



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KALEM GRAFİT ELEKTROTLARIN (PGE) PRATİK
VE EKONOMİK ENZİM TEMELİ BİYOSENSÖRLER
HAZIRLANMASINDA SENSÖR OLARAK
KULLANILMA POTANSİYELLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Zeynep ÇELİK

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Erhan DİNÇKAYA

Biyokimya Anabilim Dalı

**Bilim Dalı Kodu : 405.05.01
Sunuş Tarihi : 05.06.2014**

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KALEM GRAFİT ELEKTROTLARIN (PGE) PRATİK
VE EKONOMİK ENZİM TEMELLİ
BİYOSENSÖRLER HAZIRLANMASINDA SENSÖR
OLARAK KULLANILMA POTANSİYELLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Zeynep ÇELİK

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 405.05.01

Sunuş Tarihi :05.06.2014

Bornova – İZMİR

2014

Zeynep ÇELİK tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Kalem Grafit Elektrotların (PGE) Pratik ve Ekonomik Enzim Temelli Biyosensörler Hazırlanmasında Sensör Olarak Kullanılma Potansiyellerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 05.06.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof.Dr.Erhan DİNÇKAYA

Raportör Üye : Prof.Dr.Erol AKYILMAZ

Üye : Doç.Dr.Şenol ALPAT

İmza

.....
.....
.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Kalem Grafit Elektrotların (PGE) Pratik ve Ekonomik Enzim Temelli Biyosensörler Hazırlanmasında Sensör Olarak Kullanılma Potansiyellerinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

05 / 06 /2014

Zeynep ÇELİK

ÖZET**KALEM GRAFİT ELEKTROTLARIN (PGE) PRATİK ve
EKONOMİK ENZİM TEMELLİ BİYOSENSÖRLER
HAZIRLANMASINDA SENSÖR OLARAK KULLANILMA
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI****ÇELİK, Zeynep**

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA

Haziran 2014, 61 sayfa

Bu tezde, biyosensör teknolojisi için yeni ve özgün bir bakış açısı getirmek tasarlanan biyosensörler PGE kullanarak H_2O_2 için tasarlanmıştır. Bu çalışmada H_2O_2 tayini için PGE kullanılarak iki farklı biyosensör geliştirilmiştir. İlk olarak, katalaz jelatin ile glutaraldehid kullanılarak çapraz bağlanmış, kalem grafit elektrot yüzeyine sabitlenmiştir ve tasarlanan biyosensör H_2O_2 tayini için kullanılmıştır (PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit). İkinci olarak, farklı bir enzimatik biyosensör tasarlanmıştır. H_2O_2 tayini için ikinci tasarlanan biyosensör nafyon, katalaz ve glutaraldehit kullanılarak hazırlanmıştır. Geliştirilen biyosensörler ile H_2O_2 ölçümleri -0.7 V 'ta amperometrik yöntem ile yapılmıştır. Biyosensörler üzerinde ölçümler amperometrik yöntem kullanılarak oksijen konsantrasyonu ile orantılı akım değerlerindeki azalmanın belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan biyosensörün optimizasyon çalışmalarında öncelikle optimum jelatin miktarı, optimum nafyon yüzdesi, optimum katalaz konsantrasyonu, optimum glutaraldehitte bekleme süresi gibi parametreler çalışılmıştır. Çalışma koşullarının optimizasyonunda pH optimizasyonu ve sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra karakterizasyon çalışmaları içinde doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik, depo kararlılığı ve örnek analizi gibi bazı parametreler belirlenmiştir.

Optimizasyon çalışmalarından PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör için katalaz konsantrasyonu, jelatin miktarı ve glutaraldehitte bekletme süresi sırasıyla 70.000 U/mL, 20 mg ve 3 dakika olarak tespit edilmiştir. Fosfat tamponu (100 mM, pH: 7,0) ve 30°C sıcaklığın optimum çalışma koşullarını sağladığı belirlenmiştir. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör için karakterizasyon çalışmalarında 20 μ M - 1400 μ M aralığında H₂O₂ için doğrusal sonuçların alındığı belirlenmiştir.

PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör için katalaz konsantrasyonu, nafyon yüzdesi ve glutaraldehitte bekletme süresi sırasıyla 70.000 U/mL, %1,5 ve 5 dk olarak belirlenmiştir. Fosfat tamponu (50 mM, pH: 7,0) ve 30°C sıcaklığın optimum çalışma koşullarını sağladığı belirlenmiştir. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör için karakterizasyon çalışmalarında 40 μ M - 2000 μ M aralığında H₂O₂ için doğrusal sonuçların alındığı belirlenmiştir. Hidrojen peroksitin belirlenmesi için geliştirilmiş biyosensörler ile ticari olarak temin edilebilen hidrojen peroksit ve süt örneklerinde örnek analizi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar kelimeler : Kalem grafit elektrot, nafyon, enzim, katalaz, H₂O₂, biyosensör

ABSTRACT**INVESTIGATION OF THE USEGE POTENTIAL OF PENCIL
GRAPHITE ELECTRODE (PGE) AS A SENSOR IN
PREPARATION OF PRACTICAL AND ECONOMICAL ENZYME
BASED BIOSENSOR****CELIK, Zeynep**

Master of Science Thesis, Biochemistry Department

Supervisor : Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA

June 2014, 61 pages

In this thesis, designed biosensors which bring a new and original perspective to biosensor technology intended for H_2O_2 by using PGE. In this study, two different biosensors were developed for the determination of H_2O_2 by using PGE. Firstly, catalase was crosslinked with gelatine by using glutaraldehyde and fixed on pencil graphite electrode and designed biosensor was used for the determination H_2O_2 (PGE/gelatine-catalase/glutaraldehyde). Secondly, a different enzymatic biosensor were designed. Second designed biosensor was prepared by using nafion, catalase and glutaraldehyde for the determination of H_2O_2 (PGE/nafion/catalase/glutaraldehyde). H_2O_2 measurements were done at -0,7 V with amperometric method by developed biosensor systems. The measurements on biosensors were carried out with the determination of decreasing current values proportional with oxygen concentration using amperometric method.

In the optimization studies of the biosensor firstly optimization of bioactive layer components such as optimum gelatine amount, optimum nafion rate, optimum catalase concentration, optimum glutaraldehyde duration time were carried out. Optimization of working conditions; optimum pH and optimum temperature were also investigated. Afterwards, in the characterization studies

some parameters such as linearity, reproducibility, storage stability and applicability in real-world examples were determined.

From the optimization studies, catalase concentration, gelatine amount and glutaraldehyde duration time were determined as 70.000 U/ml, 20 mg and 3 min. for the PGE/gelatine-catalase/glutaraldehyde modified biosensor. Phosphate buffer (100 mM; pH:7.0) and 30°C were established as providing the optimum working conditions. It was determined at the characterization studies on the PGE/gelatine-catalase/glutaraldehyde biosensor that linear results are obtained between the ranges of 20 μ M to 1400 μ M H_2O_2 concentration.

Catalase concentration, nafion rate and glutaraldehyde duration time were determined as 70.000 U/ml, 1.5% and 5 min. for the PGE/nafion/catalase/glutaraldehyde modified biosensor. Phosphate buffer (50 mM; pH 7.0) and 30°C were established as providing the optimum working conditions. It was determined at the characterization studies on the PGE/nafion/catalase/glutaraldehyde biosensor that linear results are obtained between the ranges of 40 μ M to 2000 μ M H_2O_2 concentration. Determination of H_2O_2 were carried out in commercially available hydrogen peroxide and milk samples by developed biosensor.

Key words : Pencil graphite electrode, nafion, catalase, enzyme, H_2O_2 , biosensor

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca maddi manevi her anlamda desteğini esirgemeyen, yol gösteren sorumluluk vererek gelişmemi sağlayan saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA'ya, kıymetli görüşlerinden faydalandığım Doktora öğrencisi araştırma görevlisi Sayın Çağrı ALTUĞ'a, Sayın Umut MENGÜLLÜOĞLU'a ve bu aşamaya gelmemde önemli katkıları olan tüm hocalarıma teşekkürü borç bilirim. Ayrıca lisansüstü eğitimime başlamamdaki en büyük desteğim olan ve bana her zaman inanan ailem başta olmak üzere Pınar ÖZ'e , Bilge HEKİMCİ'ye, Tuğçe ŞEKERCİLER'e, Gözde DENİZ'e ve nihayetinde Erhan CANBAY'a, bütün eğitim hayatım boyunca bana verdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2013 FEN 056 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	.vii
ABSTRACT	.ix
TEŞEKKÜR	.xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	.xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	.xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	.xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyosensörler	1
1.2. Biyoreseptör Moleküller	1
1.3. Başlıca Biyosensör Çeşitleri	3
1.3.1. Elektrokimya esaslı biyosensörler	3
1.3.2. Yarı iletken temelli biyosensörler	4
1.3.3. Optik temelli biyosensörler	4
1.3.4. Piezoelektrik temelli biyosensörler	4
1.3.5. Kalorimetri temelli biyosensörler	5

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.4. Biyoaktif Tabaka Bileşenleri	5
1.4.1. İmmobilizasyonda kullanılan enzim katalaz	5
1.4.2. Katalazın kullanım alanları	6
1.4.3. Jelatin	7
1.4.4. Glutaraldehit.....	8
1.4.5. Nafyon.....	9
1.5. Kalem Grafit Elektrotla Önceki Çalışmalar	10
2. MATERYAL VE METOD	12
2.1. Materyal	12
2.1.1. Cihaz ve diğer ekipmanlar	12
2.1.2. Kimyasallar	12
2.2. Yöntem.....	13
2.2.1. Geliştirilen biyosensörlerin çalışma ilkesi	13
2.2.2. PGE/jelatin/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün hazırlanması	13

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2.3. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin	
optimizasyon çalışmaları	14
2.2.4. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin	
karakterizasyon çalışmaları	16
2.2.5. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye	
biyosensörün hazırlanması	17
2.2.6. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye	
biyosensöre ilişkin optimizasyon çalışmaları.	18
2.2.7. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye	
biyosensöre ilişkin karakterizasyon çalışmaları.	20
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.	22
3.1. PGE/Jelatin-Katalaz/Glutaraldehit Modifiye Biyosensörün	
Optimizasyonuna İlişkin Bulgular.	22
3.1.1. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.	24
3.1.2. pH'nın biyosensör cevabı üzerine etkisi.	26
3.1.3. Tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi.	27

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.4. Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.	28
3.1.5. Biyoaktif tabakalandırma işlem sayısının biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	29
3.1.6. Glutaraldehitte bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	30
3.1.7. Sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkisi	31
3.2. PGE/Jelatin-Katalaz/Glutaraldehit Modifiye Biyosensörün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular	33
3.2.1. H ₂ O ₂ için doğrusal tayin aralığı	33
3.2.2. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirliği	35
3.2.3. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile alınan yanıtların tekrarlanabilirliğine ilişkin bulgular	35
3.2.4. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile örnek analizi.....	36

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.5. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye

biyosensörün depo kararlılığı37

3.3. PGE/Nafyon/Katalaz/Glutaraldehit Modifiye

Biyosensöre İlişkin Bulgular38

3.3.1. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi40

3.3.2. pH'nın biyosensör cevabı üzerine etkisi41

3.3.3. Tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabı

üzerine etkisi42

3.3.4. Optimum nafyon/katalaz/glutaraldehit biyoaktif

tabakalandırma işlemsayısının belirlenmesi43

3.3.5. Nafyon yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi44

3.3.6. Glutaraldehitte bekletme süresinin biyosensör

cevabı üzerine etkisi46

3.3.7. Sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkisi47

3.4. PGE/Nafyon/Katalaz/Glutaraldehit Modifiye Biyosensörün

Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular49

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.4.1. H ₂ O ₂ için doğrusal tayin aralığı	49
3.4.2. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirliği.....	50
3.4.3. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün tekrarlanabilirliği.....	51
3.4.4. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile örnek analizi	52
3.4.5. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün depo kararlılığı.....	53
4. GENEL DEĞERLENDİRME.....	54
KAYNAKLAR DİZİNİ	56
ÖZGEÇMİŞ	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1.Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi	1
1.2 Katalaz enziminin hem <i>b</i> hem <i>d</i> grupları.....	6
1.3.Jelatinin yapısı	8
1.4.Glutaraldehitin formülü	9
1.5.Nafyonun formülü	10
2.1. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye elektrotta ait immobilizasyon şeması	14
2.2.PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye elektrotta ait immobilizasyon şeması	18
3.1. PGE/jelatin/glutaraldehit ve PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye elektrotları kıyaslanması.	22
3.2. PGE yüzeyine biyoaktif tabakalandırma basamaklarına ilişkin impedimetrik diyagram.....	23
3.3. PGE yüzeyine biyoaktif tabakalandırmaya ait CV voltamogramları	24
3.4.PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin enzim miktarı optimizasyonu grafiği	25
3.5. Biyosensör cevabına pH'nın etkisi	26

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.6. Tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	27
3.7. Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi	28
3.8. Biyoaktif tabakalandırma işlem sayısının biyosensör cevabına etkisi	29
3.9. Glutaraldehitte bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi	31
3.10. Biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisi	32
3.11. 100 μ M - 1.8 mM H ₂ O ₂ konsantrasyon aralığındaki amperometrik ölçümler	33
3.12. PGE/Jelatin-katalaz/glutaraldehit biyosensörüne ait doğrusal tayin aralığı grafiği	34
3.13. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirliği	35
3.14 PGE/Jelatin-Katalaz/Glutaraldehit modifiye biyosensörün depo kararlılığı	37
3.15. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün immobilizasyon basamlarının impedimetrik diyagramları	39
3.16. PGE ve PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin CV voltamogramları	40

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.17. Katalaz miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi	41
3.18. pH'nın biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	42
3.19. Tampon konsantrasyonun biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	43
3.20. Optimum nafyon/katalaz/glutaraldehit tabakalandırma işlem sayısının belirlenmesi	44
3.21. Nafyon yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	45
3.22. Glutaraldehitte bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi	47
3.23. Sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	48
3.24. 40 μ M – 600 μ M H ₂ O ₂ konsantrasyon aralığındaki amperometrik ölçümler.....	49
3.25. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit biyosensörüne ilişkin doğrusal tayin aralığı grafiği.....	50
3.26. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirlik grafiği.....	51
3.27. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün depo kararlılığı	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik bulguları	36
3.2. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörle ticari olarak satılan oksijenli suya ait örnek analizi bulguları	36
3.3. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörle süte ait örnek analizi bulguları	37
3.4. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik bulguları	52
3.5. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ait örnek analizi bulguları	52

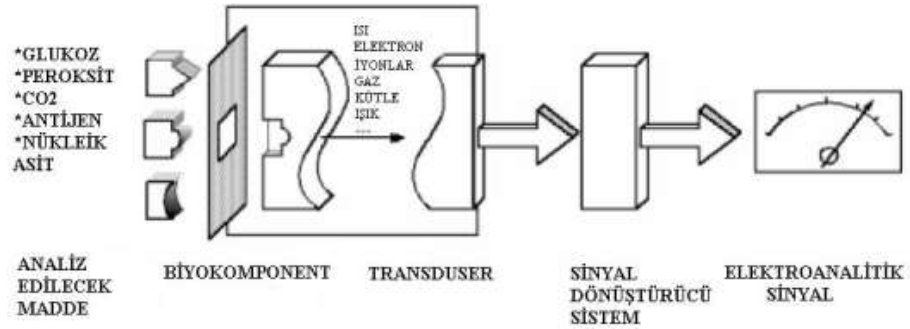
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CAT	Katalaz
CV	Döngüsel voltammogram
HMT	Hematoksilen
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
U	Ünit
PC	Parasetamol
PGE	Kalem Grafit Elektrot

1.GİRİŞ

1.1. Biyosensörler

Canlıların çevrelerindeki değişiklikleri algılama ve yanıt verme mekanizmaları, biyosensörlerin geliştirilmesinde temel oluşturmıştır (Arshak et al.,2008). Biyosensörler; sıklıkla biyolojik analizler için kullanılan bir çeşit özel sensörlerdir ve " International Union of Pure and Applied Chemistry " (IUPAC) tarafından, " kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar " olarak tanımlanmaktadır (Rasooly, 2005).



Şekil 1.1. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi (Newman et al., 2001).

Biyosensörlerin çoğu basit olarak; biyoreseptör olarak adlandırılan, hedef molekülün yakalandığı biyolojik bağlanma bölgesi bu bağlanma sonucu oluşan değişimi ileten iletici(transduser) ve sinyal dönüştürücü kısımlardan oluşur. Biyoreseptör olarak birçok biyomolekül (enzimler, antikorlar, mikroorganizmalar) kullanılabilir. Biyoreseptör ve dönüştürücünün tipi biyosensörün sınıfını belirlemektedir.

1.2. Biyoreseptör Moleküller

Biyoreseptör moleküller olarak, antikor, enzim, protein, nükleik asitler gibi biyolojik moleküller ya da hücre, doku ve mikroorganizmalar gibi canlı biyolojik sistemler kullanılabilir. Biyoreseptör olarak kullanılacak moleküllerin en önemli özelliği tespit edilmesi istenen hedef

moleküle karşı yüksek afinite ve seçicilik göstermeleridir (Rasooly, 2005). Biyomolekül olarak en çok kullanılan enzimler hedef moleküle karşı oldukça özgül olmasından dolayı tercih edilir (Chambers et al., 2008).

Enzimler kimyasal tepkimelere katıldıklarında proton, elektron, ışık ve ısı gibi birçok ölçülebilir reaksiyon ürünü meydana getirdiklerinden, biyoreseptör olarak sıklıkla kullanılan biyomoleküllerdir (Chambers et al., 2008). Özellikle birden fazla alt üniteye sahip olan allosterik enzimler, doğaları gereği biyoreseptör olarak yüksek potansiyele sahiptirler. Bu tip enzimlerin substratlarına olan ilgileri, aktif bölgeleri dışına bağlanacak efektör (modülatör) moleküller tarafından değiştirilebilir (O'Connell and Guilbault, 2001).

Antikorlar 1950'li yıllardan itibaren tanıda kullanılmaya başlanmış, yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip biyoreseptör moleküllerdir. Antikorlar tüm bir mikroorganizmayı tanıyabilecekleri gibi onlara ait toksinleri, pilileri, sporları, enzimleri hatta peptid parçalarını tanıyabilirler (Proske et al., 2005). Antikorlar ile tasarlanmış biyosensörlerin en önemli avantajı immunojen olmalarıdır. Bunun en önemli faydası, hedef molekülün saptama öncesinde saflaştırılmasına ihtiyaç duyulmamasıdır. (Chambers et al., 2008).

Biyoreseptör olarak kullanılan birçok biyolojik molekülün çıkış noktası mikroorganizmalardır. Mikroorganizmaların kendileri de biyoreseptör olarak kullanılabilirler . Çoęunlukla inorganik veya organik toksik kimyasal maddelerin tespitinde kullanılırlar ve diğer biyoreseptör moleküllere göre daha çok çeşitlilikle kimyasal yapı saptayabilirler. Genetik modifikasyonlara uyumlu olmaları, farklı pH ve farklı sıcaklıklarda işlev görebilmeleri mikroorganizmaları ideal biyoresept rlerden yapmaktadır (D'Souza 2001; Lei et al., 2006).

1.3. Başlıca Biyosensör Çeşitleri

1.3.1. Elektrokimya esaslı biyosensörler

Enzim temelli biyosensörlerin pek çoğunda elektrokimyasal esaslı ileticiler kullanılır. Bu ileticiler ile amperometri ve/veya potansiyometri ilkelerine göre ölçümler alınabildiğinden özellikle amperometride oksidoredüktaz sınıfı enzimler yaygın olarak kullanılır (Bartlett,1990).

1.3.1.1. Amperometrik biyosensörler

Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görür. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde yararlanır. İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark, ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir (Dinçkaya, 1999).

1.3.1.2. Potansiyometrik biyosensörler

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

1.3.2. Yarı iletken temelli biyosensörler

Temel sensör olarak metal oksit yarı iletken alan etki transistörlerini (MOSFET) ya da iyon duyar alan etki transistörlerini (ISFET) esas alan bu tür enzim sensörleri, enzim ile alan etki transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etki transistörleri (ENFET) olarak adlandırılırlar.

MOSFET'lerin, gazların ölçümüne uygun hale getirilmesiyle oluşan gaz duyar sensörlerde (GASFET) adsorblanan gaz moleküllerinin disosiyasyonu ve oluşan yükün oksit tabakasına transferi temel ilkeyi oluşturur. Bu durum tabanın dielektrik sabitini değiştirerek ve drain akımında bir modifikasyona yol açarak ölçüme imkan verir.

1.3.3. Optik temelli biyosensörler

Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekülün immobilize edilmesiyle hazırlanan ölçüm aygıtlarıdır.

Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alırlar. Sinyal, ışık yansıması, saçılımı ya da yayımı sonucu meydana gelir. Örneğin optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile hazırlanan optik esaslı enzim sensörleri temelde absorpsiyon, floresans, biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde işlev görürler.

1.3.4. Piezoelektrik temelli biyosensörler

Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki değişimleri belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır.

1.3.5. Kalorimetri temelli biyosensörler

Kalorimetri temelli enzim sensörleri, termal enzim sensörleri, enzim termistörleri ya da entalpimetrik enzim sensörleri gibi değişik isimlerle tanımlanırlar. Temel ilkeleri bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat konsantrasyonunu belirlemekten oluşur. Genellikle enzimatik reaksiyonların ekzotermik doğasından yararlanılır. Enzimatik reaksiyon sonucunda meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca varılır.

1.4. Biyoaktif Tabaka Bileşenleri

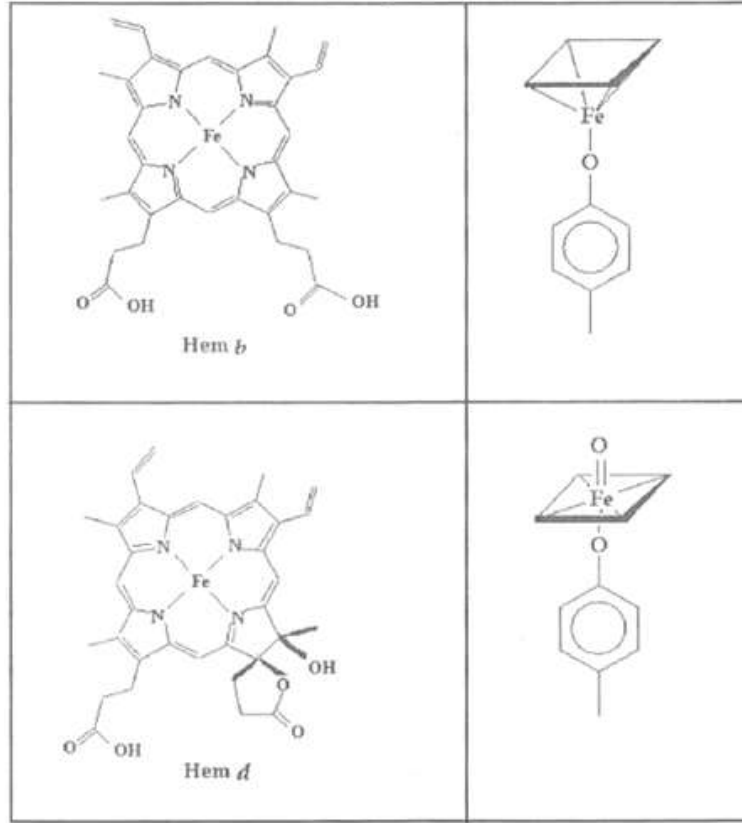
1.4.1. İmmobilizasyonda kullanılan enzim katalaz

Katalaz enzimi ($\text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O}_2$ oksidoredüktaz E.C.1.11.1.6) en yaygın olarak bilinen antioksidan enzimlerden biridir. Katalaz (CAT) ilk defa Sumner ve Dounce tarafından 1937 yılında sığır karaciğerinden izole edilmiştir (Sumner and Dounce, 1937) Bu enzim, yaygın olarak ökaryotlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Masters and Holmes, 1977). Katalaz (CAT), doğada özellikle bitkilerde de bolca bulunan katalaz enzimi H_2O_2 'yi indirgeyen veya parçalayan, peroksizomların ise yapısal bir bileşeni olan oksidaz enzimlerinden biridir (Higashi et al 1974; Halliwell et al., 1990). CAT kanda, kemik iliğinde, mukoz membranlarda, böbrek ve karaciğer de bulunur. Temel fonksiyonu bazı oksidazlar tarafından ortaya çıkan hidrojen peroksiti ortadan kaldırmaktır. Karaciğer ve böbrek dokularında aktivitesi yüksek olan enzimin bağ dokusundaki aktivitesi oldukça düşüktür (Karabulut vd., 2002)

CAT'ın temel fonksiyonu, moleküler oksijen mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, hidrojen peroksitin ve ROOH gibi bir peroksitleri gidererek, özellikle membranlarda oluşturabilecekleri geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 1997). Çünkü hidrojen peroksit, singlet oksijen ve hidroksil radikalının potansiyel kaynağıdır (Huang et al., 1983).

CAT, hidrojen peroksiti substrat olarak, hem elektron alıcısı hemde elektron vericisi olarak kullanmaktadır (Lanir and Schejder., 1975; Jones and Masters, 1976; Robertson, 2004).

Birçok in vivo ortamlarda peroksidaz aktivitesi olarak CAT tercih edilmektedir. Yüksek turnover sayısına sahiptir (Bergmeyer and Grabl, 1983).



Şekil 1.2. Katalaz enziminin hem *b* hem *d* grupları

1.4.2. Katalazın kullanım alanları

Katalaz, H_2O_2 'i suya ve oksijene parçalayan bir enzim olduğundan, H_2O_2 'in kullanıldığı ve aşırısının ortamdan uzaklaştırılmasının gerekli olduğu tüm proseslerde kullanılabilir. Ancak enzimin bu proses koşullarında aktivite gösterebilmesi gereklidir (Seriner, 2010).

1.4.2.1. Süt endüstrisinde kullanımı

Süt endüstrisinde H_2O_2 koruyucu madde olarak kullanılır. Ayrıca ütte doğal olarak bulunan ve antibakteriyel enzim olan laktoperoksidaz, aktivite gösterebilmek için H_2O_2 'e ihtiyaç duymaktadır. Ancak işlenmeden önce sütteki aşırı H_2O_2 'nin uzaklaştırılması gerekir. Bu işlemin yöntemlerinden biri serbest veya immobilize CAT kullanımıdır. H_2O_2 süte derişimi %0,002 olacak şekilde ilave edilir. 30°C'de 20 dk. muamele edildikten sonra katalaz enzimi 1000 L süte 20 ünite olacak şekilde eklenir. Böylece H_2O_2 'in fazlası parçalanırken , süt enzimleri ve yararlı bakteriler korunur (Seriner, 2010).

1.4.2.2. Oksidazlarla birlikte kullanımı

Oksidazların yer aldığı sistemlerde açığa çıkan H_2O_2 uzaklaştırılmak istendiğinde bu enzimler yanında CAT enzimi de kullanılır. Gıdaların konserve yapılması ve paketlenmesinde, yumurta, şarap gibi bazı gıdaların desakkarifikasyonunda ve glukonik asit üretiminde kullanılan glukoz oksidaz yanında ortamda CAT da bulunmalıdır (Seriner, 2010).

1.4.2.3. Endüstride kullanımı

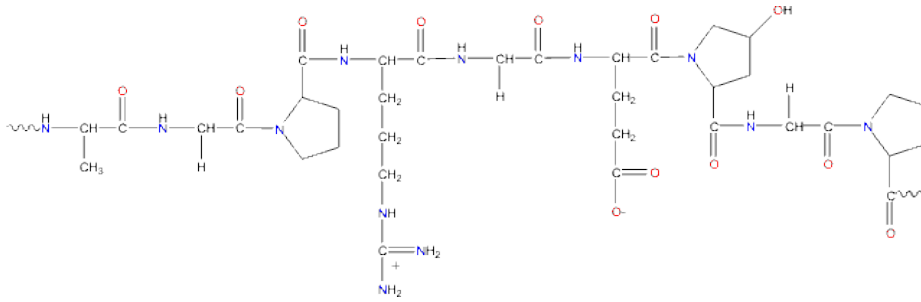
H_2O_2 reçine ve plastik üretiminde oksidasyon ve köpükleştirme amacı ile kullanılır. Sterilizasyon amaçlı kullanılabilir. H_2O_2 'in aşırısı katalaz ile muamaele edilerek parçalanabilir (Seriner, 2010).

1.4.3. Jelatin

Jelatin, sığır, domuz, koyun gibi hayvanların kemik, deri ve tendonlarındaki kollajenin hidroliziyle elde edilen bir proteindir. Jelatinin yapısında karakteristik olarak prolin, glisin ve hidroksiprolin aminoasitlerini çok bulunmaktadır. Yapısı genel olarak tekrarlanan glisin-X-Y triplet yapısını içerir ve genellikle X prolin, Y ise hidroksiprolindir. Bu aminoasitler, jelatinin üçlü bir heliks yapı oluşturmada ve jelleşme

özelliği kazanmasında etkilidirler. Jelatin, tamponda çözülüp ısıtıldıktan sonra oda sıcaklığına getirildiğinde jel kıvamını alır. Bu özelliğinden dolayı iyi ve kolay kullanılabilir bir immobilizasyon malzemesidir (Rose et al., 1987).

Jelatin eğer biyomalzeme olarak kullanılmak isteniyorsa çapraz bağlı olması şarttır. Son zamanlarda jelatin filminin çapraz bağları fiziksel olarak termal ısı ve ultraviyole ışınlar yardımıyla oluşturulmakta, kimyasal olarak ise formaldehit, glutaraldehit, suda çözünen karbodiimid, diepoksi bileşenleri ve diizosiyanatlar gibi çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak elde edilmektedir. Biyosensör çalışmalarında ise termal ve mekanik kararlılığının artırılması amacıyla immobilizasyonda genellikle çapraz bağlayıcı glutaraldehit ile birlikte kullanılır (Sezgintürk vd., 2005; Odacı vd., 2004; Espesito et al., 1998).



Şekil 1.3. Jelatinin yapısı

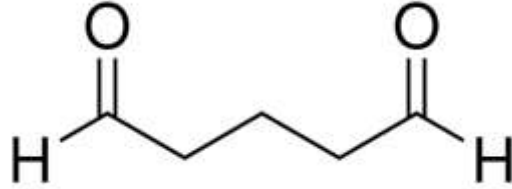
1.4.4. Glutaraldehit

Glutaraldehit tıpta özellikle sistoskop ,bronkoskop, endoskop gibi lensli aletlerin sterilizasyonunda sıkça kullanılan renksiz, sıvı bir dezenfektan ve sterilizasyon kimyasalıdır. Aynı zamanda elektron mikroskoplarında sabitleyici olarak da kullanılmaktadır (HSDB., 1996; Thomas et al., 1974).

Glutaraldehit özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan homo bifonksiyonel bir kimyasaldır. Homo bifonksiyonel maddeler, proteindeki lizin kalıntısının amino grupları gibi primer aminlerle seçici olarak etkileşime girerler. Suda ve benzen, alkol

gibi susuz ortamlarda kararlı ve çözünebilir olması nedeniyle kullanımları çok yaygındır (Kapoor, 1996).

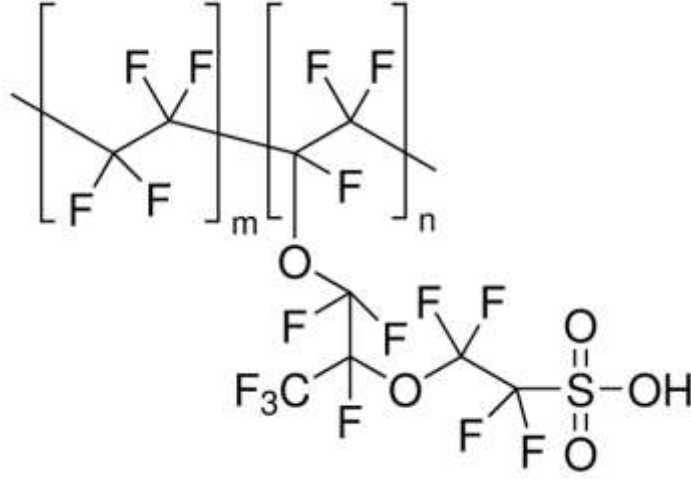
Glutaraldehit, içerdiği iki aktif aldehit grubu ile biyosensör geliştirilmesinde kullanılan enzim, mikroorganizma ve doku kesitleri gibi biyolojik bileşenlerin, kitosan, kolajen, jelatin ve karragenan gibi biyolojik matriks moleküllerinin polimerleri üzerindeki $-NH_2$ gibi gruplarla H_2O çıkararak birleşir ve iki polimer zincirini birbirine çapraz bağlar. Bu esasa dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça sık kullanılmaktadır (Sezgintürk vd., 2004a ; Akyılmaz vd., 2000). Yöntem kolay uygulanabilir olup genellikle sistemin termal, işlem ve depo kararlılıklarını da arttırmaktadır.



Şekil 1.4. Glutaraldehitin formülü

1.4.5. Nafyon

Nafyon sülfonatlı perflorlanmış anyonik bir polielektrolittir. Son yıllarda redoks polimer modifiyeli elektrotların kullanımının yaygınlaşması, kolay hazırlanabilme, iyi elektriksel iletkenlik ve birçok redoks çifti için yüksek partitasyon katsayısına sahip olmasından dolayı nafyon önem kazanmıştır. Nafyon filmler genellikle elektrot modifikasyonunda ve biyosensör hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (Andrieux et al, 1990; Liu et al, 1995; Furbee et al, 1993; Canbay, 2013).



Şekil 1.5. Nafyonun formülü

1.5. Kalem Grafit Elektrot ile Önceki Çalışmalar

Kimyasal inertlik, düşük maliyet, çeşitli algılama ve saptama uygulamaları için uygunluğundan dolayı karbon elektrotların çeşitli formları elektroanalitiksel uygulamalar için kullanılabilir (McCreery, 1991; Rice, 1983). Bunlar arasında kalem grafit elektrodun ucuzluk, kolay ulaşılabilirlik, yüksek elektrokimyasal reaktivite, modifikasyon ve minyatürize edilebilme kolaylığı sayesinde elektrokimyasal sensör tasarımında ve DNA etkileşimlerine dayalı biyosensör tasarımlarında sıklıkla kullanılmıştır (Gao et al., 2005).

Özcan ve Şahin (2011), vücut sıvılarında ürik asit mevcudiyetinde parasetamol'ün (PC) basit ve hızlı bir elektrokimyasal tayini için, yeni bir yaklaşım önerilmiştir. PC'nin voltametrik belirlenmesi ölçüm sırasında elektrokimyasal işlemde kalem grafit elektrot üzerinde aynı anda oluşan N-asetil-p-benzokinonimin'in elektrokimyasal olarak indirgemesine dayanmaktadır.

Dilgin vd. (2012), hematoksilan ile modifiye kalem grafit elektrot (PGE/HMT) kullanarak sülfidin elektrokatalitik oksidasyonunu araştırmak için yeni bir yaklaşım anlatmıştır. PGE/HMT elektrodun sülfid oksidasyonuna karşı önemli bir elektrokatalitik aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Önerilen yöntem, başarılı bir şekilde atık sularda sülfidin tayini için uygulanmış ve spektrofotometrik yöntem ile karşılaştırılmıştır.

Ensafi et al. (2012), kalem grafit elektrot kullanarak adenin ve guaninin azalan oksidasyon sinyaline ve somon balığı spermlerinin çift sarmallı DNA'sı ile riboflavin etkileşimine dayalı elektrokimyasal bir çalışma tasarlamışlardır. Çalışmada riboflavin ile etkileşim sonrası guanin ve adenin oksidasyon sinyallerinin yoğunluğundaki azalma riboflavinin hassas belirlenmesi için bir gösterge sinyali olarak kullanılmıştır.

Mirmoghtadaie et al. (2013), somon balığının çift sarmallı DNA'sı ile modifiye edilmiş kalem grafit kullanarak folik asit tayini yöntemi önermişlerdir.

Doğan Topal ve Özkan (2011), kalem grafit elektrot kullanarak çift sarmallı DNA ile anti kanser ilacı olan fulvestrantın etkileşimini diferansiyel puls voltametri yöntemi kullanarak incelemişlerdir. Guaninin oksidasyon sinyallerinin yoğunluğundaki azalma temelli etkileşim mekanizması fulvestrant'ın hassas belirlenmesi için bir gösterge olarak kullanılmıştır.

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Cihaz ve diğer ekipmanlar

Denemelerde IVIUM Compactstat marka potansiyostat kullanılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Diğer ekipmanlar:

- Lauda RE 120 soğutmalı sirkülatör
- IKA-KIMO 2 manyetik karıştırıcı
- Micro 0,5 mekanik kalem
- Magnum 0,5 grafit uç

2.1.2. Kimyasallar

Deneysel çalışmalar için temin edilen kimyasallar:

- KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich)
- Glutaraldehit(%25'lik) (Sigma)
- Jelatin (Sigma)
- Nafyon (%5'lik) (Sigma)
- Sığır karaciğer katalaz (Sigma)
- H_2O_2 (%34,5-36,5) (Sigma)
- NaOH (Sigma-Aldrich)
- $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (BDH Chemicals Ltd.)
- $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Sigma)
- KCl (Sigma)

Deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltiler:

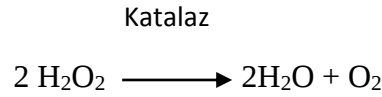
- 50 mM ve 100 mM potasyum fosfat tamponları
(pH: 6,5-7,0-7,5-8,0)
- Katalaz (70.000 U/mL)

- 100 mM H₂O₂ çözeltisi
- % 2,5'luk Glutaraldehit
- % 1 - % 1,5 - % 2 'lik Nafyon (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde)

2.2. Yöntem

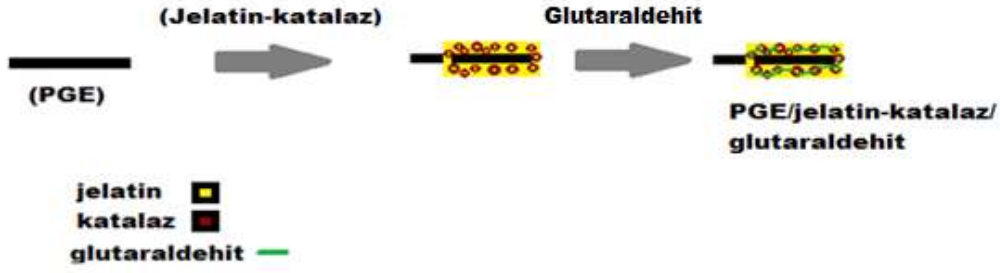
2.2.1. Geliştirilen biyosensörlerin çalışma ilkesi

Hazırlanan biyosensörün çalışma ilkesi oksijenin çıkışına dayalı olarak amperometrik ölçümler için aşağıdaki eşitliği temel alarak -0,7 V'ta gerçekleştirilmiştir.



2.2.2. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün hazırlanması

Kalem grafit elektrot (PGE) grafit kısmı 1,5 cm dışarıda kalacak şekilde elektrota yerleştirilir. PGE, 200 µl 50mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde 70.000 U/mL katalaz, 20 mg jelatin içeren 38 °C' de hazırlanmış enzim çözeltisine daldırılıp çıkartıldı. Daha sonra 3 dk % 2,5 lük glutaraldehite daldırıldı. Enzim ve glutaraldehit çözeltisine daldırma işlemi 3 kez tekrar edildi. Hazırlanan modifiye biyosensör kullanılmadığı zamanlarda + 4 °C' de saklandı. Şekil 2.1 'de tasarlanan modifiye biyosensörün şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.1. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehyt modifiye elektrota ait immobilizasyon şeması

2.2.3. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehyt modifiye biyosensöre ilişkin optimizasyon çalışmaları

Bu kısımda PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehyt modifiye biyosensörlerin hazırlanmasına ilişkin parametreler; enzim miktarı, jelatin miktarı, glutaraldehytte bekletme süresi, pH optimizasyon çalışmaları ve hazırlanan biyosensör ile örneklerde H_2O_2 tayinine yönelik metodlara ilişkin bilgiler sunulmuştur.

2.2.3.1. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Ölçümler $30^\circ C$ ' de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Jelatin miktarı 20 mg, % 2,5'luk glutaraldehytte bekletme süresi 5 dk olarak sabit tutularak enzim miktarı 140.000 U/mL, 105.000 U/mL, 70.000 U/mL, 35.000 U/mL, 7000 U/mL, 700 U/mL, 70 U/mL, 14 U/mL olarak değiştirilerek enzim miktarı optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.3.2. Optimum pH'nın belirlenmesi

Ölçümler $30^\circ C$ ' de 50 mM fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 70.000 U/mL, jelatin miktarı 20 mg, glutaraldehytte bekletme süresi 5 dk olarak sabit tutularak pH 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 olarak değiştirilerek pH optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.3.3. Optimum tampon konsantrasyonunun belirlenmesi

Ölçümler 30°C’ de fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 70.000 U/mL, jelatin miktarı 20 mg, glutaraldehitte bekletme süresi 5dk ve pH 7,0 olarak sabit tutularak fosfat tamponu konsantrasyonu 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM ve 200 mM olarak değiştirilerek tampon konsantrasyonu optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.3.4. Optimum jelatin miktarının belirlenmesi

Ölçümler 30°C’ de 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 70.000 U/mL, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dk, pH 7,0 ve tampon konsantrasyonu 100 mM sabit tutularak jelatin miktarı 10 mg, 20 mg ve 30 mg olarak değiştirilerek jelatin miktarı optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.3.5. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit biyoaktif tabakalandırma işlem sayısının optimizasyonu

Ölçümler 30°C’ de fosfat tamponu içerisinde alındı. PGE modifiye biyosensör hazırlanırken öncelikle jelatin içeren enzim çözeltisine daldırıldı, daha sonra glutaraldehitte bekletildi. Bu tabakalandırma işlemi 1 kez, 3 kez ve 5 kez tekrar edilerek işlem sayısının optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.3.6. Optimum glutaraldehitte bekletme süresinin optimizasyonu

Ölçümler 30°C’ de 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 70.000 U/mL, jelatin miktarı 20 mg olarak sabit tutularak %2,5’luk glutaraldehitte bekletme süresi 1 dk, 3 dk, 5 dk ve 7 dk olarak değiştirilerek glutaraldehitte bekletme süresi optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.3.7. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Ölçümler 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 70.000 U/mL, jelatin miktarı 20 mg, glutaraldehitte bekletme süresi 3 dk olarak sabit tutularak sıcaklık 25°C, 30°C ve 35°C olarak değiştirilerek sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.4. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin karakterizasyon çalışmaları

2.2.4.1. H₂O₂ için doğrusal tayin aralığı

Biyosensör 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde 70.000 U/mL enzim 20 mg jelatin içeren enzim çözeltisine daldırıldıktan sonra 3 dk % 2,5'luk glutaraldehit çözeltisinde bekletilerek hazırlandı. Ölçümler 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde 30°C 'de alındı.

Yapılan denemelerde 10; 20; 40; 60; 80; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1000; 1200; 1400; 1600; 1800 μ M H₂O₂ derişimleri için ölçümler alındı.

2.2.4.2. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirliği

Aynı yöntemle PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye üç ayrı biyosensör hazırlandı ve 600 μ M H₂O₂ derişimine verdiği cevaplar kıyaslandı. (Biyosensörler 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde 70.000 U/mL enzim 20 mg jelatin içeren enzim çözeltisine daldırıldıktan sonra 3 dk % 2,5'luk glutaraldehit çözeltisinde bekletilerek hazırlandı. Ölçümler 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde 30°C 'de alındı.)

2.2.4.3. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile alınan yanıtların tekrarlanabilirliği

PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile -0,7 V'ta 600 μ M H_2O_2 için 10 tane ölçüm alındı. Elde edilen verilerden faydalanarak ortalama değer ($\bar{x}$), standart sapma (S.S.), varyasyon katsayısı (% V.K.) hesaplandı.

2.2.4.4. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile farklı örneklerde H_2O_2 analizi

Geliştirilen biyosensörle süt ve oksijenli su örneklerinde H_2O_2 tayini yapılmıştır. (Biyosensör 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde 70.000 U/mL enzim 20 mg jelatin içeren enzim çözeltisine daldırıldıktan sonra 3 dk % 2,5'lük glutaraldehit çözeltisinde bekletilerek hazırlandı. Ölçümler 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde 30°C 'de alındı.)

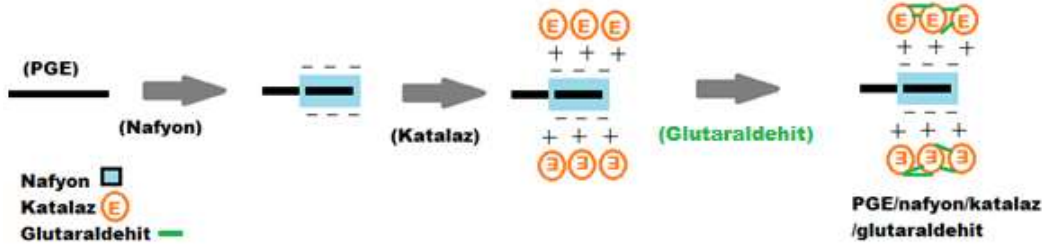
2.2.4.5. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün depo kararlılığı

PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün hazırlandığı günden itibaren 4 hafta boyunca katalaz aktivitesi izlendi. Biyosensör ile hazırlandığı gün ve haftada bir olmak üzere 600 μ M H_2O_2 derişimi için ölçümler alındı. Bu süre zarfında ölçüm alındığı zamanlar dışında biyosensör +4°C'de saklandı. Denemeler 30°C' de ve fosfat tamponunda (pH:7,0; 100mM) gerçekleştirildi.

2.2.5. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün hazırlanması ve çalışmaları

Kalem grafit elektrodun (PGE) grafit kısmı 1,5 cm dışarıda kalacak şekilde kalem elektroda yerleştirilir. PGE, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış nafyon çözeltisine (% 1,5) 15 dk daldırılarak bekletildi. PGE/nafyon modifiye elektrot 70.000 U/mL'lik enzim çözeltisi içerisinde 5 dk daldırıldı. Ardından 5 dk % 2,5'lük glutaraldehit çözeltisine daldırıldı. İşlemler üçer kez

tekrar edildi. Hazırlanan modifiye elektrot kullanılmadığı zamanlarda +4 °C’ de saklandı.



Şekil 2.2 PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye elektrota ait immobilizasyon şeması

2.2.6. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin optimizasyon çalışmaları

Bu kısımda PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörlerin hazırlanmasına ilişkin parametreler enzim miktarı, nafyon yüzdesi, nafyonda ve glutaraldehitte bekletme süresi ve pH optimizasyon çalışmaları ve hazırlanan biyosensörün örneklerde H_2O_2 tayinine yönelik metodlara ilişkin yapılan çalışmalara ait bilgiler sunuldu.

2.2.6.1. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Ölçümler 30°C’de 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alındı. Nafyon yüzdesi %1,5, nafyonda bekletme süresi 15 dk, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dk olarak sabit tutularak enzim miktarı 98.000 U/mL, 70.000 U/mL, 42.000 U/mL olarak değiştirilerek enzim miktarı optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.6.2. Optimum pH’nın belirlenmesi

Ölçümler 30 °C’ de 50 mM fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 70.000 U/mL, nafyon yüzdesi %1,5, nafyonda bekletme süresi 15 dk, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dk olacak şekilde sabit tutularak pH 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 olarak değiştirilerek pH optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.6.3. Optimum tampon konsantrasyonunun belirlenmesi

Ölçümler 30°C’ de fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 70.000 U/mL, nasyon yüzdesi % 1,5, nasyonda bekletme süresi 15 dk, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dk ve pH 7,0 olarak sabit tutularak fosfat tamponu konsantrasyonu 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM olarak değiştirilerek tampon konsantrasyonu optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.6.4. Optimum nasyon yüzdesinin belirlenmesi

Ölçümler 30°C’ de 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alınmıştır. Enzim miktarı 70.000 U/mL, nasyonda bekletme süresi 15 dk, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dk ve pH 7,0 ve tampon konsantrasyonu 50 mM olarak sabit tutularak nasyon yüzdesi % 1, % 1,5 ve % 2’ lik olacak şekilde değiştirilerek nasyon yüzdesi optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.6.5. PGE/nasyon/katalaz/glutaraldehit biyosensörünün optimum biyoaktif tabakalandırma işlem sayısının belirlenmesi

Ölçümler 30°C’de 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alındı. PGE elektrot hazırlanırken öncelikle % 1,5’lük nasyon çözeltisine 15 dk daldırıldı. Daha sonra 70.000 U/mL enzim çözeltisinde 5 dk bekletildi. Ardından % 2,5’luk glutaraldehit çözeltisine 5 dk daldırıldı. Bu işlem basamakları 1 kez, 3 kez ve 5 kez tekrar edilerek işlem basamağı optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.6.6. Optimum Glutaraldehitte Bekletme Süresinin Belirlenmesi

Ölçümler 30°C’ de 50 mM pH 7 fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 70.000 U/mL, nasyonda bekletme süresi 15 dk, pH 7,0 ve tampon konsantrasyonu 50 mM olarak sabit tutularak glutaraldehitte bekletme süresi 3 dk, 5 dk ve 7 dk olarak değiştirilerek glutaraldehitte bekletme süresi optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.6.7. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 70.000 U/mL, nasyonda bekletme süresi 15 dk, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dk, pH 7,0 ve tampon konsantrasyonu 50 mM olarak sabit tutularak sıcaklık 25°C, 30°C, 35°C ve 40°C olacak şekilde değiştirilerek sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.7. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin karakterizasyon çalışmaları

2.2.7.1. H₂O₂ için doğrusal tayin aralığı

Biyosensör, PGE sırasıyla % 1,5'luk nafyon çözeltisinde 15 dk, 70.000 U/mL enzim çözeltisine 5 dk, % 2,5'luk glutaraldehit çözeltisinde 5 dk bekletilerek hazırlandı. Ölçümler 30°C'de 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alındı. Yapılan denemelerde 40; 80; 140; 200; 300; 400; 600; 800; 1200; 1600; 2000; 2400; 2800 µM H₂O₂ derişimleri için ölçümler alındı.

2.2.7.2. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirliği

Aynı yöntemle PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye üç ayrı biyosensör hazırlandı ve 600 µM H₂O₂ derişimine verdiği cevaplar kıyaslandı. Ölçümler 30°C'de 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alındı.

2.2.7.3. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile alınan yanıtların tekrarlanabilirliği

PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile -0,7 V'ta 600 µM H₂O₂ için 5 adet ölçüm alındı. Elde edilen verilerden faydalanarak ortalama değer ($\bar{x}$), standart sapma (S.S.), varyasyon katsayısı (% V.K.) hesaplandı.

2.2.7.4. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye elektrodlu biyosensör ile örneklerde H₂O₂ analizi

Tasarlanan biyosensörle süt örneklerinde H₂O₂ tayini yapılmıştır. Ölçümler 30°C’de 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alındı.

2.2.7.5. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün depo kararlılığı

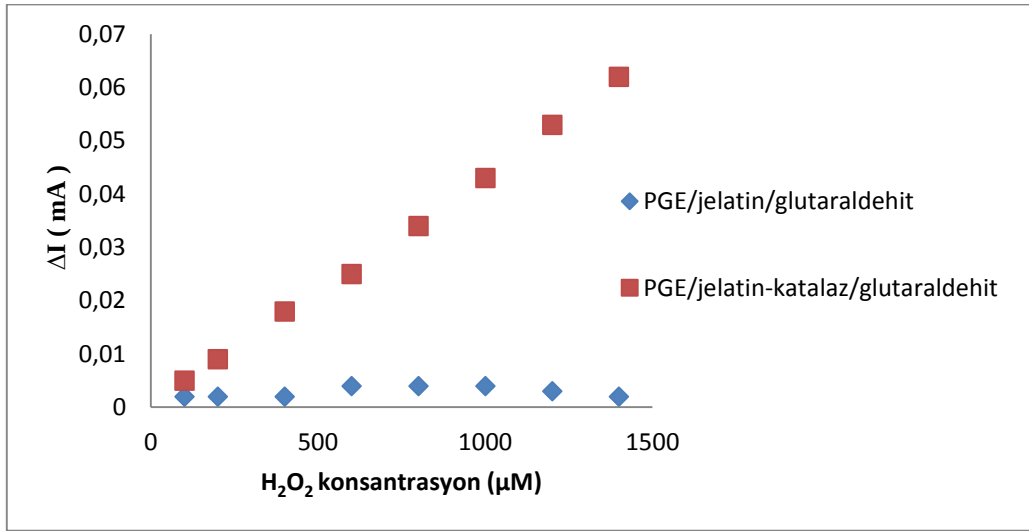
PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün hazırlandığı günden itibaren 4 hafta boyunca katalaz aktivitesi izlenmiştir. Biyosensör ile hazırlandığı gün ve haftada bir olmak üzere 600 µM H₂O₂ derişimi için ölçümler alındı. Bu süre zarfında ölçüm alındığı zamanlar dışında biyosensör +4°C’de saklandı. Denemeler 30°C’de ve 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda gerçekleştirildi.

3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

3.1. PGE/Jelatin-Katalaz/Glutaraldehit Modifiye Biyosensörün

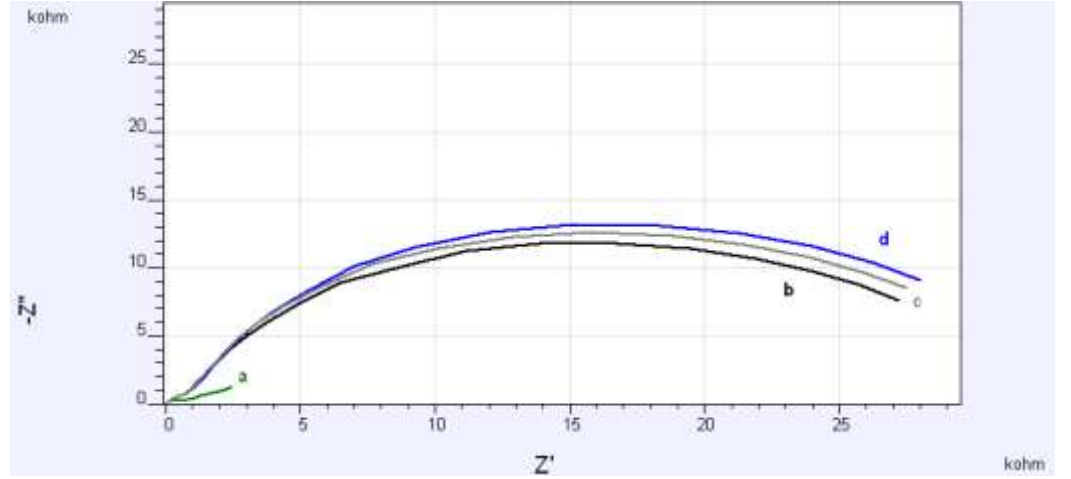
Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

Öncelikle hazırlanan biyosensör ile alınan cevabın enzimden kaynaklandığının doğrulanması amacıyla PGE/jelatin/glutaraldehit ve PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye elektrotlar kıyaslandı ve cevapların katalaz enziminden kaynakladığı doğrulandı.(Şekil 3.1)



Şekil 3.1. PGE/jelatin/glutaraldehit ve PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye elektrotları kıyaslanması. (Ölçümler -0,7 V'ta krontamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu; 30 °C'de gerçekleştirildi.)

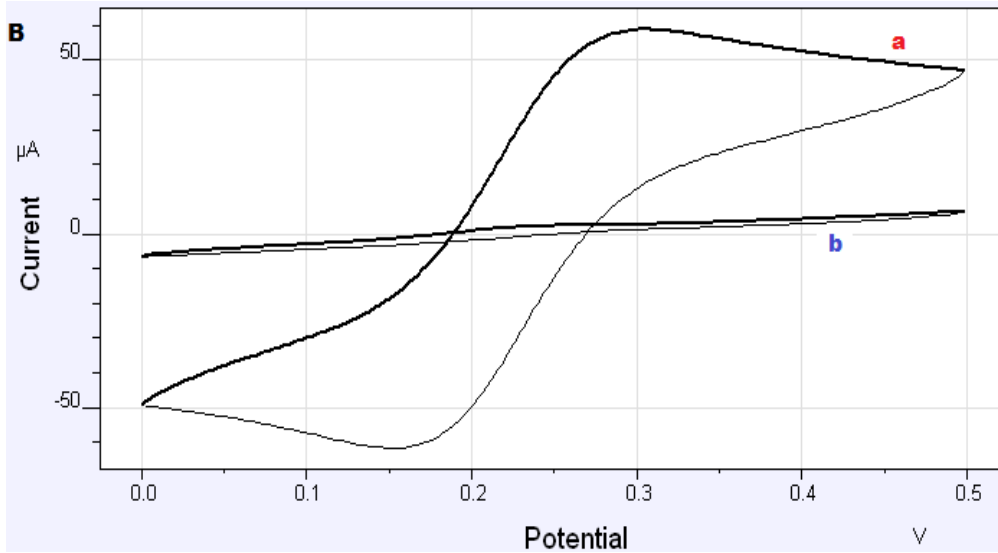
PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör için immobilizasyon basamakları CV ve impedimetrik yöntemler ile incelenmiştir. CV ve impedans ölçümleri $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0.005 M + 0,1M KCl çözeltisinde 25 °C' de gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.2'de PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün immobilizasyon basamaklarının impedimetrik diyagramları verilmiştir.



Şekil 3.2. PGE yüzeyine biyoaktif tabakalandırma basamaklarına ilişkin impedimetrik diyagram. (a. PGE, b. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit ilk tabakalandırma c. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit ikinci tabakalandırma, d. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit üçüncü tabakalandırma'ya ait diyagramlar. İmpedans ölçümleri için frekans aralığı: 10000-0,05 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV. Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot))

Diyagramlardan da anlaşıldığı gibi her bir immobilizasyon basamağı işleminden sonra PGE yüzeyinde iletkenliğin biyoaktif tabakanın kalınlaşmasına bağlı olarak azaldığı belirlendi. Bu durum immobilizasyonun başarıyla gerçekleştiğini göstermiştir.

Şekil 3.3' de PGE ve PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin CV voltamogramları karşılaştırıldı.

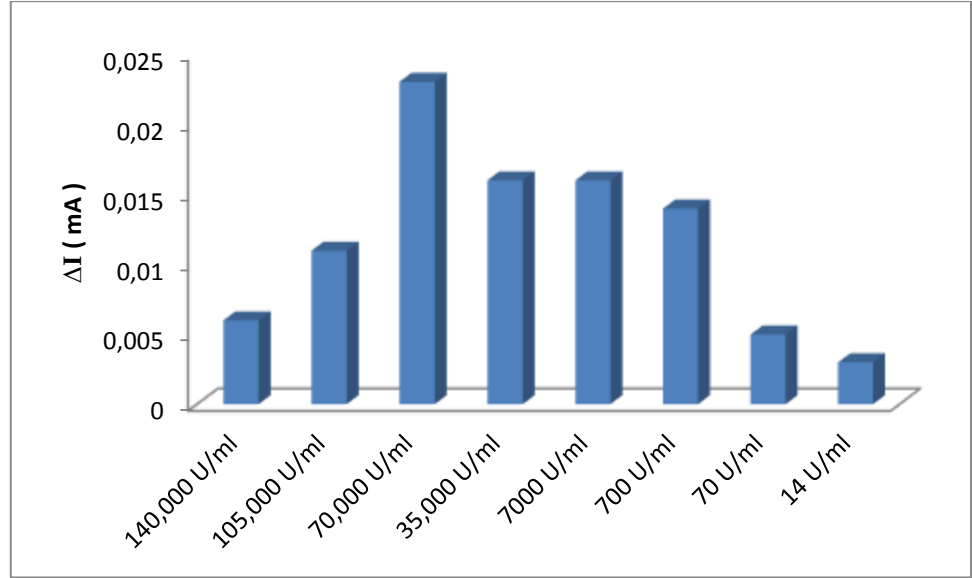


Şekil 3.3. PGE yüzeyine biyoaktif tabakalandırmaya ait CV voltamogramları (a. PGE, b. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye elektrot' a ait CV voltamogramları. Ölçümleri $Fe(CN)_6^{3-/4-}$, 0.005 M + 0,1M KCl çözeltisinde 25 °C' de gerçekleştirilmiştir. Scan rate 50 mV/s)

Sonuçlar impedans bulgularını destekleyici nitelikte tespit edilmiştir.

3.1.1. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Ölçümler 30°C' de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Jelatin miktarı 20 mg, %2,5'luk glutaraldehitte bekletme süresi 5 dk olarak sabit tutularak katalaz miktarı 140.000 U/mL, 105.000 U/mL, 70.000 U/mL, 35.000 U/mL, 7000 U/mL, 700 U/mL, 70 U/mL, 14 U/mL olarak değiştirilerek enzim miktarı optimizasyonu gerçekleştirildi ve kullanılan katalaz enziminin miktarının biyosensör cevabı üzerine olan etkisi belirlendi.(Şekil 3.4)



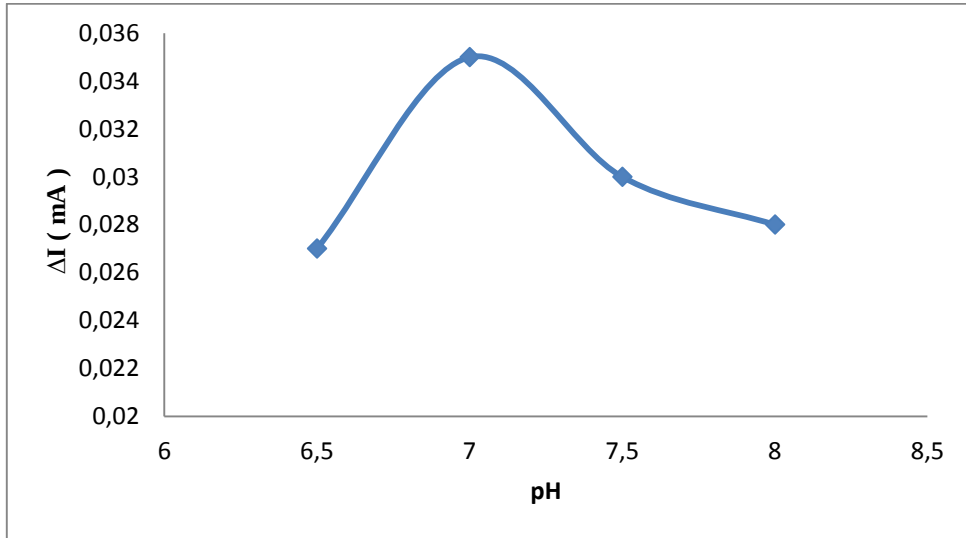
Şekil 3.4. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin enzim miktarı optimizasyonu grafiği. (Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,5 fosfat tamponu; 30 °C'de gerçekleştirildi.)

Farklı enzim miktarlarıyla hazırlanan PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörlerden 70.000 U/mL enzim kullanılarak hazırlanan biyosensörün cevabı diğerlerine göre belirgin şekilde yüksektir. Bu değerin daha üzerindeki enzim miktarlarında biyosensör yanıtının düşmesi protein miktarının artmasıyla birlikte çapraz bağ yüzdesinin ve difüzyon engellinin artması olarak yorumlanabilir. Ayrıca enzim miktarının artmasıyla birlikte tabakadaki protein miktarının çapraz bağ oranında artışa yol açarak teorik olarak yükselen katalaz aktivitesinin gerçekte düşmesine de yol açabilir. Söz konusu değerden daha düşük enzim miktarlarına indikçe ise enzim aktivitesinin düşmesinin yanı sıra biyoaktif tabakadaki protein miktarının azalması da gerçekleşir. Bu durum çapraz bağ sayısı oranının düşmesine ve daha gözenekli bir membran oluşumuna yol açar. Sonuçta enzimatik reaksiyon sonucu biyoaktif tabakada oluşan oksijenin dış ortama difüzyonun kolaylaşması ve PGE yüzeyinde indirgenen oksijen miktarının azalması biyosensör yanıtının düşmesine neden olarak yorumlanabilir.

3.1.2. pH'nın biyosensör cevabı üzerine etkisi

Çevre koşulları protein yapısındaki enzimlerin katalitik aktiviteleri için oldukça önemlidir. Enzimlerin katalitik aktivitelerini etkileyen en önemli çevre koşullarından birisi ortamın pH değeridir. Bundan dolayı immobilizasyon sonrasında pH aktivite ilişkisindeki değişimler hakkında elde edilen bilgiler, enzim proteinin yapı-fonksiyon ilişkisini anlamak ve biyosensörün optimum çalışma koşullarını belirlemek açısından önemlidir.

PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör 70.000 U/mL katalaz enzimi çözeltisiyle 20 mg jelatin kullanılarak ve %2,5'luk glutaraldehitte 5 dk bekletilerek hazırlandı. Ölçümler 30°C' de 50 mM fosfat tamponu içerisinde alınmıştır. Enzim miktarı, jelatin miktarı, glutaraldehitte bekletme süresi sabit tutularak pH 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 olarak değiştirilerek optimum pH 7,0 olarak belirlendi. İlgili grafik Şekil 3.5'de verilmiştir.



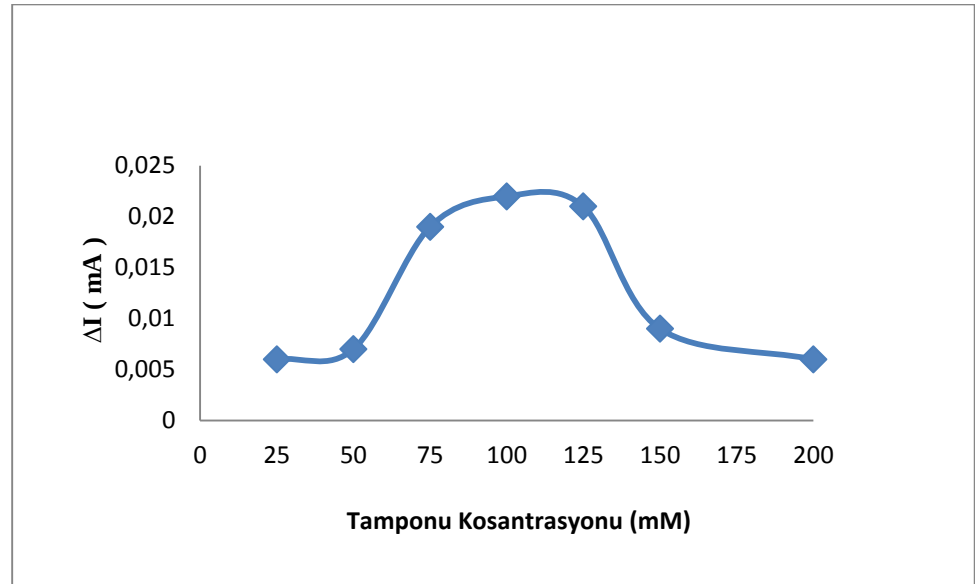
Şekil.3.5. Biyosensör cevabına pH'nın etkisi.

(Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM fosfat tamponu; 30 °C'de gerçekleştirildi.)

3.1.3. Tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi

Enzim miktarı, jelatin miktarı, glutaraldehitte bekletme süresi ve pH sabit tutularak fosfat tamponu konsantrasyonu 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM ve 200 mM olarak değiştirilerek tampon konsantrasyonu optimizasyonu gerçekleştirildi.

PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör 70.000 U/mL katalaz enzimi çözeltisiyle 20 mg jelatin kullanılarak ve %2,5 'luk glutaraldehitte 5 dk bekletilerek hazırlandı. İlgili grafik Şekil 3.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.

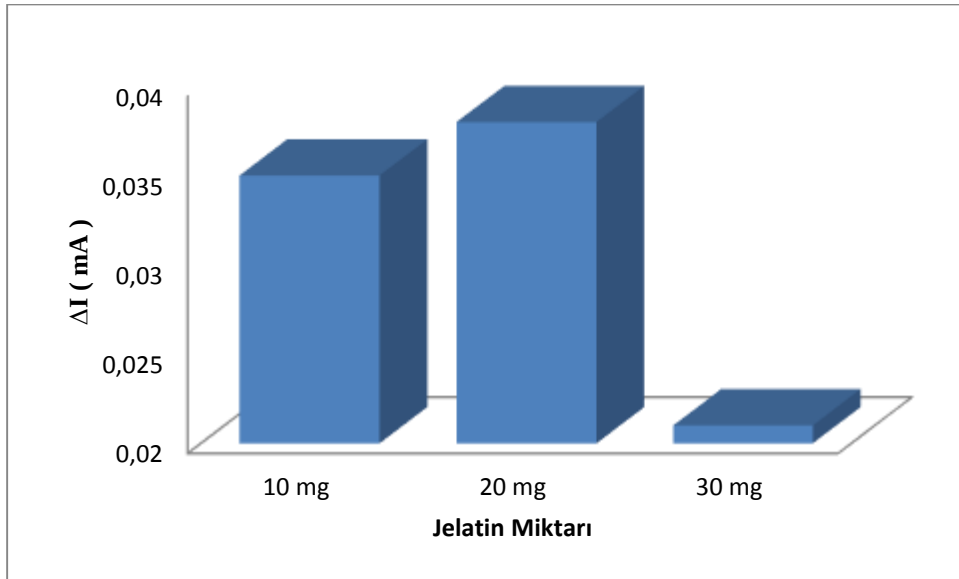
(Ölçümler -0,7 V'ta kromoamperometri yöntemi kullanılarak pH 7 fosfat tamponu; 30 °C'de gerçekleştirildi.)

Şekil 3.6'dan görüleceği üzere optimum tampon konsantrasyonu 100 mM olarak bulundu.

3.1.4. Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Optimum jelatin miktarını belirlemek için 200 µl jelatinli enzim çözeltisi 10 mg, 20 mg ve 30 mg jelatin içerecek şekilde hazırlandı. Farklı jelatin miktarlarına sahip bu enzim çözeltileri kullanarak hazırlanan 3 farklı PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile yapılan denemelerde alınan cevapların kıyaslandığı grafik Şekil 3.7' de verilmiştir.

Enzim miktarı, glutaraldehitte bekletme süresi, pH ve tampon konsantrasyonu sabit tutularak jelatin miktarı 10 mg, 20 mg ve 30 mg olarak değiştirilerek jelatin miktarı optimizasyonunun gerçekleştirildiği bu çalışmada PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör 70.000 U/mL katalaz enzimi çözeltisi kullanılarak ve % 2,5 'luk glutaraldehitte 5 dk bekletilerek hazırlandı.



Şekil 3.7. Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi .

(Ölçümler -0,7 V'ta kromamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,0;100 mM fosfat tamponu ;30 °C'de gerçekleştirildi.)

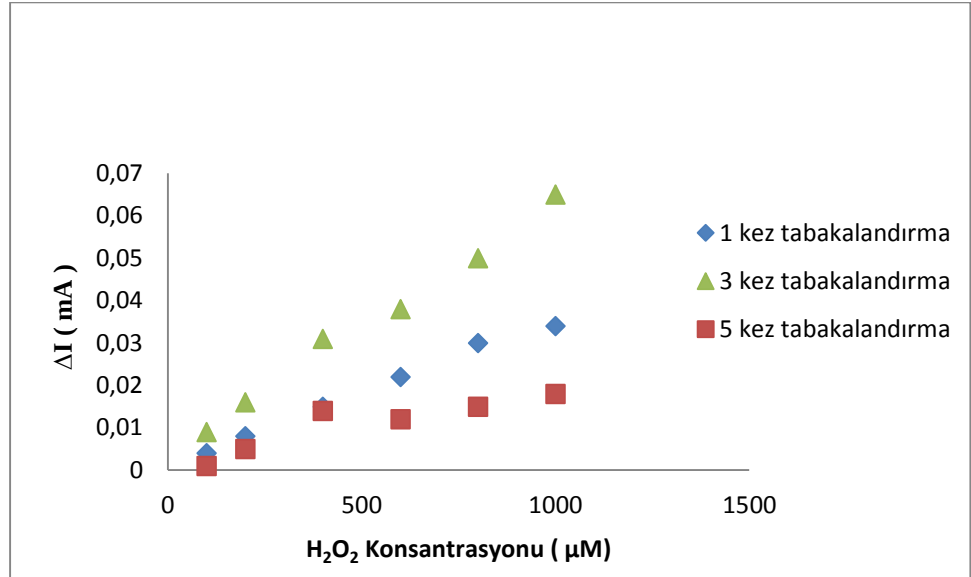
Şekil 3.7'den görüldüğü gibi 20 mg jelatin miktarı optimum olarak belirlendi. Jelatin miktarı 30 mg 'a yükseltildiğinde biyosensör cevabı önemli ölçüde düşmüştür. Bu sonuç başlıca membran kalınlaşmasının yol açtığı difüzyon engellidir. 10 mg jelatin kullanılarak hazırlanan biyosensörün yanıtı 20 mg

jelatinle hazırlanan biyosensöre göre az bir farkla düşüktür. Ancak 20 mg jelatin ile hazırlanan biyosensör hem daha kararlı bir biyoaktif tabaka oluşturmaları hem de H_2O_2 konsantrasyon aralığında daha mükemmel doğrusallık göstermesi bakımından tercih edilmiştir.

3.1.5. Biyoaktif tabakalandırma işlem sayısının biyosensör cevabı üzerine etkisi

PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör 70.000 U/mL katalaz enzimi çözeltisiyle 20 mg jelatin kullanılarak ve % 2,5 'luk glutaraldehitte 5 dk bekletilerek hazırlandı. Ölçümler 30°C' de 100 mM, pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alındı.

PGE elektrot hazırlanırken öncelikle jelatin içeren enzim çözeltisine daldırıldı ve daha sonra glutaraldehitte bekletildi. Bu işlem basamakları 1 kez, 3 kez ve 5 kez tekrar edilerek biyoaktif tabakalandırma işleminin optimizasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen bulgular Şekil 3.8 'de verilmiştir.



Şekil 3.8. Biyoaktif tabakalandırma işlem sayısının biyosensör cevabına etkisi.

(Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,0; 100 mM fosfat tamponu; 30 °C'de gerçekleştirildi.)

Grafikten de görüldüğü gibi 3 kez biyoaktif tabakalandırma işlemi en yüksek cevabı vermiştir ve optimum biyoaktif tabakalandırma işlem basamağı 3 kez olarak seçilmiştir.

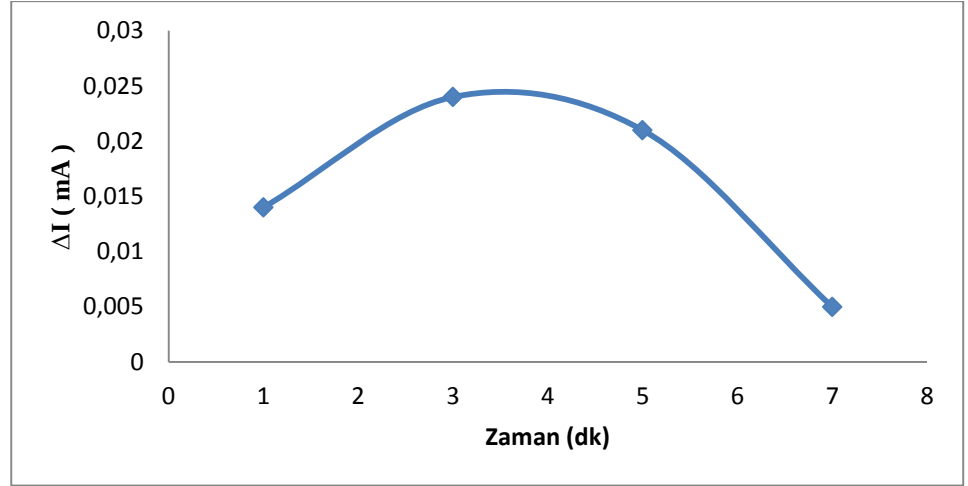
Bir kez tabakalandırmayla oluşan membran gerek enzim aktivitesi azlığı gerekse reaksiyon sonucu oluşan ve belirlenen tür olan oksijenin dışa difüzyonuna engel olmayacak ölçüde geçirgen olduğu için düşük biyosensör cevabı sergilemiştir. Beş kez tabakalandırma ise enzim aktivitesi açısından yüksek olsada muhtemelen daha fazla çapraz bağ oluşumu ve substrat için daha büyük bir difüzyon engelli yaratması nedeniyle daha düşük cevap göstermiştir.

3.1.6. Glutaraldehitte bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi

PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör 70.000 U/mL katalaz enzimi çözeltisiyle 20 mg jelatin kullanılarak ve % 2,5'luk glutaraldehitte değişen dakikalarda bekletilerek hazırlandı. Biyoaktif tabakalandırma işlemi 3 kez yapıldı. Ölçümler 30°C' de 100 mM, pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alındı.

Enzim miktarı, jelatin miktarı, pH ve tampon konsantrasyonu sabit tutularak glutaraldehitte bekletme süresi 1 dk, 3 dk, 5 dk ve 7 dk olarak değiştirilerek glutaraldehitte bekletme süresi optimizasyonu gerçekleştirildi.

Optimum glutaraldehitte bekletme süresini belirlemek için 1 dk, 3 dk, 5 dk ve 7 dk da bekletilerek hazırlanmış üç farklı PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile yapılan denemelerde alınan cevaplara ilişkin grafik Şekil 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3.9. Glutaraldehitte bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.

(Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak pH 7; 100 mM fosfat tamponu; 30 °C'de gerçekleştirildi.)

Şekil 3.9'dan görüldüğü üzere 3 dk glutaraldehitte bekletilerek hazırlanan PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör diğer modifiye biyosensörlere nazaran daha yüksek cevap vermiştir ve optimum glutaraldehitte bekletme süresi 3 dk olarak seçilmiştir.

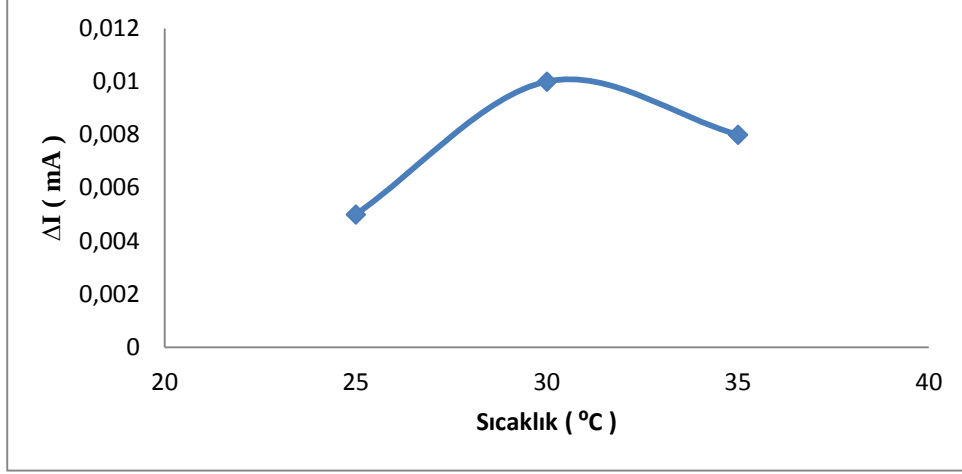
Daha kısa bekletme süresinde daha düşük cevap alınması daha az çapraz bağ oluşumu ve meydana gelen membranın daha gözenekli bir yapıya sahip olması nedeniyle ölçülen tür olan oksijenin dışa difüzyonunun kolaylaşması olarak yorumlanabilir. Daha uzun bir bekletme süresi daha düşük bir biyosensör cevabı alınması için ise daha fazla çapraz bağ oluşumu nedeniyle daha az gözenekli bir yapının daha büyük bir substrat difüzyon engeli yaratması şeklinde yorumlanabilir.

3.1.7. Sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkisi

Enzim miktarı, jelatin miktarı, glutaraldehitte bekletme süresi, pH ve tampon konsantrasyonu sabit tutularak sıcaklık 25°C, 30°C ve 35°C olarak değiştirilerek sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirildi.

PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör 70.000 U/mL katalaz enzimi çözeltisiyle 20 mg jelatin kullanılarak ve % 2,5'luk glutaraldehitte 3

dakika bekletilerek hazırlandı. Biyoaktif tabakalandırma işlemi 3 kez yapıldı. Ölçümler değişen sıcaklıklarda 100 mM, pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alındı. Elde edilen bulgular Şekil 3.10’da gösterilmiştir.



Şekil 3.10. Biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisi.

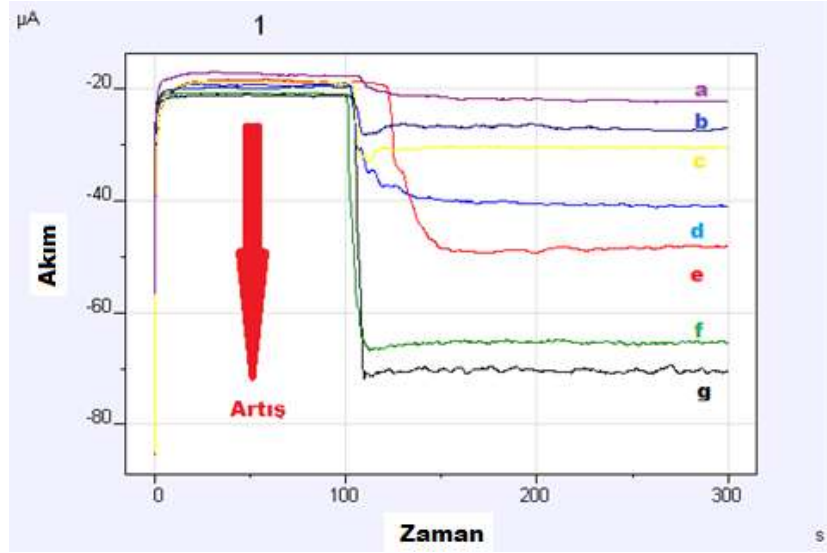
(Ölçümler -0,7 V’da kronoamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,0; 100 mM fosfat tamponunda gerçekleştirildi.)

H₂O₂ tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik çalışmalarda 25–35 °C’de düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile ölçümler alınarak akım farkı değerleri ölçülmüştür. Yapılan denemeler sonucunda sıcaklık ve biyosensör cevabı arasında oluşturulan grafikten optimum sıcaklık 30 °C sıcaklık bulunmuştur. Elde edilen bulgu, katalazın aktivite sıcaklık profiline de uygun bir veri niteliğindedir.

3.2. PGE/Jelatin-Katalaz/Glutaraldehit Modifiye Biyosensörün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

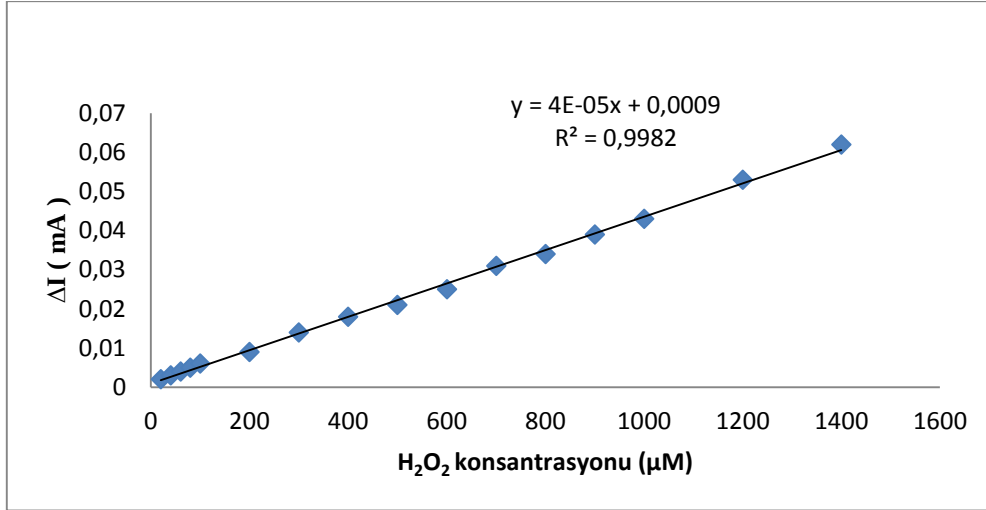
3.2.1. H₂O₂ için doğrusal tayin aralığı

Geliştirilen PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit biyosensörlerinin hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrasında, karakterizasyonu amacıyla H₂O₂ için ölçüm aralığı belirlendi. Şekil 3.11’de 100 μ M - 1400 μ M arası amperometrik ölçümler, Şekil 3.12’de ise 20 μ M - 1400 μ M arası H₂O₂ konsantrasyonuna karşılık gelen bulgular ile elde edilmiş doğrusal tayin aralığı verilmiştir.



Şekil 3.11. -0,7V’ta 100 μ M - 1.4 mM H₂O₂ konsantrasyon aralığındaki amperometrik ölçümler.
(a. 100 μ M, b. 200 μ M, c. 300 μ M, d. 600 μ M, e. 800 μ M, f. 1200 μ M, g. 1400 μ M
H₂O₂ konsantrasyonuna karşılık gelen amperometrik cevaplar)

Şekil 3.11 ‘da görüldüğü gibi artan H₂O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon sonucunda açığa çıkan O₂ konsantrasyonu artar. O₂ konsantrasyonundaki bu artış kalem elektrot yüzeyindeki reaksiyon uyarınca negatif yönde artışlar olarak gözlenmiştir.

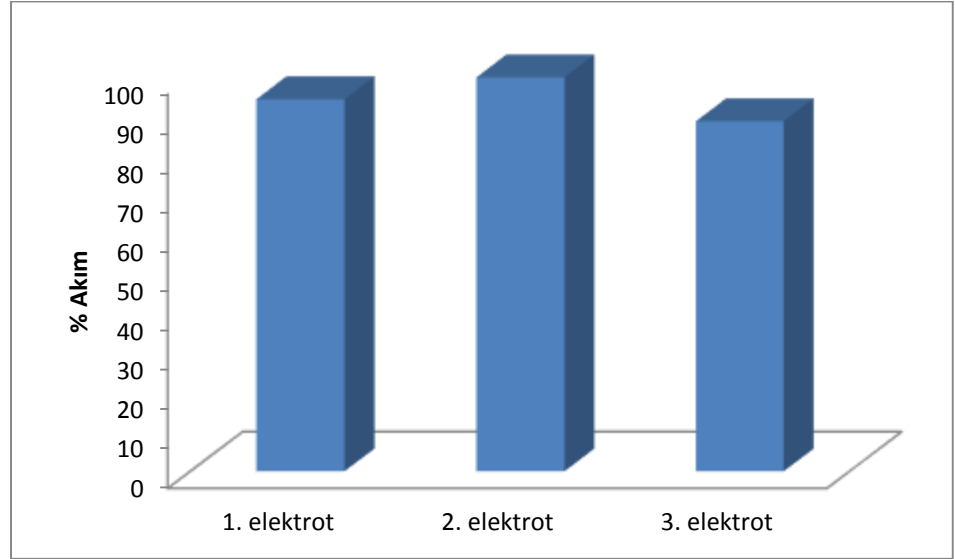


Şekil 3.12. PGE/Jelatin-katalaz/glutaraldehit biyosensörüne ait doğrusal tayin aralığı grafiği. (Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 100 mM; pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C'de gerçekleştirildi.)

10 μM – 1800 μM H₂O₂ konsantrasyon aralığında 10; 20; 40; 60; 80; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1000; 1200; 1400; 1600; 1800 μM H₂O₂ konsantrasyonları için yapılan ölçümlerde doğrusal tayin aralığının 20 μM – 1400 μM H₂O₂ konsantrasyon aralığında olduğu belirlenmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda doğrusallıktan sapma belirlenmiştir.

3.2.2. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirliği

Bu kısımda yapılan çalışmalara ilişkin olarak aynı yöntemle PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye üç ayrı elektrot hazırlanmış ve 600 μM H_2O_2 derişimine verdiği cevaplar kıyaslandı. Bulgular Şekil 3.13’de gösterilmiştir.



Şekil 3.13. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirliği.

(Ölçümler -0,7 V’ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,0; 100 mM fosfat tamponu; 30 °C’de gerçekleştirildi.)

Şekil 3.13’den görüleceği üzere aynı yöntemle tekrar hazırlanan biyosensörlerin cevapları arasındaki fark %5 - %10 arasında değişmektedir. Bu sonuç çok iyi bir netice olarak belirlenmiştir.

3.2.3. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile alınan yanıtların tekrarlanabilirliğine ilişkin bulgular

Bu çalışmada hazırlanan H_2O_2 biyosensörünün tekrarlanabilirliği incelendi. Ölçüm hücresi içerisinde 600 μM H_2O_2 olacak şekilde eklemeler yapılarak -0,7V’ta kronoamperometri yöntemle ölçümler alındı. 10 kez tekrar edilen ölçümler için çizilen standart grafik yardımıyla örnek derişimleri saptandı. Ortalama değer ($\bar{x}$), standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayısı (% V.K.) Çizelge

3.1’de verilmiştir. Çizelge 3.1’den görüldüğü gibi sonuçlar kabul edilebilir sınırlar içindedir.

Çizelge 3.1. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik bulguları

Aritmetik Ortalama ($\bar{x}$)	Standart Sapma (S.S)	Varyasyon Katsayısı(%)
601,1 μ M	$\pm 2,33 \mu$ M	0,38

3.2.4. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile örnek analizi

Hazırlanan PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye H₂O₂ biyosensörü ile ticari olarak satılan oksijenli su ve sütte H₂O₂ analizi yapılarak uygulanabilirliği incelendi.

Ticari olarak satılan % 3’ lük oksijenli sudan ölçüm hücresinde 200 μ M olacak şekilde eklemeler yapılarak (n=3) alınan ölçümlere ilişkin cevaplar standart grafiği ile kıyaslanarak değerlendirildi. Bulgular Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörle ticari olarak satılan oksijenli suya ait örnek analizi bulguları

Örnek (μ M)	Biyosensör (μ M)	% Fark	% Gerikazanım
200	197,25	% 1,38	% 98,6

WHO ve FAO bazı ülkelerde H₂O₂’nin içme sütlerine 0,1-0,4 g/L oranında katılmasına izin vermektedir. Bu değerler 3 mM ile 10 mM a karşılık gelir. Kutu süt örneklerinde de bu değer aralığında olacak şekilde standart katma yöntemi

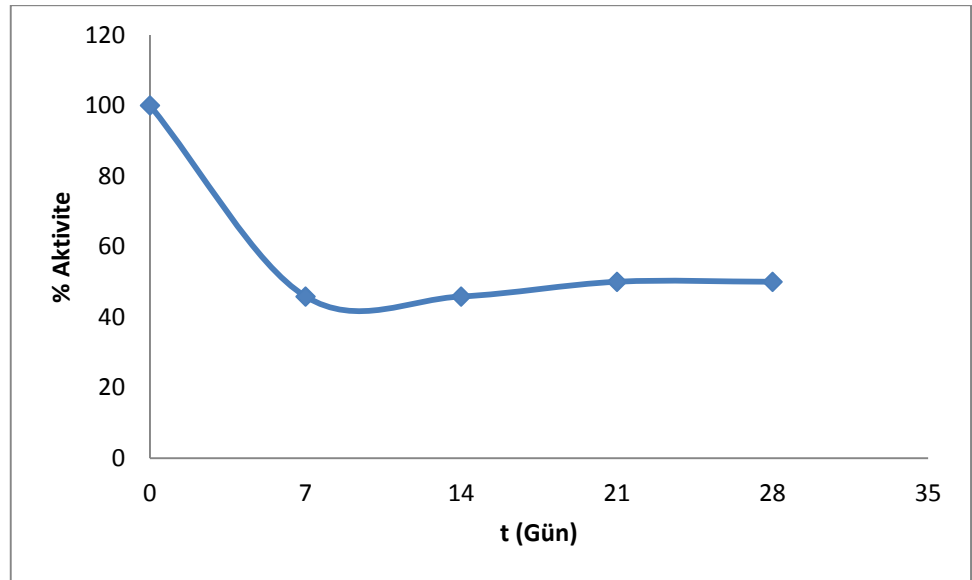
kullanılarak örnek analizi yapıldı. 6 mM H_2O_2 içerecek şekilde süt örneği hazırlandı. 6000 rpm de 15 dk santrifüjlenerek yağı uzaklaştırıldı. 6 mM H_2O_2 içerecek şekilde hazırlanan süt örneğinden ölçüm hücresinde 200 μM olacak şekilde eklemeler yapılarak (n=3) alınan ölçümlere ilişkin cevaplar standart grafiği ile kıyaslanarak değerlendirildi. Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 100mM; pH 7 fosfat tamponu; 30 °C'de gerçekleştirildi. Bulgular Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörle süte ait örnek analizi tablosu

Örnek-Süt (μM)	Biyosensör (μM)	% Fark	% Gerikazanım
200	197,5	% 1,25	% 98,7

3.2.5. PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün depo kararlılığı

Denemelerde elde edilen bulgular Şekil 3.14' de verilmiştir.



Şekil 3.14. PGE/Jelatin-Katalaz/Glutaraldehit modifiye biyosensörün depo kararlılığı.

(Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 100 mM; pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C'de gerçekleştirildi.)

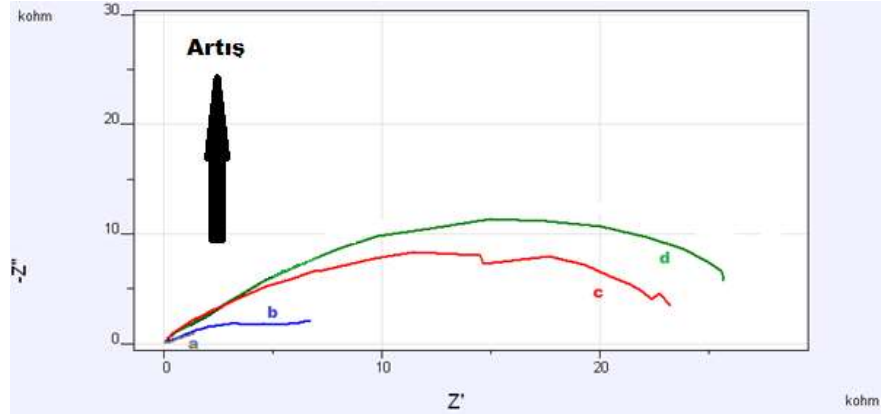
Grafik haftada bir alınan ölçümler yoluyla elde edildi. Elektrot kullanılmadığı zaman +4°C’ de buzdolabında saklandı. Grafiğe bakıldığında ilk haftada %50’lik bir aktivite kaybının olduğu daha sonra izlenen süre boyunca herhangi bir aktivite kaybının gerçekleşmediği gözlemlendi. Bu ilk haftadaki aktivite kaybı ilk işlem sonrası yıkamanın etkisiyle yüzeydeki sıkı tutunmamış enzimlerin uzaklaşmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

3.3. PGE/Nafyon/Katalaz/Glutaraldehit Modifiye Biyosensöre

İlişkin Bulgular

%1,5’luk olarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış nafyon çözeltisine 15 dk daldırılarak bekletilen PGE modifiye elektrot 70.000 U/mL’lik enzim çözeltisi içerisinde 5 dk süreyle daldırıldı ve daha sonra 5 dk % 2,5’lük glutaraldehit çözeltisine daldırılarak biyosensör hazırlandı. Bu işlem iki kez tekrar edilerek PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörü hazırlanmıştır.

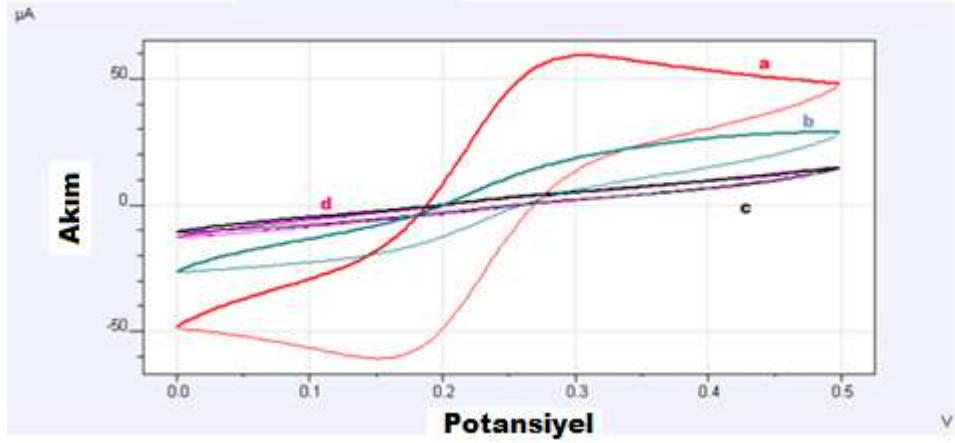
Öncelikle PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör için immobilizasyon basamakları impedimetrik ve CV yöntemleri ile incelenmiş bulgular sırasıyla Şekil 3.15 ve Şekil 3.16’de gösterilmiştir. CV ve impedans ölçümleri $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0.005 M + 0,1M KCl çözeltisinde 25 °C’ de gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.15. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehyt modifiye biyosensörün immobilizasyon basamaklarının impedimetrik diyagramı. (a. PGE, b. PGE/nafyon, c. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehyt, d. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehyt 2. işlem sonrası. İmpedans ölçümleri için frekans aralığı: 10000-0,05 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV. Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot))

Şekil 3.15’ de PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehyt modifiye biyosensörün immobilizasyon basamaklarının impedimetrik diyagramlarından anlaşıldığı gibi her bir immobilizasyon basamağı işleminden sonra PGE yüzeyindeki iletkenlik, tabakanın kalınlaşmasına bağlı olarak düşmüştür.

Şekil 3.16’ da PGE ve PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehyt modifiye elektroda ilişkin CV voltaagramları karşılaştırılmıştır. Bulgular immobilizasyon başarısını tanımlama açısından impedimetrik bulgularla uyum göstermiştir.



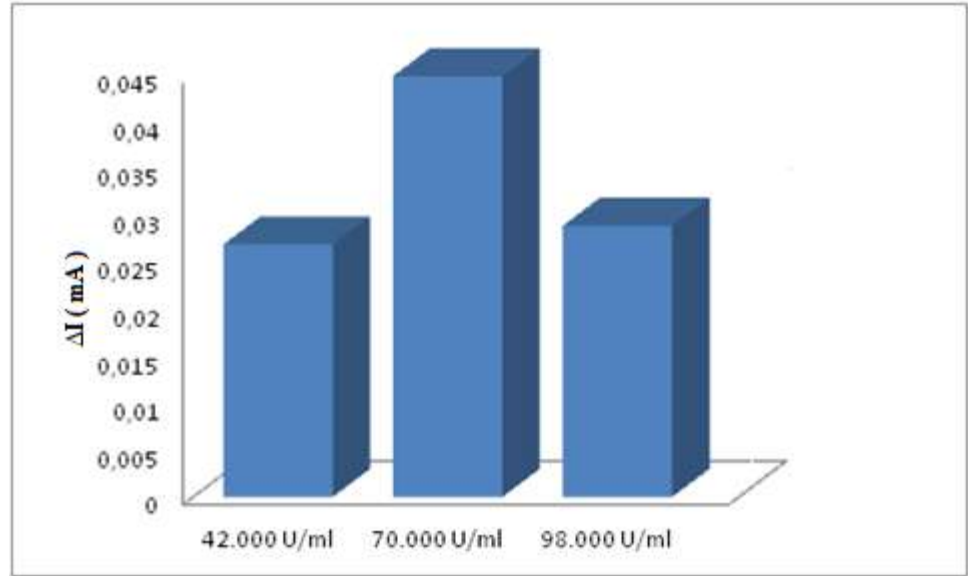
Şekil 3.16. PGE ve PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin CV voltamogramları. (a. PGE, b. PGE/nafyon, c. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit, d. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit 2. işlem sonrası. Ölçümleri $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0.005 M + 0,1M KCl çözeltisinde 25 °C’ de gerçekleştirilmiştir. Scan rate 50 mV/s)

3.3.1. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

%1,5’luk olarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış nafyon çözeltisine 15 dk daldırılarak bekletilen PGE modifiye elektrot farklı aktivitede enzim çözeltileri içerisinde 5 dk süreyle daldırıldı ve daha sonra 5 dk % 2,5’lük glutaraldehit çözeltisine daldırılarak biyosensör hazırlandı. Bu işlem iki kez tekrar edilerek PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörü hazırlanmıştır.

Ölçümler 30°C’ de 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alınmıştır. Nafyon yüzdesi, nafyonda bekletme süresi, glutaraldehitte bekletme süresi sabit tutularak enzim miktarı 98.000 U/mL, 70.000 U/mL, 42.000 U/mL olarak değiştirilerek enzim miktarı optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan katalaz miktarının biyosensör cevabı üzerine olan etkisi Şekil 3.17’de verilmiştir.



Şekil 3.17. Katalaz miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.

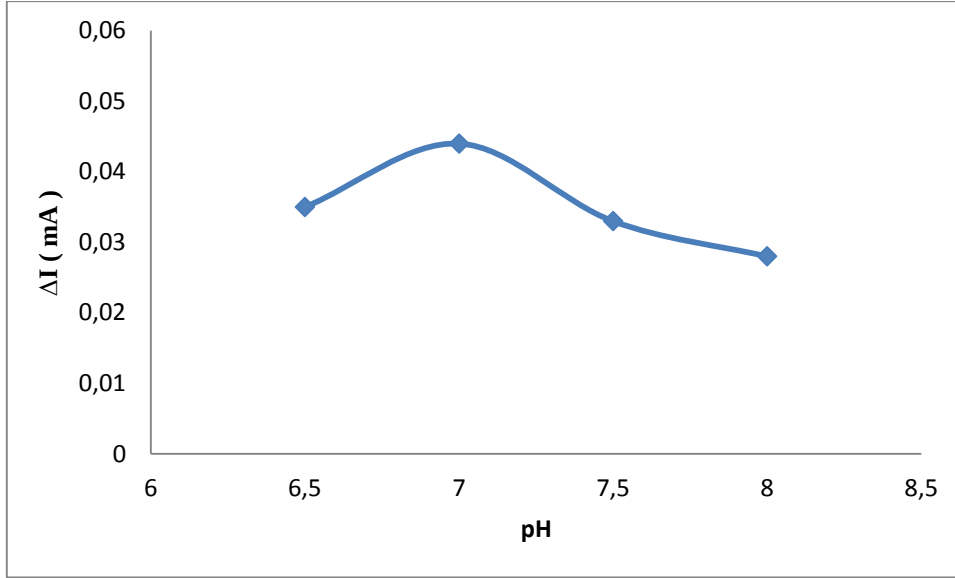
(Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C'de gerçekleştirildi.)

Farklı enzim miktarlarıyla hazırlanan PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörlerden 70.000 U/mL katalaz kullanılarak hazırlanan biyosensörün cevabı diğerlerine göre belirgin şekilde yüksektir. 42.000 U/ ml enzim aktivitesinde aktivite düşüşüne bağlı olarak biyosensör cevabı düşmüştür. 98.000 U/mL enzim aktivitesinde ise protein içeriğinin artması çapraz bağı yüzdesinin artışına yol açarak muhtemelen substrat açısından önemli bir difüzyon engeli oluşturmuştur.

3.3.2. pH'nın biyosensör cevabı üzerine etkisi

%1,5'luk olarak 50 mM pH 7 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış nafyon çözeltisine 15 dk daldırılarak bekletilen PGE modifiye elektrot 70.000 U/mL'lik enzim çözeltisi içerisine 5 dk süreyle daldırıldı ve daha sonra 5 dk % 2,5'lük glutaraldehit çözeltisine daldırılarak biyosensör hazırlandı. Bu işlem iki kez tekrar edilerek PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörü hazırlanmıştır.

Hazırlanan biyosensör ile pH'ları 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 olan 50 mM fosfat tamponları içerisinde 30°C'de ölçümler alınarak pH optimizasyonu gerçekleştirildi. Yapılan çalışmaya ilişkin bulgular Şekil 3.18'de gösterilmiştir.



Şekil 3.18. pH'nın biyosensör cevabı üzerine etkisi.

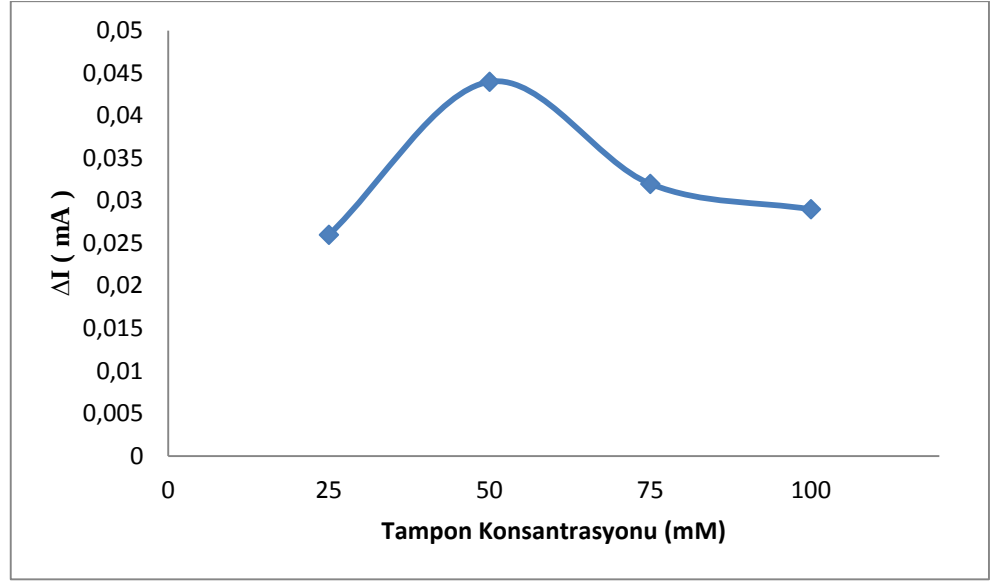
(Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM fosfat tamponu; 30 °C'de gerçekleştirildi.)

Şekil 3.18'den görüleceği üzere söz konusu biyosensörün optimum pH'sı 7,0 olarak bulunmuştur.

3.3.3. Tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi

%1,5'luk olarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış nafyon çözeltisine 15 dk daldırılarak bekletilen PGE modifiye elektrot 70.000 U/mL'lik enzim çözeltisi içerisinde 5 dk süreyle daldırıldı ve daha sonra 5 dk % 2,5'lük glutaraldehit çözeltisine daldırılarak biyosensör hazırlandı. Bu işlem iki kez tekrar edilerek PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörü hazırlanmıştır.

Hazırlanan biyosensör ile pH'ları 7,0 olan ve konsantrasyonları 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM olarak değişen fosfat tamponları içerisinde 30°C'de ölçümler alınarak tampon konsantrasyonu optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmaya ilişkin bulgular Şekil 3.19'de gösterilmiştir.



Şekil 3.19. Tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi.

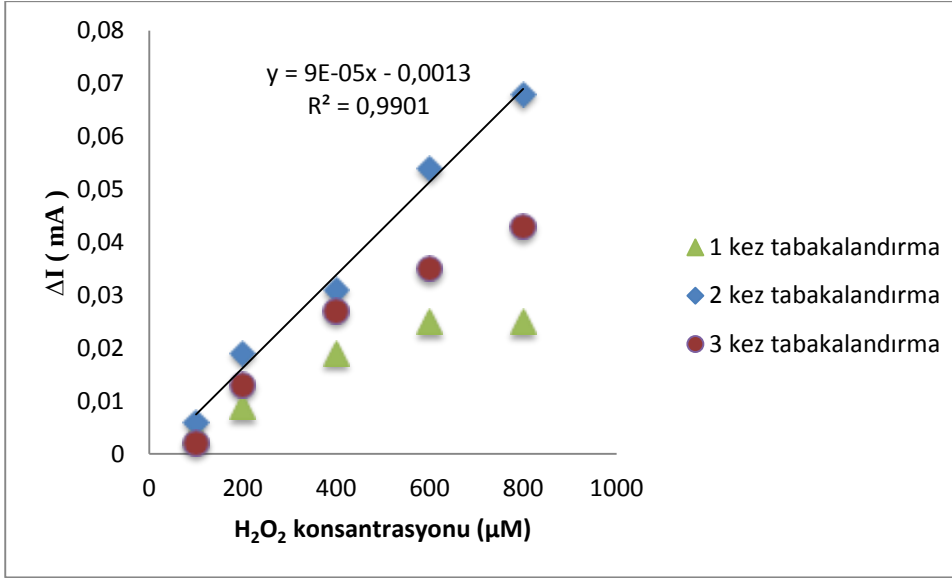
(Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,0; fosfat tamponu; 30 °C)

Şekil 3.19' dan görüldüğü üzere optimum tampon konsantrasyonu 50 mM olarak belirlenmiştir.

3.3.4. Optimum nafyon/katalaz/glutaraldehit biyoaktif tabakalandırma işlem basamağının belirlenmesi

%1,5'lük olarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış nafyon çözeltisine 15 dk daldırılarak bekletilen PGE modifiye elektrot 70.000 U/mL'lik enzim çözeltisi içerisinde 5 dk süreyle daldırıldı ve daha sonra 5 dk % 2,5'lük glutaraldehit çözeltisine daldırılarak biyosensör hazırlandı. Bu işlem 1 kez, 2 kez ve 3 kez tekrar edilerek PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit biyosensörleri hazırlandı.

Optimum tabakalandırma işlem sayısının belirlenmesi için hazırlanan biyosensörlerin kıyaslandığı grafik Şekil 3.20'de verilmiştir.



Şekil 3.20. Optimum nafyon/katalaz/glutaraldehit tabakalandırma işlem sayısının belirlenmesi. (Ölçümler -0,7 V'ta krontamperometri yöntemi kullanılarak 50mM; pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C'de gerçekleştirildi.)

Grafikten de görüldüğü üzere nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöründe enzimle 2 kez tekrar edilmiş elektrot için daha yüksek cevaplar ve doğrusal bir grafik elde edildi. Optimum tabakalandırma işlem sayısı 2 olarak seçildi. 1 kez tabakalandırma işlem sayısı ile hazırlanan biyosensörde enzim aktivitesi düşüklüğü yanı sıra tayin edilen tür olan oksijenin membranın inceliği nedeniyle dışa difüzyonunun fazlalığı biyosensör cevabının düşük elde edilmesine yol açmıştır. 3 kez tabakalandırma işlem sayısı ile hazırlanmış biyosensörde ise membrandaki teorik katalaz aktivitesi daha yüksek olsada çapraz bağ oranının fazlalığının yol açabileceği aktivite düşüşü ve/veya oluşan membranın kalınlığının yol açacağı muhtemel substrat için artan difüzyon engelinin olumsuz etkileri ile 2 kez tabakalandırma işlem sayısına nazaran daha düşük biyosensör cevapları alınmasına yol açmıştır.

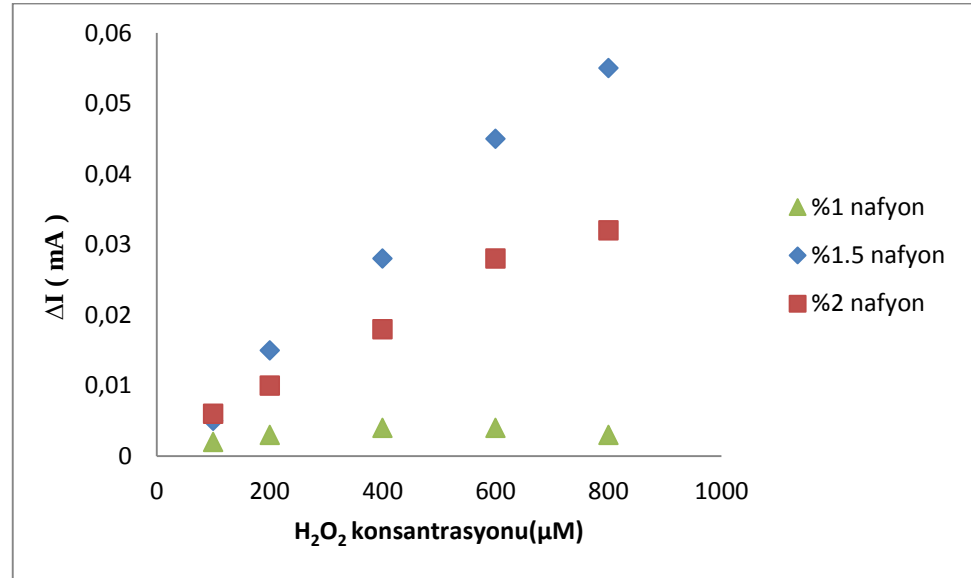
3.3.5. Nafyon yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi

%1,5'luk olarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış nafyon çözeltisine 15 dk daldırılarak bekletilen PGE modifiye elektrot 70.000 U/mL'lik enzim çözeltisi içerisinde 5 dk süreyle daldırıldı ve daha sonra 5 dk % 2,5'lük glutaraldehit çözeltisine daldırılarak biyosensör hazırlandı. Bu işlem iki

kez tekrar edilerek PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörü hazırlanmıştır.

Ölçümler 30 °C’ de 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı, nafyonda bekletme süresi, glutaraldehitte bekletme süresi ve pH ve tampon konsantrasyonu sabit tutularak nafyon yüzdesi %1, %1,5 ve %2’ lik olarak değiştirilerek nafyon yüzdesi optimizasyonu gerçekleştirildi.

Şekil 3.21’de optimum nafyon yüzdesini belirlemek için % 1,5; % 2; %3’lük nafyon çözeltisinin kullanıldığı üç farklı PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile yapılan denemelerde alınan cevapların kıyaslandığı grafik verilmiştir.



Şekil 3.21. Nafyon yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.

(Ölçümler -0,7 V’ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C’de gerçekleştirildi.)

Şekil 3.21’den görüldüğü gibi %1,5’luk nafyon ile iki kez nafyon/katalaz/glutaraldehit tabakalandırma işlemi tekrar edilerek hazırlanmış elektrot cevabı diğerlerine göre daha yüksektir. Optimum nafyon yüzdesi %1,5 olarak belirlenmiştir. %1’lik nafyon kullanımında immobilizasyon işleminde önem taşıyan nafyona ait negatif yüklerin azlığından dolayı az miktarda enzim immobilizasyona bağlı olarak düşük biyosensör cevabı alındığı düşünülmektedir.

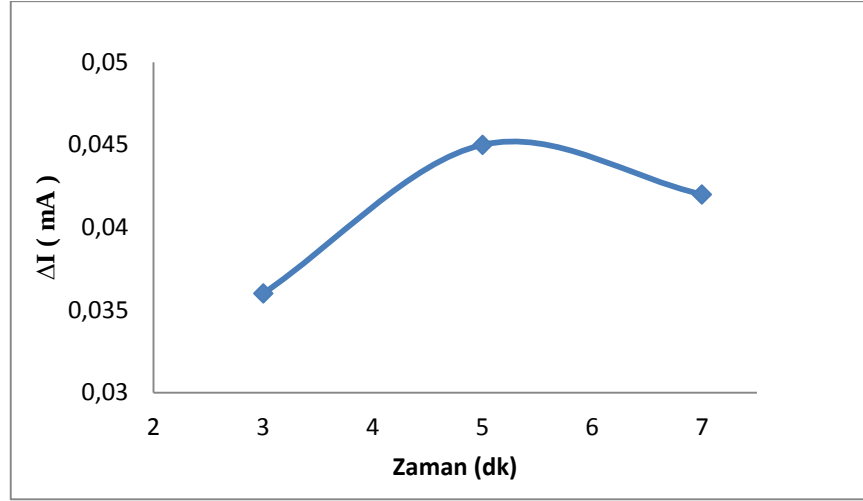
%2'lik nafyon kullanımda ise negatif yüklerin fazla olmasına bağlı olarak immobilizasyonda sterik engellemeler olduğundan %1,5 nafyona göre biraz daha düşük bir cevap verdiği düşünülmektedir.

3.3.6. Glutaraldehitte bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi

%1,5'luk olarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış nafyon çözeltisine 15 dk daldırılarak bekletilen PGE modifiye elektrot 70.000 U/mL'lik enzim çözeltisi içerisinde 5 dk süreyle daldırıldı ve daha sonra farklı sürelerde % 2,5'lük glutaraldehit çözeltisine daldırılarak biyosensör hazırlandı. Bu işlem iki kez tekrar edilerek PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörü hazırlanmıştır.

Ölçümler 30 °C' de 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı, nafyonda bekletme süresi, pH ve tampon konsantrasyonu sabit tutularak glutaraldehitte bekletme süresi 3 dk, 5 dk ve 7 dk olarak değiştirilerek glutaraldehitte bekletme süresi optimizasyonu gerçekleştirildi.

Şekil 3.22'de optimum glutaraldehitte bekletme süresini belirlemek için 3 dk, 5 dk ve 7 dk da bekletilerek hazırlanmış üç farklı PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile yapılan denemelerde alınan cevapların kıyaslandığı grafik verilmiştir.



Şekil 3.22. Glutaraldehitte bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.

(Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7 fosfat tamponu; 30 °C'de gerçekleştirildi.)

Şekil 3.22'den görüleceği üzere en yüksek biyosensör cevabı 5 dk bekletme sonrasında elde edilmiştir. 7 dk bekletmede daha fazla çapraz bağ ve substrat için daha fazla difüzyon engeli oluşturmuştur. Bu durumda biyosensör cevabında düşme ile sonuçlanmıştır. 3 dk bekletmede ise daha gözenekli ve ince bir membran oluştuğu için ölçülecek tür olan oksijenin daha kolay dışa difüzyonuna neden olan bir yapı oluşmuştur. Bu durumda daha düşük bir biyosensör yanıtına yol açmıştır.

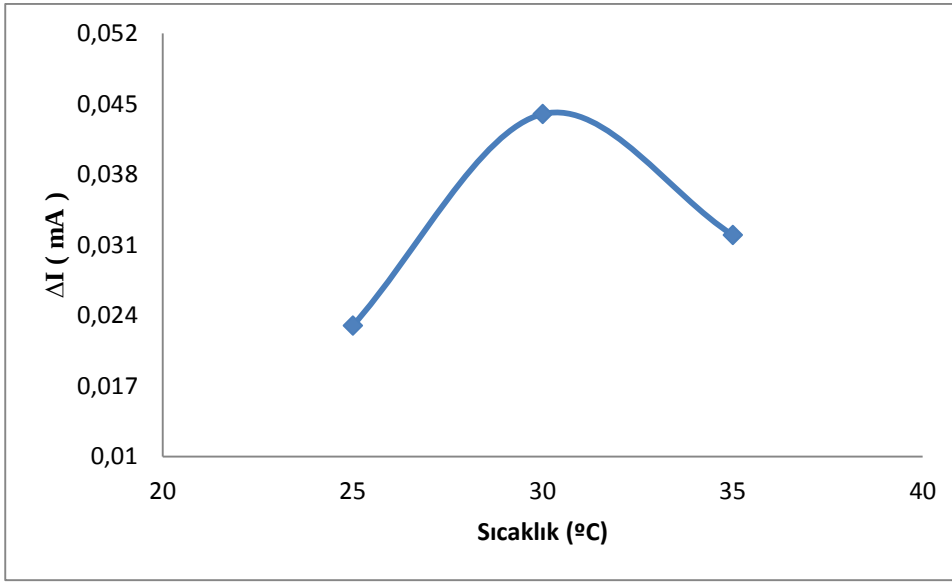
3.3.7. Sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkisi

%1,5'lük olarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış nafyon çözeltisine 15 dk daldırılarak bekletilen PGE modifiye elektrot 70.000 U/mL'lik enzim çözeltisi içerisinde 5 dk süreyle daldırıldı ve daha sonra 5 dk % 2,5'lük glutaraldehit çözeltisine daldırılarak biyosensör hazırlandı. Bu işlem iki kez tekrar edilerek PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörü hazırlanmıştır.

Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı, nafyonda bekletme süresi, glutaraldehitte bekletme süresi, pH ve tampon

konsantrasyonu sabit tutularak sıcaklık 25 °C, 30 °C ve 35 °C olarak değiştirilerek sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirildi.

H₂O₂ tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesine ilişkin çalışmalarda 25–35°C’de düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile ölçümler alınarak akım farkı değerleri izlenmiştir. Çalışmanın sonuçları Şekil 3.23’de verilmiştir.



Şekil 3.23. Sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkisi.

(Ölçümler -0,7 V’ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,0 fosfat tamponunda gerçekleştirildi.)

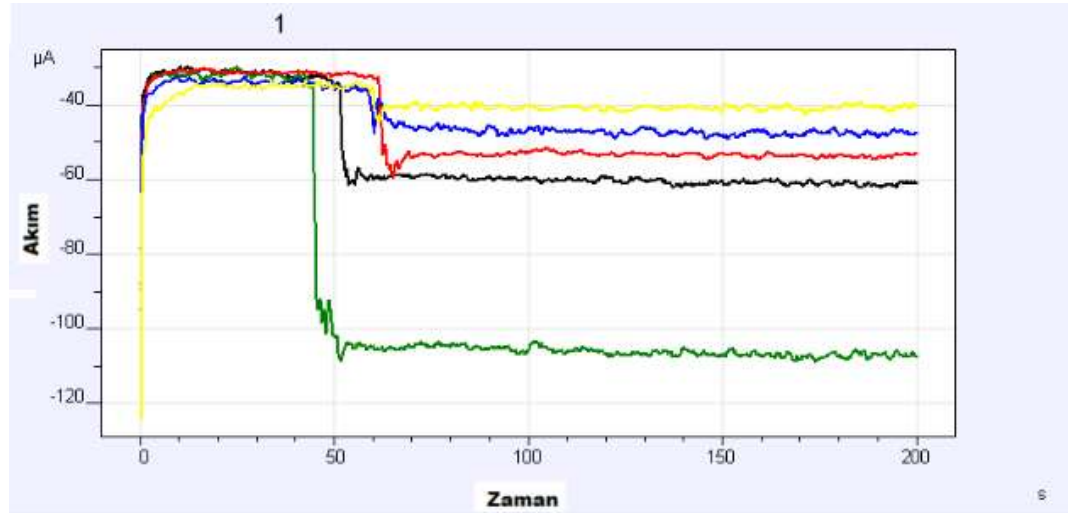
Şekil 3.23’den görüldüğü üzere PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün optimum sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiştir.

3.4. PGE/Nafyon/Katalaz/Glutaraldehit Modifiye Biyosensörün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

3.4.1. H₂O₂ için doğrusal tayin aralığı

%1,5'luk olarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış nafyon çözeltisine 15 dk daldırılarak bekletilen PGE modifiye elektrot 70.000 U/mL'lik enzim çözeltisi içerisinde 5 dk süreyle daldırıldı ve daha sonra 5 dk % 2,5'lük glutaraldehit çözeltisine daldırılarak biyosensör hazırlandı. Bu işlem iki kez tekrar edilerek PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörü hazırlanmıştır.

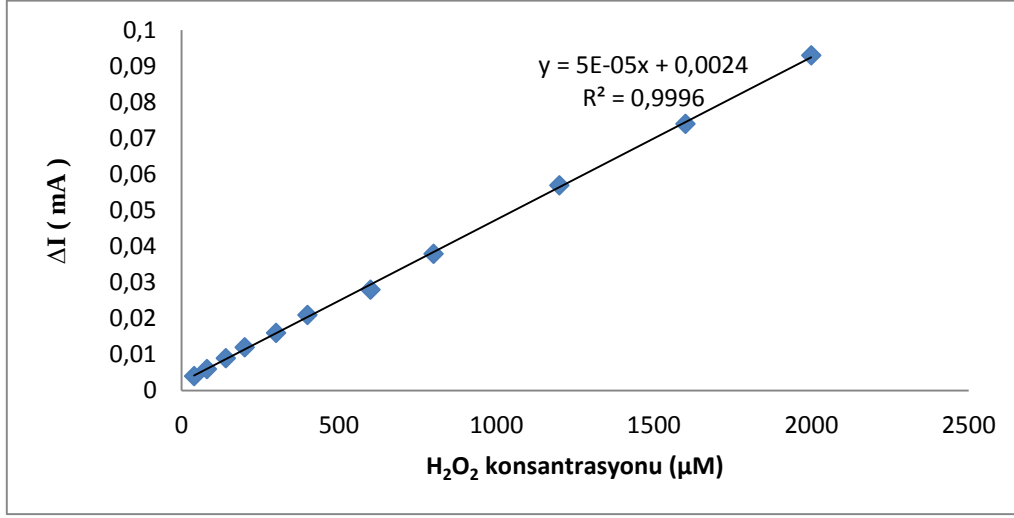
Geliştirilen PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit biyosensörlerinin hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrasında, karakterizasyonu amacıyla H₂O₂ için ölçüm aralığı belirlenmiştir. Şekil 3.24'de 40 μ M - 600 μ M arası amperometrik ölçümler Şekil 3.25'de ise PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörüne ilişkin doğrusal tayin aralığı grafiği verilmiştir.



Şekil 3.24. -0.7V'ta 80 μ M – 1600 μ M H₂O₂ konsantrasyon aralığındaki amperometrik ölçümler. (sarı:80 μ M, mavi:200 μ M, kırmızı:400 μ M, siyah:600 μ M, yeşil:1600 μ M H₂O₂ konsantrasyonuna karşılık gelen amperometrik cevaplar)

Şekil 3.24 'de görüldüğü gibi artan H₂O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak katalaz enziminin verdiği reaksiyon sonucunda açığa çıkan O₂ miktarı artar. O₂

miktarındaki bu artış kalem elektrot yüzeyindeki reaksiyon uyarınca amperometrik ölçümlerde negatif yönde artış olarak gözlenmiştir.



Şekil 3.25. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit biyosensörüne ilişkin doğrusal tayin aralığı grafiği. (Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C'de gerçekleştirildi.)

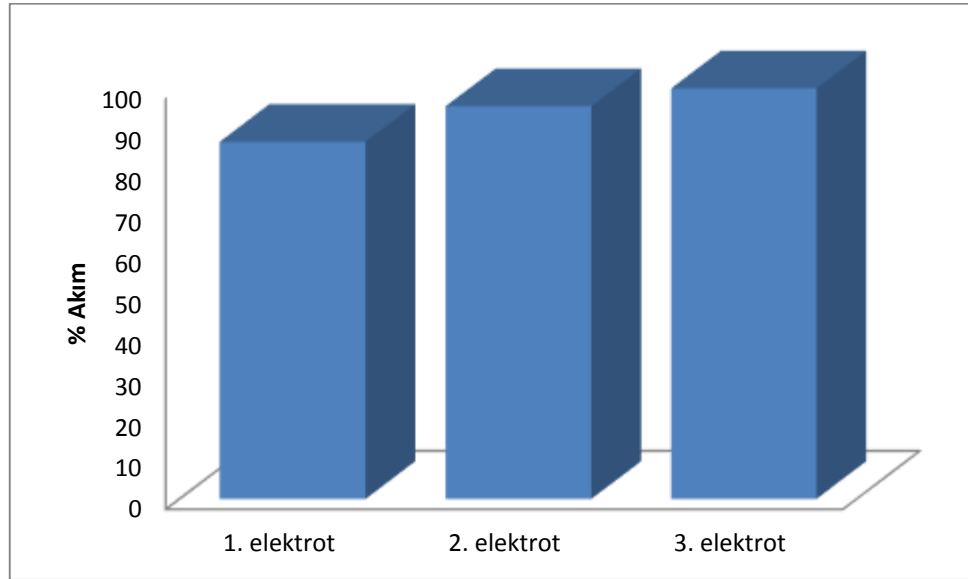
Şekil3.25'den anlaşıldığı üzere geliştirilen PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit biyosensörlerinin doğrusal tayin aralığı 20 μM - 2800 μM arasında yapılan ölçümler sonucunda 40 μM - 2000 μM olarak bulunmuştur.

3.4.2. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirliği

%1,5'lük olarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış nafyon çözeltisine 15 dk daldırılarak bekletilen PGE modifiye elektrot 70.000 U/mL'lik enzim çözeltisi içerisine 5 dk süreyle daldırıldı ve daha sonra 5 dk % 2,5'lük glutaraldehit çözeltisine daldırılarak biyosensör hazırlandı. Bu işlem iki kez tekrar edilerek PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörü hazırlanmıştır.

Bu çalışmada aynı yöntemle PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye üç ayrı biyosensör hazırlandı ve -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemiyle yapılan

ölçümlerde 600 μM H_2O_2 derişimine verdiği cevaplar kıyaslandı. Elde edilen bulgular Şekil 3.26’de gösterilmiştir.



Şekil 3.26. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirlik grafiğı. (50 mM; pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C)

Şekil 3.25’den görüldüğü gibi aynı yöntemle ayrı ayrı hazırlanmış üç PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit biyosensörünün 600 μM H_2O_2 derişimine verdiği cevaplar arasında %5 ile %14 arasında fark vardır.

3.4.3. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile alınan yanıtların tekrarlanabilirliğı

Bu çalışmada hazırlanan H_2O_2 biyosensörünün tekrarlanabilirliğı incelendi. Ölçüm hücresi içerisinde 600 μM H_2O_2 olacak şekilde eklemeler yapılarak ölçümler -0,7 V’ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C’de gerçekleştirildi. Beş kez tekrar edilen ölçümler (n=5) ve çizilen standart grafik yardımıyla örnek derişimleri saptandı.

Ortalama değeri ($\bar{x}$), standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayısı (% V.K.) Çizelge 3.4’de verilmiştir. Elde edilen veriler kabul edilebilir sınırdadır.

Çizelge 3.4. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye elektrota ait tekrarlanabilirlik tablosu.
(50 mM; pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C)

Aritmetik Ortalama ($\bar{x}$)	Standart sapma (S.S)	Varyasyon katsayısı (%)
610 μ M	$\pm 20,12$ μ M	3,29

3.4.4. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile örnek analizi

Çalışmanın bu bölümünde hazırlanan PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile kutu sütte H_2O_2 analizi yapılarak uygulanabilirliği araştırıldı.

Diğer metoda ilişkin analiz kısmında belirtilmiş olduğu gibi WHO ve FAO bazı ülkelerde H_2O_2 'nin içme sütlerine 0,1-0,4 g/L oranında katılmasına izin vermektedir. Bu değerler 3 mM ile 10 mM a karşılık gelir.

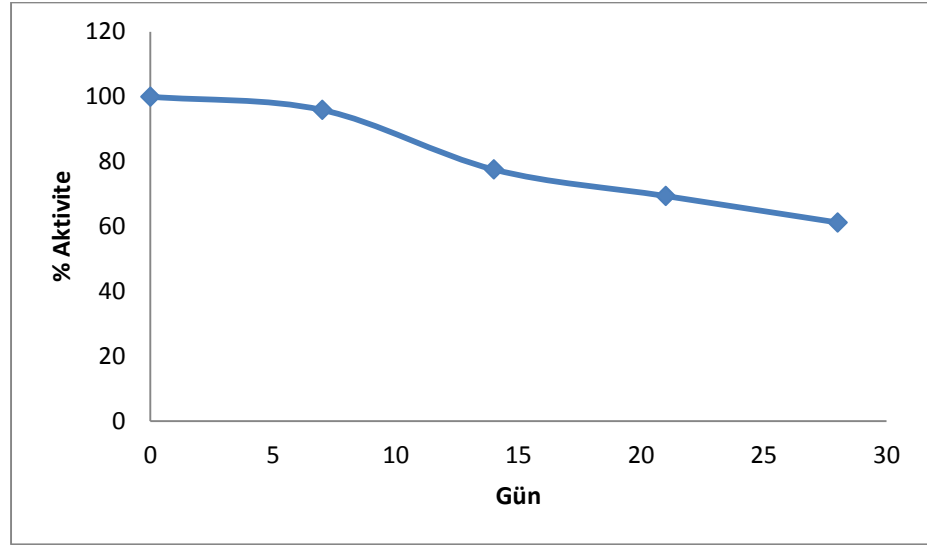
Süt örneklerinde de bu değer aralığında olacak şekilde standart katma yöntemi kullanılarak örnek analizi yapıldı. 6 mM H_2O_2 içerecek şekilde süt örnekleri hazırlandı, 6000 rpm de 15 dk santrifüjlenerek yağı uzaklaştırıldı. 6 mM olarak hazırlanan süt örneğinden ölçüm hücresi içerisinde 200 μ M olacak şekilde eklemeler yapıldı. Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,0 fosfat tamponu; 30° C'de gerçekleştirildi. Alınan ölçüm cevapları standart grafiği cevapları ile kıyaslanmıştır.

Çizelge 3.5. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ait örnek analizi bulguları.
(50 mM; pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C)

Örnek-Süt (μ M)	Biyosensör (μ M)	% Fark	Gerikazanım (%)
200	180	% 10	% 90

3.4.5. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün depo kararlılığı

Hazırlanan biyosensör kullanılmadığı zamanlarda +4°C’de saklandı. Denemelerde elde edilen bulgular Şekil 3.27’ de verilmiştir.



Şekil 3.27. PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün depo kararlılığı
(Ölçümler -0,7 V’ta krontamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,0 fosfat tamponu; 30°C’de gerçekleştirildi.)

Şekil 3.27’den anlaşıldığı üzere ilk haftada % 5’lik, ikinci haftada % 23’lük, üçüncü haftada % 31’lik, dördüncü haftada % 39’luk bir aktivite kaybının olduğu gözlenmiştir.

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Kalem grafit elektrot sıklıkla elektrokimyasal sensör olarak ve DNA etkileşimlerine dayalı biyosensörlerle kullanılmaktadır. Bu çalışmada kalem grafit elektrodun enzim temelli biyosensörlerde kullanıma potansiyeli araştırılmış ve kalem grafit elektrotla tasarlanan biyosensör çalışmalarına yeni ve orjinal bir bakış açısı getirilmiştir. Bu çalışma kapsamında iki farklı biyosensör tasarlanmıştır.

Oluşturulan biyosensör sistemlerinde kalem grafit elektrot (PGE) yüzeyine katalaz enzimi immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve H_2O_2 tayini yapılmıştır. Bu çalışma esnasında tasarlanan biyosensör sistemlerinden birincisinde kalem grafit elektrot yüzeyine katalaz enziminin jelatin ve glutaraldehit yardımıyla immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir (PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit). Geliştirilen bir diğer biyosensör sisteminde ise kalem grafit elektrot yüzeyine katalaz enziminin immobilizasyonu nafyon ve glutaraldehit yardımıyla gerçekleştirilmiştir (PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit). Tasarlanan biyosensör sistemleriyle ölçümler -0,7 V'ta amperometrik metotla yapılmıştır. (H_2O_2 konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak negatif yönde artan akım değerlerinden çıkılarak tayin yapılmıştır.)

Tasarlanan her bir biyosensör için optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışma koşullarının optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde PGE/jelatin-katalaz/Glu H_2O_2 biyosensörü için çalışma tamponu olarak 100 mM pH 7,0 fosfat tamponu ve çalışma sıcaklığı olarak 30°C, PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye H_2O_2 biyosensörü için 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu ve çalışma sıcaklığı olarak 30°C bulunmuştur. Tasarlanan biyosensörler için yapılan karakterizasyon çalışmalarında ise PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye H_2O_2 biyosensörü için 20 μM – 1400 μM konsantrasyon aralığında, PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye H_2O_2 biyosensörü için ise 40 μM - 2000 μM konsantrasyon aralığında H_2O_2 için doğrusal sonuçların alındığı belirlenmiştir. Tasarlanan her bir biyosensör için tekrarlanabilirlik denemelerinde PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye H_2O_2 biyosensörü için (n=10) 600 μM H_2O_2 konsantrasyonunda standart sapma (S.S) =

$\pm 2,33$ ve % varyasyon katsayısı (V.K) = 0,38, alt tayin limiti= 6,99 μM , PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit H_2O_2 biyosensörü için (n=5) 600 μM H_2O_2 konsantrasyonunda standart sapma (S.S) = $\pm 20,12$ ve % varyasyon katsayısı (V.K) = 3,29, alt tayin limiti = 60,36 μM olarak bulunmuştur. Ayrıca tasarlanan biyosensörlerle süt örneklerinde H_2O_2 tayini yapılmış gerikazanım yüzdeleri PGE/jelatin-katalaz/glutaraldehit modifiye H_2O_2 biyosensörü için %98,7 ve PGE/nafyon/katalaz/glutaraldehit modifiye H_2O_2 biyosensörü için %90 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak bu yüksek lisans tezi kapsamında kalem grafit elektrotların özelde H_2O_2 tayini için katalazın kullanıldığı biyosensörler hazırlanmasında genelde ise enzim temelli biyosensörler hazırlanmasında başarıyla kullanılabilceğini gösterilmiştir. Sonuçlar literatüre önemli bir yenilik kazandıracak niteliktedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akyılmaz, E. ve Dinçkaya, E.**,2000, A mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate based alcohol oxidase electrode for alcohol determination in serum, *Talanta*,53,505-509p.
- Andrieux,C.P., Audebert P., Divisia-Blohorn B.,Aldebert P.,Michalak F.**,1990,Electrochemistry in hydrophobic nafion gels, *J. Electroanal. Chem.*,296, 117–139p.
- Arshak K., Mohamed Z, Souna E., Anthony T.**,2008,Principles of bacterial detection:biosensors, recognition receptorsand microsystems, Springer Science and Business Media, New York.
- Bartlett, P.N.**,1990,Biosensors,(Cass, A.E.G. ed.),Oxford University Press, Oxford, 42p.
- Bergmeyer, J. and Grabl M.**,1983,Methods of Enzymatic Analysis,Germany, 190-302p.
- Canbay E.**, 2013, Çok duvarlı karbon nanotüp nafyon sistemin modifiye tirozinaz biyosensörü tasarımı ve dopamin tayinine adaptasyonu, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Ent.,24s.
- Chambers J.P., Arulanandam B.P., Matta LL, Weis A, Valdes JJ.**, 2008,Biosensor recognition elements. *Curr Issues Mol Biol*;10(1-2):1-12p.
- Dilgin, Y., Kızılkaya, B., Erteka, B., Işık, F., Dilgin, G.D.**,2012, Electrocatalytic oxidation of sulphide using a pencil graphite electrode modified with hematoxylin, *Sensors and Actuators B* 171– 172, 223– 229p
- Dinçkaya, E.**, 1999, Enzim Sensörleri, *Biyosensörler* (Ed.Azmi Telefoncu), Ege Ün.Yayınları, 81-142s.
- Dogan-Topal, B. ve Ozkan, S.A.**, 2011, Electrochemical determination of anticancer drug fulvestrant at dsDNA modified pencil graphite electrode , *Electrochimica Acta*, 56, 4433–4438p.
- D'Souza S. F.**, 2001, Microbial biosensors, *Biosens Bioelectron*;16(6), 337-353p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ensafi, A. A., Heydari-Bafrooei, E., Amini, M.,** 2012, DNA-functionalized biosensor for riboflavin based electrochemical interaction on pretreated pencil graphite electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 31, 376– 381p.
- Espesito, E., Cortesi, R., Nastrazzi, C.,** 1995, Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties, *Biomaterials*, 20, 2009-2020p.
- Furbee Jr. J.W., Thomas C.R., Kelly R.S., Malachowski M.R.,**1993, Mediated electrochemical reduction of cytochrome C and tyrosinase at perfluorosulfonated ionomer coated electrodes, *Anal. Chem.*, 65, 1654-1657p.
- Gao W., Song J., Wu N.,** 2005, Voltammetric behavior and square-wave voltammetric determination of trepibutone at a pencil graphite electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 576, 1–7p.
- Hallwel, B. and Gutteridge, J.M.,** 1990, *Methods Enzymology*, 186:185p.
- Higashi, T., Kavamata, F., Sakamoto, T.,** 1974, Studies on rat liver Catalase.VII. double-labeling of catalase by ¹⁴C-leucine and ³H-d- aminolevulinic acid, *J Biochem, Tokyo*, 76: 703-708p.
- HSDB., Hazardous Substances Data Bank,** 1996, National Library of Medicine, Bethesda, Md (Tomes cd-rom Version), Denver, CO: Micromedex, Inc.
- Jones, G.L., Masters, C.J.,**1976, On the comparative characteristics of mammalian catalases, *Biochemistry and Molecular Biology*; 55(4): 511-518p.
- Karabulut A.B., Özerol E., Temel İ., Gözükar E.M., Akyol Ö.,** 2002, Yaş ve sigara içiminin eritrosit katalaz aktivitesi ve bazı hematolojik parametreler üzerine etkisi, *İnönü Univ Tıp Fak. Dergisi*, 9 (2), 85-88s.
- Kapoor, M.,** 1996, How to cross-link proteins, Cellular, Molecular and Microbial Biology Division, University of Calgary, Calgary, Canada, T2N 1N4.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ.**, 1997, Biyokimya, Muhtelif Kısımlar, Şafak Yayınevi, Erzurum, 36s.
- Lanır, A., Schejter, A.**, 1975, On the Sixth Coordination Position of Beef Liver Catalase, FEBS Lett. 15, 55 (1):254–256p.
- Lei Y., Chen W., Mulchandani A.**, 2006, Microbial biosensors, Anal Chim Acta; 568(1-2),200-210p.
- Liu H.-Y. and Deng J.-Q.**, 1995, An Amperometric Lactate Sensor Employing Tetrathiafulvalene in Nafion Film as Electron Shuttle, Electrochim. Acta, 40, 1845-1849p.
- Masters C. and Holmes R.**, 1977, Peroxisome: New aspects of cell physiology and biochemistry, Physiol Rew, 57, 866-882p.
- McCreery R.L.**, 1991, Carbon electrodes: structural effects on electron transfer kinetics, in: A.J. Bard (Ed.), Electroanalytical Chemistry, vol. 18, Marcel Dekker, New York.
- Mirmoghtadaie,L., Ensafi, A.A., Kadivar,M., Norouzi, P.**, 2013, Highly selective electrochemical biosensor for the determination of folic acid based on DNA modified-pencil graphite electrode using response surface methodology, Materials Science and Engineering: C, 1753–1758p.
- Newman, J.D., Tigwell, L.J., Warner, P.J., Turner, A.P.F.**, 2001, Biosensors: boldly going into the new millennium, Sensor Review, 21, 268 – 271p.
- O’Connell, P. and Guilbault G.**, 2001, Future Trends in Biosensor Research, Analytical Letters 34(7), 1063–1078p.
- Odacı, D., Timur, S., Telefoncu, A.**, 2004, Immobilized jarusalem artichoke (Helianthus tuberosus) tissue electrode for phenol detection, Artificial Cells, Blodd Substitutes, and Biotechnology, 32, 2, 315-323p.
- Özcan, A., Şahin, Y.**, 2011, A novel approach for the determination of paracetamol based on the reduction of N-acetyl-p-benzoquinoneimine formed on the electrochemically treated pencil graphite electrode, Analytica Chimica Acta,685, 9–14p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Proske D., Blank M., Buhmann R., Resch A.**, 2005, Aptamers--basic research, drug development, and clinical applications, Appl Microbiol Biotechnol.;69(4):367-74p.
- Rasooly A.**, 2005, Biosensor Technologies Methods, 1-3p.
- Rice M.E., Z. Galus, R.N. Adams, J.**, 1983, Electroanal. Chem. 143, 89p.
- Robertson, D.E.**, 2004, Catalases, U.S.P. No: 20040005655.
- Rose, P.J., Mark, H.F., Bikales, N.M., Overberger, C.G., Menges, G., Kroscwitz, J.I.**, 1987, Encyclopedia of polymer science and enngineering, vol.7, Wiley Interscience, New-York, 89p.
- Seriner, R.**, 2010, Katalaz enziminin hıyardan (Cucimus Sativus) saflaştırılması, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 34s.
- Sezgintürk, M.K. ve Dinçkaya, E.**, 2004, Direct determination of sulfite in food samples by a biosensor based on plant tissue homogenate, Talanta 65, 998-1002p.
- Sezgintürk, M.K., Göktuğ, T., Dinçkaya, E.**, 2005, Detection of benzoik asit by an amperometric inhibitor biosensor on mushroom tissue homogenate, Food Technol. Biotechnol. 43 (4), 329-334p.
- Sumner J.B.**, 1937, Dounce AL: Crystalline catalase, J Biol Chem, 121, 417-424p.
- Thomas, S. and Russell, A.D.**, 1974, Temperature-induced changes in the sporocidal activity and chemical properties of glutaraldehyde, Applied Microbiology, 28(3), 331-335p.

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Zeynep ÇELİK

Doğum tarihi, yeri : 25.05.1990- Fethiye

Medeni hali : Bekâr

Uyruğu : T.C

Adres: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü 35100
Bornova/İZMİR

Tel : 0 554 472 69 76

e-mail: 001zeynepcelik@gmail.com

Eğitim Durumu:

OKUL	DERECE	YIL
Fethiye Yunus Nadi İlköğretim Okulu	İlköğretim	1997-2004
Fethiye Lisesi	Lise	2004-2007
Ege Üniversitesi	Yabancı Dil	2007-2008
Ege Üniversitesi	Lisans, Biyokimya	2008-2012
Ege Üniversitesi	Yüksek Lisans, Biyokimya	2013-Halen devam ediyor

Görev aldığı Projeler

BAP - 2013 FEN 056- Kalem Grafit Elektrotların Pratik ve Ekonomik Enzim Temelli Biyosensörler Hazırlanmasında Sensör Olarak Kullanılma Potansiyelinin Araştırılması (2013-2015)

.

