazırlanacak enzim sensörü ile tekrarlanabilir sonuçlar alınmasında önemlidir. Ancak biyosensör hazırlama aşamaları ve çalışma ortamı açısından belirlenen niteliklerde oldukça büyük farklılıklar 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 farklı MSG kalibrasyon çözeltileri ile 15 dk'da bir 15 kere ölçüm alınarak kalibrasyon grafikleri çizildi ve her bir grafiğin eğimi belirlendi. En yüksek eğim değerini 100 kabul ederek diğer eğimlerin yüzde değerlerini bulup, ölçüm sayısına karşı yüzde değerleri grafiğe geçirildi.

### ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

#### 5.1 Glutamat Oksidaz Biyosensörleri

Bu çalışmada glutamat oksidaz enzimi kullanılarak, glutamata duyarlı potansiyometrik biyosensör yapılması amaçlandı. Glutamat oksidaz enzimi, glutamatu amonyum ve  $\alpha$ -ketoglutarata dönüştürmektedir.



Yukarıdaki reaksiyondan da görüldüğü gibi, glutamat oksidaz enzimi, bir elektrot yüzeyine immobilize edildiği zaman potansiyometrik olarak belirlenebilecek olan amonyum iyonları oluşmaktadır. Bu reaksiyona dayanarak, çalışmamızda, amonyuma duyarlı yeni bir elektrot hazırlanarak bu elektrot üzerine glutamat oksidaz immobilize edilip glutamat oksidaz 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 [80]). Sadece PVC içeren amonyum elektrotlarının (Eggenstein vd [81]) 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 tutulması söz konusudur. Bu da, biyosensör cevabının çok iyi olmasına rağmen ömrünün çok kısa olmasına

neden olmaktadır. Bu nedenle PVC ile hazırlanacak amonyum elektrotları içerisinde enzimlerin kovalent olarak bağlanabileceği aktif uçlar içeren büyük moleküllü bileşiklerin eklenmesinin uygun olduğuna karar verildi. Bu amaçla nonaktin kullanılarak hazırlanan PVC içeren membranlara 16 karbonlu uzun zincirli yağ asidi olan palmitik asit ilave edilerek Bölüm 4’de Çizelge 4.7’de belirtilen amonyum duyarlı membranlar kullanılarak amonyum elektrotları hazırlandı. Bu amonyum elektrotları üzerine glutamat oksidazın immobilize edilmesi ile glutamat biyosensörleri oluşturuldu.

Çalışmamızda, palmitik asit içeren PVC ile hazırladığımız amonyum elektrotları üzerine ticari glutamat oksidaz enzimini immobilize ederek hazırlamış olduğumuz glutamat biyosensörleri ile ilgili bilgilerin, literatürde karşımıza çıkmış olmaması, bu konunun orijinal olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar ve ilgili tartışmalar aşağıda sırasıyla verilmiştir.

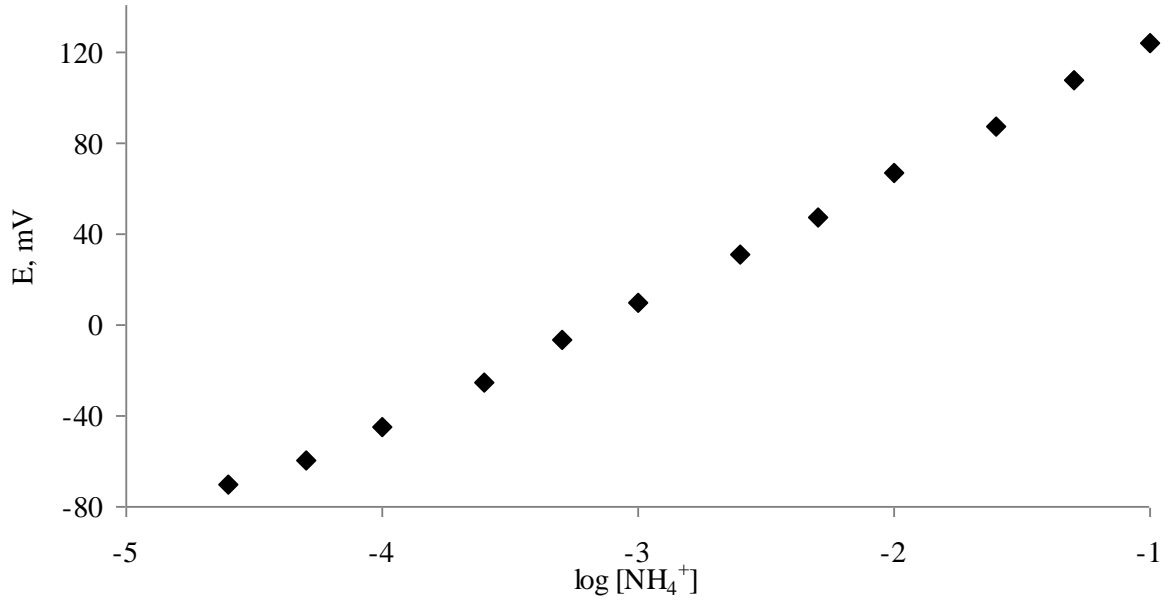
### 5.1.1 Glutamat Oksidaz Biyosensörlerinin Amonyuma Cevabı

Yukarıda anlattığımız işlemlerle hazırlanan glutamat oksidaz biyosensörlerinin amonyuma duyarlı olup olmadığını anlamak için glutamat oksidaz biyosensörü ile amonyum klorür çözeltisinin potansiyelleri okunarak kalibrasyon grafikleri çizildi. Kalibrasyon grafiklerinden amonyum iyonu için doğrusal çalışma aralığı ve elektrotların eğimleri hesaplandı ve Çizelge 5.1’de verildi.

Çizelge 5.1 25,0±1,0°C’da glutamat oksidaz biyosensörünün amonyum iyonu için doğrusal çalışma aralığı ve elektrodun eğimi

Eğim, (mV/p[glutamat])±s	Çalışma aralığı
54,86±1,2	1,0×10 <sup>-1</sup> -1,0×10 <sup>-5</sup> M

s: Standart sapma



Şekil 5.1 Glutamat oksidaz biyosensörünün amonyum iyonu için kalibrasyon grafiği

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

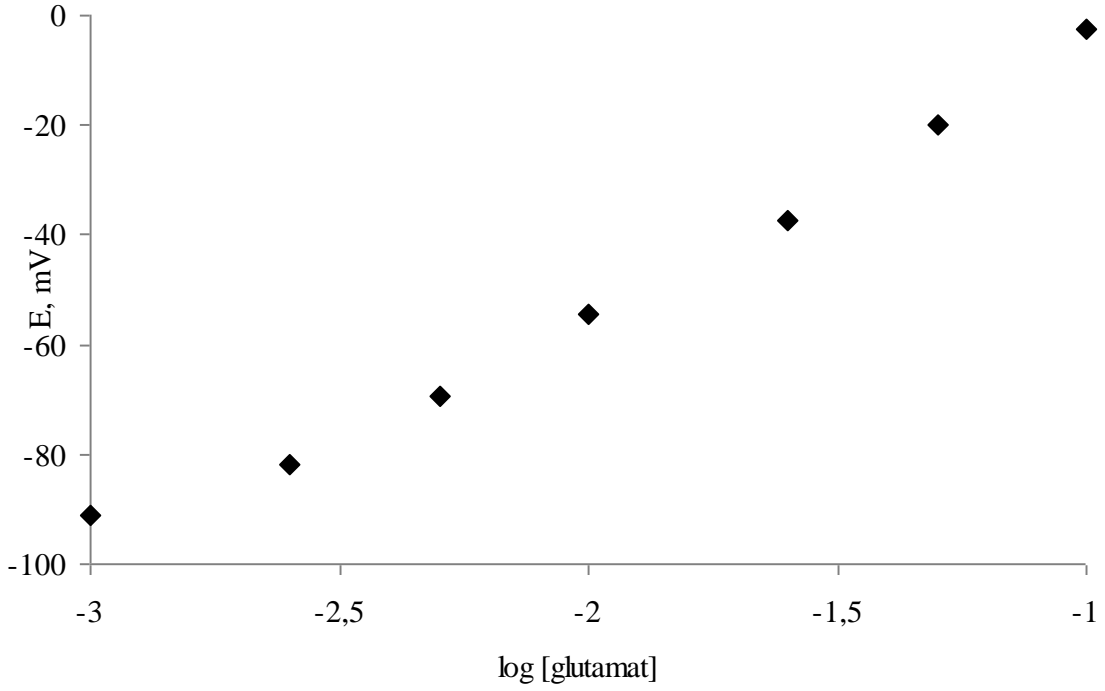
### 5.1.2 Glutamat oksidaz biyosensörlerinin kalibrasyon grafikleri

Amonyuma duyarlılığının iyi olduğunu anladığımız glutamat oksidaz biyosensörlerinin glutamata karşı kalibrasyon grafikleri de çizildi (Şekil 5.2). Kalibrasyon grafiğinden çalışma aralığı ve eğimi belirlendi.

Çizelge 5.2 25,0±1,0°C'da glutamat oksidaz biyosensörünün eğimi ve çalışma aralığı

Eğim, (mV/p[glutamat])±s	Çalışma aralığı
45,23±0,58	$1,0 \times 10^{-1}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M

s: Standart sapma



Şekil 5.2 Glutamat oksidaz biyosensörünün kalibrasyon grafiği

Alvarez-Crespo ve arkadaşları (1997), yaptıkları amperometrik glutamat biyosensörünün doğrusal çalışma aralığını  $5,0 \times 10^{-6}$  -  $7,8 \times 10^{-5}$  M olarak bulmuşlardır [41]. Bu çalışmada ise  $1,0 \times 10^{-1}$  -  $1,0 \times 10^{-3}$  M konsantrasyon aralığında lineer cevap elde edilmiştir.

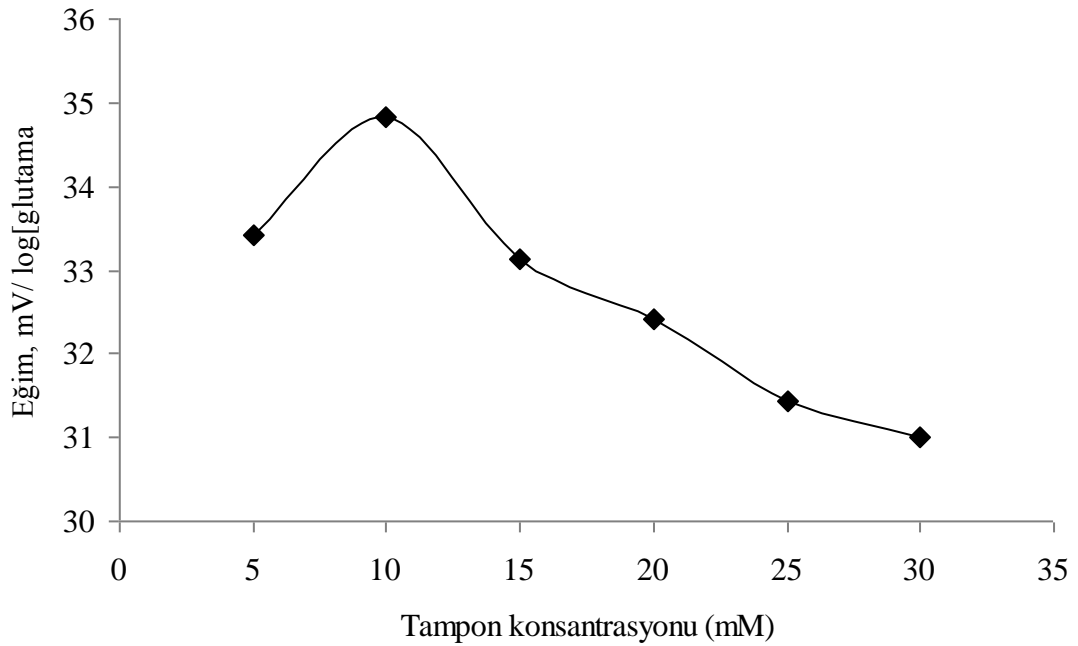
### 5.1.3 Tampon konsantrasyonunun etkisi

Glutamat oksidaz biyosensörünün performansına tampon konsantrasyonunun etkisini incelemek için, 6 farklı konsantrasyonda (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 mM) TRIS tamponu kullanılarak hazırlanan MSG çözeltilerinin pH'ları 7,0'ye ayarlandı. Hazırlanan glutamat oksidaz elektrodu ile potansiyel ölçümleri yapılarak kalibrasyon grafikleri çizildi ve glutamat oksidaz elektrotlarının eğimleri belirlendi. Elde edilen eğim değerleri Çizelge 5.3'de verildi. Ayrıca tampon konsantrasyonuna karşı eğim değerleri grafiği de Şekil 5.3'de verildi.

Çizelge 5.3 25,0±1,0°C’da glutamat oksidaz biyosensörlerinin cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi

Tampon Konsantrasyonu	E(mV/p[glutamat]) ± s
5mM	33,4 ± 1,1
10mM	34,8 ± 0,2
15mM	33,12 ± 0,5
20mM	32,4 ± 1,0
25mM	31,4 ± 0,3
30mM	31,0 ± 0,1

s: Standart sapma.



Şekil 5.3 Glutamat oksidaz biyosensörünün eğiminin tampon konsantrasyonu ile değişimi

Çizelge 4.3 ile Şekil 4.3’den de görüleceği gibi, glutamat oksidaz biyosensörü için en yüksek eğimin elde edildiği optimum tampon konsantrasyonu 10 mM olarak bulundu. 5 mM’den daha düşük tampon konsantrasyonlarında, çözeltinin tamponlama kapasitesi düşük olduğundan çalışılmadı.

Alvarez-Crespo ve arkadaşları (1997) yaptıkları amperometrik glutamat biyosensöründe 0,1 M fosfat tamponu kullanmışlar [41]. Han ve arkadaşları (2006) hazırladıkları glutamat

biyosensörü ile yaptıkları çalışmada 0,015 M NaCl içeren 0,1 M 10 mL fosfat tamponunda çalışmışlar ve tampon konsantrasyonunun artması ile biyosensörün duyarlılığının azaldığını belirtmişlerdir [56]. Bu bizim sonuçlarımızla uyumludur. Tez çalışmamızda TRIS tamponu kullanılmış olup biyosensörlerin cevabının tampon konsantrasyonunun artması ile azaldığı görülmüştür. Çalışmamızda fosfat tamponu da denenmiş fakat iyi sonuç alınamamıştır.

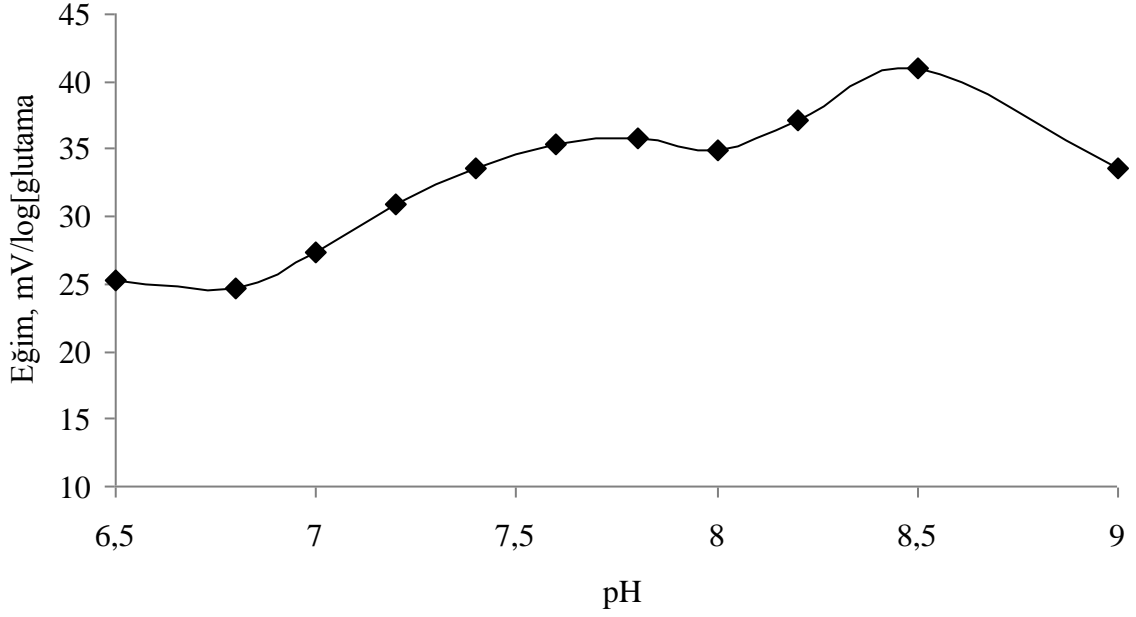
#### 5.1.4 pH'nın etkisi

Glutamat oksidaz elektrotlarının performansına pH'nın etkisini incelemek için 11 farklı pH'da (6,5; 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 7,6; 7,8; 8,0; 8,2; 8,5; 9,0) ve optimum tampon konsantrasyonunda (10mM) MSG çözeltileri hazırlandı ve kalibrasyon grafikleri çizilerek eğimleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 5.4'de toplu olarak verildi.

Çizelge 5.4 25,0±1,0°C'da glutamat oksidaz biyosensörlerinin cevabına pH'nın etkisi

<b>pH</b>	<b>Eğim (mV/p[glutamat])±s</b>
6,5	25,2 ± 1,8
6,8	24,6 ± 0,4
7,0	27,3 ± 3,0
7,2	30,9 ± 2,5
7,4	33,6 ± 0,5
7,6	35,3 ± 0,9
7,8	35,7 ± 1,1
8,0	34,9 ± 0,7
8,2	37,1 ± 0,1
8,5	41,0 ± 1,5
9,0	33,6 ± 1,3

s:Standart sapma



Şekil 5.4 Glutamat oksidaz biyosensörünün eğiminin pH ile değişimi

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

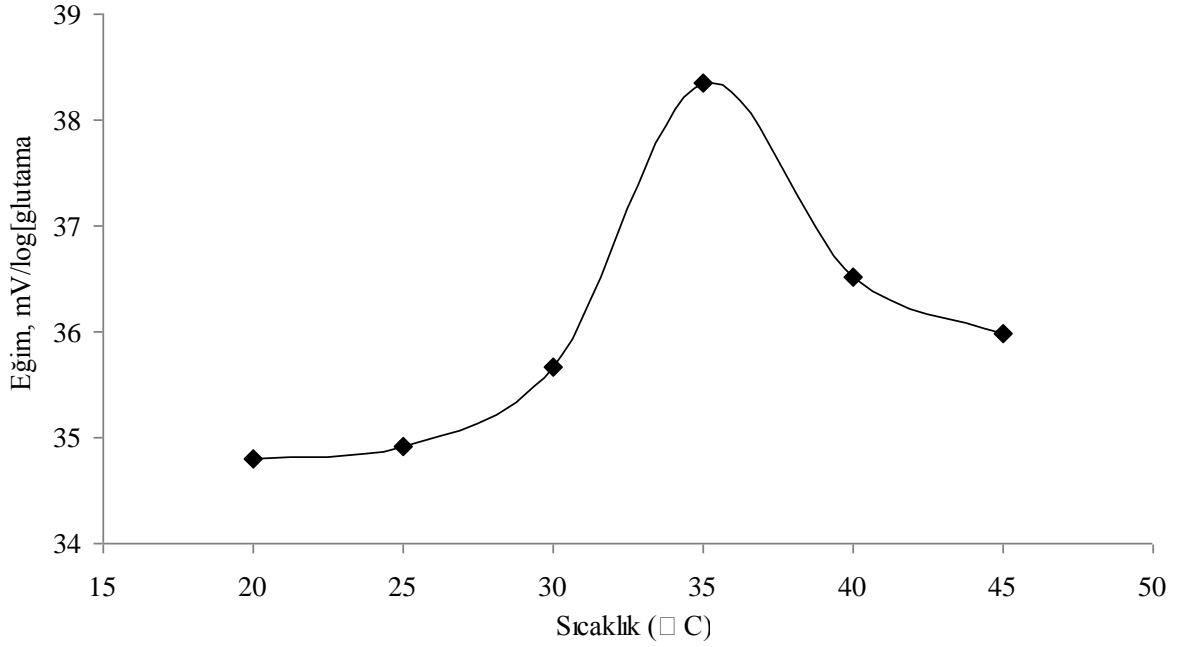
Marquette ve arkadaşları (2003) hazırladıkları glutamat oksidazın immobilizasyonuna dayanan biyosensörde pH 8,5 tamponu kullandılar ve genellikle oksidazların düşük pI değerine sahip olduklarını ve bazik tamponlarda negatif yüklendiklerini açıklamışlardır [82]. Alvarez-Crespo ve arkadaşları ise yaptıkları amperometrik glutamat biyosensöründe pH 8,0'de maksimum cevabı elde etmişlerdir [41]. McMahon ve arkadaşları ise yaptıkları polimer/enzim bileşimli glutamat biyosensöründe en iyi cevabı pH 7,4'te almışlardır [45]. Hamdi ve arkadaşları da yaptıkları dopamine karşı duyarlı glutamat mikrobiyosensöründe pH 7,4 fosfat tamponunu kullanmışlardır [57]. Maalouf ve arkadaşları ise çalışmalarını pH 7,0'de sürdürmüşlerdir [58]. Biz hazırladığımız glutamat biyosensörü ile yüksek pH değerlerinde (8,5'in altındaki değerlere göre) çok iyi sonuçlar elde ettik.

### 5.1.5 Sıcaklığın etkisi

Glutamat oksidaz elektrotlarının performansına sıcaklığın etkisini incelemek için 6 farklı sıcaklıkta (20, 25, 30, 35, 40, 45 °C'de) ve 10 mM tampon konsantrasyonunda pH 8,5'ta MSG çözeltileri hazırlandı ve kalibrasyon grafikleri çizilerek eğimleri belirlendi.

Çizelge 5.5 25,0±1,0°C’da glutamat oksidaz biyosensörlerinin cevabına sıcaklığın etkisi

Sıcaklık(°C)	Eğim ,(mV/p[glutamat]±s
20	34,8 ± 0,6
25	34,9 ± 0,4
30	35,7 ± 0,7
35	38,3 ± 0,8
40	36,5 ± 0,0
45	35,9 ± 0,5



Şekil 5.5 Glutamat oksidaz biyosensörünün eğiminin sıcaklık ile değişimi

Çizelge 5.5 ve Şekil 5.5’den görüldüğü gibi, glutamat biyosensörü için 35°C’ ye kadar eğimde artış görülmüştür. 35°C’den sonra eğimdeki düşüş, biyosensördeki immobilize edilmiş glutamat oksidazın aktivitesinin düşmüş olduğunu göstermektedir. Çizelge 5.5 ve Şekil 5.5’te görüldüğü üzere glutamat biyosensörünün optimum çalışma sıcaklığı 35°C olarak bulunmuştur. Literatürde de glutamat biyosensörü ile yapılan çalışmalarda, yüksek sıcaklıklarda çalışılabildiği görülmüştür. Glutamat oksidaz termal olarak kararlı bir enzimdir (Pan vd. [51]). Pan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada maksimum cevabı 48°C’de gözlemlemişler, 48°C’nin üzerinde enzimin termal bozunmasının gerçekleştiğini

açıklamışlardır. Hamdi ve arkadaşları ise yaptıkları glutamat mikrosensöründe 37°C 'de çalışmışlardır [57]. Biz optimum sıcaklık 35°C çıkmasına rağmen çalışmamızı maliyet ve çalışma kolaylığı açısından oda sıcaklığında gerçekleştirdik.

### 5.1.6 Seçicilik katsayılarının hesaplanması

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

Çizelge 5.6 Glutamat biyosensörünün seçicilik katsayıları

İyon	Seçicilik katsayısı, $K_{\text{NH}_4^+}$ , x
$\text{Na}^+$	$3,8 \times 10^{-2}$
$\text{K}^+$	$2,4 \times 10^{-1}$
$\text{Ca}^{2+}$	$1,3 \times 10^{-3}$

Bu sonuçlar, glutamat 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.

### 5.1.7 Amino asitlerin girişim etkisi

Glutamat biyosensörüne amino asitlerin girişim etkisinin belirlenmesi amacıyla, 11 farklı amino asitin ve glutamatın  $10^{-2}$  M stok çözeltileri hazırlanmıştır. Glutamat ve amino asit konsantrasyonunun aynı konsantrasyonda olduğu çözeltilerde ( $10^{-3}$ M, pH 8,5) biyosensörümüzün optimum koşullarında mV ölçümleri yapılmıştır. Bu değerler, sadece glutamat çözeltisinde ( $10^{-3}$ M, pH 8,5) mV okuması yapılarak elde edilen değere göre oranlandı. Bu şekilde, amino asitlerin girişim etkisi yüzde olarak belirlenmiş ve Çizelge 5.7'de verilmiştir.

Literatürde Maalouf ve arkadaşları yaptıkları amperometrik glutamat biyosensörüne 15 farklı aminoasit ve ürik asit, asetaminofen, askorbik asit gibi girişim yapan türleri eklemişler ve herhangi bir amperometrik cevap gözlemlenmemişlerdir [58]. Bizim yaptığımız glutamat biyosensörüne ise en çok girişimi glutamin yapmıştır. Girişim yapması beklenen askorbik asitin girişimi ise yok denecek kadar azdır. Diğer aminoasitler de aynı şekilde önemsenecek düzeyde girişim yapmışlardır.

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

Aminoasitler	Girişim etkisi, %
Lizin	0,19
Serin	0,29
Glisin	0,59
Valin	0,99
Metiyonin	1,28
L-Askorbik asit	1,38
Arginin	1,68
Alanin	1,97
Histidin	2,47
Sistein	4,5
Glutamin	41

### 5.1.8 Karıştırma hızının etkisi

Glutamat biyosensörlerinin cevabına karıştırma hızının etkisini araştırmak amacıyla manyetik karıştırıcının hızı 100, 250 ve 750 rpm olmak üzere üç farklı hıza ayarlanarak MSG çözeltilerinin kararlı hale gelmesi için beklendi. Glutamat biyosensörlerinde 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.

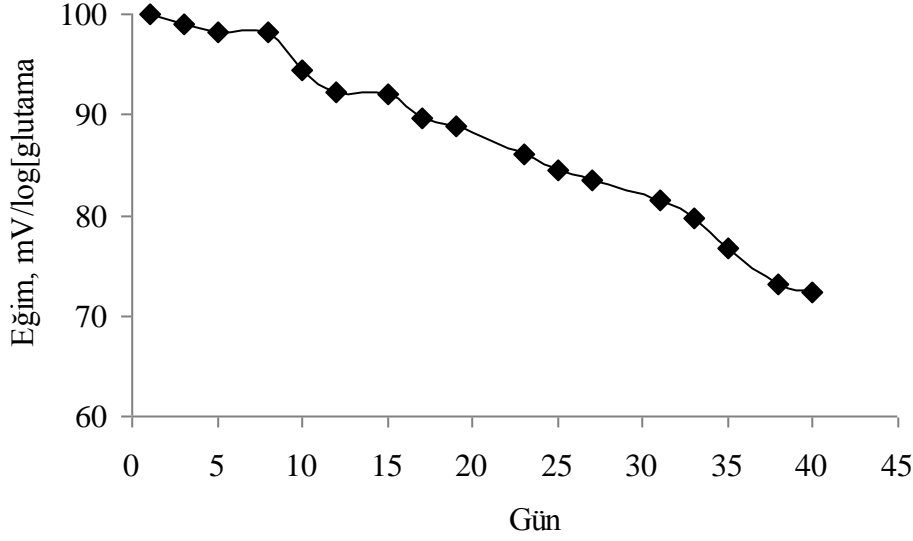
Karıştırma hızının artmasının biyosensörlerin potansiyeline herhangi bir etkisinin olmadığı, ancak cevap zamanında bir artışa neden olduğu görülmüştür. Bu durum, düşük karıştırma hızlarında enzimatik reaksiyonun yavaş olduğu, yüksek karıştırma hızlarında ise enzimin konformasyonu bozulacağından enzimatik reaksiyonun gerçekleşme olasılığının azaldığı şeklinde açıklanabilir. Bu nedenle 250 rpm en uygun karıştırma hızı olarak bulundu.

### **5.1.9 Cevap süresi**

İdeal bir biyosensör kısa sürede sonuç verebilmelidir. Glutamat elektrotlarının cevap süresini bulabilmek için optimum şartlarda hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki glutamat çözeltilerine glutamat 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). Glutamat biyosensörünün cevabı yaklaşık 1-2 dakika arasında değişmektedir. Zhang ve arkadaşları (2006) kitosan enzim filmine dayalı amperometrik glutamat biyosensörünün cevap zamanını 2 saniye olarak bulmuşlardır [50].

### **5.1.10 Raf ömrü**

Glutamat biyosensörünün raf ömrünü belirlemek amacıyla 75 gün süresince haftada 2 veya 3 defa glutamat çözeltilerinde mV ölçümü yapılarak kalibrasyon grafikleri çizildi ve çalışma aralığı ile eğimler belirlendi. İlk 45 gün düzenli olarak mV ölçümü yapıldıktan sonra kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi ile belirlenen eğim değerlerinde herhangi bir azalma görülmedi. Bu nedenle hazırlanmış olduğumuz glutamat biyosensörü ölçüm yapılmaksızın 1 ay süresince +4°C'de depolanmış ve 1 ayın sonunda eğim değerleri aynı şekilde belirlenmiştir. 75 gün sonunda glutamat biyosensörünün çalışma aralığının değişmediği ancak eğim değerinde sadece %27,7'lik bir düşme olduğu belirlenmiştir. Hazırladığımız palmitik asit içeren PVC membran temelli glutamat biyosensörünün raf ömrünün oldukça uzun olması, onun biyoanalitik çalışmalarda rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir.

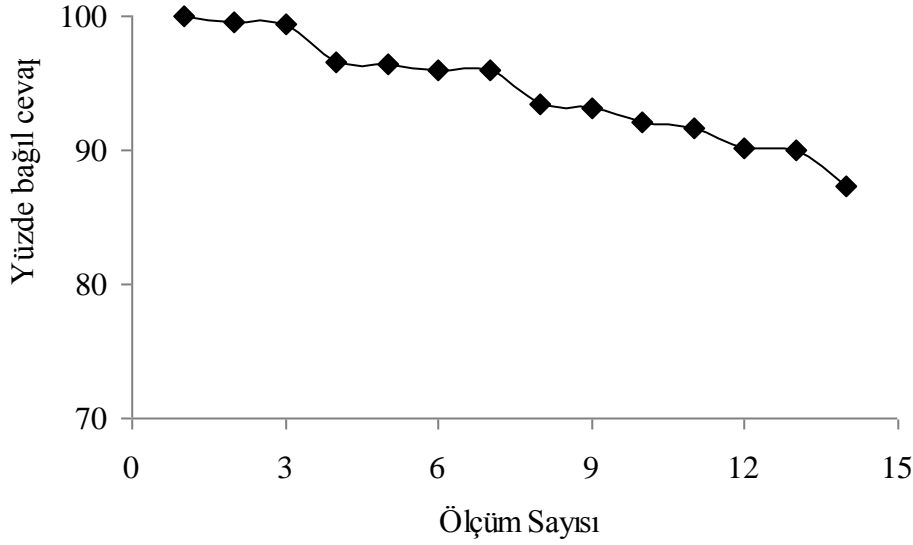


Şekil 5.6 Glutamat oksidaz biyosensöründen elde edilen eğim değerindeki değişme

Hamdi ve arkadaşları (2006) yaptıkları glutamat biyosensöründe geçici kararlılık (yaklaşık 3 hafta) elde etmişlerdir [57]. Maalouf ve arkadaşları ise yaptıkları amperometrik glutamat biyosensörünü 2 hafta kullanabilmişlerdir [58]. Bizim biyosensörümüzün raf ömrü bu biyosensörlere göre çok daha iyidir.

### 5.1.11 Tekrarlanabilirlik

Glutamat biyosensörlerinin tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla aynı gün içerisinde aynı biyosensör ile 15 farklı seri MSG çözeltisinde (pH 8,5) 15 dakika aralıklarla ölçüm alındı. Her ölçüm için kalibrasyon grafiği çizilerek her birinin eğimi belirlendi. En yüksek eğim değerini %100 kabul ederek diğer eğim değerleri de ona göre hesaplandı. Eğim değerleri yüzde bağıl cevaba karşı grafiğe geçirildi. Bütün sonuçlar ve çizilen kalibrasyon grafiği doğrultusunda elektrodumuzun katalitik aktivitesinde önemli bir düşüş olmaması, tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 5.7 Glutamat oksidaz biyosensörünün tekrarlanabilirliği

## 5.2 Glutamat Biyosensöründe Kinetik Parametrelerin ( $K_m$ ve $V_{max}$ değerleri) Belirlenmesi

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

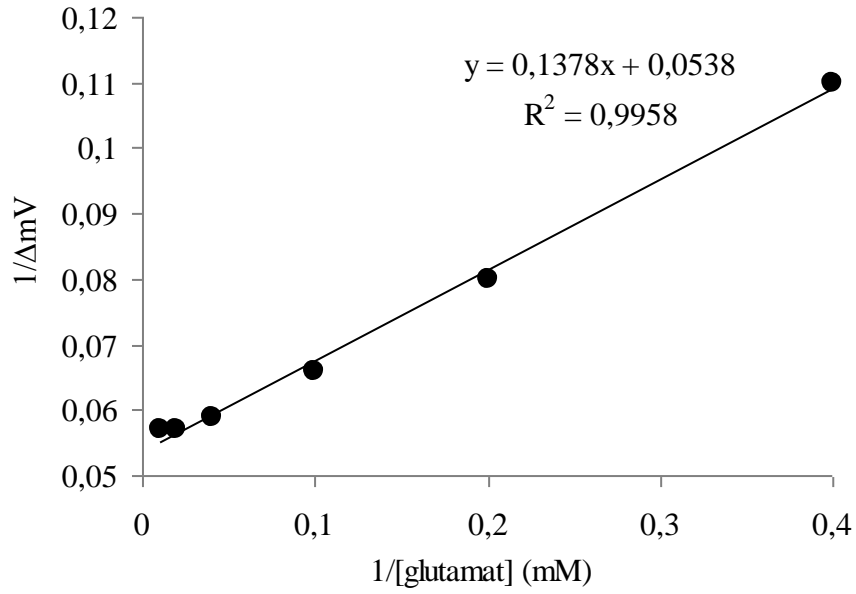
Maksimum hız,  $V_{max}$ , enzimatik katalizin ulaşabileceği en yüksek hız değeridir. Enzim bölgeleri substrat ile tam doygunluğa geçince maksimum hıza ( $V_{max}$ ) ulaşır. Michaelis-Menten sabiti,  $K_m$ , en yüksek hız değerinin yarısına ulaşmak için gerekli substrat miktarıdır, enzime ve substrata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

Glutamat biyosensöründe immobilize olmuş glutamat oksidaz enziminin  $K_m$  sabitini bulmak amacıyla glutamat konsantrasyonlarına karşı potansiyel değişimi verilerinden yararlanılarak Lineweaver-Burk grafiği ( $1/[glutamat]$ -  $1/\Delta mV$  grafiği) çizilerek bu grafikten glutamat oksidaz için  $K_m$  değeri belirlendi.

Maalouf ve arkadaşları 2006'da yaptıkları amperometrik glutamat biyosensörü ile glutamat oksidaz enziminin Michaelis-Menten sabitini Lineweaver-Burk grafiğinden 2.18 mM

bulmuşlardır [58]. Başka bir çalışmada glutamat oksidaz için  $K_m$  değeri ise 2.84 mM olarak bulunmuştur[83].

Hazırlamış olduğumuz glutamat biyosensörünün glutamata duyarlılığının belirlenmesi için elde ettiğimiz verilerden yararlanılarak  $1/[\text{glutamat}] - 1/\Delta mV$  grafiği çizilerek elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinden, glutamat oksidaz enziminin  $K_m$  değerini 2.56 mM,  $V_{max}$  değerini ise 18.59 mV/dakika olarak bulduk (Şekil 5.8). Tez çalışmamız sonucu elde ettiğimiz  $K_m$  değerimiz, literatürdeki bilgilerle ve daha önce bulunmuş sonuçlarla uyumludur.

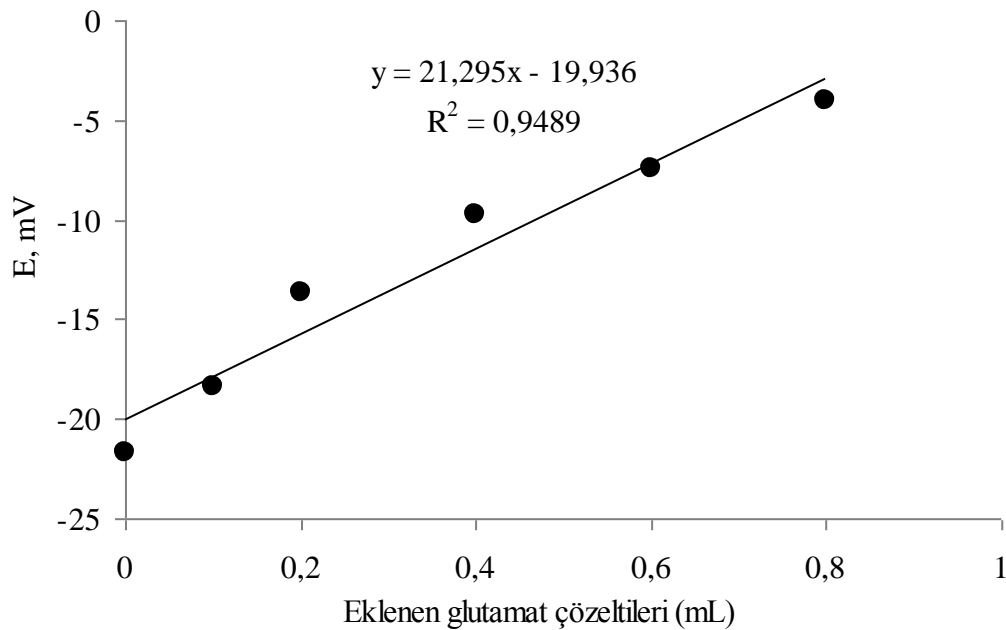


Şekil 5.8 Glutamat biyosensöründe yer alan glutamat oksidaz için Lineweaver-Burk grafiği.

### 5.3 Gerçek Numunelerde Glutamat Tayini

#### 5.3.1 Multipower aminoasit karışımında glutamik asit tayini

Hazırladığımız palmitik asit içeren PVC membranlı glutamat biyosensörünün gerçek numunelerde glutamik asit tayininde kullanıp kullanılmayacağı araştırıldı. Bu amaçla, Multipower firmasından satın alınan aminoasit karışımında glutamat tayini standart katma yöntemi kullanılarak yapıldı. Çizelge 4.5'te belirtildiği şekilde hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılan standart katma yönteminde elde edilen grafik Şekil 5.9'da verilmiştir.



Şekil 5.9 Glutamat biyosensörü ile standart katma yöntemi kullanılarak  $10^{-1}$  M MSG çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği.

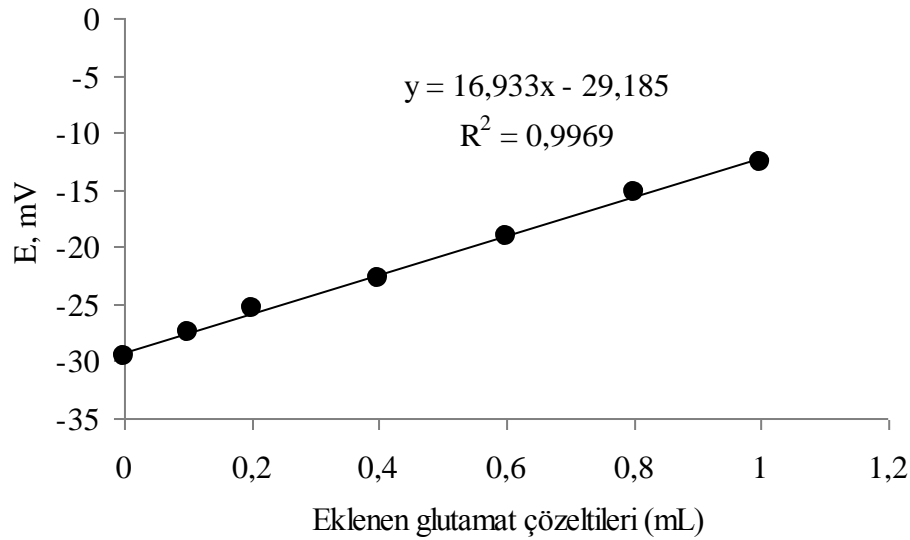
Çizelge 5.8 Hazırladığımız glutamat biyosensörü ile MULTIPOWER aminoasit karışımında glutamik asitin tayini ile elde edilen sonuç.

Glutamik asit miktarı (mg / 100 $\mu$ L)	
MULTIPOWER amino asit karışımı	Glutamat biyosensörü
1,48	1,38

Çizelge 5.8'de görüldüğü gibi, MULTIPOWER aa karışımında bulunan glutamik asit miktarı ile hazırladığımız biyosensör ile bulduğumuz sonucun birbirine çok yakın olması glutamat tayininin sensörümüzle başarılı bir şekilde yapıldığını ortaya koymaktadır.

### 5.3.2 Knorr tavuk bulyonunda glutamat tayini

Gıda katkı maddesi olarak kullanılan monosodyum glutamatın tayini hazırlamış olduğumuz glutamat biyosensörü ile knorr tavuk bulyonunda potansiyometrik olarak tayin edildi. Tarım ve köyşleri bakanlığının 2008’de yayınladığı resmi gazetede Ek 1’de E 620 kodlu glutamik asit ve E621 kodlu monosodyum glutamat isimli gıda katkı maddelerinin gıdalarda bulunması gereken max. miktarı 10 g/kg olmalıdır ibaresi yer almaktadır. Başka bir bilgi ise gıdalara konulması gereken MSG miktarının gıda ağırlığının %0,1 ile %0,8 arasında olması gerektiğidir. Biyosensörümüz ile yaptığımız ölçümler sonucu bulduğumuz değeri bu limit değerleri ile kıyasladık ve sonucumuzun bu değerler ile uyumlu olduğunu gördük. Kalibrasyon grafiği Şekil 5.10’da bulduğumuz sonuç ise Çizelge 5.9’da verilmiştir.



Şekil 5.10 Glutamat biyosensörü ile standart katma yöntemi kullanılarak  $10^{-2}$  M MSG çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği.

Çizelge 5.9 Knorr tavuk bulyonunda MSG’in tayini için glutamat biyosensörü ile elde edilen sonuçlar

Monosodyum glutamat miktarı (mg/10 g tablet)	
Knorr tavuk bulyon	63,4

10 g’lık bir bulyonda resmi gazeteye göre bulunması gereken en yüksek MSG değeri 100 mg’dır. Bizim bulduğumuz sonuç, gıdada bulunması gereken MSG’in %0,1- %0,8 aralığına

da girmektedir. Glutamat biyosensörü ile gıdada, gıdanın ağırlığının %0,63'ü kadar MSG tayin edilmiştir. Bu değer de olması gereken değer aralığı içindedir.

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada aminoasit karışımında ve tavuk bulyonda glutamat tayini yapabilmek için, uzun zincirli bir yağ asidi olan palmitik asit içeren PVC membran elektrotları kullanılarak potansiyometrik glutamat biyosensörü geliştirildi.

Bölüm 5'teki sonuçlara bakıldığında palmitik asit içeren PVC membran elektrodu ile birçok parametrede çok iyi sonuçlar elde ettiğimizi görmekteyiz.

Glutamat oksidaz enzimi kullanarak yaptığımız glutamat biyosensörü ile optimum çalışma koşullarımızı pH=8,5; optimum tampon konsantrasyonu 10 mM; optimum sıcaklık 35°C, raf ömrünü yaklaşık 1,5 ay olarak bulduk. Optimize ettiğimiz glutamat biyosensörü ile gerçek numunelerde tayin yaptık ve olması gereken sonuçlara çok yakın sonuçlar elde ettik. Yaptığımız glutamat biyosensörünü gıda ve sağlık sektöründeki numunelerde kullanabildik. Özellikle MSG gıda sektöründe kullanılan çok önemli bir lezzet arttırıcıdır ve sağlık açısından insanlar üzerinde birçok yan etkisinin olduğu düşünülmektedir. Glutamat aynı zamanda çok önemli bir nörotransmitterdir. Memeli beyinde glutamat, glutaminden glutaminaz enzimi ile veya  $\alpha$ - ketoglutarattan, glutamat dehidrogenaz ve glutamat oksalat transaminaz ile elde edilir. Glutamatın degradasyonu ile  $\alpha$ - ketoglutarat, GABA ve glutamin oluşur. GABA glutamatın glutamat dekarboksilaz enzimi ile bir molekül CO<sub>2</sub> kaybetmesiyle oluşur. GABA'da beyin metabolizması ve işleyişi için önemli bir nörotransmitterdir. Glutamat ve dolayısıyla da beyindeki GABA konsantrasyonuna göre birtakım metabolik bozukluklar tanımlanmıştır. Bu nedenle glutamatın tayini çok önemlidir. Ayrıca yaptığımız glutamat biyosensörü potansiyometrik esastır, literatürde potansiyometrik esastlı glutamat biyosensörüne rastlamamış olmamızda çalışmamızın özgünlüğünü göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- 
- [1] Martin, S.J., Grimwood, P.D., ve Morris, R.G.M. (2000), "Synaptic Plasticity and Memory: an Evaluation of the Hypothesis", *Ann. Rev. Neurosci.*, 23:649-711.
- [2] Castillo, J., Isik, S., Blöchl, A., Pereira-Rodrigues, N., Bedioui, F., Csöregi, E., Schuhmann, W., ve Oni, J. (2005), "Simultaneous Detection of the Release of Glutamate and Nitric Oxide from Adherently Growing Cells Using an Array of Glutamate and Nitric Oxide Selective Elektrodes", *Biosensors and Bioelectronics*, 20:1559-1565.
- [3] Belsham, B. (2001), "Glutamate and its Role in Psychiatric Illness", *Hum. Pharmacol. Clin. Exp.*, 401:91-94.
- [4] Nedergaard, M., Takano, T., ve Hansen, A. (2002), "Beyond the Role of Glutamate as a Neurotransmitter ", *Nat. Rev. Neurosci.*, 3:748-755.
- [5] Delauney, S., Gourden P., Lapujade, P., Maily, E., Oriol, E., Engasser, J.M., Lindley, N.D., ve Goergen, J.L. (1999), *Enzyme Microb. Technol.*, 25-762.
- [6] <http://www.food-info.net/tr/intol/msg.htm>
- [7] <http://www.bodyforumtr.com/vbforum/e621-mono-sodyum-glutamat, t32863.html?p=345264> 07.02.2011
- [8] [http://tr.wikipedia.org/wiki/Monosodyum\\_glutamat](http://tr.wikipedia.org/wiki/Monosodyum_glutamat), 08.03.2011
- [9] Fillenz, M., *Behav. Brain Res.*, 1995, 71, 51.
- [10] Obrenovitch, T. P., and Urenjak, J. (1997) *Prog. Neurobiol.*, 51, 39.
- [11] Conn, P. J., ve Pin, J. P. (1997) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37, 205.
- [12] Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe ve Diemer, N.H. (1984), *J. Neurochem.*, 43, 1369.
- [13] Wahl, F., Obrenovitch, T.P., Hardy, A.M., Plotkine, M., Boulu, R. ve Symon L. (1994), *J. Neurochem*, 63, 1003.
- [14] Nicacio J. M. Arruda, Jose L. L. Filho, Maria C. B. S. M. Montenegro, Alberto N. Araujo ve Valdinete L. Silva (2003), " Simple and Inexpensive Flow L-Glutamate Determination Using Pumpkin Tissue" *J. Agric. Food Chem.* 51:6945-6948.
- [15] Anderson, L. W., Zaharevitz, D. W., ve Strong, J. M. (1987), Glutamine and Glutamate: Automated Quantification and Isotopic Enrichments by Gas Chromatography/mass Spectrometry. *Anal. Biochem.*, 163 (2): 358-368.

- [16] Lee, K. H., Ishikawa, T., McNiven, S. J., Nomura, Y., Hiratsuka, A., Sasaki, S., Arikawa, Y., ve Karube, I. (1999), Evaluation of Chemical Oxygen Demand (COD) Based on Coulometric Determination of Electrochemical Oxygen Demand (EOD) Using a Surface Oxidized Copper Electrode. *Anal. Chim. Acta*, 398:161-171.
- [17] Fonda, M. L. (1985), Glutamate Decarboxylase from Bacteria. *Methods Enzymol.*, 113, 11-16.
- [18] Chapman, J.; Zhou, M. (1999), Microplate-Based Fluorometric Methods for the Enzymatic Determination of L-glutamate: Application in Measuring L-glutamate in Food Sample. *Anal. Chim. Acta*, 402:47-52.
- [19] Zhou, S.Y., Zuo, H., Stobaugh, J.F., Lunte, C.E. ve Lunte, S.M. (1995), *Anal. Chem.*, 67-594.
- [20] Lada, M.W., Vickroy, T.W. ve Kennedy, R.T. (1997) *Anal. Chem.*, 69, 4560.
- [21] Dawson, L.A., Stow, J.M., ve Palmer, A.M. (1997), "Improved Method for the Measurement of Glutamate and Aspartate Using Capillary Electrophoresis with Laser Induced Fluorescence Detection and its Application to Brain Microdialysis", *J. Chromatogr. B*. 694:455-460.
- [22] Walikonis, R.S., Jensen, O.N., Mann, M., Provance, D.W., Mercer, J.A., ve Kennedy, M.B. (2000), "Identification of Proteins in the Postsynaptic Density Fraction by Mass Spectrometry", *J. Neurosci*, 20:4069-4080.
- [23] Kondrat, Richard W., Kanamori, Keiko ve Ross, Brian D. (2002), "In Vivo Microdialysis and Gas Chromatography/ Mass-Spectrometry for <sup>13</sup>C-Enrichment Measurement of Extracellular Glutamate in Rat Brain" *Journal of Neuroscience Methods*, 120:179-192.
- [24] Hanko, Valoran P. ve Rohrer, Jeffrey S. (2004), "Determination of Amino acids in Cell Culture and Fermentation Broth Media Using Anion-exchange Chromatography with Integrated Pulsed Amperometric Detection" *Analytical Biochemistry*, 324:29-38.
- [25] Robinson, G. W. (1978), *Amino Acid Determination Methods and Techniques*, ed. S. Blackburn, Marcel Dekker, New York, 39–85.
- [26] Hill, D. W., Walters, F. H., Wilson, T. D. ve Stuart, J. D. (1979), *Anal. Chem.*, 51, 1338.
- [27] Mohammed, E. B. A., ve Mohammed, A. G. S. (1997), *Analyst*, 122, 147.
- [28] You, J., Lao, W., You, J. ve Wang, G. (1999) *Analyst*, , 124:1755.
- [29] Lee, Y. H. ve Lin, T. I. (1994), *J. Chromatogr. A*, 680: 287.
- [30] Shigeyuki, O., Toshiaki, F. ve Yasuyoshi, M. (1996), *Analyst*, 121:1683.
- [31] Marquez, C.D., Weintraub, S. T., ve Smith, P. C. (1994), *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.*, 658:213.
- [32] Fujii, K., Ikai, Y., Mayumi, T., Oka, H., Suzuki, M., ve Harada, K. (1997), *Anal. Chem.*, 69:3346.
- [33] Chance, D. H., Millington, D. S., Terada, N., Kahler, S. G., Roe, C. R., ve Hofman, L. F. (1993), *Clin. Chem.*, 39:66.
- [34] Qu, J., Wu, Z., Luo, G., Liu, M. ve Yang, C. (2000), *Chem. J. Chin. Univ.*, 21:210.
- [35] Müftüoğlu, H. (2008) 15. Farmakoloji Eğitim Sempozyumu, "Nörofarmakolojide in vivo Voltametri ile L-glutamat ve diğer Nörotransmitterlerin Ölçüm Teknikleri, Erzurum

- [36] Nemetlu, E. (2002) Meloksikamın Farmasötik Preparatlardan UV Spektrofotometrisive Kapiler Elektroferez Yöntemi ile Analizi, Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara.
- [37] Moser, I., Jobst, G., ve Urban, G.A. (2002), "Biosensor Arrays for Simultaneous Measurement of Glucose, Lactate, Glutamate and Glutamine", *Biosens. Bioelectron.*, 17:297-302.
- [38] Castillo, J., Isik, S., Blöchl, A., Pereira-Rodrigues, N., Bedioui, F., Csoregi, E., Schuhmann, W., ve Oni, J. (2005) "Simultaneous Detection of the Release of Glutamate and Nitric Oxide from Adherently Growing Cells Using an Array of Glutamate and Nitric Oxide Selective Electrodes" *Biosens. Bioelectron.* 20:1559–1565.
- [39] McMahon, C.P., O'Neill, R.D., (2005) "Polymer-enzyme composite biosensor with high glutamate sensitivity and low oxygen dependence" *Anal. Chem.* 77, 1196–1199.
- [40] Pasco, N., Jeffries, C., Davies, Q., Downard, A.J., Roddick-Lanzilotta, A.D., ve Gorton, L. (1999), "Characterization of a Thermophilic L-glutamate Dehydrogenase Biosensor for Amperometric Determination of L-glutamate by Flow Injection Analysis", *Biosensors and Bioelectronics*, 14:171-178.
- [41] Alvarez-Crespo, S.L., Lobo-Castanon, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., ve Tunon-Blanco, P. (1997), "Amperometric Glutamate Biosensor Based on Poly(o-phenylenediamine) Film Electrogenerated onto Modified Carbon Paste Electrodes", *Biosensors and Bioelectronics*, 12:739-747.
- [42] Doong, R., Shih, H. (2006), "Glutamate Optical Biosensor Based on the Immobilization of Glutamate Dehydrogenase in Titanium Dioxide Sol–Gel Matrix", *Biosensors and Bioelectronics*, 22:185-191.
- [43] Braeken, D.R., Rand, D.R., Andrei, A., Huys, R., Spira, M.E., Yitzchaik, S., Shappir, J., Borghs, G., Callewaert, G., ve Bartic, C. (2009), "Glutamate Sensing with Enzyme-Modified Floating-Gate Field Effect Transistors", *Biosensors and Bioelectronics*, 24:2384-2389.
- [44] Hu, Y., Mitchell, K.M., Albahadily, F.N., Michelis, E.K. ve Wilson, G.S. (1994), *Brain Res.*, 659:117.
- [45] Tamiya, E., Sugiura, Y., Amou, Y., Karube, I., Ajima, A., Kado, R. ve Ho, M. (1995) *Sens. Mater.*, 7:249.
- [46] Niwa, O., Horiuchi, T., Kurita, R., Tabei, H., ve Torimitsu, K. (1998), "Microfabricated On-Line Sensor for Continuous Monitoring of L-Glutamate" *Analytical Sciences* 14.
- [47] Albery, W. J., Boutelle, M.G., ve Galley, P.T. (1992) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 900.
- [48] Niwa, O., Torimitsu, K., Morita, M., Osborne, P., ve Yamamota, K. (1996) *Anal. Chem.*, 68, 1865.
- [49] Robert, F., Parisi, L., Bert, L., Renaud, B., ve Stoppini, L. *J. Neurosci. Meth.* 74,65.
- [50] Zhang, M., Mullens, C., ve Gorski, W. (2006), "Amperometric Glutamate Biosensor Based on Chitosan Enzyme Film", *Electrochimica Acta*, 51:4528-4532.[51] Pan, S., Arnold, M. (1995), "Selectivity Enhancement for Glutamate with a Nafion/Glutamate Oxidase Biosensor", *Talanta*, 43:1157-1162.

- [52] Moser, I., Jobst, G., Aschauer, P., Svasek, P., Varahram, M., Urban, G., Zanin, V.A., Tjoutrina, G.Y., Zharikova, A.V., ve Berezov, T.T. (1995), *Biosensors and Bioelectronics*, 10:527.
- [53] Xin, W.K., Gao, X.X. (1996), "Study of the Effect of Lanthanide Ions on the Kinetics of Glutamate Dehydrogenase by a Chronoamperometric Method", *Analyst*, 121:687-690.
- [54] Ryan, M.R., Lowry, J.P., ve O'Neill, R.D. (1997), "Biosensor for Neurotransmitter L-Glutamic Acid Designed for Efficient Use of L-Glutamate Oxidase and Effective Rejection of Interference" *Analyst*, 122:1419-1424.
- [55] Isa, I. M., Ghani, S. (2006), "Development of Prototype Heterogeneous Chitosan Membrane Using Different Plasticizer for Glutamate Sensing", *Talanta*, 71:452-455.
- [56] Han, J., Boo, H., Park, S., ve Chung T. D. (2005), "Electrochemical Oxidation of Hydrogen Peroxide at Nanoporous Platinum Electrodes and the Application to Glutamate Microsensor", *Electrochimica Acta*.
- [57] Hamdi, N., Wang, J., Walker, E., Maidment, N. T., ve Monbouquette, H. G. (2006), "An Electroenzymatic L-glutamate Microbiosensor Selective Against Dopamine", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 591:33-40.
- [58] Maalouf, R., Chebib, H., Saikali, Y., Vittori, O., Sigaud, M., ve Jaffrezic-Renault, N. (2006), "Amperometric and Impedimetric Characterization of a Glutamate Biosensor Based on Nafion and a Methyl Viologen Modified Glassy Carbon Electrode", *Biosensors and Bioelectronics*, 22:2682-2688.
- [59] Schuvailo, O. M., Soldatkin, O. O., Lefebvre, A., Cespuglio, R., ve Soldatkin, A. P. (2006), "Highly Selective Microbiosensors for in Vivo Measurement of Glucose, Lactate and Glutamate", *Analytica Chimica Acta*.
- [60] McMahan, C.P., Rocchitta, G., Kirwan, S.M., Killoran, S.J., Serra, P.A., Lowry, J.P., ve O'Neill, R.D. (2007), "Oxygen Tolerance of an Implantable Polymer/Enzyme Composite Glutamate Biosensor Displaying Polycation-Enhanced Substrate Sensitivity", *Biosensors and Bioelectronics*, 22:1466-1473.
- [61] Telefoncu, A. 1999. *Biyosensörler* (Telefoncu A., Ed.) s.81-142 Ege Üniversitesi, İzmir.
- [62] Telefoncu, A. 1997. *Enzimoloji* (Telefoncu A., Ed.) Lisansüstü Yaz Okulu, Aydın-Türkiye.
- [63] Guisan J. M. (2006), "Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells" Humana Press Inc. New Jersey
- [64] Zhang X., Huangxian J., ve Joseph W. (2008), "Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications", Elsevier.
- [65] Mulchandam, A., Rogers, K.R. (1998), "Enzyme and Microbial Biosensors Techniques and Protocols' Methods in Biotechnology", Humana Press Inc. Volume 6.
- [66] Gorton L. (2005), "Biosensors And Modern Biospecific Analytical Techniques", Elsevier B.V., 44:490.
- [67] Guilbault, G. G., ve Kauffman, J. M. (1987) "Enzyme-based Electrodes as Analytical Tools", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 9:95-113.
- [68] Rusling James F. *Biomolecular Film Design, Function, and Applications* (2003) Marcel Dekker Inc. New York

- [69] Sarıboğa, B., (2008) PKU Teşhisinde Potansiyometrik Biyosensörler Geliştirilmesi Doktora Tezi Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun.
- [70] Edmonds T. E. (1988), "Chemical Sensors" , Blackie and Son, USA, 17-69 and 75-115
- [71] Shi, Renbing ve Stein, Kathrin (1996), "Flow Injection Methods for Determination of L-Glutamate Using Glutamate Decarboxylase and Glutamate Dehydrogenase Reactors with Spectrophotometric Detection" *The Analyst*, 121:1305-1309.
- [72] Liu, Z., Niwa, O., Horiuchi, T., Kurita, R., ve Torimitsu, K. (1999) "NADH and Glutamate On-line Sensors Using Os-HRP/GC Electrodes Modified with NADH Oxidase and Glutamate Dehydrogenase" *Biosensors and Bioelectronics*, 14: 631-638.
- [73] Ling, D., Wu, G., Wang, C., Wang, Fan ve Song (2000), "Guoqiang. The Preparation and Characterization of an Immobilized L-glutamic Decarboxylase and its Application for Determination of L-glutamic Acid" *Enzyme and Microbial Technology*, 27:516-521.
- [74] Oliveira, Maria Isaura, P., Pimentel,, M. C., Montenegro, M. C., B.S.M.; Araujo, Alberto N.; Pimentel, Maria F. ve Silva, Valdinete Lins da (2001), "L-Glutamate Determination in Food Samples by Flow-Injection Analysis" *Analytica Chimica Acta*, 448:207-213.
- [75] Qhobosheane, M., Wu, D., Gu, Y. ve Tan, W. (2004) "A Two-Dimensional Imaging Biosensor to Monitor Enhanced Brain Glutamate Release Stimulated by Nicotine" *Journal of Neuroscience Methods*, 135:71-78.
- [76] Rodriguez, B. B., Bolbot, J. A. ve Tothill, Ibtisam E. (2004), "Development of Urease and Glutamic Dehydrogenase Amperometric Assay for Heavy Metals Screening in Polluted Samples" *Biosensors and Bioelectronics*, 19:1157-1167.
- [77] Butt, S.B., Camman, K. (1992), "Enzyme urea biosensor based on modified potentiometric PVC-nonactin membrane electrode for assay of urea in blood" *Anal. Lett.*, 25(9);1597-1615.
- [78] Saurina, J., Hernandez-Cassou, S., Fabregas,E., ve Alegret, S.(1998), *Anal. Chim. Acta* 71:49.
- [79] Bilitewski, U., Chemnius, G.C., Ruger, P., ve Schinid, R.D. (1992), *Sens. Actuators B*. 7:351.
- [80] Kocki, R., Chudvick, A., ve Walcerz, I. (1999), "Urea determination using pH-enzyme electrode" *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21:51-57.
- [81] Eggestein, C., Borchardt, M., Diekmann, C., Gründig, B., Dumschat, C., Cammann, K., Knoll, M., ve Spener, F. (1999), "A disposable biosensor for urea determination in blood based on an ammonium-sensitive transducer" *Biosens. Bioelectron.* 14:33-41.
- [82] Marquette. C. A., Degiuli, A., ve Blum, L.J. (2003) "Electrochemiluminescent Biosensors Array for the Concomitant Detection of Choline, Glucose, Glutamate, Lactate, Lysine and Urate" *Biosensors and Bioelectronics*, 19:433-439.
- [83] McMahon, C.P., Rocchitta, G., Kirwan, S.M., Killoran, S.J., Serra, P.A., Lowry, J.P., ve O'Neill, R.D. (2006) *Anal. Chem.* 78, 2352-2359.

## ÖZGEÇMİŞ

---

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Demet YILMAZ  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 11/08/1986 İSTANBUL  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**E-posta** : demetyilmaz86@hotmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyokimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2011
Lisans	Kimya	Dokuz Eylül Üniversitesi	2009
Lise	Fen Bilimleri	Süleyman Nazif Lisesi	2004

### İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2011	Neutec Ac Ar-Ge	Araştırmacı/Analist