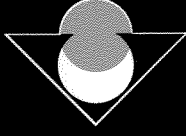


2004-8



TÜBİTAK

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

TARP

TÜRKİYE TARIMSAL ARAŞTIRMA PROJESİ

Tarım Orman ve Gıda Teknolojileri Araştırma Grubu
Agriculture Forestry and Food Technologies Research
Grant Committee

**ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİNİ İNHİBE EDEN
PESTİSİTLERİN TAYİNİNDE KULLANILMAK ÜZERE
YENİ BİR ENZİM BİYOSENSÖRÜ YAPIMI**

2004-8

PROJE NO:TOGTAG-TARP-2191

1-35
30

PROF.DR. VASIF HASIRCI
PROF. DR. NESRİN HASIRCI
DR. FATMA N. KÖK

ŞUBAT 2002
ANKARA

İÇİNDEKİLER

ÖZ 1

ABSTRACT 2

1. GİRİŞ 3

ÖNSÖZ

2. KAPSAM 4

3. YÖNTEM 5

Bu çalışma Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Biriminde TÜBİTAK TOGTAG-TARP ve ODTÜ AFP ile desteklenerek yürütülmüş olup Dr. Fatma N. Kök'ün doktora tezinin de temelini oluşturmuştur. Çalışmadan çeşitli bildiriler ve konferans kitabı makalesi sunulmuş ayrıca SCI dergilerinde basılmak amacıyla iki de makale hazırlanmış, bunlardan biri basılmış olup (ektedir) diğeri de basım için kabul edilmiştir. Bu başarılı çalışmaya destekleri nedeniyle TÜBİTAK ve ODTÜ'ye teşekkürlerimizi sunarız.

3.2.4. Membranların Mekanik Özellikleri 12

3.3. Erizimlerin Tutuklanması: 14

Vasif Hasirci

Proje ekibi adına Prof. Vasif Hasirci

3.3.1. Membran İçine Hapsedilme 14

3.3.2. Kovalent Tutuklama 14

3.3.3. İyonik Bağlama 15

3.3.4. Hibrit Tutuklama Yöntemi 15

3.4. Tutuklanmış Erizim Miktarının Belirlenmesi 16

3.4.1. Lowry Metodu 16

3.4.2. Amino Grubu Ölçümü - Protein İçeriği Belirlenmesi 16

3.4.3. Membran İçine Hapsedilmiş Erizimler 18

3.4.4. İyonik-Kovalent Tutuklama Metodu - Kovalent Erizimler 18

İÇİNDEKİLER

ÖZ	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ	3
2. KAPSAM	4
3. YÖNTEM	5
3.1. Değişik Özellikte Membranların Hazırlanması	5
3.2. Hazırlanan Membranların Karakterizasyonu	6
3.2.1. Tarama Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Analizi	6
3.2.2. Membranların Şişme Değerleri	6
3.2.3. Membran Geçirgenliği	9
3.2.4. Membranların Mekanik Özellikleri	12
3.3. Enzimlerin Tutuklanması	14
3.3.1. Membran İçine Hapsetme	14
3.3.2. Kovalent Tutuklama	14
3.3.3. İyonik Bağlama	15
3.3.4. Hibrit Tutuklama Yöntemi	15
3.4. Tutuklanmış Enzim Miktarının Belirlenmesi	16
3.4.1. Lowry Metodu	16
3.4.2. Amino Grubu Ölçümü ile Protein Miktarının Belirlenmesi	16
3.4.3. Membran İçine Hapsedilmiş Enzimler	16
3.4.4. İyonik-Kovalent Tutuklama Metodu ile Tutuklanmış Enzimler	17

3.5. Aktivite Ölçümleri	17
3.6. Tutuklamanın Enzim Aktivitesine Etkisi	18
3.7. Tutuklanmış İkili-Enzim Sisteminin Karakterizasyonu	18
3.7.1. Sıcaklığın Etkisi	18
3.7.2. Tampon Çözelti ve pH'nın Etkisi	22
3.7.3. AChE/ChO Oranının Etkisi	24
3.7.4. Depolama Ömrü	25
3.8. Pestisit Tayini Çalışmaları	26
3.8.1. Substrat Derişiminin Etkisi	27
3.8.2. İnkübasyon Süresinin Etkisi	28
3.9. Biyosensör Özelliklerinin Belirlenmesi	30
3.9.1. Membranların Tekrar Kullanabilirlikleri	30
3.9.2. Doğrusal Çalışma Aralığı ve Minimum Tayin Limiti	32
3.9.3. Tayin Süresi	34
4. SONUÇ	34
KAYNAKÇA	35
10. Substrat derişiminin aldırarlı tayini etkisi	28
11. İnkübasyon süresinin enzim aktivitesine aldırarlı membran çüne hedeşilmiş ve (b) CB-Epi ile tutuklanmış iki enzim sisteminin	28
12. Aldırarlı varlığının enzim aktivitesine aldırarlı membran çüne tutuklanmış ve (b) CB-Epi ile tutuklanmış iki enzim sisteminin aktivitesine aldırarlı varlığında (*) /100 ppb, inkübasyon süresi 5 dk, 10 dk, 15 dk, 20 dk	28
13. Aldırarlı tayini kalibrasyon eğri - (a) Membranlar çüne tutuklanmış ve (b) CB-Epi ile tutuklanmış iki enzim sisteminin aktivitesine aldırarlı kalibrasyon eğri - (a) Membranlar çüne	28

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil

TABLO LİSTESİ

1. pHEMA membranların SEM mikrografları 7
2. Membranların şişme değerleri 8
3. (a) Zamanla geçen fluorescein miktarı (b) Membranların fluorescein geçirgenlikleri 11
4. Membranların mekanik özellikleri 13
5. Eadie-Hofstee grafikleri. (a) serbest, (b) membran içine hapsedilmiş ve (c) CB-Epi metoduyla tutuklanmış ikili enzim sistemi için 19
6. Sıcaklığın (a) membran içine hapsedilmiş ve (b) yüzeye bağlanmış ikili-enzim sistemine etkisi 21
7. Membran içine hapsedilmiş ikili enzim sisteminin değişik pH ve tampon çözeltilerdeki aktivitesi 23
8. ChO-AChE oranının membran içine hapsedilmiş ikili enzim sisteminin aktivitesine etkisi 24
9. Tutuklanmış ikili enzim sisteminin depolama kararlılığı 26
10. Süstrat derişiminin aldikarb tayinine etkisi 28
11. İnkübasyon süresinin enzim aktivitesine etkisi (a) membran içine hapsedilmiş ve (b) CB-Epi ile tutuklanmış ikili enzim sistemleri 29
12. Aldikarb varlığının enzim aktivitesine etkisi (a) membran içine hapsedilmiş ve (b) CB-Epi ile tutuklanmış ikili enzim sisteminin aldikarb yokluğu (■) ve varlığında (♦) (100 ppb, inkübasyon süresi: 5 dak) aktivitesi 31
13. Aldikarb tayini kalibrasyon eğrileri (a) Membran içine hapsedilmiş ve (b) CB-Epi ile tutuklanmış ikili enzim sisteminin aldikarb tayini için kalibrasyon eğrileri (İnkübasyon süresi: 5 dak)

TABLO LİSTESİ

Tablo

1. Membran yapımında kullanılan çözeltiler	5
2. Değişik pHEMA membranların özellikleri	10
3. Değişik pHEMA membranlarının mekanik özellikleri	12
4. Sıcaklığın tutuklanmış ikili-enzim sistemlerinin K_m ve V_{max} değerlerine etkisi	20
5. pH'nın membran içine tutuklanmış ikili-enzim sistemlerinin K_m ve V_{max} değerlerine etkisi	22
6. Membran içine hapsedilmiş ikili enzim aktivitesinin ChO:AChE oranı ile değişimi	25

ÖZ

Aldikarb, dünyada yaygın biçimde çeşitli tarımsal ürünlerin (soğan, patates, pamuk, tütün, şeker pancarı ve şeker kamışı) korunmasında kullanılan bir karbamat pestisitidir. Güney ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde, özellikle de Çukurova yöresinde, beyaz pamuk sineğinin kontrolünde yoğun bir biçimde kullanılmaktadır. Sudaki yüksek çözünürlüğü ve yüksek toksisitesi yüzünden, yeraltı sularındaki aldikarb kirliliği çeşitli ülkelerde önemli bir sağlık sorunudur.

Bu çalışmada, karbamat ve organofosfat pestisitlerin asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmesi temeline dayanan bir biyosensör oluşturulmuştur. Asetilkolinesteraz, kolin oksidaz enzimi ile birlikte, polihidroksietilmetakrilat (pHEMA) membranlarında tutuklanmış ve bu enzim içeren membranlar varlığında ortamdaki pestisit enzim oksijen tüketimine etkisi gözlenmiştir.

İlk olarak enzimlerin tutuklanacakları membranların karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Membranların geçirgenlikleri, kalınlıkları, gözeneklikleri ve mekanik özellikleri incelenmiş ve SnCl₄ ile hazırlanan membranların geçirgenlik ve gözeneklilik açısından immobilizasyona uygun olduğu görülmüştür.

Enzimler membran içine hapsedme ve yüzeyine bağlanma olmak üzere iki değişik yere immobilize edilmiştir. Tutuklanmış enzimlerin değişik pH, tampon ve sıcaklıklardaki aktiviteleri incelenmiştir. En yüksek aktivitenin pH 9.0'da elde edilmesine karşılık, aldikarbın alkali ortamda hidrolize olmaması için çalışmalar pH 7.0'de gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesinin sıcaklıkla arttığı görülmüştür (25-40°C).

Doğrusal çalışma aralığı, membran içine hapsedilmiş ve yüzeye tutuklanmış enzimler için sırasıyla 10-500 ve 10-250 ppb olarak belirlenmiştir. Yüzeye tutuklanmış enzimler aldikarb varlığına daha hızlı tepki vermiştir.

23 ppb ve 12 ppb kadar düşük miktardaki aldikarbın tayini (membran içine ve yüzeyine tutuklanan enzimler için) 25 dakikalık bir analiz süresinde gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler : Aldikarb, enzim biyosensörü, asetilkolinesteraz, pHEMA

ABSTRACT

Aldicarb (AS) is a carbamate pesticide widely used throughout the world in the protection of various types of crops (e.g. onions, potatoes, nuts, cotton, tobacco and sugar beet). It is heavily used in the South and South Eastern regions of Turkey, especially in Çukurova region, for the control of the cotton white fly (*Bemisia tabaci*). Due to its high solubility in water and high mammalian toxicity, aldicarb contamination in groundwater is a serious health problem in several countries.

In this study, acetylcholinesterase and choline oxidase were co-immobilized on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) membranes and the change in oxygen consumption upon aldicarb introduction was measured. Different membranes were prepared and characterized for that purpose. Membranes prepared in the presence of SnCl₄ were found to be superior in terms of porosity and permeability and were chosen as the immobilization matrix.

Immobilization of the enzymes was achieved both by entrapment and surface attachment. Performance of immobilized enzymes at different buffer types, pH and temperature conditions were evaluated. Though pH 9.0 led to the best enzyme activity, pH 7.0 was chosen to prevent the hydrolysis of aldicarb at alkaline conditions. Activity of the enzymes was found to increase with increasing temperature (from 25°C to 40°C).

Aldicarb detection studies showed that a linear working range of 10-500 ppb and 10-250 ppb aldicarb could be achieved by entrapped and surface immobilized enzymes, respectively. Enzymes immobilized on membrane surfaces responded to aldicarb presence more quickly than entrapped enzymes. Aldicarb concentrations as low as 23 and 12 ppb could be detected by entrapped and surface immobilized enzymes, respectively, in 25 min.

Keywords: Aldicarb, enzyme biosensor, acetylcholinesterase, pHEMA

1. GİRİŞ

Pestisitlerin çevredeki derişimlerinin sürekli takibi, bu maddelerin gittikçe artan bir biçimde kullanılmaları ile daha büyük bir önem kazanmıştır. Organofosfat ve karbamat pestisitler, yıllardır DDT, aldrin gibi organoklorin pestisitlerin yerine geçmektedirler (PALLESCHI, 1992; CREMISINI, 1995). Bu pestisitler, organoklorinlerden daha kısa yarı ömürleri olmalarına rağmen, yüksek toksisiteleri nedeniyle büyük tehlike oluşturmaktadırlar.

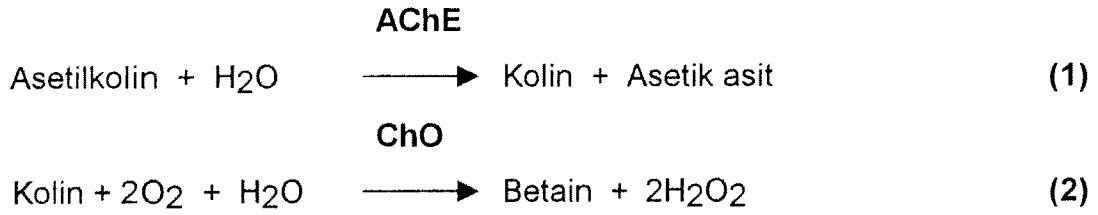
FDA, 1990 yılında Birleşik Devletlerde tüketilen gıdalardan % 35'inde pestisit kirlenmesi olduğunu tahmin etmektedir (EDWARDS, 1993). Ayrıca Dünya Sağlık Örgütü'nün, Birleşik Ülkeler Çevre Programı (WHO/UNEP) ile hazırladığı 1989 yılı raporunda dünyada her yıl 1 milyon insanın pestisit yüzünden zehirlendiği ve bunlardan 20 000'inin öldüğü belirtilmiştir (PIMENTEL, 1993).

Türkiye'de tarım bakanlığının 1997 yılında yaptığı zirai ilaç satış miktarı 40 000 ton (veya m³) olup 34.7 trilyon Türk lirasına ulaşmaktadır. Karbamat ve organofosfat pestisitler toplam miktarın % 25.6'sını ve insektisitlerin % 59.0'unu oluşturmaktadır (T.C. Tarım Bakanlığı, kişisel başvuru). Bu pestisitlerden aldicarb, Pamuk Beyaz Sineğine (*Bemisia tabaci*) karşı etkin olan tek kimyasal olmasından öte, yüksek toksisitesiyle de (farede oral LD₅₀ 0.84 mg/kg vücut ağırlığı) özel bir öneme sahiptir. Pamuğun en çok yetiştirilen ürün olduğu Güney Anadolu Bölgesi için bu pestisit taşıdığı önem çok büyüktür.

Pestisit analizleri genellikle kromatografik yöntemlerle (HPLC, GC ve TLC) yapılmaktadır. Bu yöntemler çok hassas olmakla beraber örneklerin önceden hazırlanmasını gerektirmekte, yerinde tespit için kullanılamamakta ve yüksek maliyet gerektirmektedirler. Enzim inhibisyonuna dayalı taşınabilir portatif biyosensörler bu sorunun çözümünde kullanılabilir. Sinir sistemi için büyük öneme sahip asetilkolinesteraz (AChE) enzimini inhibe eden karbamat ve organofosfat pestisitler (antikolinesterazlar) bu şekilde tayin edilebilirler.

Antikolinesterazların tespitinde kullanılan biyosensörlerin yapımında AChE yalnız başına olduğu gibi kolin oksidaz (ChO) ile birlikte de kullanılabilir. AChE yalnız kullanıldığında, pestisit tayini pH'daki değişimler takip edilerek yapılabilmektedir çünkü AChE asetilkolini (ACh) asetik asit ve koline çevirmektedir (denklem 1). Bunun dışında spektroskopik (LEON-GONZALES, 1990), florimetrik (ROGERS, 1991;

HÖBEL ve POLSTER, 1992) ve voltammetrik (LA ROSA, 1994) yöntemler de denenmiştir. ChO ile beraber kullanıldığında, pestisit tayini O₂ ve H₂O₂ elektrotları yardımı ile yapılabilmektedir. Bunun sebebi denklem 2'de de görüldüğü gibi ChO'nun kolini oksitlerken oksijen tüketmesi ve hidrojen peroksit açığa çıkarmasıdır (CAMPANELLA, 1991,1992; DORETTI, 1994; CAGNINI, 1995a,b; FENNOUH, 1996).



Bu proje kapsamında, karbamat ve organofosfat pestisitlerin asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmesi temeline dayanan bir biyosensör oluşturulmuştur. Asetilkolinesteraz, kolin oksidaz enzimi ile birlikte, polihidroksietilmetakrilat (pHEMA) membranlarına tutuklanmış ve pestisit varlığının oksijen kullanımında yaptığı azalma bu şekilde izlenmiştir.

Şimdiye kadar oluşturulan biyosensörler genellikle enzimlerin membran içine tutuklanması ya da elektrot yüzeyine glutaraldehit ile doğrudan bağlanması yolu ile oluşturulmaktadır. Glutaraldehit ile yapılan tutuklamalar, enzimin üç boyutlu yapısını değiştirerek, aktiviteyi olumsuz yönde etkilemektedir. Literatürde, tutuklamanın enzim aktivitesine etkisini inceleyen çok az örnek bulunmaktadır. Enzimin performansı ve biyosensörün duyarlılığının yanı sıra, sistemin ekonomikliğini de etkileyecek bu parametre bu çalışmada incelenmiştir. Bunun için, tutuklamanın enzim kinetiğine etkileri, serbest ve tutuklanmış formdaki enzimlerin K_m ve V_{max} değerlerinin karşılaştırılması ile belirlenmiştir. Şu anda mevcut örneklerinden daha iyi bir raf ömrü ve çalışma aralığı olan, daha hassas bir biyosensör oluşturulmuştur.

2. KAPSAM

İlk olarak değişik pHEMA membranları hazırlandı ve karakterizasyonu (geçirgenlik, kalınlık, gözeneklik ve mekanik özellik) gerçekleştirildi. Daha sonra

ACHe ve ChO enzimleri iki değişik metotla membranlara tutuklandı. Tutuklanmanın enzimlerin aktivitelere etkisi, K_m ve V_{max} değerleri karşılaştırılarak incelendi. Daha sonra sıcaklığın ve pH'nın tutuklanmış enzim aktivitesine etkisi incelendi. Son olarak aldikarb kullanılarak, substrat derişiminin ve inkübasyon süresinin, biyosensör performansına, cevap süresine etkisi araştırıldı, çalışma aralığı ve minimum tayin sınırı belirlendi. Oluşturulan biyosensörün depolanma ömrü ve yeniden kullanılabilirliği tespit edildi.

3. YÖNTEM

3.1. Değişik Özellikte Membranların Hazırlanması

Membran yapımı için HEMA ve Tablo 1'de gösterilmiş olan çözeltilerden biri değişik oranlar karıştırılmış, başlatıcı olarak α,α' -azo-isobütironitril (AIBN) eklenerek UV ışması (360 nm) ve azot atmosferi altında 1 saat bekletilerek polimerleşme sağlanmıştır. Oluşturulan membranlar damıtık su ile yıkandıktan sonra yine damıtıksu içinde ve 4°C'da saklanmıştır.

Tablo 1. Membran yapımında kullanılan çözeltiler

Çözücü	Çözücüsüz	Damıtık su	Fosfat tamponu (0.1 M, pH 7)		NaCl (M)		
					0.1	0.3	0.6
HEMA: Çözücü (v/v)	5:0	2:3	2:3	3:2	2:3	2:3	2:3

Çözücü	SnCl ₄ (M)					
	0.02	0.06				
HEMA: Çözücü (v/v)	2:3	2:3	1.5:3.5	1.5:3.5*	1.5:3.5 ^a	1.5:3.5 ^b

Toplam polimerizasyon karışımı 5 mL (asteriks ile işaretlenmiş dışında :4.5 mL). (^a) ve (^b)'ye EGDMA eklendi (% 0.5 ve 1.0).

3.2. Hazırlanan Membranların Karakterizasyonu

3.2.1. Tarama Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Analizi

Hazırlanan membranlardan alınan örnekler 6 saat liyofilize edildikten sonra altınla kaplanmış ve taramalı elektron mikroskobunda yüzey özellikleri incelenmiştir. Damıtık su ile hazırlanmış membran yüzeyinde herhangi bir gözeneklilik görülmezken (Şekil 1a), NaCl ile hazırlanmış örneklerde artan konsantrasyonla birlikte artan miktarda gözeneklilik gözlenmiştir (Şekil 1b-d).

Görüldüğü gibi tuz oranındaki artış membran gözenekliliğini pozitif bir yönde etkilemektedir. Bunun nedeni ortamda bulunan tuz iyonlarının çevresinde bir miktar suyu tutması ve buralarda polimerleşmeye izin vermeyerek gözeneklerin oluşmasını sağlamasıdır. Bunun sonucu olarak membranın geçirgenliği de değiştirmektedir. Fakat yüksek tuz konsantrasyonlarında (0.6 M) oluşan yapı, membranın mekanik dayanıklılığının düşmesine yol açtığından biyosensör yapımında tercih edilmemiştir.

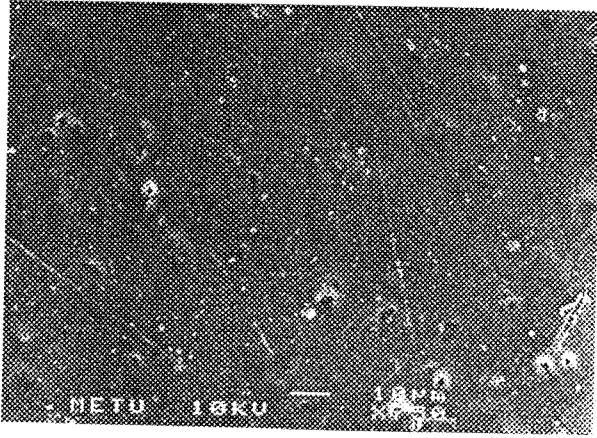
3.2.2. Membranların Denge Şişme Değerleri

Hazırlanan membranlar 48 saat damıtık su içinde bırakılarak maksimum su tutmaları sağlandı. Şişen membranlardan alınan parçalar (≈ 0.300 g) yüzeylerindeki fazla suyun alınmasından sonra tartılarak 50°C 'de 24 saat kurutuldu ve kuru ağırlıkları belirlendi. Membranların şişme değerleri denklem 3'de görüldüğü gibi hesaplandı.

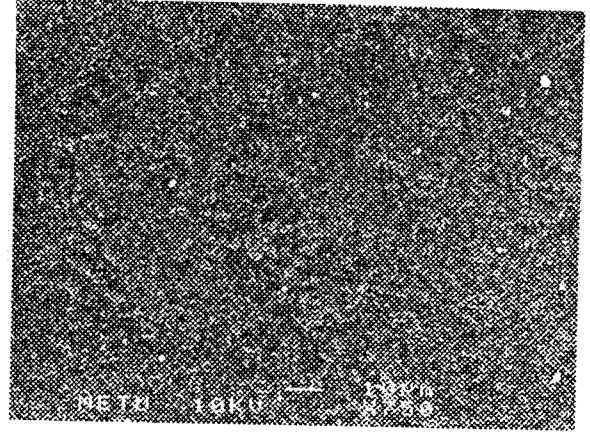
$$\text{Şişme değeri (\% w/w)} = \frac{W_s - W_d}{W_s} \times 100 \quad (3)$$

W_s = Şişmiş membran ağırlığı

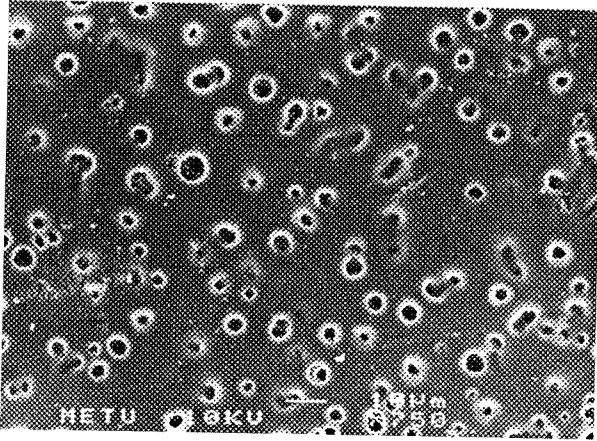
W_d = Kuru membran ağırlığı



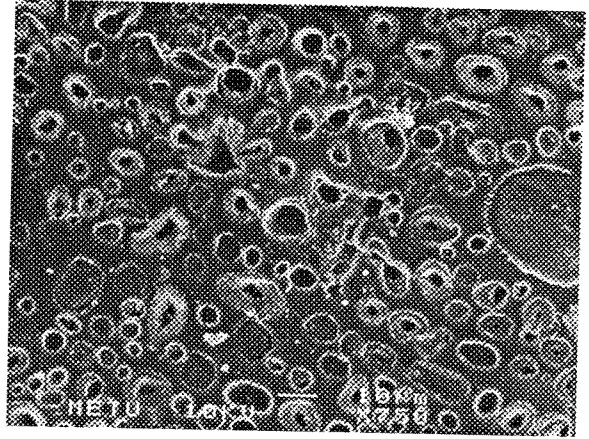
(a)



(b)



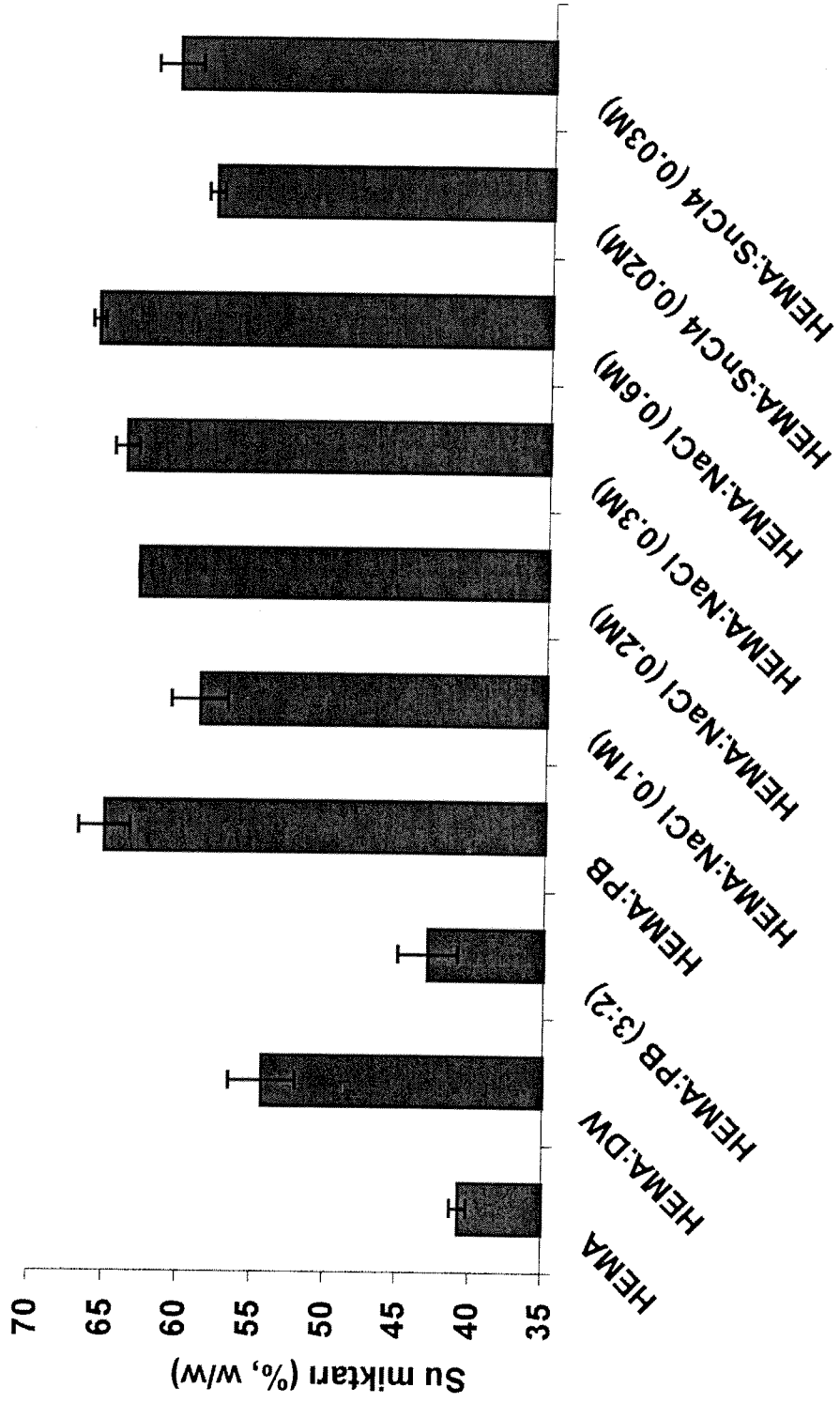
(c)



(d)

Şekil 1. pHEMA membranların SEM mikrografları (a) Damıtık su (b) 0.1 M NaCl (c) 0.3 M NaCl ve (d) 0.6 M NaCl

Membranlarda tutulan su miktarları incelendiğinde beklendiği gibi polimer:su oranı (HEMA:PB / 3:2) yüksek olan membranın en az şişme değerine sahip olduğu görülmüştür. Artan tuz derişiminin ise membranların şişme değerlerinde artışa yol açmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Membranların denge şişme değerleri

3.2.3. Membran Geçirgenliği

Değişik çözeltilerle hazırlanan membranların geçirgenliklerinin karşılaştırılması için fluorescein permeant olarak seçilmiştir. Bu seçimde bu boyanın düşük boyama kapasitesinin yanı sıra, çok düşük derişimlerde bile kolayca tayin edilebilmesi rol oynamıştır. İncelenecek membran iki bölmenin arasına sabitlenmiştir. Üstteki bölmeye 40 mM fluorescein konulmuştur. Sürekli olarak manyetik karıştırıcı ile karıştırılan alt bölmeden ise 24 saat boyunca 30 mL/saat hızında fosfat tamponu (0.1 M, pH:7) geçirilmiştir. Her yarım saatte toplanan örnekler florimetrede incelenmiştir (eksitasyon: 489.6 nm, emisyon: 512 nm). Membran geçirgenliği (P) denklem 4 temel alınarak $\ln(M_t/M_0)$ vs $A.t/V.l$ grafiği çizilerek hesaplanmıştır (Şekil 3).

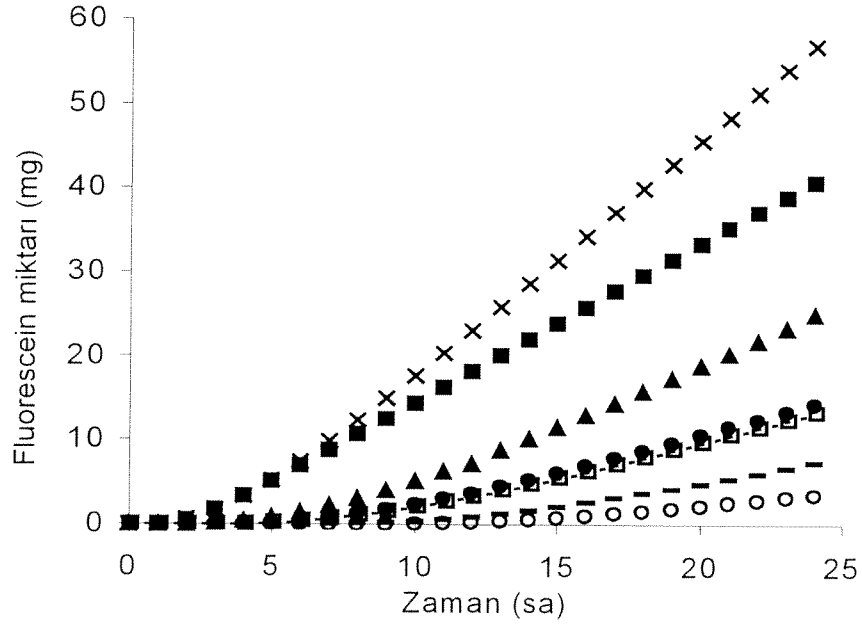
$$\ln(M_t/M_0) = P.A.t / V.l \quad (4)$$

Bu denklemde P , geçirgenlik ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$), M_t ve M_0 , t ve t_0 zamanlarında üst bölmedeki permeat derişimi, A membran yüzeyi (cm^2), V üst bölme hacmi (cm^3), t zaman (s) ve l membran kalınlığıdır (cm). Şekil 3 ve Tablo 2'de de görüldüğü gibi SnCl_4 ile hazırlanan örnek en yüksek geçirgenliğe sahiptir. Onu fosfat tamponu, 0.1M ve 0.3 M NaCl ile hazırlanmış membranlar takip etmektedir. Damıtık su ile hazırlanmış örnek ise en düşük geçirgenliğe sahip örnektir. Bu sıranın membran gözenekliliğine paralel olarak ilerlediği görülmektedir.

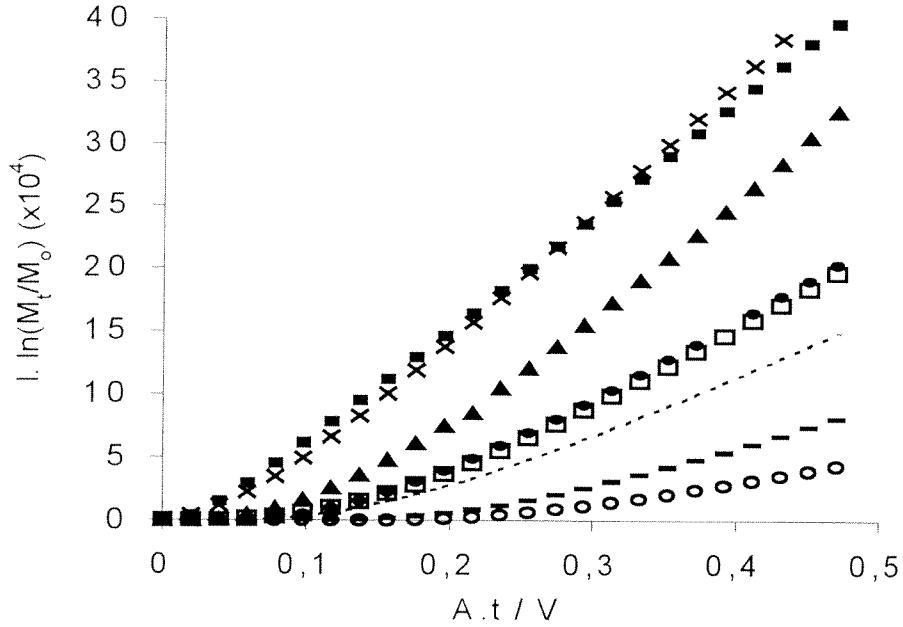
Tablo 2. Değişik pHEMA membranların özellikleri

Çözücü	Damıtık su	FT (0.1 M, pH 7)		NaCl		SnCl ₄	
				0.1 M	0.3 M	0.06 M	0.06 M*
HEMA:	2:3	3:2	2:3	2:3	2:3	1.5:3.5	1.5:3.5
Çözücü (v/v)							
Kalınlık (µm)	447.5 ± 17.1	398.7 ± 8.5	542.5 ± 12.5	413.7 ± 7.5	523.7 ± 11.1	471.2 ± 8.5	263.9 ± 4.7
Su kapasitesi (% w/w)	54.3 ± 2.2	42.9 ± 2.0	65.1 ± 1.7	58.7 ± 1.9	63.9 ± 0.8	60.5 ± 1.5	---
Geçirgenlik (cm ² .s ⁻¹)(x10 ³)	2.78	1.57	5.67	4.33	5.83	8.93	10.47
Geçirgenlik hızı (µg.h ⁻¹)	0.536	0.269	0.825	0.828	0.876	1.464	2.820

- Membran hazırlanışında diğerlerine göre % 10 daha az HEMA:Çözücü karışımı kullanıldı



(a)



(b)

Şekil 3. (a) Zamanla geçen fluorescein miktarı (b) Membranların fluorescein geçirgenlikleri (--) HEMA:NaCl (0.1 M) (2:3) (●) HEMA:NaCl (0.3 M) (2:3) (•) HEMA:SnCl₄ (0.03 M) (2:3) (■) HEMA:SnCl₄ (0.06 M) (1.5:3.5) (X) HEMA:SnCl₄ (0.06 M) (1.5:3.5) (% 10 daha az membran solüsyonu kullanıldı) (—) HEMA:DW (2:3) (□) HEMA:PB (2:3) (o) HEMA:PB (3:2)

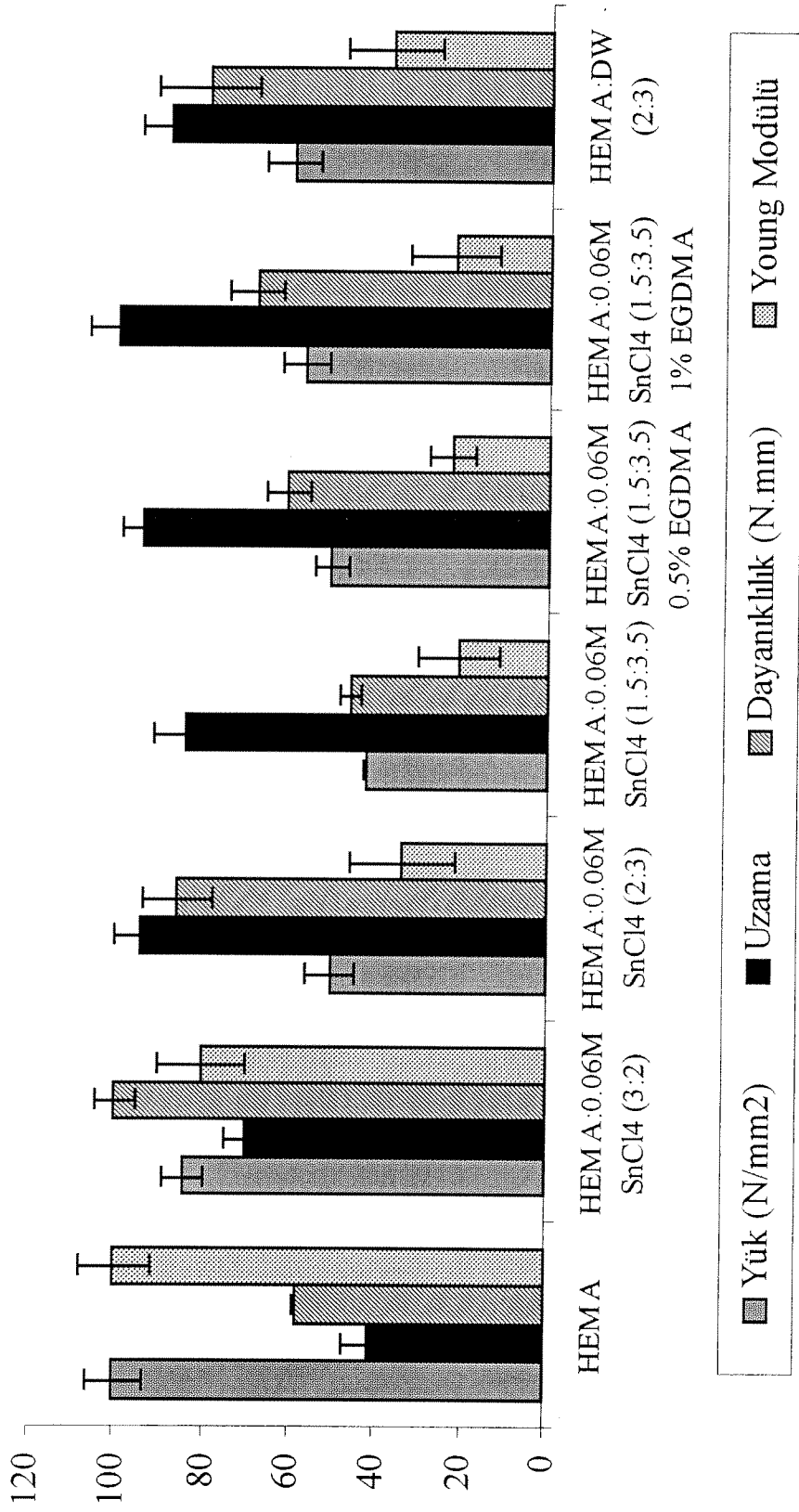
3.2.4. Membranların Mekanik Özellikleri

Membranların mekanik özellikleri Lloyd Instruments Materials Testing Machine (İngiltere) ile ıslak konumda incelenmiştir. Membranlar dikdörtgen biçimde (2 x 5 cm) kesilmiş ve belli başlı mekanik özellikleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4). Membranların mekanik özellikleri kullanımlarında önemli rol oynamaktadır. Membranların oksijen elektrodunun ucuna bağlanabilmesi için yeterince esnek olması fakat deforme olup şeklini değiştirmemesi gerekmektedir.

Artan HEMA miktarının dayanıklılığı artırırken, esnekliği azalttığı görülmüştür. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan EGDMA de aynı şekilde etki göstermektedir. Membranların esnek yapıları yüzünden “gerçek” stress değerlerinin belirlenmesi güçtür. Bu yüzden karşılaştırmalarda “mühendislik” stress değerleri kullanılmıştır. Membranlar için belirlenen mutlak değerler Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Değişik pHEMA membranlarının mekanik özellikleri

Çözücü	HEMA: Çözücü (v:v)	Mutlak Yük (N.mm ⁻²)	Uzama ($l-l_0$) / l_0	Dayanıklılık (N.mm)	Young Modülü (N.mm ⁻¹)
---	5 : 0	0.36 ± 0.02	0.41 ± 0.02	50.13 ± 6.93	0.192 ± 0.02
Damıtık su	2 : 3	0.22 ± 0.02	2.01 ± 0.39	68.65 ± 13.76	0.071 ± 0.01
SnCl ₄ (0.06 M)	3 : 2	0.30 ± 0.02	1.39 ± 0.16	85.84 ± 8.61	0.154 ± 0.02
	2 : 3	0.18 ± 0.02	2.23 ± 0.27	74.09 ± 10.40	0.065 ± 0.01
	1.5 : 3.5	0.15 ± 0.03	1.87 ± 0.09	39.65 ± 8.24	0.040 ± 0.01
SnCl ₄ (0.06 M) + EGDMA (0.5 %, v/v)	1.5 : 3.5	0.18 ± 0.02	2.21 ± 0.16	52.34 ± 4.81	0.044 ± 0.00
SnCl ₄ (0.06 M) + EGDMA (1 %, v/v)	1.5 : 3.5	0.20 ± 0.02	2.40 ± 0.22	58.92 ± 8.96	0.043 ± 0.00



Şekil 4. Membranların mekanik özellikleri

3.3. Enzimlerin Tutuklanması

3.3.1. Membran İçine Hapsetme

Membranlar yuvarlak biçimde kesilerek (Çap: 1.2 sm) 50°C'da 1 sa kurutuldu. Daha sonra fosfat tamponu ile nemlenmeleri sağlandı (20 µL, 15 dk). Enzim çözeltileri nemlendirilmiş membranların üzerine konularak 4°C'da 1 sa emilmeleri sağlandı. Daha sonra membran yüzeyi polimerizasyon çözeltisi ile kaplanarak (HEMA:PB, 2:3) daha önce anlatılan yöntemle polimerleşmesi sağlandı.

3.3.2. Kovalent Tutuklama

Kovalent tutuklama için üç değişik membran aktiveleme yöntemi kullanıldı. Aktif membranlara enzimlerin tutuklanması için asetilkolinesteraz ve kolin oksidaz çözeltileri ayrı ayrı borat tamponunda (0.2 M, pH 9.0) 250 U/mL derişiminde hazırlandı. Enzim çözeltilisine konulan aktive edilmiş membranlar hafifçe sallanarak 10 sa beklendi. Önce kolin oksidazın daha sonra asetilkolinesterazın tutuklanması gerçekleştirildi.

1-4 butandiol diglisidil eter

1-4 butandiol diglisidil eter (4 mL), NaOH (0.6 M, 2 mL) ve NaBH₄ (8 mg in 0.5 mL methanol, 31.5 µL) karıştırıldıktan sonra ıslak HEMA membranları (4 x ca. 90 mg) karışımın içine konuldu ve hafifçe karıştırılmaya bırakıldı (6 sa). Fakat bu işlemin membranların mekanik dayanıklılığını azalttığı ve kolay hasar görmelerine yol açtığı görülerek çalışmalarda kullanılmamasına karar verildi.

Epiklorohidrin

Islak pHEMA membranı damıtık su (1 mL), NaOH (4.3 mL, 2 M) ve epiklorohidrin (0.1 mL) oluşan bir karışım içine konduktan sonra 40°C'de 2 sa karıştırıldı. Reaksiyona girmemiş epiklorohidrin % 30 aseton ve daha sonra distile su

ile yıkandı. Tutuklama çalışmalarından sonra membranların aktivitesi oksijen elektrot ünitesinde denendi. Membranların ancak serbest kolin oksidaz eklenmesi ile aktivite göstermeleri asetilkolinesterazın başarılı bir şekilde bağlanmasına karşın, kolin oksidazın bağlanmasında sorun olduğunu gösterdi.

Aminoheksil-glutaraldehit

Öncelikle aminoheksil-pHEMA membranları periodat oksidasyonu ile oluşturulmuş, daha sonra heksdiamin bağlanmıştır. Bunun için membran polietilen bir tüpte NaIO_4 (0.2 M, 1 mL) ile 2 sa oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Oksitlenmiş membran damıtık su ile yıkandıktan sonra heksdiamin çözeltisi (2.0 M, 1 mL) ile pH 5.0'de karıştırılmıştır (6 sa, oda sıcaklığı). Membran fosfat tamponu (pH 8.5, 50 mL) ile yıkandıktan sonra glutaraldehit çözeltisine (2.5 %, 1 mL) konulmuş ve 10 dk oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Reaksiyona girmemiş glutaraldehit 100 mL fosfat tamponu ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Enzim bağlanmasından sonra membranların aktivitesi oksijen elektrot ünitesinde incelenmiş ve düşük aktiviteli membranlar elde edildiği görülmüştür.

3.3.3. İyonik Bağlama

Membranın aktive edilmesi için, ıslak membran Cibacron blue F36A çözeltisine (2 mg/L, 1 mL) konularak karıştırıldı. Daha sonra NaCl çözeltisi (20 % 100 μL) eklenerek 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Son olarak NaOH (5 M, 50 μL) katılarak inkübasyona 3 gün yavaşça karıştırılarak devam edildi. Boyanmış membranlar damıtık su, NaCl (1 M), üre (5 M) ve damıtık su ile yıkandı. Enzim tutuklanması için 3 sa enzim çözeltileriyle inkübe edildi.

Sonuçlar kolin oksidazın bu methodla başarılı bir biçimde bağlanabildiğini gösterdi. Diğer taraftan asetilkolin oksidaz bu methodla bağlanamadı.

3.3.4. Hibrid Tutuklama Yöntemi

Yukardaki sonuçlar ışığında Cibacron blue ve epiklorohidriini kapsayan hibrid membranların yapımı denenmiştir. Bunun için membranlar önce Cibacron blue ile

sonra epiklorohidrin (CB-Epi membranı) ve ya glutaraldehit (CB-Glu membranı) ile aktive edilmiş ve enzim tutuklanması gerçekleştirilmiştir. Oksijen ünitesinde yapılan aktivite çalışmaları CB-Epi yönteminin yüksek aktivite verdiğini göstermiştir.

3.4. Tutuklanmış Enzim Miktarının Belirlenmesi

3.4.1. Lowry Metodu

Örneklerden 0.5 mL, 0.25 mL ve 0.1 mL alınarak 0.5 mL'ye distile su ile tamamlandı. Alkalin bakır reaktifi (2.5 mL) tüplere eklenerek karıştırıldı ve 10 dk. beklendi. Folin-Fenol reaktifi (1 N, 0.25 mL) eklenerek hemen karıştırıldı. 30 dk. sonra 660 nm'de absorbansları okundu.

3.4.2. Amino Grubu Ölçümü ile Protein Miktarının Belirlenmesi

Amino asit miktarının ölçülebilmesi için enzimler önce asit hidroliz yolu ile amino asitlerine ayrıldılar. Bunun için membranlar önce tampon tuzlarından arındırılmak için damıtık su, daha sonra da gittikçe artan miktarda aseton içeren aseton-su (% 20'den % 100'e) karışımı ile yıkandı. İki gün vakumda kurutulduktan sonra HCl (6 M, 1 mL) içeren tüplere konuldu. Tüpler sıvı azot içine konuldu, havaları boşaltıldı ve ateşle ağızları kapatıldı. Yağ banyosunda 110 °C'de 24 sa bekletildi. Hidrolizden sonra, tüpler soğutuldu ve nötralizasyon için NaOH (6 M, 1 mL) eklendi.

Amino asit çözeltisi (250 µL), karbonat tamponu (0.5 M, pH 8.5, 250 µL) ve sulu trinitrobenzensülfonat (TNBS, 0.1 %, 250 µL) karıştırıldı ve 40°C'de 2 sa bekletildi. Sodyum dodesil sülfat (SDS, 10 %, 250 µL) ve HCl (1 M, 125 µL) eklenerek absorbansı ölçüldü (335 nm). Standart eğri için glisin (25-500 µM) kullanıldı.

3.4.3. Membran İçine Hapsedilmiş Enzimler

Tutuklanan enzim miktarı başta konulan enzim miktarından, tutuklanma sonrasında yapılan yıkama suyunda bulunan protein miktarının çıkarılması ile

hesaplanmıştır. Protein tayininde Lowry metodu kullanılmıştır. Yıkama suyunda protein bulunmaması yüzünden tutuklama miktarının % 100 olduğu saptanmıştır.

3.4.4. İyonik-Kovalent Hibrit Tutuklama Metodu ile Tutuklanmış Enzimler

İki aşamalı bir tayin yöntemi izlenmiştir. Önce enzim tutuklanmış membranlar 1 M NaCl çözeltisi içine konuldu ve 3 sa karıştırıldı. Cibacron blue'ya bağlanmış ChO bu şekilde ayrıldı ve Lowry metodu ile miktarı belirlendi. Kovalent bağla bağlanmış olan AChE için ise amino asit tayini yöntemi kullanıldı.

CB-Epi membranlarında, bağlanmış ChO miktarı $29.82 \mu\text{g} \pm 2.19$ (7.4 % standart sapma) olarak belirlendi. CB-Glu membranlarında bu sayı $4.04 \mu\text{g} \pm 0.52$ (12.9 % standart sapma) olarak bulundu. Diğer yandan, bağlanmış AChE miktarı CB-Glu membranlarında CB-Epi membranlarına göre daha fazla bulundu: $30.72 \mu\text{g} \pm 2.79$ (% 9.1 standart sapma) AChE'a karşılık $6.03 \mu\text{g} \pm 0.49$ (% 8.3 standart sapma). Membranların aktiviteleri gözlemlendiğinde ise CB-Epi membranlarının reaksiyon verdiği oysa CB-Glu membranlarından cevap alınamadığı görüldü. Bu sonuç ChO miktarının önemini gösterdi. Düşük spesifik aktivitesi yüzünden ChO'ın ikili-enzim sisteminin anahtar enzimi olduğu ve miktarının enzim performansını etkilediği görüldü.

3.5. Aktivite Ölçümleri

Aktivite ölçümleri tampon çözelti (fosfat, borat ve glisin; 0.1 M, 1.2 mL) içinde oksijen elektrot ünitesi (Helmut Saur, Almanya) ile gerçekleştirildi. Tamponların kullanılmadan önce oksijene doymuş olmaları sağlandı. Enzim tutuklanmış membran ünitenin içine konulduktan sonra değişik sübstrat derişimlerdeki (asetilkolin, 0.4-4 mM) oksijen kullanımı izlendi ve V_{max} ile K_m değerleri Eadie-Hoffstee grafiği ile hesaplandı .

3.6. Tutuklamanın Enzim Aktivitesine Etkisi

Tutuklamanın enzim aktivitesine etkisini araştırmak için serbest ve tutuklanmış ikili enzim sisteminin K_m ve V_{max} değerleri karşılaştırıldı. Şekil 5a-c'de serbest, membran içine hapsedilmiş ve CB-Epi ikili enzim sisteminin Eadie-Hofstee grafikleri görülmektedir. Deneyler aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir (FT, 0.1 M, pH 7.0, 30°C).

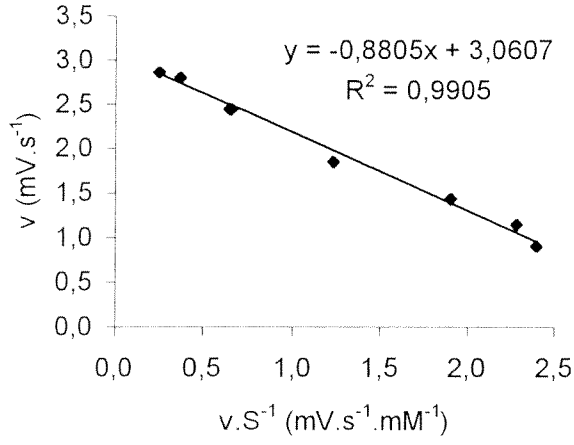
En düşük K_m değeri serbest enzim sistemininkidir (0.880 mM). Tutuklanmış enzimler için değerler membran içine hapsedilen enzimler için 1.869 mM ve CB-Epi membranları için 0.953 mM olarak bulunmuştur. K_m değerindeki artış yüzey bağlanması için 1.08 kez, membran içine hapsedilme için 2.12 kez olmuştur. Tutuklanmış enzimler için K_m yüksek oranda difüzyon limitasyonlarına bağlıdır. Membran içine hapsedilmiş enzimler için yüzeye bağlanmış enzimlerden daha fazla difüzyonel limitasyon bulunması bu Şekilde tutuklanmış enzimlerdeki daha büyük K_m artışını açıklamaktadır.

Serbest enzim için spesifik aktivite ($mV \cdot s^{-1} \cdot \mu g \text{ ChO}^{-1}$) 0.306 olarak bulunurken, bu sayı membran içine hapsedilen enzimler için 0.069 (4.43 kez azalma) ve CB-Epi membranları için 0.198 (1.54 kez azalma) olarak belirlenmiştir. Spesifik aktivitedeki azalma enzimlerin tutuklanma sürecinde deaktive olmaları yüzünden oluşmaktadır.

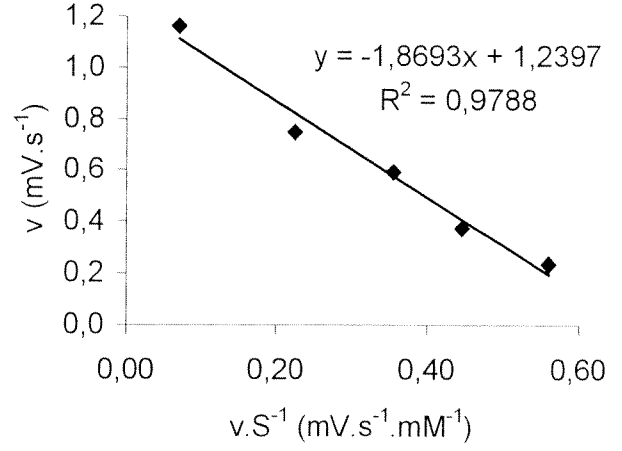
3.7. Tutuklanmış İkili-Enzim Sisteminin Karakterizasyonu

3.7.1. Sıcaklığın Etkisi

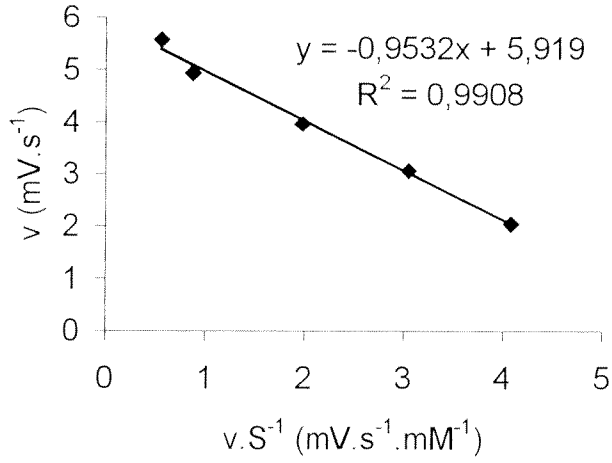
Tutuklanmış enzimlerin değişik sıcaklıktaki aktiviteleri 25 °C-40 °C arasında incelenmiştir. Sıcaklığın oksidaz enzimleri üzerinde iki türlü etkisi bulunmaktadır. İlk olarak enzim reaksiyon hızları sıcaklığın artışı artış gösterir. Bu artış enzimin denatüre olduğu sıcaklığa kadar sürer. Diğer yandan sıcaklık oksidazların çalışmasında önemli olan sudaki çözünmüş oksijen oranını azaltır (25 °C'de 8.11 ppm'e karşılık 35 °C'de 7.02 ppm).



(a)



(b)



(c)

Şekil 5. Eadie-Hofstee grafikleri (a) serbest (b) membran içine hapsedilmiş ve (c) CB-Epi metoduyla tutuklanmış ikili enzim sistemi için

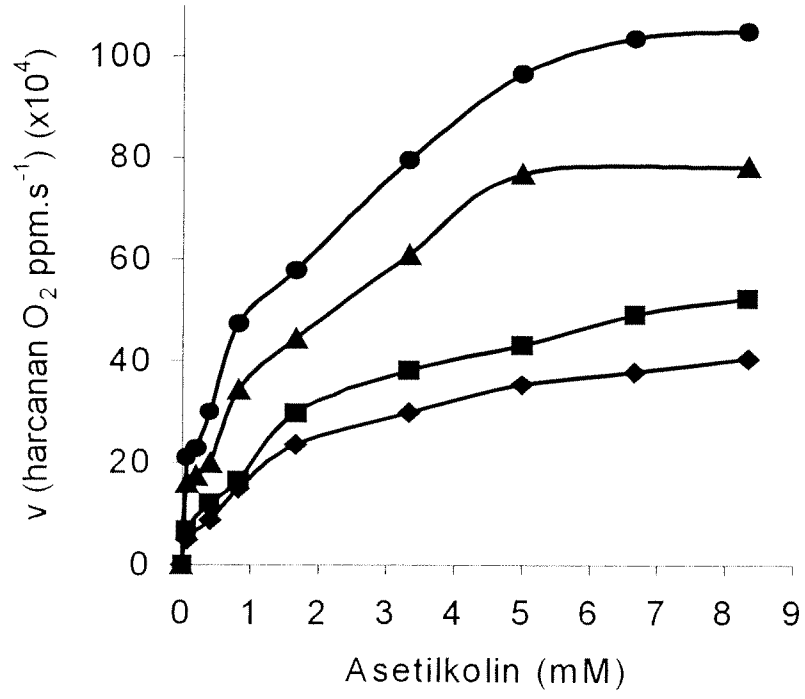
Sonuçlar sıcaklığın artmasına bağlı olarak K_m değerlerinde düşme ve V_{max} değerlerinde yükselme olduğunu göstermektedir (Şekil 6a-b, Tablo 4). Bu sıcaklık arttıkça daha hızlı ve yüksek bir aktivite alınacağını göstermiştir.

Bu sonuçlar Rouillon ve ark. (1992) buldukları ile benzer ve 30-35 °C'den (SKLADAL, 1992, DORETTI, 2000), 30 °C'den (NAVERA, 1991) ve 25-30 °C'den (LEON-GONZALES ve TOWNSHEND, 1990) sonra aktivite kaybı gözleyen birçok araştırmacının elde ettiğinden daha iyidir.

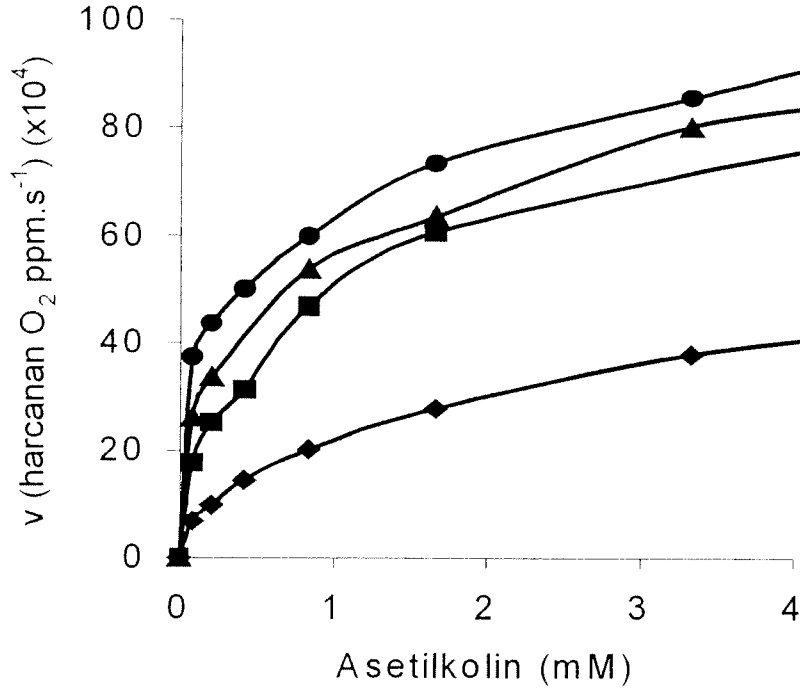
Tutuklanmış enzimlerin yüksek sıcaklıkta daha hızlı aktivite kaybına uğramaları ve pHEMA membranının sürekli 40 °C'de çalıştırılmasının mekanik dayanıklılığını bozması yüzünden 30 °C çalışma sıcaklığı olarak seçilmiştir.

Tablo 4. Sıcaklığın tutuklanmış ikili-enzim sistemlerinin K_m (mM) ve V_{max} (harcanan O_2 ppm.s⁻¹) değerlerine etkisi

Sıcaklık (°C)	Membran içine tutuklanmış		CB-Epi ile tutuklanmış	
	$K_{m,app}$	$V_{max,app}$ ($\times 10^4$)	$K_{m,app}$	$V_{max,app}$ ($\times 10^4$)
25	1.906	49.21	1.886	56.35
30	1.856	59.32	0.953	90.56
35	1.495	91.04	0.883	98.65
40	1.271	116.26	0.763	104.07



(a)



(b)

Şekil 6. Sıcaklığın (a) membran içine hapsedilmiş ve (b) yüzeye bağlanmış ikili-enzim sistemine etkisi

3.7.2. Tampon Çözelti ve pH'nın Etkisi

Tampon çözelti ve pH'nın etkisi, üç ayrı tampon çözelti ile (fosfat, glisin ve borat) 7.0 ve 10.0 pH aralığında incelenmiştir. Membran içine tutuklanmış ikili-enzim sistemleri için değişik pH'larda bulunan K_m ve V_{max} değerleri Tablo 5'de verilmiştir. Aktivitenin pH 7.0'den pH 9.0'a kadar arttığı görülmüştür. pH 10.0'da ise bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 7).

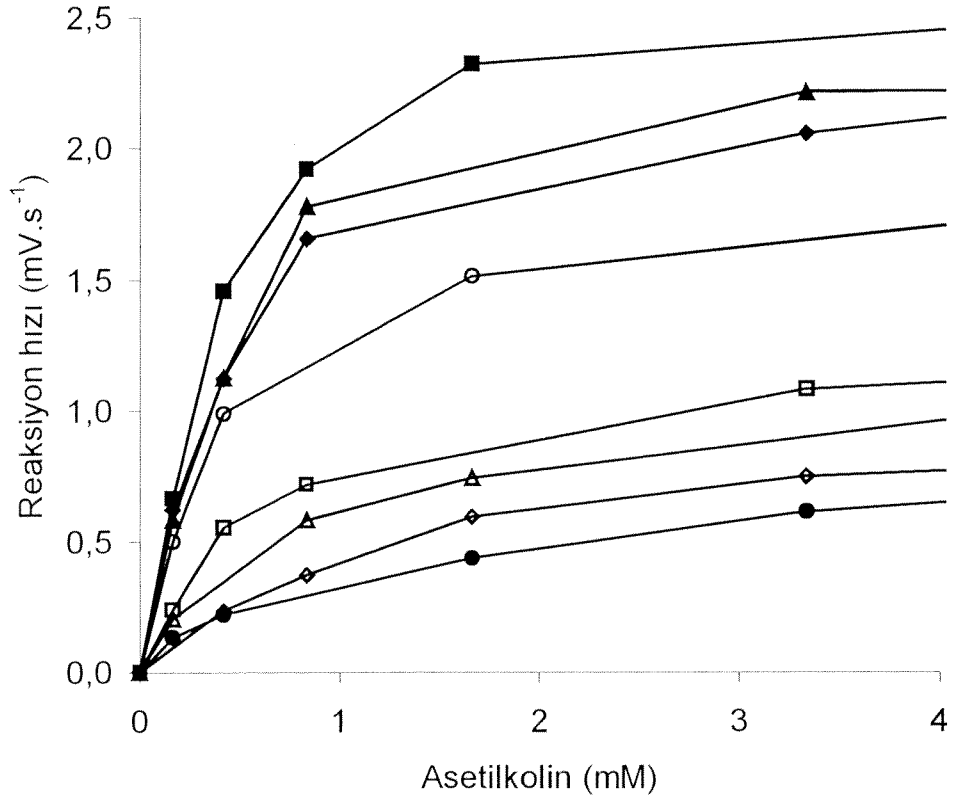
CB-Epi membranları yüksek pH'larda ChO'in kaybına dayanan bir aktivite kaybı gösterdiğinden bu sisteme ile çalışmalar sadece pH 7.0'de yapılmıştır.

Serbest haldeki AChE ve ChO'in optimum pH'sı sırasıyla pH 7.0 ve 8.0'dir (7.5-8.5) (KANO, 1994). Tutuklanma sonucunda bu pH daha bazik pH'lara kaymıştır. Bu değişiklik tutuklanan enzimin mikroçevresinde olan değişiklikler yüzündendir (EVTUGYN, 1998; MULCHANDANI, 1999). Bizim çalışmamızda HEMA'nın polar grupları ile enzimin fonksiyonel grupları arasındaki etkileşimleri buna yol açmış olabilir.

Yüksek pH'nın aktiviteye olumlu etkisine rağmen, karbamat pestisitlerin pH 8.0'in üstünde hidrolize olup bozulmaları yüzünden deneyler pH 7.0'de gerçekleştirilmiştir. Bu daha önce birçok araştırmacı tarafından da tercih edilmiş bir pH'dır (CREMISINI, 1995, SKLADAL, 1996, FENNOUH, 1997, NUNES, 1998).

Tablo 5. pH'nın membran içine tutuklanmış ikili-enzim sistemlerinin K_m ve V_{max} değerlerine etkisi

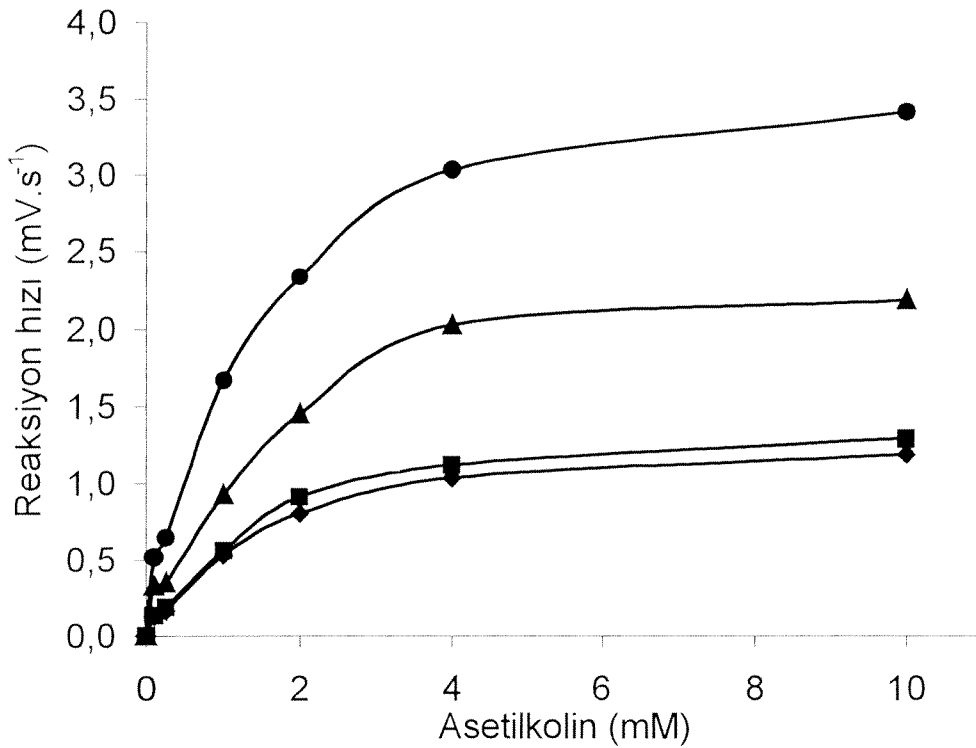
pH ve tampon çeşidi		$K_{m,app}$ (mM)	$V_{max,app}$ (mV.s ⁻¹)
Fosfat tamponu	7.0	1.869	1.24
	7.5	0.977	1.32
	8.0	0.764	1.42
Glisin tamponu	8.0	0.464	2.25
	8.5	0.466	2.34
	9.0	0.366	2.62
Borat tamponu	9.0	0.500	2.05
	10.0	1.294	0.87



Şekil 7. Membran içine hapsedilmiş ikili enzim sisteminin değişik pH ve tampon çözeltilerdeki aktivitesi. Fosfat tamponu: (◇) pH 7.0, (△) pH 7.5, (□) pH 8.0; Glisin tamponu: (◆) pH 8.0, (σ) pH 8.5, (■) pH 9.0; Borat tamponu: (o) pH 9.0, (●) pH 10.0

3.7.3. AChE/ChO Oranının Etkisi

AChE ve ChO pHEMA membranları içine değişik oranlarda tutuklandı (1:1, 1:2, 2:1 ve 1:5 (U:U)) ve membranların aktivitesi oksijen elektrot ünitesinde incelendi. Şekil 8'de görüldüğü gibi ChO:AChE oranının 1:1'den 5:1'e yükseltilmesi ile reaksiyon hızının arttığı görülmüştür. AChE miktarının artırılması ise reaksiyon hızında bir değişiklik yapmamıştır (Tablo 6). Bu ChO enziminin aktivitesinin sistemdeki sınırlayıcı unsur olduğunu göstermiştir. Diğer yandan, spesifik aktivitelerin yüksek enzim yüklemelerinde düştüğü görülmüştür.



Şekil 8. ChO-AChE oranının membran içine hapsedilmiş ikili enzim sisteminin aktivitesine etkisi. (◆) ChO (2.5 u), AChE (2.5 u), (■) ChO (2.5 u), AChE (5.0 u), (σ) ChO (5.0 u), AChE (2.5 u), ve (●) ChO (12.5 u), AChE (2.5 u)

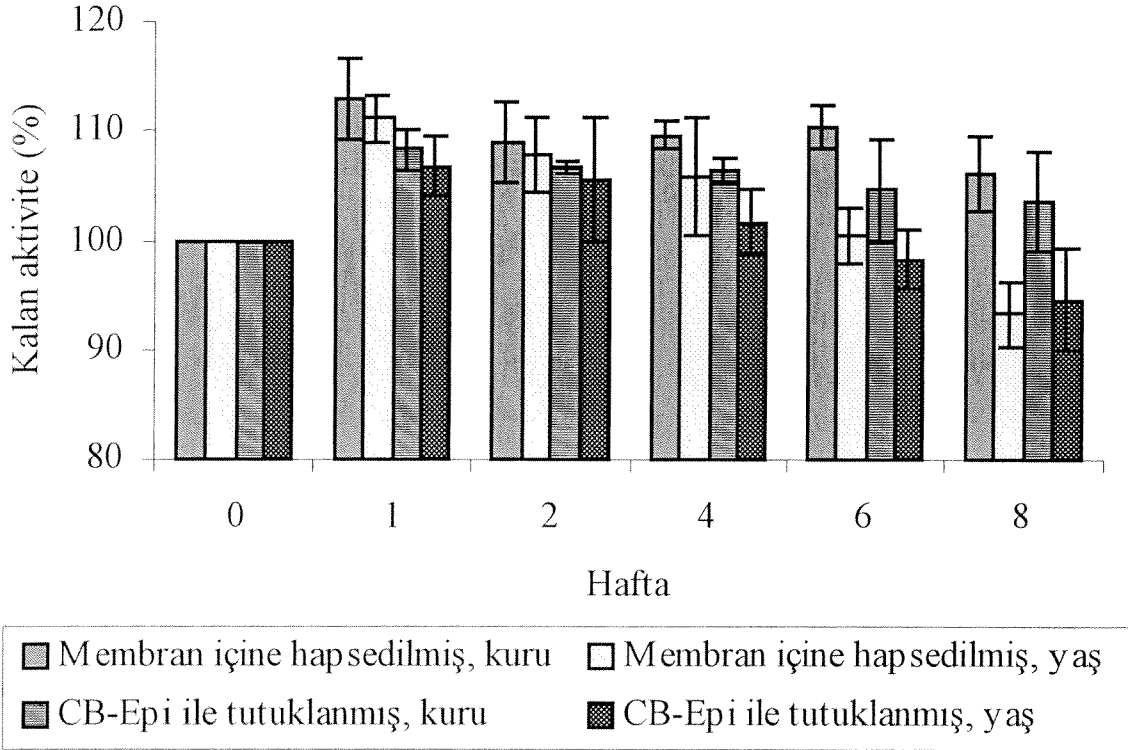
Tablo 6. Membran içine hapsedilmiş ikili enzim aktivitesinin ChO:AChE oranı ile değişimi

ChO:AChE (unit:unit)	$K_{m,app}$ (mM)	$V_{max,app}$ (mV.s ⁻¹)	Spesifik Aktivite (mV.s ⁻¹ .µg ChO ⁻¹)
2.5:2.5	1.88	1.48	0.084
2.5:5.0	1.82	1.54	0.086
5.0:2.5	1.69	2.66	0.074
12.5:2.5	1.28	3.88	0.043

3.7.4. Depolama Ömrü

Depolama ömrü kuru ve yaş olarak belirlendi. Yaş depolama için membranlar sudan çıkarılarak nemli ortamda 4 °C'da saklandı. Kuru depolama için membranlar 1 sa oda sıcaklığında kurutuldu ve sıkıca kapatılmış petrilerde 4 °C'da saklandı. Membran aktiviteleri 2 ay süresince değişik zamanlarda oksijen elektrot ünitesi ile ölçüldü. Aktivite ölçümlerinden önce membranlar 2 sa oda sıcaklığında fosfat tamponunda bekletildi.

Şekil 9'de de görüldüğü gibi ilk hafta sonunda membranlarda aktivite artışı görüldü. Bu durum Rouillon ve ark. (1992) tarafındanda gözlemlenmiştir. Kuru depolamada 2 ay boyunca her iki ikili-enzim sistemde de belirgin bir aktivite kaybı gözlenmedi. Yaş depolamada ise 2 ay sonunda % 15'lik bir düşüş görüldü. Bu aktivite kaybı biyosensörün çalışması açısından hiç bir sorun yaratmamaktadır çünkü her seferinde kalibrasyon yapılarak pestisit miktarı ona göre belirlenmektedir. Örnek olarak, Jeanty ve Marty (1998) başlangıç aktivitesinin % 50'si kalana kadar ölçümlerine devam etmişlerdir.



Şekil 9. Tutuklanmış ikili ezim sisteminin depolama kararlılığı

Oluşturulan membran fotokimyasal yolla çapraz bağlanabilen poli(vinilalkol)'den daha iyidir. Navera ve ark. (1991) enzim aktivitesinin 6 hafta sonunda % 20 azaldığını görmüştür (kuru depolama, 0°C). Rouillon ve ark. (1992) ise tutuklanmış enzimlerin kuru depolamada 3 ay aktivite kaybına uğramadığını fakat yaş depolamada önemli bir azalma olduğunu (1 ayda % 50) saptamışlardır.

3.8. Pestisit Tayini Çalışmaları

La Rosa ve ark. (1994) karbamat pestisit ortama substrat (ACh) ile birlikte eklenmesi halinde kompetitif inhibisyon gözlemlenmiştir. Enzim pestisit ile önceden inkübe edilip substrat daha sonra eklendiğinde ise inhibisyon nonkompetitif olarak bulunmuştur. İkinci metod bizim çalışmalarımız için seçilmiştir çünkü bu şekilde substrat ve analit arasında yarışma olmayacağı için inhibisyon daha çok olacaktır.

Pestisit tayini membranların aktivitesi orijinalinin % 60'ına düşene kadar yapıldı. Yüzde inhibisyon denklem 5 kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Yüzde inhibisyon (\%)} = [(I_0 - I_i) / I_0] \times 100 \quad (5)$$

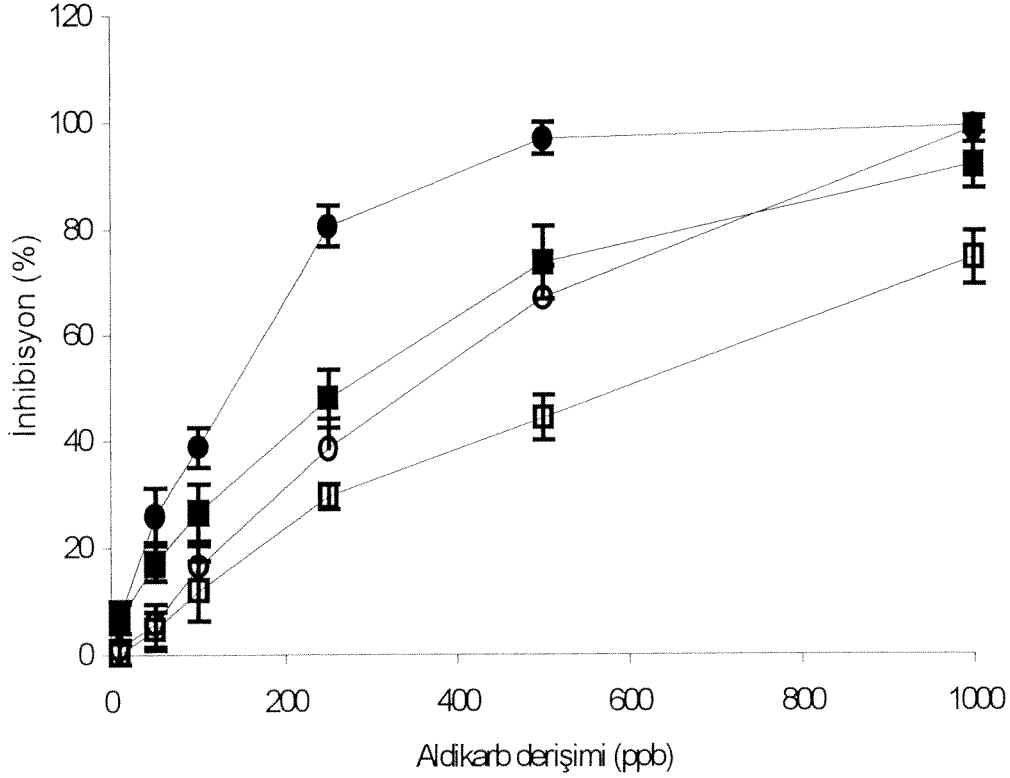
Bu denklemde I_0 ve I_i ikili enzim sisteminin aldikarb yokluğunda ve varlığındaki aktivitesidir (mV.s^{-1}). Her aktivasyondan sonra, I_0 değeri yeniden belirlenerek bir sonraki tayinde kullanılmaktadır.

Pestisit tayin çalışmaları aldikarb ile yapıldı. Bunun için aldikarb çözeltileri fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.0) içinde değişik derişimlerde (10-1000 ppb) hazırlandı. Hava pompası ile 30 dak. havalandırılmış çözelti (1.2 mL) oksijen elektrot ünitesine kondu. Enzim tutuklanmış membran bunun içine yerleştirilerek analit ile teması sağlandı. Bu temas için değişik süreler denendi (5-30 dk). Daha sonra sübstrat (ACh) eklendi. İki değişik sübstrat derişimi kullanıldı (0.4 M ve 2 M membran içine hapsedilen enzimler ve 0.2 M ve 1 M CB-Epi membranı için). Elektrotun cevabı, aynı miktardaki sübstratın pestisit olmadan verdiği cevapla karşılaştırıldı.

3.8.1. Sübstrat Derişiminin Etkisi

Her iki sistem için de iki değişik sübstrat konsantrasyonu kullanıldı. Düşük derişimde (CB-Epi membranları için 0.2 mM ve membran içine hapsedilmiş enzimler için 0.4 mM) enzim sübstrat ile doymamıştır. Yüksek derişimde ise (1 mM ve 2 mM) enzim sübstrat ile doymuştu. Sonuçlar düşük pestisit miktarlarının düşük sübstrat derişimlerinde tayin edilemediğini gösterdi (Şekil 10). Yüzde inhibisyon enzimlerin aktif ve inhibe edilmiş formlarının aktivite ölçümleri ile bulunmaktadır. Bunun için tüm enzimler her seferinde reaksiyonda yer almalıdırlar. Bu da ancak enzimin doyma derişiminde mümkün olabilmektedir. Diğer yandan düşük substrat derişimlerinde pestisit miktarını yüzde inhibisyona bağlayan eğrinin doğrusallığının arttığı görülmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda yüksek sübstrat derişimleriyle çalışılmasına karar verilmiştir.

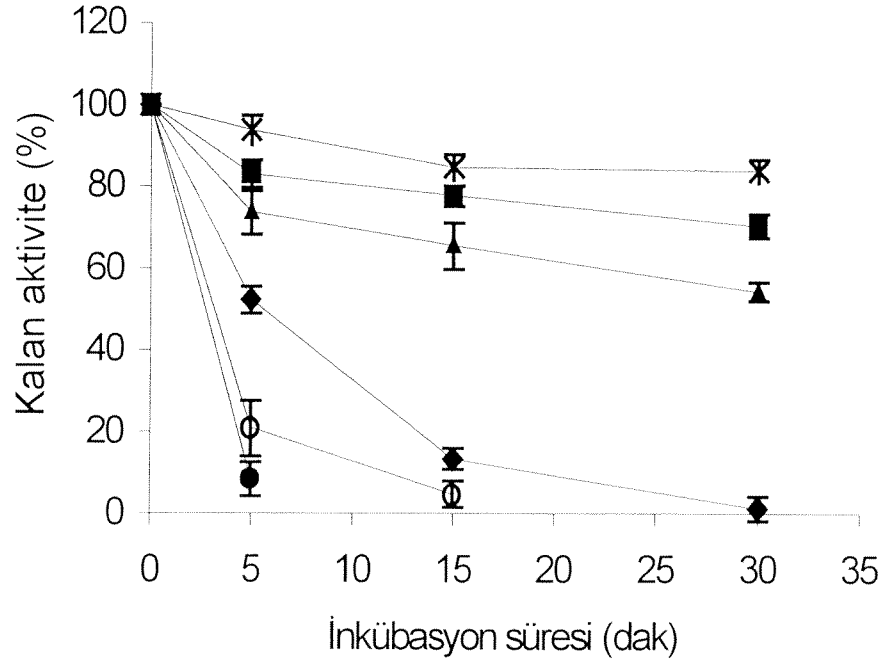
Pestisit substrat ile birlikte eklendiği durumlarda yüksek substrat kullanmak iyi sonuçlar vermeyecektir. Bu durumlarda kompetisyon olduğu için sübstrat pestisit ile aktif bölge için yarışacak ve düşük pestisit derişimleri tespit edilemeyecektir.



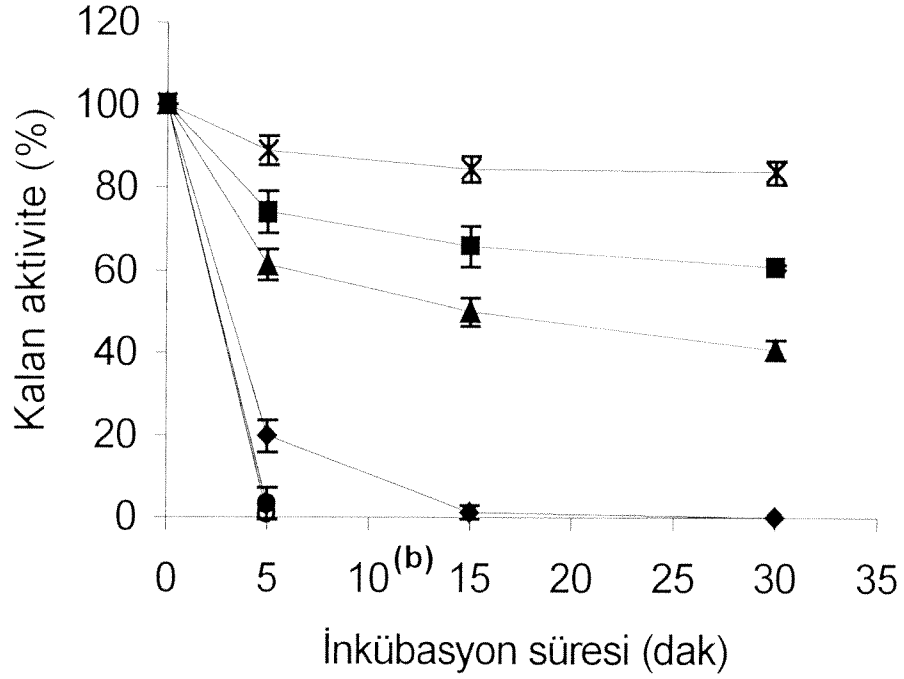
Şekil 10. Substrat derişiminin aldikarb tayinine etkisi. Membran içine hapsedilmiş enzimler için (■) 2.0 mM, (□) 0.4 mM, ve CB-Epi ile tutuklanmış enzimler için (●) 1.0 mM, (○) 0.2 mM Ach derişimlerinde yüzde inhibisyon değerleri. İnkübasyon süresi: 5 dak.

3.8.2. İnkübasyon Süresinin Etkisi

Değişik derişimdeki aldikarb çözeltilerinin enzim aktivitesine etkisi 3 değişik inkübasyon zamanında (5, 15 ve 30 dak) incelendi. Şekil 11 a ve b'de de görüldüğü gibi yüzde inhibisyon zamanla artmaktadır. Ayrıca yüzeye bağlanmış enzimler membran içine hapsedilmişlerden daha çabuk cevap vermişlerdir. 5 dk.lık inkübasyon süresinin tayinde yeterli olduğu düşünülmüş ve tayin süresinin çok uzamaması için diğer çalışmalarda bu süre kullanılmıştır. La Rosa ve ark. (1994) paraokson ve karbaril için 3-5 dk kullanırken, Barnabei ve ark. (1992) ve Campanella ve ark. (1999) aldikarb ve paraokson tayini için sırasıyla 30 dk ve 20 dk kullanmaktadır. Skladal ve ark. (1997) ve Nunes ve ark. (1998) aldikarb ve 4 değişik antikolinesteraz pestisit için 10 dk.lık süre kullanmışlardır. Literatürde 1 sa gibi uzun sürelerle de rastlanmaktadır (SKLADAL, 1992; CHO, 1999).



(a)



Şekil 11. İnkübasyon süresinin (a) membran içine hapsedilmiş ve (b) CB-Epi ile tutuklanmış ikili enzim sistemlerinin aktivitesine etkisi. AS derişimleri: (X) 10 ppb, (■) 50 ppb, (◊) 100 ppb, (◆) 250 ppb, (◊) 500 ppb ve (●) 1000 ppb

3.9. Biyosensör Özelliklerinin Belirlenmesi

3.9.1. Membranların Yeniden Kullanılabilirlikleri

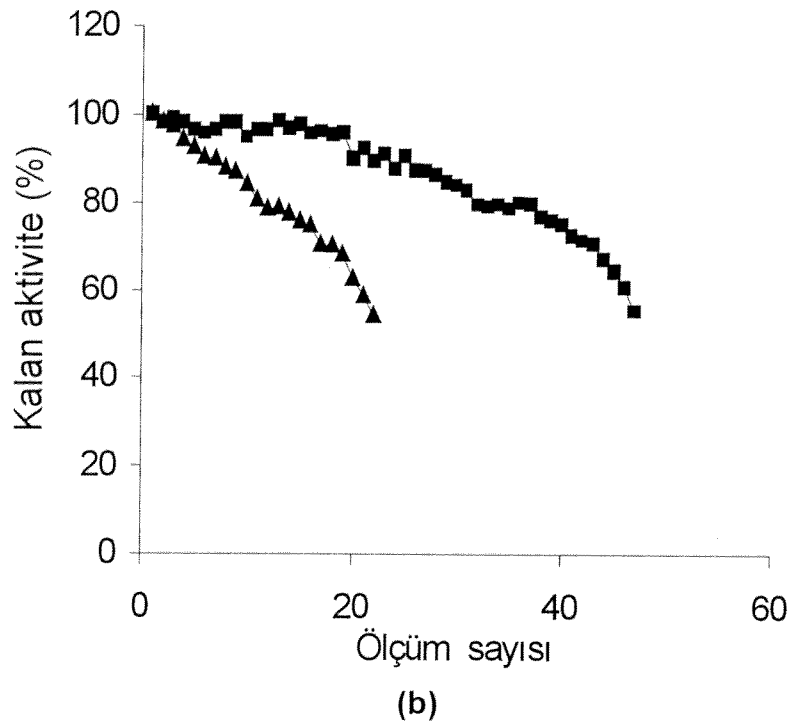
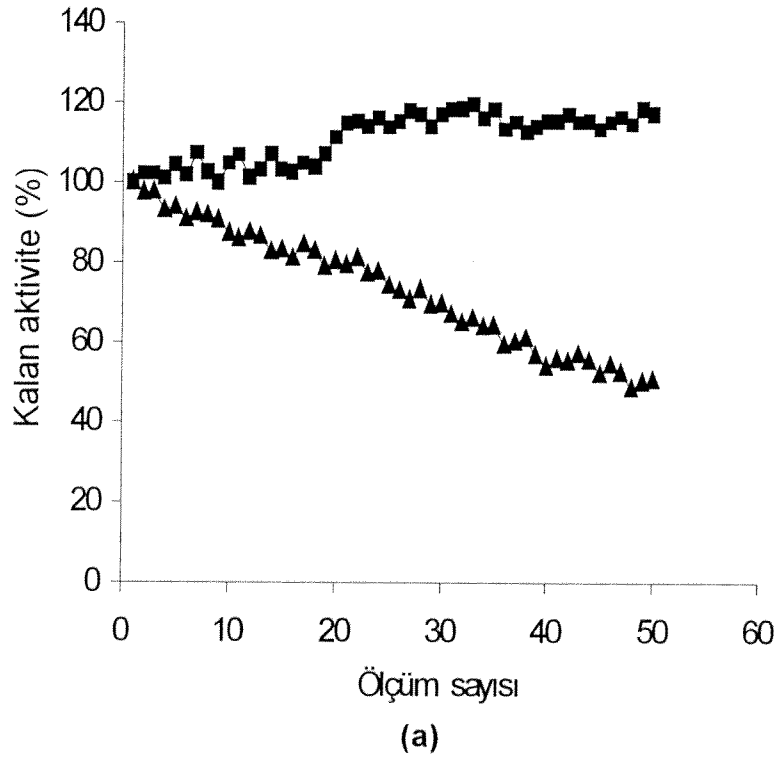
Membranların tekrar kullanılabilirlikleri aldikarb yokluğunda ve varlığında belirlendi. Bunun için 100 ppb aldikarb analit olarak ve 0.4 M ACh substrat olarak kullanıldı. Her pestisit ölçümünden sonra membranlar NaF solüsyonu (0.4 mM) içinde 10 dk bekletilerek yeniden aktivasyonları gerçekleştirildi (TAKRUNI, 1993). Aktivitenin membran içine hapsedilen enzimlerde % 98.6, CB-Epi ile tutuklanan enzimlerde % 97.1 oranında yeniden kazanıldığı görüldü. Sonuçlar Şekil 11a ve b'de gösterilmiştir.

Tekrarlanabilirlik düzeyi aldikarb yokluğunda belirlenmiştir. Membran içine hapsedilmiş enzimler için % 4.98, yüzeye bağlanmış enzimler için % 5.72 standart sapma görülmüştür. Birbirini takip eden ölçümlerde % 10'a kadar sapmalar kabul edilebilir boyuttadır ve buna benzer değerler (% 5-10) literatürde de görülmektedir (SAMPATH ve LEV, 1996; SKLADAL, 1997; NUNES, 1998).

Membran içine hapsedilmiş enzimlerin aktivitesi aldikarb yokluğunda 50 ölçüm sonunda değişmezken, aldikarb varlığında yaklaşık 50 ölçüm sonunda % 50 oranında düşmüştür (Şekil 12a).

CB-Epi ile tutuklanan enzimlerin aktivitesi ise aldikarb yokluğunda 20 ölçüm sonrası düşmeye başladı ve 50 ölçüm sonunda başlangıç aktivitesinin % 50'sine düştü. Aldikarb ölçümlerinde ise % 50 aktivite kaybına yaklaşık 20 ölçüm sonunda ulaşıldı (Şekil 12b).

Bazı araştırmacılar herhangi bir aktivasyon prosedürü uygulamamakta ve bunun yerine membranları birkaç ölçümden sonra değiştirmektedirler (BARNEBEI, 1991; SKLADAL, 1997).



Şekil 12. (a) membran içine hapsedilmiş ve (b) CB-Epi ile tutuklanmış ikili enzim sisteminin aldikarb yokluğu (■) ve varlığında (100 ppb, inkübasyon süresi: 5 dak) (•) aktivitesi

3.9.2. Doğrusal Çalışma Aralığı ve Minimum Tayin Limiti

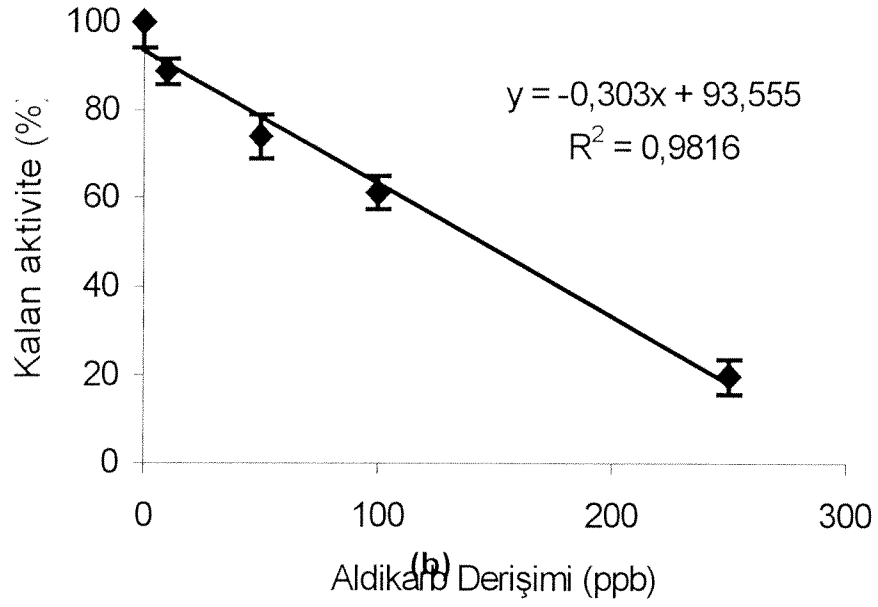
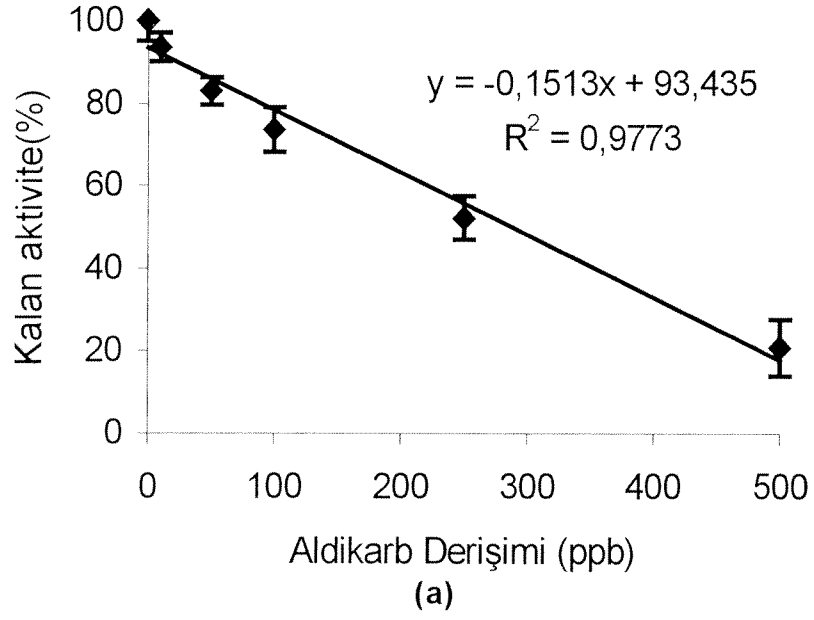
Her iki tutuklama yöntemi ile de geniş doğrusal çalışma aralıkları elde edildi (Şekil 13a ve b). Membrana hapsedilmiş enzimler için bu aralığın daha geniş olduğu görüldü (10-500 ppb' karşılık 10-250 ppb).

Minimum tayin limitinin belirlenmesinde, tekrarlanabilirlik çalışmalarında bulunan standart sapma değerlerini göz önüne almak gerekmektedir (Her biri için yaklaşık % 5). Bu sebeple başlangıç aktivitesinin % 90'ından düşük inhibisyonlar aldikarb tayini için gerekli limit olarak belirlendi. Daha yüksek değerler (% 95 gibi) sensör cevabındaki dalgalanmalardan kaynaklanabileceği için bu değer uygun görüldü. Grafiklerde görülen denklemlerden bulunan % 10 inhibisyona dayalı minimum tayin limitleri membran içine hapsedilmiş enzimler için 22.7 ppb ve CB-Epi ile tutuklanan enzimler için 11.7 ppb olarak hesaplandı.

Antikolinesterazların tayini ile ilgili olan literatürde aldikarb tayini ile ilgili çok örnek bulunmamaktadır. Bu konudaki ilk makalelerden birinde Barnabei ve ark. (1991) AChE enzimini serbest ve tutuklanmış halde aldikarb ve paraoksanın tayininde kullanmıştır. Her iki enzimde tutuklandığında (AChE ve ChO) doğrusal çalışma aralığı aldikarb için 200 ppb'ye kadar çıkmaktadır. AChE serbest halde kullanıldığında ise 120 ppb'ye kadar polinomial bir bağlantı elde edilebilmiştir.

Roda ve ark. (1994) aldikarb için 4 ppb'lik bir tayin limiti bulmuşlardır. Bu sonuç AChE'nin serbest formda kullanılması ve 60 dk.lık inkübasyon süresi ile mümkün olmuştur. Botre ve ark (1994) ise iki enzimi de tutuklamıştır. Aldikarb için 400-1300 ppb arası bir çalışma aralığı ve 100 ppb minimum tayin limiti bulunmuştur. Çalışma aralığının bu çalışmada elde edilenden daha geniş olmasına karşın minimum tayin limitinin bu çalışmada elde edilenden daha yüksek olduğu açıktır. Nunes ve ark (1998) çalışmasında da aynı şey görülmektedir. Doğrusal çalışma aralığı çok geniş olmakla birlikte (10-10000 ppb) minimum tayin limitleri 125 ppb olarak bulunmuştur.

Bir başka çalışmada ise BChE ve ChO kullanılmıştır (CAMPANELLA, 1999). Düşük aldikarb tayin limitine karşılık (4.8 ppb) çok dar bir çalışma aralığı (10-60 ppb) elde edilebilmiştir.



Şekil 13. (a) Membran içine hapsedilmiş ve (b) CB-Epi ile tutuklanmış ikili enzim sisteminin aldikarb tayini için kalibrasyon eğrileri (İnkübasyon süresi: 5 dak)

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, oluşturulan biyosensörün doğrusal çalışma aralığı, minimum tayin limiti ve inkübasyon süresi birlikte düşünüldüğünde iyi bir sonuç verdiği görülmektedir.

3.8.3. Tayin Süresi

Tayin süresi, aldikarb tayini ve aktivasyon sürelerinin toplamı olarak hesaplanmıştır. Aldikarb tayini iki aşamada yapılmıştır; inkübasyon (5 dk) ve tayin (substrat eklenmesinden sonra geçen zaman, 10 dk). Bu sebeple toplam tayin süresi 25 dk olarak belirlenmiştir yani birbirini takip eden ölçümler 25 dakikalık aralıklarda yapılabilecektir.

Literatürde çok değişik tayin süreleri görülmektedir. Cagnini ve ark (1995) (12 dak) ve Skladal ve ark. (1997) (20 dk.dan kısa) kısa tayin süreleri elde etmişlerdir. Fakat bu çalışmalarda tek kullanımlık elektrotler kullanıldığından aktivasyon yapılmamıştır. Barnebei ve ark. (1991), Botre ve ark. (1994) ve Cho ve ark. (1999), ise uzun analiz süreleri kullanmışlardır (sırasıyla 35, 40 ve 60 dk). Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen tayin süresi oldukça uygundur.

4. SONUÇ

Bu projenin amacı antikolinesteraz pestisitlerin tayininde kullanılmak üzere bir enzim biyosensörü yapımı idi. Bunun için asetilkolinesteraz ve kolin oksidaz enzimleri iki değişik metodla hidrosietilmetakrilat polimerlerine tutuklandı ve pestisit varlığı enzimlerin oksijen kullanımındaki azalma ile gözlemlendi.

Hem membran içine hapsetme, hem de yüzeye bağlama (CB-Epi) metotlarının başarılı olduğu görüldü. Membran içine hapsetmenin enzimleri daha iyi koruduğu ve daha uzun kullanım süresine sahip olduğu bulundu. Diğer yandan yüzeye bağlama metodunun enzimleri daha az inaktive ettiği ve daha düşük tayin limitleri sağladığı belirlendi. Bu teknikle, sistemin anahtar enzimi olan ChO'in düşük aktivite kaybı ile bağlanması sağlandı. Literatürde sıkça karşılaşılan glutaraldehit ile çapraz bağlamaya oranla bu yöntem çok daha başarılıdır.

Düşük tayin limiti, uygun tayin süresi ve geniş çalışma aralığı oluşturulan biyosensörün başarısını göstermektedir. Ayrıca tekrar kullanılabilirliği de ekonomik olmasını sağlamaktadır.

Elde edilen biyosensörün aldikarb dışındaki pestisitlerin de varlığında denenerek interferans sorununun incelenmesi gerekmektedir. Bunun dışında sensör tipinin daha taşınabilir bir biçime dönüştürülmesi gerekecektir.

KAYNAKÇA

BERNABEI, M., Cremisini, C., Mascini, M., Palleschi, G., Determination of organophosphorous and carbamic pesticides with a choline and acetylcholine electrochemical biosensor, *Analytical Letters*, 24(3), 1317-1331, (1991).

BOTRE, F., Lorenti, G., Mazzei, F., Simonetti, G., Porcelli, F., Botre, C., Scibona, G., Cholinesterase based bioreactor for determination of pesticides, *Sensors and Actuators B*, 18-19, 689-693, (1994).

CAGNINI, A., Palchetti, I., Lioni, I., Mascini, M., Turner, A.P.F., Disposable ruthenized screen-printed biosensors for pesticide monitoring, *Sensors and Actuators B*, 24-25, 85-89, (1995a).

CAGNINI, A., Palchetti, I., Mascini, M., Turner, A.P.F., Ruthenized screen printed choline oxidase based biosensors for measurement of anticholinesterase activity, *Mikrochimica Acta*, 121, 155-166, (1995b).

CAMPANELLA, L., Achili, M., Sammartino, M.P., Tomassetti, M., Butyrylcholine enzyme sensor for determining organophosphorous inhibitors, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 26, 237-249, (1991).

CAMPANELLA, L., Cocco, R., Sammartino, M.P., Tomassetti, M., A new enzyme inhibition sensor for organophosphorous pesticide analysis, *The Science of the Total Environment*, 123/124, 1-16, (1992).

CAMPANELLA, L., De Luca, S., Sammartino, M.P., Tomassetti, M., A new organic phase enzyme electrode for the analysis of organophosphate pesticides and carbamates, *Analytica Chimica Acta*, 385, 59-71, (1999).

CHO, Y.A., Lee, H.S., Cha, G.S., Lee, Y.T., Fabrication of butylcholinesterase sensor using polyurethane-based ion selective membranes, *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 387-390, (1999).

CREMISINI, C., Di Sario, S., Mela, J., Pilloton, R., Palleschi, G., Evaluation of the use of free and immobilized acetylcholinesterase for paraoxon detection with an amperometric choline oxidase based biosensor, *Analytica Chimica Acta*, 311, 273-280, (1995).

DORETTI, L., Gattolin, P., Lora, S., Amperometric choline sensor with enzyme immobilized by gamma-irradiation in a biocompatible membrane, *Analytical Letters*, 27(13), 2455-2470, (1994).

DORETTI, L., Ferrara, D., Lora, S., Schiavon, F., Veronese, F.M., Acetylcholine biosensor involving entrapment of acetylcholinesterase and poly(ethylene glycol)-modified choline oxidase in a poly(vinyl alcohol) cryogel membrane, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 279-285, (2000).

EDWARDS, C.A., The impact of the pesticides on the environment in *The Pesticide Question: Environment, Economics and Ethics*, eds: Pimantel, D. and Letiman, H., Chapman & Hall Inc., USA, (1993).

EVTUGYN, G.A., Budnikov, H.C., Nikolskaya, E.B., Sensitivity and selectivity of electrochemical enzyme sensors for inhibitor determination, *Talanta*, 46, 465-484, (1998).

JEANTY, G., Marty, J.L., Detection of paraoxon by continuous flow system based enzyme sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 13(2), 213-218, (1998).

KANO, K., Morikage, K., Uno, B., Esata, Y., Goto, M., Enzyme microelectrodes for choline and acetylcholine and their applications, *Analytica Chimica Acta*, 299, 69-74, (1994).

LA ROSA, C., Pariente, F., Hernandez, L., Lorenzo, E., Determination of organophosphorus and carbamic pesticides with an acetylcholinesterase amperometric biosensor using 4-aminophenyl acetate as substrate, *Analytica Chimica Acta*, 295, 273-282, (1994).

LEON-GONZALES, M.F., Townhend, A., Flow-injection determination of paraoxon by inhibition of immobilized acetylcholinesterase, *Analytica Chimica Acta*, 236, 267-272, (1990).

MULCHANDANI, P., Mulchandani, A., Kaneva, I., Chen, W., Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. 1. Potentiometric enzyme electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 77-85, (1999).

NAVERA, E.N., Sode, K., Tamiya, E. and Karube, I., Development of acetylcholine sensor using carbon fiber (amperometric determination), *Biosensors and Bioelectronics*, 6, 675-680, (1991).

NUNES, G.S., Skladal, P., Yamanaka, H., Barcelo, D., Determination of carbamate residues in crop samples by cholinesterase-based biosensors and chromatographic techniques, *Analytica Chimica Acta*, 362, 59-68, (1998).

PALLESCHI, G., Bernabei, M., Cremisini, C., Mascini, M., Determination of organophosphorous insecticides with a choline electrochemical biosensor, *Sensors and Actuators B*, 7, 513-517, (1992).

PIMENTEL, D., Environmental and economic impacts of pesticide use, in *The Pesticide Question: Environment, Economics and Ethics*, ed: Pimantel, D. and Letiman, H., Chapman & Hall Inc., USA, (1993).

- ROGERS, K.R., Cao, C.J., Valdes, J.J., Eldefrawi, A.T., Eldefrawi, M.E., Acetylcholinesterase fiber-optic biosensor for detection of anticholinesterases, *Fundamental and Applied Toxicology*, 16, 810-820, (1991).
- RODA, A., Rauch, P., Ferri, E., Girotti, S., Ghini, S., Carrea, G., Bovara, R., Chemiluminescent flow sensor for the determination of paraoxon and aldicarb pesticides, *Analytica Chimica Acta*, 294, 35-42, (1994).
- ROUILLON, R. Mionetto, N., Marty, J.-L., Acetylcholine biosensor involving entrapment of two enzymes. Optimization of operational and storage conditions, *Analytica Chimica Acta*, 268, 347-350, (1992).
- SAMPATH, I., Lev, O., Inert metal-modified, composite ceramic-carbon, amperometric biosensors: renewable, controlled reactive layer, *Analytical Chemistry*, 68(13), (1996).
- SKLADAL, P., Detection of organophosphate and carbamate pesticides using disposable biosensors based on chemically modified electrodes and immobilized cholinesterase, *Analytica Chimica Acta*, 269, 281-287, (1992).
- SKLADAL, P., Fiala, M., Krejci, J., Detection of pesticides in the environment using biosensors based on cholinesterases, *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 65, 139-148, (1996).
- SKLADAL, P., Nunes, G.S., Yamanaka, H. and Ribeiro, M.L., Detection of carbamate pesticides in vegetable samples using cholinesterase-based biosensors, *Electroanalysis*, 9(14), 1083-1087, (1997).
- TAKRUNI, I.A., Almuaibed, A.M., Townshend, A., Flow-injection study of inhibition and reactivation of immobilized acetylcholinesterase: determination of pesticides paraoxon and carbamoylcholine, *Analytica Chimica Acta*, 282, 307-312, (1993).

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU

1- Proje No: TOG TAG-TARP-2191 2-Rapor Tarihi

3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.01.1999 – 01.02.2002

4- Proje Adı:

ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİNİ İNHİBE EDEN PESTİSİTLERİN TAYİNİNDE KULLANILMAK ÜZERE YENİ BİR ENZİM BİYOSENSÖRÜ YAPIMI

5- Projenin Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar:

Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Vasıf Hasırcı

Yardımcı Araştırmacılar: Prof. Dr. Nesrin Hasırcı, Fatma N. Kök

6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:

Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Birimi
06531 Ankara

7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:

ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü 06531 Ankara

AFP-99-06-02-02 no.lu proje

8- Öz:

Bu çalışmada, karbamat ve organofosfat pestisitlerin asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmesi temeline dayanan bir biyosensör oluşturulmuştur. Asetilkolinesteraz, kolin oksidaz enzimi ile birlikte, fotopolimerizasyonla çapraz bağlanabilir hidroksietilmetakrilat (pHEMA) membranlarına tutuklanmış ve bu membranlar ile ortamdaki pestisit oksijen tüketimine etkisi gözlenmiştir. SnCl₄ ile hazırlanan membranların geçirgenlik ve gözeneklilik açısından immobilizasyona uygun olduğu görülmüştür. Enzimler membran içine hapsedme ve yüzeyine bağlanma olmak üzere iki değişik şekilde immobilize edilmiştir. En yüksek aktivite pH 9.0'da elde edilmesine karşılık, aldikarbın hidrolize olmaması için çalışmalar pH 7.0'de gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesinin sıcaklıkla arttığı görülmüştür (25-40°C). Doğrusal çalışma aralığı, membran içine hapsedilmiş ve yüzeye tutuklanmış enzimler için sırasıyla 10-500 ve 10-250 ppb olarak belirlenmiştir. Yüzeye tutuklanmış enzimler aldikarb varlığına daha hızlı tepki vermiştir. 23 ppb ve 12 ppb kadar düşük miktardaki aldikarbın tayini (membran içine ve yüzeyine tutuklanan enzimler için) 25 dakikalık bir analiz süresinde gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aldikarb, enzim biyosensörü, asetilkolinesteraz, pHEMA

Abstract

In this study, acetylcholinesterase and choline oxidase were co-immobilized on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) membranes and the change in oxygen consumption upon aldicarb introduction was measured. Membranes prepared in the presence of SnCl₄ were found to be superior in terms of porosity and permeability and were chosen as immobilization matrix. Immobilization of the enzymes was achieved both by entrapment and surface attachment. Though pH 9.0 led to the best enzyme activity, pH 7.0 was chosen to prevent the hydrolysis of aldicarb at alkaline conditions. Activity of the enzymes was found to increase with increasing temperature (from 25°C to 40°C). Aldicarb detection studies showed that a linear working range of 10-500 ppb and 10-250 ppb aldicarb could be achieved by entrapped and surface immobilized enzymes, respectively. Enzymes immobilized on membrane surfaces responded to aldicarb presence more quickly than entrapped enzymes. Aldicarb concentrations as low as 23 and 12 ppb could be detected by entrapped and surface immobilized enzymes, respectively, in 25 min.

Keywords: Aldicarb, enzyme biosensor, acetylcholinesterase, pHEMA

9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler

F.N.Kök, F.Bozoğlu and V.Hasırcı, Construction of an acetylcholinesterase-choline oxidase Biosensor for aldicarb determination, *Biosensors and Bioelectronics* (kabul edildi)

F.N.Kök, F.Bozoğlu and V.Hasırcı, Immobilization of acetylcholinesterase and choline oxidase in/on pHEMA membrane for biosensor construction, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 12(11), 1161-1176, (2001).

F.N.Kök, F.Bozoğlu and V.Hasırcı, Construction of an acetylcholinesterase-choline oxidase biosensor for aldicarb determination, The Sixth World Congress on Biosensors, San Diego, USA, 2000

F.N.Kök, F.Bozoğlu and V.Hasırcı, Asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden pestisitlerin tayininde kullanılmak üzere biyosensör tasarımı, 6. Uluslararası Katılımlı Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, 5zmir, 1998

V.Hasırcı, pHEMA membranes in biosensors, NATO ASI Novel Processes and Control Technologies in the Food Industry, September 11-22, 2000, Antalya

10- Bilim Dalı:

Doçentlik B.Dalı Kodu:

ISIC Kodu:

Uzmanlık Alanı Kodu:

11- Dağıtım (*) : Sınırlı Sınırsız

12- Raporun Gizlilik Durumu: Gizli Gizli Değil

(*) Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz.

Immobilization of acetylcholinesterase and choline oxidase in/on pHEMA membrane for biosensor construction

FATMA N. KOK¹, FARUK BOZOGLU² and VASIF HASIRCI^{1,*}

¹ *Middle East Technical University, Departments of Biological Sciences and Biotechnology, Biotechnology Research Unit, 06531 Ankara, Turkey*

² *Middle East Technical University, Food Engineering Department, 06531 Ankara, Turkey*

Received 14 May 2001; accepted 6 August 2001

Abstract—In this study, acetylcholinesterase (AChE) and choline oxidase (ChO) were co-immobilized on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) membranes with the aim of using them in biosensor construction. pHEMA membranes were prepared with the addition of different salts in different HEMA:aqueous solution ratios and characterized in terms of porosity, thickness, permeability, and mechanical properties. Membranes prepared in the presence of SnCl₄ were found to be superior in terms of porosity and permeability and were chosen as the immobilization matrix. Immobilization of the enzymes was achieved both by entrapment and surface attachment via epichlorohydrin (Epi) and Cibacron Blue F36A (CB) activation. The effect of immobilization on enzyme activity was evaluated by the comparison of K_m and V_{max} values for the free and immobilized bi-enzyme systems. The increase in K_m was negligible (1.08-fold) for the bi-enzyme system upon immobilization on surface but was 2.12-fold upon entrapment. Specific activity of the free enzyme system was found to be $0.306 \text{ mV s}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ ChO while it was 0.069 (4.43-fold decrease) for entrapped and 0.198 (1.54 fold decrease) for CB-Epi immobilized enzymes. The performance of immobilized enzymes in different buffer types, pH, and temperature conditions were evaluated. The best enzyme activity was obtained at pH 9.0. Activity of the enzymes was found to increase with increasing temperature (in the range 25–40°C).

Key words: Enzyme biosensor; acetylcholinesterase; pHEMA; immobilization.

INTRODUCTION

Immobilization of enzymes attracts attention since it makes the reusability of these important bioactive materials possible. Moreover, immobilization increases the stability of the enzymes and makes different applications possible. Immobilized enzymes are used in the production of various compounds, in the selective treatment of specified pollutants, in continuous analysis of various compounds with high

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: vhasirci@metu.edu.tr

sensitivity and specificity, and finally in medical applications. Biosensors are one of the important growing areas involving use of immobilized bioactive compounds. Their applications widely range from the environmental and industrial monitoring to medical fields.

The performance of a biosensor strongly depends on the success of the immobilization technique employed. The bioactive compound is expected to retain a substantial proportion of its activity and have long term stability upon immobilization. Immobilized acetylcholinesterase (AChE) and choline oxidase (ChO) are very important in biosensors used in both environmental and medical analyses. Detection of anti-cholinesterase pesticides (namely, carbamates and organophosphates) in environmental and food samples is the most abundantly studied area due to the wide application of these toxic pesticides throughout the world [1-6]. Different methods were used for immobilization of AChE and ChO in/on various supports. Adsorption [7, 8], entrapment [5, 9], covalent bonding [1, 10, 11] and cross-linking [3, 12-14] are the methods commonly used for this purpose.

Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) is a hydrophilic polymer widely used in the immobilization of bioactive compounds [15-17]. Non-toxicity, ease of fabrication and modification, and the presence of hydroxyl group offering attachment sites, are the main reasons why this polymer is an important immobilization support.

In this study, AChE and ChO were immobilized in/on pHEMA membranes by: (i) entrapment; and (ii) a hybrid method involving both covalent (via epichlorohydrin linkage) and ionic bonding (by Cibacron Blue F36A). Immobilization of bioactive compounds by reactive dyes attract attention due to their various advantages such as ease of immobilization, availability, absence of hazardous and toxic reagents in the activation step, stability against biological and chemical attack, and high capacity [18]. Cibacron blue F36A is one of these reactive dyes consisting of two major components: a chromophore and a reactive group, a triazine ring. For high binding capacities, the support should be both porous and possess a sufficient number of hydroxyl groups. The pHEMA membranes are ideal in both respects.

Both methods of immobilization were evaluated in terms of the effect of immobilization on enzyme activity and the effect of temperature and pH on the activity of immobilized enzymes.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Choline (Ch) (chloride salt), acetylcholine (ACh) (chloride salt), choline oxidase (ChO) (E.C. 1.1.3.17, from *Alcaligenes* sp.), acetylcholinesterase (AChE) (E.C. 3.1.1.7, from electric eel, Type V-S) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

The monomer, 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and was vacuum distilled and stored at

4°C until use. The initiator, α, α' -azo-isobutyronitrile (AIBN) was purchased from Fluka, AG (Switzerland). The cross-linker, ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and purified before use.

Methods

Preparation of pHEMA membranes. Preparation of pHEMA membranes was carried out according to the method described by Arica and Hasirci [19]. Membranes were prepared by mixing HEMA with one of the solutions shown in Table 1 and by the addition of AIBN as the initiator and EGDMA as cross-linker. Polymerization was achieved in a Petri plate (diameter: 9 cm) under nitrogen atmosphere with exposure to UV light (long wave UV, 360 nm, 12 W). The resultant membranes were washed with and stored in distilled water at 4°C.

Characterization of membranes.

Determination of water content. The membranes were incubated in an excess of distilled water for 48 h. A known amount (*c.* 300 mg) was taken and dried under vacuum (50°C, 24 h). Water content of the membranes was determined according to Eq. (1).

$$\text{water content (\%, w/w)} = [(W_s - W_d)/W_s] \times 100, \quad (1)$$

where W_s is the weight of wet membrane and W_d the weight of dry membrane.

Evaluation of porosity by scanning electron microscopy (SEM). The membranes were lyophilized for 6 h and coated with gold and scanning electron micrographs were obtained using a Jeol SEM (JSM-6400, Japan).

Determination of membrane permeability. Disks (4 cm in diameter) were cut from the membranes and fixed between two chambers of a permeability system.

Table 1.
Membrane preparation media

Solvent	No solvent	DW	PB (0.1 M, pH 7)	NaCl (M)		
				0.1	0.3	0.6
HEMA:	5:0	2:3	2:3	3:2	2:3	2:3
solvent (v/v)						
Solvent	SnCl ₄ (M)		1.5:3.5	1.5:3.5*	1.5:3.5 ^a	1.5:3.5 ^b
	0.02	0.06				
HEMA:	2:3	2:3				
solvent (v/v)						

Total reaction medium was 5 ml (except the one marked with asterisk which is 4.5 ml). EGDMA was added to samples marked with (a) and (b) (0.5 and 1.0%). UV duration: 1 h, temperature: ambient. DW: distilled water, PB: phosphate buffer, AIBN 0.2% (w/v).

Fluorescein (λ_{ex} : 489.6 nm, λ_{em} : 512 nm) solution (175 ml, 40 mM) was put into the upper one. Phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) was passed through lower chamber (175 ml capacity) at a rate of 30 ml h⁻¹ for 24 h. Samples were collected every 30 min and analyzed by spectrofluorimetry (Shimadzu Model RF-5000, Japan). Membrane permeabilities (P) were calculated by a $\ln(M_t/M_0)$ vs At/Vl graph based on Eq. (2).

$$\ln(M_t/M_0) = PA t/Vl, \quad (2)$$

where P is permeability (cm² s⁻¹), M_t and M_0 are the permeant concentration at times t and t_0 (s), A is the membrane surface area (cm²), V is the upper chamber volume (cm³), and l is the membrane thickness (cm).

Mechanical properties of the membranes. Mechanical properties of the membranes were studied in wet state with a Lloyd Instruments Materials Testing Machine (UK). Membranes were cut in rectangular shapes (2 × 5 cm) and major mechanical properties (tensile strength, Young's modulus, and toughness) were determined.

Preparation of AChE and ChO immobilized membranes.

Entrapment. A membrane was cut as a disk of 1.2 cm in diameter and dried at 50°C for 1 h and then moistened with 20 μ l phosphate buffer (PB). Enzyme solutions (at different ChO/AChE ratios) were placed on the membrane surface and adsorption of enzymes on the membrane was achieved at 4°C in 1 h. The membrane surface was then covered with a polymerization solution (40 μ l) and polymerization was carried out as explained above.

Ionic-covalent hybrid immobilization. The membranes were first activated with Cibacron Blue. A wet membrane disk (*c.* 90 mg) was placed in a Cibacron Blue F36A solution (1 ml, 2 mg l⁻¹) and the medium was stirred. NaCl solution (20 %, 100 μ l) was added and the solution was incubated for 30 min at room temperature. Then, NaOH (5 M, 50 μ l) was added and incubated for 3 days while shaking gently. The membranes were then drained, washed with distilled water, NaCl (1 M), urea (5 M), and finally with distilled water to remove unbound dye.

The dye-loaded membranes were then activated by epichlorohydrin or amino-hexylglutaraldehyde.

For epichlorohydrin activation, a single wet membrane was put in a solution of distilled water (1 ml), NaOH (4.3 ml, 2 M), and epichlorohydrin (0.1 ml) and shaken at 40°C for 2 h. Unreacted epichlorohydrin was washed off with 30% acetone and then with distilled water. Ionic-covalent hybrid bi-enzyme immobilization scheme is presented in Fig. 1.

Activation of pHEMA membrane by glutaraldehyde is achieved after several reaction steps at room temperature. The membrane was first brought in contact with NaIO₄ (1 ml, 0.2 M) and gently shaken for 2 h. Oxidized pHEMA membrane was then placed in a hexadamine solution (1 ml, 2.0 M, pH 5.0) and gently shaken for

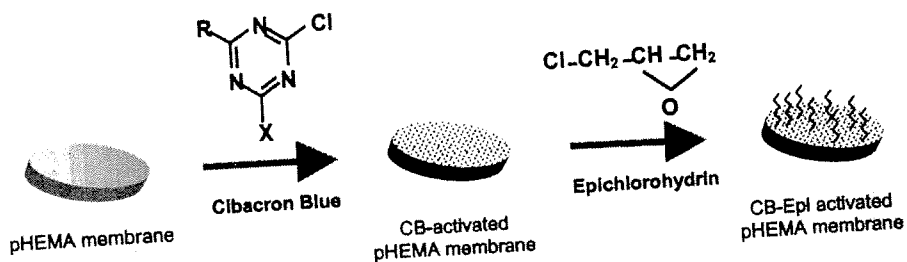


Figure 1. Ionic-covalent activation of pHEMA membrane (see text for details).

6 h. The membrane was washed with 50 ml PB (pH 8.5), placed in a glutaraldehyde solution (1 ml, 2.5%) and mixed for 10 min. Unreacted glutaraldehyde was removed by washing with 100 ml PB.

For enzyme coupling, AChE and ChO solutions were prepared separately in borate buffer (0.2 M, pH 9.0) and phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0), respectively, at a concentration of 250 U ml^{-1} . Activated membranes were kept in contact with these enzyme solutions for 10 and 4 h for AChE and ChO, respectively, while shaking gently.

Determination of immobilized enzyme content.

Entrapped enzymes. The entrapment efficiency was calculated through mass balance by subtraction of the protein determined in the wash solution after completion of immobilization from the total input protein. Protein determination in the wash was carried out by Lowry [20].

Ionic-covalent hybrid immobilized enzymes. A two-step procedure was applied for the ionic-covalent hybrid immobilized enzymes. First, the enzyme-immobilized membranes (diameter 1.2 cm) were placed in a 1-M NaCl solution and gently shaken for 3 h. Ionically-immobilized ChO was thus removed from the membrane and ChO determination was carried out according to Lowry [20].

For the covalently-bound AChE, protein determination was made by amino group determination. The enzyme was first cleaved to its amino acids by acid hydrolysis. For this purpose, membranes were washed with an acetone-water solution with increasing acetone content (from 0 to 100%). They were then dried under vacuum for 2 days. Dried membranes were placed in tubes containing HCl (6 M, 1 ml) and the tubes were evacuated and their necks heat-sealed. After hydrolysis (110°C, 24 h) the tubes were cooled and NaOH (6 M, 1 ml) was added for neutralization.

Amino acid solution (250 μl), sodium bicarbonate buffer (0.5 M, pH 8.5, 250 μl), and aqueous trinitrobenzenesulfonate (TNBS, 0.1%, 250 μl) were mixed and incubated at 40°C for 2 h. After the incubation, sodium dodecyl sulfate (SDS, 10%, 250 μl) and HCl (1 M, 125 μl) were added and the UV absorbance was measured at 335 nm.

Measurement of enzyme activity. Activity measurements of free ChO, free bi-enzyme and immobilized bi-enzyme systems were realized in an oxygen electrode unit (Helmut Saur, Germany). Oxygen depletion in the medium due to AChE-ChO activity was determined using ACh as substrate. The buffer was aerated for 30 min before the measurements.

ACh was added at different concentrations (2.5 μ l, 0.1–10 mM) with a Hamilton syringe from the sample injection port and the change in signal was recorded with a chart recorder to yield a mV vs time plot. Reaction rates were determined from the initial stages of the curve. V_{\max} (mV s⁻¹) and K_m (mM) values were calculated by constructing Eadie–Hoffstee plots.

Characterization of immobilized bi-enzyme system.

Effect of temperature. The effect of temperature on biosensor response was evaluated between 25 and 40°C by using PB (0.1 M, pH 7.0) as the working solution. The temperature range for proper measurement, as well as the best working temperature, was determined.

Effect of buffer type and pH. A pH range of 7.0–10.0 was studied to determine the optimum pH for the activity of immobilized bi-enzyme system under different conditions. For that purpose, phosphate (pH 7.0–8.0), glycine (pH 8.0–9.0), and borate (pH 9.0–10.0) buffers were used.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the membranes

Determination of water content. It can be seen in Table 2 that the pHEMA membrane prepared from undiluted monomer had the lowest water content of

Table 2.
Physical properties of different pHEMA membranes

Solvent	No solvent	DW	PB		NaCl			SnCl ₄		
			(0.1 M, pH 7)		0.1 M	0.3 M	0.6 M	0.06 M	0.06 M ^a	
HEMA:	5:0	2:3	3:2	2:3	2:3	2:3	2:3	1.5:3.5	1.5:3.5	
solvent (v/v)										
Thickness	355.6	447.5	398.7	542.5	413.7	523.7	544.9	471.2	353.7	263.9
(μ m)	± 7.6	± 17.1	± 8.5	± 12.5	± 7.5	± 11.1	± 9.3	± 8.5	± 4.8	± 4.7
Water content	40.7	54.3	42.9	65.1	58.7	63.9	65.9	60.5	—	—
(%, w/w)	± 0.6	± 2.2	± 2.0	± 1.7	± 1.9	± 0.8	± 0.4	± 1.5		
Permeability	—	2.78	1.57	5.67	4.33	5.83	—	8.93	9.17	10.47
(cm ² s ⁻¹)($\times 10^3$)										
Permeation	—	0.536	0.269	0.825	0.828	0.876	—	1.464	1.884	2.820
Rate (μ g h ⁻¹)										

^a 10% less medium was used than the others for membrane preparation.

all (c. 40%). The membrane prepared using the highest monomer:water ratio (HEMA:PB 3:2) had a slightly higher water content (c. 43%) compared to the undiluted one. However, when the medium composition was changed to HEMA:PB 2:3, the water content values increased drastically (c. 65%).

In addition, it was observed that increasing the salt concentration in the polymer preparation medium gave rise to higher water contents (Table 2). This is best observed with the increase in water content from 58 (w/w) to 66% (w/w) upon an increase in NaCl concentration from 0.1 to 0.6 M. A more substantial change is observed with SnCl₄ which at almost ten-fold lower salt concentration than NaCl solution yielded comparative water contents. This indicates that the ionic strength is more influential on the water content than the salt concentration.

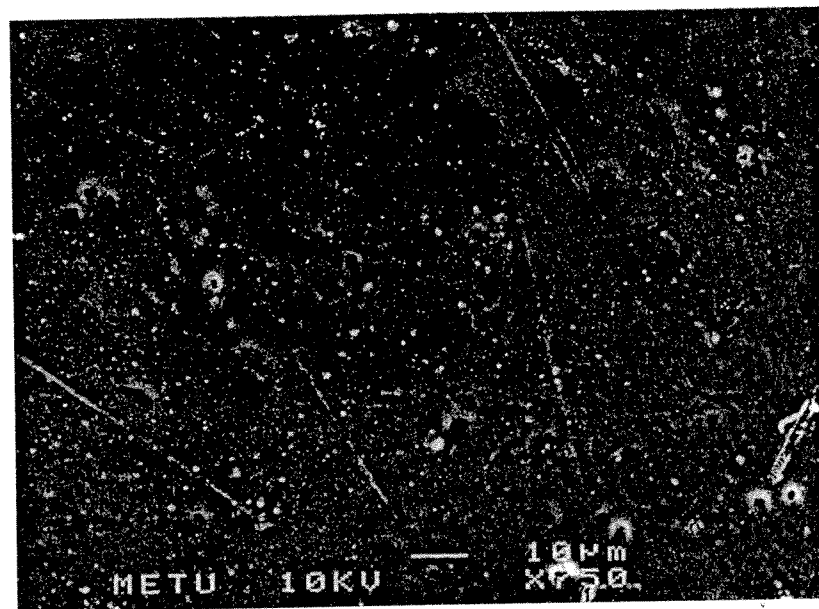
Hydrophilic matrices are preferred in enzyme immobilization since the substrate and analyte can not approach the enzyme in hydrophobic matrices. A hydrophilic environment is also necessary for maintenance of the activity of the enzyme since the enzymes show their activity only in specific conformations and these conformations are maintained by weak forces such as H-bonding, van der Waals, and hydrophobic interactions.

Evaluation of membrane porosity by scanning electron microscopy (SEM).

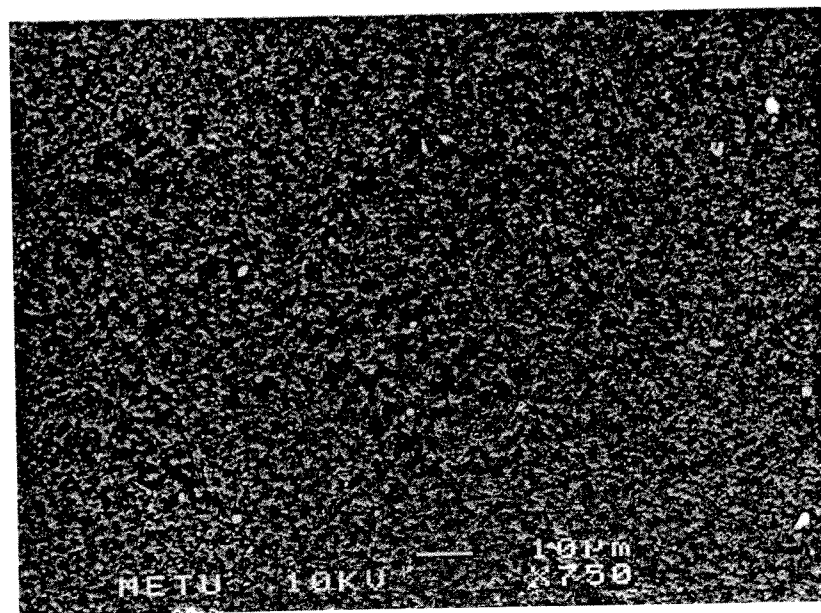
While no porosity can be seen in the membrane prepared in distilled water (Fig. 2a), the porosity of the membranes prepared in NaCl solutions increased with increasing salt concentration (Fig. 2b-d). It can be concluded from these results that salt concentration has positively affected the porosity. Salts create a water environment around themselves because of hydration which prevents polymerization within that volume and this causes pores to form in the membrane. Thus, when the salt concentration is increased, the permeability is also increased. In that, this method is quite dissimilar to approaches where a high or low molecular weight component or a crystal of a soluble salt is leached out of the membrane [21-23], but resembles ionotropic membrane formation [24].

Determination of permeability. Permeability of the membranes is very important especially in cases where enzymes are entrapped in them since the main difficulty associated with entrapped enzymes is the restriction imposed on the substrate during diffusion through the membrane towards the enzyme. Studying the parameters influencing the permeability and the measurement of permeability are, therefore, very important in designing enzyme-loaded membranes for biosensor or other biocatalytic uses.

As can be seen from Fig. 3 and Table 2, membranes prepared in SnCl₄ solution had the highest permeability towards fluorescein. Phosphate buffer (PB) and 0.3 M NaCl added pHEMA membranes follow these membranes in permeability. It can be observed that, as the salt concentration decreased, the permeability also decreased, as did the water content and porosity, and minimum permeability was measured with the salt-free medium (HEMA:DW).

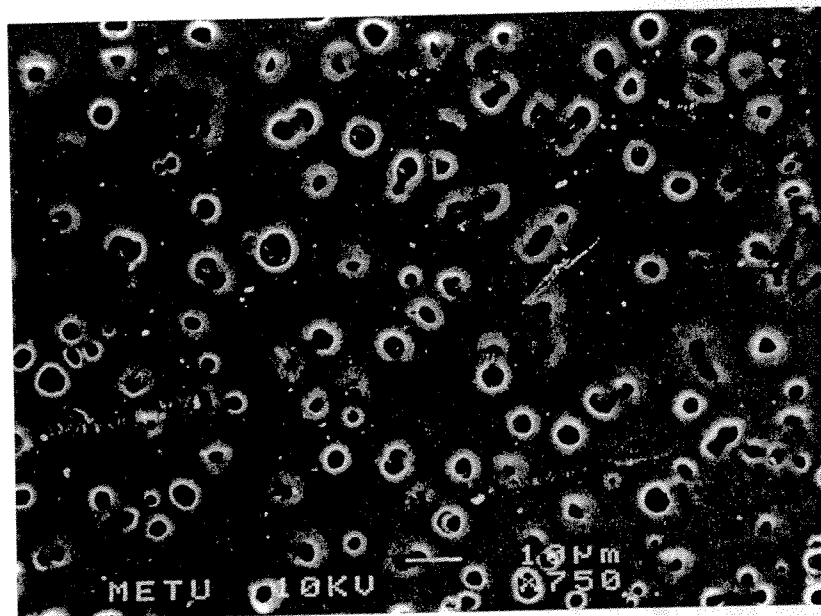


(a)

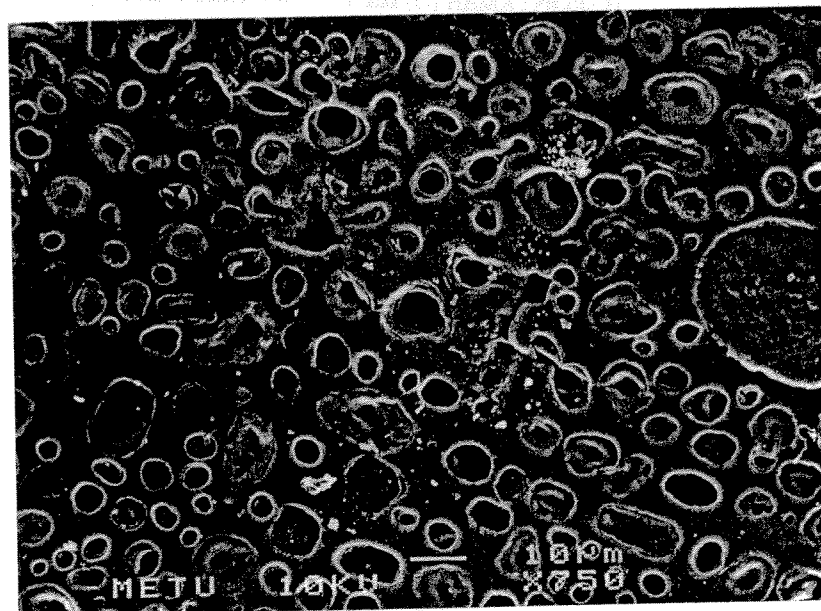


(b)

Figure 2. SEM micrograph of membrane prepared with: (a) distilled water; (b) 0.1 M NaCl; (c) 0.3 M NaCl; and (d) 0.6 M NaCl.



(c)



(d)

Figure 2. (Continued).

0.3 M

HEMA content of the membrane preparation medium adversely and significantly affected the permeability. For example, when the HEMA : PB ratio was increased from 2 : 3 to 3 : 2 (v/v), permeability decreased by 3-folds (Table 2).

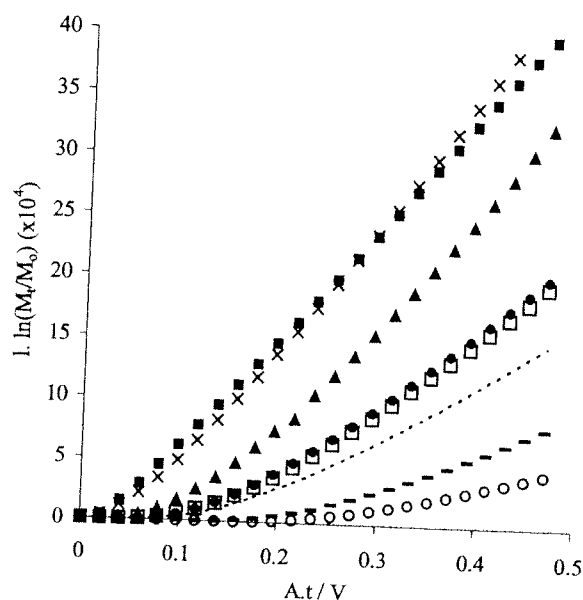


Figure 3. Permeability of the membranes: (---) HEMA:NaCl (0.1 M) (2:3); (●) HEMA:NaCl (0.3 M) (2:3); (◆) HEMA:SnCl₄ (0.03 M) (2:3); (■) HEMA:SnCl₄ (0.06 M) (1.5:3.5); (×) HEMA:SnCl₄ (0.06 M) (1.5:3.5) (10% less membrane solution was used); (▲) HEMA:DW (2:3); (□) HEMA:PB (2:3), and (○) HEMA:PB (3:2).

Membrane thickness is another important criterion which influences the transport of the analyte across the membrane. As stated in Fick's first law of diffusion in one dimension, the flux is inversely proportional with the diffusion path [25]. In the present case, the permeability values did not change with decreasing thickness, but the permeation rates were significantly altered (compare SnCl₄ (0.06 M) with SnCl₄ (0.06 M)* in Table 2) where the main difference between the two cases was the thickness of the membranes used.

Mechanical properties of the membranes. Mechanical properties of membranes are important especially for their handling while in use as an enzyme carrier in the biosensor. The membrane should be elastic to a certain degree since it is needed to be stretched to cover the tip of an oxygen electrode and it should not be ruptured, deform, or lose its shape through creep while in this stretched state.

One of the parameters that has a significant degree of influence on the mechanical properties of the membranes appears to be the HEMA content of the polymerization solution. It is observed that decreasing the HEMA content led to an increase in elasticity at the expense of strength (Table 3). For example, the membrane prepared in the HEMA medium (with no aqueous component) had an elastic modulus of 0.192 N mm⁻¹, and this decreased to 0.154 N mm⁻¹ when an aqueous component was added at 3:2 HEMA:SnCl₄ solution (0.06 M) (v/v) ratio. It further decreased to 0.065 N mm⁻¹ at a 2:3 ratio and to 0.040 N mm⁻¹ at a 1.5:3.5 ratio (Table 3).

Table 3.
Mechanical properties of pHEMA membranes prepared in different polymerization media

Aqueous component of the medium	HEMA: solvent (v:v)	Ultimate stress (N mm ⁻²)	Strain (l - l ₀)/l ₀	Toughness (N mm)	Modulus of elasticity (N mm ⁻¹)
—	5:0	0.36 ± 0.02	0.41 ± 0.02	50.13 ± 6.93	0.192 ± 0.02
Distilled water	2:3	0.22 ± 0.02	2.01 ± 0.39	68.65 ± 13.76	0.071 ± 0.01
SnCl ₄ (0.06 M)	3:2	0.30 ± 0.02	1.39 ± 0.16	85.84 ± 8.61	0.154 ± 0.02
	2:3	0.18 ± 0.02	2.23 ± 0.27	74.09 ± 10.40	0.065 ± 0.01
	1.5:3.5	0.15 ± 0.03	1.87 ± 0.09	39.65 ± 8.24	0.040 ± 0.01
SnCl ₄ (0.06 M) + EGDMA (0.5%, v/v)	1.5:3.5	0.18 ± 0.02	2.21 ± 0.16	52.34 ± 4.81	0.044 ± 0.00
SnCl ₄ (0.06 M) + EGDMA (1%, v/v)	1.5:3.5	0.20 ± 0.02	2.40 ± 0.22	58.92 ± 8.96	0.043 ± 0.00

Ultimate stress values (N mm⁻²) (or ultimate tensile strength) decreased from 0.36 to 0.15 with decreasing the HEMA to aqueous solution ratio (v/v) from 5:0 to 1.5:3.5.

Strain values, on the other hand, increased from 0.41 to 2.23 with decreasing HEMA content and a maximum was reached at 2:3 HEMA:aqueous solution (v/v) ratio. At a lower HEMA content, this value decreased to 1.87, but this result was probably partly due to the low thickness of the membrane prepared with 1.5:3.5 (HEMA:aqueous solution, v/v) ratio and also partly due to composition.

Addition of EGDMA increased both the modulus of elasticity and the strength of the membranes as expected since EGDMA acted as cross-linker and led to a more rigid membrane.

Finally, the membrane prepared with the addition of 0.06 M SnCl₄ solution at a HEMA:aqueous solution ratio of 1.5:3.5 was chosen for further studies because of its high permeability and superior mechanical properties.

Immobilized enzyme content

Dual immobilization method. The dual ionic-covalent approach was preferred over pure ionic or covalent immobilizations because it was seen that when CB was used alone only ChO was successfully immobilized while covalent immobilization gave fruitful results only with AChE (data not shown). In the literature it was reported that Cibacron Blue interacted specifically with enzymes that associate with nucleotide cofactors (e.g. oxidoreductases and transferases). This explains the successful immobilization of ChO, which contains flavin adenine dinucleotide (FAD), to this dye [26].

The immobilized ChO amount was found to be 29.82 ± 2.19 μg (26.37 μg cm⁻²) with the CB-Epi membranes while it was 4.04 ± 0.52 μg (3.57 μg cm⁻²) for CB-Glu membranes. Aminohexyl-glutaraldehyde activation involves several steps including periodate oxidation, and hexadamine and glutaraldehyde coupling. These steps could be harmful for the dye attached to the surface and, therefore, affect

MA:NaCl
(1.5:3.5);
EMA:DW

transport
fusion in
[25]. In
thickness,
M) with
ases was

mbranes
er in the
eeded to
uptured,

mechanical
rization
rease in
repared
ulus of
nponent
reased
ble 3).

immobilized ChO amount. In addition, long chains of aminohexyl-glutaraldehyde might prevent the attachment of ChO to the dye.

AChE immobilized on CB-Glu membranes, on the other hand, was superior to that of CB-Epi membranes. $30.72 \pm 2.79 \mu\text{g}$ ($27.16 \mu\text{g cm}^{-2}$) AChE was immobilized on the CB-Glu activated membranes while this was $6.03 \pm 0.49 \mu\text{g}$ ($5.33 \mu\text{g cm}^{-2}$) for CB-Epi membranes. It was, however, seen that the CB-Epi membranes had enzyme activity while CB-Glu membranes did not. These results indicate that ChO is the key enzyme in the bi-enzyme system because ChO acts as the rate limiting step due to its low specific activity. Therefore, ChO amount is an important determinant on the sensor performance.

Entrapment. With the membranes in which enzymes were immobilized via entrapment, no protein could be detected in the wash solution using the Lowry method [20] and, therefore, it was deduced that all the enzymes were entrapped in the membrane; in other words, immobilization efficiency was 100%.

Effect of immobilization on enzyme activity

In order to study the effect of immobilization of enzymes on their activity, the apparent K_m and V_{max} values of soluble and immobilized bi-enzyme system were compared.

It was seen that apparent K_m of the two soluble enzymes combined was the lowest (0.880 mM). As expected, K_m values were higher for the immobilized enzymes: 1.869 mM for the entrapped bi-enzyme system and 0.953 mM for the CB-Epi immobilized bi-enzyme system. There was practically no increase in K_m (1.08-fold) for the bi-enzyme system upon ionic-covalent immobilization on the surface but there was a 2.12-fold increase upon entrapment.

For the immobilized enzymes, K_m is strongly dependent on diffusional resistance. When the enzymes are immobilized on the surface, the mass transfer resistance is limited to the diffusion within the boundary layer at the membrane surface. For the entrapped enzymes, however, there is an additional resistance to mass transfer as a result of diffusion through the membrane bulk leading to the higher K_m values of entrapped enzymes.

Specific activity ($\text{mV s}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{ChO}$) of the free enzyme system was found to be 0.306 while it was 0.069 (4.43-fold decrease) for entrapped and 0.198 (1.54-fold decrease) for CB-Epi immobilized enzymes. The decrease in the specific activity is probably due to the deactivation of the enzymes during immobilization.

Immobilized enzyme activity is also affected by the immobilization conditions. During entrapment, enzymes were exposed to UV light and this could affect enzyme structure and, therefore, change the specific activity values. The polymerization initiator could also affect the enzyme activity because it is a highly reactive compound and could inactivate the enzyme through interaction with its active site or by disturbing its conformation. In covalent immobilization, on the other hand,

the conformations of the enzymes could be altered and they could also be rendered inactive through binding to the active site.

Characterization of immobilized bi-enzyme system

Effect of buffer type and pH. The constructed immobilized system consists of ChO and AChE and the two enzymes have to work together for an efficient biosensor. For this reason, activity studies in different buffers were not carried out independently for each enzyme.

Apparent K_m and V_{max} values obtained at different buffer and pH conditions are given in Table 4. It is seen that the response of the entrapped bi-enzyme system, as measured with the oxygen electrode system, increased by increasing the pH from 7.0 to 9.0 (using glycine and phosphate buffers), but a decrease was observed at pH 10.0 (with borate buffer). The best results were obtained with glycine buffer.

The CB-Epi-immobilized bi-enzyme system was adversely affected by the pH of the buffer and no reliable results could be obtained at pHs higher than 8.0 (no data given). Therefore, the membrane was studied only in phosphate buffer at pH 7.0.

Enzymes have optimum pH values at which they show maximum activity. Free AChE and ChO have their optimum activity at pH 7.0 and 8.0 (7.5–8.5), respectively [27]. Most enzyme carriers possess buffer properties to a certain degree or interact with the enzyme so pH dependence of immobilized enzymes differs from those of the free enzymes and, therefore, a shift in pH optima is seen upon immobilization. Immobilization of the enzyme can cause other changes in the local microenvironment of the active centre of the enzyme, e.g. variations in ionic strength, electrostatic interactions, etc. compounding the effect of immobilization [28, 29]. In the present case, the interaction between the polar groups of HEMA and functional groups of the enzyme might be the major cause for the shift in pH optima.

Although high reaction rates and high responses appear to be obtained at high pHs, other factors must also be considered when pesticide detection is concerned. One of these factors is the stability of the analyte at the test conditions. pH 7.0 was chosen by several researchers in anti-cholinesterase detection [1, 3, 10, 12].

Table 4.

Apparent K_m and V_{max} values of entrapped bi-enzyme system under different buffer and pH conditions

Buffer type and pH	$K_{m,app}$ (mM)	$V_{max,app}$ (mV s ⁻¹)
Phosphate buffer	pH 7.0	1.869
	pH 7.5	0.977
	pH 8.0	0.764
Glycine buffer	pH 8.0	0.464
	pH 8.5	0.466
	pH 9.0	0.366
Borate buffer	pH 9.0	0.500
	pH 10.0	1.294

Table 5.

The effect of temperature on the apparent K_m and V_{max} values for entrapped and CB-Epi immobilized bi-enzyme system

Temperature (°C)	Entrapped bi-enzyme system		CB-Epi immobilized bi-enzyme system	
	$K_{m,app}$ (mM)	$V_{max,app}$ ($\times 10^4$) (O ₂ consumed, ppm s ⁻¹)	$K_{m,app}$ (mM)	$V_{max,app}$ ($\times 10^3$) (O ₂ consumed, ppm s ⁻¹)
25	1.906	49.21	1.886	56.35
30	1.856	59.32	0.953	90.56
35	1.495	91.04	0.883	98.65
40	1.271	116.26	0.763	104.07

Most carbamates, including aldicarb, are hydrolyzed at high pH and, therefore, to preserve the analyte in an intact state pH 7.0 was used. On the other hand, some inhibitors are converted to their active form upon protonation. For example, Evtugyn and his coworkers [28] showed that secondary amines inhibit cholinesterase after preliminary protonation. They observed maximum inhibition in weakly acidic media (pH 6.0–7.0). This, however, is not the case for aldicarb.

Effect of temperature. Temperature affects the immobilized bi-enzyme system in three ways. Enzyme activity increases as the temperature increases. The increase in temperature, however, induces denaturation of the enzyme. Finally, in the case of oxidases, the temperature affects the oxygen solubility in the medium (e.g. 8.11 ppm at 25°C and 7.02 ppm at 35°C). This is a very important parameter because oxidases need oxygen for the reaction.

The results show that for both entrapped and CB-Epi-immobilized bi-enzyme systems, an increase of temperature from 25 to 40°C leads to a decrease of the K_m values and an increase of V_{max} (Table 5), indicating that a faster and higher response can be achieved at higher temperatures in this given range.

The results were similar to those of Rouillon *et al.* [30], but differ from those of several other researchers who reported maximum activities at 30–35°C [5, 31], 30°C [32], and 25–30°C [33].

CONCLUSIONS

This work showed that membranes prepared by the photopolymerization of HEMA could be a good immobilization support for AChE and ChO in biosensor construction. pHEMA membranes could be easily fabricated and tailored according to the desired mechanical and physical needs. Both types of immobilization, entrapment, and CB-Epi were successful. Immobilization of enzymes via CB-Epi activation offers an easy and mild method with better enzyme kinetics. Also, by this technique, immobilization of the rate-limiting enzyme ChO, was achieved with a very low activity loss enabling efficient biosensor construction.

Acknowledgements

Authors wish to acknowledge the grant from the Scientific and Technical Research Council of Turkey (TUBITAK TOGTAG TARP-2191) and from METU (AFP-99.06.02.02) and the assistantship (to FNK) from METU Graduate School of Natural and Applied Sciences. Authors also wish to thank Prof. N. Hasirci (METJ) for the mechanical analyses of the samples.

REFERENCES

1. S. Fennouh, V. Casimiri and C. Burstein, *Biosens. Bioelectron.* **12** (2), 97 (1997).
2. P. Skladal, G. S. Nunes, H. Yamanaka and M. L. Ribeiro, *Electroanalysis* **9** (14), 1083 (1997).
3. G. S. Nunes, P. Skladal, H. Yamanaka and D. Barcelo, *Anal. Chim. Acta* **362**, 59 (1998).
4. T. T. Bachmann, B. Leca, F. Vilatte, J.-L. Marty, D. Fournier and R. D. Schmid, *Biosens. Bioelectron.* **15**, 193 (2000).
5. L. Doretto, D. Ferrara, S. Lora, F. Schiavon and F. M. Veronese, *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 279 (2000).
6. P. C. Pandey, S. Upadhyay, H. C. Pathak, C. M. D. Pandey and I. Tiwari, *Sens. Actuators B* **62**, 109 (2000).
7. A. Cagnini, I. Palchetti, I. Lioni, M. Mascini and A. P. F. Turner, *Sens. Actuators B* **24-25**, 85 (1995).
8. I. Palchetti, A. Cagnini, M. Del Carlo, C. Coppi, M. Mascini and A. P. F. Turner, *Anal. Chim. Acta* **337**, 315 (1997).
9. L. Campanella, S. De Luca, M. P. Sammartino and M. Tomassetti, *Anal. Chim. Acta* **385**, 59 (1999).
10. A. Cremisini, S. Di Sario, J. Mela, R. Pilloton and G. Palleschi, *Anal. Chim. Acta* **311**, 273 (1995).
11. M. P. Xavier, B. Vallejo, M. D. Marazuela, M. C. Moreno-Bondi, F. Baldini and A. Falai, *Biosens. Bioelectron.* **14**, 895 (2000).
12. P. Skladal, M. Fiala and J. Krejci, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **65**, 139 (1996).
13. O. V. Fedosseva, H. Uchida, T. Katsube, Y. Ishimaru and T. Iida, *Sens. Actuators B* **65**, 55 (2000).
14. A. N. Ivanov, G. A. Evtugyn, R. E. Gyurcsanyi, K. Tothand and H. C. Budnikov, *Anal. Chim. Acta* **404**, 55 (2000).
15. M. Y. Arica and V. Hasirci, *Biomaterials* **14**, 803 (1993).
16. L. Doretto, D. Ferrara, P. Gattolin and S. Lora, *Biosens. Bioelectron.* **11** (4), 365 (1996).
17. B. Schulz, A. Riedel and P. U. Abel, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **7**, 85 (1999).
18. J. Turkova, in: *Bioaffinity Chromatography, Journal of Chromatography Library*, J. Turkova (Ed.), Vol. 55. Elsevier Science, Netherlands (1993).
19. M. Y. Arica and V. Hasirci, *Biomaterials* **8**, 489 (1987).
20. O. H. Lowry, N. J. Rosbrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
21. I. M. Wienk, R. M. Boom, M. A. M. Beerlage, A. M. W. Bulte, C. A. Smolders and H. Strathmann, *J. Memb. Sci.* **113**, 361 (1996).
22. J. Y. Lai, F. C. Lin, C. C. Wang and D. M. Wary, *J. Memb. Sci.* **118** (1), 49 (1996).
23. L. Y. Lafreniere, D. F. Talbot, T. Matsuura and S. Sourirajan, *Ind. Eng. Chem. Res.* **26**, 2385 (1987).
24. R. E. Kesting, in: *Synthetic Polymeric Membranes*, W. G. Sode (Ed.). Mc Graw Hill, New York (1971).

25. M. J. Eddowes, in: *Biosensors, A Practical Approach*, A. E. G. Cass (Ed.). IRL Press, Oxford (1990).
26. P. M. Boyer and J. T. Hsu, in: *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology*, A. Fiechter (Ed.), Vol. 49. Springer-Verlag, Berlin (1993).
27. K. Kano, K. Morikage, B. Uno, Y. Esata and M. Goto, *Anal. Chim. Acta* **299**, 69 (1994).
28. G. A. Evtugyn, H. C. Budnikov and E. B. Nikolskaya, *Talanta* **46**, 465 (1998).
29. P. Mulchandani, A. Mulchandani, I. Kaneva and W. Chen, *Biosens. Bioelectron* **14**, 77 (1999).
30. R. Rouillon, N. Mionetto and J.-L. Marty, *Anal. Chim. Acta* **268**, 347 (1992).
31. P. Skladal, *Anal. Chim. Acta* **269**, 281 (1992).
32. E. N. Navera, K. Sode, E. Tamiya and I. Karube, *Biosens. Bioelectron*. **6**, 675 (1991).
33. M. F. Leon-Gonzales and A. Townhend, *Anal. Chim. Acta* **236**, 267 (1990).