

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÜREAZ ENZİMİNİN ÇEŞİTLİ POLİMERLERLE
MODİFİKASYONU SONUCU MİKRO BOYUTTA ÜRE
BİYOSENSÖRÜNÜN OLUŞTURULMASI VE
BİYOKİMYASAL UYGULAMALARI**

Gökay VARDAR

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman

Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ

Ekim, 2019

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜREAZ ENZİMİNİN ÇEŞİTLİ POLİMERLERLE MODİFİKASYONU
SONUCU MİKRO BOYUTTA ÜRE BİYOSENSÖRÜNÜN
OLUŞTURULMASI VE BİYOKİMYASAL UYGULAMALARI

Gökay VARDAR tarafından hazırlanan tez çalışması çalışması 30.10.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Jüri Üyeleri

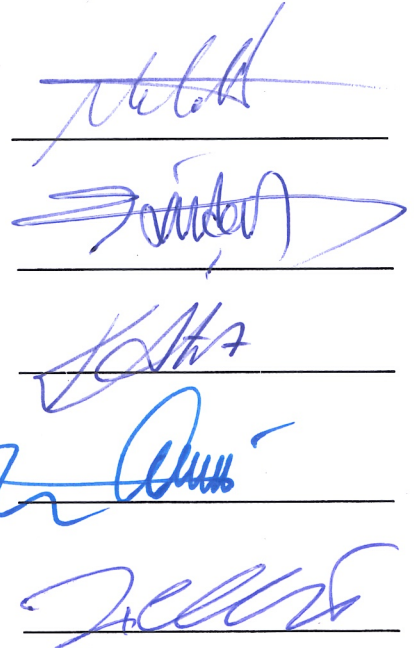
Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Kadriye KIZILBEY, Üye
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Mithat ÇELEBİ, Üye
Yalova Üniversitesi



Danışmanım Doç. Dr. Melda ALTİKATOĞLU YAPAÖZ sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Üreaz Enziminin Çeşitli Polimerlerle Modifikasyonu Sonucu Mikro Boyutta Üre Biyosensörünün Oluşturulması ve Biyokimyasal Uygulamaları başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Gökay VARDAR

İmza

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FDK-2017-3198 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

*Aileme
ve
dostlarıma*

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren, karşılaştığım her türlü sorunu ilgi ve sabırla dinleyip çözümlerini esirgemeyen, güleryüzünü eksik etmeyen, kendisinden çok şey öğrendiğim ve saygı duyduğum tez danışmanım Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ'e

Tez çalışmamda bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren, kendisinden çok şey öğrendiğim, bu tezin ortaya çıkmasında katkıları olan, beni kendi öğrencilerinden ayırmayan ve bana kendi biyomühendislik laboratuvarında çalışma imkanı sunan Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü hocalarından Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK'a

Doktora tez ilerleme jürimde bulunan, her doktora ilerleme döneminde beni güler yüzüyle ağırlayan ve yol gösteren Yeni yüzyıl Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'nden Dr. Öğr. Üyesi KADRIYE KIZILBEY'e

Çalışmamız için gerekli olan insan kan serumu örneklerinin temini için yardımcı olan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden Dr. Öğr.Üyesi Fatemeh BAHADORİ'ye ve bize bu kan serumu örneklerini temin eden, yardımlarını hiç esirgemeyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk ÖZER'e

Doktora tez sürecimde sağlamış oldukları destekten dolayı Tubitak 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Burs Programı'na ve Bilim İnsanları Destekleme Daire Başkanlığı'na

Her zaman yanımda olan, desteklerini hiç esirgemeyen dostlarıma, Kimya ve Biyomühendislik Bölümü'nde bulunan yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca aldığım kararlarda her zaman yanımda olan ve doktora eğitimim boyunca maddi, manevi desteklerini esirgemeyen sevgili babam Mefail VARDAR, sevgili annem Bedriye VARDAR ve canım kardeşim Gözde VARDAR'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gökay VARDAR

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	X
KISALTMA LİSTESİ	XI
ŞEKİL LİSTESİ	XII
TABLO LİSTESİ	XV
ÖZET	XVI
ABSTRACT	XVIII
1 Giriş	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	2
2 Enzimler	2
2.1 Enzimlerin Yapısı	2
2.2 Enzimlerin Sınıflandırılması	3
2.2.1 Oksidoredüktazlar	4
2.2.2 Transferazlar	5
2.2.3 Hidrolazlar	5
2.2.4 Liyazlar	5
2.2.5 İzomerazlar	6
2.2.6 Ligazlar	6
2.3 Enzimatik Kataliz	7
2.4 Enzimlerin Aktif Bölgesi	7
2.5 Enzim Stabilizasyonu	9

2.5.1	Enzim Stabilizasyon Teknikleri	11
2.6	Üreaz (Üre Amidohidrolaz: EC 3.5.1.5).....	15
3	Biyosensörler	18
3.1	Genel Olarak Biyosensörler.....	18
3.1.1	Elektrokimyasal Biyosensörler	21
3.1.2	Biyosensörlerin Uygulama Alanları	25
3.2	Üre Biyosensörleri	27
3.3	Üre ve Üre Tayin Yöntemleri	29
4	Biyopolimerler	34
4.1	Polimerler ve Biyopolimerler.....	34
4.1.2	Dekstran	37
4.1.3	Polietilen Glikol.....	39
5	Materyal-Metot	43
5.1	Kullanılan Cihazlar.....	43
5.2	Kullanılan Malzemeler ve Kimyasal Maddeler	44
5.3	Deneylerin Yapılışı.....	46
5.3.1	Üreaz Enzimin Aktivite Tayini	46
5.3.2	Enzim Polimer Komplekslerinin Sentezi	47
5.3.3	Enzim Polimer Komplekslerinin Aktivite Tayini	48
5.3.4	Mikro Boyutlarda Potansiyometrik Amonyum Seçici Elektrodun Hazırlanması ve Testi	49
5.3.5	Dekstran/Üreaz Kompleksinin Amonyum Seçici Elektrot Yüzeyine İmmobilizasyonu.....	51
5.3.6	Polietilen glikol/Üreaz Kompleksinin Amonyum Seçici Elektrot Yüzeyine İmmobilizasyonu	51
5.3.7	Üre Biyosensörlerinin Analitik Davranışlarının İncelenmesi.....	53

6 Sonuç ve Öneriler

56

6.1 Polietilen Glikol (PEG) Aldehit Türevinin ve Dekstran Aldehit Türevinin FTIR Spektrumları	56
6.2 Enzim Polimer Komplekslerinin Aktivite Tayini Sonuçları.....	57
6.2.1 Polietilen Glikol/Üreaz Komplekslerine Ait Aktivite Tayini Sonuçları... ..	57
6.2.2 Dekstran/Üreaz Komplekslerine Ait Aktivite Tayini Sonuçları.....	58
6.3 Amonyum Seçici Elektrotların Potansiyometrik Davranışı.....	59
6.3.1 Karboksillenmiş PVC Membranına Dayalı (PVC-COOH) Amonyum Seçici Elektrodun Potansiyometrik Davranışı	59
6.3.2 PVC-Palimitik Asit Membranına Dayalı Amonyum Seçici Elektrodun Potansiyometrik Davranışı.....	60
6.4 Üre Biyosensörlerinin Çalışma Aralıklarının Belirlenmesi.....	61
6.4.1 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Çalışma Aralıklarının Belirlenmesi.....	61
6.4.2 Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Çalışma Aralıklarının Belirlenmesi.....	63
6.5 Üre Biyosensörlerine pH'nın etkisi	66
6.5.1 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Farklı pH'larda ki Potansiyometrik Davranışı	66
6.5.2 Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Farklı pH'lardaki Potansiyometrik Davranışı	68
6.6 Üre Biyosensörlerine Sıcaklığın Etkisi	70
6.6.1 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Farklı Sıcaklıklardaki Potansiyometrik Davranışı.....	70

6.6.2 Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Farklı Sıcaklıklardaki Potansiyometrik Davranışı	72
6.7 Üre Biyosensörlerinin Tekrarlanabilirlikleri	75
6.7.1 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Tekrarlanabilirliklerinin İncelenmesi	75
6.7.2 Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Tekrarlanabilirliklerinin İncelenmesi	76
6.8 Üre Biyosensörlerinin Seçicilik Katsayılarının Hesaplanması	78
6.8.1 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Seçicilik Katsayılarının Hesaplanması.....	78
6.8.2 Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Seçicilik Katsayılarının Hesaplanması.....	79
6.9 Üre Biyosensörlerinin Cevap Zamanlarının Belirlenmesi.....	80
6.9.1 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Cevap Zamanlarının Belirlenmesi	80
6.9.2 Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Cevap Zamanlarının Belirlenmesi	80
6.10 Üre Biyosensörleri ile İnsan Kan Serumlarındaki Üre Tayini	81
6.10.1 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörleri ile İnsan Kan Serumlarındaki Üre Tayini	81
6.10.2 Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörleri ile İnsan Kan Serumlarındaki Üre Tayini	82
Kaynakça	88
Tezden Üretilmiş Yayınlar	98

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
dk	Dakika
gr	Gram
kDA	Kilodalton
C	Konsantrasyon
mg	Miligram
µg	Mikrogram
mL	Mililitre
mV	Milivolt
µl	Mikrolitre
M	Molarite
n	Mol Sayısı
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
U	Ünite
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

DNA	Deoksiribonükleik Asit
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
PEG	Polietilen Glikol
PVC	Polivinil Klorür
RNA	Ribonükleik Asit
SPSS	Sosyal Bilimler için İstatistik Programı
THF	Tetrahidro Furan

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1	Haloenzim-Apoenzim Çiftinin Gösterimi [9].	3
Şekil 2. 2	Bir Oksidoredüktaz Enzimi Katalizi [7].	4
Şekil 2. 3	Bir Transferaz Enzimi Katalizi [7].	5
Şekil 2. 4	Bir Hidrolaz Enzimi Katalizi [7].	5
Şekil 2. 5	Bir Liyaz Enzimi Katalizi [7].	6
Şekil 2. 6	Bir İzomeraz Enzim Katalizi [7].	6
Şekil 2. 7	Bir Ligaz Enzim Katalizi [7].	7
Şekil 2. 8	Enzim ile Substrat Reaksiyonu [7].	7
Şekil 2. 9	Enzimatik Reaksiyonun Şematik Gösterimi [7].	8
Şekil 2. 10	Enzim Katalizinde ki Anahtar-Kilit Uyumu Modeli ve Etkileşme Sonrası Uygunluk Modeli [14].	9
Şekil 2. 11	Farklı Enzim Stabilizasyon Metotlarının Şematik Gösterimi [15].	11
Şekil 2. 12	İmmobilizasyon Yöntemleri [31].	14
Şekil 2. 13	Ürenin Karbamat ve Amonyaga Dönüşüm Reaksiyonu [37].	16
Şekil 2. 14	Karbonik asit ve Amonyagın Denge Reaksiyonu [37].	16
Şekil 2. 15	Helicobakter pylori Üreaz Enziminin Yapısı [35].	17
Şekil 3. 1	Biyosensörün Şematik Gösterimi [41].	18
Şekil 3. 2	Biyosensörün Sınıflandırılması [47].	21
Şekil 3. 3	NERST Eşitliği [48].	23
Şekil 3. 4	Ürenin Enzimatik Hidrolizi [55].	27
Şekil 3. 5	Protein Metabolizmasının Genel Taslağı [67].	30
Şekil 3. 6	Üre Döngüsü [69].	31
Şekil 3. 7	Amonyagın CO ₂ ile Reaksiyonu [71].	32
Şekil 4. 1	Biyopolimerlerin Sınıflandırılması [76].	35
Şekil 4. 2	Dekstranın Molekül Yapısı [81].	38
Şekil 4. 3	Polietilen glikol'ün yapısı [87].	39
Şekil 4. 4	Bağlanmış Polietilen Glikol İçeren Bir Proteinin Şematik Gösterimi ...	42
Şekil 5. 1	Üreaz Enziminin Aktivite Hesabı [71].	46
Şekil 5. 2	Dekstran Aldehit Türevinin Eldesi [96].	47
Şekil 5. 3	Polietilen Glikol (PEG) Aldehit Eldesi [10].	48
Şekil 5. 4	Amonyum Seçici Elektrodun Şematik Gösterimi	50
Şekil 5. 5	Hazırlanan Üre Biyosensörünün Genel Görüntüsü	52

Şekil 5. 6	Üre Biyosensörünün Şematik Görüntüsü.....	53
Şekil 6. 1	PEG Aldehit Türevinin FTIR Spektrumu	56
Şekil 6. 2	Dekstran Aldehit Türevinin FTIR Spektrumu	56
Şekil 6. 3	Polietilen Glikol/Üreaz Komplekslerinin Aktivite Tayini Sonuçları.....	57
Şekil 6. 4	Dekstran/Üreaz Komplekslerine Ait Aktivite Tayini Sonuçları	58
Şekil 6. 5	PVC-COOH Membranına Dayalı Amonyum Seçici Elektrodun Standart Amonyum Klorür Çözeltilerindeki Potansiyel-Zaman Değişimi	59
Şekil 6.6	PVC-Palmitik asit Membranına Dayalı Amonyum Seçici Elektrodun Standart Amonyum Klorür Çözeltilerindeki Potansiyel-Zaman Değişimi.....	60
Şekil 6.7	PVC-Palmitik Asit-Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Çalışma Aralığı	61
Şekil 6.8	PVC-Palmitik Asit-Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Kalibrasyon Grafiği.....	62
Şekil 6. 9	PVC-COOH-Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Çalışma Aralığı.....	62
Şekil 6. 10	PVC-COOH-Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Kalibrasyon Grafiği	63
Şekil 6. 11	PVC-Palmitik Asit-Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Çalışma Aralığı	63
Şekil 6. 12	PVC-Palmitik Asit-Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Kalibrasyon Grafiği.....	64
Şekil 6.13	PVC-COOH-Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Çalışma Aralığı	64
Şekil 6.14	PVC-COOH-Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Kalibrasyon Grafiği.....	65
Şekil 6.15	PVC-Palmitik Asit –Dekstran/Üreaz ve PVC-Palmitik Asit-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı pH Değerlerindeki Eğim Grafiği	66
Şekil 6. 16	PVC-COOH-Dekstran/Üreaz ve PVC-COOH-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı pH Değerlerindeki Eğim Grafiği	67
Şekil 6. 17	PVC-Palmitik Asit –Polietilen Glikol/Üreaz ve PVC-Palmitik Asit-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı pH Değerlerindeki Eğim Grafiği	68
Şekil 6. 18	PVC-COOH-Polietilen Glikol/Üreaz ve PVC-COOH-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı pH Değerlerindeki Eğim Grafiği	69
Şekil 6. 19	PVC-Palmitik Asit –Dekstran/Üreaz ve PVC-Palmitik Asit-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı Sıcaklık Değerlerindeki Eğim Grafiği.....	70

Şekil 6. 20	PVC-COOH–Dekstran/Üreaz ve PVC-COOH-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı Sıcaklık Değerlerindeki Eğim Grafiği	71
Şekil 6. 21	PVC-Palmitik Asit –Polietilen Glikol/Üreaz ve PVC-Palmitik Asit-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı Sıcaklık Değerlerindeki Eğim Grafiği.....	72
Şekil 6. 22	PVC-COOH –Polietilen Glikol/Üreaz ve PVC-COOH-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı Sıcaklık Değerlerindeki Eğim Grafiği.....	73
Şekil 6. 23	PVC-Palmitik Asit –Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği.....	75
Şekil 6. 24	PVC-COOH–Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği	75
Şekil 6. 25	PVC-Palmitik Asit –Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği.....	76
Şekil 6. 26	PVC-COOH–Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği.....	77

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1	Denatürasyondan Sorumlu Çeşitli Fiziksel ve Biyolojik Ajanların İlgili Hedef Bölgelere Etkisi ve Enzimler Üzerindeki İlgili Etkileri [15].....	10
Tablo 3. 1	Biyosensör Bileşenleri [42].	19
Tablo 5. 1	Deneysel Çalışmada Kullanılan Cihazlar	43
Tablo 5. 2	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler	44
Tablo 6. 1	PVC-COOH Membranına Dayalı Amonyum Seçici Elektrodun Potansiyometrik Özellikleri.....	60
Tablo 6. 2	PVC-Palmitik asit Membranına Dayalı Amonyum Seçici Elektrodun Potansiyometrik Özellikleri.....	61
Tablo 6. 3	Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Bağlı Standart Sapma Değerleri.....	76
Tablo 6. 4	Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Bağlı Standart Sapma Değerleri.....	77
Tablo 6. 5	Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Seçicilik Katsayıları	78
Tablo 6. 6	Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Seçicilik Katsayıları	79
Tablo 6. 7	Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Cevap Zamanları.....	80
Tablo 6. 8	Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Cevap Zamanları.....	80
Tablo 6. 9	PVC-Palmitik Asit –Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü ile İnsan Kan Serumunda Üre Miktarlarının Ölçülmesi ..	81
Tablo 6. 10	PVC-COOH–Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü ile İnsan Kan Serumunda Üre Miktarlarının Ölçülmesi.....	82
Tablo 6. 11	PVC-Palmitik Asit –Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü ile İnsan Kan Serumunda Üre Miktarlarının Ölçülmesi .	82
Tablo 6. 12	PVC-COOH–Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü ile İnsan Kan Serumunda Üre Miktarlarının Ölçülmesi .	83

Üreaz Enziminin Çeşitli Polimerlerle Modifikasyonu Sonucu Mikro Boyutta Üre Biyosensörünün Oluşturulması Ve Biyokimyasal Uygulamaları

Gökay VARDAR

Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ

Azotlu maddelerin metabolizmasının son ürünü olan üre, böbrekler kanalıyla çıkarıldığı için üre tayini böbrek bozukluklarının derecesini anlamada yararlıdır ve özellikle pratikte en çok akut veya kronik böbrek hastalıklarının tanı, tedavi ve izleniminde kullanılır. Bu yüzden ürenin tayini önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında, üreaz enziminin polietilen glikol ve dekstran polimerleri ile çeşitli oranlarda non-kovalent kompleksleri sentezlenmiştir. Yapılan aktivite tayinleri sonucu Polietilen Glikol/Üreaz için en iyi mol oranı 1/1 ve Dekstran/Üreaz için en iyi mol oranının 40/1 olduğu saptanmıştır. Daha sonra amonyum seçici elektrot hazırlamak için PVC-COOH ve PVC-Palmitik asit temelli iki farklı membran bileşimi kullanılmıştır. En iyi aktivite gösteren Polietilen Glikol/Üreaz ve Dekstran/Üreaz kompleksleri çapraz bağlayıcı ajanlar vasıtasıyla amonyum elektrot yüzeylerine immobilize edilmiştir. Bu sayede PVC-COOH-

Dekstran/Üreaz, PVC-Palmitik Asit-Dekstran/Üreaz, PVC-COOH-Polietilen Glikol/Üreaz, PVC-Palmitik asit-Polietilen Glikol/Üreaz temelli 4 farklı üre biyosensörü geliştirilmiştir.

Geliştirilen biyosensörlerin potansiyometrik davranışları incelendi. Farklı pH'lerde ve sıcaklıklarda modifiye olmayan üre biyosensörüne göre daha iyi, daha kararlı bir potansiyometrik davranış gösterdi. Ayrıca geliştirilen biyosensörlerin tekrarlanabilirlikleri, seçicilikleri, cevap zamanları incelendi. Biyosensörlerin tekrarlanabilirlikleri gayet iyi (B.S.S.<%10), Na⁺, Ca²⁺, Li⁺ iyonların girişim etkisi K⁺ iyonuna göre nispeten daha az, cevap zamanları genel olarak 30 saniyenin altındadır.

Son olarak, geliştirilen biyosensörler ile insan kan serumunda üre tayini yapılmıştır. Deneysel olarak bulduğumuz üre değerleri ile hastanede bulunan üre değerleri ile bağımlı iki örneklem t testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analizin sonucunda deneysel olarak bulduğumuz değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Üre biyosensörü, enzim modifikasyonu, polietilen glikol, dekstran, üreaz

Development of Micro Sized Urea Biosensor by Using Modified Various Polymers and Biochemical Applications

Gökay VARDAR

Department of Chemistry

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ

Urea, which is the end product of the metabolism of nitrogenous substances, is removed through the kidneys, the determination of urea is useful in understanding the degree of kidney disorders and is particularly used in practice in the diagnosis, treatment and impression of acute or chronic kidney diseases. Therefore, determination of urea is important for kidney diseases.

In this thesis, non-covalent complexes of urease enzyme were synthesized by dextran and polyethylene polymers with different molar ratios. According to the urease activity determinations, the best molar ratio for Polyethylene Glycol/Urease was 1/1 and the best ratio for Dextran/Urease was 40/1 was obtained. Later, Two different membrane compositions based on PVC-COOH and PVC-Palmitic acid were used to prepare the ammonium selective electrodes. Urease-Polyethylene Glycol and Urease-Dextran complexes which were obtained best activity were immobilized to ammonium electrode surfaces by crosslinking agents. Four different urea biosensors based on PVC-COOH-Dextran/Urease, PVC -

Palmitic Acid-Dextran/Urease, PVC-COOH-Polyethylene Glycol/Urease, PVC-Palmitic acid-Polyethylene Glycol/Urease were developed.

Potentiometric response of the developed biosensors was examined against pH and temperature. It showed better, more stable potentiometric response than unmodified urea biosensor at different pHs and temperatures. Also reproducibility, selectivity and response times of the developed biosensors were examined. The reproducibility of the biosensors is very good (R.S.D. <10%), the interference effect of Na^+ , Ca^{+2} , Li^+ ions are relatively less than K^+ ion, and response times are generally less than 30 seconds.

Finally, urea was determined in human blood serum with the developed biosensors. The urea values that we found experimentally and the urea values in the hospital were statistically compared with paired dependent t test. As a result of the statistical analysis, it was found that the experimental values were statistically significant.

Keywords: Urea biosensor, enzyme modification, polyethylene glycol, dextran, urease

1.1 Literatür Özeti

Üre, insanlarda azot metabolizmasının başlıca son ürünüdür ve vücuttan esas olarak idrar yoluyla böbrekler tarafından elimine edilir, ayrıca kan ve tükürük gibi vücut sıvılarında da salgılanır. İdrardaki düzeyi, patofizyolojik koşullar altında 7 ila 20 mg/dL arasında değişmekte, ürenin miktarı böbrek fonksiyonunu ve çeşitli böbrek ve karaciğer hastalıklarının teşhisinde önemli bilgiler sağlamaktadır. Azotemi veya üremi olarak da adlandırılan, kandaki üre seviyelerinin artması, Kronik Kidney disease (CKD) veya End Stage Renal Disease (ESRD) olarak da bilinir ve genellikle ilerleyen böbrek fonksiyon kaybına neden olur. CKD dışında, kalp yetmezliği, hipovolemik şok, gastrointestinal kanama, ciddi enfeksiyonlar gibi diğer bazı durumlar da normal seviyenin ötesinde üre seviyelerinde artışa neden olur [1].

Üre tayini için gaz kromatografisi, kalorimetri, florimetri ve elektrokimyasal metotlar bulunmaktadır. Bu metotlar arasında ürenin elektrokimyasal tayini, bir çok üre biyosensörünün gelişmesine yol açtı. Birçok üre biyosensörü algılayıcı olarak üreaz enzimini kullanmaktadır [2]. Üreaz enzimi, (üre amidohidrolaz, E.C. 3.5.1.5) üreyi amonyum ve karbon dioksit çeviren etkili bir enzimdir. Üreazın kanda, idrarda ve atık sularda belirlenmesi çok önemlidir. Ayrıca diyaliz prosesinde önemli rol oynamaktadır [3].

Ürenin potansiyometrik tayini için enzimatik sensörler en iyi bilinen biyosensör sınıfıdır. Bu tip sensörler enzimatik reaksiyon sırasında açığa çıkan ürenin konsantrasyonunu ölçecek şekilde sensörün yüzeyine doğrudan substrat ile temas edebilen enzim katmanı yerleştirilir. Literatürde, elektroanalizde kullanılan potansiyometrik üre biyosensörleri hakkında birçok yayın bildirilmiştir. Enzimatik reaksiyon sırasında sırasıyla açığa çıkan amonyum iyonlarını ve hidrojen iyonlarını

tespit eden amonyum iyon seçici elektrotlar ,amonyum gaz elektrotları ve pH elektrotları üre biyosensörü olarak kullanılmaktadır [4].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez önerisinin amacı, mikro boyutlarda hızlı, hassas, doğru ve tekrarlanabilen sonuçlar sergileyen, sıcaklığa karşı dirençli, geniş pH aralığında çalışabilen, ekonomik ve güvenilir potansiyometrik üre biyosensörü geliştirilmesidir.

1.3 Hipotez

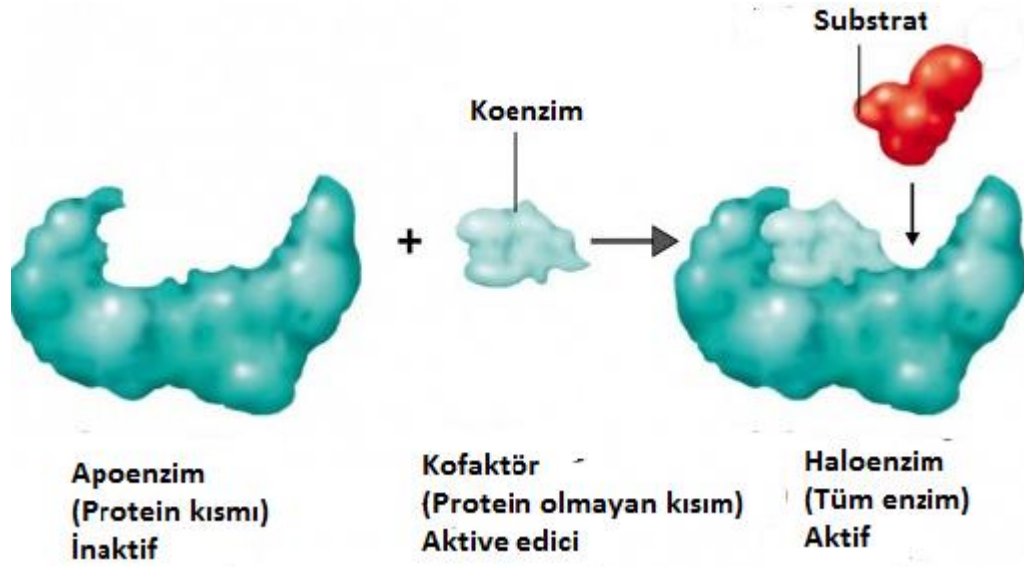
Hipotez olarak polietilen glikol ve dekstran ile fiziksel olarak modifiye edilen üreaz enziminin iyonofor olarak nonaktin, çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılarak karbokillenmiş PVC membran ve uzun zincirli yağ asidi olan palmitik asitli PVC membran yüzeyine immobilize edilmesine dayanır. Elde edilen biyosensörün potansiyometrik olarak okumaları yapılarak, kan serumlarında üre değerleri biyosensör vasıtasıyla belirlenir.

2.1 Enzimlerin Yapısı

Enzimler, genellikle yüksek katalitik aktiviteye, seçiciliğe ve özgüllüğe sahip proteinler olarak adlandırılan bir biyolojik makro moleküller grubudur. Canlı organizmalarda enzimler, yaşamı sürdüren metabolik süreçlerde binlerce spesifik reaksiyon için son derece etkili katalizörler olarak görev yapar [5]. Kesin düzenlemelerde binlerce atomdan oluşan bu moleküller, biyolojik hücrelerde meydana gelen farklı kimyasal reaksiyonların çoğunu katalize edebilir ve çok yüksek bir substrat özgüllük derecesi ile yan ürünlerin oluşumunu azaltır [6]. Enzimler çoğu inorganik katalizörden daha etkilidir; ayrıca, enzimler daha büyük spesifik etki sergilerler. Genellikle inorganik katalizörler, çeşitli kimyasal reaksiyonları hızlandırarak işlev görürken, enzimler sadece belirli bir kimyasal reaksiyonu katalize eder. Enzimler tarafından değiştirilen maddelere substratlar denir. Enzimlerin özgüllüğü, farklı maddeler arasında ve hatta bir bileşiğin optik izomerleri arasında ayırım yapmada yüksek seçiciliğe sahip olmalarını sağlar. Örneğin, D-glukoz fosforilasyonunu katalize eden bir enzim olan glukokinaz, L-glukoz üzerinde etkili olmaz [7].

Bütün enzimler protein yapılı olmasına rağmen kofaktör denilen protein yapılı olmayan bir bileşenin yokluğunda çoğu enzim katalitik aktivite gösteremezler. Bu durumda enzimin inaktif protein bileşenine **apoenzim**, kofaktör içeren aktif enzime **haloenzim** denmektedir. Kofaktör **koenzim** denilen organik bir molekül ya da metal iyonu olabilir. Bazı enzimler kofaktörlerine sıkıca bağlanır ki enzimlere zarar vermeden çıkarılması zordur. Böyle kofaktörlere **prostetik grup** denir [8]. Oksidoredüktazlar, transferazlar, izomerazlar ve ligazlar koenzimler gerektirir. Koenzimler aktif olarak reaksiyonlara dahil olurlar. Örneğin, oksidoredüktazlardaki koenzimler substrattaki hidrojenleri veya elektronları kabul ederek ya da elektronları substrata vererek görev alırlar. Transferazlar ise

reaksiyonda transfer edilen grubu kabul eden veya başışlayan koenzimlere sahiptir. Birçok koenzim, nükleotitlere benzeyen yapılar sunar. Ayrıca koenzimler bazı vitaminler gibi vücudun sentezleyemediği, diyetle dışarıdan alınması gereken bileşikler içerir. Örneğin B kompleks vitaminleri, koenzimler olarak işlev görür veya koenzimlerin yapısının bir parçasını oluşturur [7].



Şekil 2. 1 Holoenzim-Apoenzim Çiftinin Gösterimi [9]

2.2 Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler genellikle reaksiyona girdikleri substratın adına -az son ekini ekleyerek adlandırılır. Örneğin, amilaz, üreaz ve tirozinaz, sırasıyla nişasta, üre ve tirozin içeren reaksiyonları katalize eden enzimlerdir. Enzimler ayrıca, dehidrojenazlar ve dekarboksilazlar gibi farklı substratlardan hidrojen ve karboksil uzaklaştırılmasını katalize eden reaksiyon tipi ile de belirlenir. Bazı enzimlerin kendine has isimleri vardır; bunların arasında tükürük pitalin, mide pepsini ve pankreas tripsin ve kimotripsin vardır. İsimlerin farklı kriterlere göre kullanılması sonucu ortaya çıkan karışıklık, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'ni (IUBMB) bir sınıflandırma sistemi önermeye, her enzime tanımlayıcı bir isim ve kendine özgü bir tanımlamaya izin veren bir numara vermeye yöneltmiştir. Bu sınıflandırmada, katalizlenen reaksiyon tipine göre altı ana enzim sınıfı göz önünde bulundurulur. Her sınıf kendi alt sınıflarına ayrılır. Enzimi tanımlamak için kullanılan sayısal kod dört bileşenden oluşur: ilk sayı ana enzim sınıfına karşılık gelir, ikincisi alt sınıfı

belirtir, üçüncüsü alt sınıfı gösterir (bu sayılar, reaksiyonda yer alan atom gruplarının niteliği hesaba katılarak verilir), dördüncü sayı aynı üç rakama sahip enzimler arasında ki sırasını vermektedir. Uluslararası sınıflandırma 6 ana grubu içerir [7], [10], [11], [12].

2.2.1 Oksidoredüktazlar

Bu enzimler redoks reaksiyonlarını katalize eder. Dehidrojenazları, oksidazları, peroksidazları ve oksijenazları içerir.

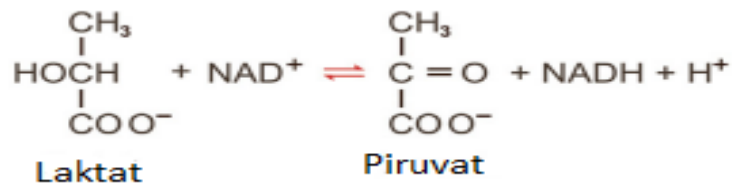
Dehidrojenazlar, substratlar olarak hidrojen vericisi ve alıcı olarak bir koenzim kullanır. Reaksiyona girdikleri substratın adı ve ardından dehidrojenaz kelimesi ile belirtilirler. Daha az sıklıkla, ters reaksiyon göz önüne alındığında, bunlara redüktaz denir.

Oksidazlar, hidrojen alıcısının moleküler oksijen (O₂) olduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

Peroksidazlar, bir substratı oksitlemek için H₂O₂ kullanan enzimlerdir, H₂O₂ H₂O'ye dönüştürülür.

Oksijenazlar, substrat olarak oksijen içerir.

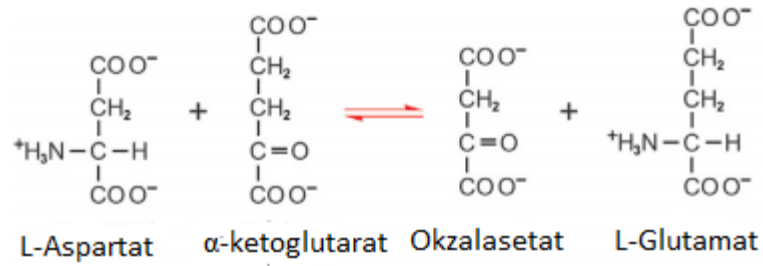
Bir oksidoredüktaz örneği, laktat dehidrojenazdır. Sistematik ismi L-laktat: NAD oksidoredüktaz. önerilen yaygın adı laktat dehidrojenaz ve kod numarası 1.1.1.27'dir. Bu enzim, laktatın piruvat'a oksidasyonunun yanı sıra ters reaksiyonu (piruvatın laktata indirgenmesi) katalize eder. Enzim, koenzim olarak nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) kullanır [7], [10], [11], [12].



Şekil 2. 2 Bir Oksidoredüktaz Enzimi Katalizi [7]

2.2.2 Transferazlar

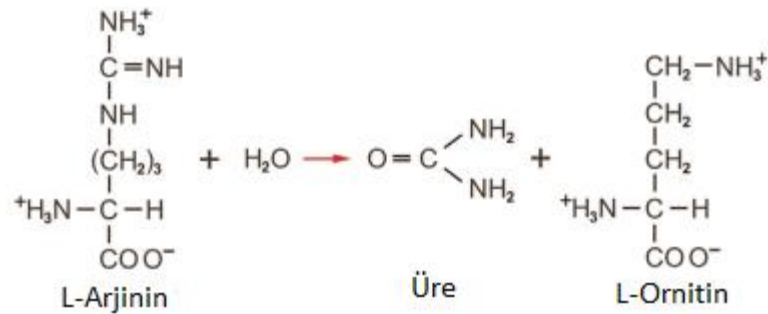
Transferazlar, bir amin, karboksil, karbonil, metil, asil, glikosil ve fosforil gibi bir atom grubunun bir donör substrattan bir alıcı bileşiğe transferini katalize eden enzimlerdir. Örnek olarak aspartat aminotransferaz verilebilir. (kod numarası, 2.6.1.1.). Aşağıdaki reaksiyonla bir amin grubunun bir bileşikten diğerine transferini katalize eden bir aminotransferaz veya transaminaz reaksiyonunu görebiliriz [7], [10], [11], [12].



Şekil 2. 3 Bir Transferaz Enzimi Katalizi [7]

2.2.3 Hidrolazlar

Hidrolazlar, C-O, C-N, C-S ve O-P bağlarının su ilavesiyle parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir. Örnek olarak, üre oluşturmak için arjinin hidrolizini katalize eden arjininaz veya l-arjinin amidino hidrolazdır (kod numarası, 3.5.3.1) [7], [10], [11], [12].

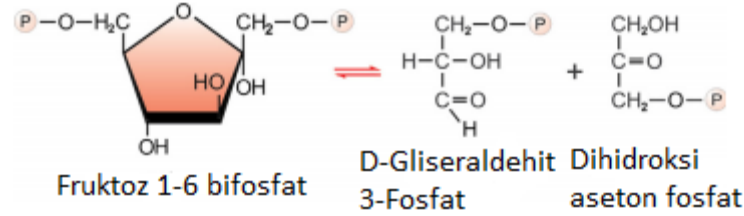


Şekil 2. 4 Bir Hidrolaz Enzimi Katalizi [7]

2.2.4 Liyazlar

Liyazlar, hidrolizden farklı bir işlemle bir substrattaki C-C, C-S ve C-N bağlarının (peptit bağları hariç) bölünmesini katalize eder. Çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değiştirmesiyle çift bağların oluşumunu katalize eder. Sırasıyla CO₂,

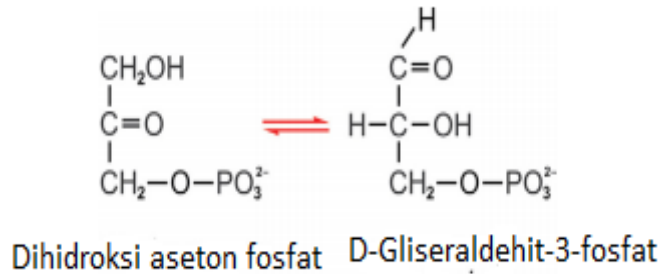
su veya aldehit çıkarıldıkları reaksiyonları katalize eden dekarboksilazlar, dehidratazlar, aldolazlar örnek verilebilir. Bir liyaz örneği olarak, fruktoz-1,6 bisfosfatı iki üçlü fosfat halinde bölen aldolazdır [7], [10], [11], [12].



Şekil 2. 5 Bir Liyaz Enzimi Katalizi [7]

2.2.5 İzomerazlar

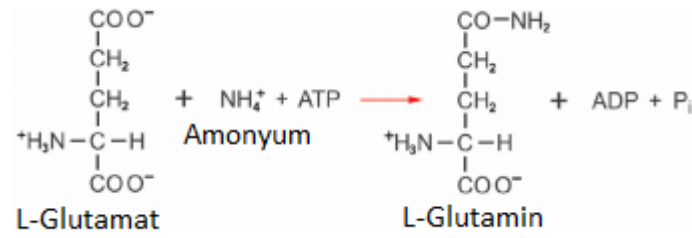
İzomerazlar, optik, geometrik veya konumsal izomerleri birbirine dönüştüren reaksiyonları katalizler. Bazılarının epimeraz racemaz, cis-trans izomerazları, sikloizomeraz ve tautomeraz gibi yaygın isimleri vardır. Aşağıdaki reaksiyonu katalize eden triosfosfat izomeraz veya digliseraldehit-3-fosfat ketol izomeraz (kod numarası, 5.3.1.1) örnek olarak verilebilir [7], [10], [11].



Şekil 2. 6 Bir İzomeraz Enzim Katalizi [7]

2.2.6 Ligazlar

Ligazlar, bir nükleosid trifosfatın yüksek enerjili bir bağının hidrolizine bağlı bir reaksiyonda iki molekülün bağlanmasını katalize eder. Reaksiyon sonucunda, C—C, C—S, C—O veya C—N bağları oluşturur. Bir örnek olarak, glutamin oluşturmak için glutamik asit ve amonyak kullanan reaksiyonu katalize eden glutamin sentetazdır. Sentez için gereken enerji ATP'nin hidrolizi ile sağlanır [7], [10], [11], [12].



Şekil 2. 7 Bir Ligaz Enzim Katalizi [7]

2.3 Enzimatik Kataliz

Enzimler reaksiyon hızını büyük ölçüde artırır ve herhangi bir katalizör gibi, net enerji değişimini veya reaksiyonun denge sabitini değiştirmezler. Reaksiyon boyunca, bir enzim aslında bir geçici kompleks oluşturan substratlara bağlanır. Bu bağlanma sırasında molekülün olası modifikasyonları geçicidir, bu da enzimin katalizin sonunda değişmediği anlamına gelir.

Eğer bir enzim E, substrat S'nin P ürününe dönüşümünü katalize ederse, enzim ve substrat daha sonra enzim ve ürüne ayrılan kompleks bir ES oluşturur.

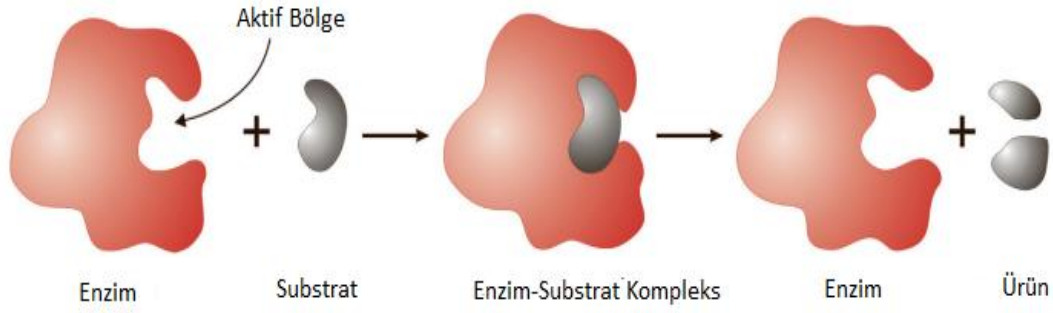


Şekil 2. 8 Enzim ile Substrat Reaksiyonu [7]

Başlangıçta teorik olarak önerilen ES kompleksinin oluşumu deneysel olarak ispatlanmıştır. Reaksiyon sırasında, enzim etkin bir şekilde substrata bağlanır. Son olarak, enzim değişmez ve tekrar başka bir substrat molekülüne bağlanabilir. Bu olay, niçin çok az miktarda enzimin reaksiyon hızını büyük ölçüde hızlandırdığını açıklar. Aynı molekül birçok kez tekrar kullanılır [7], [10], [11], [12].

2.4 Enzimlerin Aktif Bölgesi

ES kompleksini oluşturmak için, substrat enzim üzerinde tanımlanmış bir yere tutturulur. Molekülün bu bölgesi aktif bölge, aktif merkez, katalitik bölge veya substrat yeri isimlerini almıştır. Enzimin katalitik etkisinin gerçekleştiği yer burasıdır (Şekil 2.9).

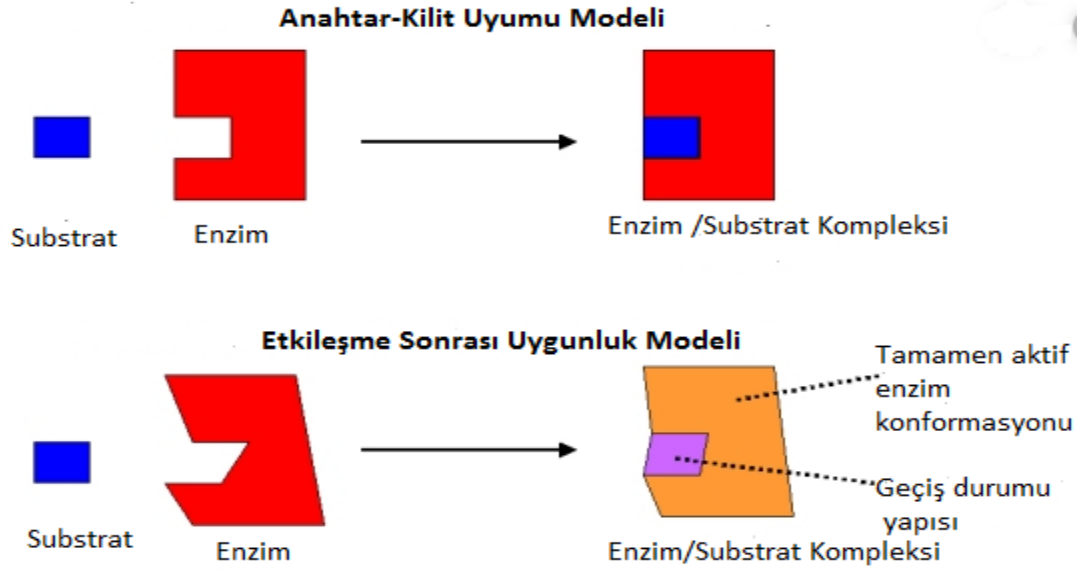


Şekil 2. 9 Enzimatik Reaksiyonun Şematik Gösterimi [7]

Aktif bölge bağlayıcı ve katalitik bölgelere sahiptir. Substrat, bağlayıcı bölgeye, substratta değiştirilecek olan yer tam olarak katalitik bölgeye yerleştirilecek şekilde yerleştirilir. Hem bağlama hem de katalitik hareketler, amino asit rezidülerinin yan zincirlerinin önemli bir rol oynadığı aktif bölge seviyesinde oldukça spesifik bir üç boyutlu konformasyon gerektirir. Substratın enzime bağlanması, hidrojen bağları, iyonik çekimler, hidrofobik bağlar ve van der Waals etkileşimleri gibi kovalent olmayan bağları içerir. Aktif bölgedeki kimyasal gruplar, substrattaki gruplar ile yüzleşecek ve etkileşime girecek şekilde yerleştirilmiş ve uygun pozisyonda sabitlenecek şekilde düzenlenmiştir. Reaksiyon boyunca, enzim ve substrat arasında geçici kovalent bağlar da oluşur.

19. yüzyılın sonlarında, E. Fischer bir anahtar ve kilidi arasındaki kesin uyumu karşılaştırarak enzim-substrat etkileşimini açıklamak için bir hipotez önerdi. Bu hipotez, doğru bir bağlanma için mükemmel bir yapısal tamamlayıcılık gerektirir. “Anahtar ve kilit” hipotezi, kesin özgülüğü olan enzimlerin etki mekanizmasını açıklamak için faydalıdır. Ancak model, moleküler yapı ve makromoleküllerin konformasyonunun mevcut bilgisi ile uyumlu olmayan bir rijide seviyesi gerektirir. Enzimde konformasyonel değişikliklere neden olan ve katalitik etkinliği artıran ajanlar vardır. Şu anda Koshland tarafından önerilen başka bir hipotez daha kabul görmektedir. Bu “etkileşme sonucu uygunluk” hipotezi, enzim yapısının rijit değil esnek olduğunu dikkate alan uyarılmış uyum kavramını ortaya koydu. Bu esnek model, enzimin substrat ile temas halindeyken konformasyonunu modifiye etmesine izin verir, buna adapte olur ve ES kompleksi oluşturmak için en uygun konformasyonu elde etmek için esansiyel rezidülerini yönlendirir. Sadece uygun

bir substrat, kataliz için gerekli olan kesin konformasyonel değişikliğini tetikleyebilir. Substrat enzime bağlandığında, molekülde yapısal değişiklikler meydana getirir; ancak o zaman en etkili yeri sağlamak için kritik fonksiyonel gruplar yeniden düzenlenir [7], [10], [11], [12], [13].



Şekil 2. 10 Enzim Katalizinde ki Anahtar-Kilit Uyumu Modeli ve Etkileşme Sonrası Uygunluk Modeli [14]

2.5 Enzim Stabilizasyonu

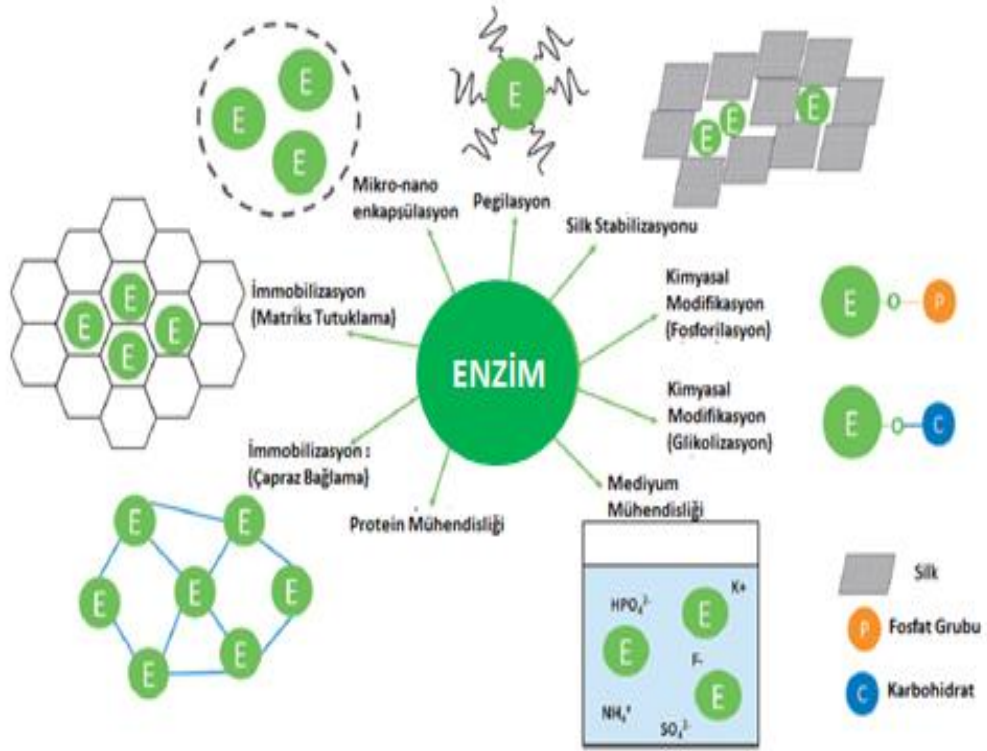
Enzimlerin başlıca uygulamaları deterjanlar, gıda işleme, hayvan beslenmesi, meyve suyu ve aromalar, kozmetikler, ilaçlar, farmasötikler, deri, ipek, kimyasal ve araştırma ve geliştirme amaçlıdır. Endüstriyel uygulamalar enzimlerin sıcaklık, aşırı pH ve alkaliler, asitler, tuzlar ve yüzey aktif cisimleri varlığında stabilize olmuşsa uygulanabilir [15]. Enzimlerin stabilitesi sıcaklık, muamele ve solventlerle etkileşim gibi ortamlarda azalmaktadır [16]. Enzimler üretimde, saklama ve uygulama sırasında çeşitli denatürasyon reaksiyonlarına maruz kalırlar. Protein denatürasyonu, amino asit dizilimi değişmeden üç boyutlu yapısında meydana gelen büyük veya küçük değişimlerdir. Eğer denatüre edici etki gideriliyorsa, enzim denatürasyonu tersine çevrilebilir. Kararlı ve aktif enzimlerin elde edilmesi genellikle zorlu bir çabadır çünkü endüstriyel ortamlarda kullanılmak üzere doğal olarak evrimleşmemişlerdir. Enzimlerin biyolojik aktivitesi, üç boyutlu doğal yapıya dolayısıyla katalitik olarak aktif bir enzimin herhangi bir önemli

konformasyonel değişikliği onların inaktivasyonuna neden olabilir. Enzimlerin instabilitesi agregasyon, biyolojik fonksiyonlarının azalması, ve ekstrem koşullar ya da pH ve sıcaklıkta meydana gelen küçük değişimlerin ani konformasyon değişiklerine ve ardından biyolojik aktive kayıplarına neden olmasından kaynaklanır. Değerli ürünlerin üretilmesi için bir dizi enzim bazlı işlem gerçekleştirilmiştir, ancak büyük potansiyellerine rağmen istenmeyen stabilite, katalitik verimlilik ve düşük spesifikklik nedeniyle engellenmiştir. Bu nedenle, enzim stabilizasyonu için metodolojilerin kullanımı, biyoteknolojideki ilerleme ve potansiyel protein modellerinin keşfi için zorunludur [15], [17], [18].

Tablo 2. 1 Denatürasyondan Sorumlu Çeşitli Fiziksel ve Biyolojik Ajanların İlgili Hedef Bölgelere Etkisi ve Enzimler Üzerindeki İlgili Etkileri [15]

Denatürasyon Tipi	Protein Hedefi	Denatürasyon Ürünü
Sıcak	Hidrojen Bağları	Agregatlar
Soğuk	Hidrofobik bağlar; Çözünen Gruplar	Agregatlar İnaktif Monomerler
Mekanik kuvvet	Çözünen Gruplar	Yüksek Düzensiz Yapılar; İnaktif Monomerler
Radyasyon	Fonksiyonel Gruplar; Sistein, Peptit Bağları	Yüksek Düzensiz Yapı
Proteazlar	Peptit Bağları	Oligopeptit; Amino Asitler

Protein moleküllerinin stabilizasyonu, bu değişimin önlenmesi ve proteinlerin doğal yapısının değişmeden korunması anlamına gelir [19]. Enzim stabilizasyonu yüksek stabiliteye sahip enzimlerin üretilmesi, protein mühendisliği, enzimlerin kimyasal olarak modifiye edilmesi, mikro-nano enkapsülasyon, immobilizasyon ve stabilite edici katkı maddelerinin eklenmesidir [10].



Şekil 2. 11 Farklı Enzim Stabilizasyon Metotlarının Şematik Gösterimi [15]

2.5.1 Enzim Stabilizasyon Teknikleri

2.5.1.1 Ekstremofillerden Enzimlerin Taranması ve İzolasyonu

Ekstremofiller, çeşitli ekstrem ortamlarda var olan ve termofiller, asitofiller, alkalofiller, psikrofiller ve barofiller (piezofiller) ve diğerlerini içeren çeşitli sınıflardaki organizmalardır.

Bu organizmalar yüksek ve düşük sıcaklıklarda (5 ila 130 °C), aşırı pH'da (0-12), yüksek tuz konsantrasyonlarında (% 3-35) ve yüksek basınçta (1000 bar) yaşayabilirler. Bu mikroorganizmalar, mezofilik türevlerinin hayatta kalamadıkları koşullar altında, endüstriyel işlemlerin gelişmesine izin veren benzersiz biyokatalizörler üretir. Bu enzimler, mikroorganizmaların ya optimize edilmiş fermentasyonu ya da rekombinant DNA teknolojisi ile hızlı büyüyen mezofillerin klonlanması yoluyla termofillerden üretilebilir. Bu enzim sınıfları içinde:

esterazlar/lipazlar, glikozidazlar, aldolazlar, nitrilazlar/ amidazlar, fosfatazlar ve rasemazlar bulunur [15], [20], [21].

2.5.1.2 Enzim Mühendisliği

Protein mühendisliği, genellikle protein genlerinin kullanılıp, yeni proteinlerin tasarımı ve yapımıdır. Rasyonel protein tasarımı, enzim özelliklerinin değişmesi sebebiyle, enzim uygulamalarındaki kısıtlamaları karşılamasını sağlar [22]. Rasyonel tasarım, istenen özellikleri değiştirmek veya uyarmak amacıyla protein yapısındaki değişikliklerin öngörülmesi için moleküler modelleme ile birlikte yapısal ve mekanik bilgileri kullanır. Bilgisayar teknolojisindeki gelişmeler, rasyonel tasarım tahminlerini geliştirmek için daha iyi protein modelleri oluşturmaya yardımcı olmuştur. Genomik, proteomik ve bilişim alanındaki gelişmeler, büyük miktarda biyolojik veriden yararlanmak için yeni fırsatlar yaratmaktadır [15], [23], [24].

2.5.1.3 Enzimlerin Fonksiyonlaştırılması

Kovalent kimyasal modifikasyon, bölgeye yönelik mutajenez ve hedef enzimin doğrudan gelişimi için güçlü bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Amino asit yan zincirlerinin kimyasal modifikasyonu daha büyük, neredeyse sınırsız, çeşitli grupların eklenmesine izin verir, fakat girişleri için kullanılan reaksiyonlar tipik olarak doğada spesifik değildir [25].

Glutaraldehit çapraz bağlanması ve enzim yüzeyinin pegilasyonu, biyokatalizör kararlılığını arttırmak için stratejilerden biridir. Bu teknoloji, enzim mikro kristallerinin glutaraldehit gibi bifonksiyonel reaktiflerle çapraz bağlanmasını içerir [26].

Pegilasyon, toksik ve immünojenik olmayan bir polimer olan, bir veya daha fazla metoksi polietilen glikol zincirinin bağlanmasıyla bir protein veya peptidin modifikasyonu ile karakterize edilen yaygın olarak kullanılan bir stratejidir. Pegilasyon biyomolekülün konformasyonu, elektrostatik bağlanması, boyudu ve hidrofobikliği gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirir, enzimlerin katalitik davranışlarını ve sulu ortamdaki kararlılıklarını iyileştirir. mPEG'nin su moleküllerini koordine etme kabiliyetinden kaynaklanan PEG-enzim konjugatının

büyük ölçüde genişletilmiş hidrodinamik hacmi bu değişikliklerden sorumlu olabilir [27], [28].

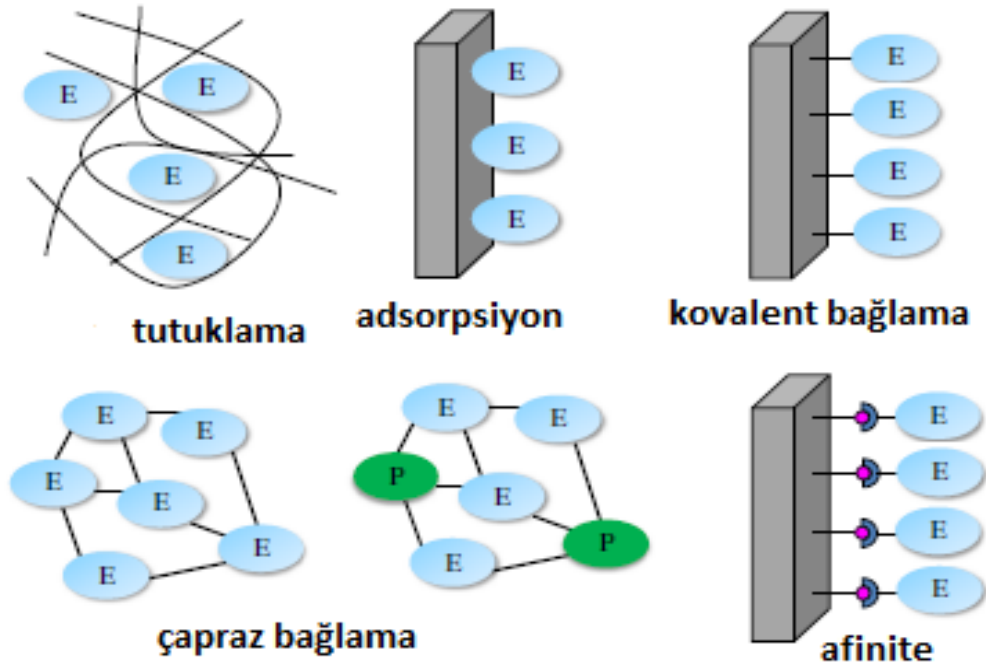
2.5.1.4 Enzim İmmobilizasyonu

Enzim İmmobilizasyonu, heterojen immobilize edilmiş bir enzim sistemi yaratarak enzimlerin katı desteklere ya da katı desteklerin içine sabitlendiği teknik bir işlemdir. Katı destek, enzim aktivitesini koruyarak enzim yapısını stabilize eder. Destek bağlayıcılar, zayıf veya kovalent bağları içeren fiziksel veya kimyasal olabilir. Fiziksel bağlanma zayıftır ve endüstriyel koşullar altında enzimi taşıyıcıya sabit tutabilmesi zordur. Bu destek bağlayıcılar sentetik bir reçine, zeolit veya silika gibi inorganik bir polimer veya bir biyopolimer olabilir [29].

Katı taşıyıcılara enzim immobilizasyonu, biyokatalizörlerin operasyonel stabilitesini, daha iyi çalışma kontrolünü, katalizör kontaminasyonu olmadan kolay ürün geri kazanımını ve reaktör tasarımının esnekliğini artırmak için belki de en çok kullanılan stratejidir. Ayrıca reaksiyon ürünleri tarafından inhibisyonu azaltması, doğal olmayan substratlara karşı seçiciliği, çözülebilir enzimlere kıyasla daha iyi fonksiyonel özellik göstermesi, bunların hepsi immobilizasyonu, enzim stabilizasyonuna geliştirmesi yönünden en çok tercih edilen yöntem yapar. Termal stabilite genellikle, sert bir desteğe tutturma ve korumalı bir mikro-ortamın yaratılmasıyla ortaya çıkan moleküler sertlikten kaynaklanır [30].

Belirli bir enzim için en ideal immobilizasyon prosedürü, zaman içinde yüksek katalitik aktiviteyi korurken, enzimin yüksek turnover sayısına ulaşmasını sağlayan prosedürdür [15].

Başlıca immobilizasyon yöntemleri; adsorpsiyon, kovalent bağlama, tutuklama, çapraz bağlama, afinite. Bazı durumlarda enzim immobilizasyonu protokolleri birkaç immobilizasyon kombinasyonuna dayanmaktadır. Örneğin enzimin gözenekli polimere daha iyi tutuklanması için boncuklara kovalent, adsorpsiyon ve afinite yöntemiyle ön immobilizasyonu yapılır [31], [15].



Şekil 2. 12 İmmobilizasyon Yöntemleri [31]

2.5.1.5 Polioller,Şekerler ve Tuz İlavesi

Poliollerin ve şekerlerin sulu protein çözeltilerine eklenmesi, polar olmayan amino asit kalıntıları arasındaki hidrofobik etkileşimlerin güçlendirilmesini teşvik eder, protein sertleşmesine ve termostabilitenin artırılmasına neden olur. Ayrıca, poliollerin suyun aktivitesi üzerindeki etkisinin, dengeleme etkilerini yönettiği görülmektedir [32].

Genel olarak enzimler, konsantrasyonlarını ve ortamın iyonik kuvvetlerini artırarak stabilize edilir. Nötr tuzlar su için enzimler ile yarışır ve yüklü gruplara veya dipollere bağlanır. Bu, enzimin hidrofobik alanları arasındaki etkileşimlerin güçlendirilmesine ve enzim moleküllerinin termal açılma reaksiyonlarına karşı daha dirençli hale gelmelerine ve sıkışmalarına neden olabilir. Tüm tuzlar hidrofobik etkileşimlerin stabilizasyonunda eşit derecede etkili değildir, bazıları bunlara bağlanarak ve suyun lokalize yapısını (kaotropik etki) bozarak enzim destabilizasyonunda çok daha etkilidir [15].

2.5.1.6 Enzim Enkapsülasyonu

Enzimlerin kapsüllemesi, bir polimer ağındaki (jel kafesi), bir silika sol-jelindeki, bir membran yapısındaki ya da bir mikrokapsül içindeki tutma işlemidir. Tutma,

kapsüllenecek enzim varlığında polimerik bir ağın sentezini gerektirir[33]. Nanopartiküller, enzim immobilizasyon taşıyıcıları olarak kullanılmıştır. Enzimler küreler, fiberler ve tüpler şeklinde nanoboyuttaki iskelelerin üzerine immobilize edilir. Genel olarak, nanopartiküller, minimize edilmiş difüzyon sınırlamaları, birim kütle başına maksimum yüzey alanı ve yüksek enzim yükleme kabiliyeti nedeniyle enzim immobilizasyonu için ideal bir destek olarak kabul edilir [34].

Enzim immobilizasyonu için en çok çalışılan konulardan biri silika matrislerinde kapsüllemidir.

Enzimlerin lipozomlar halinde kapsüllemesi denatürasyonu stabilize etmek ve önlemek için umut verici bir stratejidir. Lipid membran geçirgenliğini kontrol ederek, substratın geçirgenliğini artıran lipozomların geçirgenliğini kontrol etmek mümkündür [15].

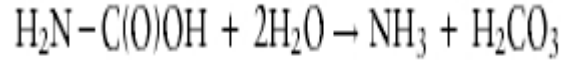
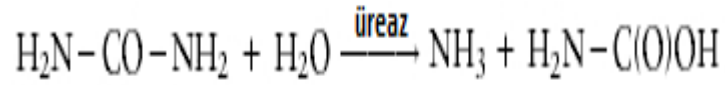
2.6 Üreaz (Üre Amidohidrolaz: EC 3.5.1.5)

Üreaz bir hidrolaz sınıfı enzimdir. 1926 yılında Sumner tarafından soya fasulyesinden kristal halde ekstrakte edildi. Bu olay enzimoloji tarihinin en önemli olayıdır. Çünkü ilk kez bir enzim saf halde ekstrakte edildi ve enzimlerin protein yapısında olduğu açıkça anlaşıldı. Ayrıca Sumner bu buluşuyla 1946 yılında kimya dalında Nobel Ödülünü kazanmıştır. [35].

Üreaz bakteri, mantar, maya ve bitkiler tarafından üretilir. Bu organizmalarda üre parçalanmasını katalize ederek bu organizmalara büyüme için bir azot kaynağı sağlar. En sık araştırılan bakteriyel üreazlardan biri, *Helicobacter pylori*', peptik ülserleri ve mide kanserini işaret etmektedir. Bitkilerde üreaz, baklagil tohumlarında yaygın olarak bulunur ve tohum çimlenmesinde önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir. Bitki üreazlarının ayrıca tohum kimyasal savunmasına katılmaları öngörülmektedir. Ayrıca bakterilerde normal flora ve patojen olmayanları içeren birçok sınıfta çeşitli bakteri türleri tarafından üretilir. Üreolitik özelliklere sahip mikroorganizmalar, insan ve hayvan vücutlarında olduğu gibi toprakta ve suda da bulunur. Üreolitik bakteriler simbiyotik doğal mikroflora veya patojenlere ait olabilir [36]. Ayrıca, üreazın *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus* ve *Helicobacter pylori* gibi bazı türler için güçlü bir

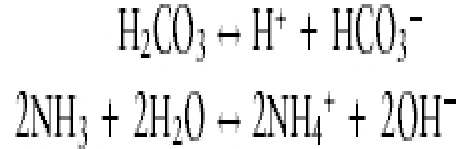
virölans faktörü olduğu gösterilmiştir. Üreaz *H. pylori* metabolizması ve virölansının merkezinde yer alır, mide mukozasını kolonileştirmesi için gereklidir ve güçlü bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkaran güçlü bir immünojendir. Bu enzim taksonomik tanımlama ve tedaviden sonra tanı ve takip için kullanılır ve bir aşı adayıdır. Şimdi, bu kayda değer proteinin kaynağının, insanların mide mukozasını kolonize eden *H. pylori* olduğu bilinmektedir.

Üreaz, ürenin amonyak ve karbamat verecek şekilde hidrolize eder. Son ürün kendiliğinden amonyak ve karbonik asit verecek şekilde ayrışır [37].



Şekil 2. 13 Ürenin Karbamat ve Amonyağa Dönüşüm Reaksiyonu [37]

Sulu çözeltilerde salınan karbonik asit ve iki amonyak molekülü sırasıyla deprotonlanmış ve protonlanmış formlarıyla denge halindedir.



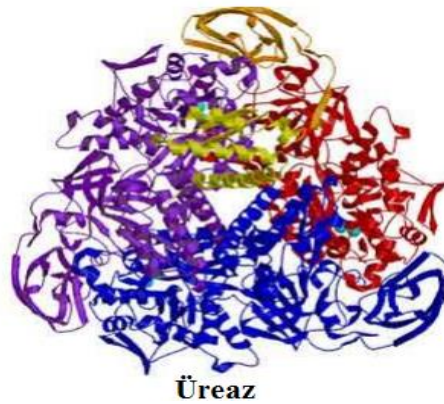
Şekil 2. 14 Karbonik asit ve Amonyağın Denge Reaksiyonu [37]

Saflaştırılmış *H. pylori* üreazın kinetik parametreleri, 23 ° C'de 0 ila 5 mM'lik bir üre konsantrasyonları aralığında ölçülen hidroliz oranları kullanılarak hesaplanmıştır; Km 0,17 ila 0,48 mM arasında değişmekteydi [37].

Üreaz yapıları, alt birimlerinin yapıları ve sayıları, moleküler ağırlıkları ve amino asit dizileri çeşitli kaynaklardan eldesine göre değişir. Üreaz, hidrolitik özelliklerinin elde edilmesi için birkaç ek proteinin aktivitesini gerektiren nikel içeren bir enzimdir.

Bakteriyel üreazlar daima iki veya üç farklı polipeptitten oluşan multimerik enzimlerdir. *P. mirabilis*'te üç yapısal alt birim: 11 kDa UreA (γ alt birim), 12.2 kDa ÜreB (β alt birim) ve 61 kDa ÜreC (α alt birim) bulunmaktadır. Bu polipeptitler, üç yapısal gen tarafından kodlanır: sırasıyla ureA, ureB ve ureC. Helikobakter üreazı özgün olarak farklı bir yapıda bulunur. *H. pylori* üreaz sadece iki alt birimden oluşur: ureA ve ureB genleri tarafından kodlanan 26.5 kDa ÜreA (α altbirim) ve 61.7 kDa ÜreB (β alt birim). İki metal iyonlu aktif üreazın merkezi, yapısal alt birimlerin en büyüğünde bulunur. Üreaz nikel içeren enzim olmasına rağmen mikraerofilik *Helicobacter mustelae* üreazında bir demir açığa çıkarıldı. Mantar ve bitki üreazlarının alt birimlerinin proteinleri homo-heksamerik yapıda iken, bakteriyel üreazların iki veya üç alt birimli kompleksleri multimer yapıdadır [36]. Üreaz monomer olarak aktiftir ve genellikle multimerik yapı içerisinde trimer veya heksamer olarak bulunur [35].

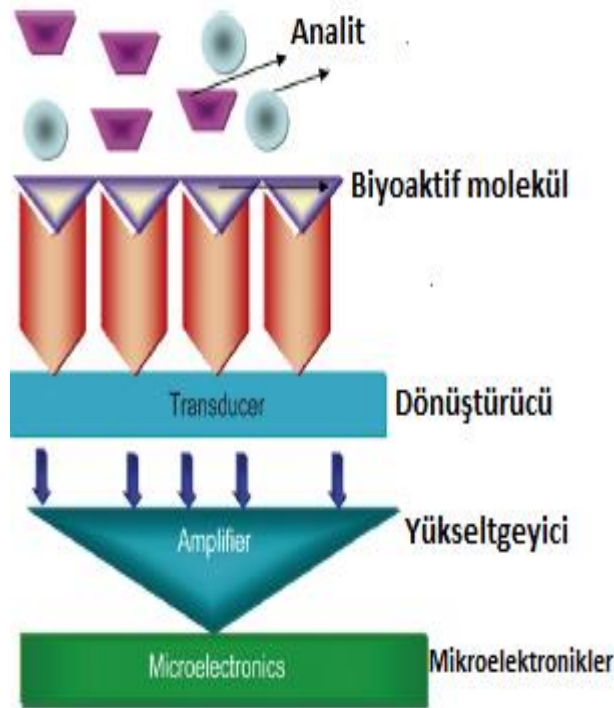
Bitki ve fungal üreazlar 90-kDa ağırlığında aynı alt birimli homo-oligomerik proteinleridir. Bakteriyel ve bitki üreazları, benzer üç boyutlu yapılara ve korunmuş bir katalitik mekanizmaya sahip oldukları öne sürülerek, yüksek sekans benzerliğine sahiptir. Bitki üreazları, α , β ve γ olarak belirtilen iki ya da üç polipeptitten oluşan bakteriyel üreazların aksine tek zincirli polipeptitten oluşur. Bitki üreazı olan Jack bean üreazı 840 amino asit rezidüzü içerir, molekül ağırlığı ise 90 kDa'dır. Jack bean üreazın katalitik bölgesi, birbirinde $3.7 \text{ \AA}$ uzaklıkla ayrılmış Ni1 ne Ni2 şeklinde bi nikel merkezi içeren bakteri üreazlarına çok benzerdir [38].



Şekil 2. 15 *Helicobacter pylori* Üreaz Enziminin Yapısı [35]

3.1 Genel Olarak Biyosensörler

Biyosensörler immobilize edilmiş biyolojik aktif bileşiğin biyokimyasal sinyalini ölçülebilir elektriksel sinyale dönüştüren uygun bir dönüştürücülerle bağlanmasıyla oluşturulan analitik cihazlardır. Biyokomponentler nükleik asitler (DNA, RNA), enzimler, mikroorganizmalar, antikorlar, dokular, hücre reseptörleridir. Dönüştürücü sistemleri ise elektrokimyasal, termometrik, optik, piezoelektrik ve manyetiktir. [39], [40], [41].



Şekil 3. 1 Biyosensörün Şematik Gösterimi [41]

Dönüştürücüler biyokimyasal sinyal ölçülebilir sinyale dönüştürürler. **Amperometrik dönüştürücüler**, elektrokimyasal reaksiyonun bir sonucu olarak sabit bir potansiyelde bir elektrot boyunca akım boşalmasını tespit ederken, potansiyometrik **dönüştürücüler**, elektrot membranının belirli iyonlarla temas ettikçe, membran boyunca potansiyelindeki değişikliği tespit eder. **Termometrik**

dönüştürücüler, biyokimyasal reaksiyon ile oluşan sıcaklık değişimini tespit ederlerken **piezoelektrik** ve **yüzeysel ses dalgası (SAW)** moleküllerin kuvars kristallerinin yüzeyinden adsorpsiyonu veya desorpsiyonundan sonra salınım frekansındaki değişimi tespit eder. **Optik dönüştürücüler**, reaktifler veya biyolojik sistemin ürünleri tarafından emilen veya yayılan elektromanyetik radyasyonları ölçer. **Alan etkisi transistörleri (FETs)**, katı hal elektroniğinin iyon seçici elektrotlarla (ISE) bir araya gelmesi ve ISE'de akım boşaltmadan biriken yükün izlenmesidir [40].

Tablo 3. 1 Biyosensör Bileşenleri [42]

Analit (Örnek)	Biyobileşen (Reseptör)	Sinyali İleten Sistem
Metaller		Elektrokimyasal Esaslı
Hormonlar	Enzimler	Elektrokimyasal Esaslı
Enzim	Antikorlar	Yarı iletken Esaslı
Koenzimler	Hücre	Optik Esaslı
Substrat	Doku Kesitleri	Fotometri Esaslı
Aktivatör	Reseptörler	Flüorometri Esaslı
İnhibitör	Mikroorganizmalar	Flüorometri Esaslı
Antikor-Antijen	Nükleik Asitler	Piezoelektrik Esaslı
Nükleik Asit	Lipitler	Kuartz Kristal Mikrobals
Mikroorganizmalar	Hücre Organelleri	Mikrokantil everlar
Glikoz	Glikoz Oksidaz	Amperometrik
L-Aminoasitler	Horseradish Peroksidaz	Potansiyometrik
Herbist	Antibadiler	Piezoelektrik kuartz kristal

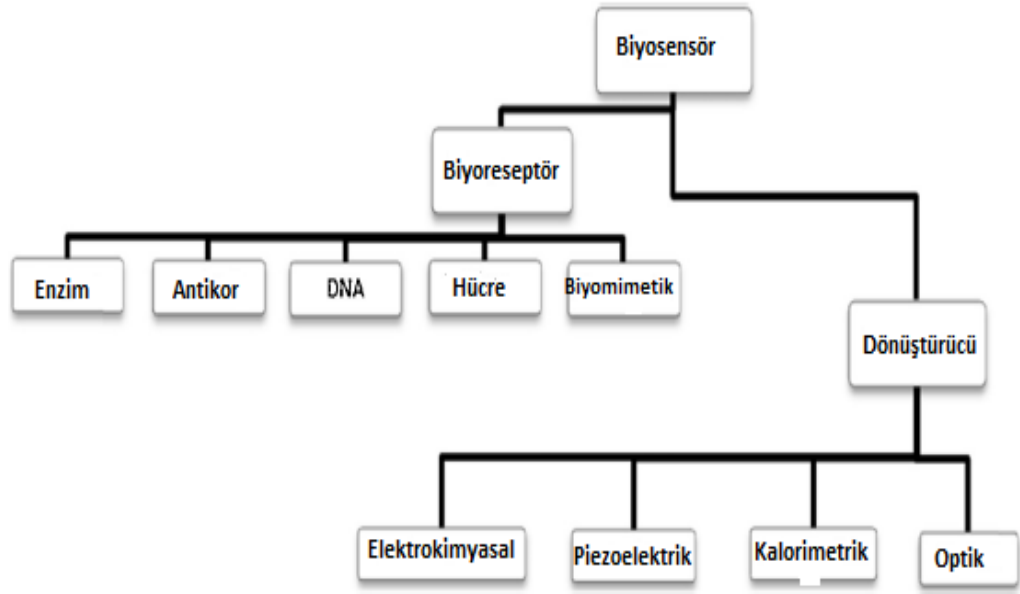
Biyokomponentler, analite karşı önemli derece spesifik olan biyomoleküllerdir. En çok kullanılan biyokomponentler enzim ve antikorlardır [10].

İlk enzim bazlı sensör 1967'de Updike ve Hicks tarafından üretildi. Enzim biyosensörleri, immobilizasyon yöntemleri vasıtasıyla yani enzimlerin van der Waals kuvvetleri, iyonik bağlanma veya kovalent bağlanma ile adsorbe edilmesi üzerine tasarlanmıştır. Bu amaç için yaygın olarak kullanılan enzimler; oksidoredüktazlar, polifenol oksidazlar, peroksidazlar ve aminooksidazlardır [43].

İlk mikrop bazlı veya hücre bazlı sensör Diviès tarafından gerçekleştirildi [44]. Doku bazlı sensörler için dokular, bitki ve hayvan kaynaklarından elde edilir. Rechnitz, amino asit arginininin belirlenmesi için ilk doku bazlı sensörü geliştirmiştir. Organel bazlı sensörler membranlar, kloroplastlar, mitokondri ve mikrozomlar kullanılarak yapılmıştır. Bununla birlikte, bu tip biyosensörlerin stabilitesi yüksek olmasına rağmen, tespit süreleri daha uzundur ve spesifiklikleri daha azdır.

Antikorların kendi antijenlerine karşı yüksek afiniteye sahip olduğu, yani antikorların spesifik olarak patojenlere veya toksinlere bağlandığı veya konakçının bağışıklık sisteminin bileşenleri ile etkileşime girdiği gerçeği üzerine immünosensörler tasarlanmıştır [45].

DNA biyosensörleri, bir numunede tek zincirli nükleik asit molekülünün tamamlayıcı zincirini tanıyabilmesi ve bağlayabilmesi özelliği üzerine geliştirilmiştir. Etkileşim, iki nükleik asit zinciri arasında stabil hidrojen bağlarının oluşmasından kaynaklanmaktadır [46].



Şekil 3. 2 Biyosensörün Sınıflandırılması [47]

Başarılı bir biyosensörün oluşturulması, biyolojik durumun prensibine ve uygun dönüştürücüyle bir araya gelmesine bağlıdır [40].

Basitlikleri, yüksek hassasiyetleri, gerçek zamanlı ve yerinde analizleri için biyosensörler endüstriyel prosesler, klinik tespit ve çevresel kontrol dahil olmak üzere çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca biyosensörler, günümüzde çeşitli biyomoleküller (enzim, antikor, doku, hücre) kullanılarak klinik teşhis, gıda teknolojisi, askeri, endüstriyel, biyomedikal ve çevresel izleme gibi uygulamalar için kapsamlı araştırmalara konu olmaktadır [41], [47].

3.1.1 Elektrokimyasal Biyosensörler

Bir elektrokimyasal biyosensör, bir elektrokimyasal transdüserle sahip bir biyosensördür. Bu biyosensörler potansiyometrik, amperometrik, konduktometrik, impedimetrik ve alan etki biyosensörleridir [48], [49]. En çok çalışılan teknik amperometriktir onu potansiyometrik biyosensörler izler [50].

Reaksiyonlar genellikle sadece elektrot yüzeyine yakın bir yerde ölçüldüğünden, elektrotların kendileri elektrokimyasal biyosensörlerin performansında önemli bir rol oynamaktadır. Belirli bir elektrotun seçilen işlevine dayanarak, elektrot materyali, yüzey modifikasyonu veya boyutları elektrodun tayin özelliğini büyük

ölçüde etkiler. Elektrokimyasal algılama, genellikle algılama veya redoks elektrotu olarak da bilinen bir referans elektrot, bir karşı veya yardımcı elektrot ve çalışan bir elektrot gerektirir. Yaygın olarak Ag / AgCl'den yapılan referans elektrot, bilinen ve kararlı bir potansiyeli korumak için reaksiyon bölgesinden belli bir mesafede tutulur. Çalışma elektrotu biyokimyasal reaksiyonda dönüştürücü elemanı olarak hizmet ederken, karşı elektrot elektrolitik çözeltiye bir bağlantı kurar, böylece çalışma elektroduna bir akım uygulanabilir. Bu elektrotlar hem iletken hem de kimyasal olarak kararlı olmalıdır. Bu nedenle, analite bağlı olarak platin, altın, karbon (örneğin grafit) ve silikon bileşikleri yaygın olarak kullanılmaktadır [48].

3.1.1.1 Amperometrik Biyosensörler

Amperometri, bir elektroaktif türün elektrokimyasal oksidasyon veya indirgenmesinden kaynaklanan akımın ölçülmesine dayanır [49]. Elektrokimyasal kurulum sıklıkla altın, platin, camsi karbon, grafit veya karbon macunu gibi bir çalışma elektrodundan, Ag / AgCl gibi bir referans elektrottan ve genellikle karbon veya platinden yapılan bir yardımcı elektrottan oluşur [50].

Amperometri, basitliği ve hassasiyeti nedeniyle biyosensörlerde muhtemelen en yaygın tespit yöntemidir. Biyolojik element doğrudan elektrot üzerinde immobilize edilebilir ve genellikle de bir enzimdir. Enzimatik reaksiyon sırasında, enzim tarafından bir elektrokimyasal olarak aktif tür üretilebilir veya tüketilebilir ve bu türler elektrotta oksitlenebilir veya indirgenebilir. İdeal durumda, ölçülen akım, analit konsantrasyonuyla doğrudan orantılıdır [50].

Clark oksijen elektrotları belki de bir akımın oksijen konsantrasyonuyla orantılı olarak üretildiği en basit amperometrik biyosensör formları için temeli temsil eder. Bu, belirli bir potansiyelde bir Ag / AgCl referans elektrodundaki referansla platin çalışma elektrottaki oksijenin azaltılmasıyla ölçülür. Tipik olarak, akım sabit bir potansiyelde ölçülür ve buna amperometri denir. Potansiyelin kontrollü değişimleri sırasında bir akım ölçülürse, buna voltametri denir [48].

Daha yeni biyosensörlerde elektron transferi için mediatörler veya aktif merkezden elektroda doğrudan elektron transferi olan enzimler kullanılır [50].

3.1.1.2 Potansiyometrik Biyosensörler

Potansiyometrik cihazlar, bir elektrokimyasal hücredeki referans elektrot ile karşılaştırıldığında, çalışma elektrotunda şarj potansiyelinin birikmesini, aralarında sıfır veya hiç önemli bir akım olmadığında ölçer. Başka bir deyişle, potansiyometri, bir elektrokimyasal reaksiyondaki iyon aktivitesi hakkında bilgi sağlar [48].

En yaygın potansiyometrik cihazlar pH elektrotlarıdır; diğer birçok iyon (F^- , I^- , CN^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , NH_4^+) veya gaz (CO_2 , NH_3) seçici elektrotlar mevcuttur [49].

İyon seçici elektrotlar (ISE'ler) potansiyometrik ölçümlere dayanır ve temel olarak enzim bazlı biyosensörler için kullanılabilir. Örneğin enzim aktivitesine bağlı olarak pH'deki değişim, pH'ye duyarlı bir ISE ile kolayca izlenebilir. Bir iyon seçici membran boyunca gelişen potansiyel ölçülür [50].

Potansiyometrik ölçümler için, konsantrasyon ile potansiyel arasındaki ilişki, E_{cell} 'in sıfır akımda gözlenen hücre potansiyelini temsil ettiği Nernst denklemi tarafından yönetilir. Bu bazen elektromotiv kuvveti veya EMF olarak da ifade edilir. E^0_{cell} hücreye sabit bir potansiyel katar, R evrensel gaz sabiti, T derece Kelvin cinsinden mutlak sıcaklık, n elektrot reaksiyonunun yük sayısıdır, F Faraday sabitidir, Q anottaki iyon konsantrasyonunun katottaki iyon konsantrasyonuna oranıdır [48].

$$EMF \text{ or } E_{cell} = E^0_{cell} - \frac{RT}{nF} \ln Q$$

Şekil 3. 3 NERST Eşitliği [48]

Potansiyometrik dedektöre bitişik bir biyokatalizör katmanı yerleştirildiğinde, herhangi bir biyokatalizör sensöründe olduğu gibi şunlar göz önünde bulundurulmalıdır. (1) analiz edilecek olan substratın biyosensör yüzeyine taşınması (2) reaksiyon tabakasına analitin difüzyonu (3) biyokatalizör mevcudiyetinde analit reaksiyonu ve (4) reaksiyon ürününün hem detektöre hem de bulk çözeltiye doğru difüzyonu [49].

3.1.1.3 Konduktometrik Biyosensörler

Üreazdaki gibi birçok enzim reaksiyonu ve birçok biyolojik membran reseptörü birleştirilmiş mikroelektrotlar kullanılarak iyon iletkenlik veya impedimetrik cihazlarla izlenebilir [49]. Konduktometri, bir analitin (örneğin elektrolit çözeltileri) veya bir ortamın (örneğin nanotellerin) elektrotlar veya referans devreleri arasında bir elektrik akımı iletme kabiliyetini ölçmektedir. Çoğu durumda, konduktometrik biyosensörler, enzimatik bir reaksiyonun bir sonucu olarak iyonik kuvveti ve dolayısıyla iki elektrot arasındaki bir çözeltinin iletkenliğini değiştiren enzimlerle güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Böylece, iletken bir çözeltide yüklü türlerin konsantrasyonunda değişiklik üreten enzimatik reaksiyonları incelemek için konduktometrik cihazlar kullanılabilir. Klinik örneklerin değişken iyonik arka planı ve yüksek iyonik kuvvetli ortamlardaki küçük iletkenlik değişikliklerini ölçme gereksinimi, bu tür enzim bazlı iletken cihazların biyoalgılayıcı için uygulanabilirliğini sınırlar. Diğer bir yaklaşım, enzimlerin ya da antikor-antijen çiftinin immobilizasyonu sonucu bir elektrotun iletkenliğindeki değişiklikleri doğrudan izlemektir [48].

3.1.1.4 Yüzey Alan Dönüştürücüleri (Field Effect Transistörleri)

FET, yarı iletken bir malzemedeki iki elektrot arasındaki kanalın iletkenliğini kontrol etmek için bir elektrik alanı kullanan bir transistör türüdür. İletkenliğin kontrolü, kaynak ve boşaltma elektroduna göre elektrik alan potansiyelinin gate olarak bilinen üçüncü bir elektrotta değiştirilmesiyle gerçekleştirilir [48].

İyon konsantrasyonlarını belirlemek için kullanılan sistemlerin önemli bir varyasyonu, iyona duyarlı alan etkili transistörlerdir (ISFET'ler). Bir ISFET, doğrudan FET'in yalıtımlı gate elektroduna uygulanan bir iyon seçici membrandan oluşur. Bu gibi ISFET'ler bir biyokatalitik veya biyo-kompleksleştirici tabaka ile birleştiğinde, bunlar biyosensör olurlar ve genellikle enzim (ENFET'ler) veya immünolojik (IMFET'ler) alan transistörleri olarak adlandırılırlar. ENFET ve IMFET tabanlı cihazların çalışma özellikleri, ISE tabanlı biyosensörlerin özellikleri ile güçlü bir şekilde ilgilidir [50].

3.1.2 Biyosensörlerin Uygulama Alanları

3.1.2.1 Gıda Teknolojisi

Biyosensörler, gıdalardaki patojenlerin tespitinde kullanılır. Sebzelerde *Escherichia coli* varlığı, gıdalara dışkı bulaşmasının bir biyoindikatörüdür. E. coli, potansiyometrik biyoalgılayıcı sistemleri kullanılarak amonyak (üreaz - E. coli antikor konjugatı tarafından üretilen) kaynaklı pH'taki değişim tespit edilerek ölçülmüştür [51].

Süt endüstrisinde enzimatik biyosensörler de kullanılmaktadır. Screen-printed karbon elektrotu temel alan bir biyosensör, bir akış hücresine entegre edildi. Enzimler, foto çapraz bağlanabilir bir polimerin içine sokularak elektrotlar üzerine immobilize edildi. Bu sayede oluşturulan otomatik akış bazlı biyosensör, sütteki üç organofosfat pestisiti ölçebilmektedir [52].

Fermantasyon sürecinde, sakrifikasyon geleneksel Fehling'in metodu ile izlenmektedir. Bu yöntem, indirgeyici şekerin titrasyonunu içerdiğinden, sonuçları kesin olmamaktadır. Bununla birlikte, 1975'te ticari olarak glikoz biyosensörünün piyasaya sürülmesinden bu yana biyosensörler fermantasyon endüstrilerinde kullanılmaktadır. Artık fabrikalar başarıyla sakrifikasyon ve fermantasyon atölyesinde üretimi kontrol etmek için glikoz biyosensörlerini kullanıyor ve glikoz üretmek için bioenzimatik yöntemi kullanıyor [53].

3.1.2.2 Medikal Alandaki Uygulamaları

Tıp alanında, biyosensörlerin uygulamaları hızla artmaktadır. Glikoz biyosensörleri, kan şekeri düzeyleri üzerinde hassas kontrolü gerektiren diyabetus mellitus tanısı için klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Evde kan şekeri ölçen biyosensörlerin kullanımı dünya pazarının% 85'ini oluşturmaktadır [54].

Biyosensörler, bulaşıcı hastalıkları teşhis etmek için tıp alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Patojen tanımlaması ve anti-mikrobiyal duyarlılık ile birlikte idrar yolu enfeksiyonu (İYE) tanısı için umut verici bir biyosensör teknolojisi çalışılmaktadır [50].

Bugün karşılaşılan en büyük sorun, kalp yetersizliği ile yaklaşık bir milyon insanın muzdarip olmasıdır. Kardiyovasküler hastalıkların tespit teknikleri arasında

immünoafinite kolonu testi, florometrik ve enzime bağılı immünosorbent testi bulunur. Bunlar zahmetli, kalifiye personel gerektirir ve zaman alıcıdır. Elektrik ölçümü üzerine kurulan biyosensörler, ilgili belirli bir biyomarker ile istenen seçiciliği sağlayarak biyokimyasal moleküler tanımda kullanır [50].

3.1.2.3 Askeri Alandaki Uygulamaları

Biyosensörler biyolojik saldırı zamanlarında askeri amaçlar için kullanılabilir. Bu tür biyosensörlerin temel amacı, gerçek zamanlı olarak biyolojik savaş ajanlarını, yani bakteriler (vejetatif ve sporlar), toksinler ve virüsler olarak adlandırılan ve gerçek zamanlı olarak tehdit oluşturan organizmaları hassas ve seçici bir şekilde tanımlamaktır. Biyolojik savaş ajanlarının kimyasal markerlarını tanımlayabilen moleküler teknikler kullanılarak birçok biyosensör tasarımı yapılmıştır [50].

3.1.2.4 Çevre İzleme Alanlarındaki Uygulamaları

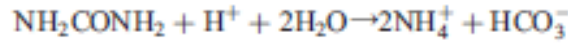
Çevresel ölçümler genel olarak, toprak kirliliği, hava kirliliği ve su kirliliğinin tayin edilmesi, su arıtma etkinliklerinin saptanması, tarımsal ve endüstriyel atıkların takip edilmesidir. Çevresel ölçümler çok geniş bir alanı kapsamaktadır. Bu yüzden yüzlerce ve binlerce örnek için numune alınması, bu numunelerin hazırlanması ve ölçülmesi masraflı ve zaman olarak dezavantajlıdır. Bunun yerine taşınabilir bir biyosensör ile anında ve olay yerinde ölçüm yapılabilmektedir.

Atık sularındaki organik kirliliğin ölçüsü olan Biyokimyasal Oksijen İstemi (BOD), *Trichosporon cutaneum* denilen bir mikroorganizma kullanılarak oluşturulan bir mikrobiyal biyosensör ile çok kısa zamanda ölçülebilmektedir. Bunun yanında, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* gibi mikrobiyal türler kullanılarak bir çok amperometrik BOD sensörü oluşturulmuştur.

Atmosfer kirliliğinin ölçümü için de gaz sensörlerine ihtiyaç duyulur. Bu yüzden mikrobiyal temelli havadaki karbondioksit, azotdioksit, kükürtdioksit, metan gibi gazları ölçen biyosensörler geliştirilmiştir. Bu biyosensörler temel olarak, ototrof bakterilerin havadaki kirlilik bileşenini tüketmesiyle, solunum aktivitesinin bir oksijen elektroduyla ölçülmesidir [47].

3.2 Üre Biyosensörleri

Ürenin potansiyometrik tayini için enzimatik sensörler en iyi bilinen biyosensör sınıfıdır. Bu biyosensörlerde aktif enzim tabakası bir substrat ile doğrudan temas ettiği ve enzimatik reaksiyon sırasında oluşan ürünlerin konsantrasyonunu ölçen klasik bir sensörün yüzeyine yerleştirilir [4]. Sensör, üreaz ile hidrolize edilen ürenin enzimatik reaksiyonuna dayanır [55].



Şekil 3. 4 Ürenin Enzimatik Hidrolizi [55]

Üre, reaksiyonun sonucunda hidrojen iyonlarının konsantrasyonunda bir düşüşe (pH artar) ve iki yeni iyon oluşmasına neden olan üre'yi amonyak ve hidrojen karbonata parçalar [56]. Üre konsantrasyonunu, pCO₂ elektrodu, pNH₃ elektrodu, pH elektrodu ve pNH₄ elektrodu gibi çeşitli dönüştürücüler kullanarak potansiyometrik olarak belirlemek mümkündür [57].

Katı hal kontakt nonaktin bazlı amonyum iyon seçici elektrotlar (ISE), hızlı ve tekrarlanabilirlikleri nedeniyle, potansiyometrik üre biyosensörlerinin gelişimi için en uygun transdüserler arasındadır [58].

Enzimatik hidroliz sonucu protolitik özelliklere sahip ürünler oluşmasından dolayı pH ölçümüne dayanan üre algılayıcısı mümkündür. Bu ürünler pH sensör yüzeyinin alkalileştirek sensör potansiyelinin düşmesine neden olur. pH-bazlı biyosensörlerin ortak kalibrasyon grafikleri sigmoidal şekle sahiptir. Bu biyoalgılama yönteminin ana dezavantajı, analiz edilen numunelerin tampon kapasitesine güçlü bir duyarlılıkla bağlı olmasıdır [39].

Potansiyometri ve amperometri üre biyosensörünün ölçülmesinde kullanılan en yaygın iki yöntemdir. Bu ikisi arasında potansiyometrik yöntemler oldukça seçicidir ve yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Potansiyometrik biyosensörler, kolaylık, hız, düşük maliyet ve yüksek hassasiyet nedeniyle geleneksel üre belirleme yöntemlerine daha iyi bir alternatif olarak kabul edilmiştir [59].

Polivinil klorür (PVC) membran elektrotların uygun iyonoforlar kullanılarak biyosensör oluşturulmasının kısa yanıt süresi, iyi tekrarlanabilirlik ve basit dizaynı

gibi avantajları vardır. Enzimler glutaraldehit çapraz bağlayıcı reaksiyonlarla PVC iyon seçici membran yüzeyine bağlanır. Ancak enzimin plastikleştirilmiş hidrofobik PVC membran yüzeyine bağlanması zayıftır. Enzim immobilizasyonunu kolaylaştırmak için membran malzemesi olarak kullanılan PVC fonksiyonlaştırılır (amin,karboksil) [60]. Enzimler karboksillenmiş PVC membran yüzeyine kovalent olarak direkt bağlanabilmektedir. Bu enzim immobilizasyon metodu hazırlanış (1 adım karbodiimid metodu) açısından basittir ve elde edilen biyosensörlerin mükemmel dinamikleri, yüksek hassasiyeti ve uzun çalışma stabilitesi bulunur [39].

Bu biyosensörlerle birlikte üreyi eş zamanlı ölçebilen birkaç biparametrik sistem vardır. Bu sistemler enzimatik yöntemlere dayanır ve ölçümden önce girişim yapan maddelerin uzaklaştırılması gerekir. Amonyum dönüştürücü bu sistemlerde endojen amonyuma sodyum ve potasyum iyonları girişim yapabilir. Bu girişimlerin üstesinden gelebilmek için çeşitli stratejiler kullanılmıştır: diferansiyel ölçümler

(Koncki et al., 2000), gaz difüzyonu ile ayrılma (Krawczynski vel Krawczyk et al., 1994), kolon iyon değiştiricisi (Radomska et al., 2004) [58],[61].

Chetana Vaghela ve arkadaşları (2018), üreyi berthelot testiyle üreaz tarafından üretilen amonyum nedeniyle ortaya çıkan renkli kompleksin yoğunluğunun LED ışığına ve optik fibere dayalı basit algılama sistemi kullanılarak ölçülmüştür [62].

Anaradha Soni ve arkadaşları (2018), tükürük numunelerinde üre tayini için basit bir metodoloji kullanılarak filtre kağıdı bazlı pH duyarlı boya üzerindeki şeride üreazın immobilizasyonu sonucu optik bazlı akıllı telefon geliştirildi. Şerit, tükürük numunesinde bulunan üre ile üreaz enzimi reaksiyonunun bir sonucu olarak amonyak oluşumu üzerine pH'daki artış nedeniyle renk değiştirmiştir. Örnekte mevcut olan üre konsantrasyonu arttıkça, daha fazla amonyak serbest bırakıldı ve bu nedenle renk değişimi daha derindi. Kağıt şeridindeki bu renk değişimi, daha sonra evde geliştirilen akıllı telefon tabanlı bir uygulama kullanılarak RGB profileme yoluyla tarandı [1].

Emre Çevik ve arkadaşları (2012) Altın elektrot üzerinde demir oksit nanopartiküller ile modifiye edilen PGMA (poly(glycidylmethacrylate) bazlı yeni

bir üre biyosensörü geliştirmiştir. Üreaz enzimi bu yapıya kovalent olarak bağlanmıştır [2].

Walcerz 1998 yılında nonaktin, PVC-COOH ve Dioktil sebakat membranı içeren amonyum seçici elektotlarına üreazı immobilize ederek potansiyometrik üre biyosensörü üretmişlerdir. Bu biyosensör ile kanda FIA sistemi ile kanda üre tayinini gerçekleştirmişlerdir [63]

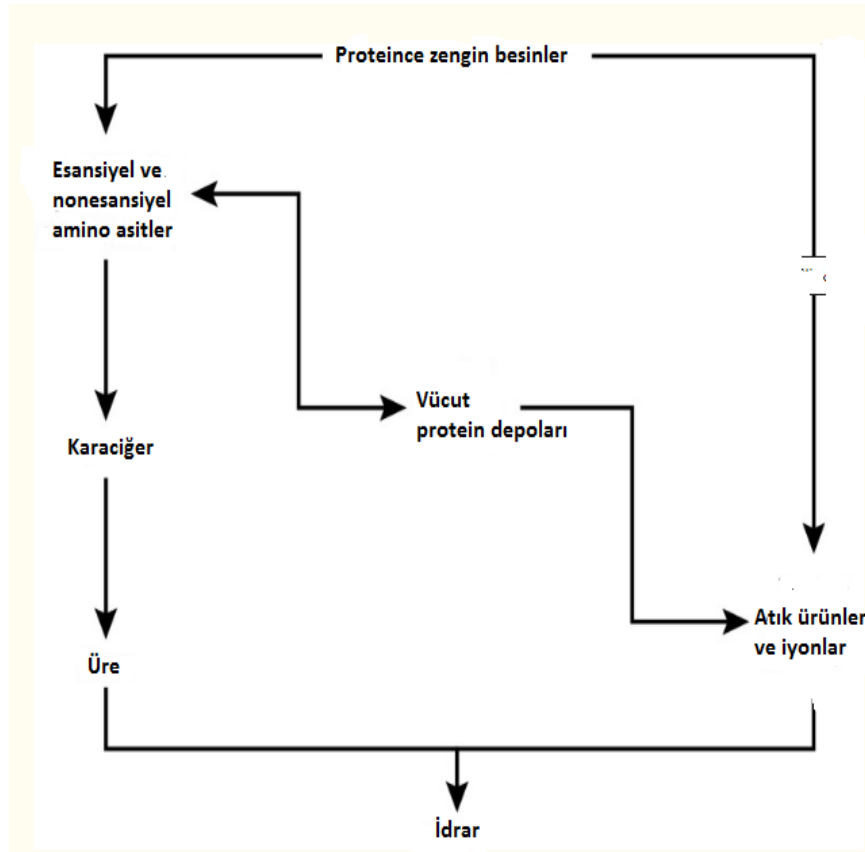
M.Sheliakina ve arkadaşları (2014) arginin tespiti için üreazın inhibisyon etkisine dayanılarak yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir. İyon seçici alan etkisi transistörleri, transdüserler olarak kullanıldı. Glutaraldehit buharında immobilize olan üreaz, biyosensörün biyotaniyıcı elemanı olarak görev almıştır. Çalışmanın önemli bir kısmı üreazın argininin tarafından inhibisyonunu kanıtlamayı amaçlamaktaydı [64].

Azam S. Emami Meibodi ve Sara Haghighi, enzimin tutuklanmasında matriks olarak görev alan polianilin-çok duvarlı karbon nanotüpler (PANI / MWCNTs) kompozitini, elektropolimerizasyon yöntemi ile ürettiriler. Üreaz fiziksel adsorpsiyon ve elektrokimyasal tuzaklama tekniği kullanılarak immobilize edilmiştir [65].

3.3 Üre ve Üre Tayin Yöntemleri

Üre (karbamid, karbonil diamid), memelilerde azotlu bileşiklerin en etkili son metabolitidir, insanlarda azot atılımının% 80-90'ını oluşturur [66].

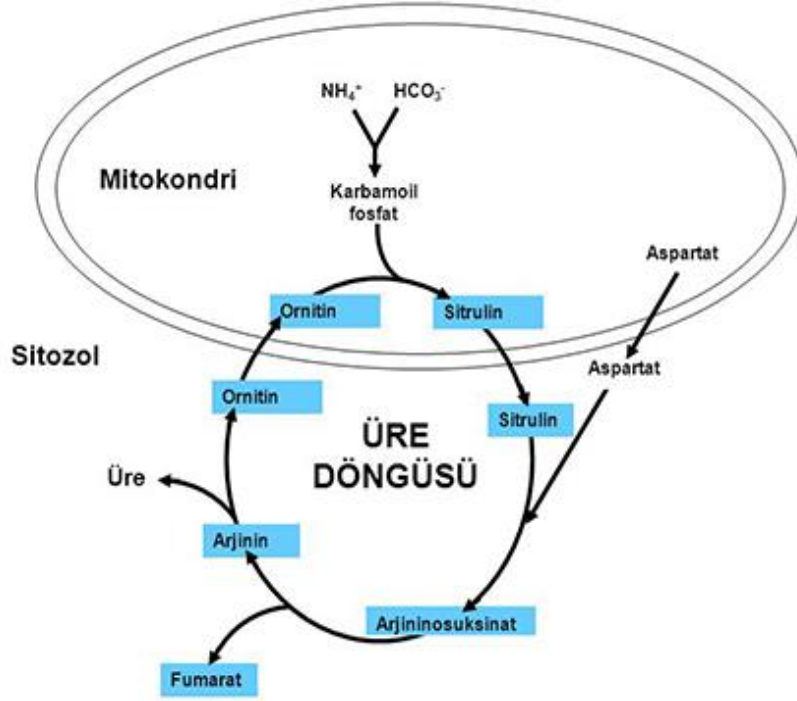
Protein bakımından zengin yiyecekler 9 esansiyel ve 11 esansiyel olmayan amino aside dönüştürülür. İki grup arasındaki fark, esansiyel amino asitlerin vücutta sentezlenememesi ve bu nedenle diyet veya proteinlerle alınması gerekliliğidir. Amino asitlerin iki seçeneği vardır: (1) proteini sentezlemek için kullanılabilirler veya (2) a-amino grubunun çıkarıldığı ve karaciğerde üre haline dönüştürüldüğü monoton bir şekilde parçalanırlar. Şaşırtıcı olmayan bir şekilde üre üretimi, yenen protein miktarı ile yakından ilgilidir; bu nedenle üre, kronik böbrek hastalığını olan bir hastanın gerekli miktarda protein alıp almadığını tahmin etmek için kullanılabilir [67].



Şekil 3. 5 Protein Metabolizmasının Genel Taslağı [67]

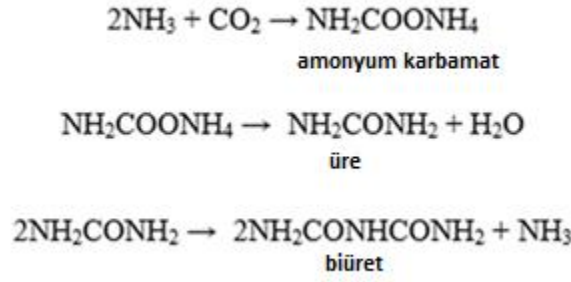
Şekil 3.5'deki taslağa göre; diyet proteini alımı, esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitlere veya metabolik atık ürünlere ve iyonlara hızlı bir şekilde metabolize edilebilir. Esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitler vücut protein depolarıyla iç içe geçebilirler. Amino asitler ayrıca üre oluşturmak için karaciğerden metabolize edilebilir, daha sonra idrarla atılır. Vücut protein depoları, esansiyel ve esansiyel olmayan amino asitlere geri dönüştürülebilir veya idrarla atılan atık ürünler ve iyonlar oluşturarak metabolize edilebilir [67].

Memelilerde, deaminasyon reaksiyonu sonucu oluşan ve güçlü bir baz olan amonyak canlı ortamının pH'sını yükselterek canlılar için zararlı etkilere neden olabilir. Bu yüzden karaciğerde CO_2 ile birleşerek toksik olmayan bileşik üre sentezlenir [68]. Karaciğerde oluşan üre kan yoluyla böbreklere taşınır ve idrar yoluyla vücuttan atılmaktadır [66].



Şekil 3. 6 Üre Döngüsü [69]

Üre döngüsü, hepatositlerin mitokondrilerinde başlar ve sitoplazmada sona erer. Üre döngüsü, vücudun toksik amonyağı üre haline dönüştürmenin bir yoludur. Amonyak, protein katabolizmasından kaynaklanır, bunun yanında sekonder olarak yüksek proteinli diyet, deaminasyonlara veya uzun süreli açlık dönemine bağlıdır. Amonyak ayrıca doğal olarak bağırsak florası tarafından üretilir. Kas ve periferik dokularda, glutamat serbest amonyağı kabul eden amino asit üzerinde glutamin oluşumuna yol açar. Glutamin daha sonra kas ve periferik dokulardan salınır ve karaciğer tarafından kullanılır. Glutaminaz, glutamini glutamat ve amonyağa parçalar. Glutamat ayrıca, glutamat dehidrojenaz enzimi yoluyla ek üre sağlar. Buradan itibaren, amonyak başlangıçta hepatosit mitokondri içine dahil edilir ve sonuçta üre oluşumuna yol açar. Üre daha sonra hepatosit sitoplazmasını bırakılır ve sonuçta idrarla atılır [70].



Şekil 3. 7 Amonyanın CO₂ ile Reaksiyonu [71]

Doğada yaygın olarak bulunan ürenin belirlemesi tıbbi tanı, tarım bilimi, çevre izlemesi ve gıda bilimi için önemli hususlardan biridir [59].

Kan plazmasında üre seviyelerinin azalması nadir olarak görülür ve ciddi karaciğer hastalıklarına ve düşük protein alımına karakteristiktir. Metabolizmanın son ürünü olan üre, böbreklerin böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesine olanak sağlayan önemli bir faktördür. İdrar ve kandaki üre düzeyi, böbrek ve karaciğer fonksiyonlarını, proteinlerin katabolizmasını, konjestif kalp yetmezliğini, yüksek protein diyetini, yetersiz beslenmeyi, hamileliği ve hatta şok ve stresi kontrol etmek için değerli bir belirteç olarak kullanılır [39], [59].

Kandaki üre fizyolojik düzeyi diyetle bağlı olarak 2,5 ile 8,6 mM arasındadır. Kronik ve keskin böbrek yetmezliği sırasında önemli derecede artar (sırasıyla 50–70 ve 120-150 mM). Bu patolojik üre seviyeleri, periton diyalizi veya hemodiyaliz tedavisi sırasında 10 mM'nin altına düşürülebilir. Postdiyalizat sıvılarında üre seviyeleri, yaklaşık 3 ila 16 mM arasında değişebilir. İdrar numunelerinde bulunan en yüksek ve güçlü diyet bağımlı üre düzeyleri, 0.2 ile 1 M arasında değişmektedir [39].

Kandaki artan üre seviyesi böbrek yetmezliğinden, üriner sistemde tıkanma, dehidrasyon, yanma, şok ve sindirim kanalındaki kanamadan sorumludur. Kronik böbrek hastalığı (KBH) veya böbrek yetmezliği olan kişilerde, üre seviyesi, sağlıklı kişilere kıyasla 10 katına kadar ulaşabilir. Yıllık küresel üre üretiminin, büyük kısmı gübre olarak kullanılır ve 2050 yılına kadar 9,3 milyar tonu aşması beklenmektedir. Üre ayrıca toprak pH'sındaki düşüşten de sorumlu olabilir [59].

Başlıca üre tayin yöntemleri;

Direkt yöntemler: Kolorimetrik, Ksanthidrol yöntemi

İndirekt yöntemler: Kowarsky Yöntemi

Kolorimetrik yöntemler: Berthelot ve Nessler reaksiyonları

Elektrokimyasal Yöntemler: Kondüktometrik ve Potansiyometrik

Diğer Yöntemler: Kemilüminesans yöntemi [68].

4.1 Polimerler ve Biyopolimerler

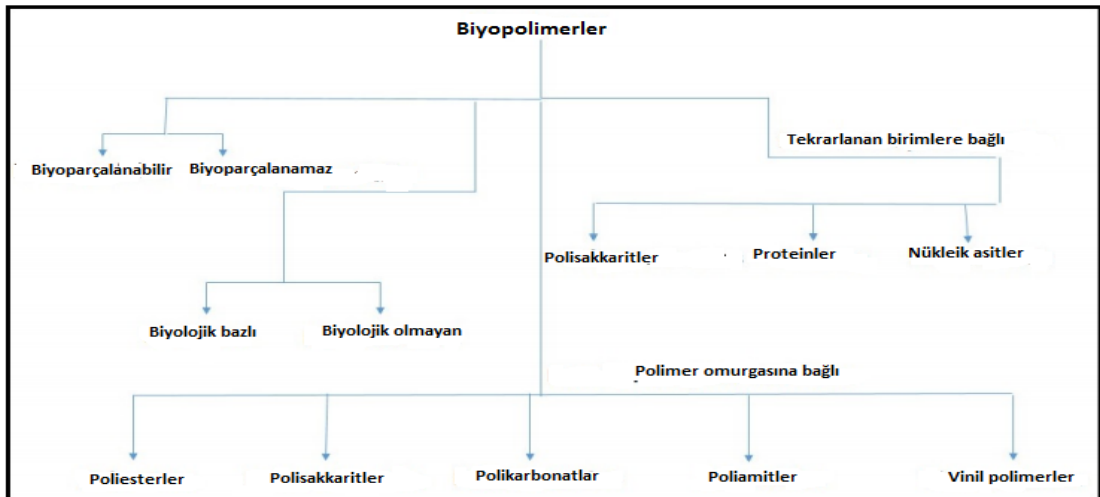
Polimerler, tıp endüstrisinde ve toplumumuzda en göze çarpan materyal sınıflarından biridir. Doğada meydana geldikleri zaman, hem bitkisel hem de hayvansal kaynaklı materyalleri insan konakçılarda biyoyumluluğu artırdığı, biyoaktivite kabiliyetini gösterdiği, biyobozunmaya maruz kaldığı tahmin edilmektedir [72]. Sürdürülebilirlik yaklaşımları ardından, yenilenebilir kaynaklardan elde edilen polimerler üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır. Polisakkaritler doğada en bol bulunan polimerler olmasının yanında, aynı zamanda mükemmel bir yapı çeşitliliği sunar. Polisakkaritler kimyasal modifikasyonla fonksiyonel polimerlerin hazırlanmasında başlangıç materyali olarak önceden belirlenebilir. Esterifikasyon, eterifikasyon, nükleofilik yer değiştirme ve oksidasyon gibi yaygın modifikasyon metotları için polisakkaritlerde yaygın bulunan hidroksil gruplarından yararlanılır [73].

Doğal olarak türetilmiş biyopolimerler, son birkaç yılda bollukları, toksik olmamaları, biyoyumlulukları, biyobozunurlukları, esneklikleri, yenilenebilirlikleri ve fonksiyonlaştırılması için çok sayıda reaktif gruplarına sahip olmalarından dolayı büyük ölçüde ilgi çekmektedir. Şu sıralar, doğal polimerlerin çoğu biyomedikal, çevresel, farmasötik, gıda, biyoyakıt/enerji gibi çeşitli uygulamalar için ideal ve gelecek vaat eden destek/kompozit aday potansiyeli göstermektedir. Enzimlerin optimal reaksiyonu için çevresinde biyoyumlu bir mikroortam sağlayarak biyokatalitik performansını ve stabilitesini artırması açısından biyopolimerlerin kullanılmasının önemli bir avantaja sahiptirler. Günümüzde aljinat, kitosan, selüloz, dekstran, agaroz, agar-agar, karra geenan, jelatin, guar zambkı, pektin vb. birçok polimer ve bunların türevleri multifonksiyonel biyokataliz için destek taşıyıcı görevi üstlenmektedirler [74].

Sentetik polimerler, yaygın olarak kullanılan malzemeler ve yüksek teknoloji uygulamalarında fonksiyonel elemanlar olarak, modern insanın hemen hemen her yönüyle kendi yollarını açmış olan her yerde bulunur.

Birçok durumda, sentetik polimerlerin çeşitli tıbbi implant ve doku mühendisliği uygulamaları için kompozisyonları, mekanik özellikleri ve bozunma özellikleri bakımından doğal polimerlerden daha üstün olduğu kanıtlanmıştır [75].

Biyopolimerler, farklı ölçeklere dayalı olarak farklı şekillerde sınıflandırılır. Parçalanabilirliklerine bağlı olarak, biyopolimerler biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak parçalanamayan, alternatif olarak biyolojik bazlı ve biyolojik esaslı olmayan biyopolimerler iki geniş gruba ayrılabilir. Polimer omurgalarına dayanarak, biyopolimerler kabaca aşağıdaki gruplara ayrılabilir: poliestерler, polisakaritler, polikarbonatlar, poliamitler ve vinil polimerler. Bu gruplar tekrardan kökenlerine göre birkaç alt gruba ayrılmaktadır. Biyopolimerler, tekrar eden birimin yapısına bağlı olarak, üç gruba ayrılabilir: (i) polisakaritler, şekerlerden yapılır (örneğin bitkilerde bulunan selüloz), (ii) proteinler, amino asitlerden yapılır (örneğin, miyogloblin). kas dokularında bulunur) ve (iii) nükleik asitler nükleotidlerden (DNA, verilen bir organizmanın genetik materyali) yapılır. Uygulamaya dayanarak, biyopolimerler biyoplastikler, biyo yüzey aktif madde, biyo-deterjan, biyo-yapışkan, biyo-akışkan ve benzeri olarak sınıflandırılabilir [76].



Şekil 4. 1 Biyopolimerlerin Sınıflandırılması [76]

4.1.1 Biyopolimerlerin Uygulama Alanları

4.1.1.1 Nanomateryallerin Sentezi

Nanopartiküllerin sentez protokollerinin çoğu çevre için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Araştırmacılar şu anda nanopartiküllerin sentezi için daha çevre dostu işlemler geliştirmeye odaklanmaktadır. Biyopolimerler, çeşitli nanopartiküllerin sentezi için kapaklama ve indirgeme maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Kitosan, heparin, çözünür nişasta, selüloz, jelatin, polivinil alkol,vb. gibi biyopolimerler, farklı nanopartiküllerin sentezlenmesinde çeşitli toksik maddelerin yerini almak için kullanılabilir [77], [78].

4.1.1.2 Biyomedikal Uygulamalar

Son yıllarda, biyopolimer malzemeler doku mühendisliği, farmasötik taşıyıcılar ve tıbbi cihazlar gibi biyomedikal uygulamalarından dolayı büyük ilgi uyandırdı. Yaygın bir biyopolimer olan jelatin tıpta yaraların sarılmasında sargı olarak kullanıldı. Gözenekli jelatin iskeleleri ve filmler, basit köpürtücü olarak çözücüler veya gazların yardımı ile üretildi; bu iskeleler iyileşmek üzere olan yaraya beslenmesini sağlayan ilaç veya besinleri tutmalarını sağlamaktadır [79], [80].

4.1.1.3 Gıda Endüstrisi

Biyopolimerler şu anda gıda kaplamalarında, gıda ambalaj materyali ve fonksiyonel gıdalar için kapsülleme matrislerinde kullanılmaktadır. Ürün raf ömrünü artırmak için benzersiz çözümler sunar. Kitosan, yiyeceği çok çeşitli mikroorganizmalara karşı korumak için antimikrobiyal bir paketleme maddesi olarak büyük potansiyel göstermiştir. Amiloz gibi biyopolimerler, plastikleştiricilerle karıştırıldığında, çeşitli gıda ve ambalaj uygulamaları için ince filmler oluşturma konusunda mükemmel potansiyele sahiptir [76].

4.1.1.4 Suyun Arıtılmasında

Fonksiyonel malzemelerle çeşitli nanokompozitler geliştirmek arsenik, kurşun vb. gibi çeşitli toksik metalleri antibakteriyel maddelerle birlikte sudan temizleyebilir, bu durum elektriksiz çalışabilen uygun fiyatlı su temizleyicilerini ortaya çıkarabilir.

Kitosan, su arıtma işlemlerinde topaklaştırıcı olarak kullanılır ve yıllara göre haftalar veya aylar boyunca çevrede biyolojik olarak parçalanabilmektedir. Kitosan ile karşılaştırıldığında, birçok uygun ve ucuz sentetik topaklayıcılar mevcuttur, ancak çevre üzerinde kalıcı bir etki bırakmaktadırlar. Kitosan şelatlar oluşturarak metalleri sudan uzaklaştırır [76].

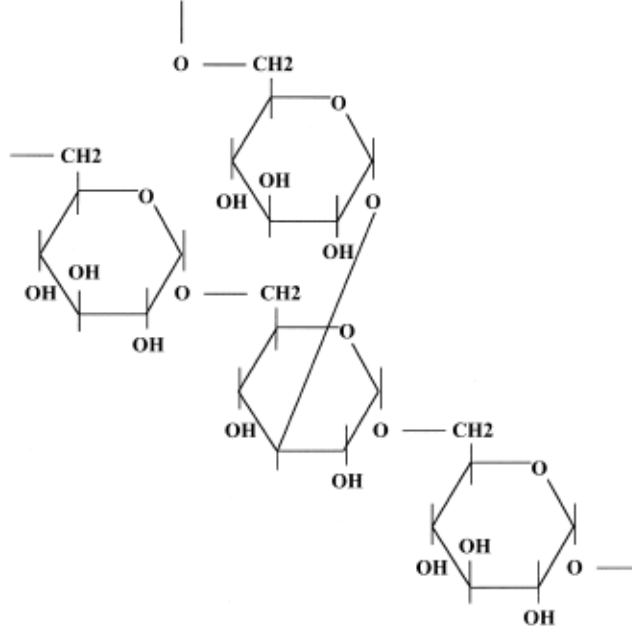
4.1.2 Dekstran

Dekstranlar 50 seneden fazla plazma hacmi genişleticisi, periferik akış destekçisi ve antitrombolitik ajan olarak klinik amaçlarla kullanılan glikoz polimerleridir. Ancak son zamanlarda, başlıca terapötik ajan olarak dögündeki dayanıklılığı artırarak protein ve ilaçların taşınmasında moleküler taşıyıcı olarak potansiyeli olduğu keşfedilmiştir. Aynı zamanda ilaç taşıyıcısı olarak hedef ilacın spesifik bölgelerine aktif ya da pasif olarak bağlanma özelliği gösterir. Ayrıca dekstranlar, in vitro stabiliteyi artırır, protein ya da enzimlerin in vivo immünojenliğini azaltır. Dekstran protein konjugatlarının bir çoğu proteinlerin farmakolojik aktivitesini belirli derecede sağlasa da, küçük moleköl ilaçlarda dekstran konjugatlarının bir çoğu ön ilaç olarak in vivo aktif ilacın salınmasında rol oynar [81].

Gıdalarda dekstranın başlıca potansiyel kullanımı kristalleşmeyi önleme, nemi muhafaza etme ve vücut sağlama kapasitesiyle ilgili olduğu bilinmektedir. *Leuconostoc* ve *Lactobacillus* türleri tarafından üretilen küçük miktarlarda dekstranın, sakkaroz içeren fermente gıdalarda bulunması muhtemeldir. Dekstran kristalleşmeyi engellediği için, dekstran formasyonu şeker (sakkaroz) üretimine zararlıdır; vizkoziteyi artırır ve bu nedenle buharlaştırıcılardaki, kristalleştiricilerdeki ve tavalardaki filtrenebilirliği ve ısı transferini azaltır. Üretilen herhangi bir dekstranı parçalamak için dekstranazlar kullanılabilir. Şekerin yiyeceklerde, içeceklerde ve şekerlemelerde kristalleşmesinin önlenmesi potansiyel bir kullanımdır [82].

Dekstranlar ana zincirde α (1-6) glukopiranoz birimleri içeren, dallanma zincirinde de α (1-2), α (1-4) ya da α (1-3) dallanmalar içeren biyopolimerdir [83]. Dallanma içeriği kaynağa göre % 0,5' ten %60'a kadar değişmektedir [81]. Birçok

mikroorganizma, değişen moleküler ağırlıklarıyla ve az ya da çok dallı olan yapılar içeren dekstranlar üretir. Doğadaki dekstranların bir çoğu *Leuconostoc*, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* türlerinden oluşmaktadır [84]. Dekstranın kaynağı molek l ağırlığı dağılımını da belirler [81]. Ayrıca düşük molek l ağırlıklı dekstranlar medikal olarak daha kullanılışlıdır [84].



şekil 4. 2 Dekstranın Molek l Yapısı [81]

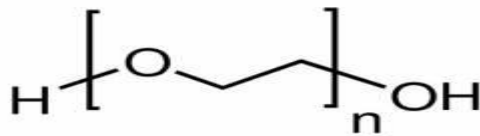
Dekstranın periodat ile oksitlenmesiyle elde edilen bir aldehit-dekstran, enzim molekülünün amino gruplarının çapraz bağlanması için uygun bir poli aldehit polimer olarak kabul edilir. Daha önce multimerik katalizörlerin monomer alt birimlerinin çapraz bağlanması, enzimlerin desorpsiyonunu desteklerden ve koruyucu enzim yüzey modifikasyonlarını azaltmak için daha önce kullanılmıştır. Tekli amino ve aldehit grupları arasındaki reaksiyon, stabil olmayan Schiff bazlarının oluşması ile sonuçlanır. Ama bu polimerin çeşitli pH'larda inkübe edilmesi yeni sıklık yapıların üretilmesini bunu takiben komşu aldehit gruplarının modifikasyonu, proteinlerle amino asitlerin daha güçlü bağlanarak daha stabil bağlar oluşmasını sağlar. Bu nedenle aldehit dekstran intermoleküler çapraz bağlayıcı ve enzim yüzeyini kaplayarak stabilitesini artırmak için m kemel bir çapraz bağlayıcı aday olarak işlev görebilir [85].

Dekstran ayrıca diğer birkaç uygulama için kimyasal olarak da modifiye edilebilir.

- Veterinerlikte (Fe2 + kaynağı olarak Fe-dekstran)
- Tıpta kolesterol düşürücü bir madde olarak (Dietilamino etanol((DEAE)-dekstran)
- Ayırma teknolojisinde, moleküler elek (çapraz bağlı dekstran) ve sulu iki fazlı ayırma sistemlerinde (dekstran / polietilen glikol)
- Doku / hücre kültüründe bir mikro taşıyıcı olarak
- Biyoteknolojik uygulamalar için (dekstran sülfat) [86].

4.1.3 Polietilen Glikol

Polietilen glikol çok çeşitli uzunluklarda ve terminal fonksiyonel gruplar kullanılarak hazırlanabilen, etilen dioksit yapılarından oluşan doğrusal sentetik bir polieterdir [87].



Şekil 4. 3 Polietilen glikol'ün yapısı [87]

Çalışılan polimerler arasında PEG en ilginç, çok yönlü olanı olarak ortaya çıkmaktadır ve dokuz PEG-protein konjugatı şu anda klinik uygulamada kullanılmaktadır. PEG'in başarısının nedenleri, hidrofilikliği, toksik olmaması ve immünojenik olmaması gibi birçok avantajlı özellikte bulunur [88].

Sulu çözeltilerdeki varlığı, protein konformasyonu veya enzim aktiviteleri üzerinde zararlı bir etkiye sahip değildir [87]. Polietilen glikol (PEG), toksik olmayışı, biyouyumluluğu ve su veya çeşitli çözücülerde iyi çözünürlüğü nedeniyle biyolojide çok değerli bir bileşendir. PEG, etilen oksit ünitesi başına 2-3 su molekülüyle koordinasyonundan kaynaklanan benzersiz çözülme özelliklerine sahiptir. Bu yüksek çözülme, polimerik omurgadaki büyük esnekliği ile birlikte, polimere biyouyumluluk, immünojenik olmama ve antijenik olmama gibi özellikler kazandırır. Solvasyonun bir başka sonucu, PEG'in jel geçirgenlik kromatografisiyle

belirlenen, kütlenin küresel proteinden 5 ila 10 kat daha yüksek görünür bir moleküler ağırlığa sahip olmasıdır [88]. PEG'in diğer polimerlerle veya nanomalzemelerle birleştirilmesi biyouyumluluklarını verimli bir şekilde artırabilir [89].

Polietilen glikol (PEG) ve türevleri, tıpta, kozmetikte ve gıda katkılarında kullanılmakta olan biyolojik olarak uyumlu polimerlerdir. Biyomoleküllerin PEG türevleriyle konjugasyonu (PEGilasyon) çözünürlük, stabilite ve yarı ömrünü artırabilir. PEG türevlerinin hem lipozom hem de misel bazlı ilaç dağılım sistemlerinde önemli bir başarısı olduğu bulunmuştur. PEG'lerin uygulamaları, yüksek kalitede polimerlerin hazırlanmasına ve biyomoleküllere bağlanmasını kolaylaştıran terminale uygun fonksiyonel grupların dahil edilmesine bağlıdır [90].

Polimer ailesinden olan polietilen glikoller (PEG'ler), imalat endüstrisinden ilaç endüstrisine kadar önemli uygulamalara sahip polieter bileşiklerdir. Düşük toksisiteleri nedeniyle, belirgin klinik kullanımları vardır. Birçok müshil ve cilt kremleri için kullanılırlar[91] .

Polietilen glikol (PEG), zehirli boya yüzeylerini geliştirmek için kullanılan iyi bilinen bir polimerdir. Bir substrat üzerine immobilize edildiğinde, protein adsorpsiyonunu, memeli hücreli yapışmasını ve bakteriyel yapışmasını sağlayan hidrofilik karakter verir. Bu kaplamalar ayrıca trombosit yapışmasını azaltır, bu da trombüs oluşumu riski, doku hasarı ve diğer sitotoksik etki riskini azaltır. Bu nedenle, PEG kaplamaları diğer uygulamaların yanı sıra anti-enfektif tıbbi implantlar, gelişmiş sinyal-gürültü oranlarına sahip biyosensörler ve az kirli membranları elde etmek için kullanılmıştır [92].

PEG, ayrıca kayganlığı arttırmak için bir plastikleştirici olarak kullanılır [93].

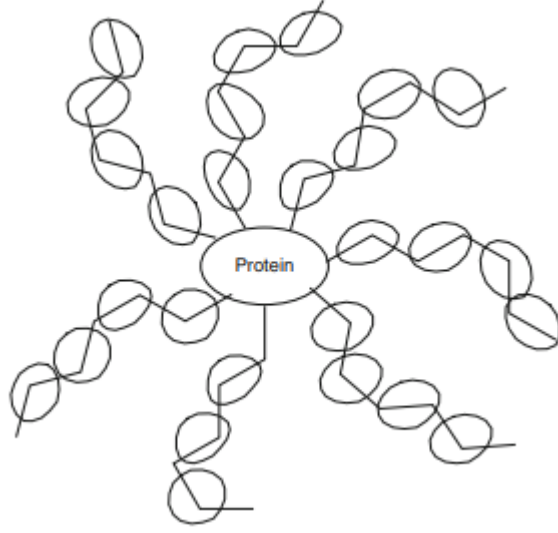
PEG'in büyük başarısına rağmen bu polimer, her uygulama için mükemmel ve en uygun polimer olmayabilir ve her durumda, kullanımını sınırlayabilen aşağıda listelenen bazı dezavantajları sunar.

- Biyobozunur olmadığından, yüksek moleküler ağırlıklı PEG'ler, daima böbrek klerensi eşiğinin altındaki moleküler ağırlıklarında dikkatli kullanılmalıdır.

- Spesifik anti-PEG antikorları, PEG-asparajinaz ve PEG-ürikaz ile tedavi edilen hastaların serumunda tespit edildi, bu da terapötik etkinlik kaybıyla nötrleştirici bir etki yarattı. Bazı araştırmacılar önceden var olan IgM ve IgG anti-PEG antikorlarının varlığını PEG ilaçlarıyla daha önce tedavi görmemiş hastaların yaklaşık% 25'inde tespit etmişlerdir.
- PEG-konjuge hemoglobin ve TNF-R bağlayıcı proteinlerin çoklu doz uygulamasından sonra hayvanlarda tartışmalı böbrek hücre vakuolizasyonu gözlenirken, polimerin tek başına veya diğer konjugatlarla birlikte kullanıldığı zaman asla bulunamamıştır. Bununla birlikte, bu bulgu, biyolojik olarak parçalanamayan, yüksek moleküler ağırlıklı PEG'lerin kullanımıyla bağlantılı başka bir potansiyel sorunu vurgulamaktadır.
- İlaç salınım bileşimlerinde PEG'lerin kullanımına bağlı çok sayıda patent, yeni konjugatların gelişmesini engelleyebilir veya önleyebilir [88].

PEGilasyon , biyolojik moleküllerin, toksik olmayan, immünojenik olmayan bir polimer olan polietilen glikol (PEG) ile kovalent konjugasyonla modifikasyonunu tarif eder ve bazı biyofarmasötiklerle ilişkili dezavantajların üstesinden gelmek için bir strateji olarak kullanılır. Genellikle proteinlerde yer alan amino gruplarının alkilasyon ve açilasyonu ile gerçekleşmektedir. Amino gruplarının kullanılmasının sebebi yapıda nükleofilik olarak aktif olmalarıdır [94], [10].

PEGilasyon, biyomedikal molekülün konformasyonunu, elektrostatik bağlanmasını ve hidrofobikliği gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirir ve ilacın farmakokinetik davranışında bir iyileşme gerçekleştirir.



Şekil 4. 4 Bağlanmış Polietilen Glikol İçeren Bir Proteinin Şematik Gösterimi
Polimeri çevreleyen daireler, polimerin eter-oksijen gruplarıyla koordine edilmiş su bulutunu tasvir eder [94].

5.1 Kullanılan Cihazlar

Tablo 5. 1 Deneysel Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihazlar	Modeller
Liyofilizatör	SEM CHRIST
UV Spektrofotometre	PG Instruments T60
Su Banyosu	Nüve ST30
Referans Elektrot	Hanna Instruments HI 5315
Etüv	Memmert
Potansiyometre	Medisen
Hassas Terazî	Shimadzu ATX224
pH metre	Hanna Instruments HI 2211
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR3001
Saf Su Cihazı	Purelab Flex
Mikropipet	Eppendorf
FT-IR Spektrofotometre	Pelkin Elmer Spectrum One

5.2 Kullanılan Malzemeler ve Kimyasal Maddeler

Beher (10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml ,250 ml)

Spatül

Penisilin Şişeleri

Pasteur Pipetler

Deney Tüpleri

Kuvartz Küvet (1 ml)

Manyetik Karıştırıcı Magneti

Bakır Tel

Saat Camı

Plastik Kablolar

Tablo 5. 2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Maddeler	Üretici Firma	Katalog Numarası
Sodyum Meta Periyodat	Fluka	71862
Dekstran	Sigma	9004-54-0
Diyaliz Membran	Sigma	D9777-100FT
Polietilen Glikol Mw:20.000	Sigma	BCBB3752
Fenol	Sigma	108-95-2
Sodyum Hipoklorit	Sigma	7681-52-9
Grafit	Aldrich	BC7679V

Tablo 5. 2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler (devamı)

Epoksi Reçinesi	Sigma	26544-38-7
Sertleştirici	Bayern	RN-LL2-132
Tetrahidro Furan	Emplura	1.08114.2500
Polivinil Klorür	Aldrich	WE370852/1
Bis (2-etil hekzil) Sebakat	SIAL	290831
Nonaktin	Biochemika	74155
Palmitik Asit	Merck	800508
Amonyum Klorür	Merck	1.01145.1000
Üreaz from <i>Jack Bean</i>	Sigma	SLBV7562
Karbodimid	Sigma	538-75-0
Glutaraldehit	Sigma Aldrich	STBB3357
Tris HCl	Sigma Aldrich	T32553
Tris Baz	Aldrich	185515
Potasyum Klorür	Merck	1.04936.1000
Kalsiyum Klorür	Merck	1.02379.1000
Sodyum Klorür	Sigma Aldrich	S2BD1280V
Lityum Klorür	Carlo ERBA	458271

5.3 Deneylerin Yapılışı

5.3.1 Üreaz Enzimin Aktivite Tayini

Kullanılan Reaktifler;

0,1 M Fosfat tamponu (pH 7)

2 mg/ml Üreaz enzim çözeltisi

0,17 gr/l Üre çözeltisi

Fenol reaktifi: (reaktif A ve reaktif B) şeklinde iki çeşit reaktifin 1:1 oranda karıştırılmasıyla elde edildi. Reaktif A 2,5 g fenol 25 ml suda çözülerek; reaktif B i 25 ml distile suda 14 mg Na-nitroprussid 25 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

Alkali hipoklorit çözeltisi: (reaktif A ve reaktif B) şeklinde iki çeşit reaktifin 1:1 oranda karıştırılmasıyla elde edildi. Reaktif A %5'lik (w/v) NaOH ile hazırlanırken, reaktif B litresinde 2 gr NaOCl içeren klorak kullanıldı ve bu çözeltiden 2.9 ml alınıp distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Deneyin yapılışı: 25°C'deki deney tüplerine sırasıyla 1,89 ml pH:7 fosfat tamponu, 10 µl üre çözeltisi ve 0,1 ml üreaz enzim çözeltisi konularak reaksiyon başlatıldı. 30 dakika sonra 0,5 ml fenol reaktifi ve 0,5 ml alkali hipoklorit çözeltisi eklenilmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır. Bu karışım 50-60°C'deki su banyosunda 5 dakika inkübe edilmiştir ve soğuması beklenmiştir. Bu işlemler sonucu 630 nm dalga boyunda (A_{630}) absorpsiyon spektrumları okundu. Açığa çıkan NH_3 miktarından üreaz aktivitesi tayin edilmiştir [95].

Aktivite ünite hesaplaması: Bir ünite üreaz aktivitesi, belirli pH değerinde, 1 dakikada 1 µmol ürenin, amonyak ve CO_2 'e dönüşmesini katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. 5.1'de verilen eşitlik vasıtasıyla hesaplanmıştır:

$$U/ml = \frac{A_{630} \times 10^6}{M_{\epsilon} \times t \times C_{\text{üreaz}}}$$

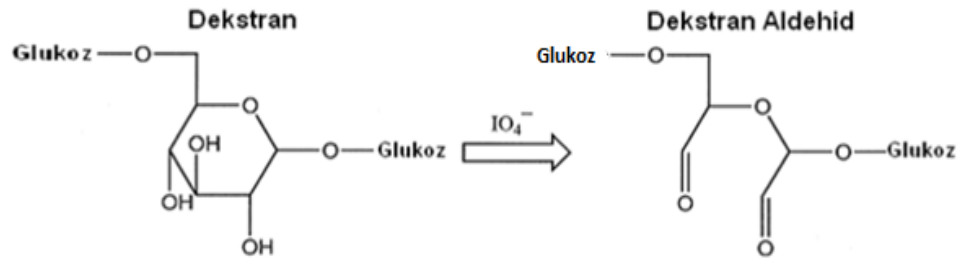
Şekil 5. 1 Üreaz Enziminin Aktivite Hesabı [71]

A_{630} Üreazın 630 nm'deki absorpsiyonu, M_ϵ Üreazın molar absorpsiyon katsayısı, t zaman, $C_{\text{üreaz}}$ üreazın konsantrasyonu.

5.3.2 Enzim Polimer Komplekslerinin Sentezi

5.3.2.1 Dekstran Aldehit Türevinin Sentezi

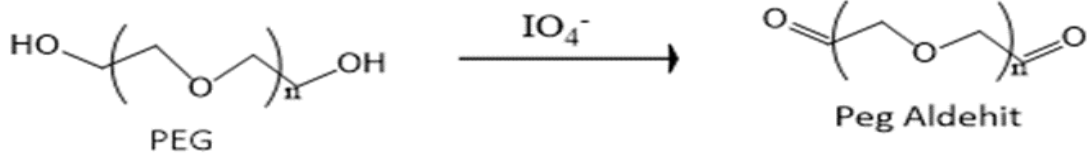
- Sodyum periodat (NaIO_4) dekstran çözeltisinin üzerine yavaş yavaş karıştırılarak eklendi.
- Bu çözelti oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 24 saat süre boyunca karışmaya bırakıldı.
- Ortamda bulunan fazla iyonları uzaklaştırmak için elde edilen yükseltgenmiş dekstranı 24 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda distile suya karşı diyalize bırakıldı.
- Ürün liyofilizatörde kurutularak aldehit grupları içeren dekstran elde edildi [96].



Şekil 5. 2 Dekstran Aldehit Türevinin Eldesi [96]

5.3.2.2 Polietilen Glikol (PEG) Aldehit Türevinin Eldesi

- NaIO_4 PEG çözeltisinin üzerine yavaş yavaş karıştırılarak eklendi.
- Bu çözelti oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 24 saat süre boyunca karışmaya bırakıldı.
- Ortamda bulunan fazla iyonları uzaklaştırmak için elde edilen yükseltgenmiş PEG 24 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda distile suya karşı diyalize bırakıldı.
- Ürün liyofilizatörde kurutularak aldehit grupları içeren PEG elde edildi [10]



Şekil 5. 3 Polietilen Glikol (PEG) Aldehit Eldesi [10]

5.3.2.3 Dekstran/Üreaz, Polietilen Glikol/ Üreaz Komplekslerinin Sentezi

Ticari üreaz enzimi ile 20 000 Da PEG'in aldehit türevinin non-kovalent kompleksleri ile 75 000 Da dekstranın aldehit türevinin non-kovalent kompleksleri sentezlenmiştir.

Toplamı 4 ml reaksiyon hacminde olacak şekilde kompleks reaksiyonu yapılmıştır. Protein konsantrasyonu $C_p=0,2$ mg/ml olacak şekilde enzimden $0,2$ mg/ml $\times$ 2 ml = $0,4$ mg proteine karşılık gelen hacim alınmıştır. PEG ve dekstran konsantrasyonu farklı oranda kompleksler hesaplanmıştır. Penisilin şişelerinde protein/polimer (2 ml enzim + 2 ml PEG ve 2 ml enzim + 2 ml dekstran) reaksiyonu 4°C 'de ve 1 saat boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla gerçekleşmiştir [71],[97].

5.3.3 Enzim Polimer Komplekslerinin Aktivite Tayini

5.3.3.1 Polietilen Glikol/Üreaz Komplekslerine Ait Aktivite Tayinleri

Değişik mol oranlarında hazırlanmış Üreaz/Peg-aldehit kompleksleri (1/1, 1/5, 1/10, 1/20, 5/1, 10/1, 20/1, 30/1) substrat olan üre ile 30 dakika boyunca su banyosunda etkileşime sokulmuştur. Bu etkileşim tamamlandıktan sonra reaksiyonu durdurmak için fenol reaktifi ve alkali hipoklorit çözeltisi yardımıyla $50-60^\circ\text{C}$ 'de 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

İşlemler tamamlandıktan sonra, 630 nm dalga boyunda absorbanst ölçümü yapılmış ve aktivite hesaplanmıştır [95].

5.3.3.2 Dekstran/Üreaz Komplekslerine Ait Aktivite Tayinleri

Değişik mol oranlarında hazırlanmış Üreaz/Dekstran-aldehit kompleksleri (1/1, 1/5, 1/10, 1/20, 10/1, 20/1, 30/1, 40/1, 50/1) substrat olan üre ile 30 dakika boyunca su banyosunda etkileşime sokulmuştur. Bu etkileşim tamamlandıktan

sonra reaksiyonu durdurmak için fenol reaktifi ve alkali hipoklorit çözeltisi yardımıyla 50-60°C'de 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

İşlemler tamamlandıktan sonra, 630 nm dalga boyunda absorbanans ölçümü yapılmış ve aktivite hesaplanmıştır [95].

5.3.4 Mikro Boyutlarda Potansiyometrik Amonyum Seçici Elektrodun Hazırlanması ve Testi

Çalışmada yeni bir teknolojiyle kompozit materyalden potansiyometrik mikro boyuta sahip amonyum duyarlı sensör hazırlanacaktır. Bu şekilde hazırlanacak sensör iç referans elektrot ve referans çözelti içermeyecektir.

Kütlece %50 grafit, % 35 epoksi ve % 15 sertleştiriciden oluşan karışıma yeterli miktarda THF ilave edilerek homojen olacak şekilde iyice karıştırılacaktır. Elektrot gövdesini teşkil eden, çapı 1.0 mm olan bakır telin yüzeyi, THF içeriği uçurularak uygun kıvama getirilen katı-kontakt karışımına daldırılarak kaplanacaktır. Katı-kontaktla kaplanan bakır teller, 24 saat süreyle 50 °C'taki etüvde kurutulacaktır [60],[98],[99], [100],[101].

5.3.4.1 Amonyum Seçici Membranlarının Hazırlanışı

Amonyum seçici elektrot membranları aşağıda anlatılan iki farklı yöntemle hazırlanmıştır.

- i) Toplam kütle 100 mg olacak şekilde %32 karboksillenmiş PVC bazlı polimer, %65 bis (2-etilhekzil) sebakat (plastikleştirici) ve %3 nonaktin (iyonofor) 1 ml THF'ye ilave edilecek ve iyice çözünene kadar ultrasonik karıştırıcıda karıştırılacaktır. Böylece, katı kontakt yüzeylere kaplanacak olan elektrot membranları elde edilecektir [102], [68].
- ii) Toplam kütle 100 mg olacak şekilde %30 PVC polimeri, %3 palmitik asit, %3 nonaktin, %64 bis (2-etilhekzil) sebakat (plastikleştirici) 1 ml THF'ye ilave edilecek ve iyice çözünene kadar ultrasonik karıştırıcıda karıştırılacaktır. Böylece, katı kontakt yüzeylere kaplanacak olan elektrot membranları elde edilecektir [68], [102], [103].

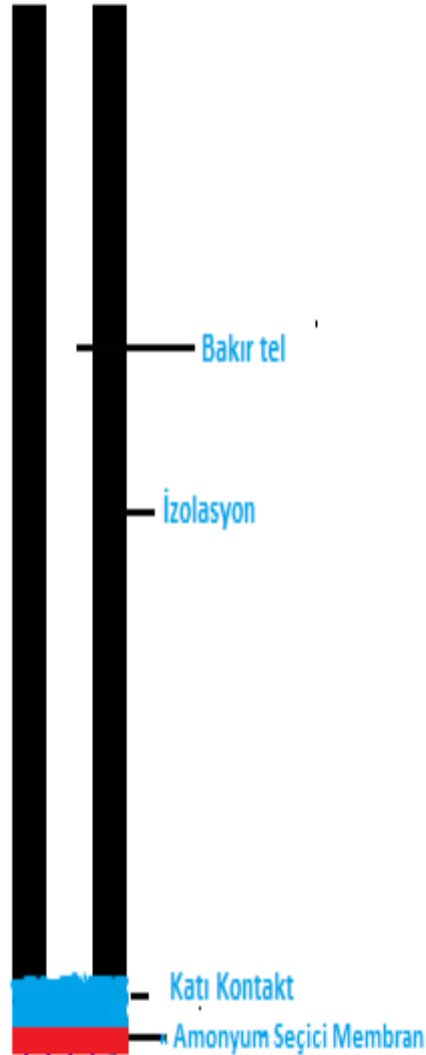
5.3.4.2 Membranların Katı Kontakt Yüzeylere Kaplanması

Yüzeyleri katı kontakla kaplanmış olan bakır teller, hazırlanan membran çözeltilerine uygun kalınlıkta membran elde edilecek şekilde 2-3 defa

daldırılarak kaplanacaktır. Kaplanan elektrot membranları, 6 saat süresince karanlıkta oda koşullarında kurumaya bırakılacaktır.

5.3.4.3 Elektrotların Koşullandırılması

Amonyum seçici elektrotlar kurutulduktan sonra, amonyum klorür tuzundan hazırlanan 10^{-2} M'lık çözeltide 12 saat süreyle koşullandırılacaktır. Elektrotlar, kullanım zamanları dışında oda koşullarında karanlıkta tutulacaktır. Kullanımdan önce PVC membran elektrotlar, 10^{-1} M'lık NH_4Cl çözeltisinde yaklaşık 15 dk. koşullandırılacaktır.



Şekil 5. 4 Amonyum Seçici Elektrodun Şematik Gösterimi

5.3.4.4 Amonyum Seçici Elektrotlarının Potansiyometrik Davranışlarının İncelenmesi

Amonyum klorür (10^{-1} M ve 10^{-5} M) çözeltileri kullanılarak iki farklı yöntemle de hazırlanan amonyum elektrotlarının potansiyelleri okundu (mV) ve çalışma aralıkları belirlendi.

5.3.5 Dekstran/Üreaz Kompleksinin Amonyum Seçici Elektrot Yüzeyine İmmobilizasyonu

Üreaz enzimini daha önceki çalışmalarda dekstran polimeri ile stabilizasyonunu gerçekleştirmiştik. Dekstran polimeri ile stabilize olan üreaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği oran ($n_{\text{üreaz}}/n_{\text{dekstran}}$):40/1 olarak bulunmuştur. Bu oranlı kompleks iki farklı yöntemle hazırlanan amonyum seçici membranlar yüzeyine immobilize edilmesi amaçlanmıştır.

- 2 ml'lik çözelti içerisinde 30 mg üreaz olacak şekilde hazırlanan üreaz-dekstran aldehit kompleksinden 1ml alınarak 5 mg karbodimid ile karıştırılmıştır. Bu karışım elektrot yüzeyine damlatılıp 1 gece buzdolabında bekletilmiştir.
- Daha sonra elektrot yüzeyine %2.5 glutaraldehit çözeltisi damlatılıp, 1 saat bekletilip bağlanmayan glutaraldehitlerin uzaklaştırılması için elektrot yüzeyi distile su ile yıkanmıştır.
- Kalan 1 ml'lik üreaz-dekstran kompleksi elektrot yüzeyinde tekrar damlatılıp 1 gece kuruması beklenmiştir. Ölçüm alınmadan önce bağlanmayan enzimlerin uzaklaştırılması için distile su ile yıkanmıştır. Elektrotlar kullanımları dışında $+4^{\circ}$ C'de saklanmaktadır [102], [103], [104].

5.3.6 Polietilen glikol/Üreaz Kompleksinin Amonyum Seçici Elektrot Yüzeyine İmmobilizasyonu

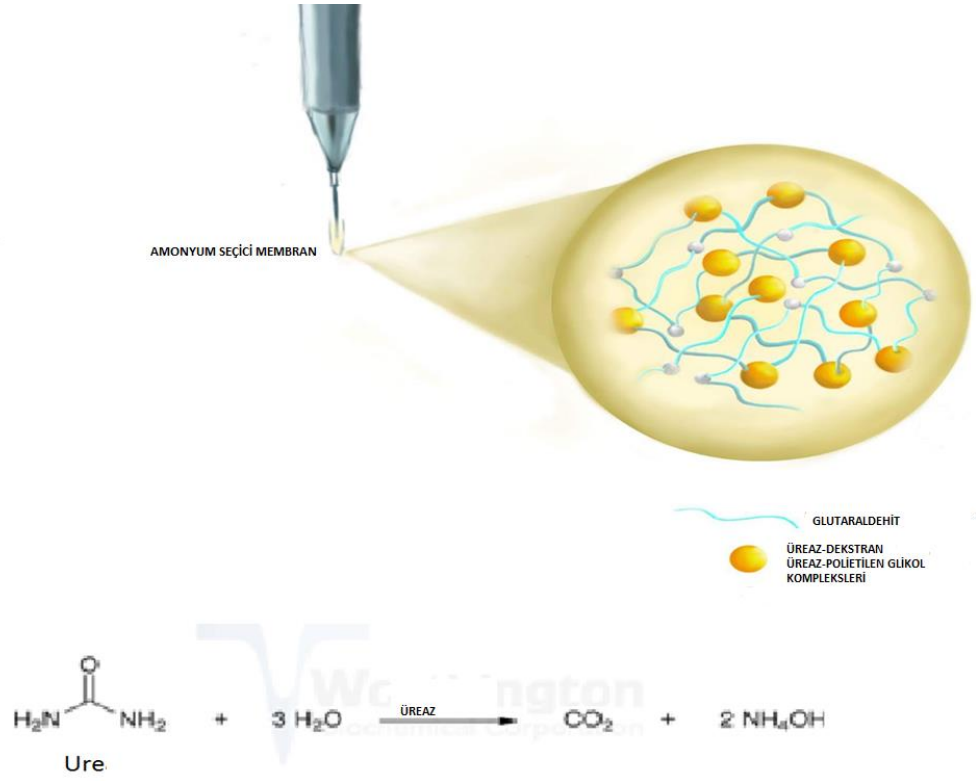
Üreaz enzimini daha önceki çalışmalarda polietilen glikol polimeri ile stabilizasyonunu gerçekleştirmiştik. Polietilen glikol polimeri ile stabilize olan üreaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği oran ($n_{\text{üreaz}}/n_{\text{polietilen glikol}}$): 1/1 olarak

bulunmuştur. Bu oranlı kompleks iki farklı yöntemle hazırlanan amonyum seçici membranlar yüzeyine immobilize edilmesi amaçlanmıştır.

- 2 ml'lik çözelti içerisinde 30 mg üreaz olacak şekilde hazırlanan üreaz-polietilen glikol aldehit kompleksinden 1ml alınarak 5 mg karbodimid ile karıştırılmıştır. Bu karışım elektrot yüzeyine damlatılıp 1 gece buzdolabında bekletilmiştir.
- Daha sonra elektrot yüzeyine %2.5 glutaraldehit çözeltisi damlatılıp, 1 saat bekletilip bağlanmayan glutaraldehitlerin uzaklaştırılması için elektrot yüzeyi distile su ile yıkanmıştır.
- Kalan 1 ml'lik üreaz-polietilen glikol kompleksi elektrot yüzeyinde tekrar damlatılıp 1 gece kuruması beklenmiştir. Ölçüm alınmadan önce bağlanmayan enzimlerin uzaklaştırılması için distile su ile yıkanmıştır. Elektrotlar kullanımları dışında +4° C'de saklanmaktadır [102], [103], [104].



Şekil 5. 5 Hazırlanan Üre Biyosensörünün Genel Görüntüsü



Şekil 5. 6 Üre Biyosensörünün Şematik Görüntüsü

5.3.7 Üre Biyosensörlerinin Analitik Davranışlarının İncelenmesi

5.3.7.1 Üre Biyosensörlerinin Çalışma Aralıklarının Belirlenmesi

Üre biyosensörlerinin çalışma aralıklarının belirlenmesi için tris tamponunda hazırlanmış (pH:7,2) çeşitli üre konsantrasyonlarının potansiyometre cihazında potansiyel değerleri (mv) okunmuştur ve her bir biyosensörün çalışma aralıkları belirlenmiştir.

5.3.7.2 Üre Biyosensörlerinin Farklı pH'larda ki Davranışı

Üre biyosensörlerinin 10^{-2} M - 10^{-4} M arasındaki farklı pH'larda tris tamponuyla hazırlanan (pH 5,2; pH 6,2; pH 7,2; pH 8,2) üre çözeltilerindeki potansiyel değerleri (mv) okunmuştur. Her bir pH için $-\log[\text{üre}]$ 'ye karşı potansiyel değerleri (mV) grafiğe geçirildi ve grafiğin eğimleri hesaplanarak biyosensörlerin optimum pH değerleri belirlendi.

5.3.7.3 Üre Biyosensörlerinin Farklı Sıcaklıklardaki Davranışı

Üre biyosensörlerinin 10^{-2} M - 10^{-4} M arasındaki farklı sıcaklıklarda tris tamponuyla hazırlanan (25°C, 30°C, 35°C, 40°C ve 45°C) üre çözeltilerindeki potansiyel değerleri (mv) okunmuştur. Her bir sıcaklık için $-\log[\text{üre}]$ 'ye karşı potansiyel değerleri (mV) grafiğe geçirildi ve grafiğin eğimleri hesaplanarak biyosensörlerin optimum sıcaklıkları belirlendi.

5.3.7.4 Üre Biyosensörlerinin Tekrarlanabilirliklerinin İncelenmesi

Üre biyosensörlerinin tekrarlanabilirliklerini belirlemek için 10^{-4} ve 10^{-2} molar arasında ki (pH 7,2) standart üre çözeltilerinde aynı gün içerisinde aynı anda 8-10 defa potansiyel değerleri okunmuştur. Her bir ölçümün $-\log[\text{üre}]$ 'ye karşı potansiyel değerleri (mV) grafiğe geçirildi ve her bir biyosensörün eğimleri belirlendi. Bulunan eğim değerlerinin bağıl standart sapmaları (%B.S.S.) hesaplandı. B.S.S değeri %10 dan az ise biyosensörün tekrarlanabilirliği yüksektir.

5.3.7.5 Üre Biyosensörlerinin Seçicilikleri

Hazırlanan biyosensörlerin Na^+ , Ca^{2+} , K^+ ve Li^+ iyonlarına karşı potansiyometrik seçiciliklerini incelemek için ilgili iyonların pH 7.2'de NaCl, CaCl_2 , KCl, LiCl çözeltilerini hazırladık. Her bir tuzun potansiyometrik mV okuması yapılarak sonuçlar kaydedildi. Elde edilen sonuçlar IUPAC tarafından önerilen ayrı çözeltiler yöntemiyle hesaplanarak biyosensörlerin seçicilik katsayıları belirlendi.

5.3.7.6 Üre Biyosensörlerinin Cevap Zamanı

Hazırlanan üre biyosensörlerinin cevap zamanlarını belirleyebilmek için 10^{-4} ve 10^{-2} molar arasındaki (pH 7,2) standart üre çözeltilerinin her birine biyosensör daldırılarak ölçülen potansiyel değerinin sabit hale gelmesi için geçen süre kaydedildi.

5.3.7.7 İnsan Kan Serumlarında Üre Tayini ve İstatistiksel Hesaplamaları

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'ndan alınan insan kan serumu örneklerinde kalibrasyon eğrisi çizilerek üre tayini yapılmıştır. Deneyssel olarak bulduğumuz üre miktarları ile hastane laboratuvarında kullanılan "ARCHITECT 7D75 Urea Nitrogen Reagent Kit" ile bulunan üre miktarları

istatistiksel olarak SPSS programı ile bağımlı iki örneklem t testi yapılarak karşılaştırılmıştır. Deneysel olarak bulduğumuz üre sonuçlarının gerçek sonuçlara göre ne kadar anlamlı olup olmadığı bu test ile belirlenmiştir.

SPSS programında;

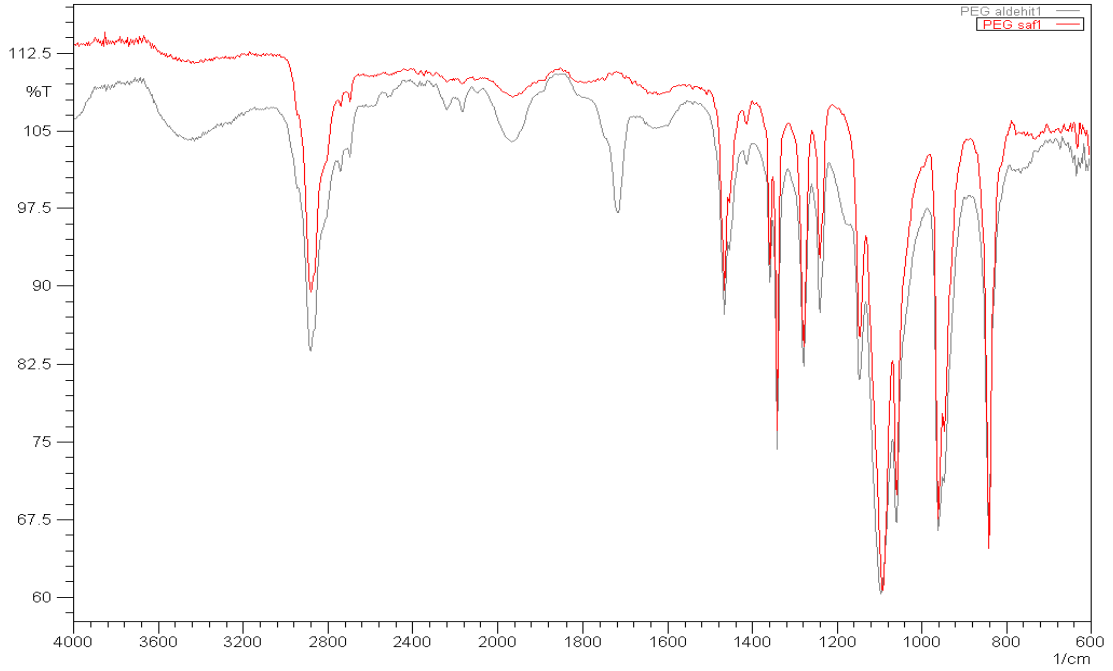
H_0 : Farksızlık hipotezidir, istenilen durumun belirtildiği yerdir. Gerçek değerler ile deneysel değerler arasında fark yoktur şeklinde kurulur.

H_s : Alternatif hipotezidir, farklılık üzerine kurulur.

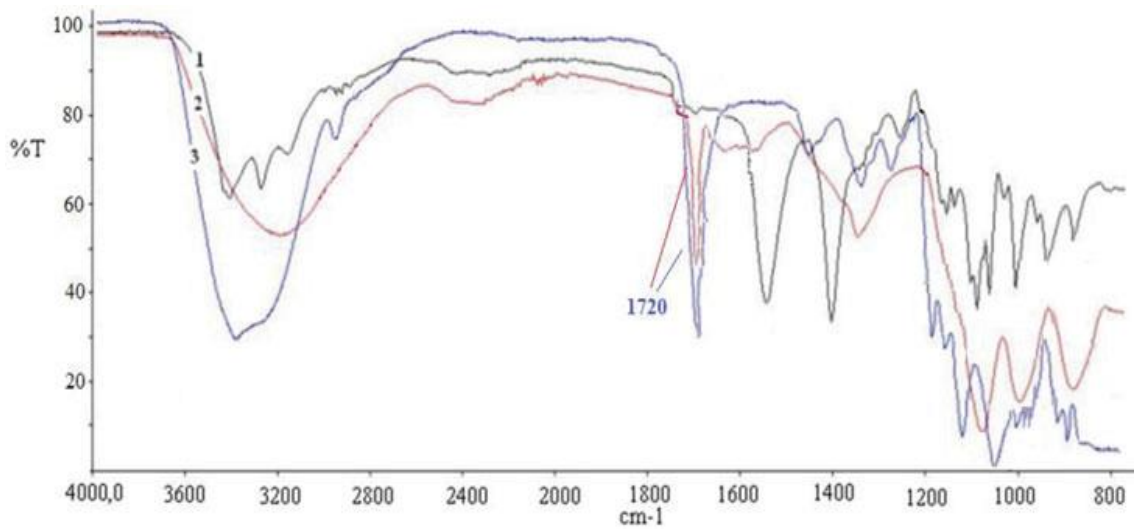
Sig: Anlamlılık düzeyi (p). P değeri bir karşılaştırmada “**istatistiksel anlamlı** fark vardır” kararı vereceğimiz zaman yapacağımız olası hata miktarını gösterir. Maksimum kabul edilebilir düzeyi 0,05 olarak belirlenmiştir. SPSS paket programında p değeri Sig. kısaltması ile verilmektedir. Sig. “significance” (anlamlılık) kelimesinin kısaltmasıdır. SPSS dışındaki bütün programlar ise P değerini “P value” ya da P olarak belirtmektedir.

α : Anlamlılık düzeyinin karşılaştırılması için kullanılan güven aralığı değerinin simgesidir. Genelde %95 (0,05) olarak belirlenir [105], [106].

6.1 Polietilen Glikol (PEG) Aldehit Türevinin ve Dekstran Aldehit Türevinin FTIR Spektrumları



Şekil 6. 1 PEG Aldehit Türevinin FTIR Spektrumu

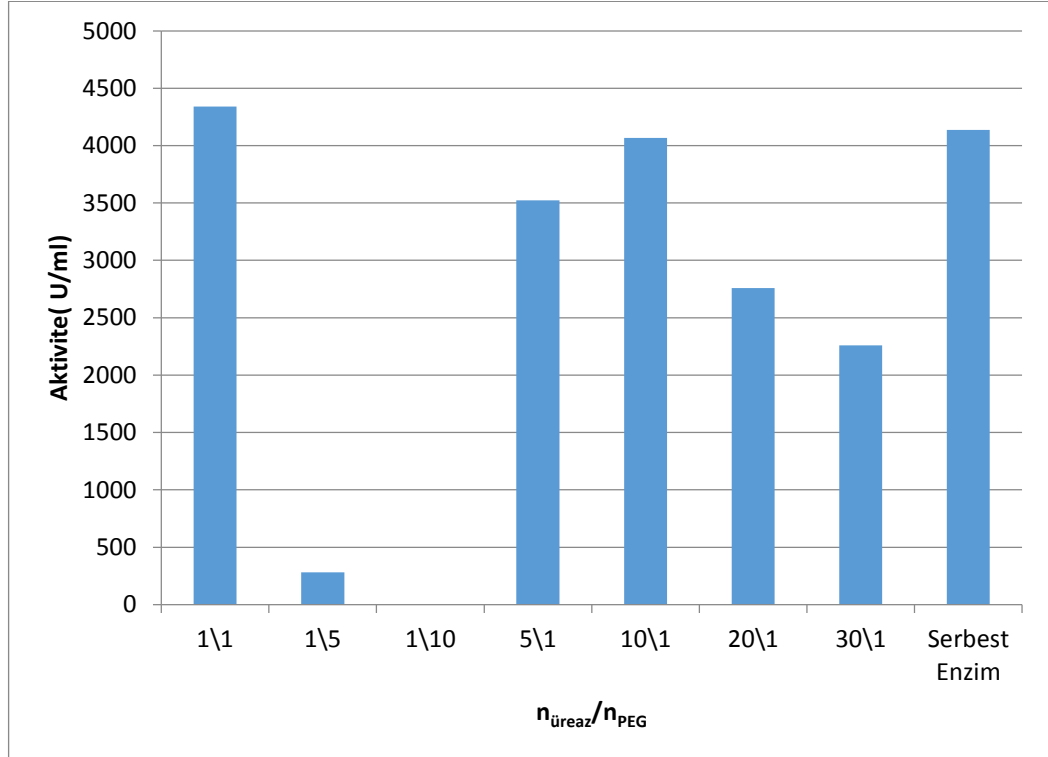


Şekil 6. 2 Dekstran Aldehit Türevinin FTIR Spektrumu

Dekstran aldehidin ve polietilen glikol aldehidin spektrumlarında $2750-2900\text{ cm}^{-1}$ dalga boyunda (C-H aldehid gerilmesi) aldehid grubunun, $1720-1639\text{ cm}^{-1}$ dalga boyunda ise C=O aldehid gerilmesinin bandları görülmektedir [97], [107]. Literatürde de benzer sonuçlar görülmektedir [108], [97], [109], [110].

6.2 Enzim Polimer Komplekslerinin Aktivite Tayini Sonuçları

6.2.1 Polietilen Glikol/Üreaz Komplekslerine Ait Aktivite Tayini Sonuçları



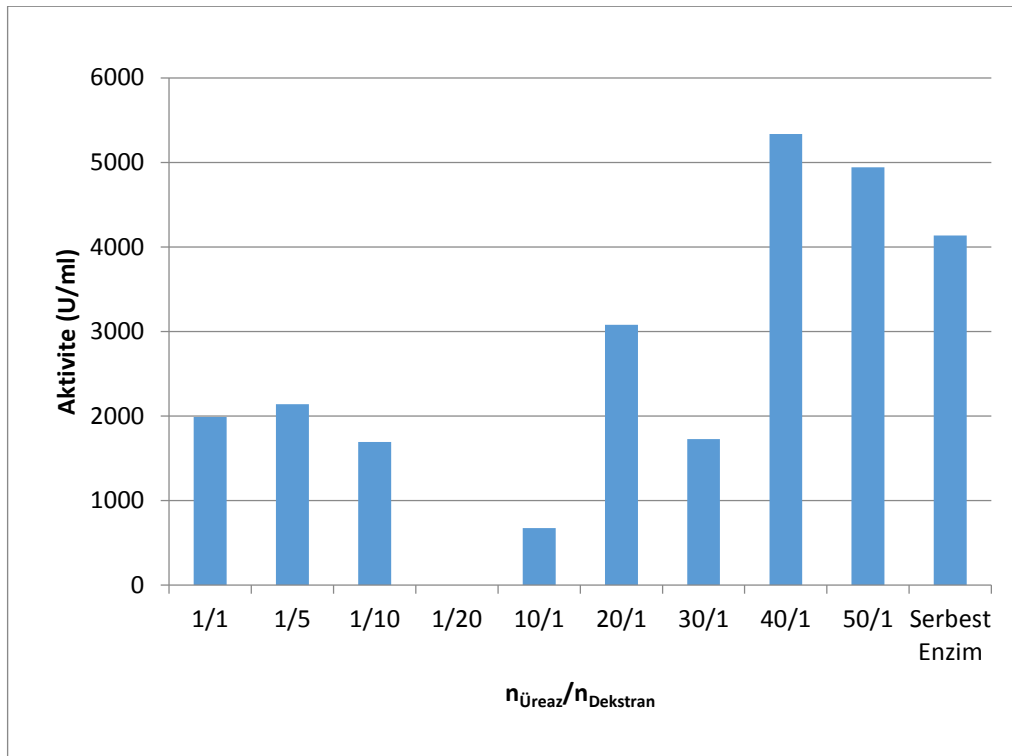
Şekil 6. 3 Polietilen Glikol/Üreaz Komplekslerinin Aktivite Tayini Sonuçları

25°C 'de pH 7 Fosfat tamponunda $n_{\text{üreaz}}/n_{\text{peg}}$ oranlı 6 farklı kompleksin ve serbest enzimin aktivite değerleri Şekil 6.3'de verilmiştir. Grafikte görüleceği üzere $n_{\text{üreaz}}/n_{\text{peg}} : 1/1$ oranlı kompleks serbest enzimden daha yüksek ve ayrıca diğer komplekslere göre en yüksek aktivite değerini göstermiştir. [18], [102].

Üreaz / PEG oranı azaldıkça toplam aktivite artmıştır, dolayısıyla $n_{\text{üreaz}}/n_{\text{peg}} : 1/1$ kompleksi maksimum aktivite göstermiştir. Literatüre göre, eklenen üreaz miktarının artması ile modifikasyon etkinliği azalmaktadır. Bu nedenle, sonuçlarımız mevcut literatürle paraleldir [102],[111]. Üreazın bir polimer tarafından immobilizasyonu sonucu, serbest üreaz enzimi ile karşılaştırıldığında

aktivitede azalmaya neden olmaktadır [112]. Protein yapısındaki konformasyonel değişiklikler ve erişilebilir aktif bölgelerin azalması nedeniyle enzim aktivitesindeki azalmayı gösteren farklı polimerlerle üreazın kovalent modifikasyonunu gerçekleştiren birkaç çalışma vardır [113], [114]. Bununla birlikte, çalışmamızda üreaz ve PEG konsantrasyonunun eşitliği en yüksek enzim aktivitesini beraberinde getirmektedir.

6.2.2 Dekstran/Üreaz Komplekslerine Ait Aktivite Tayini Sonuçları



Şekil 6. 4 Dekstran/Üreaz Komplekslerine Ait Aktivite Tayini Sonuçları

25°C'de pH 7 Fosfat tamponunda $n_{\text{üreaz}}/n_{\text{Dekstran}}$ oranlı 8 farklı kompleksin ve serbest enzimin aktivite değerleri Şekil 6.4'de verilmiştir. Grafiğe bakılarak 40/1 oranlı kompleks diğer oranlara göre en yüksek aktivite değeri ve ayrıca serbest enzimden daha yüksek aktivite değeri göstermektedir.[71], [97].

Şekil 6.4'de üreaz dekstran kompleksinin aktivitesinin, sabit üreaz konsantrasyonunda eklenen polimer miktarına bağlı olduğunu görmekteyiz. Bununla birlikte, aynı zamanda, maksimum aktiviteye $n_{\text{üreaz}}/n_{\text{Dekstran}}$ 40/1 oranında ulaşıldıktan sonra, dekstran/üreaz kompleksinin enzimatik aktivitesinin,

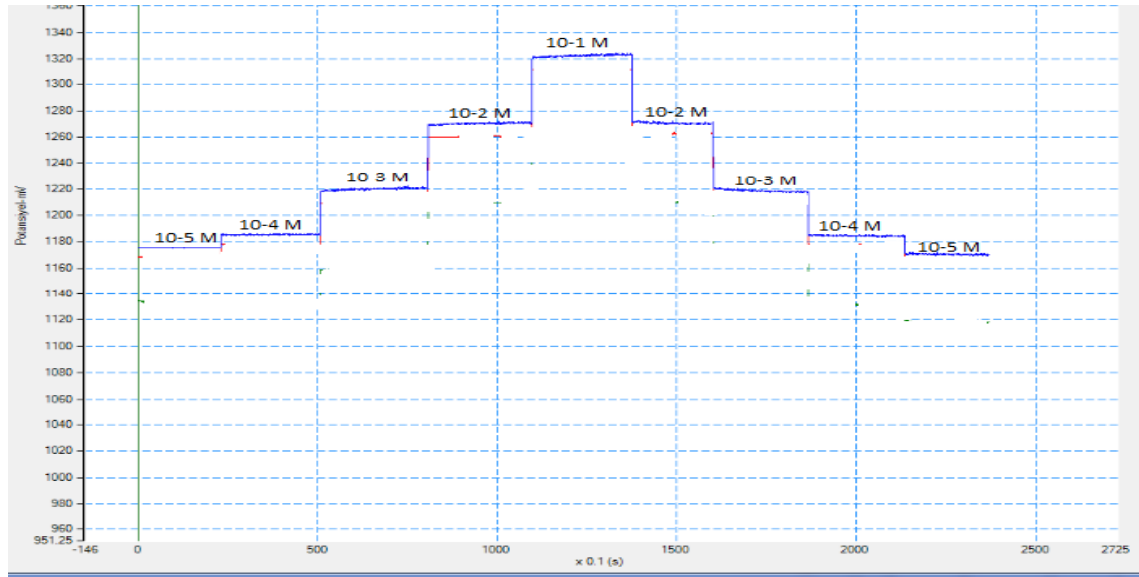
kompleks içindeki polimer konsantrasyonunun artmasıyla azaldığı görülmektedir. Molar oranına karşı aktivitedeki değişim, enzim molekülleri etrafında kalın bir polimer kılıfın oluşmasından dolayı olabilir ve enzimin etrafındaki polimer tabakası çok kalın olduğunda, enzimin substrat ile temasını önlemek için enzim aktif merkezi bloke edilebilir, enzim aktivitesi düşebilir [115]. Ayrıca, literatüre göre, poliol molekülleri, protein molekülünün yüzey tabakasından tercihen dışlanır ve protein molekülü etrafındaki su kabuğu korunur, böylece proteinin konformasyonu daha rijid hale gelir [116].

Daha önceki çalışmalarımızda da, enzim ve polimerin molar oranının enzim-polimer kompleksinin aktivitesini yönettiğini bulduk [108], [117], [118], [119].

Sonuç olarak iki farklı polimer ile stabilize olan üreaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği oranlar ($n_{\text{üreaz}}/n_{\text{peg}}:1/1$) ve ($n_{\text{üreaz}}/n_{\text{Dekstran}}:40/1$) biyosensör üretimi için seçilmiştir.

6.3 Amonyum Seçici Elektrotların Potansiyometrik Davranışı

6.3.1 Karboksillenmiş PVC Membranına Dayalı (PVC-COOH) Amonyum Seçici Elektrodun Potansiyometrik Davranışı



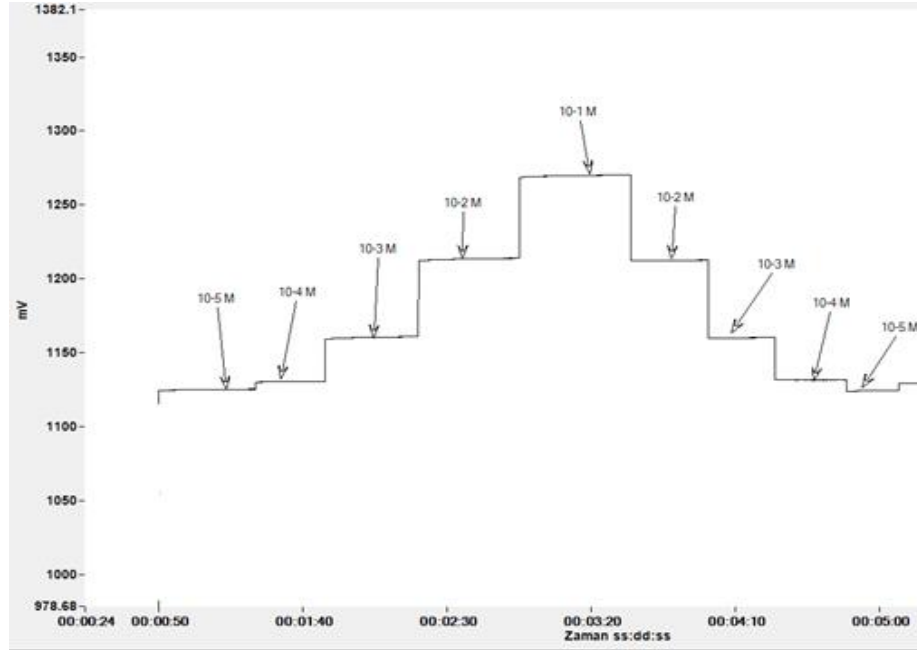
Şekil 6. 5 PVC-COOH Membranına Dayalı Amonyum Seçici Elektrodun Standart Amonyum Klorür Çözeltilerindeki Potansiyel-Zaman Değişimi

Tablo 6. 1 PVC-COOH Membranına Dayalı Amonyum Seçici Elektrodun Potansiyometrik Özellikleri

Çalışma aralığı	10^{-1} - 10^{-5} M
Nernst davranışı, (mV/Her onkat)	50 ± 2
Cevap zamanı	< 15 s
Yaşam süresi	10 Hafta

Literatürdeki bazı çalışmalarda PVC-COOH Amonyum seçici elektrodun çalışma aralığı 10^{-1} - 10^{-5} M [99]; nerst davranışı 50 ± 5 mv, 51 ± 1.55 mv [120]; cevap zamanları 22 saniyeden düşük [120], 10 saniye olarak bulunmuştur [99].

6.3.2 PVC-Palimitik Asit Membranına Dayalı Amonyum Seçici Elektrodun Potansiyometrik Davranışı



Şekil 6. 6 PVC-Palmitik asit Membranına Dayalı Amonyum Seçici Elektrodun Standart Amonyum Klorür Çözeltilerindeki Potansiyel-Zaman Değişimi

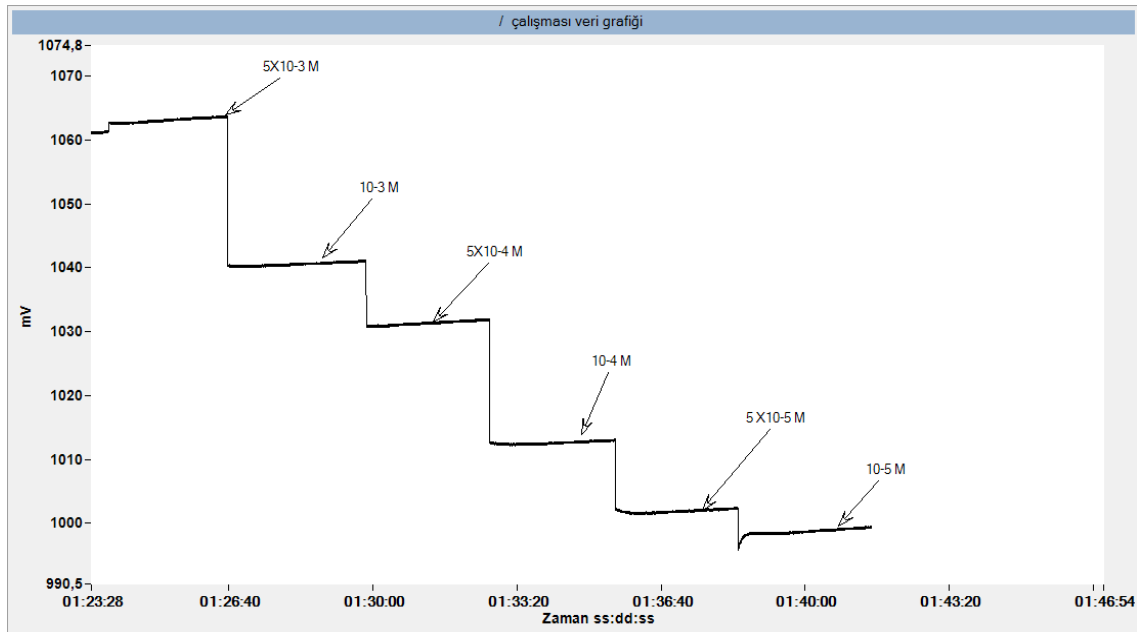
Tablo 6. 2 PVC-Palmitik asit Membranına Dayalı Amonyum Seçici Elektrodun Potansiyometrik Özellikleri

Çalışma aralığı	10^{-1} - 10^{-5} M
Nernst davranışı, (mV/Her onkat)	50 ± 5
Cevap zamanı	< 15 s
Yaşam süresi	9-10 Hafta

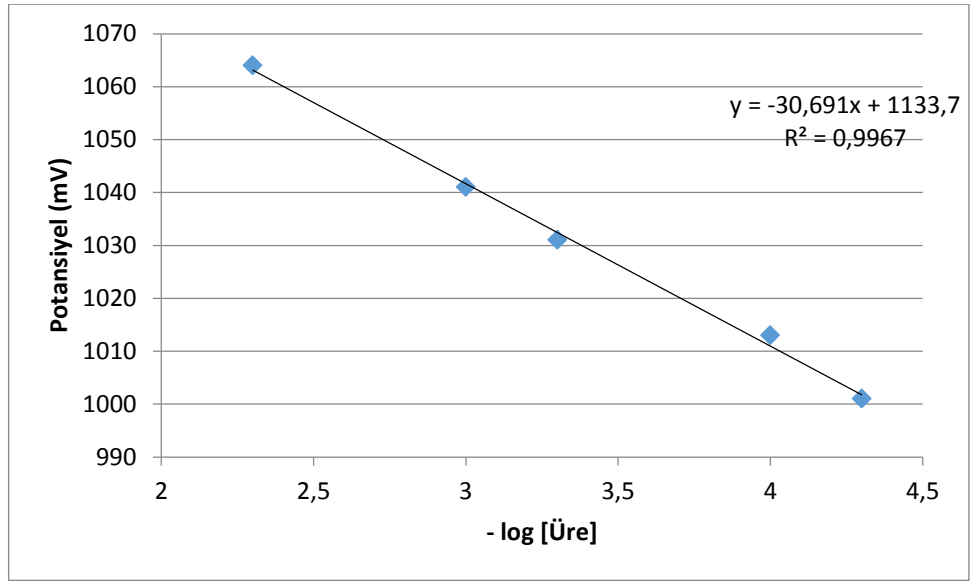
Literatürdeki çalışmada PVC-Palmitik asit amonyum seçici elektrodun çalışma aralığı 47 ± 5 mv, cevap zamanı 15 saniyeden aşağıda bulunmuştur [99].

6.4 Üre Biyosensörlerinin Çalışma Aralıklarının Belirlenmesi

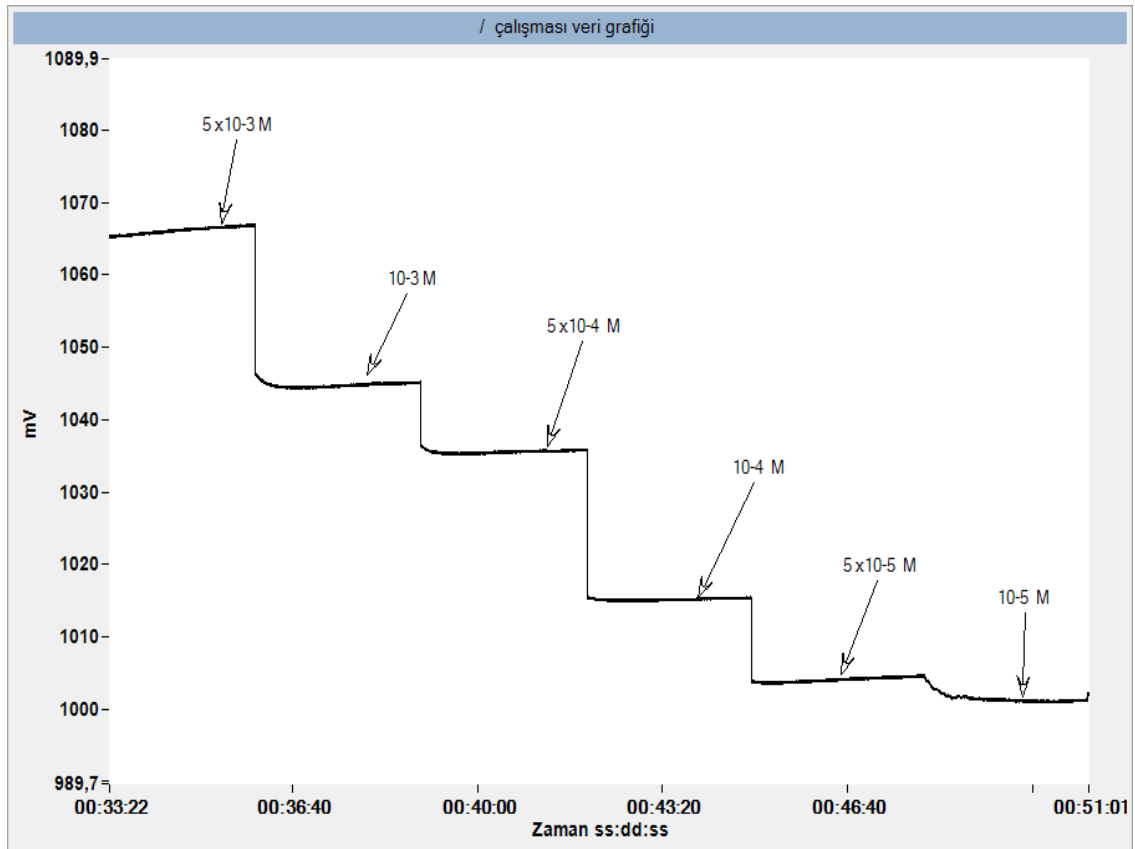
6.4.1 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Çalışma Aralıklarının Belirlenmesi



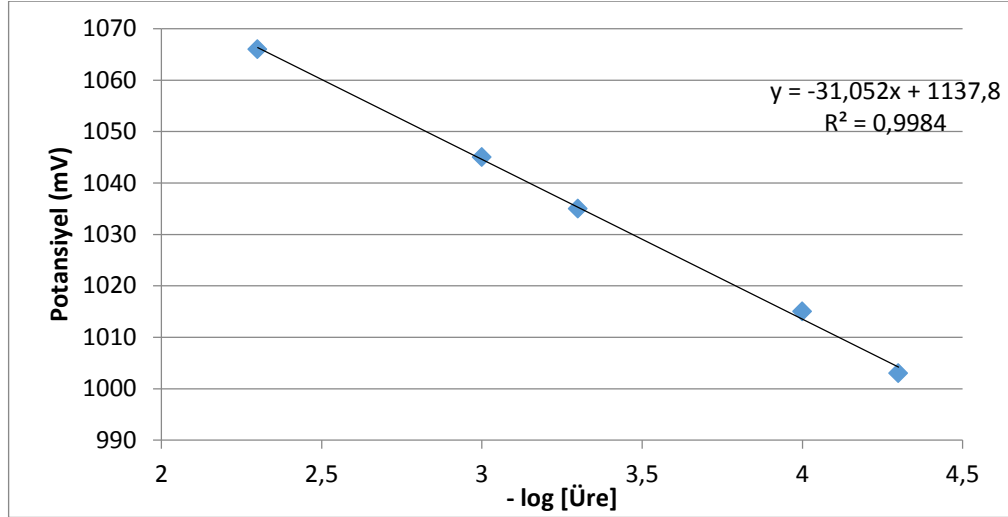
Şekil 6. 7 PVC-Palmitik Asit-Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Çalışma Aralığı



Şekil 6. 8 PVC-Palmitik Asit-Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Kalibrasyon Grafiği



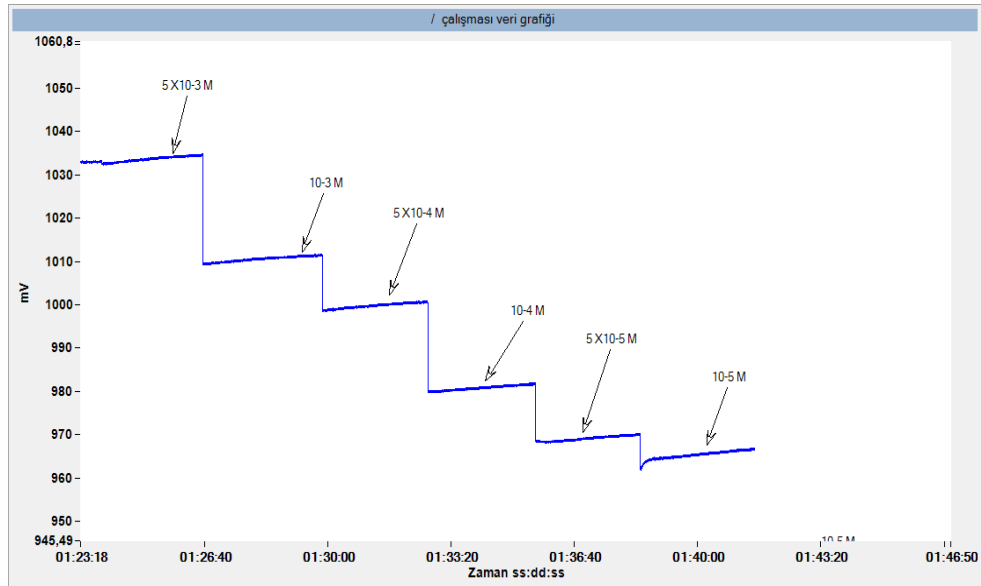
Şekil 6. 9 PVC-COOH-Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Çalışma Aralığı



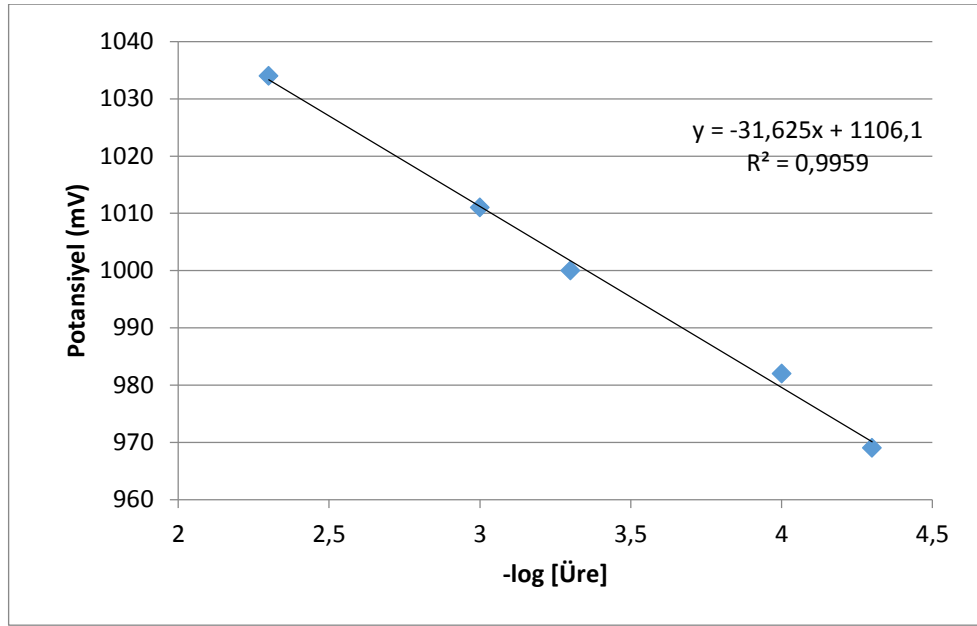
Şekil 6. 10 PVC-COOH-Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Kalibrasyon Grafiği

Şekil 6.7 ve Şekil 6.9’da üreaz’ın dekstran ile modifikasyonu sonucu oluşturulan üre biyosensörlerinin lineer çalışma aralıkları 5×10^{-5} M ile 5×10^{-3} M arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca bu biyosensörlerin Şekil 6.8 ve Şekil 6.10’da kalibrasyon grafiklerine bakacak olursak grafiklerin R^2 değerleri sırasıyla 0,9967 ve 0.9984 olarak bulunmuştur.

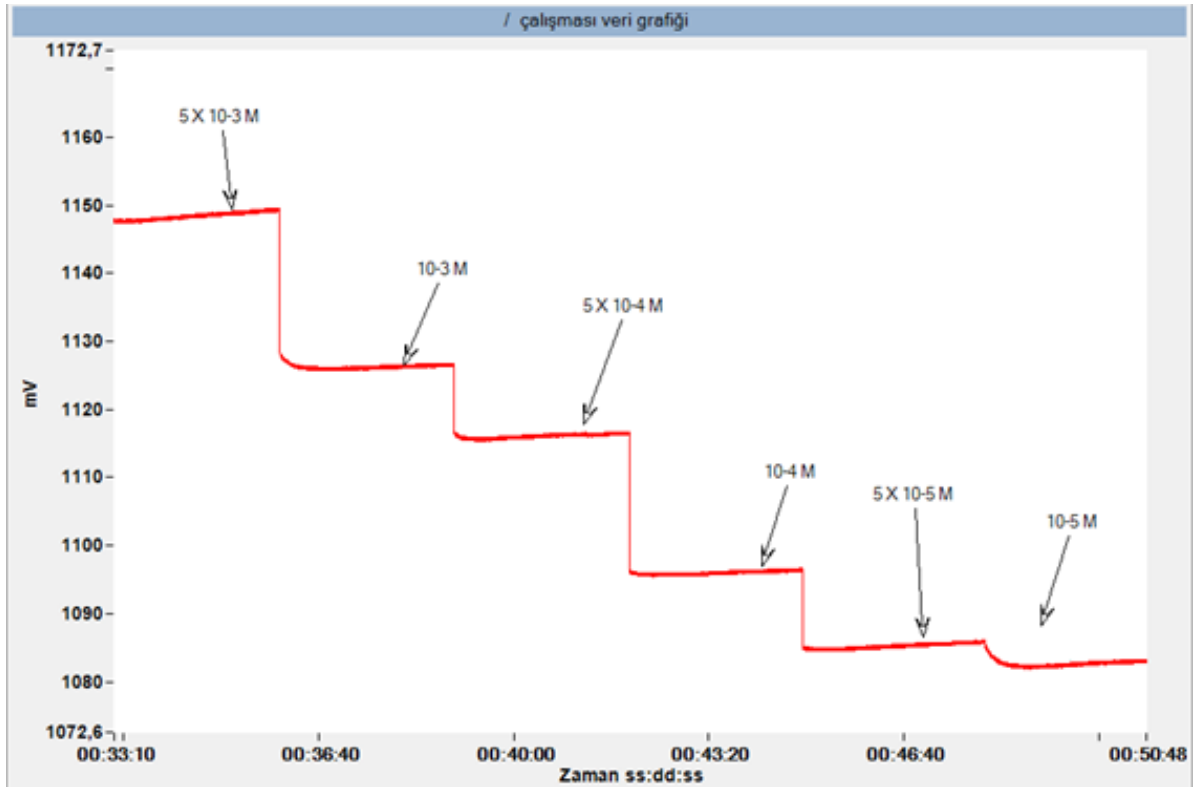
6.4.2 Üreaz’ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Çalışma Aralıklarının Belirlenmesi



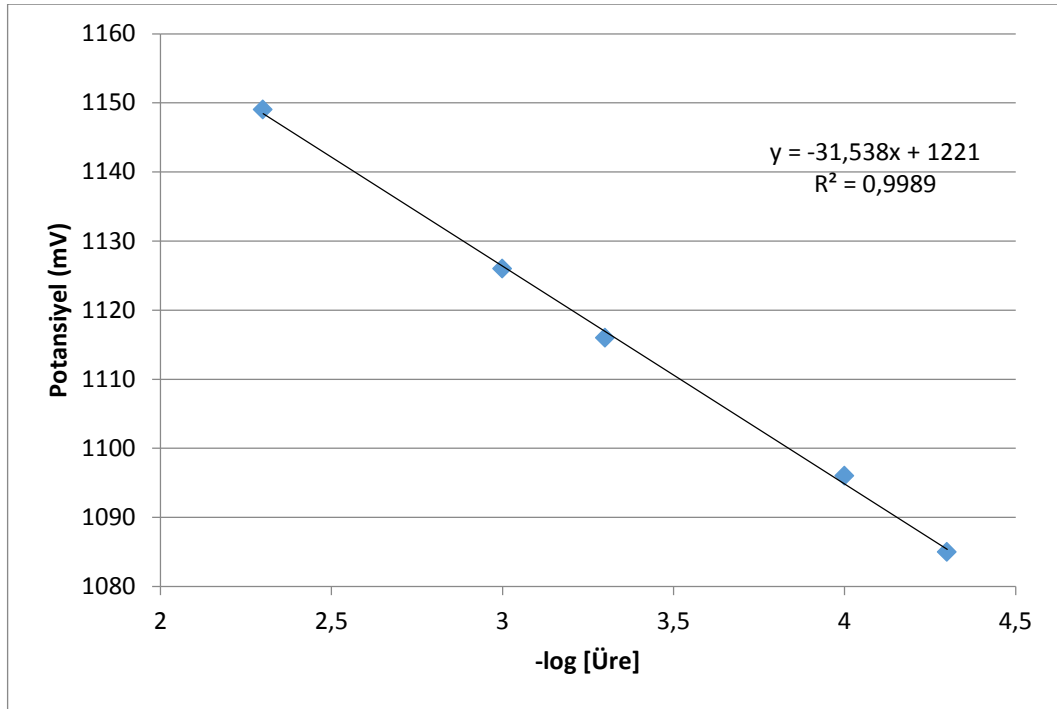
Şekil 6. 11 PVC-Palmitik Asit-Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Çalışma Aralığı



Şekil 6. 12 PVC-Palmitik Asit-Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Kalibrasyon Grafiği



Şekil 6. 13 PVC-COOH-Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Çalışma Aralığı



Şekil 6. 14 PVC-COOH-Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Kalibrasyon Grafiği

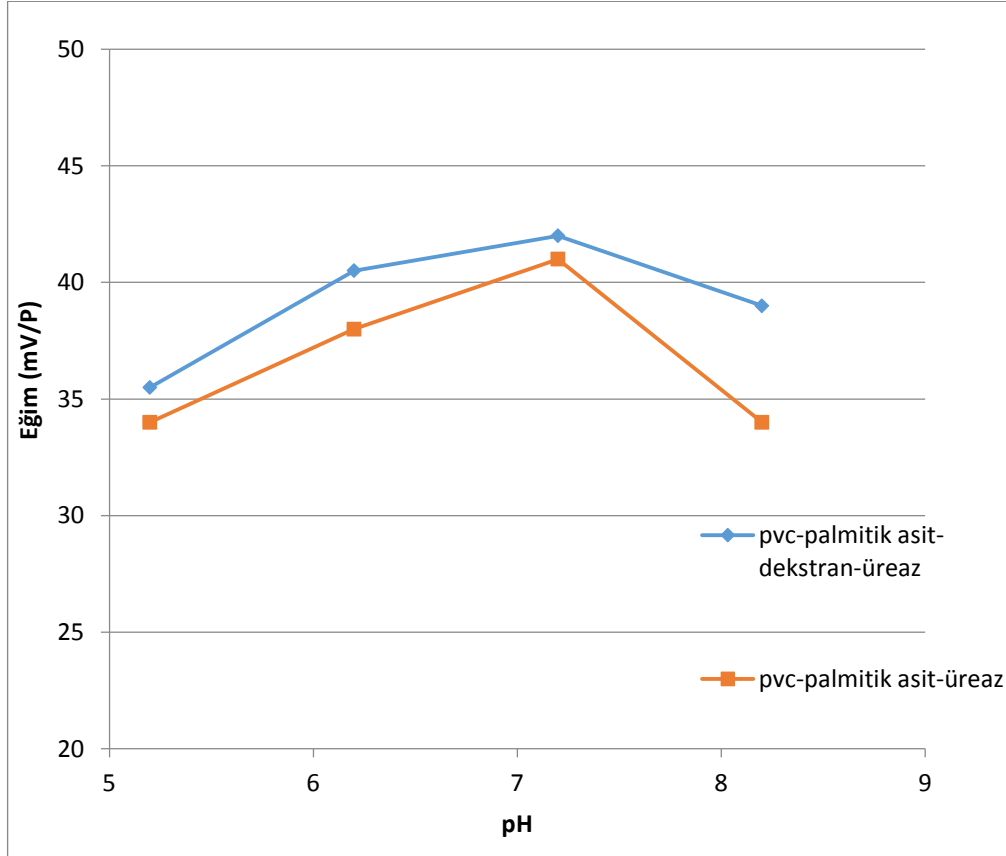
Şekil 6.11 ve Şekil 6.13’de üreaz’ın polietilen glikol ile modifikasyonu sonucu oluşturulan üre biyosensörlerinin lineer çalışma aralıkları 5×10^{-5} M ile 5×10^{-3} M arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca bu biyosensörlerin Şekil 6.12 ve Şekil 6.14’de kalibrasyon grafiklerine bakacak olursak grafiklerin R^2 değerleri sırasıyla 0,9959 ve 0.9989 olarak bulunmuştur.

Literatürdeki çalışmaları incelediğimizde; PVC-COOH membranına dayalı potansiyometrik üre biyosensörünün lineer çalışma aralığı 10^{-4} - 10^{-2} M arasında bulunmuştur [121], [58], PVC-COOH membranına dayalı diğer çalışmalarda sırasıyla 10^{-2} - 10^{-5} M [103], [52], 0.026 ve 10 mM [122], 0.3-70 mM [123], 10^{-1} - 10^{-5} M [124]. PVC-Palmitik asit membranına dayalı üre biyosensörünün lineer çalışma aralığı 10^{-2} - 10^{-5} M bulunmuştur [103]. PVC’nin amin grubu ile fonksiyonlaştırılmasından oluşan PVC-NH₂ membranına dayalı üre biyosensörünün lineer çalışma aralığı 5×10^{-2} - 5×10^{-4} M arasında bulunmuştur [60]. Poly(vinylferrocenium) film üzerine immobilize edilen üreaza dayalı oluşturulan üre biyosensörünün çalışma aralığı 5×10^{-5} - 1×10^{-1} M olarak

bulunmuştur [4]. Sonuç olarak hazırladığımız biyosensörlerin lineer çalışma aralıkları literatürdeki benzer membranlar kullanılarak hazırlanan üre biyosensörlerine göre benzer ya da yakın sonuçlar göstermektedir.

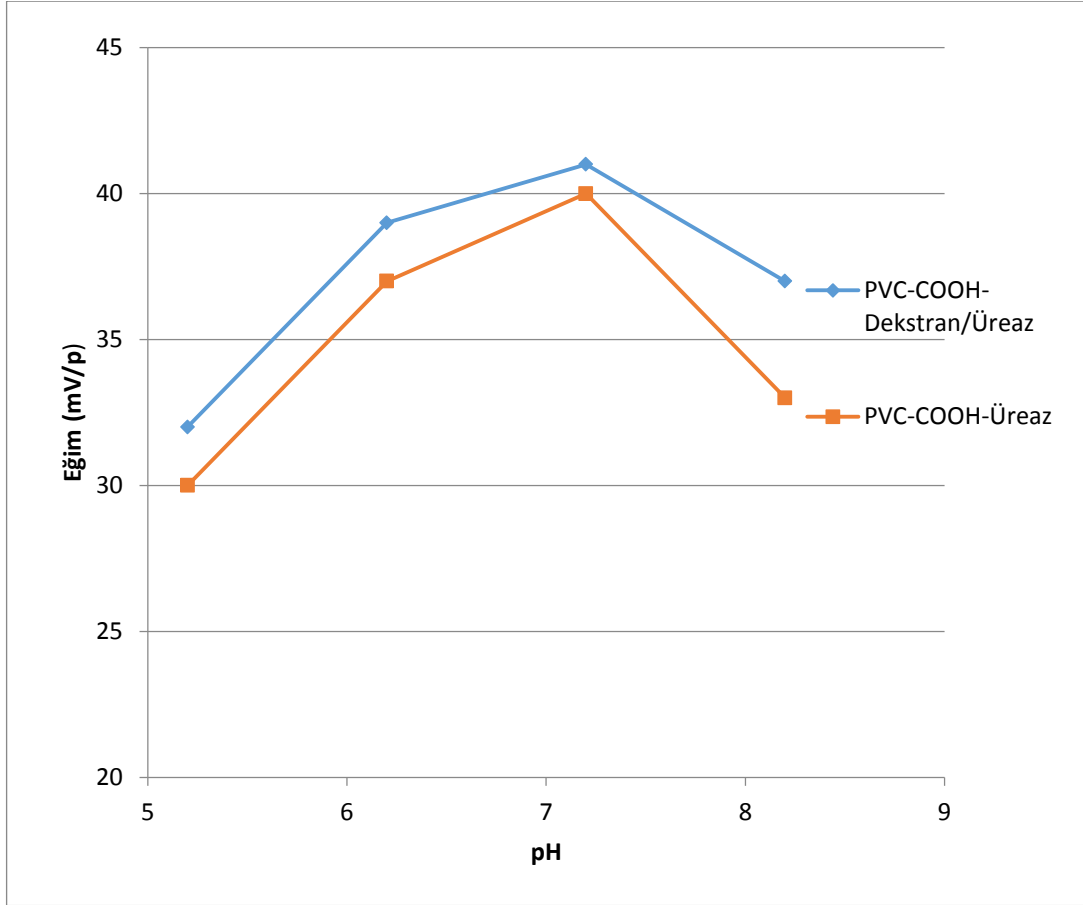
6.5 Üre Biyosensörlerine pH'nın etkisi

6.5.1 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Farklı pH'larda ki Potansiyometrik Davranışı



Şekil 6. 15 PVC-Palmitik Asit –Dekstran/Üreaz ve PVC-Palmitik Asit-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı pH Değerlerindeki Eğim Grafiği

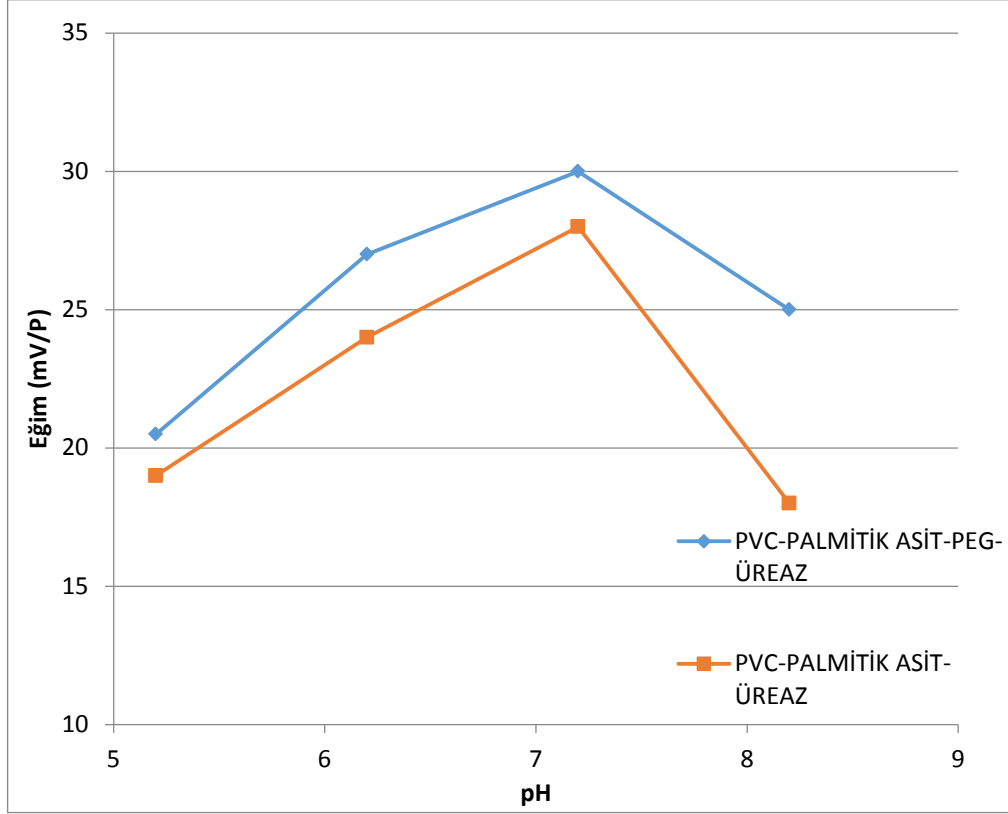
Şekil 6.15’de dekstran ile modifiye edilmiş üreazın ve serbest üreaz enziminin palmitik asitli membranda oluşturulduğu üre biyosensörlerinin pH 5,2; 6,2; 7,2 ve 8,2 tris tamponundaki üre çözeltilerinde eğim değerleri hesaplanmıştır .Görüleceği gibi her iki biyosensörde en iyi aktiviteyi pH 7.2’de göstermektedir. Modifiye edilmiş üre biyosensörü değişen pH değerlerinde özellikle 6,2 ve 7,2 arasında daha stabil davrandığı görülmüştür.



Şekil 6. 16 PVC-COOH-Dekstran/Üreaz ve PVC-COOH-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı pH Değerlerindeki Eğim Grafiği

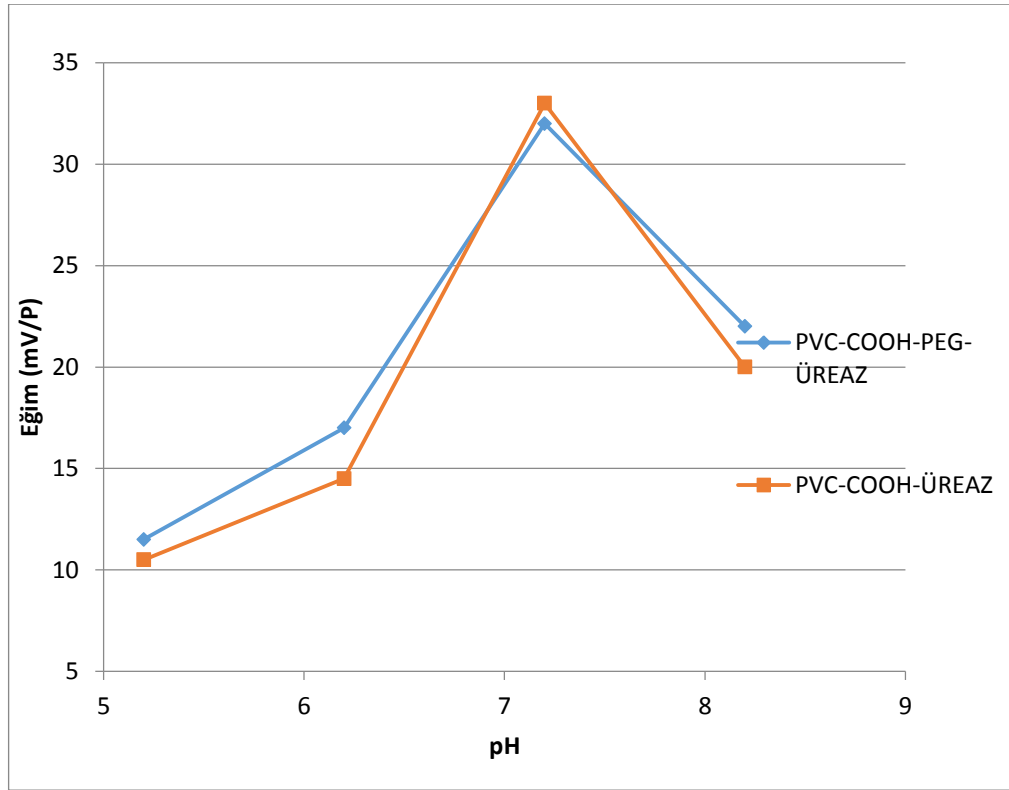
Şekil 6.16'da dekstran ile modifiye edilmiş üreazın ve serbest üreaz enziminin karboksilli membranda oluşturulduğu üre biyosensörlerinin pH 5,2; 6,2; 7,2 ve 8,2'de tris tamponundaki üre çözeltilerinde eğim değerleri hesaplanmıştır. Her iki biyosensöründe optimum pH'sı 7.2'dir. Karboksillenmiş membrana bağlanan dekstran/üreaz kompleksi, klasik üre biyosensörüne göre değişen pH değerlerinde daha stabil olduğu görülmüştür. Özellikle modifiye edilmemiş üre biyosensörü pH 8,2 değerinde keskin bir düşüş yaşamaktadır.

6.5.2 Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Farklı pH'lardaki Potansiyometrik Davranışı



Şekil 6. 17 PVC-Palmitik Asit –Polietilen Glikol/Üreaz ve PVC-Palmitik Asit-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı pH Değerlerindeki Eğim Grafiği

Şekil 6.17’de polietilen glikol ile modifiye edilmiş üreazın ve serbest üreaz enziminin palmitik asitli membranda oluşturulduğu üre biyosensörlerinin pH 5,2; 6,2; 7,2 ve 8,2’de tris tamponundaki üre çözeltilerinde eğim değerleri hesaplanmıştır. Her iki biyosensöründe optimum pH değerleri 7,2’dir. Polietilen glikol ile modifiye edilmiş üre biyosensörü, modifiye olmamış üre biyosensörüne göre daha stabil davranış göstermektedir. Hatta yüksek pH değerinde daha iyi aktivite göstermektedir.



Şekil 6. 18 PVC-COOH-Polietilen Glikol/Üreaz ve PVC-COOH-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı pH Değerlerindeki Eğim Grafiği

Şekil 6.18’de polietilen glikol ile modifiye edilmiş üreazın ve serbest üreaz enziminin karboksilli membranda oluşturulduğu üre biyosensörlerinin pH 5,2; 6,2; 7,2 ve 8,2’de tris tamponundaki üre çözeltilerinde eğim değerleri hesaplanmıştır. Her iki biyosensöründe optimum pH değeri 7,2’dir. Modifiye olan üre biyosensörü değişen pH değerlerinde daha stabil davranış göstermiştir.

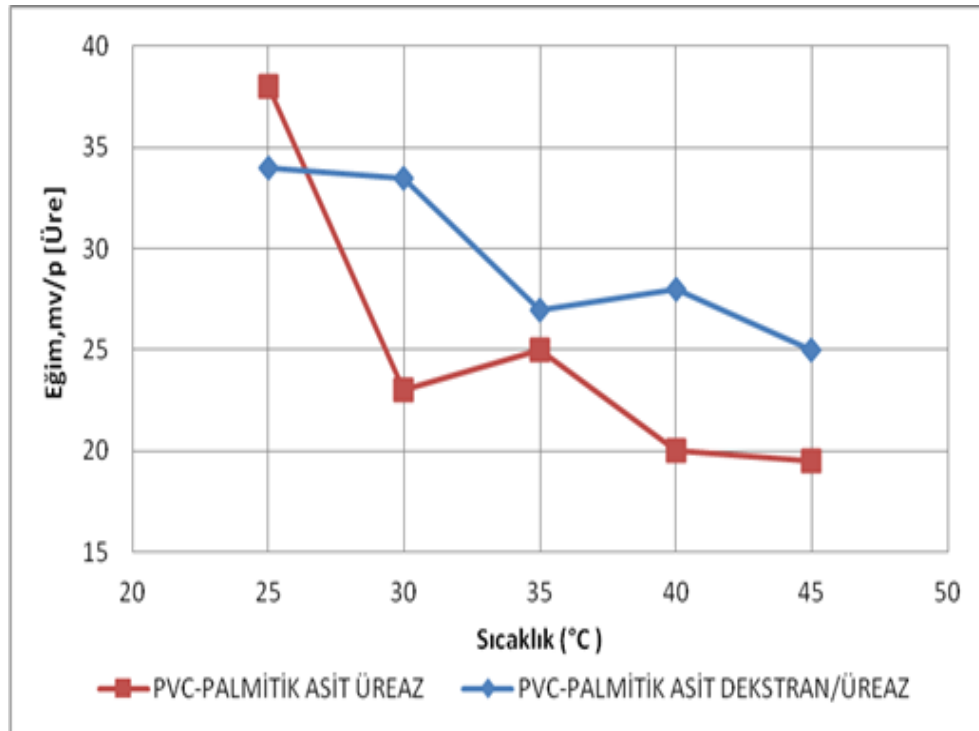
PVC-Palmitik asit ve PVC-COOH membranlar kullanılarak, dekstran ve polietilen glikol ile modifiye olan üre biyosensörlerimizin optimum pH değeri 7,2’dir. Belirli bir üre biyosensörü için optimum çalışma pH aralığının tanımı, üreaz reaksiyonunun aktivitesine bağlıdır [122]. Üreaz enziminin tarafından üreyi parçalama reaksiyonunun katalitik aktivitesi pH 7 olarak belirlenmiştir [4], [2], [125]. Normal insan kanı pH 7.2-7.6 arasında ortalama olarak pH 7.4 olarak kabul edebiliriz [122],[56]. Bu sebeple hazırladığımız biyosensörlerin kandaki üre ölçümüne uygun olduğunu görebilmekteyiz. Literatürdeki çalışmalarda da optimum pH değerinin 7’ye yakın olduğu [68], [4], [56], [2], [103], [104], [122],

[125] ve pH 6-7.5 arası biyosensörlerin stabil cevap gösterdiği, pH 8'den sonra cevabın azaldığı görülmektedir [122].

Üreaz'ın dekstran ve polietilen Glikol ile modifiye olmasıyla oluşturduğumuz üre biyosensörleri, modifiye olmadan serbest üreaz enzimiyle hazırlanan üre biyosensörüne göre daha geniş pH aralığında aktivite gösterip, değişen pH değerlerinden daha stabil olduğu görülmüştür. Polimerlerle modifiye olduktan sonra enzimin pH stabilitesindeki artış yüzeye veya artık yüklere ve bağların yapısına bağlı olarak mikro ortamının değişmesinden kaynaklanabilir [126]. Muhtemelen, enzim polimer kompleksi protein yüzey yükünü değiştirdi ve sonuç olarak etrafındaki izoelektrik sabitini değiştirdi [118],[119]. pH stabilitesindeki bu tür bir artış, önceki çalışmalarla uyumludur [126], [119], [118].

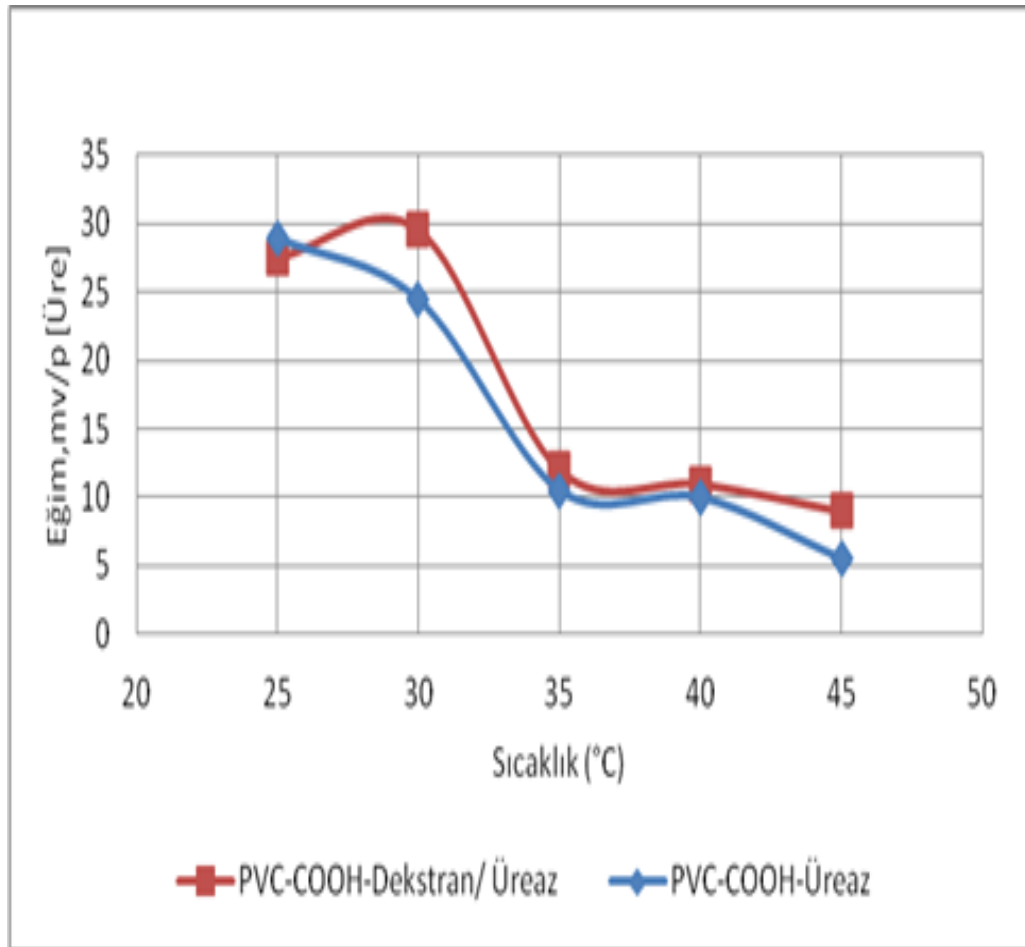
6.6 Üre Biyosensörlerine Sıcaklığın Etkisi

6.6.1 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Farklı Sıcaklıklardaki Potansiyometrik Davranışı



Şekil 6. 19 PVC-Palmitik Asit –Dekstran/Üreaz ve PVC-Palmitik Asit-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı Sıcaklık Değerlerindeki Eğim Grafiği

Pvc-Palmitik asit membran yüzeyine immobilize edilen Dekstran/Üreaz kompleksi ve serbest üreaz enzimiyle oluşturulan üre biyosensörünün farklı sıcaklıklardaki (25°C,30°C,35°C,40°C ve 45°C) potansiyometrik davranışı Şekil 6.19'da gösterilmektedir. Serbest enzim ile oluşturulan üre biyosensörünün optimum sıcaklığı 25°C, Dekstran/Üreaz kompleksi ile oluşturulan üre biyosensörünün optimum sıcaklığı 30°C'dir .Serbest enzim biyosensörü 30°C'de keskin bir düşüş yaşamaktadır Ayrıca Dekstran/üreaz kompleksi ile oluşturulan üre biyosensörünün artan sıcaklıklara karşı serbest enzimli üre biyosensöre göre daha dayanıklı ve stabil olduğu görülmüştür.

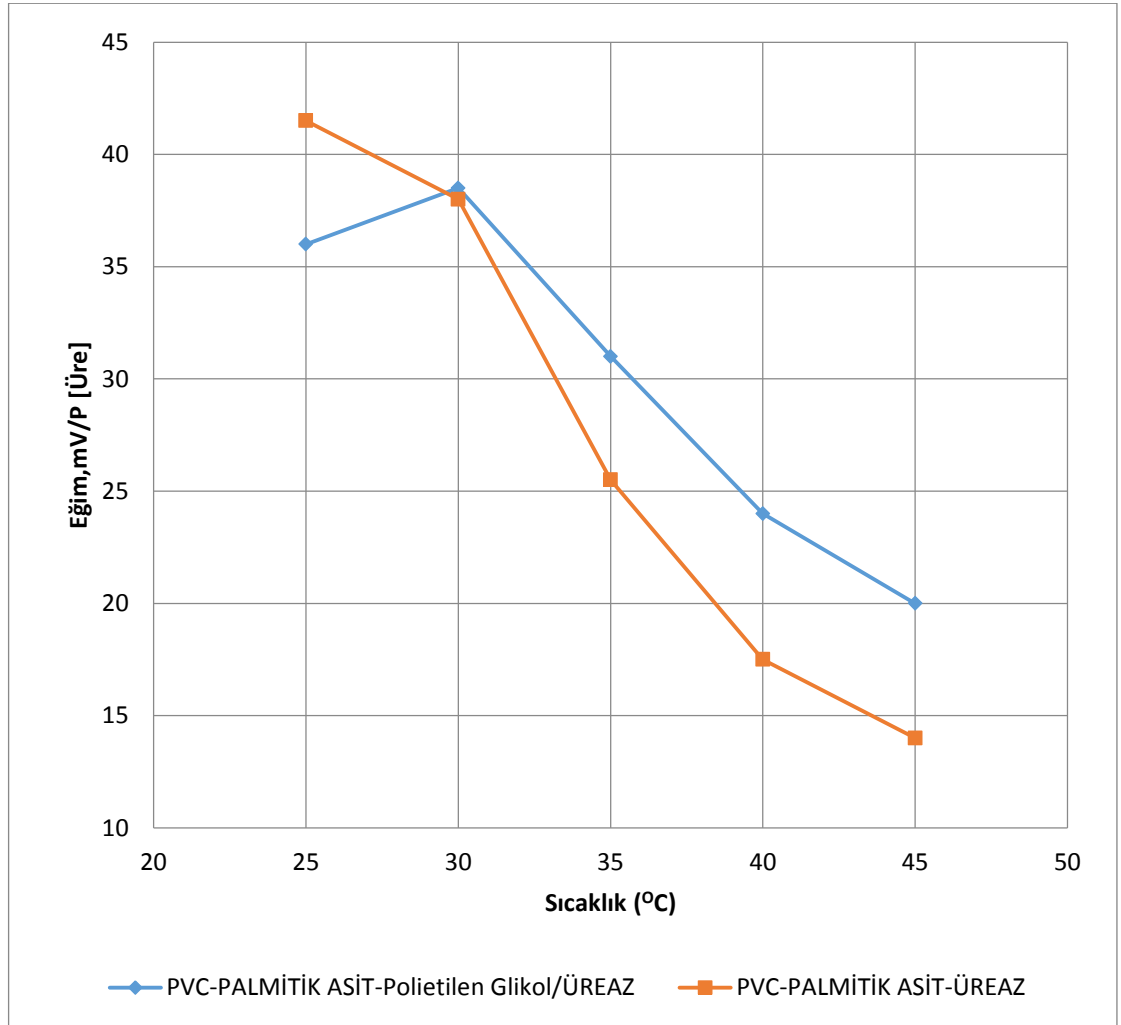


Şekil 6. 20 PVC-COOH–Dekstran/Üreaz ve PVC-COOH-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı Sıcaklık Değerlerindeki Eğim Grafiği

Karboksillenmiş Pvc membran yüzeyine immobilize edilen Dekstran/Üreaz kompleksi ve serbest üreaz enzimiyle oluşturulan üre biyosensörünün farklı sıcaklıklardaki (25°C,30°C,35°C,40°C ve 45°C) potansiyometrik davranışı Şekil

6.20’de gösterilmektedir. Serbest enzim ile oluşturulan üre biyosensörünün optimum sıcaklığı 25°C, Dekstran/Üreaz kompleksi ile oluşturulan üre biyosensörünün optimum sıcaklığı 30°C’dir. Ayrıca Dekstran/Üreaz kompleksi ile oluşturulan üre biyosensörünün artan sıcaklıklara karşı serbest enzimli üre biyosensöre göre daha dayanıklı olduğu görülmüştür.

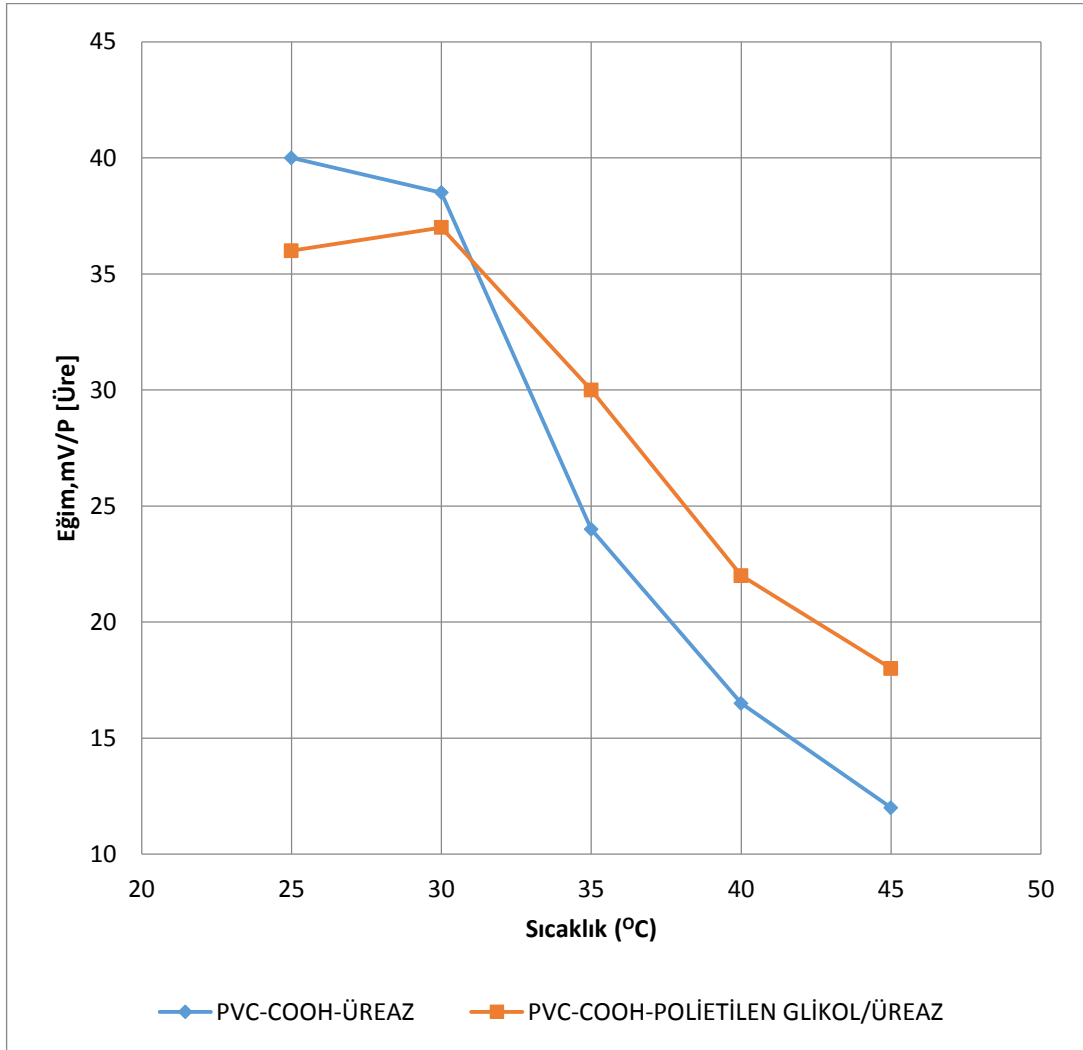
6.6.2 Üreaz’ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Farklı Sıcaklıklardaki Potansiyometrik Davranışı



Şekil 6. 21 PVC-Palmitik Asit –Polietilen Glikol/Üreaz ve PVC-Palmitik Asit-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı Sıcaklık Değerlerindeki Eğim Grafiği

Pvc-Palmitik asit membran yüzeyine immobilize edilen Polietilen Glikol/Üreaz kompleksi ve serbest üreaz enzimiyle oluşturulan üre biyosensörünün farklı sıcaklıklardaki (25°C,30°C,35°C,40°C ve 45°C) potansiyometrik davranışı Şekil

6.21’de gösterilmektedir. Serbest enzim ile oluşturulan üre biyosensörünün optimum sıcaklığı 25°C, Polietilen Glikol/üreaz kompleksi ile oluşturulan üre biyosensörünün optimum sıcaklığı 30°C’dir. Serbest enzim biyosensörü sıcaklık arttığı zaman daha keskin düşüşler yaşamaktadır. Ayrıca Dekstran/üreaz kompleksi ile oluşturulan üre biyosensörünün artan sıcaklıklara karşı serbest enzimli üre biyosensöre göre daha dayanıklı ve stabil olduğu görülmüştür.



Şekil 6. 22 PVC-COOH –Polietilen Glikol/Üreaz ve PVC-COOH-Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Farklı Sıcaklık Değerlerindeki Eğim Grafiği

Karboksillenmiş PVC membran yüzeyine immobilize edilen Polietilen Glikol/Üreaz kompleksi ve serbest üreaz enzimiyle oluşturulan üre biyosensörünün farklı sıcaklıklardaki (25°C,30°C,35°C,40°C ve 45°C) potansiyometrik davranışı Şekil

6.22'de gösterilmektedir. Serbest enzim ile oluşturulan üre biyosensörünün optimum sıcaklığı 25°C, Polietilen Glikol/Üreaz kompleksi ile oluşturulan üre biyosensörünün optimum sıcaklığı 30°C'dir. Ayrıca Polietilen Glikol/üreaz kompleksi ile oluşturulan üre biyosensörünün artan sıcaklıklara karşı modifiye olmayan üre biyosensörüne göre daha dayanıklı olduğu görülmüştür.

Modiye olmadan serbest üreaz enzimiyle hazırlanan üre biyosensörü PVC-COOH ve PVC-Palmitik asit membranında da optimum sıcaklığı 25°C, Üreaz'ın dekstran ve polietilen Glikol ile modifiye olmasıyla oluşturduğumuz üre biyosensörlerinin PVC-COOH ve PVC-Palmitik asit membranında da optimum sıcaklığı 30°C. Optimum sıcaklıktan sonraki sıcaklıklarda ki yaşanan eğimdeki düşüş, üreazın aktivitesindeki azalmadan, denatürasyonundan ya da PVC membranlarının instabilitesinden kaynaklanmaktadır [104]. Literatürde yapılan bazı çalışmalarda;

H.pylori üreaz kullanılan üre biyosensörlerinin PVC-COOH ve PVC-Palmitik asit membranlarında ki optimum sıcaklıkları 30°C olarak bulunmuştur. Jack Bean üreaz kullanılan potansiyometrik üre biyosensörlerinin PVC-COOH ve PVC-Palmitik asit membranlarında ki optimum sıcaklıkları 25 °C olarak bulunmuştur [68], [104].

Üreaz enziminin poly(vinylferrocenium) kompozit membran üzerine immobilizasyonu sonucu oluşan potansiyometrik üre biyosensörünün optimum sıcaklığı 35°C olarak bulunmuştur [4].

Üreaz'ın SİPGMA aşılı nanopartiküllere immobilizasyonu sonucu oluşan potansiyometrik üre biyosensörünün maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 35°C olarak bulunmuştur [2].

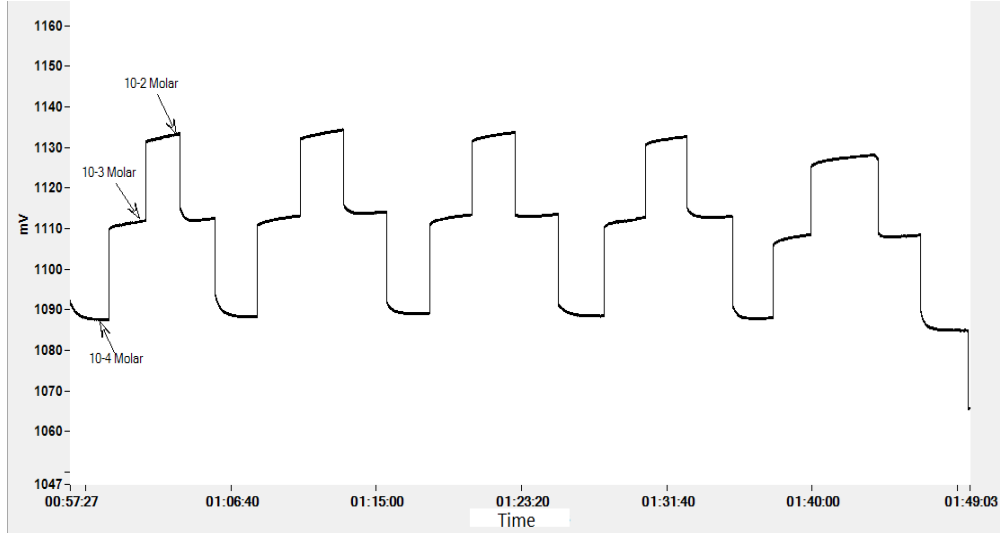
Polipirol bazlı potansiyometrik üre biyosensörünün optimum sıcaklığı 35°C'dir [127].

Üreaz'ın dekstran ve polietilen Glikol ile modifiye olmasıyla oluşturduğumuz üre biyosensörleri, modiye olmadan serbest üreaz enzimiyle hazırlanan üre biyosensörüne göre farklı sıcaklarda daha stabil davranış gösterdiği ve artan sıcaklıklara karşı daha dirençli olduğu görülmektedir. Dekstran/Üreaz ve Polietilen glikol/Üreaz kompleksleri, üreazın polimerler ile bir çok noktadaki

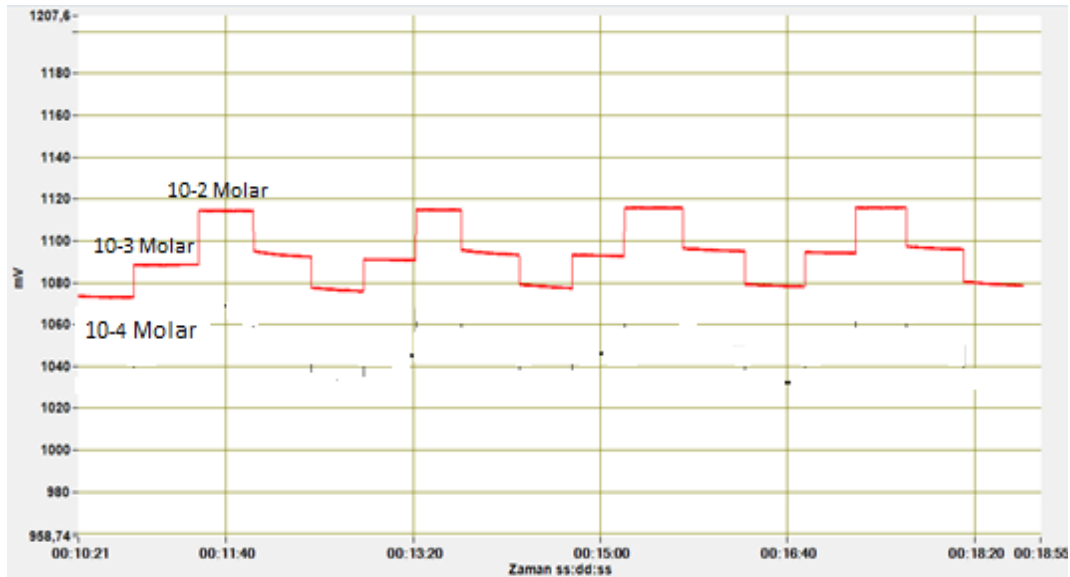
etkileşimlerinden dolayı enzimin doğal yapısını değiştirerek ya da enzim molekülleri çevresinde kalın polimer kabuğun oluşmasından dolayı serbest enzime kıyasla termal stabilitesini göstermiştir [126], [128], [108], [109].

6.7 Üre Biyosensörlerinin Tekrarlanabilirlikleri

6.7.1 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Tekrarlanabilirliklerinin İncelenmesi



Şekil 6. 23 PVC-Palmitik Asit –Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği



Şekil 6. 24 PVC-COOH–Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği

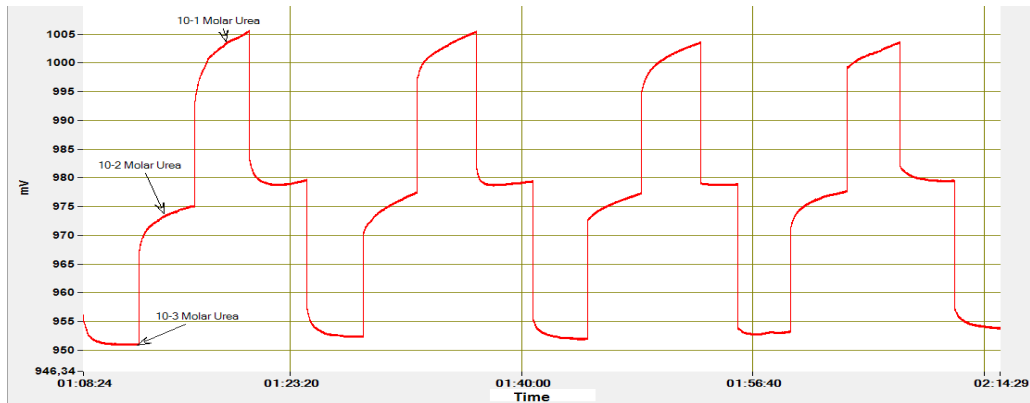
Dekstran ile modifiye edilmiş üre biyosensörlerinin tekrarlanabilirliklerini belirlemek için 10^{-4} ve 10^{-2} molar arasında aynı gün içerisinde aynı anda 8-10 arası ölçüm yapılmıştır. Her bir ölçümün kalibrasyon grafiği çizilerek her bir biyosensörün eğimleri belirlendi. Bulunan eğim değerlerinin bağıl standart sapmaları (%B.S.S.) hesaplandı. Hesaplanan bağıl standart sapmalar Tablo 6.3’de gösterilmektedir.

Tablo 6. 3 Üreaz’ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Bağıl Standart Sapma Değerleri

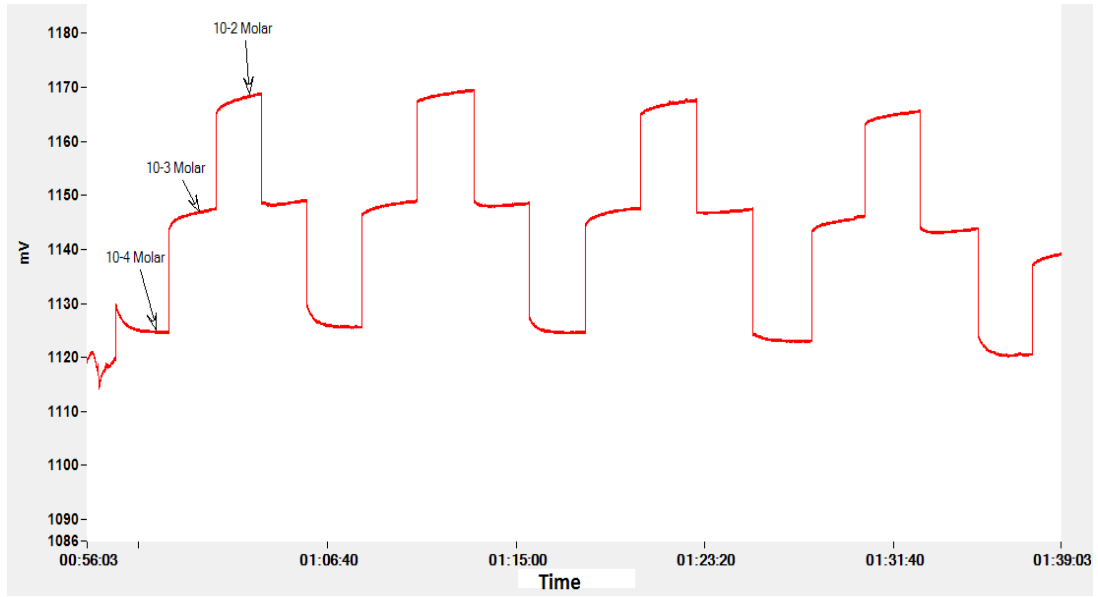
	PVC-PalmitikAsit- Dekstran/Üreaz	PVC-COOH- Dekstran/Üreaz
Bağıl Standart Sapma (%B.S.S.)	%3.052	%2.702

Bağıl standart sapma değerleri %10’un altında olduğu zaman biyosensör membranlarının tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu bilinmektedir [68]. Bu yüzden dekstran ile modifiye edilmiş üre biyosensörlerinin tekrarlanabilirliklerinin oldukça iyi olduğunu söyleyebiliriz. Literatürde de üre biyosensörlerinin % 3.27, % 5.1 gibi bağıl standart sapma değerlerini görmekteyiz [129],[130].

6.7.2 Üreaz’ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Tekrarlanabilirliklerinin İncelenmesi



Şekil 6. 25 PVC-Palmitik Asit –Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörünün Tekrarlanabilirliği



Şekil 6. 26 PVC-COOH-Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biosensörünün Tekrarlanabilirliği

Polietilen glikol ile modifiye edilmiş üre biosensörlerinin tekrarlanabilirliklerini belirlemek için 10^{-4} ve 10^{-2} molar arasında aynı gün içerisinde aynı anda 8-10 arası ölçüm yapılmıştır. Her bir ölçümün kalibrasyon grafiği çizilerek her bir biosensörün eğimleri belirlendi. Bulunan eğim değerlerinin bağıl standart sapmaları (%B.S.S.) hesaplandı. Hesaplanan bağıl standart sapmalar Tablo 6.4’de gösterilmektedir.

Tablo 6. 4 Üreaz’ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biosensörlerinin Bağıl Standart Sapma Değerleri

	PVC-PalmitikAsit-Polietilen Glikol/Üreaz	PVC-COOH-Polietilen Glikol/Üreaz
Bağıl Standart Sapma (%B.S.S.)	% 3.14	% 2.11

Bağıl standart sapma değerleri %10’un altında olduğu zaman biosensör membranlarının tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu bilinmektedir [16]. Bu yüzden polietilen glikol ile modifiye edilmiş üre biosensörlerinin tekrarlanabilirliklerinin oldukça iyi olduğunu söyleyebiliriz. Literatürde de üre

biyosensörlerinin %3.04, %4,5,% 3,8 gibi bağıl standart sapma değerleri görülmektedir [131], [54], [132], [95].

6.8 Üre Biyosensörlerinin Seçicilik Katsayılarının Hesaplanması

6.8.1 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Seçicilik Katsayılarının Hesaplanması

Tablo 6. 5 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Seçicilik Katsayıları

İyonlar	Seçicilik Katsayısı, $K_{NH_4,X}$	
	PVC-PalmitikAsit-Dekstran/Üreaz	PVC-COOH-Dekstran/Üreaz
Na ⁺	1.4×10^{-2}	1.4×10^{-2}
K ⁺	2.1×10^{-1}	1.7×10^{-1}
Ca ²⁺	1.2×10^{-2}	1.3×10^{-2}
Li ⁺	1.4×10^{-2}	1.5×10^{-2}

Tablo 6.5'de görüleceği üzere biyosensörlerin Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Li⁺ iyonlarına karşı seçicilik katsayıları hesaplanmıştır. Tabloya baktığımız zaman üre biyosensörlerinin cevabına Na⁺, Ca²⁺, Li⁺ iyonların girişim etkisinin düşük olduğu görülmüştür. Bu iyonlara kıyasla K⁺ iyonu biyosensör cevabına yüksek bir girişim etkisi göstermektedir. Literatüre baktığımız zamanda genel olarak K⁺ iyonunun girişim etkisinin yüksek olduğu göze çarpmaktadır [41], [68], [60], [123], [133]. Hatta bazı çalışmalarda K⁺ iyonunun ($K_{NH_4,X} = >10^{-1}$) yanında Na⁺ iyonunun da ($K_{NH_4,X} = >10^{-2}$) girişim etkisinin yüksek olduğu görülmektedir [39]. Her iki membranla oluşturulan üre biyosensörleriyle kıyasladığımız zaman hemen hemen sonuçların benzer olduğu sadece PVC-COOH-Dekstran/Üreaz membranına dayalı üre biyosensöründe K⁺ iyonunun girişim etkisi diğer membrana göre biraz daha azdır.

6.8.2 Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Seçicilik Katsayılarının Hesaplanması

Tablo 6. 6 Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Seçicilik Katsayıları

İyonlar	Seçicilik Katsayısı, $K_{NH_4,X}$	
	PVC-PalmitikAsit-Polietilen Glikol/Üreaz	PVC-COOH-Polietilen Glikol/Üreaz
Na ⁺	$2,7 \times 10^{-3}$	5.1×10^{-3}
K ⁺	$1,6 \times 10^{-2}$	2.3×10^{-2}
Ca ²⁺	$1,2 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-2}$
Li ⁺	$7,4 \times 10^{-3}$	6.7×10^{-3}

Tablo 6.6'da görüleceği üzere biyosensörlerin Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Li⁺ iyonlarına karşı seçicilik katsayıları hesaplanmıştır. Tabloya baktığımız zaman üre biyosensörlerinin cevabına Na⁺, Ca²⁺, Li⁺ iyonların girişim etkisinin düşük olduğu görülmüştür. Bu iyonlara kıyasla K⁺ iyonu biyosensör cevabına girişim etkisi göstermektedir. Ancak üre biyosensörünün literatürdeki çalışmalarına bakacak olursak K⁺ iyonunun seçicilik katsayısı $K_{NH_4,X} = 10^{-1}$ civarında olduğu görülmektedir. Bu sonuç bizim hazırladığımız üre biyosensöründen 10 kat daha fazla girişim etkisi yaptığını gösterir [134], [135]. Özellikle Li⁺ iyonunu girişim etkisi yok denecek kadar az olduğu tabloda görülmektedir. Her iki membran arasındaki seçicilik değerlerinde önemli bir fark bulunmamaktadır ve genel olarak benzer sonuçlar vermişlerdir.

6.9 Üre Biyosensörlerinin Cevap Zamanlarının Belirlenmesi

6.9.1 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Cevap Zamanlarının Belirlenmesi

Tablo 6. 7 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Cevap Zamanları

	PVC-PalmitikAsit-Dekstran/Üreaz	PVC-COOH-Dekstran/Üreaz
Cevap Zamanı	20-30 saniye	20-30 saniye

Dekstran ile modifiye edilen üre biyosensörlerin cevap zamanı Tablo 6.7'de görülmektedir. Tabloya göre biyosensörlerin cevap zamanı 20-30 saniye aralığında değişmektedir. Potansiyometrik üre biyosensörlerinin cevap zamanını literatürde incelediğimiz zaman genel olarak; 10 saniye [136], 1-2 dakika [121], [58], < 2 dakika [137], 10 dakika [138], 280 saniye [139]. Genel olarak biyosensörlerin cevap zamanı birkaç saniye ile birkaç dakika arasında değişmektedir. 5 dakikaya kadar olan değerler kabul edilebilir. 10 dakika gibi olan süreler uzun kabul edilir [47]. Bu sebeple dekstran ile modifiye ettiğimiz üre biyosensörlerimizin cevap zamanı kısa ve kabul edilebilir sınırlar içerisinde.

6.9.2 Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Cevap Zamanlarının Belirlenmesi

Tablo 6. 8 Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörlerinin Cevap Zamanları

	PVC/PalmitikAsit-Polietilen Glikol/Üreaz	PVC-COOH-Polietilen Glikol/Üreaz
Cevap Zamanı	20-25 saniye	20-25 saniye

Polietilen Glikol ile modifiye edilen üre biyosensörlerin cevap zamanı Tablo 6.8'de görülmektedir. Tabloya göre biyosensörlerin cevap zamanı 20-25 saniye aralığında değişmektedir. Literatürde potansiyometrik üre biyosensörlerin cevap zamanı; 315 saniye [140], >60 saniye [141], 30-40 saniye [142], 29 saniye [143], 70-90 saniye [144],

20 saniye [145], 5 saniye [146]. Genel olarak biyosensörlerin cevap zamanı birkaç saniye ile birkaç dakika arasında değişmektedir. 5 dakikaya kadar olan değerler kabul edilebilir. 10 dakika gibi olan süreler uzun kabul edilir [47]. Bu sebeple polietilen glikol ile modifiye ettiğimiz üre biyosensörlerimizin cevap zamanı kısa ve kabul edilebilir sınırlar içerisindedir.

6.10 Üre Biyosensörleri ile İnsan Kan Serumlarındaki Üre Tayini

6.10.1 Üreaz'ın Dekstran ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörleri ile İnsan Kan Serumlarındaki Üre Tayini

Tablo 6. 9 PVC-Palmitik Asit –Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü ile İnsan Kan Serumunda Üre Miktarlarının Ölçülmesi

Örnek	Gerçek Değerler ('ARCHITECT 7D75 Urea Nitrogen Reagent Kit) (mg/dl)	PVC-PalmitikAsit-Dekstran/Üreaz (mg/dl)
1	15	13.09
2	20	22.23
3	33	30
4	38	35.24
5	72	68.76

H_0 : Gerçek değerler ile PVC-Palmitik Asit –Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü değerleri arasında fark yoktur.

H_s : Gerçek değerler ile PVC-Palmitik Asit –Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü değerleri arasında fark vardır.

Sig:0,163> α :0,05 olduğu için H_0 kabul edilir. Gerçek değerler ile PVC-Palmitik Asit –Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü değerleri arasında fark olmadığı %95 güvenle test edilmiştir.

Tablo 6. 10 PVC-COOH-Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü ile İnsan Kan Serumunda Üre Miktarlarının Ölçülmesi

Örnek	Gerçek Değerler ('ARCHITECT 7D75 Urea Nitrogen Reagent Kit) (mg/dl)	PVC-COOH-Dekstran/Üreaz (mg/dl)
1	15	15.07
2	20	19.36
3	33	31.48
4	38	35.23
5	72	67.32

H_0 : Gerçek değerler ile PVC-COOH-Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü değerleri arasında fark yoktur.

H_s : Gerçek değerler ile PVC-COOH-Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü değerleri arasında fark vardır.

Sig:0,085> α :0,05 olduğu için H_0 kabul edilir. Gerçek değerler ile PVC-COOH-Dekstran/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü değerleri arasında fark olmadığı %95 güvenle test edilmiştir.

6.10.2 Üreaz'ın Polietilen Glikol ile Modifikasyonu Sonucu Oluşturulan Üre Biyosensörleri ile İnsan Kan Serumlarındaki Üre Tayini

Tablo 6. 11 PVC-Palmitik Asit -Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü ile İnsan Kan Serumunda Üre Miktarlarının Ölçülmesi

Örnek	Gerçek Değerler ('ARCHITECT 7D75 Urea Nitrogen Reagent Kit) (mg/dl)	PVC-Palmitik Asit-Polietilen Glikol /Üreaz (mg/dl)
1	19	15
2	27	25

Tablo 6. 11 PVC-Palmitik Asit –Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü ile İnsan Kan Serumunda Üre Miktarlarının Ölçülmesi (devamı)

3	33	28
4	57	45.4
5	139	130

H_0 : Gerçek değerler ile PVC-Palmitik Asit -Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü değerleri arasında fark yoktur.

H_s : Gerçek değerler ile PVC-Palmitik Asit -Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü değerleri arasında fark vardır.

Sig:0,080> α :0,05 olduğu için H_0 kabul edilir. Gerçek değerler ile PVC-Palmitik Asit –Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü değerleri arasında fark olmadığı %95 güvenle test edilmiştir.

Tablo 6. 12 PVC-COOH–Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü ile İnsan Kan Serumunda Üre Miktarlarının Ölçülmesi

Örnek	Gerçek Değerler ('ARCHITECT 7D75 Urea Nitrogen Reagent Kit) (mg/dl)	PVC-COOH-Polietilen Glikol/Üreaz (mg/dl)
1	19	16.56
2	27	27.2
3	33	28.21
4	57	50.5
5	139	130.3

H_0 : Gerçek değerler ile PVC-COOH–Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü değerleri arasında fark yoktur.

H_s : Gerçek değerler ile PVC-COOH–Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü değerleri arasında fark vardır.

Sig:0,121> α :0,05 olduğu için H_0 kabul edilir. Gerçek değerler ile PVC-COOH-Polietilen Glikol/Üreaz Membranına Dayalı Üre Biyosensörü değerleri arasında fark olmadığı %95 güvenle test edilmiştir.

Genel olarak tez çalışmasını özetlediğimizde;

- Üreaz enziminin modifikasyonu için dekstran ve polietilen glikol polimerleri kullanılmıştır. Bu polimerlerle farklı mol oranlarında enzim/polimer fiziksel kompleksleri sentezlenmiştir. Üreaz enziminin polietilen glikol ile modifikasyonunda $n_{\text{üreaz}}/n_{\text{peg}} : 1/1$ oranlı kompleks diğer komplekslere göre en yüksek aktivite değerini göstermiştir. Ayrıca üreaz enziminin dekstran ile modifikasyonunda $n_{\text{üreaz}}/n_{\text{Dekstran}} 40/1$ oranlı kompleks diğer oranlara göre en yüksek aktivite değerini göstermiştir
- Modifiye edilen ve stabilizasyonu gerçekleştiren üreaz enziminin birçok uygulama alanı bulunmaktadır [147]. Biz bu tez çalışmasında biyosensör üretimi için modifiye olan üreaz enzimini kullandık. Aktivite tayinleri sonuçlarına bakılarak en iyi aktivite gösteren $n_{\text{üreaz}}/n_{\text{peg}} : 1/1$ ve $n_{\text{üreaz}}/n_{\text{Dekstran}} 40/1$ oranlı iki enzim-polimer kompleksi biyosensörün oluşturulması için seçilmiştir.
- Seçilen üreaz/polimer komplekslerinin elektrot yüzeyine immobilize edilerek üre biyosensörü oluşturulması için iki farklı amonyum seçici membran elektrodu hazırlanmıştır. Bunlardan ilki; PVC membranına ilave edilen 18 karbonlu uzun zincirli yağ asidi olan palmitik asit ile oluşturulan PVC-Palmitik asit amonyum seçici membran, ikincisi ise membran bileşeni olarak karboksillenmiş PVC'nin kullanıldığı PVC-COOH amonyum seçici membrandır. Her iki yöntemle hazırlanan amonyum seçici membranlar 10^{-1} - 10^{-5} M arasındaki amonyum çözeltilerinde potansiyometrik davranış göstermektedir, cevap zamanları 15 saniyeden az ve 9-10 haftalık yaşam süreleri mevcuttur.
- Dekstran/Üreaz ve Polietilen glikol/Üreaz komplekslerinin PVC-Palmitik asit ve PVC-COOH amonyum membranlarına immobilize edilmesi sonucu 4 farklı üre biyosensörü oluşturuldu. Bunlar; **PVC-Palmitik asit-Dekstran/Üreaz**, **PVC-COOH-Dekstran/Üreaz**, **PVC-Palmitik asit-Polietilen glikol/Üreaz**, **PVC-COOH-Polietilen glikol/Üreaz**'dır. Bu biyosensörler özgün, ilk kez hazırlanmış olup, literatürde bulunmamaktadır.
- İlk olarak, oluşturulan 4 farklı biyosensörün lineer çalışma aralıkları belirlenmiştir. Hazırlanan 4 biyosensör 5×10^{-5} M ile 5×10^{-3} M arasındaki standart üre çözeltilerinde lineer davranış göstermiştir. Biyosensörlerin lineer çalışma

aralıklarında ki kalibrasyon grafikleri çizildiğinde R^2 değerlerinin 0.99 civarında olduğu bulunmuştur.

- Hazırlanan üre biyosensörlerinin farklı pH'lardaki (5,2; 6,2; 7,2 ve 8,2) potansiyometrik davranışı incelenmiş ve sonuçlar serbest üreaz enzimi ile oluşturulan üre biyosensörleri ile karşılaştırılmıştır. Hazırladığımız 4 farklı üre biyosensörünün ve serbest üreaz enzimi ile oluşturulan üre biyosensörünün optimum pH değeri 7.2 olarak bulunmuştur. Hazırladığımız 4 farklı üre biyosensörü, serbest üreaz enzimi ile oluşturulan üre biyosensörüne göre değişen pH değerlerinde daha kararlı potansiyometrik davranış göstermiştir. Hazırladığımız 4 farklı üre biyosensörünü kendi arasında kıyasladığımız zaman PVC- Palmitik asit-Dekstran/Üreaz biyosensörü değişen pH değerlerinde en kararlı potansiyometrik davranışı gösterirken, PVC-COOH-Polietilen glikol/Üreaz biyosensörü değişen pH değerlerinde ki kararlılığı en düşük olan biyosensördür.

- Hazırlanan üre biyosensörlerinin farklı sıcaklıklardaki (25°C,30°C,35°C,40°C ve 45°C) potansiyometrik davranışı incelenmiş ve sonuçlar serbest üreaz enzimi ile oluşturulan üre biyosensörleri (PVC-Palmitik asit-Üreaz ve PVC-COOH-Üreaz) ile kıyaslanmıştır. Hazırladığımız 4 farklı üre biyosensörünün optimum sıcaklığı 30°C'dir ve serbest üreaz enzimi ile oluşturulan üre biyosensörüne göre daha iyi bir termal direnç göstermiştir. Özellikle PVC- Palmitik asit-Dekstran/Üreaz biyosensörü diğer biyosensörlere göre farklı sıcaklıklardaki termal direnci en iyi olan biyosensördür. PVC-COOH-Dekstran/Üreaz biyosensörünün ise farklı sıcaklıklardaki termal direnci, serbest üreaz enzimi ile oluşturulan PVC-COOH-Üreaz biyosensörüne çok yakındır ve diğer hazırladığımız üre biyosensörlerine göre en düşüktür.

- Hazırlanan üre biyosensörlerinin tekrarlanabilirliklerini ölçmek her bir biyosensörün bağıl standart sapmaları (%B.S.S.) hesaplanmıştır. Her bir biyosensörün %B.S.S. değeri sınır değer olan %.10'un çok fazla altındadır. Biyosensörler arasında en iyi %B.S.S. değeri % 2.11 ile PVC-COOH-Polietilen Glikol/ Üreaz biyosensörüne aittir. PVC-COOH membranına dayalı üre biyosensörlerin tekrarlanabilirlikleri PVC-Palmitik asit membranına dayalı üre biyosensörlerinden daha iyi olduğunu görmekteyiz.

- Hazırlanan üre biyosensörlerine Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Li^+ iyonlarının girişim etkisi belirlemek için biyosensörlerin bu iyonlara karşı seçicilik katsayıları hesaplanmıştır. Diğer üç iyonla nispeten K^+ iyonunun girişim etkisi olduğu gözlemlendi. En iyi seçicilik gösteren biyosensör PVC-COOH-Polietilen Glikol/Üreaz biyosensörüdür. Özellikle Polietilen glikol/Üreaz kompleksine dayalı üre biyosensörlerinin, Dekstran/Üreaz kompleksine dayalı üre biyosensörlerine göre seçicilikleri daha iyi bulunmuştur.
- Hazırlanan üre biyosensörlerinin cevap zamanları belirlenmiştir. Dekstran/Üreaz kompleksine dayalı üre biyosensörlerinin cevap zamanı 20-30 saniye; Polietilen glikol/Üreaz kompleksine dayalı üre biyosensörlerinin cevap zamanı ise 20-25saniye aralığında bulunmuştur.
- Hazırlanan dört üre biyosensörüyle insan kan serumunda üre analizleri yapılmıştır ve gerçek değerler ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Hazırladığımız bütün biyosensörlerdeki üre analizleri, bağımlı iki örneklem t testi ile %95 güven seviyesinde ($\text{Sig} > \alpha: 0,05$) anlamlı bulunmuştur. PVC-Palmitik Asit-Dekstran/Üreaz biyosensörünün %95 güven seviyesindeki Sig değeri 0.163 olarak en iyi Sig değerine sahip biyosensördür.

-
- [1] A. Soni, R. K. Surana, and S. K. Jha, "Smartphone based optical biosensor for the detection of urea in saliva," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 269, pp. 346–353, 2018.
 - [2] E. Çevik, M. Şenel, and A. Baykal, "Potentiometric urea biosensor based on poly(glycidylmethacrylate)-grafted iron oxide nanoparticles," *Curr. Appl. Phys.*, vol. 13, no. 1, pp. 280–286, 2013.
 - [3] G. Seema, A. De, and S. Mozumdar, "pH-dependent immobilization of urease on glutathione-capped gold nanoparticles," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 103, no. 5, pp. 1771–1783, 2014.
 - [4] F. Kuralay, H. Özyörük, and A. Yıldız, "Potentiometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly (vinylferrocenium) film," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 109, no. 2, pp. 194–199, 2005.
 - [5] N. An, C. H. Zhou, X. Y. Zhuang, D. S. Tong, and W. H. Yu, "Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors," *Appl. Clay Sci.*, vol. 114, pp. 283–296, 2015.
 - [6] B. Brena, P. González-Pombo, and F. Batista-Viera, "Immobilization of enzymes: A literature survey," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1051, pp. 15–31, 2013.
 - [7] G. B. Antonio Blanco, "Enzymes are biological catalysts," *Med. Biochem.*, pp. 153–175, 2017.
 - [8] T. Palmer and P. L. Bonner, *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry: Second Edition*. 2007.
 - [9] "What are apoenzymes?" [Online]. Available: <https://www.quora.com/What-are-apoenzymes-1>, 17 Temmuz 2019.
 - [10] G. Vardar, "Yeni Enzim Polimer Konjugatlarına Dayalı Glukoz Biyosensörü Hazırlanması ve Uygulamaları," Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, 2014.
 - [11] E. Keha and İ. Küfrevioğlu, *Biyokimya*, 8. Baskı. Ankara: Aktif Yayınevi, 2011.
 - [12] J. Boyle, "Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M.," *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 2005.
 - [13] R. B. Silverman and M. W. Holladay, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action: Third Edition*. 2015.
 - [14] M. Blaber, "Enzyme specificity, Control of enzyme activity, Allosteric behavior," 2001. .
 - [15] C. Silva, M. Martins, S. Jing, J. Fu, and A. Cavaco-Paulo, "Practical insights on enzyme stabilization," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 38, no. 3, pp. 335–350, 2018.
 - [16] K. M. R. Kallury, E. Lee, and M. Thompson, "by Covalent Attachment to Phospholipid-Bound Silica I'," vol. 1068, no. 15, pp. 1062–1068, 1992.

- [17] A. S. Bommarius and M. F. Paye, "Stabilizing biocatalysts," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, pp. 6534–6565, 2013.
- [18] C. M. Dobson, "Protein folding and misfolding," *Nature*. 2003.
- [19] L. Gianfreda and M. R. Scarfi, "Enzyme stabilization: state of the art," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 100, no. 2, pp. 97–128, 1991.
- [20] G. D. Haki and S. K. Rakshit, "Developments in industrially important thermostable enzymes: A review," *Bioresour. Technol.*, vol. 89, no. 1, pp. 17–34, 2003.
- [21] P. Bergquist, H. Morgan, and D. Saul, "Selected Enzymes from Extreme Thermophiles with Applications in Biotechnology," *Curr. Biotechnol.*, vol. 3, no. 1, pp. 45–59, 2014.
- [22] T. Davis, M. Schmidt, D. Böttcher, and U. Bornscheuer, "Strategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 17, no. 2, pp. 215–220, 2013.
- [23] A. S. Bommarius, J. K. Blum, and M. J. Abrahamson, "Status of protein engineering for biocatalysts: How to design an industrially useful biocatalyst," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 15, no. 2, pp. 194–200, 2011.
- [24] J. M. Woodley, "Protein engineering of enzymes for process applications," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 17, no. 2, pp. 310–316, 2013.
- [25] B. G. Davis, "Chemical modification of biocatalysts," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 14, no. 4, pp. 379–386, 2003.
- [26] G. DeSantis and J. B. Jones, "Chemical modification of enzymes for enhanced functionality," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 10, no. 4, pp. 324–330, 1999.
- [27] C. P. Govardhan, "Crosslinking of enzymes for improved stability and performance," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 10, no. 4, pp. 331–335, 1999.
- [28] K. Mayolo-Deloya, M. González-González, J. Simental-Martínez, and M. Rito-Palomares, "Aldehyde PEGylation of laccase from *Trametes versicolor* in route to increase its stability: Effect on enzymatic activity," *J. Mol. Recognit.*, vol. 28, no. 3, pp. 173–179, 2015.
- [29] A. A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, and R. Stevanato, "Enzyme immobilization: an update," *J. Chem. Biol.*, vol. 6, no. 4, pp. 185–205, 2013.
- [30] P. V. Iyer and L. Ananthanarayan, "Enzyme stability and stabilization- Aqueous and non-aqueous environment," *Process Biochem.*, vol. 43, no. 10, pp. 1019–1032, 2008.
- [31] A. Sassolas, L. J. Blum, and B. D. Leca-Bouvier, "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 3, pp. 489–511, 2012.
- [32] V. M. Balcão and M. M. D. C. Vila, "Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 93, pp. 25–41, 2015.

- [33] E. T. Hwang and M. Gu Bock, "Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials," *Eng. Life Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 49–61, 2013.
- [34] L. Betancor and H. L. Luckarift, "Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis," *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 10, pp. 566–572, 2008.
- [35] M. Çelik, "The Effects of Microwave Irradiation on Urease Enzyme Activity," Yüksek Lisans Tezi, Fatih Üniversitesi, 2014.
- [36] I. Konieczna, M. Kwinkowski, B. Kolesi, Z. Kami, and W. Kaca, "Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases," *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 13, pp. 789–806, 2012.
- [37] H. L. T. Mobley, "Urease," in *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, ASM Press, 2001.
- [38] A. Balasubramanian and K. Ponnuraj, "Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure †," *J. Mol. Biol.*, vol. 400, no. 3, pp. 274–283, 2010.
- [39] R. Koncki, "Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis," *Anal. Chim. Acta*, vol. 599, no. 1, pp. 7–15, 2007.
- [40] M. Singh, N. Verma, A. K. Garg, and N. Redhu, "Urea biosensors," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 134, no. 1, pp. 345–351, 2008.
- [41] G. Dhawan, G. Sumana, and B. D. Malhotra, "Recent developments in urea biosensors," *Biochem. Eng. J.*, vol. 44, no. 1, pp. 42–52, 2009.
- [42] Z. Tüylek, "Derleme Makalesi / Review Article Biyosensörler ve Nanoteknolojik Etkileşim Biosensors and Nanotechnological Interaction," vol. 6, no. 2, pp. 71–80, 2017.
- [43] J. Wang, "Electrochemical Glucose Biosensors," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 2, pp. 814–825, 2007.
- [44] Diviès C., "Remarques sur l'oxydation de l'éthanol par une electrode microbienne d'acetobacter zylinum," *Ann Microbiol*, vol. 126, pp. 175–186, 1975.
- [45] P. Mehrotra, "ScienceDirect Biosensors and their applications – A review," *J. Oral Biol. Craniofacial Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 153–159, 2016.
- [46] J. Wang, "DNA biosensors based on Peptide Nucleic Acid (PNA) recognition layers. A review," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 13, no. 7–8, pp. 757–762, 1998.
- [47] A. Telefoncu, *Biyosensörler*. 1999.
- [48] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, and E. Reimhult, "Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures," *Sensors*, vol. 8, pp. 1400–1458, 2008.
- [49] D. R. The, K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson, "Technical report Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 16, pp. 121–131, 2001.

- [50] A. K. Agrawal, S. Adil, and S. Ranvir, "Biosensor and its Application in Food and Dairy Industry : A Review," *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 7, no. 2, pp. 3305–3324, 2018.
- [51] Ö. Torun, İ. H. Boyacı, E. Temür, and U. Tamer, "Comparison of sensing strategies in SPR biosensor for rapid and sensitive enumeration of bacteria," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 37, no. 1, pp. 53–60, 2012.
- [52] R. K. Mishra, R. B. Dominguez, S. Bhand, R. Munoz, and J. L. Marty, "A novel automated flow-based biosensor for the determination of organophosphate pesticides in milk," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 32, no. 1, pp. 56–61, 2012.
- [53] C. Yan, F. Dnong, B. Chun-yuan, Z. Si-rong, and S. Jian-guo, "Recent Progress of Commercially Available Biosensors in China and Their Applications in Fermentation Processes," *J. Northeast Agric. Univ.*, vol. 21, no. 4, pp. 73–85, 2014.
- [54] M. Alqasaimah, L. Y. Heng, M. Ahmad, and A. S. S. Raj, "A Large Response Range Reflectometric Urea Biosensor Made from Silica-Gel Nanoparticles," pp. 13186–13209, 2014.
- [55] S. K. Jha, A. Topkar, and S. F. D'Souza, "Development of potentiometric urea biosensor based on urease immobilized in PVA-PAA composite matrix for estimation of blood urea nitrogen (BUN).," *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 70, no. 6, pp. 1145–1150, 2008.
- [56] S. V. Marchenko *et al.*, "Application of potentiometric biosensor based on recombinant urease for urea determination in blood serum and hemodialyzate," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 207, no. PB, pp. 981–986, 2015.
- [57] A. Tiwari, S. Aryal, S. Pilla, and S. Gong, "An amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrode made of hyperbranched polyester functionalized gold nanoparticles," *Talanta*, vol. 78, no. 4–5, pp. 1401–1407, 2009.
- [58] M. Gutiérrez, S. Alegret, and M. del Valle, "Bioelectronic tongue for the simultaneous determination of urea, creatinine and alkaline ions in clinical samples," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, no. 6, pp. 795–802, 2008.
- [59] S. Jakhar and C. S. Pundir, "Preparation, characterization and application of urease nanoparticles for construction of an improved potentiometric urea biosensor," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 100, pp. 242–250, 2018.
- [60] N. Tinkilic, O. Cubuk, and I. Isildak, "Glucose and urea biosensors based on all solid-state PVC-NH₂ membrane electrodes," *Anal. Chim. Acta*, vol. 452, no. 1, pp. 29–34, 2002.
- [61] V. Perumal and U. Hashim, "Advances in biosensors: Principle, architecture and applications," *J. Appl. Biomed.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–15, 2014.

- [62] C. Vaghela, M. Kulkarni, R. Aiyer, and M. Karve, "LED-Based Portable Optical Biosensor for Measurement of Serum Urea Levels Using Urease Immobilized Agarose-Guar Gum Composite Film," *IEEE Sens. J.*, vol. 18, no. 17, pp. 7273–7280, 2018.
- [63] R. Koncki, A. Chudzik, and I. Walcerz, "Urea determination using pH-enzyme electrode," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 21, pp. 51–57, 1999.
- [64] M. Sheliakina, V. Arkhypova, O. O. Soldatkin, O. Saiapina, B. Akata, and S. Dzyadevych, "Urease-based ISFET biosensor for arginine determination," *Talanta*, vol. 121, pp. 18–23, 2014.
- [65] A. S. E. Meibodi and S. Haghjoo, "Amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrochemically polymerized film of polyaniline containing MWCNTs," *Synth. Met.*, vol. 194, pp. 1–6, 2014.
- [66] P. S. Francis, S. W. Lewis, and K. F. Lim, "Analytical methodology for the determination of urea: Current practice and future trends," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 21, no. 5, pp. 389–400, 2002.
- [67] I. D. Weiner, W. E. Mitch, and J. M. Sands, "Physiology Urea and Ammonia Metabolism and the Control of Renal Nitrogen Excretion," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 10, no. 8, pp. 1444–1458, 2015.
- [68] B. Dindar, "Üre Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu," Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, 2010.
- [69] "kimyadergisi.org." [Online]. Available: <https://www.kimyadersi.org/ure-dongusu.html>, 01 Ağustos 2019.
- [70] W. Barmore and W. L. Stone, *Physiology, Urea Cycle*. 2019.
- [71] A. Destanoğlu, "Enzimlerin Çeşitli Polimerlerle Modifikasyonu," Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, 2016.
- [72] E. P. Ivanova, K. Bazaka, and R. J. Crawford, *Natural polymer biomaterials: advanced applications*, no. 32. 2014.
- [73] A. Sitterli and T. Heinze, "Studies about reactive ene-functionalized dextran derivatives for Thiol-ene click reactions," *React. Funct. Polym.*, vol. 136, pp. 66–74, 2019.
- [74] M. Bilal and H. M. N. Iqbal, "Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 130, pp. 462–482, 2019.
- [75] D. K. Bedade, Y. B. Sutar, and R. S. Singhal, "Chitosan coated calcium alginate beads for covalent immobilization of acrylamidase: Process parameters and removal of acrylamide from coffee," *Food Chem.*, vol. 275, pp. 95–104, 2019.
- [76] S. Mohan, O. S. Oluwafemi, N. Kalarikkal, S. Thomas, and S. P. Songca, "Biopolymers – Application in Nanoscience and Nanotechnology," *Recent Adv. Biopolym.*, 2016.

- [77] A. Panáček *et al.*, "Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity," *J. Phys. Chem.*, vol. 110, no. 33, pp. 16248–16253, 2006.
- [78] S. Mohan *et al.*, "Completely green synthesis of dextrose reduced silver nanoparticles, its antimicrobial and sensing properties," *Carbohydr. Polym.*, vol. 106, pp. 469–474, 2014.
- [79] A. S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, no. 1, pp. 3–12, 2002.
- [80] A. J. Meinel *et al.*, "Optimization strategies for electrospun silk fibroin tissue engineering scaffolds," *Biomaterials*, vol. 30, no. 17, pp. 3058–3067, 2009.
- [81] R. Mehvar, "Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents," *J. Control. Release*, vol. 69, no. 1, pp. 1–25, 2000.
- [82] L. G. LARMUTH, "Dextrin," *J. Soc. Dye. Colour.*, vol. 25, no. 8, pp. 220–223, 1909.
- [83] M. G. Llamas-Arriba *et al.*, "Characterization of dextrans produced by *Lactobacillus mali* CUPV271 and *Leuconostoc carnosum* CUPV411," *Food Hydrocoll.*, vol. 89, no. November 2018, pp. 613–622, 2019.
- [84] B. Esmaeilnejad-Moghadam, R. R. Mokarram, M. A. Hejazi, M. S. Khiabani, and F. Keivaninahr, "Low molecular weight dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* strains: Optimization of a new culture medium and the rheological assessments," *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre*, vol. 18, no. February, p. 100181, 2019.
- [85] C. Mateo *et al.*, "Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 39, no. 2, pp. 274–280, 2006.
- [86] W. Soetaert, D. Schwengers, K. Buchholz, and E. J. Vandamme, *A wide range of carbohydrate modifications by a single micro-organism: Leuconostoc mesenteroides*, vol. 10. Elsevier Masson SAS, 1995.
- [87] Z. Karimi, L. Karimi, and H. Shokrollahi, "Nano-magnetic particles used in biomedicine: Core and coating materials," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 5, pp. 2465–2475, 2013.
- [88] G. Pasut, "Polymers for protein conjugation," *Polymers (Basel)*, vol. 6, no. 1, pp. 160–178, 2014.
- [89] N. D. Mao *et al.*, "Polyethylene glycol functionalized graphene oxide and its influences on properties of Poly(lactic acid) biohybrid materials," *Compos. Part B Eng.*, vol. 161, pp. 651–658, 2019.
- [90] T. Vojkovsky, B. Sullivan, and K. N. Sill, "Synthesis of heterobifunctional polyethylene glycols: Polymerization from functional initiators," *Polymer (Guildf)*, vol. 105, pp. 72–78, 2016.
- [91] K. Kaur, K. C. Juglan, and H. Kumar, "Temperature dependent physicochemical studies of polyethylene glycols (PEG-400 and PEG-4000) in aqueous sorbitol solutions," *J. Mol. Liq.*, vol. 268, pp. 700–706, 2018.

- [92] J. Buxadera-Palomero *et al.*, "Biofunctional polyethylene glycol coatings on titanium: An in vitro-based comparison of functionalization methods," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 152, pp. 367–375, 2017.
- [93] O. Mikhailova and P. Rovnaník, "Effect of Polyethylene Glycol Addition on Metakaolin-based Geopolymer," *Procedia Eng.*, vol. 151, pp. 222–228, 2016.
- [94] F. M. Veronese and A. Mero, "The Impact of PEGylation on Biological Therapies," *Biodrugs*, vol. 22, no. 5, pp. 315–329, 2008.
- [95] T. Azarno, "Mikrobiyal Biyoçimento Üretimine Yönelik Üreaz Enzimi Üretiminin Optimizasyonu," Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, 2013.
- [96] M. Altıkatoğlu Yapaöz, "Enzim-Dekstran Konjugatları," Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, 2007.
- [97] M. A. Yapaöz and A. Destanoğlu, "Urease-Dextran complexes with enhanced enzymatic activity and stability," *J. Carbohydr. Chem.*, vol. 8303, 2017.
- [98] D. Ö. Işildak, "Aminoasitlerin Sıvı Kromatografi -Potansiyometri Hibrit Analiz Sistemi İle Basit , Hızlı Ve Ekonomik Olarak Eşzamanlı Tayinleri Proje No : 110T793," 2013.
- [99] M. Altıkatoğlu, E. Karakus, V. Erci, Ş. Pekyardımcı, and I. Isildak, "Novel creatine biosensors based on all solid-state contact ammonium-selective membrane electrodes," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 41, no. 2, pp. 131–136, 2013.
- [100] O. Çubuk, "Bütünüyle Katı Hal Mikro Enzim Sensörler ve Uygulamaları," Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 2007.
- [101] G. Vardar, D. Ortac, M. Cemek, and I. Isildak, "Measuring calcium , potassium , and nitrate in plant nutrient solutions using ion-selective electrodes in hydroponic greenhouse," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 62, no. 5, pp. 663–668, 2015.
- [102] G. Vardar, A. Attar, and M. A. Yapaoz, "Development of urea biosensor using non-covalent complexes of urease with aldehyde derivative of PEG and analysis on serum samples," *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 49, no. 9, pp. 868–875, 2019.
- [103] E. Karakuş, Ş. Pekyardımcı, and E. Kılıç, "Urea Biosensors Based on PVC Membrane Containing Palmitic Acid Urea Biosensors Based on PVC Membrane," *Artif. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.*, vol. 33, no. 3, pp. 329–341, 2005.
- [104] B. Dindar, E. Karakus, and F. Abasyanık, "New Urea Biosensor Based on Urease Enzyme Obtained from *Helicobacter pylori*," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 165, no. 5–6, pp. 1308–1321, 2011.
- [105] N. Spiers, B. Manktelow, and H. M.J., "Practical Statistics Using SPSS," *Natl. Institute Heal. Res. NHS*, 2009.
- [106] Ş. Kalaycı, *SPSS Uygulamalı Çok Değişkenli İstatistik Teknikleri*. Asil Yayınevi, 2006.

- [107] J. Pan *et al.*, "RSC Advances tissue engineering," *R. Soc. Chem.*, vol. 5, pp. 40820–40830, 2015.
- [108] G. Vardar, M. Altikatoglu, Y. Basaran, and İ. Işıldak, "Synthesis of glucose oxidase-PEG aldehyde conjugates and improvement of enzymatic stability," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 46, no. 4, pp. 788–794, 2018.
- [109] M. Altikatoglu, C. Arioğlu, Y. Basaran, and H. Kuzu, "Stabilization of horseradish peroxidase by covalent conjugation with dextran aldehyde against temperature and pH changes," *Cent. Eur. J. Chem.*, vol. 7, no. 3, pp. 423–428, 2009.
- [110] M. Altikatoglu, Y. Basaran, C. Arioğlu, A. Ogan, and H. Kuzu, "Glucose oxidase-dextran conjugates with enhanced stabilities against temperature and pH," *Appl. Biochem. Biotechnol. Charact. Cellul. Cott. fibers Effic.*, vol. 160, no. 8, pp. 2187–2197, 2010.
- [111] M. Monier and A. M. A. El-Sokkary, "Modification and characterization of cellulosic cotton fibers for efficient immobilization of urease," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 51, no. 1–2, pp. 18–24, 2012.
- [112] P. Petrov, S. Pavlova, C. B. Tsvetanov, Y. Topalova, and R. Dimkov, "In situ entrapment of urease in cryogels of poly(N-isopropylacrylamide): An effective strategy for noncovalent immobilization of enzymes," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 122, no. 3, pp. 1742–1748, 2011.
- [113] A. B. Teke and Ş. H. Baysal, "Immobilization of urease using glycidyl methacrylate grafted nylon-6-membranes," *Process Biochem.*, vol. 42, pp. 439–443, 2007.
- [114] A. Akkaya, "Covalent immobilization of urease to modified ethyl cellulose," *Fibers Polym.*, vol. 14, pp. 22–27, 2013.
- [115] Y. Murakami, R. Hoshi, and A. Hirata, "Characterization of polymer-enzyme complex as a novel biocatalyst for nonaqueous enzymology," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 22, pp. 79–88, 2003.
- [116] R. M. De La Casa, J. M. Guisán, J. M. Sánchez-Montero, and J. V. Sinisterra, "Modification of the activities of two different lipases from *Candida rugosa* with dextrans," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 30, pp. 30–40, 2002.
- [117] M. Altikatoglu, Ö. Tavukcuoglu, and M. Mustafaev, "Characterization of water-soluble complexes of polyacrylic acid with α -Amylase from *Aspergillus oryzae*," *Protein J.*, vol. 29, no. 2, pp. 120–126, 2010.
- [118] M. Altikatoglu and Y. Basaran-Elalmis, "Protective effect of dextrans on glucose oxidase denaturation and inactivation," *Artif. Cells. Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, vol. 40, no. 4, pp. 261–265, 2012.
- [119] M. Altikatoglu and Y. Basaran, "Additive effect of dextrans on the stability of horseradish peroxidase," *Protein J.*, vol. 30, pp. 84–90, 2011.
- [120] N. H. Chou, J. C. Chou, T. P. Sun, and S. K. Hsiung, "All Solid-State Potentiometric Biosensors for Creatinine Determination Based on pH and Ammonium Electrodes," *IEEE Sens. J.*, vol. 9, no. 6, pp. 665–672, 2009.

- [121] M. Gutiérrez, S. Alegret, and M. del Valle, "Potentiometric bioelectronic tongue for the analysis of urea and alkaline ions in clinical samples," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 9–10, pp. 2171–2178, 2007.
- [122] N. H. Chou, J. C. Chou, T. P. Sun, and S. K. Hsiung, "Study on the disposable urea biosensors based on PVC-COOH membrane ammonium ion-selective electrodes," *IEEE Sens. J.*, vol. 6, no. 2, pp. 262–268, 2006.
- [123] I. Wałcerz, R. Koncki, E. Leszczyńska, and S. Głąb, "Enzyme biosensors for urea determination based on an ionophore free pH membrane electrode," *Anal. Chim. Acta*, vol. 315, no. 3, pp. 289–296, 1995.
- [124] Z. Wu, L. Guan, G. Shen, and R. Yu, "Renewable urea sensor based on a self-assembled polyelectrolyte layer," *Analyst*, vol. 127, no. 3, pp. 391–395, 2002.
- [125] I. Karbuye, E. Tamiya, and J. M. Dicks, "A microsensor for urea based on an ionselective effect transistor field," *Anal. Chim. Acta*, vol. 185, pp. 195–200, 1986.
- [126] E. Çevik, M. Şenel, and M. Fatih Abasiyanik, "Immobilization of urease on copper chelated EC-Tribeads and reversible adsorption," *African J. Biotechnol.*, vol. 26, pp. 6590–6597, 2011.
- [127] G. D. Curfman, S. Morrissey, and J. M. Drazen, "The medical device safety act of 2009," *New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 15, pp. 1550–1551, 2009.
- [128] A. M. Kayastha and P. K. Srivastava, "Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) urease immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads and its analytical applications," in *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 2001, pp. 41–53.
- [129] G. Aydoğdu, "Çinko Oksit Modifiye Karbon Pasta Enzim Elektrotla Glukoz Tayini," Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, 2011.
- [130] T. P. Velychko *et al.*, "A Novel Conductometric Urea Biosensor with Improved Analytical Characteristic Based on Recombinant Urease Adsorbed on Nanoparticle of Silicalite," *Nanoscale Res. Lett.*, pp. 3–8, 2016.
- [131] N. Nurhanan *et al.*, "An Amperometric Biosensor for the Determination of Bacterial Sepsis Biomarker , Secretory Phospholipase Group 2-IIA Using a Tri-Enzyme System," *Sensors (Basel)*, vol. 18, no. 3, pp. 1–15, 2018.
- [132] R. Chaudhari, A. Joshi, and R. Srivastava, "pH and Urea Estimation in Urine Samples using Single Fluorophore and Ratiometric Fluorescent Biosensors," *Sci. Rep.*, pp. 1–9, 2017.
- [133] R. Koncki, E. Kopczewska, and S. Glab, "Comparison of pH-Membrane Enzyme Electrodes for Urea with Covalently Bound Enzyme," *Anal. Lett.*, vol. 27, no. 3, pp. 475–486, 1994.
- [134] N. H. Chou, J. C. Chou, T. P. Sun, and S. K. Hsiung, "Measurement and comparison of potentiometric selectivity coefficients of urea biosensors based on ammonium ion-selective electrodes," *IEEE Sens. J.*, vol. 5, no. 6, pp. 1362–1368, 2005.

- [135] N. H. Chou, J. C. Chou, T. P. Sun, and S. K. Hsiung, "Differential type solid-state urea biosensors based on ion-selective electrodes," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 130, no. 1, pp. 359–366, 2008.
- [136] C. Marzadori, S. Miletto, C. Gessa, and S. Ciurli, "Immobilization of jack bean urase on hydroxiapetite:urease immobilization on alkaline soils," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 30, pp. 1485–1490, 1998.
- [137] K. Saeedfar, L. Y. Heng, T. L. Ling, and M. Rezayi, "Potentiometric urea biosensor based on an immobilised fullerene-urease bio-conjugate," *Sensors (Switzerland)*, vol. 13, no. 12, pp. 16851–16866, 2013.
- [138] C. Y. (Kevin) Lai, P. J. S. Foot, J. W. Brown, and P. Spearman, "A urea potentiometric biosensor based on a thiophene copolymer," *Biosensors*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2017.
- [139] A. Mulyasuryani, A. Roosdiana, and A. Srihardyastutie, "the Potentiometric Urea Biosensor Using Chitosan Membrane," *Indones. J. Chem.*, vol. 10, no. 2, pp. 162–166, 2010.
- [140] A. Medeiros, L. Maria, Z. Coelho, and M. Alice, "Development of Potentiometric Urea Biosensor based on Canavalia ensiformis Urease," in *Biosensors - Emerging Materials and Applications*, 2011.
- [141] W. Prissanaroon-Ouajai, A. Sirivat, P. J. Pigram, and N. Brack, "Potentiometric urea biosensor based on a urease-immobilized polypyrrole," *Macromol. Symp.*, vol. 354, no. 1, pp. 334–339, 2015.
- [142] U. B. Trivedi *et al.*, "Potentiometric biosensor for urea determination in milk," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 140, no. 1, pp. 260–266, 2009.
- [143] J. C. Chou *et al.*, "The Flexible Urea Biosensor Using Magnetic Nanoparticles," *IEEE Trans. Nanotechnol.*, vol. 18, no. c, pp. 484–490, 2019.
- [144] T. Ahuja, I. A. Mir, D. Kumar, and Rajesh, "Potentiometric urea biosensor based on BSA embedded surface modified polypyrrole film," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 134, no. 1, pp. 140–145, 2008.
- [145] D. Chirizzi and C. Malitesta, "Potentiometric urea biosensor based on urease immobilized by an electrosynthesized poly(o-phenylenediamine) film with buffering capability," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 157, no. 1, pp. 211–215, 2011.
- [146] M. Mikani, S. Talaei, R. Rahmanian, P. Ahmadi, and A. Mahmoudi, "Sensitive electrochemical sensor for urea determination based on F-doped SnO₂ electrode modified with ZnO-Fe₃O₄ nanoparticles transducer: Application in biological fluids," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 840, pp. 285–294, 2019.
- [147] D. Ö. Acar, "Üreaz Enziminin Ca-Alginat Üzerine İmmobilizasyon Koşullarının İncelenmesi," Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, 2009.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

İletişim Bilgisi: vardargokay@gmail.com

Makaleler

1.G. Vardar, A. Attar, and M. A. Yapaoz, "Development of urea biosensor using non covalent complexes of urease with aldehyde derivative of PEG and analysis on serum samples," *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 49, no. 9, pp. 868-875, 2019.

Konferans Bildirileri

1. G. Vardar, M. Altıkatoğlu Yapaöz, and I. Isildak, "An All Solid-State Urea Biosensor Based on Ammonium Selective PVC Membrane Electrode," in *41st FEBS Congress on Molecular and Systems Biology for a Better Life*, 2016.

2. G. Vardar and M. Altikatoglu Yapaöz, "Development Potentiometric Mikro Sized Urea Biosensor Based on Urease-Dextran Complex," in *43rd FEBS Congress*, 2018.

3. A. Destanoğlu, G. Vardar, M. Altıkatoğlu Yapaöz, and I. Isildak, "Üreaz Enziminin Dekstran Aldehit Polimeriyle Modifikasyonu," in *18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, 2015.

4. A. Destanoğlu, G. Vardar, and M. Altikatoglu Yapaoz, "Üreaz Enziminin PEG Aldehit Polimeriyle Non-Kovalent Etkileşimlerle Stabilizasyonu," in *10. Ulusal Afinité Teknikleri Kongresi*, 2016.

5. G. Vardar and M. Altikatoglu Yapaoz, "Karboksillenmiş PVC Membran Yüzeyine Üreaz-Dekstran Kompleksi İmmobilizasyonuna Dayalı Potansiyometrik Üre Biyosensörünün Oluşturulması," in *8.Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi*, 2017.

6. G. Vardar and M. Altikatoglu Yapaoz, "Karboksillenmiş PVC Membran Yüzeyine Üreaz Polietilen Glikol Kompleksi İmmobilizasyonuna Dayalı Potansiyometrik Üre Biyosensörünün Oluşturulması," in *12. Ulusal Afinité Teknikleri Kongresi*, 2018.

Projeler

1. Tübitak 3001 Başlangıç Ar-Ge projesi; Dekstran ile Stabilize Edilmiş Üreaz Enzimi ve Kompozit Amonyum Sensör Kullanılarak Mikro Büyüklükte Yeni Tip Potansiyometrik Üre Biyosensör Geliştirilmesi, İbrahim IŞILDAK, 114Z138, 2014-2016, Bursiyer

2. Ytü Doktora Projesi; Üreaz enziminin Polietilen glikol ile modifikasyonu sonucu mikro boyutta üre biyosensörünün oluşturulması, Melda ALTİKATOĞLU YAPAÖZ, FDK-2017-3198, 2018-2019, Araştırmacı

Ödüller

1. Tubitak 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Doktora Bursu