

Kolesterol Tayini için Biyosensör Geliştirilmesi

Zikriye Özbek^{1,*}

¹University of Canakkale Onsekiz Mart, Faculty of Engineering, Department of Bioengineering, Canakkale, 17100, Turkey

*e-mail: zikriye@comu.edu.tr, ORCID: 0000-0002-9112-1478

The Arrival date:13.05.2023 ; Date of Acceptance: 24.05.2023

Öz

Bu çalışmada, kolesterol amperometrik tayini için Prusya mavisi (PB) temelli amperometrik biyosensörler hazırlandı. Bu amaçla, jelatin ve glüteraldehit içeren ortam kullanılarak çapraz bağlama tekniği ile PB ve kolesterol oksidaz (CO_x) enzimi screen-printed elektrotların (SPE) yüzeyine immobilize edildi. SPE/PB/CO_x elektrotların kolesterol tayini için uygun oldukları gözlemlendi ve optimizasyon çalışmaları bu enzim elektrotları kullanılarak yapıldı. SPE/PB/CO_x enzim elektrodu için optimum jelatin miktarı, glüteraldehit oranı, PB derişimi, tampon cinsi, tampon derişimi, sırasıyla fosfat tamponu; 0,002 g, % 0,5, 0,02 M, 0,05 M; pH:7,5 olarak belirlendi. Enzim elektrodun, kolesterol için doğrusal çalışma aralığı 2×10^{-6} - 2×10^{-5} M, gözlenebilir sınıırı 2×10^{-6} M, cevap süresi 50 s ve raf ömrü yaklaşık bir ay olarak bulundu. SPE/PB/CO_x kolesterol biyosensörü hazırlanması optimizasyonu başarılı bir şekilde elde edildi.

Anahtar Kelimeler

Amperometri;
Biyosensör; Enzim elektrot; Kolesterol.

Development of Biosensors for Cholesterol Determination

Abstract

In this study, for the determination of cholesterol amperometric Prussian blue (PB) based amperometric biosensors were prepared. For this purpose, the cross-linking techniques using glutaraldehyde medium containing gelatin and PB and cholesterol oxidase (CO_x) enzyme was immobilized on the surface of the screen-printed electrode. SPE / PB / CO_x was observed that the electrodes are suitable for the determination of cholesterol and optimization study was performed using the enzyme electrodes. SPE / PB / CO_x enzyme optimum amount of gelatin to the electrodes, glutaraldehyde ratio of concentration, buffer type, buffer concentration, respectively, in phosphate buffer; 0.002 g, 0.5%, 0.02 M, 0.05 M; pH was set at 7.5. The enzyme electrode linear operating range for cholesterol, 2×10^{-6} to 2×10^{-5} M, observed ability to limit 2×10^{-6} M, response time of 50 h and shelf-life was found to be about a month. Optimization of SPE/PB/CO_x cholesterol biosensor preparation was successfully achieved.

Keywords

Amperometry;
Biosensor; Enzyme electrode; Cholesterol.

1. Giriş

Biyosensörler ilk olarak 1950'li yıllarda Clark'ın Cincinnati Hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat esnasında kanda bulunan O₂ derişimini kullandığı bir elektrotla takip etmesi ile ortaya çıkmıştır. Clark ve Lyons Glukozoksidaz (GOD) enzimini O₂ elektronu ile birleştirerek kandaki mevcut glikoz miktarını 1962 yılında tespit edebildiler. Bu şekilde yeni bir analitik sistem oluştu ve bu sistem ile birlikte hem fiziksel sistemin (elektrot) tayin uyarlılığı hem de biyolojik kısmın yüksek spesifikliğini (enzim) birleştirilerek geniş spektrumlu bir uygulama olanağı meydana gelmiştir. Klasik elektrokimya sistemi ile sadece katyon ve anyonları ölçebilen sensörler, şu anda biyomateryalin de sisteme dahil olması ile birçok maddenin tayinine olanak tanımıştır. Biyosensörler; bakteri ve virüs teşhisi, tarım ve veterinerlik, biyomedikal sektör, maden işletmelerinde zehirli gaz analizleri gıda üretim ve analizi, ilaç analizi, askeri uygulamalar süreç kontrolü, çevre koruma ve kirlilik kontrolü, klinik teşhis, biyoreaktör kontrolü, tarım ve veterinerlik, endüstriyel atık su kontrolü gibi uygulamalarda kullanım alanı bulmaktadır. Gelişen teknolojik çalışmalarla biyosensörler kullunılarak hastanelerde, gıda alanında enzim biyosensörleri kullanılmaktadır. Ayrıca, gıdalardaki yabancı maddeler gibi tazelik ve aroma analizindeki karışık parametreler için de biyosensörler kullanılabilir. Uyuşturucu ile mücadelede ve ilaçların kötü amaçla kullanımı gibi konularda biyosensörler kullanılabilmektedir (Telefoncu, 1999).

1975'ten itibaren kalorimetrik tayinle serumdaki serbest kolesterolün belirlenmesinde kolestrol enzimi kullanılır (Fujishiro vd. 2002; Singh vd. 2004; Isobe vd. 2003)

Serum içindeki toplam kolesterolün belirlenmesi klinik tespitler açısından önemlidir. Yüksek kolesterol miktarı çeşitli damarların duvarlarında toplanarak damarların kapanmasına, tiroit bezinin biraz çalışması sonucu tiroit bozukluğuna, şeker rahatsızlığına ve sarılığa neden olur (Coulombe vd., 2001).

Kolesterol oksidaz farklı mikroorganizmalardan saflaştırılarak elde edilen iki basamaklı bir enzimdir. Bu enzim merkezde iki reaksiyonu katalize eder. Kolesterolün ilk tepkimede yükseltgenmesini, ikinci tepkimede ise oluşan yükseltgenme ürününün kolesterol-4- en-3-on'a dönüşümünü oluşturur ve H₂O₂ açığa çıkar (Bailey vd. 1986; Nishiya vd. 1999). Amperometrik kolesterol biyoalgısı amacıyla polianilin film üzerine poli(stiren-ko-akrilik asit) manyetik mikroküreler ve kolesterol oksidaz enzimini kovalent olarak immobilize etmişlerdir. PANI/Fe₃O₄/PSA-ChO_x elektrodunun algılama özellikleri dönüşümlü voltametri ve kronoamperometri tekniklerini kullanılarak çalışılmıştır. Optimize edilmiş deney koşulları altında biyosensör geniş doğrusal çalışma aralığı 0.2-1.8 mM (R² =0.9901), düşük tayin sınırı (0.02 mM), kısa cevap süresi (5-10 s) gibi mükemmel özellikleri göstermiştir (Huy vd. 2013). Serum numunesindeki kolesterol miktarını belirlemek için kolesterol oksidaz enzimi, platin elektrot üzerinde oluşturulmuş poli(2-hidroksietilmetakrilat/polipirol) kompozit membranı içine tutuklanarak biyosensör geliştirilmiştir. Standart yöntemlerle, elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında 0.998'den büyük bir korelasyon elde edildiği belirtilmiştir (Brahim vd. 2001). Platin-/polipirol-polivinilsülfonat filmine kolesterol oksidaz enzimini hapsedme yöntemiyle immobilize edilmiştir. Kolesterol tespiti, oluşturdukları enzim bağlanmış elektrodun yüzey tabakasında meydana gelen

enzim reaksiyonu ile hidrojen peroksitin +0.4V'da yükseltgenmesi esas alınarak yapılmıştır. İmmobilize enzimin en uygun pH değerini 7.25 ve en uygun sıcaklık değerini 35 °C bulunmuştur (Yıldırımoglu, 2009). Amperometrik kolesterol biyosensörü geliştirmek amacıyla, genelde platin, altın ve karbon elektrot materyalleri polianilin, polipirol, poli(o-fenilendiamin), poli(vinilferrosenyum) gibi polimerik filmler ile kaplanmış ve bu modifiye elektrotlar üzerine çeşitli teknikler kullanarak kolesterol oksidaz enzimi tek başına ya da kolesterol esteraz enzimi ile birlikte immobilize edilmiştir (Singh vd. 2006a, Solanki vd. 2007a, Özer vd. 2007). Kolesterolün kandaki yüksek seviyeleri, kalp hastalıkları, yüksek tansiyon, damar sertliği, kronik kalp hastalıkları, beyin trombozu gibi hastalıklarla ilişkilidir. Bu sebepten, kanda kolesterolün hızlı ve kolay bir şekilde tayini, bu gibi durumların teşhisinde ve önlenmesinde oldukça önemlidir (Kumar vd. 2011, Basu vd. 2007). Genel olarak, kolesterolün tayini spektrofotometri üzerine temellenmektedir. Ancak, bu yöntem karışık işlemleri içerir ve her analizde pahalı enzimler kullanıldığı için yöntem maliyetlidir. Amperometrik enzim elektrotlar yüksek çalışma kararlılığına, seçiciliğe, hızlı cevaba ve düşük maliyete sahip olduklarından kolesterol tayini için spektrofotometrik yöntemlere önemli bir alternatiftir (Bokoch vd. 2001, Nishiya vd. 2008, Solanki vd. 2009).

Kolesterol tayininde günümüzde çeşitli kolorimetrik, polarografik, kromatografik, spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bunlar genel olarak zaman alıcı ve pahalı sistemlerdir. Bu nedenle kolesterol derişiminin daha kısa sürede, daha düşük maliyetle daha doğru ölçüm yapan sistemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Bu çalışma kapsamında

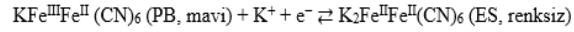
kolesterol derişiminin daha hızlı ve daha ucuz ölçümüne olanak sağlayan SPE/PB/CO_x modifiye biyosensör geliştirildi.

Bu çalışmada kolesterole duyarlı yeni bir Prusya mavisi esaslı amperometrik biyosensör hazırlandı. Bu amaç doğrultusunda çapraz bağlama yöntemi kullanılarak screen printed elektrodun yüzeyine kolestrol oksidaz enzimi immobilizasyonu sağlandı. Hazırlanan enzim elektrod kolestrol örneğine daldırıldı. Kolestrol tayini enzim reaksiyonları sonucu oluşan hidrojen peroksitin +0.65 V'da yükseltilmesi prensibine dayanılarak yapıldı. Hazırlanan biyosensörün en iyi çalışma koşulları belirlenmesi ve performansını etkileyen faktörlerin incelendi.

2. Materyal ve Metot

SPE/PB/CO_x elektrotların kolesterol tayini için kullanılan kolesterol, kolesterol oksidaz ve tüm çözeltiler Sigma Aldrich firması tarafından temin edilmiştir. Bu çalışmada, kolesterol tayini için prusya mavisi film temelli amperometrik enzim elektrotların hazırlanması amaçlandı. Bunun için, PB içeren çözeltiler kullanılarak hazır alınan SPE'lar üzerine, kolesterol oksidaz (CO_x) enzimleri çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edildi. Enzim elektrotların uygun çalışma şartları ve performans faktörleri yapılan çalışmalarla belirlendi.

PB olarak adlandırılan potasyum ferrik hekzasiyanoferrat (KFe^{III}Fe^{II}(CN)₆), kararlı elektrokimyasal redoks davranışlar ve iyi elektrokromik performans gösteren bir elektrokromik malzemedir. Aşağıdaki denkleme göre mavi durumdan renksiz duruma değişen bir anodik renklendirme sergiler.

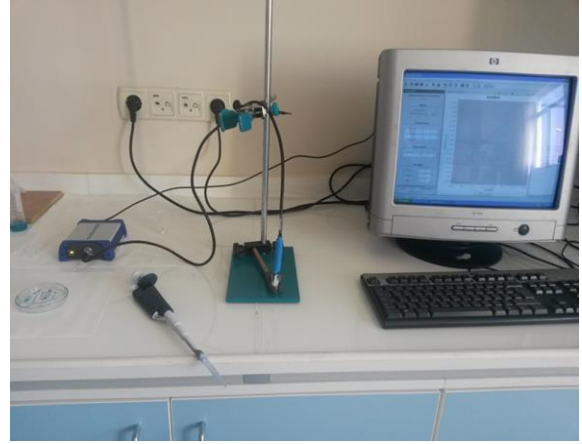


PB, biyosensörler, iyon seçici elektrotlar, batarya ve elektrokromik ekran gibi çeşitli uygulamalar için iletken tabakalar üzerine ince filmler olarak çöktürebilir. Renklendirme / ağartma süresi ve renklenme verimliliği gibi PB'nin elektrokromik özellikleri, uygulamalar için önemli bir husustur ve birçok araştırma bu elektrokromik özelliklerin geliştirilmesine odaklanmıştır (Lin vd. 2014).

Amperometrik çalışmalar Dropsens-stat400 elektrokimyasal analiz cihazı ve homemade-ev yapımı hücre standı ile birlikte gerçekleştirildi. Çalışmadaki çözeltilerin pH'ları ORION marka 912600 numaralı kombine cam pH elektrodu kullanılarak ORION 720A cihazı vasıtasıyla sağlandı. Yıkama işlemlerinin yapılmasında (Tip III kalitesinde) ve çözeltilerin (18.2 MΩ·cm @ 25 °C-Tip I kalitesinde) hazırlanmasında kullanılan su, Merk-Millipore marka ultra saf su sistemi ile elde edildi. Çözelti eklemeleri için Gilson marka mikro pipetler kullanıldı. Çözeltileri karıştırmak için çoklu manyetik karıştırıcı olarak Jeitech marka manyetik karıştırıcı ve IKA marka vortex kullanıldı. Kimyasalların tartılmasında Denver marka hassas terazi kullanıldı.

2.1 Elektrokimyasal Hücre ve Elektrotlar

Amperometrik ölçüm çalışmaları, kendi içerisinde bulunan çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrottan ibaret olan 4 mm çapında 0.12 cm² alanlı screen printed elektrot (SPE) ve Şekil 1' de verilen ölçme sistemi kullanılarak yapıldı.



Şekil 1. Dropsens ölçüm sistemi

2.2 Kullanılan Çözeltiler

Bu yöntemde Prusya mavisi ince film tek çözeltinin damlatılması ile kimyasal olarak SPE altaşları-substratları depozitlenmiştir. Çözeltilerden biri 0.1 M Fe₂(SO₄)₃, diğeri ise 0.1 M K₄[Fe(CN)₆] çözeltisidir. Kullanılan çözeltilerin hazırlanmasıyla ilgili hesaplar ayrıntıları ile aşağıda verilmiştir;

0.1 M (Fe₂SO₄)₃ kaplama çözeltisi: Öncelikle 3.998 g Fe₂(SO₄)₃ bileşiği 100 mL su içerisinde çözülerek 0.1 M Fe₂(SO₄)₃ çözeltisi hazırlanmıştır. Ardından aşağıda yazılan kimyasalların ultrasonik karıştırma ile çözünmesi sağlanarak kaplama çözeltisi elde edilmiştir.

15 ml 0.1 M Fe₂(SO₄)₃ çözeltisi

90 ml saf su

0.5 g EDTA

10 ml HCl (3 M)

0.1 M K₄[Fe(CN)₆] kaplama çözeltisi

Öncelikle 4.1234 g K₄[Fe(CN)₆] bileşiği 100 mL su içerisinde çözülerek 0,1 M K₄[Fe(CN)₆] çözeltisi hazırlanmıştır. Ardından aşağıda yazılan kimyasalların ultrasonik karıştırma ile çözünmesi sağlanarak kaplama çözeltisi elde edilmiştir.

15 ml 0,1 M $K_4[Fe(CN)_6]$ çözeltisi

90 ml saf su

10 ml HCl (3 M)

Toplam fosfat derişimi 0.05 M olacak şekilde sodyum dihidrojenfosfat dihidrat ve disodyum monohidrojenfosfat heptahidrat'tan belirli oranlarda tartıldı ve saf suda çözüldü. Hazırlanan çözeltilerin pH'ları 0.10 M NaOH ve 0.10 M HCl çözeltileri ile birlikte pH değerleri ayarlandı. Ayrıca, optimum tampon derişimini belirlemek amacıyla, toplam fosfat derişimi 0.10 M; 0.15 M ve 0.20 M olan fosfat tamponları yukarıdaki ile aynı biçimde hazırlandı. Tampon çözeltiler kullanıldıktan sonra bozulmamaları için buzdolabında +4 °C'de saklandı.

Derişimi 0.05 M olan TRIS tampon çözeltisi hazırlamak amacıyla, gerekli miktarda tris(hidroksimetil)aminometan tartıldı ve pH değeri 1.0 M HCl çözeltisi kullanılarak istenilen pH değerine belirlendi. Ayrıca derişimi 0.10 M olan TRIS tampon çözeltiside yukarıdaki şekilde hazırlandı.

2.2.1 Hücre Ölçüm Çözeltisi

Amperometrik ölçüm çalışmaları için kullanacağımız hücre içerisine (toplam hücre hacmi 1 mL) 0.05 M pH:7.5 fosfat tamponundan 885 µL, 0.1 M potasyum klorür (KCl) çözeltisinden 100 µL, 5 mM potasyum ferrosiyanit ($K_4[Fe(CN)_6]$) çözeltisinden 10 µL ve 5 mM potasyum ferrisiyonit ($K_3[Fe(CN)_6]$) çözeltisinden 5 µL alınarak koyulması ile hücre ölçüm çözeltisi hazırlandı.

Amperometrik ölçümler için kullandığımız SPE ölçüm hücresi Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Amperometrik SPE ölçüm hücresi

2.2.2 Enzim Çözeltisi

Kolesterol oksidaz ($COx-5$ U/mg) enzimi, derişimi 1 mg/mL olacak biçimde 0.05 M pH 7.5 fosfat tamponunda çözüldü. Hazırlanan enzim çözeltisi kullanılmadığında -20 °C'ta buzdolabında saklandı.

2.2.3 Kolesterol Çözeltisi

Derişimi 2.0×10^{-5} M stok kolesterol çözeltisi hazırlamak için, metil β -siklodekstrin içeren suda çözünebilir kolesterolün uygun miktarda tartıldı ve saf suda çözülme işlemi gerçekleştirildi. Aynı şekilde stok kolesterol çözeltisi kullanılmadığı zaman +4 °C'de buzdolabında korundu.

2.2.4 Girişim Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

Serumda olabilecek elektroaktif farklı çeşitlerin enzim elektrodun yanıtına etkisinin bulunmasında kullanılacak çözeltiler aşağıda belirtildiği şekillerde hazırlandı:

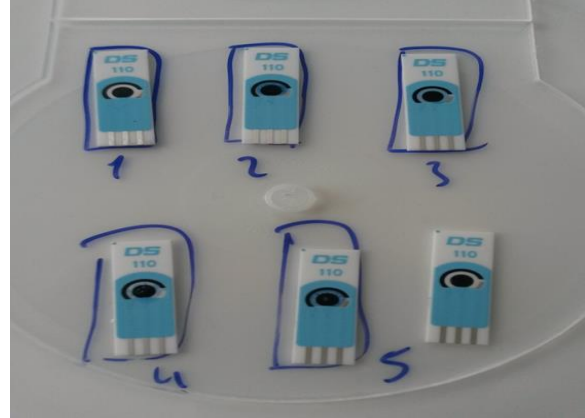
L-Askorbik asit, glukoz ve üre stok çözeltileri her birinin derişimleri 1.0×10^{-2} M olarak katı malzemelerin tek tek saf suda çözülmesi ile hazırlandı.

Girişim çalışmalarında, yukarıda verilen maddelerin fizyolojik konsantrasyonu, stok çözeltilerin belli oranlarının elektrokimyasal hücreye eklenmesiyle sağlandı.

2.3 Kolesterol Tayini için Enzim Elektrotların Hazırlanması

Kolesterol tayininde kullanılacak enzim elektrotların hazırlanması için, satın alınan SPE elektroda kolesterol oksidaz (CO_x) enzimi immobilize edildi. Bunun için;

Belirli miktarda jelatin tartılarak ependorf tüp içerisine konuldu. Üzerine $50 \mu L$ $0.05 M$ $pH:7.5$ fosfat tamponu ilave edildi. $15 dk$ beklenildi. Sıcak su içerisinde $1-2 s$ bekletilerek jelatin şişirildi ve vortekslendi. Şişirilen jelatin çözeltisinden $11.5 \mu L$ alınarak farklı bir ependorf tüp içerisine koyuldu. Belli ünite de enzim içeren enzim çözeltisinden $4 \mu L$ alınarak jelatin bulunan ependorf tüpe koyuldu. Bu çözeltinin üzerine $2.5 \mu L$ PB çözeltisi eklendi. Üç çözeltinin olduğu ependorf tüp içerisine $2 \mu L$ % 25 'lik glutaraldehit (GA) ilave edilerek iyice karışması sağlandı. Hazırlanan bu çözeltiden $10 \mu L$ alınarak screen printed elektrot yüzeyine enzim immobilizasyonunun gerçekleşebilmesi için yarım saat oda sıcaklığında $3-4$ saat buzdolabında $+4 ^\circ C$ 'de bekletildi. Hazırlanan enzim elektrot (Şekil 3) SPE/PB/ CO_x olarak adlandırıldı.



Şekil 3. Hazırlanan enzim elektrotlar

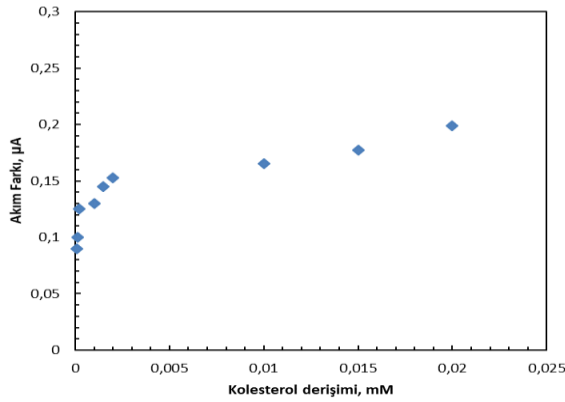
Hazırlanan SPE/PB/ CO_x enzim elektrotların kolesterole duyarlıklarını belirlemek için enzim elektrotlar ayrı ayrı hazırladığımız hücre çözeltisi içerisine farklı potansiyelde kararlı hal akımları elde edilene kadar tutuldu. Çalışma potansiyel değeri belirlendi. Ayrıca, çalışma ortamına belli derişimde stok kolesterol çözeltisinden ilaveler yapıldı ve her ilave sonrası amperometrik cevaplar belirlendi. Kolesterol derişimine karşı hesaplanan akım farkları grafiğe geçirilerek enzim elektrotların çalışılan derişimlerde kolesterole duyarlıkları ve doğrusal çalışma aralıkları bulundu.

3. Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada, kolesterol tayini için enzim elektrot hazırlamak amacıyla SPE kaplı elektrotlar üzerine, CO_x enzimi immobilize edildi. Bu çalışmada hazırlanan enzim elektrodun cevabına jelatin miktarı, GA oranı, tampon cinsi, tampon derişimi gibi çeşitli parametrelerin etkisi, enzim elektrodun kolesterole duyarlığı, cevap süresi, tekrar kullanılabilirliği ve üretilebilirliği, ömrü gibi performans faktörleri incelendi. Ayrıca, hazırlanan enzim elektrodun serumda bulunabilecek ve girişim yapabilecek türlere cevabı belirlendi.

3.1 SPE/PB/CO_x Enzim Elektrotların Kolesterolle Duyarlılığı

Kolesterol enzim elektrodu hazırlamak amacıyla, SPE elektroda, CO_x enzimi immobilize edildi. Elde edilen SPE/PB/CO_x enzim elektrodu, hücre ölçüm çözeltisi içerisinde +0.65 V'da kararlı hal akımları elde edilme süresince bekletildi ve daha sonra belirlenen konsantrasyonda kolesterol çözeltisi eklenerek amperometrik cevaplar belirlendi. Elde edilen cevap akımları kolesterol derişimine karşın grafiğe geçirildi (Şekil 4).



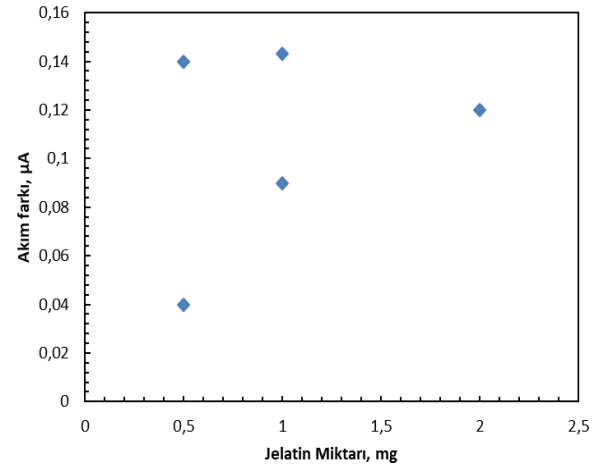
Şekil 4. SPE/PB/CO_x enzim elektrodunun kolesterolle duyarlılığı (0.05 M pH 7.5 fosfat tamponu, +0.65 V, oda sıcaklığı)

3.2 SPE/PB/COX Enzim Elektrodunun Optimum Şartları ve Performans Faktörleri

3.2.1 Jelatin Miktarı

SPE/PB/CO_x enzim elektrodunun hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine jelatin miktarının etkisini araştırmak amacıyla jelatin 0.0005; 0.001; 0.002 g olarak farklı kütelerde hazırlandı. Bu beş farklı jelatin miktarları ile SPE/PB/CO_x enzim elektroduları hazırlandı. Hücre içine hazırladığımız çözelti 1 mL eklendi. Biyosensör bu çözeltide +0.65 V'da dengeye getirildi. Sonra pH'sı 7.5 olan fosfat

tampon çözeltiyle hazırlanan kolesterol çözeltisinden, çalışma ortamındaki kolesterol konsantrasyonu 2×10^{-5} M olacak şekilde çalışma kabına eklendi. Daha sonra +0,65 V sabit potansiyelde amperometrik cevap akımı ölçüldü. Benzer işlevler farklı jelatin miktarları ve 2×10^{-5} M kolesterol çözeltileri için de yinelenildi. Farklı jelatin miktarlardaki her bir elektrot için +0.65 V sabit potansiyelde belirlenen amperometrik yanıt akımları jelatin miktarına karşın grafiğe (Şekil 5) geçirildi ve grafikten biyosensörün en iyi oranda çalışma jelatin miktarı 2 mg olarak belirlendi.

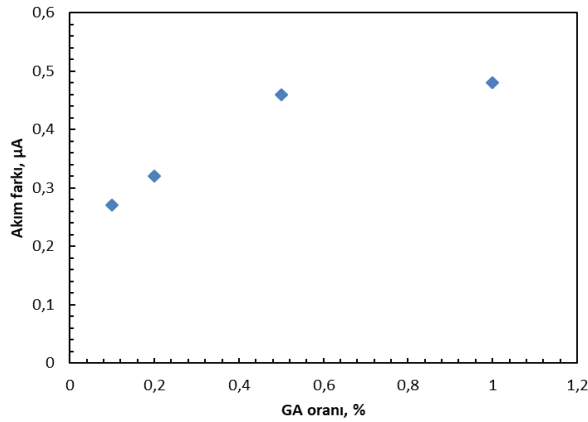


Şekil 5. SPE/PB/CO_x enzim elektrodu cevabı üzerine jelatin miktarının etkisi (0.05 M pH 7.5 fosfat tamponu, +0.65 V, oda sıcaklığı)

3.2.3 Gluteraldehit (GA) Oranı

Hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine GA oranının etkisini incelemek için GA % 1; % 0.5; % 0.2; % 0.1 olarak farklı oranlarda hazırlandı. Bu 4 farklı GA miktarları ile SPE/PB/CO_x enzim elektroduları hazırlandı. Hücre içine hazırladığımız çözelti 1 mL ilave edildi. Biyosensör bu çözeltide +0.65 V'da denge sağlandı. Sonra ölçüm hücresindeki kolesterol

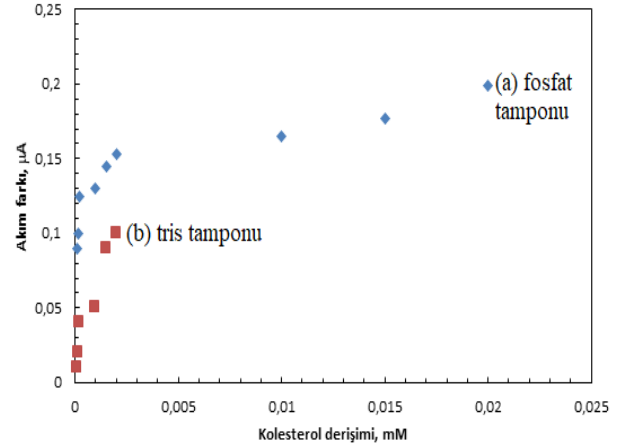
derişimi 2×10^{-5} M olacak şekilde hücreye ilave edildi. Daha sonra +0.65 V değişmeyen potansiyelde amperometrik cevap akımı belirlendi. Benzer işlemler farklı GA miktarları ve 2×10^{-5} M kolesterol çözeltileri için de tekrarlandı. Farklı jelatin miktarlardaki her bir elektrot için +0.65 V sabit potansiyelde ölçülen amperometrik cevap akımları GA miktarına karşı grafiğe (Şekil 6) geçirildi ve grafikten biyosensörün optimum çalışma GA miktarı % 0.5 olarak belirlendi.



Şekil 6. SPE/PB/CO_x enzim elektrodu cevabı üzerine GA miktarının etkisi (0.05 M pH 7.5 fosfat tamponu, +0.65 V, oda sıcaklığı)

3.2.4 Tampon Cinsi

Enzim elektrotlarda ortamda bulunan türlerin elektrot cevabına etkisinin önemli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada tampon cinsinin de belirlenmesinin uygun olacağı düşünüldü. En uygun tampon cinsinin bulunması amacıyla, 0.05 M pH 7.5 fosfat ve TRIS tamponlarında SPE/PB/CO_x enzim elektrodun belli derişimde kolesterol eklemeleriyle gözlenen amperometrik cevapları kolesterol konsantrasyonuna karşı grafiğe aktarıldı (Şekil 7 a ve b).



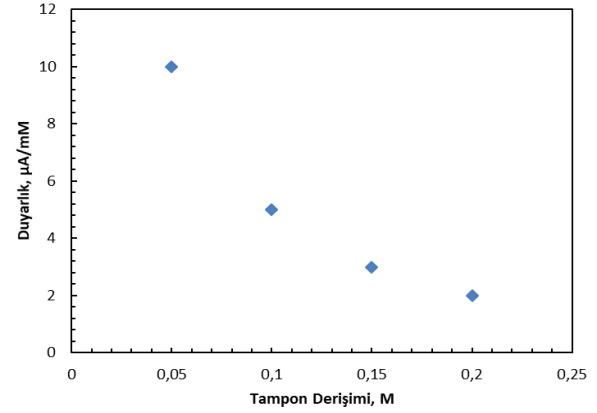
Şekil 7. SPE/PB/CO_x enzim elektrodun cevabına tampon cinsinin etkisi (a) 0.05 M pH 7.5 fosfat tamponu, (b) 0.05 M pH 7.5 TRIS tamponu (+0.65 V, oda sıcaklığı)

Bu grafiklerden elde edilen duyarlık değerleri ve çalışma aralıkları karşılaştırıldığında, fosfat tamponu kullanıldığında enzim elektrodun kolesterole duyarlığının TRIS tamponu ile elde edilene göre yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğu ve çalışma aralığının da daha geniş olduğu görüldü. Bu nedenle, daha sonraki deneylerde, çalışma tamponu olarak fosfat tamponu kullanıldı. Kolesterol tayini ile ilgili yapılan polimer temelli pek çok çalışmada çalışma tamponu olarak fosfat tamponu kullanıldığı görüldü (Singh vd. 2006a, Solanki vd. 2007a, Basu vd. 2007). TRIS tamponu kullanılarak elde edilen duyarlığın düşük olmasının nedeni, tam olarak açıklanamamakla birlikte, pH'yı ayarlamak için kullanılan HCl'den gelen Cl⁻ iyonlarının etkisiyle prusya mavisi filmin iletkenliğinin azalmasından kaynaklandığı söylenebilir. Grafik incelendiğinde, fosfat tamponunda elde edilen duyarlığın TRIS tamponunda elde edilen duyarlıktan daha yüksek olduğu görüldü. Ayrıca, fosfat tamponunda nispeten daha geniş bir doğrusal çalışma aralığı elde edildi. Bu sebepten, daha

sonraki çalışmalar fosfat tamponu kullanılarak yapıldı. Kolesterol tayinine yönelik daha önceki çalışmalarda genellikle fosfat tamponu çalışma tamponu olarak kullanılmıştır (Shan vd. 2009, Kochana vd. 2008, Fan vd. 2007, Tembe vd. 2006, Rajesh vd. 2004, Vedrine vd. 2003).

3.2.5 Tampon Derişimi

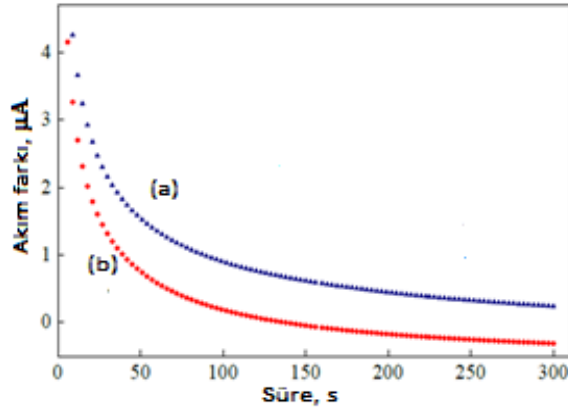
SPE/PB/CO_x enzim elektrodun cevabına tampon derişiminin etkisini görmek ve uygun tampon derişimini belirlemek amacıyla, 0.05 M; 0.10 M; 0.15 M ve 0.20 M konsantrasyonlarında hazırlanan tamponlarda, SPE/PB/CO_x enzim elektrodunun kolesterol eklemelerine karşı amperometrik cevapları belirlendi ve elde edilen kalibrasyon grafiklerinden yararlanarak bulunan duyarlık değerleri tampon derişimine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 8). Grafikten de görülebileceği üzere, enyüksek duyarlık 0.05 M tampon derişiminde elde edildi. Bu derişimin üstündeki fosfat derişimlerinde duyarlığın azaldığı görülmektedir. Bu sebepten, daha sonraki çalışmaların 0.05 M tampon derişiminde yapılmasının uygun olacağına karar verildi. Ayrıca, pek çok çalışmada, en uygun tampon derişimi olarak 0.05 M tampon derişiminin kullanıldığı görüldü (Singh vd. 2006a,b, Özer vd. 2007, Solanki vd. 2007a). Bu açıdan çalışmada elde edilen sonucun literatür bilgileriyle uyum içinde olduğu söylenebilir. Tampon kapasitesi düşük olması nedeniyle daha düşük tampon derişimlerinde çalışma yapılmadı.



Şekil 8. SPE/PB/CO_x enzim elektrodun cevabına tampon derişiminin etkisi (pH 7.5 fosfat tamponu, +0.65 V, oda sıcaklığı)

3.2.6 Cevap Süresi

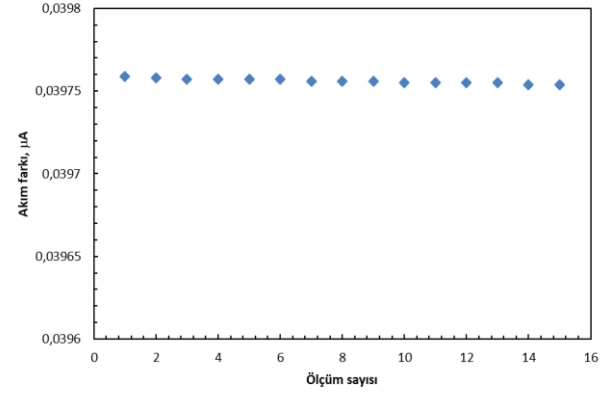
SPE/PB/CO_x enzim elektrodun kolesterole cevabı, 1.0×10^{-6} M ve 1.0×10^{-5} M olan iki farklı kolesterol konsantrasyonu için belirlendi. Zamana karşı cevap akımları grafiğe geçirildiğinde iki değişik konsantrasyonda eğrilerin birbiriyle aynı oranda gittiği gözlemlendi (Şekil 9). Enzim elektrodun cevaplarının belirlenmesi için akımların neredeyse sabit kaldığı 150 s'lik sürelerin alınabileceği düşünüldü. Ancak, bütün ölçümler 50 s sonunda yapıldığında da uygun kalibrasyon eğrileri bulunduğundan çalışmalar 50 s sonraki akımlar belirlenerek yapıldı. Çünkü bir analizin doğru bir şekilde ve oldukça kısa bir sürede yapılması (özellikle klinik uygulamalarda) oldukça önemlidir. Literatürde cevap süresi 30 s (Solanki vd. 2007a), 40 s (Singh vd. 2006b), 150 s (Türkaskan vd. 2009), 240 s (Singh vd. 2006a), 2 dakika (Chuan vd. 2011) olan çalışmalar vardır. Bu çalışmada belirlenen cevap süresi, makul ve kısa sürede analiz yapmak için uygun bir değerdir.



Şekil 9. SPE/PB/CO_x enzim elektrodunun cevap süresi. (a) 1.0×10^{-5} M kolesterol ve (b) 1.0×10^{-6} M kolesterol (0,05 M pH 7.5 fosfat tamponu, +0.65 V, oda sıcaklığı)

3.2.7 Tekrar Kullanılabilirlik ve Tekrar Üretilebilirlik

Yapılan deneyler sonunda belirlenen amperometrik cevap akımları ölçme sayısına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 10). Enzim elektrodunun 15 ölçüm sonucunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık %89.9'unu koruduğu gözlenmiştir. Biyosensörün belli süre zarfında aktivitesinin pek değişmemesi kullanılan immobilizasyon metodunun uygun ve kullanılabilirliğini göstermektedir. Tekrarlanabilirlik biyosensörler için etkili olup hazırlanan biyosensörle defalarca deneme yapabileceğimizi göstermektedir. Devamlı yaptığımız analizlerde tek ölçümede kullanılan kitler ekonomik bakımdan pahalı olduklarından dolayı bu şekilde hazırlanan bir biyosensör daha uygun ve kullanışlıdır. Bulunan ölçüm sonuçları literatür ile kıyaslandığında hazırlanan biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin mümkün olabileceği sonucuna varılabilir (Singh vd. 2009, Kumar vd. 2011, Wang vd. 1999).



Şekil 10. Enzim elektrodunun tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi (0,05 M pH=7.5 fosfat tamponu, 25 °C)

3.2.8 Girişim Yapan Maddeler

Çalışma elektroduna yüksek bir anodik potansiyel uygulanmasıyla kanda bulunan bazı maddeler (ürik asit, L-askorbik asit, glukoz vb.) yükseltgenirler. Bu durum amperometrik cevap akımının artmasına dolayısıyla kolesterolün, kandaki gerçek değerinde daha yüksek bir değerde bulunmasına sebep olur. Hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımına L-askorbik asit, glukoz girişim etkileri incelendi ve bulunan veriler çizelge 1'de verildi.

Çizelge 1. Biyosensör üzerine girişim yapan maddeler ve girişim etkileri

Girişim Yapan Maddeler	Çalışılan derişimler (M)	Toplam cevap akımı (µA)	Girişim yapan maddenin cevap akımı (µA)	Girişim yapan maddenin cevap akımının Toplam akıma oranı (%)
Glukoz	10^{-2}	0,0636	0,0162	25,5
Glukoz	5×10^{-3}	0,0486	0,0064	13,2
L-Askorbik Asit	10^{-4} (Kanda)	0,7240	0,6150	84,9
L-Askorbik Asit	10^{-5}	0,4240	0,1910	45,0
L-Askorbik Asit	10^{-6}	0,0353	0,0107	30,3

4. Sonuçlar

Sonuç olarak bu çalışmada hazırlanan SPE/PB/CO_x kolesterol biyosensörünün; Kolesterol derişimi doğrusal çalışma aralığı 2×10^{-6} - 2×10^{-5} mM olarak bulundu. Bu aralıkta doğrusallığın çok iyi olduğu ve bu aralığın kantitatif analizlerde kullanılabileceği söylenebilir. En iyi çalışma jelatin miktarı 2 mg olarak bulundu. En iyi GA oranı % 0.5 olarak bulundu. En iyi çalışma sıcaklığı 25 °C olarak alındı. Kolesterol biyosensörün cevap verme süresi 50 s olarak bulundu. En iyi çalışma tamponu fosfat tamponu 0.05 M pH:7.5 olarak bulundu. Tekrar kullanılabilirliği iyidir (15 ölçme sonunda biyosensörün aktivitesini % 89.9 oranında koruduğu görülmüştür). Çalışmaların beklenen sonuçları elde edilmesi çalışmanın başarılı olduğunu göstermektedir. SPE/PB/CO_x kolesterol biyosensörü hazırlanması optimizasyonu başarılı bir şekilde elde edilmiştir.

5. References

- Bailey J.E., Ollis F.D. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals 2nd ed. McGraw Hill International Editions, 984.
- Basu A. K., Chattopadhyay P., Roychoudhuri U., Chakraborty R. 2007. Development Of Cholesterol Biosensor Based On Immobilized Cholesterol Esterase And Cholesterol Oxidase On Oxygen Electrode For The Determination Of Total Cholesterol In Food Samples. Bioelectrochemistry, **70**: 375–379.
- Bokoch M.P., Devadoss A., Palencsar M.S., Burgess J.D. 2004. Steady-State Oxidation Of Cholesterol Catalyzed By Cholesterol Oxidase In Lipid Bilayer Membranes On Platinum Electrodes. Analytica Chimica Acta, **519**: 47-55.
- Brahim S., Narinesing D., Guiseppi-Elie A. 2001. Amperometric Determination Of Cholesterol In Serum Using Biosensor Of Cholesterol Oxidase Contained Within A Polypyrrole-hydrogel Membrane. Analytica Chimica Acta, **448**(1-2): 27-36.
- Chauhan N., Pundir C. S. 2011. Co-Immobilization Of Cholesterol Esterase, Cholesterol Oxidase And Peroxidase On Pvc Strip For Serum Cholesterol Determination. Anal Methods, **3** :1360–1365.
- Fan, Q., Shan, D., Xue, H., He, Y. and Cosnier, S. 2007. Amperometric phenol biosensor based on laponite clay-chitosan nanocomposite matrix. Biosensors and Bioelectronics, **22**, 816-821.
- Fujishiro K., Uchida H., Shimokawa K., Nakano M., Sano F., Ohta T., Kayahara N., Aisaka K., Uwajima T. 2002. Purification And Properties On A New Brevibacterium Sterolicum Cholesterol Oxidase Produce By E.Coli Mm294/Pnh10. FEMS Microbiology Letters, **215**: 243-248.
- Huy N.L., Thuy N.T., Binh N.H., Think N.N., Lam T.D. 2013. Covalent Immobilization Of Cholesterol Oxidase and Poly(styrene-co-acrylic acid) Magnetic Microspheres On Polyaniline Films For Amperometric Cholesterol Biosensing. Anal Methods, **5**(6): 1392-1398.
- Isoke K., Shoji K., Nakanishi Y., Yokoe M., Wakao N. 2003. Purification and Some Properties Of Cholesterol Oxidase Stable In Detergents From F-Probacterium Y-134. Journal of Bioscience and Bioengineering, **95**(3): 257-263.
- Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A.J., Bioeron, M. 2008. Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. Microchemical Journal, **89**, 171-174.

- Kumar S., Singh J., Agrawal V. V., Malhotra B. D. 2011. Biocompatible Self-Assembled Monolayer Platform Based On (3-Glycidoxypropyl)Trimethoxysilane For Total Cholesterol Estimation. *Anal Methods*, **3**:2237–2245.
- Lin C.L, Liao L.C. 2014. Preparation And Characterization Of Micropatterned Prussian Blue Thin Films With Enhanced Electrochromic Properties. *Surface and Coatings Technology*, **259**, B, 330-334.
- Nishiya Y., Hirayama N. 1999. Alteration Of Substrate Affinity Of Streptomyces Cholesterol Oxidase Application To The Rate Assay Of Cholesterol Serum. *Clinica Chimica Acta*, **287**: 111-122.
- Özer B.C., Özyörük H., Çelebi S.S., Yıldız A. 2007. Amperometric Enzyme Electrode For Free Cholesterol Determination Prepared With Cholesterol Oxidase Immobilized In Poly (Vinylferrocenium) Film. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**(2): 262-265.
- Rajesh, Takashima, W. and Kaneto, K. 2004. Amperometric phenol biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase onto an electrochemically prepared novel copolymer poly(N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film. *Sensors and Actuators B*, **102**, 271-277.
- Shan, D., Zhang, J., Xue, H.G., Zhang, Y.C., Cosnier, S. and Ding, S.N. 2009. Polycrystalline bismuth oxide films for development of amperometric biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 2671-3676.
- Singh K., Basu T., Solanki P.R., Malhotra B.D. 2009. Poly (Pyrrole-Co-N-Methyl Pyrrole) For Application To Cholesterol Sensor. *Journal Of Materials Science*, **44**: 954–961.
- Singh S., Solanki P.R., Pandey M.K., Malhotra B.D. 2006a. Covalent Immobilization Of Cholesterol Esterase And Cholesterol Oxidase On Polyaniline Films For Application To Cholesterol Biosensor. *Analytica Chimica Acta*, **568**(1-2): 126-132.
- Singh S., Chaubey A., Malhotra B.D. 2004. Amperometric Cholesterol Biosensor Based On Immobilized Cholesterol Esterase And Cholesterol Oxidase On Conduction Polypyrrole Films. *Analytica Chimica Acta*, **502**: 229-234.
- Solanki P.R., Arya S.K., Singh S.P., Pandey M.K., Malhotra B.D. 2007a. Application Of Electrochemically Prepared Poly-N-Methylpyrrole-P-Toluene Sulphonate Films To Cholesterol Biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **123**(2): 829-839.
- Yıldırımoglu F. 2009. Kolesterol Tayini İçin Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Türkiye.
- Telefoncu A. 1999. Biyoreseptör İmmobilizasyonu, Biyosensörler. *Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu*. 42-61.
- Tembe, S., Karve, M., Inamdar, S., Haram, S., Melo, J. and D'Souza, S. 2006. Development of electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized in composite biopolymeric film. *Analytical Biochemistry*, **349**, 72-77.
- Türkarıslan Ö., Kayahan S.K., Toppare L. 2009. Poly(Pyrrole) Versus Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene): Amperometric Cholesterol Biosensor Matrices. *J Solid State Electrochem*, **13**: 657–663.
- Vérdine, C., Fabiano, S. and Tran-Minh, C. 2003. Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support. *Talanta*, **59**, 535-544.
- Wang H., Mu S. 1999. Bioelectrochemical Characteristics Of Cholesterol Immobilized In A Polyaniline Film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **56**(1-2): 22-30.