

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***Pseudomonas fluorescens* Hücrelerini Temel Alan**
I.ve II. Nesil Biyosensörlerin
Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu

Fatma YENİ

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 405.05.01.

Sunuş Tarihi: 08.01.2009

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Suna TİMUR

Bornova-İZMİR

Fatma YENİ tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “*Pseudomonas fluorescens* Hücrelerini Temel Alan I. ve II. Nesil Biyosensörlerin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu” 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 08.01.2009 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri: İmza

Jüri Başkanı :

Raportör Üye:

Üye :

ÖZET***Pseudomonas fluorescens* Hücrelerini Temel Alan
I. ve II. Nesil Biyosensörlerin
Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu**

YENİ, Fatma

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez yöneticisi: Doç. Dr. Suna TİMUR

Ocak 2009, 68 sayfa

Bu tez projesi kapsamında I. ve II. nesil mikrobiyal biyosensör sistemleri tasarlandı. Gram negatif bakteri olan *Pseudomonas fluorescens* hücreleri fiziksel adsorbsiyon ile yumurta kabuğu membranına immobilize edildi. Glukozun substrat olarak kullanılmasıyla biyosensör sistemleri optimize edilerek, analitik karakterizasyonları gerçekleştirildi.

I. nesil biyosensöre ilişkin, en ideal hücre miktarı $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, optimum pH 7,0 ve optimize edilen koşullarda glukoz için doğrusal tayin aralığı $5\mu\text{M}$ - $25\mu\text{M}$ olarak belirlendi. Tekrarlanabilirlik denemelerinde $10\mu\text{M}$ glukoz için (n=5) standart sapma (S.D) $\pm 0,405\mu\text{M}$ ve varyasyon katsayısı (cv) % 4,09 olarak bulundu. Operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla 4 saat boyunca 30 dakika aralıklarla ölçümler alındı ve biyosensör cevabının sadece % 7 oranında azaldığı gözlemlendi. Biyosensörün substrat spesifikliğı ayrıca incelendi.

VI

II. nesil biyosensör sistemleri için medyatör olarak potasyum hegzasiyanoferrat (III), (HCF) ve ferrosen kullanıldı. Daha önce I. nesil biyosensör sistemi için bulunan optimum hücre miktarı ($7,02 \times 10^9$ hücre/ml) ve optimum tampon sistemi (pH 7,0, 50 mM'lık potasyum fosfat tamponu) kullanılarak, en yüksek sensör cevabı veren medyatör miktarları araştırıldı. Glukoz için doğrusal tayin aralıkları ferrosen medyatörlü biyosensör sistemi için 60 μ M - 750 μ M, HCF medyatörlü biyosensör sistemi için ise 10 μ M - 40 μ M olarak belirlendi. Tekrarlanabilirlik denemelerinde (n=5) ferrosen için 250 μ M, HCF için 25 μ M glukoz standart çözeltisi kullanıldı. Ferrosen medyatörlü biyosensör için standart sapma (S.D) $\pm 10,18$ μ M ve varyasyon katsayısı (cv) % 4,57, HCF medyatörlü için ise $\pm 1,004$ μ M ve %3,99 olarak hesaplandı. Operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla 4 saat boyunca 30 dakika aralıklarla alınan ölçümler sonucunda, ferrosen kullanılan biyosensör için % 24, HCF medyatörlü biyosensör için ise sadece % 3 oranında aktivite kaybı olduğu gözlemlendi. Substrat spesifiklikleri medyatörlü sistemler için ayrıca incelendi.

Anahtar kelimeler: Mikrobiyal biyosensör, yumurta kabuğu membranı, medyatörlü mikrobiyal sensör, *Pseudomonas fluorescens*.

ABSTRACT

**Mediated and non-Mediated Microbial Sensors based on
Pseudomonas fluorescens Cells**

YENI, Fatma

Master of Science Thesis, Biochemistry Department

Supervisor: Doç. Dr. Suna TIMUR

January 2009, 68 pages

In this project, mediated and non-mediated microbial biosensors were designed. *Pseudomonas fluorescens* which are gram negative bacterium were immobilized on to the eggshell membrane via physical adsorption. Optimization and characterization studies were carried out by glucose substrate.

According to the optimization studies, for the non-mediated system, optimum cell amount and pH were found to be as 7.02×10^9 cell/ml and 7.0. Under these conditions, linearity for the glucose was in the range of 5 μ M and 25 μ M. As for the repeatability, 5 subsequent measurements were taken for 10 μ M glucose. Standard deviation (S.D) and coefficient of variation (c.v) were calculated as ± 0.405 μ M and 4.09 %. For the operational stability, sensor responses were followed during 4 hours in 30 minutes intervals and only 7 % drop was observed at the end of this period. Substrate specificity of the proposed syetem was also investigated.

In the second part, Potassium hexacyanoferrate III (HCF) and ferrocene mediated microbial sensors were developed and at the first, the

VIII

effect of mediator amounts on the sensor response were investigated by using glucose as the substrate. In these studies biosensors with the optimum cell amount (7.02×10^9 cell/ml) detected for non-mediated system and potassium phosphate buffer (pH 7.0, 50 mM) were used. The linear detection ranges of glucose were found in the range of 10 μ M and 40 μ M and 60 μ M and 750 μ M for ferrocene and HCF mediated systems, respectively. Moreover, Standard deviation (S.D) and coefficient of variation (c.v) values were calculated as $250 \mu\text{M} \pm 10.18 \mu\text{M}$ and 4.57 % $25 \mu\text{M} \pm 1.004 \mu\text{M}$ and 3.99% for ferrocene and HCF mediated biosensors. Operational stability experiments were done as mentioned before for both types of mediated biosensors, while 24 % decrease was obtaining for ferrocene mediated biosensor, only 3 % drop was found for HCF mediated system. Substrate specificities were also investigated for both types of biosensors.

Keywords: Microbial biosensor, eggshell membrane, mediated microbial sensor, *Pseudomonas fluorescens*.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca değerli görüş ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Doç. Dr. Suna TİMUR 'a, bu aşamaya gelmemde önemli katkıları olan tüm hocalarıma ve ayrıca Araş. Gör. Dilek ODACI'ya, beni daima destekleyen aileme ve nişanlım Murat HÜSMEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2008 FEN 017 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIX
SİMGELER VE KISALTMALAR	XX
1. GİRİŞ	1
1.1 Biyosensörlere Genel Bakış	1
1.1.1 Elektrokimyasal biyosensörler	3
1.1.2 Mikrobiyal biyosensörler	11
1.1.3 Glukoz biyosensörleri	20
1.2 Yumurta Kabuğu Membranı	20

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2. MATERYAL VE METOD	23
2.1 Materyal	23
2.1.1 <i>P. fluorescens</i> hücrelerinin kültivasyonu	24
2.1.2 Yumurta kabuğu membranının hazırlanması	25
2.1.3 Karbon pasta elektrodun hazırlanması	26
3. I. NESİL MİKROBİYAL BİYOSENSÖRLER	27
3.1 I. Nesil Mikrobiyal Biyosensörlere İlişkin Ölçüm Yöntemi ...	27
3.2 I. Nesil Mikrobiyal Biyosensörlerin Hazırlanması	28
3.2.1 I. Nesil mikrobiyal biyosensörlere ilişkin optimizasyon çalışmaları.....	28
3.3 I. Nesil Mikrobiyal Biyosensörlerin Analitik Karakterizasyonuna ilişkin çalışmalar	29
3.3.1 Doğrusal tayin aralığı	29

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.3.2 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği	30
3.3.3 Operasyonel kararlılık	30
3.3.4 Substrat spesifikliği	30
4. II. NESİL MİKROBİYAL BİYOSENSÖRLERE İLİŞKİN ÇALIŞMALAR	31
4.1 II. Nesil Mikrobiyal Biyosensörlerin Hazırlanması	31
4.2 II. Nesil Mikrobiyal Biyosensörlere İlişkin Optimizasyon Çalışmaları	32
4.2.1 Döngüsel voltammetri ile çalışma potansiyelinin belirlenmesi	32
4.2.2 Optimum medyatör konsantrasyonunun belirlenmesi.....	32
4.3 II. Nesil Mikrobiyal Biyosensörlerin Analitik Karakterizasyonlarına İlişkin Çalışmalar	33
4.3.1 Doğrusal tayin aralığı	33
4.3.1 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği	33
4.3.3 Operasyonel kararlılık.....	34

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.3.4 Substrat spesifikliği	34
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	35
5.1 I. Nesil Mikrobiyal Biyosensörlere İlişkin Sonuçlar	35
5.1.1 I. Nesil mikrobiyal biyosensörlerin optimizasyonuna ilişkin sonuçlar.....	35
5.1.3 I.Nesil mikrobiyal biyosensörün analitik karakterizasyonuna ilişkin sonuçlar.....	39
5.2 II.Nesil Mikrobiyal Biyosensörlere İlişkin Sonuçlar	43
5.2.1 II. Nesil mikrobiyal biyosensörlerin optimizasyonuna ilişkin sonuçlar.....	43
5.2.2 II.Nesil mikrobiyal biyosensörlerin analitik karakterizasyonuna ilişkin sonuçlar.....	47
6. GENEL DEĞERLENDİRME	54
KAYNAKLAR DİZİNİ	57
ÖZGEÇMİŞ.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Biyosensörlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi	2
1.2 Medyatörsüz amperometrik biyosensörün şematik gösterimi (E_{Red} , E_{Ox} ; indirgenmiş ve yükseltgenmiş enzimler)	6
1.3 Medyatörlü amperometrik biyosensörün şematik gösterimi (E_{Red} , E_{Ox} ; indirgenmiş ve yükseltgenmiş enzimler; Med_{Red} , Med_{Ox} : indirgenmiş ve yükseltgenmiş medyatörler)	7
1.4 Mikrobiyal biyosensörün şematik gösterimi	13
1.5 İmmobilizasyon teknikleri (a) Çözünmez adsorban yüzeye non- kovalent olarak adsorblanma, (b) Çözünmez matrikse kovalent bağlama; (c) Biyokomponentin çapraz bağlanmış polimer matrikste tutuklanması, (d) Yarı geçirgen membranda tutuklanmış biyokomponent.....	16
1.6 <i>Pseudomonas fluorescens</i> hücrelerine ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü (Odaci et al., 2008)	18
1.7 Taramalı elektron mikroskopisi ile yumurta kabuğu membranının dış tarafından alınan görüntü (F. Yi et al.,2004)	21
5.1 <i>P. fluorescens</i> hücrelerinin büyüme profili	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
5.2 Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisi (pH 7; 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25 °C, -700 mV, her bir hata çubuğu 2 ya da ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)	37
5.3 Biyosensör cevabına pH'nın etkisi (50 mM potasyum fosfat tamponu, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, 250 mM glukoz, 25 °C, -700mV, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).....	38
5.4 Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (pH 7,0, 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25 °C, -700 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 yada 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)	40
5.5 I. Nesil mikrobiyal biyosensörlerde analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği (n=5) (50 mM, pH 7,0 potasyum fosfat tamponu, 25 °C, -700 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).....	41
5.6 I. nesil biyosensörün operasyonel kararlılığına ait grafik (50 mM, pH 7,0 potasyum fosfat tamponu, 25 °C, -700 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml)	42
5.7 Ferrosene ait döngüsel voltammogram (0 mV ve +600 mV aralığı, 10 mV/s, (A): Yumurta kabuğu membranı + hücre + Ferrosen, (B): Yumurta kabuğu membranı + hücre)	44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
5.8 HCF'ye ait döngüsel voltammogram (-200 mV ve + 600 mV aralğı, 10 mV/s, A:Yumurta kabuğı membranı + hücre + HCF; B: Yumurta kabuğı membranı + hücre)	45
5.9 Ferrosen miktarının sensör cevabına etkisi (50 mM, pH 7,0 potasyum fosfat tamponu, 25 °C, +400 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğı 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)	46
5.10 HCF miktarının sensör cevabına etkisi (50 mM, pH 7,0 potasyum fosfat tamponu, 25 °C, +300 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğı 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)	47
5.11 Ferrosen medyatörlü biyosensör cevabına glukoz konsantrasyonunun etkisi (pH 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25 °C, +400 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğı 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)	49
5.12 HCF medyatörlü biyosensör cevabına glukoz konsantrasyonunun etkisi (pH 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25°C, +300 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml her bir hata çubuğı 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)	49
5.13 Ferrosen için tekrarlanabilirlik (pH 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25 °C, +400 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğı 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)	50

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**Şekil****Sayfa**

- 5.14 HCF için tekrarlanabilirlik (pH 7,0, 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25 °C, +300 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)51
- 5.15 Ferrosen için operasyonel kararlılık (pH 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25 °C, +400 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).....52
- 5.16 HCF için operasyonel kararlılık (pH 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25 °C, +300 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)52

ÇİZELGELER DİZİNİ**Cizelge****Sayfa**

1.1 Oksidaz temelli amperometrik biyosensörler.....	5
1.2 Medyatörlü amperometrik biyosensörler.....	9
1.3 Çeşitli <i>P. fluorescens</i> temelli mikrobiyal biyosensörlerin karakterizasyonları ve karşılaştırılması.....	19
1.4 Yumurta kabuğu membranının immobilizasyon materyali olarak kullanıldığı enzim temelli sensörler.....	22
6.1 Geliştirilen mikrobiyal biyosensör sistemlerinin analitik karakterizasyonları.....	56

XX

SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Simgeler/Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
OD	Optik Dansite
S.D	Standart Sapma
cv	Varyasyon katsayısı
μM	Mikromolar
nm	Nanometre
mM	Millimolar
L	Litre
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
V	Volt
mV	Milivolt
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece

mg

Miligram

 μA

Mikroamper

Pt

Platin

1. GİRİŞ

1.1 Biyosensörlere Genel Bakış

Geleneksel kimyasal ve biyolojik analitik teknikler örnekler ve reaktiflerin çözelti içerisine eklenmesi ile çözelti içerisinde gerçekleşen reaksiyonları içerirler. Son yıllarda ‘reagentless sistemler’ alanında pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu sistemlerde rekatifler sisteme immobilize edilmiştir ve dışarıdan eklemeye gerek yoktur. Bunun gibi sistemlerde reaksiyon elektrodun yüzeyinde gerçekleşir ve genel olarak bu sistemler biyosensör olarak adlandırılırlar.

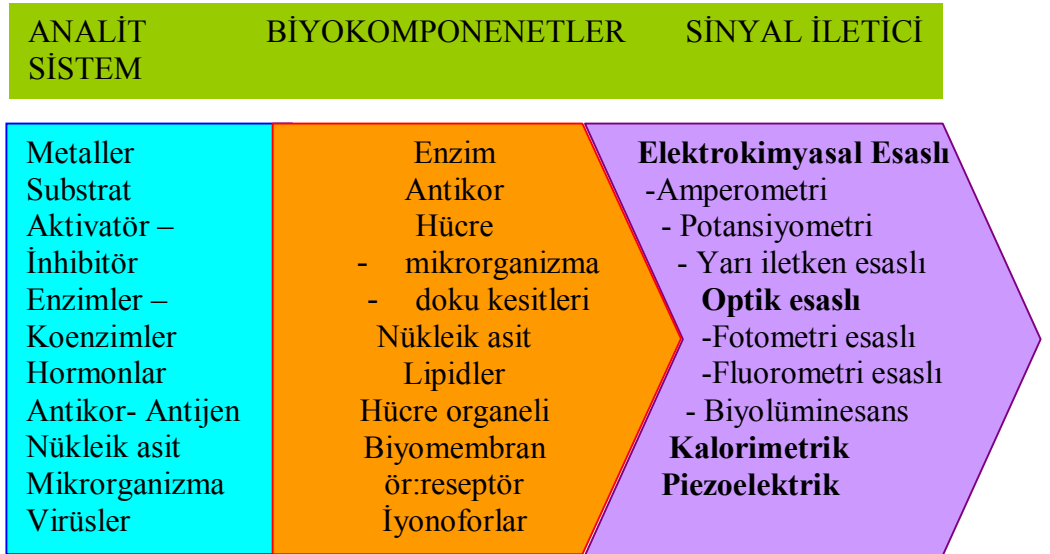
Biyosensör sistemleri, biyolojik tanıma elementleri ile ara yüzeyde bulunan ve analitin konsantrasyonunu ölçülebilir cevaba dönüştüren sinyal ileticilerden ibarettir (Chaubey and Malhotra, 2002).

Ulusal Araştırma Komisyonu (The National Research Council) (U.S. National Academy of Sciences’in bir bölümü) tarafından biyosensör;

- a) canlı organizma veya yaşayan sistemlerin ürünleri (örn; enzim veya antibadi) ve
- b) ortamdaki sinyal üreten veya spesifik türün varlığının sinyal iletilici tarafından tanınması olarak tanımlanmaktadır (Luong et al., 2008).

Analit seçimli ara yüzey enzim, antibadi veya mikroorganizma gibi biyoaktif bir maddedir. Bunlar kendi spesifik analitlerini tanıyabilirler ve biyosensörün spesifikliği ve duyarlılığı bu biyoaktif maddeye bağlıdır. Sinyal ileticiler biyokimyasal sinyali elektriksel sinyale dönüştürürler. Biyosensörler düşük maliyetli, hızlı ve basit analitik ölçüm sistemleridir (Chaubey and Malhotra, 2002).

Biyosensörler kullanılan biyolojik tanıma elementi veya sinyal ileticiye göre sınıflandırılabilir. Elektrokimyasal, kalorimetrik, piezoelektrik ve diğer tayin prensipleri kullanılarak başarılı biyosensör üretimi için çeşitli sinyal ileticiler kullanılmıştır. Biyosensör yapımında kullanılan en yaygın biyolojik elementler enzimler, antibadiler, DNA ve hücrelerdir (Şekil 1). Biyosensörün iyi bir performans gösterebilmesi için sinyal iletici ile biyolojik elementin uygun immobilizasyon yöntemiyle birbirleriyle bağlantı kurması gerekir (Tkac et al., 2005).



Şekil 1.1 Biyosensörlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi

İdeal biyosensörler analitik önemi olan moleküllerin, patojenlerin ve toksik bileşenlerin tayin edilmesi için hızlı, doğru ve gerçek bilgi sağlamak amacıyla dizayn edilmişlerdir. Biyosensörlerin ilaç, ziraat, gıda güvenliği, biyoproses, çevre ve endüstriyel izleme alanlarında ve askeri alanda önemli bir analitik rol oynayacağı planlanmaktadır.

Ortamdaki biyolojik tehlikelerin tayini 11 Eylül 2001'den sonra önemli bir konu haline gelmiştir ve sonuç olarak USA'de ve diğer ülkelerde ülke güvenliğine ilişkin taşınabilir biyosensör teknolojisinin gelişmesi yönünde biyosensör araştırmaları için ayrılan fonda önemli bir artış gözlenmektedir. Son zamanlardaki gıda maddelerinin kontaminasyon vakaları da biyosensörlere olan ilgiyi arttırmıştır (Luong et al., 2008).

1.1.1 Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler en yaygın kullanılan biyosensör sınıfıdır. Elektronlar gibi elektrokimyasal türleri tüketen veya üreten biyo-etkileşim prosesi boyunca elektrokimyasal sinyalin elektrokimyasal dedektör tarafından ölçülebilmesi temeline dayanır. Bu tür biyosensörlerin duyarlılığı bulanık ortamlarda çalışabilen diğer yöntemlerle kıyaslanabilecek kadar iyi ve minyatürüzyasyona elverişli sistemlerdir. Elektrokimyasal biyosensörler genellikle potansiyometrik ve amperometrik temellidirler. İyon seçimli elektrodlar (ISE), iyon seçimli alan etkin transistörler (ISFET) ve pH elektrodları genellikle substrat veya ürünün oksidasyonu temellidir, örneğin; oksijen elektrodu H_2O_2 tayini için kullanılabilir. Dedektör sistemi tarafından ölçülebilen elektrokimyasal özelliğe bağlı olarak konduktometrik, potansiyometrik

ve amperometrik biyosensörler olarak sınıflanabilirler (Chaubey and Malhotra, 2002).

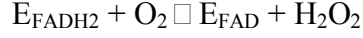
1.1.1.1 Amperometrik biyosensörler

Amperometri en genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. (Dinçkaya, 1999). Amperometrik biyosensörler biyokimyasal reaksiyon sonucu oksidasyondan dolayı çalışma elektrodundaki akım değişimlerini ölçerler. Amperometrik teknikler analit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Oksijen ve H_2O_2 amperometrik ölçümler için kullanılabilen bazı enzim reaksiyonlarında ko-substrattır. Elektrokimyasal biyosensörler elektron transferi için medyatörlü veya medyatörsüz elektrokimya temeline dayanır (Chaubey and Malhotra, 2002).

1.1.1.2 Medyatörsüz (I. nesil) amperometrik biyosensörler

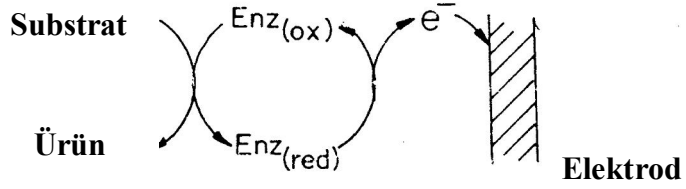
Amperometrik biyosensörlerin ilk gurubu enzim reaksiyonunun doğal substratlarının veya ürünlerinin konsantrasyonlarının ölçümüne dayalı sensörleri teşkil eder. Herhangi bir reaksiyon sırasında bazı ürünler oluşur ve bazı substratlar azalır. Eğer bunlar elektroaktif ise konsantrasyonları amperometrik sensörler tarafından doğrudan ölçülebilir. Bu tip reaksiyonlar genellikle çeşitli oksidazlar tarafından katalizlenirler (Çizelge 1.1).

Oksidazların gerçekleştirdiği enzimatik reaksiyon şu şekildedir;



Çizelge 1.1 Oksidaz temelli amperometrik biosensörler

Enzim	Substrat	Referans
Glukoz Oksidaz	Glukoz	Tran,1993; Warsinke, 1997; Pfeiffer,1997.
Laktat Oksidaz	Laktat	Mizutani et al., 1985; Bardeletti et al., 1986.
Kolin Oksidaz	Kolin	Matsumoto et al., 1980; Xin and Wightman, 1997.
Alkol Oksidaz	Etanol, Metanol, Formaldehid	Verduyn et al., 1983; Boujtita et al., 2000; Clark, 1972; Belghitin et al., 1987; Korpan et al., 2000.
Glutamat Oksidaz	Glutamat	Wollenberger et al., 1989.
Triptofan-2-monooksijenaz	Triptofan	Simonian et al., 1995.
Lizin Oksidaz	Lizin	Saurina et al., 1999; Vrbova et al., 1992.
Ksantin Oksidaz	Ksantin	Niu and Yang, 1999.



Şekil 1.2 Medyatörsüz amperometrik biyosensörün şematik gösterimi
(E_{Red}, E_{Ox}; indirgenmiş ve yükseltgenmiş enzimler)

Medyatörsüz amperometrik biyosensörler sınıfında en çok kullanılan ikinci enzim grubu ise dehidrogenazlardır.

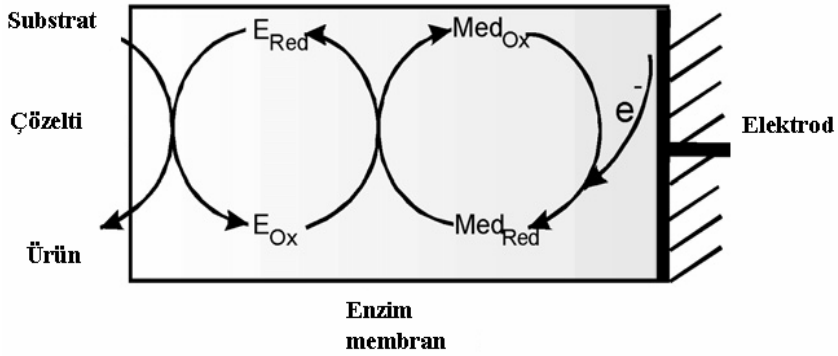
Bu tür çalışan sensörlerinin çoğu hem -0,7 V potansiyelde katotda oksijenin indirgenmesini kontrol eden biyokatalitik reaksiyon boyunca oksijen absorpsiyonu ölçümü, hem de +0,65 V potansiyelde anodun oksidasyonu ile hidrojen peroksidin biyokatalitik üretiminin izlenmesi ile çalışabilirler (Dzyadevych et al., 2008).

1.1.1.3 Medyatörlü (II.nesil) amperometrik biyosensörler

Amperometrik biyosensörlerin temel sorunu çözünmüş oksijen konsantrasyonuna bağımlı olmalarıdır. Medyatör veya elektron taşıyıcı gibi alternatif oksidasyon ajanları kullanan II. nesil amperometrik biyosensörler ile bu sorun yok edilmeye çalışılmıştır (Dzyadevych et al., 2008).

Genellikle enzimlerin redoks merkezleri enzimlerin içerisine gömülü olduğu için elektron transferini direkt gerçekleştirmek zor olabilir (Murphy, 2006). Son yıllarda redoks enzimleri ve elektrod yüzeyi

arasında direkt elektron transferi geniş ölçüde çalışılmıştır ve biyokimyasal ve biyofiziksel bilim alanlarında uygulamaları sebebiyle hala önemli bir araştırma konusudur. Ne yazık ki redoks enzimlerinin üç boyutlu yapıları ve redoks aktif merkezlerinin protein tabakası ile çevrili olmasından dolayı uygun elektrod yüzeyinde direkt elektron transferinde rol almaları genellikle güçtür. Elektrod yüzeyi ve enzim aktif merkezi arasındaki bu bağlantıyı güçlendirmek için pek çok strateji ileri sürülmüştür (Luo, 2006). Redoks merkezinin elektroda yaklaşması için yüksek potansiyel uygulamak gerekir. Bu da elektrod yüzeyinin bozulması ve enzim denatürasyonu ile sonuçlanır (Murphy, 2006). Ayrıca yüksek potansiyelde çalışmak pek çok girişim etkisine neden olur. II. nesil amperometrik biyosensörler ile düşük potansiyelerde çalışılabilmekte ve bunun sonucu olarak da çeşitli maddelerin girişim etkileri yok edilmektedir. Direkt elektron transferini başarmak için biyolojik materyalin veya enzim yüzeyinin medyatör ile modifikasyonu gerçekleştirilmektedir.



Şekil 1.3 Medyatörlü amperometrik biyosensörün şematik gösterimi
(E_{Red} , E_{Ox} ; indirgenmiş ve yükseltgenmiş enzimler; Med_{Red} , Med_{Ox} :
indirgenmiş ve yükseltgenmiş medyatörler.)

Genel olarak bir medyatör enzimin redoks merkezi ve çalışma elektrodu arasında elektron transferini sağlayan düşük moleküler ağırlıklı bir partiküldür.

Medyatörlü amperometrik biyosensörlerde reaksiyon genel olarak şu şekilde gerçekleşir;



Metilen mavisi, fenazinler, metil violet, alizarin sarısı, prusyan mavisi, tionin, azur A, azur ve toludin gibi organik boyalar medyatör olarak kullanılmakla birlikte en iyi bilinen ve en yaygın kullanılan medyatörler ferriciyanid ve ferrosendir (Dzyadevych et al., 2008).

Çizelge 1.2 Medyatörlü amperometrik biyosensörler

Substrat	Enzim	Medyatör	Referans
Glukoz	Glukoz Oksidaz	Ferrosen	Cass et al., 1984; Spinas et al., 1990; Bradley et al., 1991.
Fruktoz	D-fruktoz dehidrogenaz	Ferrisiyanid	Stredansky et al., 1999; Xie et al., 1991.
Laktat	Laktat Oksidaz	Ferrosen	White et al., 1992; Kulys et al., 1992.
Glutamat	L-glutamat oksidaz	Ferrosen	Hale et al., 1991; Vahjen et al., 1991.
Lizin	Lizin dehidrogenaz	Ferrisiyanür	Dempsey et al., 1992.
Etanol	Alkol dehidrogenaz	Ferrisiyanür	Yon et al., 1987.

Medyatörler ölçüm çözeltisine eklenebilir veya elektrod yüzeyine immobilize edilebilirler. Ölçüm çözeltisine eklemek daha kolaydır fakat teknolojik değildir.

Bunların yanı sıra medyatörlerin uygulanması ile ilgili bazı problemler vardır. En önemli sorun oksijen tamamıyla elimine edilemediği zaman elektron transferi için medyatör ile yarışmasıdır. Diğer bir sorun da immobilize medyatörün çözünüp dağılması ve yanlış sinyale neden olabilmesidir. Medyatör molekülünün immobilizasyonu elektron taşıma fonksiyonunu sınırlar. Pek çok zorluğuna rağmen pek çok araştırmacı enzim veya mikrobiyal hücre temelli medyatörlü biyosensörler geliştirmişlerdir (Skladal et al., 2002). Geliştirilen bu sistemlerden bazıları Çizelge 1.2’de verilmiştir. Aktif çamurdan izole edilmiş bakteri içeren medyatörlü sensörler atık su toksisite ölçümleri için kullanılmıştır (Evans et al., 1998). Ferrisiyanid, dikolorofenolindofenol ve p-benzokinon gibi çözünür medyatörler glukano bakter ile hazırlanmış biyosensörlerde kullanılmıştır (Ikeda et al., 1996). Ferrosen türevlerini içeren çözünmeyen medyatörler *Paracoccus denitrificans* temelli laktat biyosensörlerinde başarıyla kullanılmıştır (Kalab and Skladal, 1994) ve ferrosen karboksilik asid *Ps. fluorescens* hücrelerinden elektron transferinde etkili olmuştur (Takayama et al., 1995).

Uygun medyatör seçimi için aşağıdaki faktörler dikkate alınmalıdır;

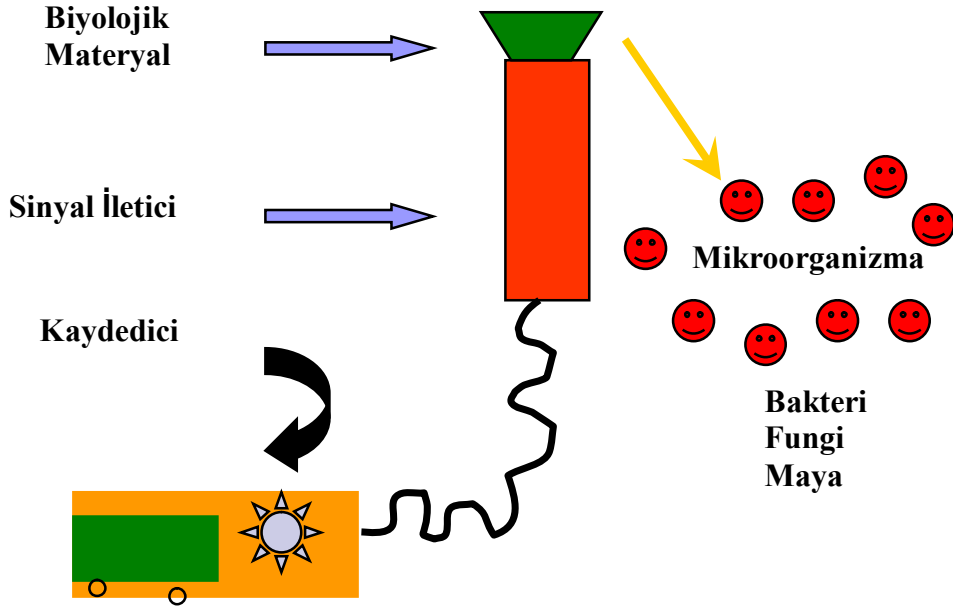
- ❖ Uygulanan voltaj oksijen indirgenme potansiyelinin üzerinde olmamalıdır,
- ❖ İndirgenen medyatör oksijen ile reaksiyon vermemelidir,

- ❖ Medyatör ve enzim arasındaki elektron transferi çok hızlı olmalıdır,
- ❖ Medyatör pH tarafından etkilenmemelidir,
- ❖ Medyatör toksik olmamalıdır (Dzyadevych et al., 2008).

1.1.2 Mikrobiyal biyosensörler

Hayvan ve bitki hücreleri veya dokular, enzimler, antikolar, reseptörler, organeller ve mikroorganizmalar gibi biyomoleküller biyolojik tanıma elementleri olarak kullanılmaktadır. Enzimler biyosensörlerin yapımında kullanılan en yaygın biyolojik tanıma elementleridir. Saflaştırılmış enzimin substratları veya inhibitörleri için yüksek spesifikliğe sahip olmasına rağmen enzim saflaştırmasının zaman alıcı olması, pahalı olması, bazı enzimlerin kofaktör veya koenzime ihtiyaç duymaları nedeniyle biyosensör uygulamaları sınırlıdır (Lei et al., 2006). Hücreler enzim izolasyonu gerektirmediği için, enzimler kendi doğal ortamlarında daha kararlı oldukları için ve enzimlerin ihtiyacı olan koenzim ve kofaktörleri içermesi sayesinde dışarıdan koenzim ve kofaktöre ihtiyaç olmadığı için biyosensör yapımında oldukça elverişli biyolojik materyallerdir. Hücre biyosensörleri hazırlayabilmek için mikrobiyal hücreler veya yüksek yapılı bitki ve hayvanların dokuları kullanılabilir. Mikrobiyal hücreler doku hücrelerine kıyasla bazı avantajlara sahiptir; fiziksel ve kimyasal değişimlere oldukça dirençlidir, üretimleri kolay ve ucuzdur, yüksek tekrarlanabilirliğe sahiplerdir, biyosensör yapımı için kolaylıkla modifiye edilebilirler (Tkac et al., 2005). Hücrelerde çoğu enzimler ve kofaktörlerinin bir arada bulunması hücrelere kimyasalların çoğunu tayin edebilme yeteneği sağlar ancak bu

da seçimliliği düşürebilir (Lei et al., 2006). Seçimliliklerinin düşük olması sebebiyle mikrobiyal sensörler bazı parametrelerin (BOD-biyolojik oksijen ihtiyacı, toksik ajanlar, şekerler) hızlı tayini için kullanılmaktadır fakat tek bir analitin seçimli tayini için de kullanılabilir. Bununla birlikte düşük seçimlilik ve yavaş cevap süresi gibi sorunların aşılması gerekir. İlgilenilen analit hücreler için substrat (karbohidratlar, organik asitler, amino asitler, peptidler, alkoller, bazı gazlar- CO₂, CH₄ ve diğerleri), aktivatör (vitaminler, kofaktörler ve bazı metaller) veya inhibitör (ağır metaller, pestisidler, herbisidler ve diğer toksik ajanlar) gibi düşünülebilir. Mikrobiyal biyosensörlerin tek bir analit tayini için kullanıldığında temel sorunu- seçimliliğin düşük olması- çeşitli yaklaşımlarla geliştirilmeye çalışılmaktadır (Tkac et al., 2005). Bazı substratları indirgemelerinin ayarlanabilmesi için bazı kültürasyon koşulları altında kolaylıkla adaptasyonları mümkündür (Lei et al., 2006). Seçimlilik, hücre fizyolojisi tarafından etkilenerek (transport/metabolik sistemlerin indüksiyonu, istenmeyen transport/metabolik yolların inhibisyonu); hücrenin bulunduğu ortamın değiştirilmesiyle (ölçüm ortamının pH'ı), uygun sinyal iletici veya uygun ölçüm modunun seçilmesiyle (kinetik, steady-state) ve hücre membranının geçirgenliğinin değişmesiyle (kofaktörlerin hücrelere geçişi) geliştirilebilir (Tkac et al., 2005). Mikroorganizmaların kimyasal maddeleri geniş oranda tayin edebilme, genetik modifikasyonlara uğrayabilme, geniş pH ve sıcaklık aralığında çalışabilme gibi avantajlara sahip olması mikroorganizmaları biyolojik tanıma elementleri olarak ideal kılar. Mikroorganizmalar amperometrik, potansiyometrik, kalorimetrik, kondüktometrik, kolorimetrik, lüminesans ve fluoresans gibi çeşitli sinyal ileticilerle entegre edilerek biyosensörü oluştururlar (Lei et al., 2006). Mikrobiyal biyosensörler gıda, fermentasyon endüstrisi ve çevre kontrolünde ve klinik analiz alanlarında başarıyla kullanılmaktadır (Tkac et al., 2005).



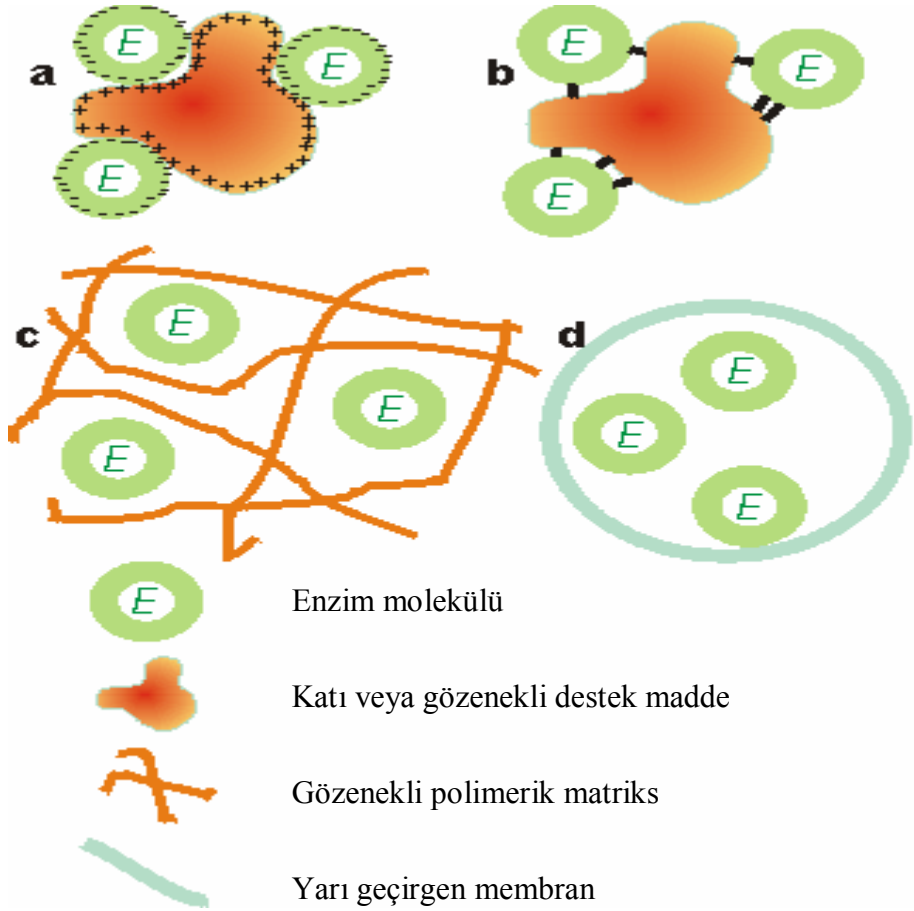
Şekil 1.4 Mikrobiyal biyosensörün şematik gösterimi

1.1.2.1 Mikrobiyal hücreler için immobilizasyon teknikleri

Canlı mikrobiyal hücreler kullanıldığında ılımlı immobilizasyon teknikleri kullanılmalıdır. Enzimlerin immobilizasyonu için sıklıkla kullanılan kovalent bağlama yöntemi hücre canlılığının azalmasına veya intraselüler enzimleri negatif etkileyerek biyosensör performansının düşmesine neden olur. Üstelik biyosensörlerde düşük hücre miktarı kullanmak genellikle daha başarılıdır. Aljinat/pektat, karagenan, kollojen, jelatin, kitosan ve agar (agaroz)'dan hazırlanmış doğal

polimerler içerisine tutuklama ile ılımlı koşullar altında hücrelerin canlılıklarını korumaları sağlanır. Ancak aljinat, pektat ve karregenat matriksleri ortamdaki şelatlayıcı ajanlar tarafından kolaylıkla bozulabilir çünkü matriks Ca^{2+} veya K^+ iyonları varlığında iyonotropik jelleşme tarafından oluşturulur. Jel matriksi glutraldehid veya glutraldehid/polietilenimin gibi çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak daha stabil hale getirilebilir. Çapraz bağlama için kullanılan glutraldehidin jelatin veya albumin gibi protein yapılı desteklerle kombinasyonu sıklıkla kullanılmaktadır. Çünkü yaşamayan hücrelerin immobilizasyonu için kovalent bağlamaya benzer oldukça faydalı bir tekniktir. Polivinil alkol, poliakrilamid, poliüretan ve foto çapraz bağlayıcı reçineleri (photo cross-linkable resin) içeren sentetik polimerler doğal polimerden daha stabildir fakat pek çok sebepten dolayı hücre canlılığını yitirebilir. Sentetik veya doğal polimer matrikste tutuklamanın temel sorunu difüzyon bariyerinin biyosensör cevabını yavaşlatmasıdır. Bileşiklerin hücreye ve hücreden sinyal ileticiye difüzyonunu kolaylaştırmak amacıyla geniş gözenekli uygun jel matriks seçilerek bu problem ozlebilir. Hücrelerin katı yüzeyde adsorpsiyonu çok basit bir immobilizasyon yöntemidir ve genellikle aktivasyon ve temizlik adımları için kimyasal gerektirmez. Ancak adsorpsiyon pH, sıcaklık, iyonik şiddet ve diğer faktörlerin değişimine oldukça duyarlıdır ve yöntem daha çok tek ölümler için uygundur. Hücrelerin sentetik veya selüloz temelli membranların gözenekleri içerisinde basit tutuklanması ile hücre canlılığı en iyi korunur. Bu nedenle hücre süspansiyonunun filtrasyonu gerçekleştirilir ve hücreli membran elektroda tutturulur. Diğer bir alternatif ise hücre süspansiyonunun bir membran aracılığıyla elektrod yüzeyini kaplamasıdır, genellikle diyaliz membranı kullanılır. Bu durumda jel/polimer matriks içerisine tutuklama ile kıyaslandığında genellikle düşük operasyonel ve depo stabilitesi gözlenir.

Diğer immobilizasyon teknikleri arasında bahsedilen en iyi yöntem biyospesifik geri dönüşümlü immobilizasyon yöntemidir. Lektinlerin kullanıldığı biyospesifik geri dönüşümlü immobilizasyon yöntemi tek tabakadaki hücrelerin adezyonu gerçekleştiğinde ve hücrelerin immobilize edildiği birkaç lektin tabakasının uygulanması ile duyarlılığı daha da geliştirilebilir. Yeni teknikler polietilenimin kullanarak çeşitli polimerik yüzeylerde hücrelerin güçlü ve hızlı adezyonunu içerir. Hücre yüzeyinde selüloz bağlama alt birimi olarak ifade edilen bölgenin sellüloz partükülleri/membranlarına biyospesifik geri dönüşümlü bağlanması ile düşük difüzyon direnci sayesinde hızlı cevap ve yüksek canlılık sağlar. Hücrelerin karbon pastaya veya sol-jel matriks içerisine karıştırılması çeşitli avantajlara sahiptir. Hücreler de dahil olmak üzere ihtiyaç olan bütün reaktiflerin karbon pasta veya sol-jel matriks içerisinde bulunması 'reagentless' biyosensörleri oluşturmaktadır. Pek çok şekilde yüksek canlılık sağlanarak biyomateryallerin stabilitesi arttırılır. Karbon pasta ve sol-jel elektrodlar kolaylıkla modifiye edilebilir ve basit parlatma işlemleri ile duyarlılıkları yeniden sağlanabilir (Tkac et al., 2005).



Şekil 1.5 İmmobilizasyon teknikleri

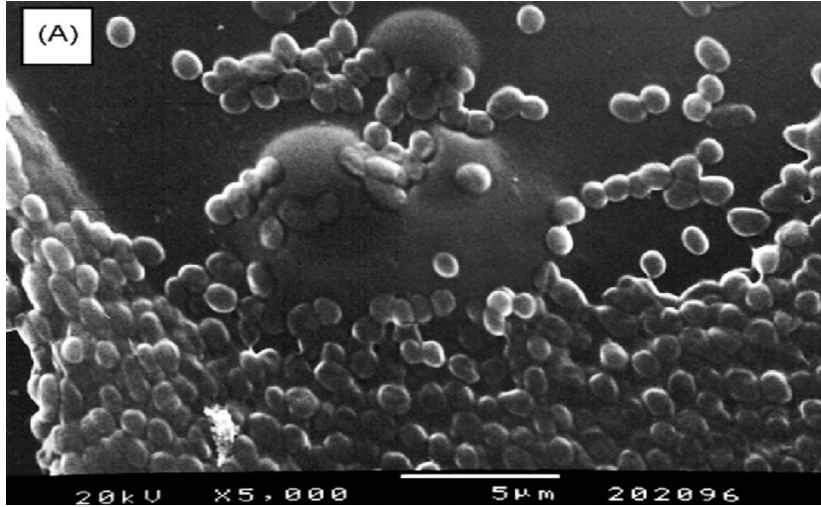
(a) Çözünmez adsorban yüzeye non-kovalent olarak adsorblanma, **(b)** Çözünmez matrikse kovalent bağlama;

(c) Biyokomponentin çapraz bağlanmış polimer matrikste tutuklanması, **(d)** Yarı geçirgen membranda tutuklanmış biyokomponent.

1.1.2.2 *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas cinsi bakteriler, *Pseudomonadaceae* familyası içerisinde yer alırlar. Bu bakterilerin çoğu doğada toprak ve sularda yoğun olarak bulunur. Bazı türleri insan, hayvan ve bitki patojenidir. Glukozu oksidasyon yoluyla parçalayan bakterilerdir. Türlerin tamamı katalaz pozitif, gram negatif, aerobik, polar flagellasıyla hareket edebilen çubuk şekilli bakterilerdir. Kendi gelişmeleri için gerekli olan gelişme faktörlerini ve vitaminleri sentezleme yeteneğindedirler. Isı ve radyasyonla kolaylıkla inhibe olabilmektedirler. Oksijensiz koşullarda ve 42 °C' nin üzerinde çoğalamazlar (Pelczar and Reid, 1958; Tortora et al., 1992; Ayhan, 2000). *Pseudomonas* 'lar lipolitik ve proteolitik aktiviteleri sonucunda gıdalarda istenmeyen tat, renk ve koku oluştururlar (Solberg et al., 1972; Jeppesen, 1995). Uzunlukları çok değişik olmakla beraber 1,5–3 µm genişliğinde, bazen ikili bazen de kısa zincirler halinde görülen sporsuz, kapsülsüz, çubuk şeklinde, aerob bakteridirler. Çoğu kez bir uçlarında bir, nadiren iki-üç adet flagellaları vardır ve çok hareketlidirler. Kolay boyanırlar ve gram negatiftirler. Uzun süre beklemiş kültürlerinde ve antiseptik maddelerin bulunduğu ortamlarda kısa veya çok uzun deforme şekilleri, hareketsiz ve pigmentsiz olanları, R (rough) tipinde üreyenlerin bulunduğu bildirilmiştir (Frobisher, 1968; Davis et al., 1968; Özan, 1996). *Pseudomonas* suşlarının çoğu kültür ortamında pigment üretirler. Pigment oluşumu kültür koşullarına bağlıdır. Mutasyonla bu özellik kaybolur ya da aynı anda birçok pigment oluşumu görülebilir. Bu pigmentler oksijensiz ortamda oluşmazlar, oda sıcaklığında daha iyi oluşurlar (Davis et al., 1968; Aydın, 2001). Floresan pigmentler, floresan özellik taşıyan *Pseudomonas* 'ların (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichori*, *P. flavescens*) karakteristiğidir (Wilson and Miles, 1964; Aydın, 2001).

Pseudomonas fluorescens non-patojenik saprofit olup gram negatif bir bakteridir. Çok yönlü bir metabolizmaya sahiptir, su, toprak ve bitki yüzeyinde bulunabilir. Obligat aerobiktir ancak bazı suşları hücresel solunumda elektron akseptörü olarak oksijen yerine nitrat kullanabilirler. Kolonileri yuvarlak, nemli ve parlak yüzeyledir. Sarımsı yeşil pigment oluştururlar. *Pseudomonas fluorescens* hücreleri 41°C’de üreyemez fakat +4°C’de üreyebilirler, optimum büyüme sıcaklıkları ise 25-30°C’dir. Fizyolojik ve genetik özelliği sayesinde biyoteknolojide kullanım alanları giderek artmaktadır (Wasi et al., 2008).



Şekil 1.6 *Pseudomonas fluorescens* hücrelerine ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü (Odaci et al., 2008)

Yayınlanmış çeşitli *P. fluorescens* biyosensörlerinin analitik karakterizasyonlarının karşılaştırılması Çizelge 1.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3 Çeşitli *P. fluorescens* temelli mikrobiyal biyosensörlerin karakterizasyonları ve karşılaştırılması

Elektrod çeşidi/ yöntem	Substrat	İmmobilizasyon Yöntemi	Çalışma Potansiyeli (mV)	Analitik Performansları			Referans
				Doğrusal tayin aralığı (mM)	Standart Sapma/ Varyasyon Katsayısı	Operasyonel Stabilitate	
Mikroskop camı / Biyoluminesans	Naftalen	Sol-jel	-	-	-	-	Trogl et al., 2005.
Altın disk elektrodlar/ Kronoamperometrik	Glukoz	Osmium redoks polimer I	+300	0.05–1.0	-	480 dakika sonra sensör cevabında % 41 azalma	Timur et al., 2007.
Altın disk elektrodlar/ Kronoamperometrik	Kateşol	Osmium redoks polimer I	+300	0.005–0.02	1.9 (RSD %)	480 dakika sonra sensör cevabında % 41 azalma	Timur et al., 2007.
Altın disk elektrodlar/ Kronoamperometrik	Glukoz	Osmium redoks polimer II	-180	0.2–2.0	-	480 dakika sonra sensör cevabında %35 azalma	Timur et al., 2007.
Altın disk elektrodlar / Kronoamperometrik	Kateşol	Osmium redoks polimer II	-180	0.02–0.08	-	480 dakika sonra sensör cevabında %35 azalma	Timur et al., 2007.
Altın disk elektrodlar / Kronoamperometrik	Fenol	Osmium redoks polimer II	-180	0.02–0.2	3.2 (RSD %)	480 dakika sonra sensör cevabında %35 azalma	Timur et al., 2007.
CNTEC/Kronoamperometrik	Glukoz	Jelatin kullanarak tutuklama ve gluteraldehid ile çapraz bağlama	-700	0.5 – 4.0	±0.06 mM/ %2.7	-	Kirgoz .et al., 2007.

Osmium redoks polimer I: poli(1-vinilimidazol)12-[osmium (4,4_-dimetil-2,2_-bipiridil)2C12]^{2+/3+};
Osmium redoks polimer II: poli(vinilpiridin)-[osmium-(N,N_-metilaled-2,2_-biimidazol)3]^{2+/3+};
CNTEC: karbon-nanotüp epoksi komposit, HCF: potasyum hegzasioferrat (III)

1.1.3 Glukoz biyosensörleri

Glukoz hayvanlar ve bitkilerin temel karbohidratıdır. Glukozun kantitatif tayini biyokimya, klinik ve yiyecek analizlerinde çok önemlidir. Spektrofotometri (Bateman et al., 1995; Mullis et al., 1999; Edmiston and Williams, 2000; Vasilarou and Georgiou, 2000; Han et al., 2003), amperometri (Wang and Macca, 1996; Sadik et al., 1999), HPLC (Gao et al., 2002), polarimetri (Luo et al., 2003) ve kapiller elektroforez (Geng et al., 2000) gibi yöntemler glukoz tayini için kullanılmaktadır. Ancak kabul edilen pek çok metod pahalı ve uzun süren yöntemlerdir. Glukozun kantitatif tayinine yönelik ilginin artması var olan yöntemlere alternatif daha hızlı, yeni glukoz tayin yöntemlerinin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Son zamanlarda kimyasal sensörler ve biyosensörler çok hızlı büyümektedir ve birçok glukoz biyosensörü tasarlanmıştır (Wu et al., 2004).

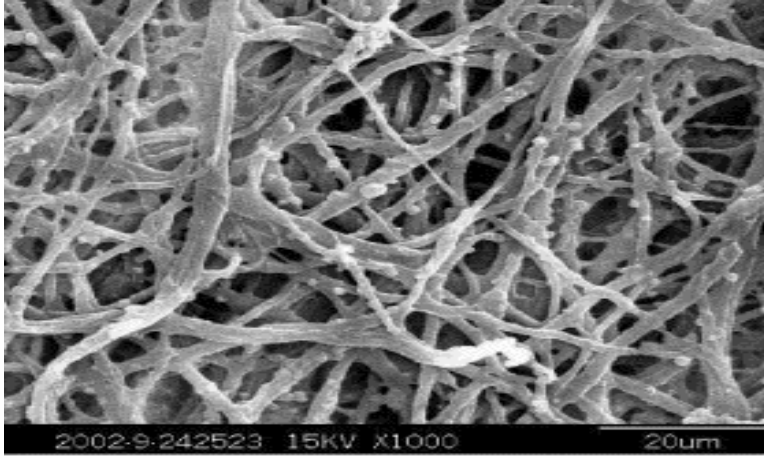
Ticari olarak en başarılı biyosensörler amperometrik glukoz biyosensörleridir. Bu biyosensörleri çeşitli şekillerde ve formlarda bulmak mümkündür. Tarihte ilk glukoz biyosensörü Lealand C. Clark tarafından yapılmıştır (Mohanty and Kougianos, 2006).

1.2 Yumurta Kabuğu Membranı

Son yıllarda kollajen, ipek fibroini, jelatin ve kitosan gibi doğal biyomateryaller biyomedikal mühendisliği alanında oldukça fazla kullanılmaya başlamıştır. Yumurta kabuğu membranı da bu biyomateryallerden birisidir (Yi et al., 2004).

Yumurta kabuğu membranı yumurta kabuğu içerisinde parlak pembe çift tabakalı bir membrandır (light pink double-layer membrane). Keratin, kollajen ve elastin benzeri yüksek çapraz bağlı proteinlerden oluşmuştur (Choi and Yiu, 2004). Proteinler yapılarında heksozaminler, heksozlar ve fukozlar içerirler. Membranın yapısında lizozim, hiyalüronik asid, kondroitin-4-sülfat, lizil oksidaz ve glukozamin sülfat varlığı da kanıtlanmıştır (Hinckea et al., 2006).

Çift tabakalı membranın toplam kalınlığı 100 μm 'dir (Tsai et al., 2006), suda çözünmeyen ve yarı geçirgen özellikte bir membrandır (Hinckea et al., 2006). Gaz ve su geçirgenliği mükemmel, biyoyuumluluğu yüksek olduğu için ideal bir immobilizasyon materyalidir (Choi et al., 2001). Biyolojik moleküller ve protein fibrillerinden oluştuğu için enzimlerin stabilizasyonu için gerekli polikasyonları temin edebilmektedir (Yi et al., 2004). Yumurta kabuğu membranına ait SEM görüntüsü Şekil 1.7'de verilmiştir (Yi et al., 2004).



Şekil 1.7 Taramalı elektron mikroskopisi ile yumurta kabuğu membranının dış tarafından alınan görüntü (F. Yi et al., 2004)

Yumurta kabuğu membranı çeşitli çalışmalarda adsorban olarak ve immobilizasyon materyali olarak kullanılmıştır. Yumurta kabuğu membranı diğer membranlara göre daha ekonomik ve kolay temin edilebilir bir materyaldir. Ayrıca elastik yapısı ile mekanik dayanıklılığı diğer bazı polimerlere göre daha iyi olması membranın tercih sebeplerindedir (Tsai et al., 2006). Ve çeşitli temelli biyosensörlerde immobilizasyon materyali olarak kullanılmıştır (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4 Yumurta kabuğu membranının immobilizasyon materyali olarak kullanıldığı enzim temelli sensörler

Enzim	Substrat	Referans
Glukoz oksidaz-mirozinaz	Glukosinolat	Choi et al., 2005; Wu et al., 2005
D-amino asid oksidaz	Homosistein	Zhang, et al., 2006
Alkol oksidaz	Etanol	Wen et al., 2007
L-laktat oksidaz	L-laktat	Choi, 2005
Glukoz oksidaz	Glukoz	Wu et al., 2004
Ürikaz	Ürik asit	Zhang et al., 2007
Katalaz	Hidrojen peroksit	Choi and Yiu, 2004
L-homosistein desülfidraz	Homosistein	Alacam et al., 2007

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

I. nesil ve II. nesil mikrobiyal biyosensörler hazırlanırken DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany)'den alınan *Pseudomonas fluorescens* hücreleri kullanıldı.

Ölçümler Palm-Sens elektrokimyasal ölçüm sistemi (Palm Instruments, Houten, The Netherlands) kullanılarak, Ag\AgCl referans elektrod (Metrohm, Switzerland, CH-9101)'a karşı alındı. Çalışma elektrodu olarak modifiye karbon pasta elektrod, karşıt elektrod olarak Pt (Metrohm, Switzerland) kullanıldı.

Hücrelerin immobilizasyonu için marketten alınmış aynı firmaya ilişkin yumurtalardan çıkartılmış yumurta kabuğu membranı kullanıldı.

Glukoz, mineral yağı ve grafit tozu Sigma-Aldrich (St. Louis-A.B.D) firmasından sağlandı.

II. nesil biyosensör sistemlerinin hazırlanmasında kullanılan ferrosen Sigma-Aldrich, potasyum hegzasiyanoferrat III (HCF) Fluka firmasından sağlandı.

Diğer kullanılan tüm kimyasallar da analitik saflıktadır.

2.1.1 *P. fluorescens* hücrelerinin kültivasyonu

P. fluorescens hücreleri için büyüme ortamı olarak aşağıdaki kompozisyona göre mineral tuz ortamı (MSM) hazırlandı;

% 0,244 Na₂HPO₄, % 0,152 KH₂PO₄, % 0,050 (NH₄)₂SO₄, % 0,02 MgSO₄·7 H₂O, % 0,005 CaCl₂·2H₂O ve iz element çözeltisi (10 ml/L). Büyüme ortamının pH'ı 6,9'a ayarlandı (Timur et al., 2007).

Stok kültürler yatık agarda (nutrient agar, 28g/L) 28 °C'de 24 saat boyunca inkübe edildi.



Hücreler yatık agardan nutrient broth ortamına (8g/L) alınarak 28 °C'de, 175 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edildi.



Hücreler 1g/L glukoz içeren 50 ml MSM büyüme ortamına alınarak 28 °C'de 175 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 17 saat boyunca üremeye bırakıldı.



17 saat sonunda 560 nm'de optik dansitesine (A₅₆₀) bakılarak geç logaritmik evredeki hücreler kullanıldı.

Ayrıca *P. fluorescens* hücrelerinin 17. saatinde MSM kültür ortamından 10 ml alınarak % 0,9'luk fizyolojik su (NaCl) ile 10^5 - 10^9 arasında yapılan seyreltmelerden dökme plaka yöntemine göre petrilere pipetlendi ve üzerine 45 °C'ye soğutulmuş nutrient agar döküldükten sonra petrilere 28 °C'de 12 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucu petrilere oluşan koloniler sayıldı. Stok hücre kültür ortamındaki hücre sayısı belirlenerek, uygun seyreltmelerle hazırlanan hücre ara stoklarından alınan eşit hacimli (50 µl) hücrelerle hazırlanmış biyosensörler ile hücre miktarı optimizasyonu gerçekleştirildi. En iyi sonuç alınan sistem diğer denemelerde kullanıldı.

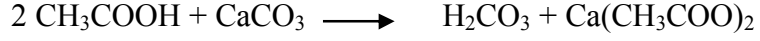
2.1.2 Yumurta kabuğu membranının hazırlanması

Yumurta kabuğu % 94'ü kalsiyum karbonat, % 1'i magnezyum karbonat, % 1'i kalsiyum fosfat ve % 4'ü organik asit (ağırlık olarak) olan kimyasal bileşenlerden oluşmuştur. Bu nedenle yumurta %100'lük asetik asitte 18 saat bekletildi. Ardından yumurta kabuğu membranı çıkartılarak albümin ve asetik asit uzaklaşana kadar distile su ile yıkandı. Kullanılmak üzere pH 7,0, 5 mM fosfat tamponunda, 4 °C'de saklandı (Alacam et al., 2007).

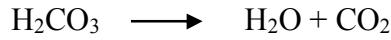


Yumurta asetik asitte ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) bekletildiğinde, kalsiyum karbonatın yapısında bulunan karbonat (CO_3^{2-}) asetik asit ile protonlanarak karbonik asidi oluşturur (H_2CO_3).

Bu sırada kalsiyum ve asetat da kalsiyum asetat oluşturur.



Karbonik asid karbondioksit ve suya parçalanır karbondioksit gaz çıkışı gözlenir.



Toplam reaksiyon şu şekildedir;



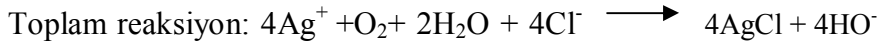
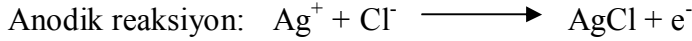
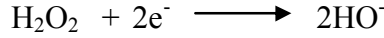
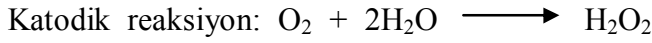
2.1.3 Karbon pasta elektrodun hazırlanması

Çalışma elektrodu olarak kullanılan karbon elektrot, 18,5 mg grafit tozu ile 6,5 mg mineral yağının (74%:26%) karıştırılmasının ardından, içerisinde bakır tel bulunan teflon gövde içerisine yerleştirilerek hazırlandı. Pürüzsüz yüzey elde etmek amacıyla parlatma kağıdı yardımıyla yüzeyi parlatıldı.

3. I. NESİL MİKROBİYAL BİYOSENSÖRLER

3.1 I. Nesil Mikrobiyal Biyosensörlere İlişkin Ölçüm Yöntemi

İletici sistem olarak olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark; ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrod yüzeyinde tüketilmesidir. Oksijen tüketimine ilişkin reaksiyonlar aşağıda verilmiştir (Dinçkaya, 1999).



Biyosensör sistemlerine ait cevaplar akım (I, μA) olarak elde edildi.

Mikrobiyal sensöre ilişkin cevaplar, kronoamperometrik olarak, -700 mV potansiyel altında Ag/AgCl referans ve platin karşı elektrot kullanımıyla, mikrobiyal hücrelerin metabolik aktivitesi sonucunda tükettiği oksijenin azalmasının izlenmesiyle elde edildi. Ölçümler, 50 mM, pH 7,0 potasyum fosfat tamponunda, 25 °C'de gerçekleştirildi.

3.2 I. Nesil Mikrobiyal Biyosensörlerin Hazırlanması

2.1.1'de tanımlanmış geç logaritmik faz evresinde bulunan hücrelerden 10 ml alınarak 4 000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi.

Santrifüjle ayrılan hücre pastası (çökelek kısmı) öncelikle % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile yıkanarak tekrar santrifüjlendi ve belirli miktarda 5 mM, pH 7,0 potasyum fosfat tamponunda çözülerek 50 µl'si yumurta kabuğu membranı yüzeyine pipetlendi.

Yumurta kabuğu membranı oda sıcaklığında 35-40 dakika bekletilerek hücrelerin membran yüzeyine immobilizasyonu sağlandı.

İmmobilize hücreleri içeren yumurta kabuğu membranı o-ring vasıtası ile karbon pasta elektrot yüzeyine kaplandı.

3.2.1 I. Nesil mikrobiyal biyosensörlere ilişkin optimizasyon çalışmaları

Çalışmanın bu aşamasında *P. fluorescens* hücreleri ile hazırlanan I. nesil mikrobiyal biyosensörlere ilişkin optimum cevabın alınabileceği hücre miktarının ve ortam pH'ının biyosensör cevabına etkileri araştırıldı.

3.2.1.1 Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisi

Farklı miktarlarda hücre pastaları öncelikle potasyum fosfat tamponunda (pH 7,0, 5 mM) çözülerek farklı stok hücre çözeltileri hazırlandı ($35,09 \times 10^9$ hücre/ml, $17,58 \times 10^9$ hücre/ml, $11,71 \times 10^9$ hücre/ml, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml ve $4,68 \times 10^9$ hücre/ml) ve her birinden 50 µl yumurta kabuğu membranı yüzeyine pipetleterek biyosensörler hazırlandı. Ardından herbiri için glukoz kullanılarak kalibrasyon grafikleri oluşturuldu.

3.2.1.2 Optimum pH

$7,02 \times 10^9$ hücre/ml ile hazırlanmış I. nesil mikrobiyal biyosensör ile pH optimizasyonu yapıldı. Bunun için pH'ı 6,0; 6,5; 7,0; 7,2; 7,5 olan potasyum fosfat tamponları (50 mM) kullanılarak glukoz (250 mM) için alınan en iyi biyosensör cevabının hangi pH değerinde alındığı belirlendi. Her yeni tampon sistemine geçildiğinde biyosensör ilgili tampon çözeltisi ile 20 dakika inkübe edildi.

3.3 I. Nesil Mikrobiyal Biyosensörlerin Analitik Karakterizasyonuna ilişkin çalışmalar

3.3.1 Doğrusal tayin aralığı

Geliştirilen biyosensörün hücre miktarı ($7,02 \times 10^9$ hücre/ml) ve pH optimizasyonu sonrası analitik karakterizasyonu amacıyla 20 ml (pH 7,0; 50 mM) potasyum fosfat tamponu bulunan reaksiyon hücresine

100 mM glukoz standart çözeltisinden farklı miktarlarda eklenerek standart grafik çizildi ve glukoz için doğrusal tayin aralığı belirlendi.

3.3.2 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

Optimum olarak belirlenen çalışma koşullarında 10 μ M glukoz konsantrasyonu için beş (5) kez ard arda ölçüm alındı. Ölçümlere ilişkin standart sapma (S.D) ve varyasyon katsayısı (cv) belirlendi.

3.3.3 Operasyonel kararlılık

Biyosensörün operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla daha önce optimizasyonu gerçekleştirilmiş olan koşullarda ($7,02 \times 10^9$ hücre/ml, pH 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25 °C) glukozun 10 μ M'lık konsantrasyonu ile ölçümler gerçekleştirildi. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevabı %100 kabul edilerek dört saat boyunca otuz dakika aralıklarla yapılan ölçümlerde elde edilen sonuçlarla zamana karşı biyosensör cevabındaki farklanma rölatif olarak hesaplandı.

3.3.4 Substrat spesifikliğı

Biyosensörün substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda farklı substratlar kullanılarak sensör cevabı izlendi. Sukroz, laktoz, fruktoz, galaktoz, arginin, lizin, triptofan ve etanol standart çözeltilerinin 10 μ M'lık konsantrasyonları substrat olarak kullanıldı.

Mikrobiyal elektrodun 10 µM glukoza verdiği cevap %100 kabul edilerek diğer substratlar ile elde edilen % biyosensör cevapları hesaplandı.

4. II. NESİL MİKROBİYAL BİYOSENSÖRLERE İLİŞKİN ÇALIŞMALAR

4.1 II. Nesil Mikrobiyal Biyosensörlerin Hazırlanması

10 ml hücre kültür ortamından alınarak 4 000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi.

HCF ve ferrosen olmak üzere iki farklı medyatör kullanılarak çalışmalar gerçekleştirildi. Farklı çözünürlük özelliklerinden dolayı HCF çalışma tamponuna ilave edilirken, ferrosenin yumurta kabuğu membranı yüzeyine hücre ile birlikte adsorbsiyonu sağlandı.

HCF medyatörlü biyosensör sistemi için santrifüjle ayrılan hücre pastası uygun miktarda pH 7,0 potasyum fosfat tamponunda (5 mM) çözülerek 50 µl'si ($7,02 \times 10^9$ hücre/ml) yumurta kabuğu membranı yüzeyine pipetlenerek immobilizasyon için 35-40 dakika oda koşullarında beklendi.

Ferrosen medyatörlü biyosensör sistemi yukarıda HCF içeren sistemde bahsedildiği gibi hazırlandı, ancak farklı olarak hücre dışında, 100 mM ferrosen çözletisinden 25 µl (0,465 mg) yumurta kabuğu membranı yüzeyine pipetlenerek immobilizasyon için 35-40 dakika oda koşullarında beklendi.

4.2 II. Nesil Mikrobiyal Biyosensörlere İlişkin Optimizasyon Çalışmaları

4.2.1 Döngüsel voltammetri ile çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Ferrosen immobilize edilerek hazırlanmış biyosensör ile 20 ml, pH 7,0 potasyum fosfat (50 mM) ölçüm ortamına 0 mV ve +600 mV potansiyel aralığında arasında döngüsel voltamogramı alınarak ferrosenin çalışma potansiyelinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. HCF medyatörlü biyosensör sistemi için ise ölçüm ortamında 10 mM HCF olacak şekilde stok çözeltilerden ilave edilerek, elektrodun 3 dakika inkübasyonu sağlandı. Ardından, -200 mV ve +600 mV potansiyel aralığında döngüsel voltammogramlar alınarak HCF içeren sistem içinde oksidasyon potansiyeli dikkate alınarak uygun çalışma potansiyeli belirlendi.

4.2.2 Optimum medyatör konsantrasyonunun belirlenmesi

Ferrosenin kullanıldığı sistem için, optimum medyatör konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla 100 mM ferrosen çözeltisinden 5, 15, 25, 35 µl yumurta kabuğu membranına adsorblanarak farklı mikrobiyal biyosensörler (hücre miktarı $7,02 \times 10^9$ hücre/ml) hazırlandı. 500 µM glukoz konsantrasyonunda +400 mV'da Ag/AgCl referans, Pt karşıt elektroduna karşı kronoamperometrik ölçümler alındı.

HCF'nin kullanıldığı sistem için ise reaksiyon hücresinde konsantrasyonları 2,5; 7,5; 10; 12,5 mM HCF ve 500 µM glukoz konsantrasyonunda, +300 mV'da Ag/AgCl referans, Pt karşı elektroduna karşı kronoamperometrik ölçümler alındı.

4.3 II. Nesil Mikrobiyal Biyosensörlerin Analitik Karakterizasyonlarına ilişkin çalışmalar

II. nesil mikrobiyal biyosensörün analitik karakterizasyonu amacıyla bu bölümde glukoz için doğrusal tayin aralığının, analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin, substrat spesifikliğin, operasyonel kararlılığın belirlenmesine yönelik çalışmalar yapıldı.

4.3.1 Doğrusal tayin aralığı

Geliştirilen II. nesil biyosensörlerin karakterizasyonu amacıyla I. nesil mikrobiyal biyosensör sistemi için optimize edilmiş koşullar (pH ve hücre miktarı) kullanıldı. 1 M glukoz stok çözeltisinden ortama farklı miktarlarda eklenerek hem ferrosen hem de HCF medyatörlü sistem için standart grafikleri çizildi ve glukoz için doğrusal tayin aralıkları belirlendi.

4.3.2 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

Potasyum fosfat tamponunda (pH 7,0; 50 mM) ve 25 °C'de gerçekleştirilen denemelerde kalibrasyon grafiklerinden belirlenmiş, ve doğrusal tayin aralığında kalan, ferrosen için 250 µM, HCF için 25 µM

glukoz içeren standartlar kullanılarak beş (5) kez ölçüm alındı. Ölçümlere ilişkin standart sapma (S.D) ve varyasyon katsayısı (cv) belirlendi.

4.3.3 Operasyonel kararlılık

Biyosensörün operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla daha önce optimizasyonu gerçekleştirilmiş olan koşullarda ($7,02 \times 10^9$ hücre/ml, 50 mM, pH 7,0 potasyum fosfat tamponu, 25 °C) belirli glukoz konsantrasyonları (ferrosen için 250 µM, HCF için 25 µM) ile ölçümler gerçekleştirildi. Her iki medyatörlü sistem için başlangıçta elde edilen biyosensör cevabı %100 kabul edilerek dört saat boyunca otuz dakika aralıklarla yapılan ölçümlerde elde edilen sonuçlarla zamana karşı biyosensör cevabındaki farklanmaları rölatif olarak hesaplandı.

4.3.4 Substrat spesifikliği

Medyatörlü mikrobiyal biyosensörün substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda ferrosen medyatörlü biyosensör sistemi için 1 M, HCF medyatörlü biyosensör için 100 mM sukroz, laktoz, fruktoz, galaktoz, arginin, lizin, triptofan, etanol standart çözeltileri kullanıldı.

Biyosensörlerde glukoz için elde edilen cevaplar %100 kabul edildi ve diğer substratlar için elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

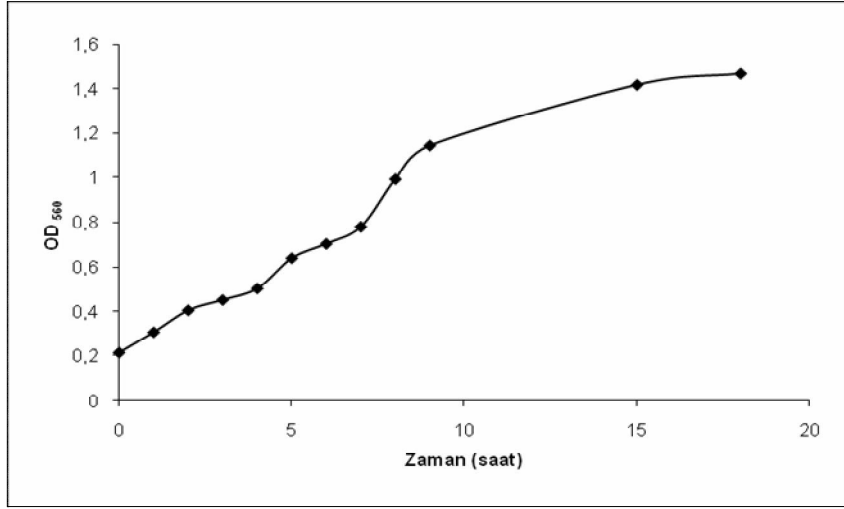
5.1 I. Nesil Mikrobiyal Biyosensörlere İlişkin Sonuçlar

5.1.1 I. Nesil mikrobiyal biyosensörlerin optimizasyonuna ilişkin sonuçlar

5.1.1.1 *P. fluorescens* hücrelerinin kültivasyonu

P. fluorescens hücrelerinin büyüme profillerine ilişkin yapılan bu çalışmada hücrelerin büyümeleri spektrofotometrik olarak 560 nm’de absorbanları okunarak izlendi. Bu amaçla zamana bağlı hücre yoğunluğu (optik dansite) grafiği oluşturuldu (Şekil 5.1). Büyüme profilinden de görüleceği gibi 15’inci saate kadar logaritmik faz, 15’inci saatten sonra stasyoner faz gözlenmiştir. Diğer biyosensör çalışmalarında da tercih edildiği gibi tekralanabilir sonuçların alınabilmesi için geç logaritmik faz evresindeki hücreler biyosensör hazırlığında tercih edildi (Tkac et al., 2003).

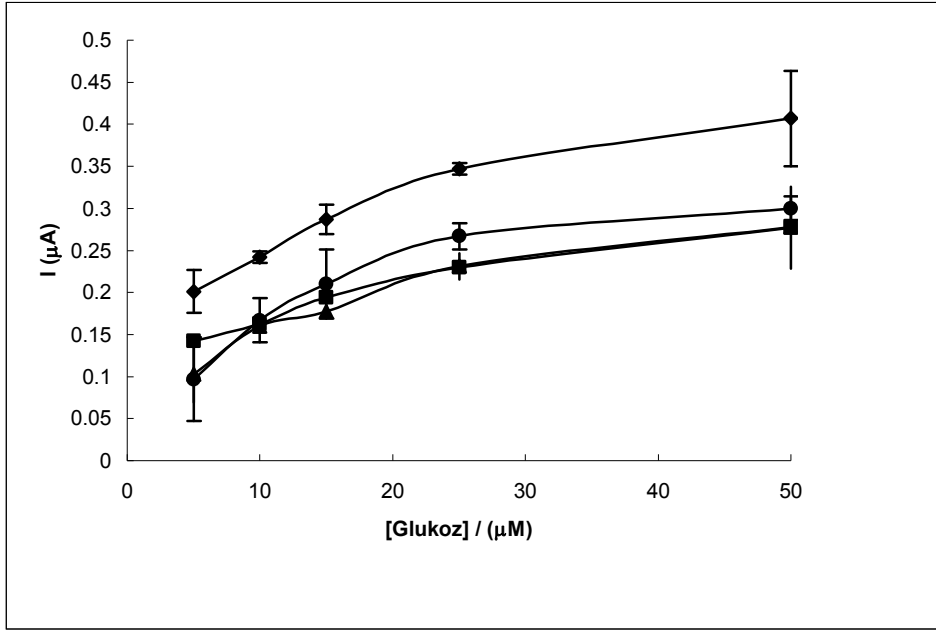
Ayrıca yapılan hücre sayımında kullanılan stok hücre çözeltilisindeki hücre miktarı 60×10^9 hücre/ml olarak hesaplandı.



Şekil 5.1 *P. fluorescens* hücrelerinin büyüme profili

5.1.1.2 Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisi

$35,09 \times 10^9$ hücre/ml, $17,58 \times 10^9$ hücre/ml, $11,71 \times 10^9$ hücre/ml, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml ve $4,68 \times 10^9$ hücre/ml miktarlarıyla hazırlanan biyosensörlere ilişkin kalibrasyon grafikleri Şekil 5.2’de gösterildi.



- ◆ 35.09 × 10⁹ hücre/ml ▲ 11.71 × 10⁹ hücre/ml
 ■ 17.58 × 10⁹ hücre/ml ◆ 7.02 × 10⁹ hücre/ml

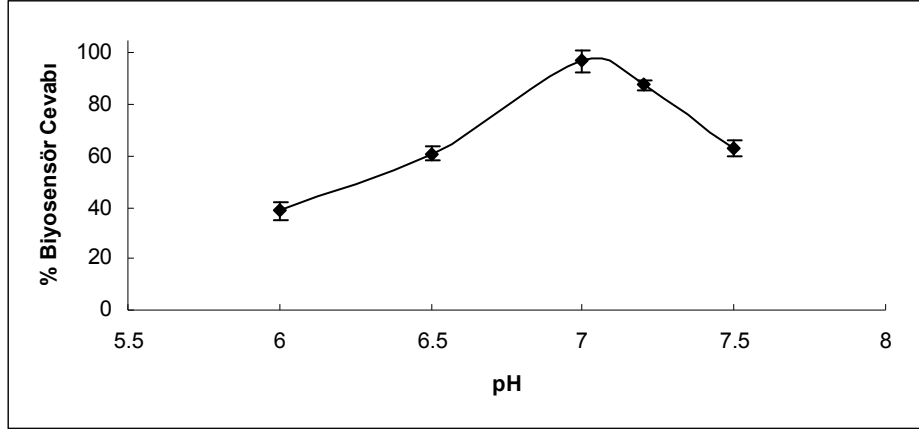
Şekil 5.2 Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisi (pH 7; 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25 °C, -700 mV, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)

Elde edilen sonuçlara göre $4,68 \times 10^9$ hücre/ml miktarı ile cevap alınmazken maksimum biyosensör cevaplarının $7,02 \times 10^9$ hücre/ml olacak şekilde hazırlanan mikrobiyal sensör ile alındığı görüldü. Ayrıca yüksek biyokütle miktarlarında sinyalin düştüğü gözlemlendi. Yüksek biyokütle miktarı biyoaktif tabakada oksijen miktarını sınırlandırır, bu nedenle immobilize hücre tabakasının oksijen ihtiyacı çok iyi karşılanamaz. Dolayısıyla hücreler substratın oksidasyonunu yeterli

etkinlikte gerçekleştiremezler ve bu nedenle alınan sinyal düşer. Biyokütlenin artan miktarının difüzyon problemi yaratmasından dolayı bu durum beklenen bir sonuçtur.

5.1.1.3 Optimum pH

Optimum olarak belirlenmiş $7,02 \times 10^9$ hücre/ml miktarı ile hazırlanan I. nesil mikrobiyal biyosensör ile pH optimizasyonu yapıldı. Denemeler sonucunda elde edilen verilere göre biyosensörün optimum grafiği Şekil 5.3'te verilmiştir.



Şekil 5.3 Biyosensör cevabına pH'nın etkisi (50 mM fosfat tamponu, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, 250 mM glukoz, 25 °C, -700 mV, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)

pH değerinin biyosensör performansına etkisinin belirlenmesi önemli bir parametredir. Çünkü pH hücrelerin metabolik aktivitesini etkileyen önemli bir faktördür. 250 mM glukoz varlığında çeşitli pH'larda (6,0–7,5) potasyum fosfat (50 mM) tampon çözeltileri kullanılarak biyoaktif tabakadaki çözünmüş oksijen içeriğinin metabolik aktiviteye bağlı olarak tükenmesi -700 mV izlendi. Elde edilen veriler pH 6,0'dan 7,0'ye yükseldiğinde biyosensör cevabının arttığını fakat pH 8,0'e ulaştıktan sonra azalmaya başladığını göstermektedir (Şekil 5.3). Dolayısıyla, aynı zamanda mikrobiyal biyosensör için hücrelerin kültür ortamının pH'ına da yakın olan pH 7,0 optimum olarak belirlendi.

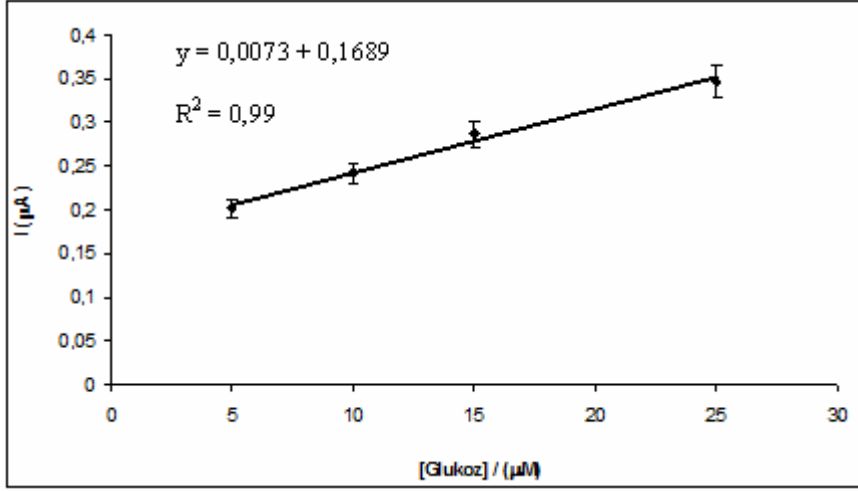
5.1.3 I. Nesil mikrobiyal biyosensörlerin analitik karakterizasyonuna ilişkin sonuçlar

Bu bölümde mikrobiyal biyosensörün analitik karakterizasyonu amacıyla glukoz tayin aralığının, analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin, substrat spesifikliğinin, operasyonel kararlılığın belirlenmesine yönelik çalışmalar yapıldı.

5.1.3.1 Doğrusal tayin aralığı

P. fluorescens temelli I. nesil biyosensöre yönelik optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra glukoz için kalibrasyon grafiği çizildi.

Hazırlanan biyosensör ile yapılan denemeler sonrasında, glukoz için elde edilen doğrusal grafik Şekil 5.4'de verilmiştir.



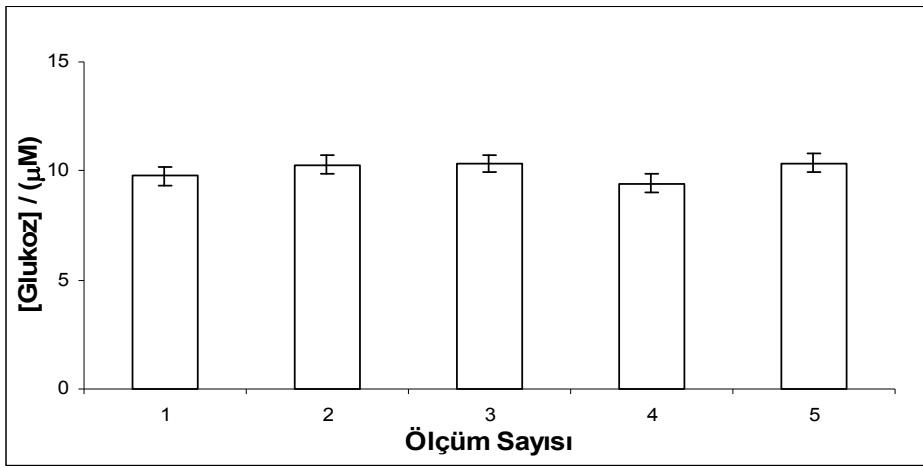
Şekil 5.4 Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (pH 7,0, 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25 °C, -700 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)

Şekil 5.4'te de görüleceği gibi optimize edilen çalışma koşullarında, hazırlanan I. nesil bakteriyel sensör sistemi ile 5 µM-25 µM tayin aralığında glukoz dedeksiyonu gerçekleştirilebilmektedir.

5.1.3.2 Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği

Hazırlanan I. nesil mikrobiyal biyosensör ile yapılan analizlerin tekrarlanabilirliğinin test edilmesi amacıyla; 10 µM glukoz standart çözeltisi kullanılarak pH 7,0 potasyum fosfat tamponunda (50 mM), 25 °C'de ard arda beş (5) ölçüm yapıldı. Yapılan ölçümler sonrasında elde edilen akım değerleri kalibrasyon grafiğinde verilen ilgili denklemde y değeri olarak kullanılıp standart sapma (S.D) ve varyasyon katsayısı

(cv) değerleri hesaplanmıştır. Buna göre I. nesil mikrobiyal sensör için S.D \pm 0,405 μ M % cv değeri ise % 4,09 olarak bulunmuştur. Elde edilen değerler analitik olarak kabul edilebilir sınırlar içerisinde olup hazırlanan sistemin tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir (şekil 5.5).

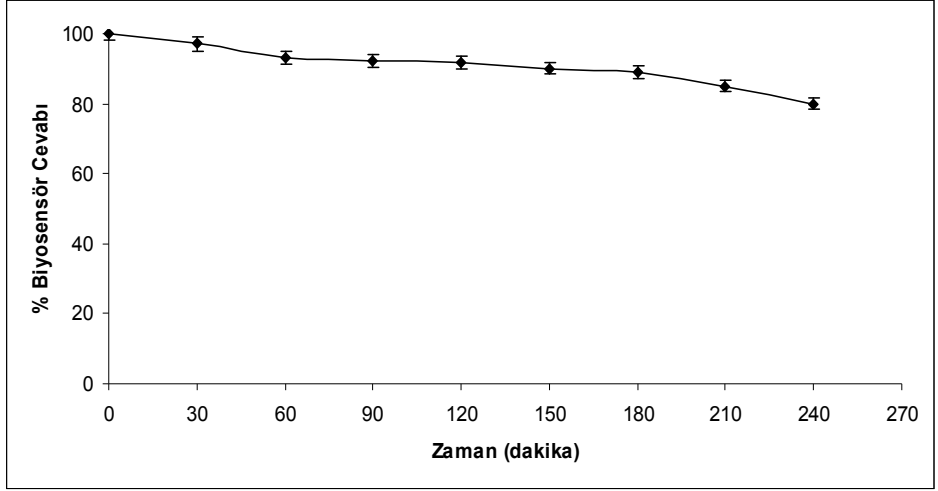


şekil 5.5 I. Nesil mikrobiyal biyosensörlerde analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği (n=5) (50 mM, pH 7,0 potasyum fosfat tamponu, 25 $^{\circ}$ C, -700 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 lme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)

5.1.3.3 Operasyonel Kararlılık

Başlangıçta elde edilen biyosensör cevapları %100 kabul edilerek 4 saat boyunca 30 dakika aralıklarla yapılan ölümlerde elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı.

4 saatlik zaman diliminde biyosensör cevabının %7'ye düştüğü gözlemlendi. Hücrelerin canlılık faaliyetleri göz önünde bulundurulduğunda sistemin operasyonel kararlılığının oldukça iyi olduğu görülmektedir.



Şekil 5.6 I. nesil biyosensörün operasyonel kararlılığına ait grafik (50 mM, pH 7,0 potasyum fosfat tamponu, 25 °C, -700 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)

5.1.3.4 Substrat Spesifikliği

Biyosensörün substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda 10 μ M sukroz, laktoz, fruktoz, galaktoz, arginin, lizin, triptofan, etanol standart çözeltilerinden sadece etanol için biyosensör cevabı alındı. 10 μ M glukoz için elde edilen cevap %100 kabul edildi ve etanol için % biyosensör cevabı hesaplandı. I. nesil biyosensör ile %14,0 olmak üzere sadece etanol için cevap alındı.

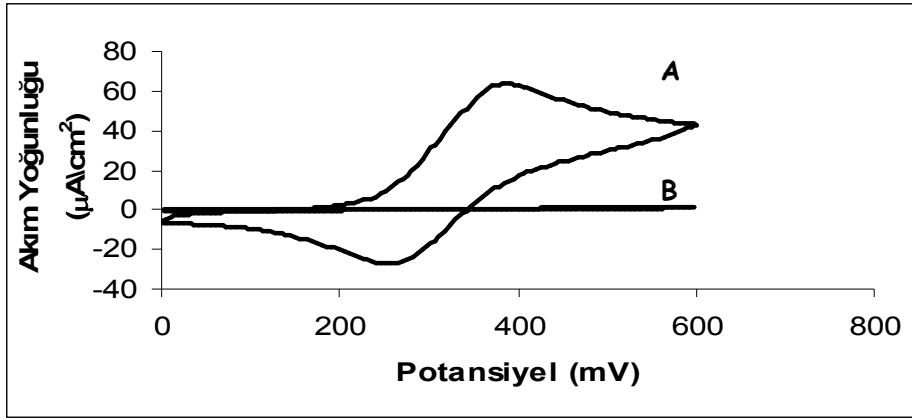
5.2 II. Nesil Mikrobiyal Biyosensörlere İlişkin Sonuçlar

5.2.1 II. Nesil mikrobiyal biyosensörlerin optimizasyonuna ilişkin sonuçlar

5.2.1.1 Döngüsel voltammetri ile çalışma potansiyelinin belirlenmesi

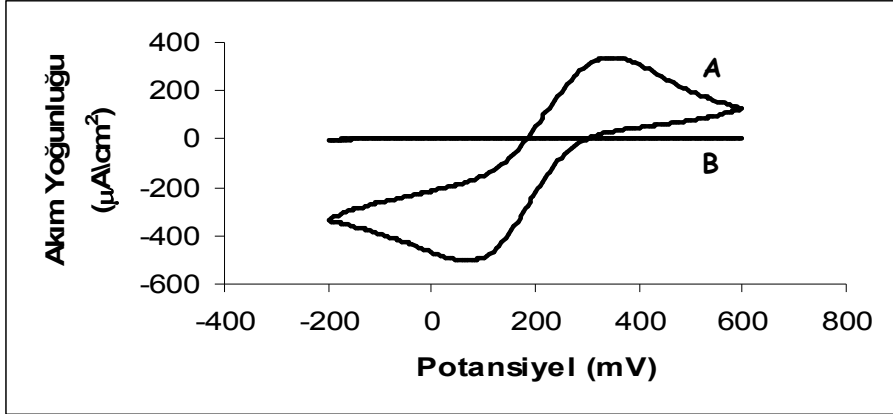
Medyatörlü mikrobiyal sensör sistemlerinin temel prensibi kullanılan redoks medyatörlerinin oksijen yerine, karbon kaynağı/substratın tüketimine bağlı metabolik aktivite sonucu olarak oluşan elektronları kabul ederek indirgenmesidir. İndirgenen elektroaktif türler elektrot yüzeyinde tekrar oksitlenerek rejenere olacaktır ve bu şekilde mikrobiyal türler ile elektrot arasında gerçekleşen elektron aktarım döngüsü tamamlanacaktır. Bu durumda medyatörler bu döngüyü gerçekleştiren aracı moleküllerdir ve iyi bir medyatörden beklenen temel özellikler, yükseltgenmiş halinin hücre membranından geçerek elektronları kabul edebilmesi akabinde indirgenmiş halinin membranı kolaylıkla terk ederek elektrot yüzeyine bu elektronları aktarmasıdır. Bu durumda, redoks medyatörünün çözünürlük özellikleri, hücrenin lipofilik, inert membranıyla kolayca kontakt haline geçebilmesi, etkin bir medyatörlü mikrobiyal biyosensör hazırlanmasında en önemli kriterdir (Timur et al., 2007). Bu tez projesi kapsamında suda çözünürlüğü yüksek olan HCF ve az çözünen ferrosen seçilerek HCF çözelti fazında ferrosen ise biyoaktif membran yapısına katılarak kullanıldı.

Ferrosen medyatörlü mikrobiyal biyosensörün 0 mV ve +600 mV arasında döngüsel voltammogramı alınarak, gözlemlenen yükseltgenme potansiyeline göre uygun çalışma potansiyeli +400 mV belirlendi (Şekil 5.7). +400 mV’da kronoamperometrik olarak sensör cevabının izlenmesi gerçekleştirildi.



Şekil 5.7 Ferrosene ait döngüsel voltammogram (0 mV ve +600 mV aralığı, 10 mV/s, (A): Yumurta kabuğu membranı + hücre + Ferrosen, (B): Yumurta kabuğu membranı + hücre)

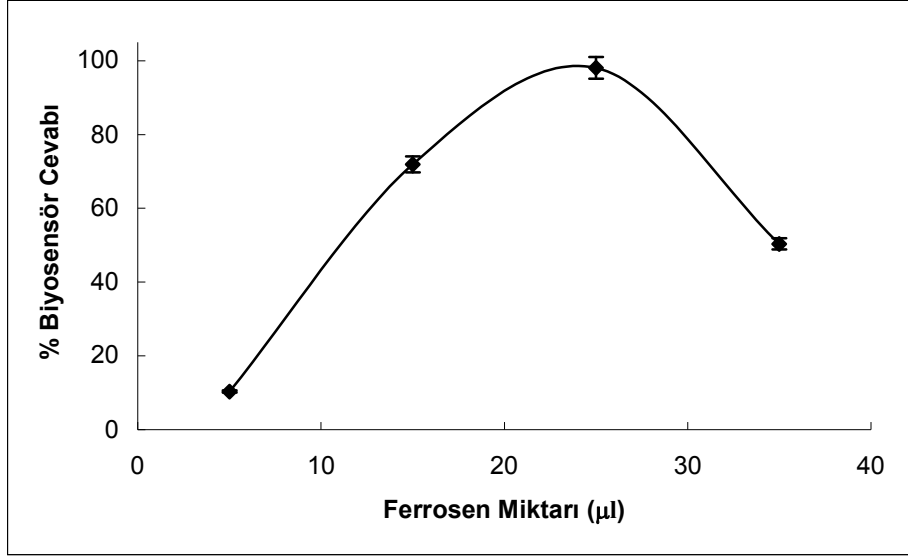
Çalışma tamponuna 10 mM potasyum hegzasiyanoferrat (HCF) ilave edilerek 3 dakika inkübe edildi. -200 mV ve +600 mV arasında döngüsel voltammogram alınarak ferrosenli sistemde olduğu gibi optimum çalışma potansiyeli, yine medyatörün oksidasyonun izlenmesine bağlı +300 mV olarak seçildi (Şekil 5.8) ve hücrelerin metabolik aktivitesi oksijenden bağımsız olarak +300 mV’da kronoamperometrik olarak izlendi.



Şekil 5.8 HCF'ye ait döngüsel voltammogram (-200 mV ve +600 mV aralığı, 10 mV/s, A:Yumurta kabuğu membranı + hücre + HCF; B: Yumurta kabuğu membranı + hücre)

5.2.1.2 Optimum medyatör konsantrasyonunun belirlenmesi

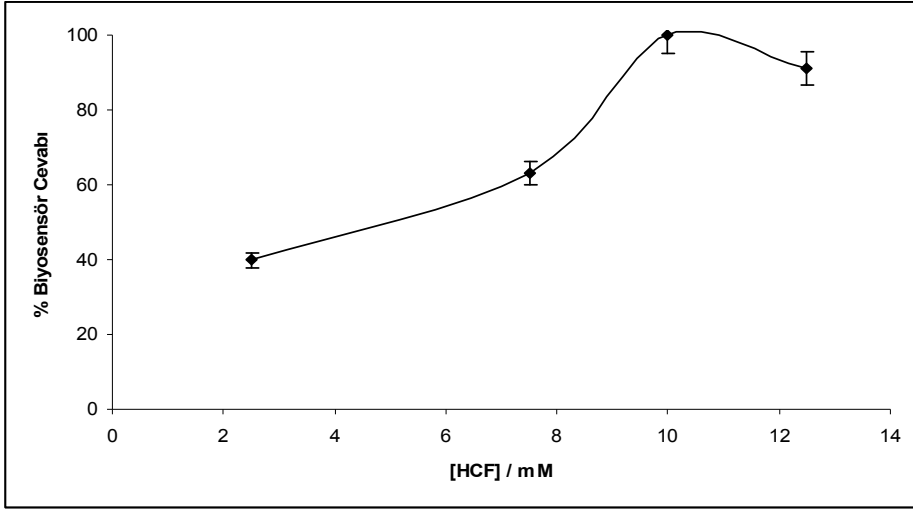
Optimum medyatör konsantrasyonunun belirlenmesi için 100 mM ferrosen çözeltisinden sırasıyla 5, 15, 25, 35 μ l yumurta kabuğu membranına immobilize ederek farklı II. nesil mikrobiyal biyosensörler hazırlandı. Membrana immobilize edilmiş ferrosen medyatörlü biyosensörler ile 500 μ M glukoz konsantrasyonunda +400 mV'da kronoamperometrik ölçümler alınarak sensör cevabı izlendi (Şekil 5.9).



Şekil 5.9 Ferrosen miktarının sensör cevabına etkisi (50 mM, pH 7,0 potasyum fosfat tamponu, 25 °C, +400 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)

Yumurta kabuğu membranındaki ferrosenin oluşturduğu ince tabakanın difüzyon problemine neden olmasından dolayı 35 µl ferrosen kullanıldığında alınan sinyalde büyük bir düşme gözlemlendi. En yüksek bağıl (%) biyosensör cevabı 25 µl (0,465 mg) ferrosen varlığında elde edildi. Bu nedenle ferrosen medyatörlü sistemde sonraki ölçümlerde 25 µL ferrosen içeren biyosensörler kullanıldı.

Reaksiyon hücresinde konsantrasyonları 2,5; 7,5; 10; 12,5 mM HCF olacak şekilde, 500 µM glukoz konsantrasyonunda +300 mV'da sensör cevapları belirlendi (Şekil 5.10).



Şekil 5.10 HCF miktarının sensör cevabına etkisi (50 mM, pH 7,0 potasyum fosfat tamponu, 25 °C, +300 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)

HCF'nin belli bir konsantrasyon değerinden sonra sensör cevabında bir doygunluğa ulaşılarak, 12,5 mM HCF varlığında elde edilen sinyalde nispeten düşme gözlenmiştir. En yüksek % biyosensör cevabının 10 mM HCF varlığında elde edildiği görüldü ve bundan sonraki ölçümler bu değer ile gerçekleştirildi.

5.2.2 II. Nesil mikrobiyal biyosensörlerin analitik karakterizasyonuna ilişkin sonuçlar

II. nesil mikrobiyal biyosensörün analitik karakterizasyonu amacıyla bu bölümde glukoz tayin aralığının, analiz sonuçlarının

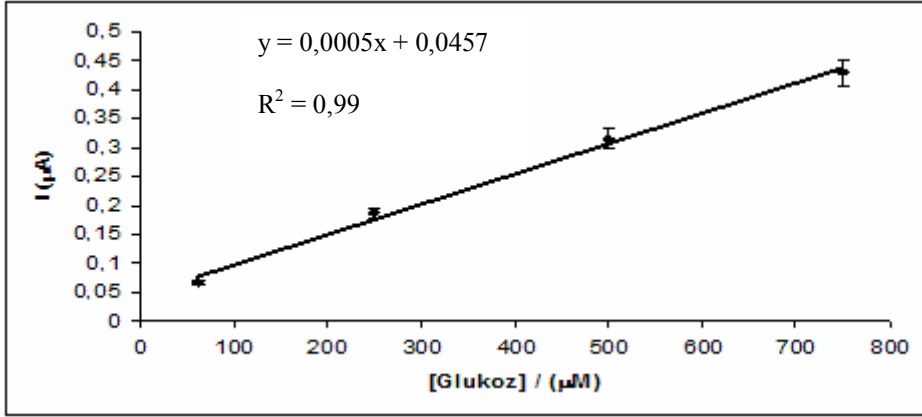
tekrarlanabilirliğinin, substrat spesifikliğinin, operasyonel kararlılığın belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

5.2.2.1 Doğrusal tayin aralığı

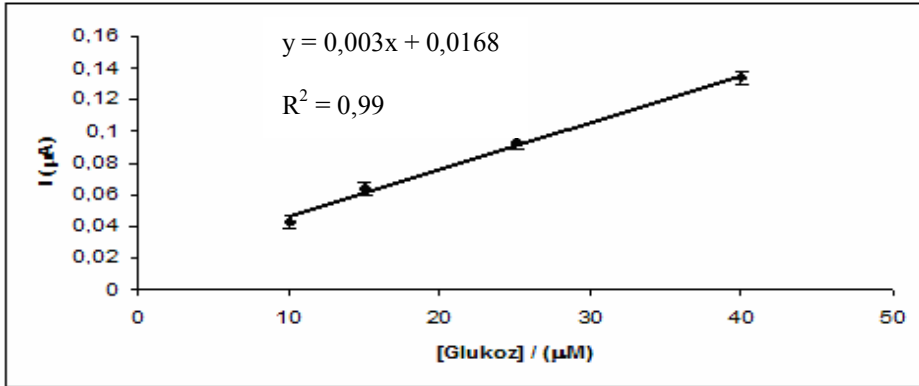
Glukoz analizine yönelik *Pseudomonas fluorescens* temelli II. nesil biyosensörler ile farklı glukoz konsantrasyonlarında biyosensör cevapları incelendi ve kalibrasyon grafiği çizildi. Ferrosen medyatörlü II. nesil mikrobiyal sensör için 60, 250, 500, 750 μM glukoz konsantrasyonları ile çalışıldı. HCF medyatörlü II. nesil mikrobiyal sensör için 10, 15, 25, 40 μM glukoz konsantrasyonları ile çalışıldı. Ölçümler potasyum fosfat çalışma tamponunda (pH 7,0; 50mM) 25 °C’de gerçekleştirildi.

Geliştirilen II. nesil biyosensörlerin analitik karakterizasyonu amacıyla standart grafikleri çizilerek glukoz için ölçüm aralıkları belirlendi. Ferrosen ve HCF medyatörlü biyosensörler için elde edilen glukoz standart grafikleri sırasıyla Şekil 5.11 ve 5.12’de görölmektedir.

Hazırlanan HCF medyatörlü sensör sistemi ile 10 μM - 40 μM tayin aralığında, ferrosen medyatörlü sensör sistemi ile 60 μM – 750 μM tayin aralığında glukoz dedeksiyonu gerçekleştirilebilmektedir. HCF’nin medyatör olarak kullanıldığı sensör sistemi daha düşük glukoz konsantrasyonuna cevap verirken ferrosenin medyatör olarak kullanıldığı sensör sistemde daha az duyarlı ancak daha geniş glukoz konstrasyonu aralığında cevap elde edildi. HCF’nin çözünürlüğünün ferrosene göre daha iyi olması düşük glukoz konsantrasyonunda dahi yüksek sinyal elde edilmesini sağlamıştır ve düşük glukoz konsantrasyonunun tayinine imkan tanımıştır.



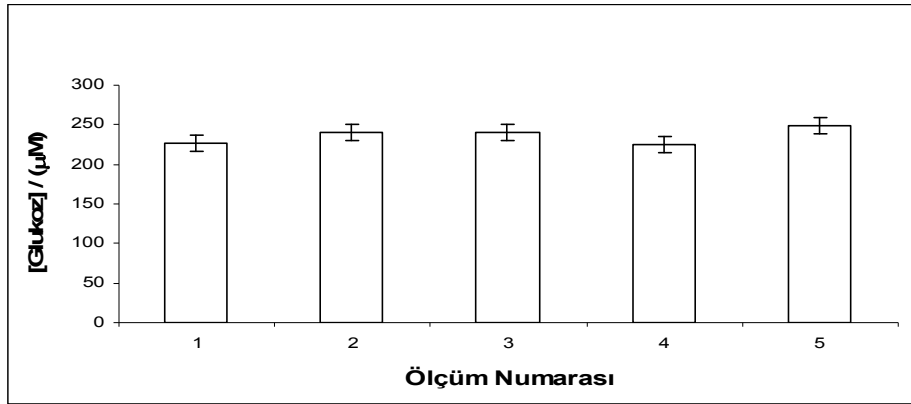
Şekil 5.11 Ferrosen medyatörlü biyosensör cevabına glukoz konsantrasyonunun etkisi (pH 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25 °C, +400 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)



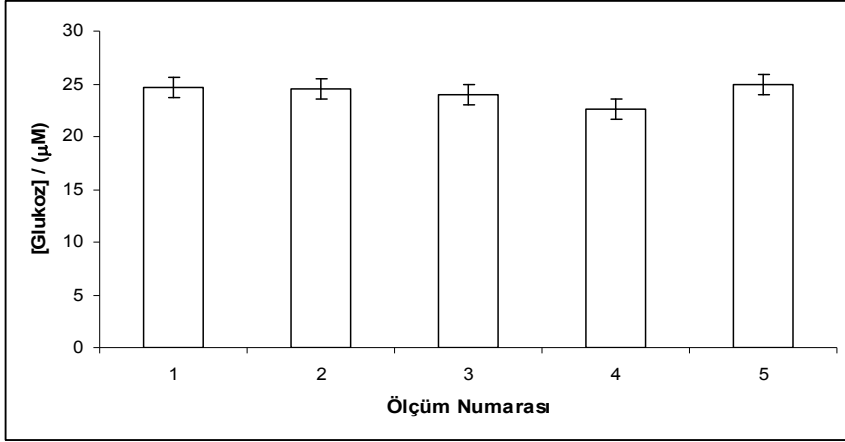
Şekil 5.12 HCF medyatörlü biyosensör cevabına glukoz konsantrasyonunun etkisi (pH 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25°C, +300 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)

5.2.2.2 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

Hazırlanan II. nesil mikrobiyal biyosensör ile yapılan analizlerin tekrarlanabilirliğinin test edilmesi amacıyla; ferrosen için 250 μM , potasyum hegzasiyanoferrat için 25 μM glukoz standart çözeltisi kullanılarak pH 7,0, 50 mM fosfat tamponu, 25 °C'de ard arda dört (5) ölçüm yapıldı. Yapılan ölçümler sonrasında elde edilen akım değerleri kalibrasyon grafiğinde verilen ilgili denklemde y değeri olarak kullanılıp standart sapma (S.D) ve varyasyon katsayısı (cv) değerleri hesaplanmıştır. Buna göre ferrosen medyatörlü mikrobiyal sensör için S.D $\pm 10,18 \mu\text{M}$, % cv değeri ise %4,57, HCF medyatörlü mikrobiyal sensör için S.D $\pm 1,004 \mu\text{M}$, % cv değeri ise %3,99 olarak bulunmuştur. Elde edilen değerler analitik olarak anlamlı sonuçlar olup hazırlanan II. nesil mikrobiyal biyosensör sistemlerinin tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 5.13 Ferrosen için tekrarlanabilirlik (pH 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25 °C, +400 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)

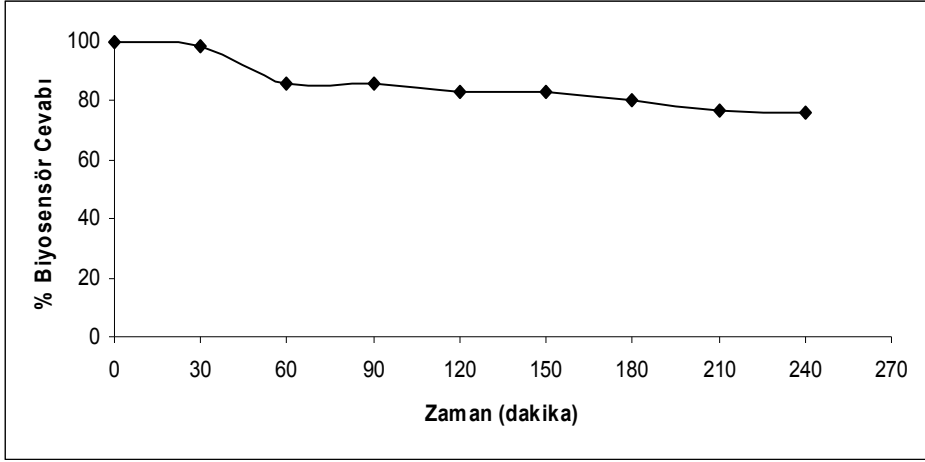


Şekil 5.14 HCF için tekrarlanabilirlik (pH 7,0, 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25 °C, +300 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)

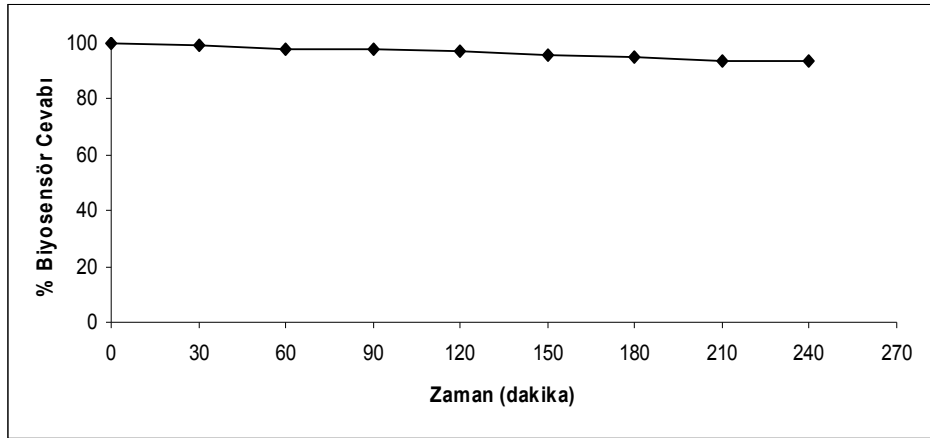
5.2.2.3 Operasyonel kararlılık

Biyosensörün operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensör daha önce optimizasyonu yapılarak belirlenmiş olan koşullarda (pH 7,0, 50 mM fosfat tamponu, 25 °C) her 30 dakikada bir olmak üzere belirli glukoz standardı için ölçümler gerçekleştirildi.

25 °C'de gerçekleştirilen denemelerde ferrosen için glukozun 250 µM, HCF için glukozun 25 µM'lık konsantrasyonu ile çalışıldı. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevapları %100 kabul edilerek 4 saat boyunca 30 dakika aralıklarla yapılan ölçümlerde elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı.



Şekil 5.15 Ferrosen için operasyonel kararlılık (pH 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25 °C, +400 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)



Şekil 5.16 HCF için operasyonel kararlılık (pH 7,0; 50 mM potasyum fosfat tamponu, 25 °C, +300 mV, $7,02 \times 10^9$ hücre/ml, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)

4 saatlik zaman diliminin sonunda ferrosen medyatörlü biyosensör sisteminin aktivitesinde % 24, HCF medyatörlü biyosensör sisteminin aktivitesinde ise % 3 azalma gözlemlendi. Sistemlerin operasyonel kararlılıklarının farklı olması medyatörlerin uygulanma şekline kaynaklanmaktadır. Ferrosen membrana adsorblandırılarak kullanıldığı için zamanla çözünerek membranın gözeneklerinden ölçüm ortamına doğru difüze olması mümkündür. Bu nedenle ferrosen medyatörlü biyosensör cevabında düşme daha fazla olmaktadır. HCF medyatörlü sistemde medyatör her ölçüm için ortama çözelti şeklinde ilave edilmesi sebebiyle aktivitesini oldukça iyi koruduğu Şekil 5.16'da görülmektedir.

5.2.2.4 Substrat spesifikliği

Medyatörlü mikrobiyal biyosensörün substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda ferrosen medyatörlü biyosensör sistemi için 1 M, HCF medyatörlü biyosensör için 100 mM sukroz, laktoz, fruktoz, galaktoz, arginin, lizin, triptofan, etanol standart çözeltileri kullanıldı.

Biyosensörde glukoz için elde edilen cevaplar % 100 kabul edildi ve diğer substratlar için elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı. Ferrosen medyatörlü biyosensör ile %14,6, HCF medyatörlü biyosensör ile % 2 olmak üzere sadece etanol için cevap alındı.

6. GENEL DEĞERLENDİRME

Bu tez projesinde I. ve II. nesil mikrobiyal biyosensör sistemleri tasarlandı. Gram negatif, bakteri olan *P. fluorescens* hücrelerinin kullanıldığı sistemlerde hücreler fiziksel adsorbsiyon ile yumurta kabuğu membranına immobilize edildi. Glukozun substrat olarak kullanılmasıyla biyosensör sistemleri optimize edilerek, analitik karakterizasyonları gerçekleştirildi. Ayrıca elde edilen biyosensörlerin performansları incelendi.

P. fluorescens hücrelerini temel alan I. nesil biyosensörün optimizasyon çalışmaları sonunda en ideal hücre miktarı $7,02 \times 10^9$ hücre/ml olarak bulundu. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda çalışma tamponu pH 7,0; 50 mM'lık fosfat tamponu olmasına karar verildi. Ölçümler 25 °C'de gerçekleştirildi.

P. fluorescens hücrelerini temel alan II. nesil biyosensör sistemleri için medyatör olarak HCF ve ferrosen kullanıldı. II. nesil mikrobiyal biyosensör sistemleri için daha önce I. nesil biyosensör sistemi için bulunan optimum hücre miktarı ($7,02 \times 10^9$ hücre/ml) ve optimum tampon sistemi (pH 7,0, 50 mM'lık potasyum fosfat tamponu) kullanıldı. Ölçümler 25 °C'de gerçekleştirildi. II. nesil mikrobiyal biyosensörlerin optimizasyon çalışmaları sonunda en ideal medyatör miktarları bulundu. 100 mM ferrosen çözeltisinden yumurta kabuğu membranına 25 µl immobilizasyonu ile hazırlanmış sensörde ve reaksiyon ortamında 10 mM HCF varlığında hazırlanmış sensörde en yüksek % biyosensör cevapları elde edildi.

Geliştirilen biyosensör sistemlerine ait analitik karakterizasyon sonuçları Çizelge 6.1’de görülmektedir. Sonuç olarak medyatör kullanımının mikrobiyal biyosensörün glukoz için duyarlılığını arttırdığı görüldü.

Biyosensör sistemlerinin 4 saatlik zaman diliminde operasyonel kararlılıkları da birbirlerine göre farklılık gösterdi. I.nesil mikrobiyal biyosensörün aktivitesinde %7 azalma görülürken, ferrosen medyatörlü biyosensörün %24, HCF medyatörlü biyosensörün %3 azalma görüldü. En fazla aktivite kaybı ferrosen medyatörlü biyosensörde görüldü. Bunun nedeni ferrosenin zamanla membrandan difüzlenererek uzaklaşmasıdır.

HCF’nin çözünürlüğünün ferrosene göre daha iyi olması düşük glukoz konsantrasyonunda dahi yüksek sinyal elde edilmesini sağlamıştır ve ferrosen medyatörlü sisteme göre daha düşük glukoz konsantrasyonunun tayinine imkan tanımıştır. Ayrıca HCF medyatörlü biyosensörün operasyonel kararlılığının daha iyi olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak daha önce enzim temelli biyosensörlerde kullanılan yumurta kabuğu membranı ilk kez mikroorganizma immobilizasyonu için de kullanıldı. Yumurta kabuğu membranı hem biyoyumlu olması hem de iyi geçirgenlik özelliği sayesinde glukoz tayini için geliştirilen mikrobiyal biyosensör sistemi için oldukça elverişli bir immobilizasyon materyalidir.

Çizelge 6.1 Geliştirilen mikrobiyal biyosensör sistemlerinin analitik karakterizasyonları

Analitik Karakterizasyon	I.Nesil Biyosensör	II. Nesil Biyosensör (Ferrosen medyatörlü)	II. Nesil Biyosensör (HCF medyatörlü)
Kalibrasyon denklemleri	$y = 0,0073x + 0,1689$ ($r^2=0,99$)	$y = 0,5233x + 0,0457$ ($r^2=0,99$)	$y = 0,003x + 0,0168$ ($r^2=0,99$)
Doğrusal aralık	5-25 μM	60-750 μM	10-40 μM
Standart sapma	10 \pm 0,405 μM	250 \pm 10,18 μM	25 \pm 1,004 μM
Ortalama (\bar{x}) (μM) (n=5)	9,909 μM	222,594 μM	25,169 μM
Varyasyon Katsayısı (V.K.)	%4,09 (n:5)	%4,57 (n:5)	%3,99 (n:5)

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alacam, S., Timur, S. and Telefoncu, A.,** 2007, A novel biosensor based on L-homocysteine desulfurase enzyme immobilized on eggshell membrane, *J. Mol. Catal. B: Enzym*, 49:55-60.
- Aydın, F.,** 2001, Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Değişik Yöntemlerle Çeşitli Antimikrobiyellere Duyarlılıklarının Araştırılması, A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara.
- Ayhan, K.,** 2000, Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını Sim Matbaacılık Ltd., Ankara, 522s.
- Bateman, R.C., Evans, J.A.,** 1995, Using the Glucose Oxidase/Peroxidase System in Enzyme Kinetics, *J. Chem. Educ*, 72: A240-A241.
- Chaubey, A. and Malhotra, B.D.,** 2002, Mediated biosensors, *Biosensors & Bioelectronics*, 17:441-456.
- Choi, M.M.F., Pang, W.S.H., Xiao, D. and Wu, X.J.,** 2001, An optical glucose biosensor with eggshell as an enzyme immobilization platform, *Analyst*, 126:1558-1563.
- Choi, M.M.F., Yiu, T.P.,** 2004, Immobilization of beef liver catalase on eggshell membrane for fabrication of hydrogen peroxide biosensor, *Enzyme and Microbial Technology*, 34:41-47.
- Davis, D.B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H. S. and Wood, W.B.,** 1968, Microbiology, Hober Medical Division, New York, 774p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dinçkaya, E.**, 1999, Enzim Sensörleri, Biyosensörler (Ed. Telefoncu A.), 81-142s.
- Dzyadevych, S.V., Arkhypova, V.N., Soldatkin, A.P., El'skaya, A.V., Martelet, C., and Jaffrezic-Renault,** 2008, Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future Biocapteurs enzymatiques à transduction ampérométrique :passé, présent, futur, *ITBM-RBM*, 29:171–180.
- Edmiston, P.L. and Williams, T.R.**, 2000, An Analytical Experiment in Error Analysis; Repeated Determination of Glucose Using Commercail Glucometers, *J. Chem. Educ.*, 77:377.
- Evans, M.R., Jordinson, G.M., Rawson, D.M. and Rogerson, J.G.**, 1998, Biosensors for the measurement of toxicity of wastewaters to activated sludge, *Pesticide Sci.*, 54:447-452.
- Frobisher, M.**, 1968, Fundamentals of Microbiology, W. B. Saunders Company, USA, 457p.
- Gao, Y. and Xu, Chin, X.**, 2002, *J. Health Lab. Technol.*, 12:553.
- Geng, Y., Cui, H., Zhao, X.**, 2000, *J. Shandong Normal Univ. (Nat. Sci.)* 15:436.
- Han, A., Wu, G., Liang, Q., Zhang, F., Hao, L., Zhang, X., Tang, Y., Chin J.**, 2003, *Anal. Chem.*, 31:1417.
- Hinckea, M.T., Gautronb, U.J., Panheleux, M., Garcia-Ruizc, M.D., McKeed, Y.N.**, 2006, Identification and localization of lysozyme as a component of eggshell membranes and eggshell matrix, *Bioresource Technology*, 97:488–493.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ikeda, T., Kurosaki, T., Takayama, K., Kano, K. and Miki, K.,** 1996, Measurements of oxidoreductase-like activity of intact bacterial cells by an amperometric method using a membrane-coated electrode, *Anal. Chem.*, 68:192–198.
- Jeppesen, C.,** 1995, Media for *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp From Food and Environment, *International Journal of Food Microbiology*, 26:25–41.
- John, H.T., Luong, Male, K.B. and Glennon, J.D.,** 2008, Biosensor technology: Technology push versus market pull, *Biotechnology Advances*, 26:492–500.
- Kalab, T. and Skladal, P.,** 1994, Evaluation of mediators for development of amperometric microbial bioelectrodes, *Electroanalysis*, 6:1004–1008.
- Kirgoz, U.A., Timur, S., Odaci, D., Perez, B., Alegret, S. and Merkoçi, A.,** 2007, Carbon Nanotube Composite as Novel Platform for Microbial Biosensor, *Electroanalysis*, 19: 893 – 898.
- Lei, Y., Chenb, W. and Mulchandani, A.,** 2006, Review Microbial biosensors, *Analytica Chimica Acta*, 568:200–210.
- Luo,X., Killard, A.J. and Smyth M.R.,** 2006, Reagentless Glucose Biosensor Based on the Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase on Carbon Nanotube-Modified Electrodes, *Electroanalysis*, 18:1131 – 1134.
- Luo, F., Li, Y., Han, H. and Chin, W.,** 2003, *J. Pharm. Sci.*, 18:147.
- Mohanty, S.P. and Kougiianos, E.,** 2006, Biosensors: A Tutorial Review, *IEEE Potentials*, 25:35-40.
- Mullis, T.C., Winge, J.T. and S.T. Deal,** 1999, *J. Chem. Educ.*, 76:1711.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Murphy, L.**, 2006, Bioinorganic chemistry / Biocatalysis and biotransformation, *Biosensors and bioelectrochemistry*, 10: 177-184.
- Odaci, D., Timur, S. and Telefoncu, A.**, 2008, Bacterial sensors based on chitosan matrices, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134:89-94.
- Özan, M.**, 1996, Ankara Garnizonundaki Askeri Birliklerin İçme Sularında Membran Filtrasyon Tekniği ile Pseudomonas aeruginosa' nın İzolasyonu ve İdentifikasyonu Üzerine Araştırmalar. A.Ü. Sağlık Bil. Ens. Bilim Uzmanlığı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Sadik, O.A., Brenda, S., Joasil, P. and Lord, J.**, 1999, *J. Chem. Educ.*, 76:967.
- Skladal, P., Morozova, N.O. and Reshetilov, A.N.**, 2002, Amperometric biosensors for detection of phenol using chemically modified electrodes containing immobilized bacteria, *Biosensors and Bioelectronics*, 17:867-873.
- Solberg, M., O'leary, V.S. and Riha, W.E.**, 1972, New Medium for the Isolation and Enumeration of Pseudomonads, *Applied Microbiology*, 24: 544-550.
- Takayama, K., Kurosaki, T., Ikeda, T. and Nagasawa, T.**, 1995, Bioelectrocatalytic hydroxylation of nicotinic acid at an electrode modified with immobilized bacterial cells of Pseudomonas fluorescens in the presence of electron transfer mediators, *J. Electroanal. Chem.*, 381:47-53
- Timur, S., Haghghi, B., Tkac, J., Pazarlıoğlu, N., Telefoncu, A. and Gorton, L.**, 2007, Electrical wiring of Pseudomonas putida and Pseudomonas fluorescens with osmium redox polymers, *Bioelectrochemistry*, 71: 38-45.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tka, J., Stefuca, V. and Gemeiner, P.,** 2005, Biosensors with Immobilised Microbial Cells Using Amperometric and Thermal Detection Principles, Applications of Cell Immobilisation Biotechnology, Volume 8B, part 5.
- Tkac, J., Vostiar, I., Gorton, L., Gemeiner, P. and Sturdik, E.,** 2003, Improved selectivity of microbial biosensor using membrane coating. Application to the analysis of ethanol during fermentation, *Biosensors and Bioelectronics*, 18: 1125-1134.
- Tortora, J.G., Funke, R.B. and Case, L.C.,** 1992, Microbiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., California, 523p.
- Trogl, J., Ripp, S., Kuncova, G., Sayler, G.S., Churava, A., Parik, P., Demnerova, K., Halova, J. and L. Kubicova,** 2005, Selectivity of whole cell optical biosensor with immobilized bioreporter *Pseudomonas fluorescens* HK44, *Sens. Actuators B.*, 107: 98–103.
- Tsai, W.T., Yang, J.M., Lai, C.W., Cheng, Y.H., Lin, C.C. and Yeh, C.W.,** 2006, Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane, *Bioresource Technology*, 97:488–493.
- Vasilarou, A.M.G. and Georgiou, C.A.,** 2000, *J. Chem. Educ.*, 77:1327.
- Wang, J.C. and Macca, J.,** 1996, *Chem. Educ.*, 73:797.
- Wasi, S., Jeelani, G. and Ahmad, M.,** 2008, Biochemical characterization of a multiple heavy metal, pesticides and phenol resistant *Pseudomonas fluorescens* strain, *Chemosphere*, 71:1348-1355.
- Wilson, S.G. and Miles, A.A.,** 1964, Principles of Bacteriology and Immunity. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, 636–643 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wu, B., Zhang, G., Shuang, S., Choi, M.M.F.,** 2004, Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane, *Talanta*, 64: 546-553.
- Yi, F., Guo, Z.X., Zhang, L.X., Yu, J. and Li, Q.,** 2004, Soluble eggshell membrane protein: preparation, characterization and biocompatibility, *Biomaterials*, 25:4591–4599.

ÖZGEÇMİŞ

1.GENEL

DÜZENLEME TARİHİ	: 28.12.2008
T.C. KİMLİK NO	: 19184794148
ADI SOYADI	: Fatma YENİ
YAZIŞMA ADRESİ	: Ege Üniversitesi, Fen Fak., Biyokimya Bölümü, 35100-Bornova/İZMİR
DOĞUM TARİHİ ve YERİ	: 15.02.1983, Uşak
GSM	: 0 506 944 33 89
E-POSTA	: fyeni@hotmail.com

2. EĞİTİM

OKUL	DERECE	YIL
Sait ve Sabri Ağaoğlu Lisesi, Uşak	Lise	1997-1998
Ege Üniversitesi, İzmir	Yabancı Dil Eğitimi	2001-2002
Ege Üniversitesi, İzmir	Lisans (Biyokimya)	2002-2006
Ege Üniversitesi, İzmir	Yüksek Lisans (Biyokimya)	2007- Devam ediyor

3. KATILDIĞI KURSLAR / SEMİNERLER

KURS/SEMİNER ADI	TARİH
International Enzyme Engineering Symposium	(01-05 Eylül, 2008) Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, Kuşadası
Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu	(7 Mart 2008) Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu (EBİLTET), İzmir
21. Ulusal Kimya Kongresi	(23-27 Ağustos 2007) İnönü Üniversitesi
Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri Çalıştay,	(25 Ağustos 2007) İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Malatya
Kanser Biyokimyası Sempozyumu	(2 Mart 2007) Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu (EBİLTET), İzmir
İnternational Symposium on Selenium Health and Disease	(12-13 Ekim 2006) Hacettepe Üniversitesi, Ankara
Adli Bilimlerde Güncel Gelişmeler Sempozyumu	(25 Mart 2005) Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu (EBİLTET), İzmir

4. POSTER SUNUMLARI

SEMPOZYUM / KONGRE	POSTER ADI
International Symposium on Selenium Health and Disease (12-13 Ekim 2006)	Selenocysteine and Selenoproteins: Biochemical Aspect <u>Didem KELES</u> , Fatma YENİ, Seçil ÖNAL, Azmi TELEFONCU Ege University Science Faculty Biochemistry Department 35100 Bornova İZMİR
21. Ulusal Kimya Kongresi (23-27 Ağustos 2007)	Yumurta Kabuğu Membranında İmmobilize <i>Pseudomonas fluorescens</i> Hücrelerini Temel Alan Bir Mikrobiyal Biyosensör Geliştirilmesi <u>Fatma YENİ</u> , Dilek ODACI, Suna TİMUR Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Bornova/İZMİR
International Enzyme Engineering Symposium (01-05 Eylül, 2008)	Glucose Biosensing by Pyranose Oxidase Biosensors Modified With Nanoparticles <u>Dilek Odaci</u> ¹ , Çağlar Ozdemir ¹ , Fatma Yeni ¹ , Suna Timur ¹ , Roberto Pilloton ² 1-Ege University, Biochemistry Department, 35100-Bornova/Izmir, Turkey 2-ENEA, Via Anguillarese 301, SP061, Santa Maria di Galeria, 00060 Rome, Italy
International Enzyme Engineering Symposium (01-05 Eylül, 2008)	Electrochemical Glucose Biosensing by Pyranose Oxidase Immobilized in Gold Nanoparticle-Polyaniline/AgCl/Gelatin Nanocomposite Çağlar Ozdemir, Fatma Yeni, Dilek Odaci, Suna Timur Ege University, Faculty of Science, Biochemistry Department 35100 Bornova-Izmir/TURKIYE
International Enzyme Engineering Symposium (01-05 Eylül, 2008)	L-Amino Acid Oxidase Biosensor Based on PAMAM Dendrimer/ Cysteamine Modified Gold Electrode <u>Fatma YENİ</u> , Dilek ODACI, Suna TİMUR, Ege University, Faculty of Science, Department of Biochemistry 35100 Bornova-Izmir/TURKIYE

5. ULUSLAR ARASI DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

MAKALE ADI	DERGİ
<p>Use of eggshell membrane as an immobilization platform in microbial sensing, Fatma YENİ, Dilek ODACI, Suna TIMUR, Ege University, Faculty of Science, Biochemistry Department 35100 Bornova-İzmir/TURKIYE</p>	<p>Analytical Letters, 2008</p>
<p>Electrochemical Glucose Biosensing by Pyranose Oxidase Immobilized in Gold nanoparticle-Polyaniline/AgCl/Gelatin Nanocomposite matrix, Çağlar ozdemir, Fatma YENİ, Dilek ODACI, Suna TIMUR, Ege University, Faculty of Science, Biochemistry Department 35100 Bornova-İzmir/TURKIYE</p>	<p>Food chemistry, 2008 (İncelemede)</p>

6. ULUSAL TOPLANTILARDA YAPILAN SUNUMLAR

Glukoz Analizine Yönelik Piranoz Oksidaz ve Nanopartikül ile Modifiye İnce Film Sensörlerin Geliştirilmesi, Dilek Odacı, Çağlar Özdemir, Fatma Yeni, Suna Timur, 13. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı (BİYOMUT), 29-31 Mayıs 2008, ODTÜ Kültür ve Kongre Merkezi ANKARA

7. ULUSLARARASI PROJE DENEYİMİ

PROJENİN ADI
Biyomikroelektronik sistemlerin hazırlanması ve uygulamaları TBAG-U151 (106T755) , TÜBİTAK İtalya ENEAOrtaklı Uluslararası Araştırma Projesi (Öğrenci) 2007- Devam ediyor
Multitester-development for cell analysis (Çoklu analiz sistemlerinin geliştirilmesi ve hücre analizinde uygulanabilirliklerinin incelenmesi) (108T293) TÜBİTAK Almanya Leibniz Hannover Üniversitesi Ortaklı Uluslararası Araştırma Projesi (Öğrenci) 2008- Devam ediyor

8. KAZANILAN BURSLAR

Eylül 2007-devam ediyor, TÜBİTAK Projesi, Proje No:106T755 (Projede burslu öğrenci)

9. İŞ TECRÜBESİ

KURUM ADI	TARİH
İzmir Özel Gazi Hastanesi - Biyokimya ve mikrobiyoloji laboratuvarı	07.2004 - 08.2004 (staj)
İzmir Adli Tıp Kurumu - Biyoloji İhtisas Dairesi	08.2005 - 09.2005 (staj)
İzmir Özel Gazi Hastanesi - Biyokimya ve mikrobiyoloji laboratuvarı	07.2006 - 11.2006 (iş)

10. YURT DIŐI TECRÜBESİ

PROJE	TARİH - YER
Multitester-development for cell analysis (Çoklu analiz sistemlerinin geliştirilmesi ve hücre analizinde uygulanabilirliklerinin incelenmesi) (108T293) TÜBİTAK Almanya Leibniz Hannover Üniversitesi Ortaklı Uluslararası Araştırma Projesi	16 Temmuz- 23 Eylül 2008, Leibniz Hannover Üniversitesi, Teknik Kimya Enstitüsü, ALMANYA

11. YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Pseudomonas fluorescens* hücrelerini temel alan I. ve II. nesil biyosensörlerin geliştirilmesi ve karakterizasyonu, 2008 FEN 017 No'lu Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Doç. Dr. Suna Timur (Danışman), 2008-Devam ediyor.**