

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**FARKLI NANOMALZEMELER İLE GLUKOZ
BİYOSENSÖRLERİNİN HAZIRLANMASI VE
UYGULAMA POTANSİYELLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Çağlar ÖZDEMİR

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Suna TİMUR

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 405.05.01

Sunuş Tarihi: 03.02.2010

Bornova-İZMİR

2010

Çağlar ÖZDEMİR tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “Farklı Nanomalzemeler ile Glukoz Biyosensörlerinin Hazırlanması ve Uygulama 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 03.02.2010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	:	
Raportör Üye	:	
Üye	:	

ÖZET**FARKLI NANOMALZEMELER İLE GLUKOZ
BİYOSENSÖRLERİNİN HAZIRLANMASI VE
UYGULAMA POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖZDEMİR, Çağlar

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Suna TİMUR

Şubat 2010, 69 sayfa

Bu tez projesi kapsamında, üç farklı glukoz biyosensörü tasarlandı. Piranoz oksidaz (POx) ve glukoz oksidaz (GOx) enzimleri farklı immobilizasyon metodlarıyla elektrot yüzeyine immobilize edildi. Bu sistemlere yönelik optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

Poliamidoamin (PAMAM) temelli piranoz oksidaz biyosensörüne yönelik yapılan optimizasyon çalışmalarına göre optimum enzim miktarı ve pH; 9,4 U aktiviteye sahip enzim miktarı ve 6 olarak bulundu. Bu koşullarda, glukoz için doğrusal tayin aralığı 0,025 mM-0,5 mM olarak belirlendi. Tekrarlanabilirlik denemelerinde 0,3 mM glukoz için tekrarlı 7 ölçüm alındı. Standard sapma (S.D) ve varyasyon katsayısı (c.v) $\pm 0,011$ mM ve % 3,57 olarak bulundu. Operasyonel kararlılığın belirlenmesi amacıyla belirli aralıklarla 9 gün boyunca ölçüm alındı. İlk 2 günde alınan 30 ölçüm sonunda aktivite kaybı gözlenmedi. 9 günde alınan 80 ölçüm sonunda biyosensör cevabının % 50 azaldığı gözlemlendi. Tekrar üretilebilirlik ve substrat spesifikliği belirlendi. Ayrıca bu sistem FIA sistemiyle kombine edildi. Bu sistemde aynı koşullar altında, glukoz için doğrusal tayin aralığı 0,025 mM-1 mM olarak belirlendi. Tekrarlanabilirlik denemelerinde 0,5 mM glukoz için tekrarlı 10 ölçüm alındı. Standard sapma (S.D) ve varyasyon katsayısı (c.v) $\pm 0,019$ mM ve % 3,69 olarak bulundu. Operasyonel kararlılığın belirlenmesi amacıyla 6 saat boyunca 15 ölçüm alındı ve biyosensör cevabının % 9,3 oranında azaldığı gözlemlendi. Tekrar üretilebilirlik ve substrat spesifikliği belirlendi.

Altın nanopartikül (AuNP)-polianilin (PANI)/AgCl/jelatin nanokompozit temelli piranoz oksidaz biyosensörü ikinci sistem olarak geliştirildi. Yapılan optimizasyon çalışmalarına göre optimum enzim miktarı ve pH; 0,75 U aktiviteye sahip enzim miktarı ve 6,5 olarak bulundu. Bu koşullarda, glukoz için doğrusal tayin aralığı 0,05 mM-0,75 mM olarak belirlendi. Tekrarlanabilirlik denemelerinde 0,25 mM glukoz için tekrarlı 6 ölçüm alındı. Standard sapma (S.D) ve varyasyon katsayısı (c.v) $\pm 0,005$ mM ve % 2,16 olarak bulundu. Operasyonel kararlılığın belirlenmesi amacıyla 6 saat boyunca 8 ölçüm alındı ve biyosensör cevabının % 12 oranında azaldığı gözlemlendi. AuNP'nin biyosensör cevabına etkisi ve substrat spesifikliğı belirlendi. Son olarak biyosensör, doğal örneklerdeki glukoz miktarının analizi için kullanıldı. Biyosensörden elde edilen veriler referans metod olarak spektrofotometrik Trinder reaksiyonuna dayanan ticari glukoz deney kitlerinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

Manyetik Fe₃O₄ nanopartikül temelli glukoz oksidaz biyosensörü üçüncü sistem olarak geliştirildi. Yapılan optimizasyon çalışmalarına göre optimum biyopartikül miktarı ve pH; 10 µL ve 6 olarak bulundu. Bu koşullarda, glukoz için doğrusal tayin aralığı 0,25 mM-2 mM olarak belirlendi. Tekrarlanabilirlik denemelerinde 2 mM glukoz için tekrarlı 10 ölçüm alındı. Standard sapma (S.D) ve varyasyon katsayısı (c.v) $\pm 0,051$ mM ve % 2,51 olarak bulundu. Operasyonel kararlılığın belirlenmesi amacıyla 6 saat boyunca 15 ölçüm alındı ve biyosensör cevabının % 17 oranında azaldığı gözlemlendi. Son olarak biyosensör, doğal örneklerdeki glukoz miktarının analizi için kullanıldı. Biyosensörden elde edilen veriler referans metod olarak spektrofotometrik Trinder reaksiyonuna dayanan ticari glukoz deney kitlerinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

Anahtar Kelimeler: Glukoz biyosensörü, piranoz oksidaz (POx), glukoz oksidaz (GOx), poliamidoamin (PAMAM), altın nanopartikül (AuNP), polianilin (PANI), nanokompozit, Fe₃O₄ manyetik nanopartikül.

ABSTRACT**DESİGN OF GLUCOSE BIOSENSORS
USİNG DIFFERENT NANOPARTICLES AND THEİR
APPLICATIONS İN GLUCOSE SENSİNG**

ÖZDEMİR, Çağlar

Master of Science Thesis in Biochemistry Department

Supervisor: Doç. Dr. Suna TİMUR

February 2010, 69 pages

In this project, tree different glucose biosensors were designed. Pyranose oxidase (POx) and glucose oxidase (GOx) enzymes were immobilized on to electrode surfaces via different immobilization methods. Optimization and characterization studies were carried out by glucose substrate.

According to the optimization studies, for the polyamidoamine (PAMAM) based pyranose oxidase biosensor, optimum enzyme amount and pH were found to be as 9.4 U and 6.0. Under these conditions, linearity for the glucose was in the range of 0.025 mM and 0.5 mM. As for the repeatability, 7 subsequent measurements were taken for 0.3 mM glucose. Standard deviation (S.D) and coefficient of variation (c.v) were calculated as ± 0.011 mM and 3.57 %. For the operational stability, sensor responses were followed during 9 days. First 2 days 30 measurement were carried out and any drop wasn't observed. At the end of this period 80 measurement were carried out and 50 % drop was observed. Reproducibility and substrate specifity of the proposed system was investigated. Also this system was combined FIA. Under same conditions, linearity for the glucose was range of 0.025 mM and 1 mM. As for the repeatability, 10 subsequent measurements were taken for 0.5 mM glucose. Standard deviation (S.D) and coefficient of variation (c.v) were calculated as ± 0.0189 mM and 3.69 %. For the operational stability, sensor responses were followed during 6 hours, 15 measurements were carried out and only 9.3 % drop was observed at the end of this period.

Pyranose oxidase biosensor based on gold nanoparticles (AuNP)-polyaniline(PANI)/AgCl/gelatin nanocomposite has been developed for the second biosensor system. According to the optimization studies, optimum enzyme amount and pH were found to be as 0.75 U and 6.5. Under these conditions, linearity for the glucose was in the range of 0.05 mM and 0.75 mM. As for the repeatability, 6 subsequent measurements were taken for 0.25 mM glucose. Standard deviation (S.D) and coefficient of variation (c.v) were calculated as ± 0.005 mM and 2.16 %. For the operational stability, sensor responses were followed during 6 hours 8 measurements were carried out and 12 % drop was observed at the end of this period. Substrate specificity of the proposed system and effect of AuNP to biosensor response was investigated. Finally, proposed biosensor was used to analyze glucose content in real samples. Obtained data from the biosensing system was compared with a commercial enzyme assay kit based on spectrophotometric Trinder reaction as a reference method.

Glucose oxidase biosensor based on magnetic Fe_3O_4 nanoparticles (Nano- Fe_3O_4) has been developed for the third biosensor system. According to the optimization studies, optimum bionanoparticle amount and pH were found to be as 10 μL and 6.0. Under these conditions, linearity for the glucose was in the range of 0.25 mM and 2 mM. As for the repeatability, 10 subsequent measurements were taken for 2 mM glucose. Standard deviation (S.D) and coefficient of variation (c.v) were calculated as ± 0.051 mM and 2.51 %. For the operational stability, sensor responses were followed during 6 hours 15 measurements were carried out and 17 % drop was observed at the end of this period. Finally, proposed biosensor was used to analyze glucose content in real samples. Obtained data from the biosensing system was compared with a commercial enzyme assay kit based on spectrophotometric Trinder reaction as a reference method.

Keywords: Glucose biosensor, pyranose oxidase (POx), glucose oxidase (GOx), polyamidoamine (PAMAM), gold nanoparticle (AuNP), polianiline (PANI), nanocomposite, Fe_3O_4 magnetic nanoparticle.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezi kapsamında sürdürdüğüm çalışmalar süresince 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 her konuda destekleyen aileme ve çalışma arkadaşlarıma, özellikle maddi ve manevi her zaman yanımda olan Özlet AKÇA' ya teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 108T293 no' lu proje ve Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2009 FEN 0059 no' lu proje kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviivii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1 Biyosensörlere Genel Bakış.....	1
1.1.1 Biyosensörlerin yapısı ve fonksiyonu	1
1.1.2 Biyosensörlerin uygulama alanları.....	2
1.1.3 Biyosensörlerin sınıflandırılması	3
1.2 Biyosensörlerde Biyokomponentlerin İmmobilizasyonu.....	7
1.2.1 İmmobilizasyonun önemi	7
1.2.2 İmmobilizasyon yöntemleri	8
1.3. Glukoz Tayini	15
1.4. Glukoz Biyosensörleri.....	16

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

1.4.1 Glukoz oksidaz	16
1.4.2 Piranoz oksidaz	16
1.4.3 Poliamidoamin (PAMAM) dendrimerleri	17
1.4.4 Altın nanopartiküller	18
1.4.5 Fe ₃ O ₄ manyetik nanopartiküller	19
1.4.6 Nanokompozit Materyaller	19
2. MATERYAL VE METOD	23
2.1 Kimyasal ve Reaktifler	23
2.2 Ekipmanlar	23
2.3 Ölçüm Prensibi	24
2.4 Glukoz Biyosensörlerinin Hazırlanması	25
2.4.1 PAMAM temelli glukoz biyosensörünün hazırlanması	25
2.4.2 Nanokompozit temelli glukoz biyosensörünün hazırlanması	26
2.4.3 Manyetik nanopartikül temelli glukoz biyosensörünün hazırlanması	28
3. GLUKOZ BİYOSENSÖRLERİNE İLİŞKİN ÇALIŞMALAR	31
3.1 PAMAM Temelli Glukoz Biyosensörüne ilişkin Çalışmalar	31

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.1 Yüzey karakterizasyonu	31
3.1.2 Kesikli sistemde biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu	31
3.1.3 Kesikli sistemde biyosensörün karakterizasyonu.....	31
3.1.4 FIA sisteminde biyosensörün karakterizasyonu	32
3.2 Nanokompozit Temelli Glukoz Biyosensörüne İlişkin Çalışmalar	33
3.2.1 Yüzey karakterizasyonu	33
3.2.2 Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu	34
3.2.3 Biyosensörün karakterizasyonu	34
3.3 Manyetik Nano-Fe ₃ O ₄ Temelli Glukoz Biyosensörüne İlişkin Çalışmalar....	35
3.3.1 Yüzey karakterizasyonu	35
3.3.2 Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu	36
3.3.3 Biyosensörün karakterizasyonu	36
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	38
4.1 PAMAM Temelli Glukoz Biyosensörüne ilişkin Sonuçlar	38
4.1.1 Yüzey karakterizasyonu	38
4.1.2 Kesikli sistemde biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu	39

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.1.3 Kesikli sistemde biyosensörün karakterizasyonu	40
4.1.4 FIA sisteminde biyosensörün karakterizasyonu	43
4.2 Nanokompozit Temelli Glukoz Biyosensörüne İlişkin Sonuçlar	44
4.2.1 Yüzey karakterizasyonu	44
4.2.2 Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu.....	44
4.2.3 Biyosensörün karakterizasyonu	46
4.3 Manyetik Nano-Fe ₃ O ₄ Temelli Glukoz Biyosensörüne İlişkin Sonuçlar	49
4.3.1 Yüzey karakterizasyonu	49
4.3.2 Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu.....	50
4.3.3 Biyosensörün karakterizasyonu	51
5. GENEL DEĞERLENDİRME	55
6. KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Biyosensörün bileşenleri.....	1
1.2 Bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi (Dinçkaya, 1999). (A=analizlenecek madde , B= immobilize enzim tabakası, C= iletici tabaka, D= ölçüm sistemi)	3
1.3 Enzim immobilizasyon yöntemleri	8
1.4 PAMAM dendrimeri	18
1.5 Manyetik Fe ₃ O ₄ nanopartiküller a) manyetik alan olmadığı durum b) manyetik alan altında olduğu durum.	19
1.6 Tek-Çizgi FIA Sistemi: Analizlenecek örnek reaktifin bulunduğu taşıyıcı çözeltiye enjekte edilir ve gerçekleşen tepkime sonucu ölçülecek fizikokimyasal parametre detektör ile belirlenir.	21
1.7 Çoklu Örnek Analizine Uygun FIA Sistemi: Selektör tarafından seçilen örnekler taşıyıcı çözeltiye enjekte edilir ve gerçekleşen tepkime sonucu ölçülecek fizikokimyasal parametre detektör ile belirlenir.	22
2.1 PAMAM temelli glukoz biyosensörünün hazırlama şeması	25
2.2 Karbon pasta elektrodun dizaynı a) Boş karbon pasta elektrot, b) Mıknatıs yerleştirilmiş elektrot, c) Karbon pasta d) Karbon pasta doldurulmuş ve parlatılmış elektrot.....	30
2.3 Manyetik biyonanopartiküllerle modifiye edilmiş karbon pasta elektrot.....	30
3.1 Piranoz oksidaz biyosensörü ile kombine edilmiş FIA sistemi	33
4.1 Elektrot yüzeyinin AFM görüntüleri a) Boş elektrot, b) Sistemin modifikasyonu sonrası, c) PAMAM modifikasyonu sonrası, d) Enzim immobilizasyonu sonrası	38
4.2 Biyosensör cevabına pH'nın etkisi (Sodyum asetat tamponu; pH 5,5; sodyum fosfat tamponu pH 6-8; 50 mM, -0,7 V, oda sıcaklığı).....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.3 Biyosensör cevabına enzim miktarının etkisi (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50mM, -0,7 V, oda sıcaklığı).....	40
4.4 Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50mM, piranoz oksidaz 9,4 U, -0,7 V, oda sıcaklığı)	41
4.5 Farklı günlerde hazırlanan piranoz oksidaz biyosensörlerinin kalibrasyon grafikleri (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50 mM, piranoz oksidaz 9,4 U, -0,7 V, oda sıcaklığı).	42
4.6 Biyosensörün farklı substratlara (0,25 mM) cevabı (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50 mM, piranoz oksidaz 9,4 U, -0,7 V, oda sıcaklığı).	42
4.7 Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50mM, piranoz oksidaz 9,4 U, -0,7 V, oda sıcaklığı)	43
4.8 Kompozit matrislerin SEM görüntüleri a) AuNP-PANI/AgCl, b) AuNP-PANI/ AgCl/Jelatin.	44
4.9 Biyosensör cevabına pH'nın etkisi (Sodyum fosfat tamponu pH 6-7,5; 50 mM, -0,7 V, oda sıcaklığı)	45
4.10 Biyosensör cevabına enzim miktarının etkisi (Sodyum fosfat tamponu pH 6,5; 50mM, 0,7 V, oda sıcaklığı).	45
4.11 Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (Sodyum fosfat tamponu pH 6,5; 50mM, piranoz oksidaz 0,75 U, -0,7 V, oda sıcaklığı)	46
4.12 AuNP' nin biyosensör cevabı üzerine etkisi (Sodyum fosfat tamponu pH 6,5; 50mM; piranoz oksidaz 0,75 U; -0,7 V, oda sıcaklığı).....	47
4.13 Biyosensörün farklı substratlara (0,25 mM) cevabı (Sodyum fosfat tamponu pH 6,5; 5 mM; piranoz oksidaz 0,75 U; -0,7 V; oda sıcaklığı).	48
4.14 Manyetik Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerin SEM görüntüleri (50000X), a) Manyetik Fe ₃ O ₄ nanopartiküller, b) Silika kaplı manyetik Fe ₃ O ₄ nanopartiküller, c) Silika kaplı silanlı manyetik Fe ₃ O ₄ nanopartiküller.	49
4.15 Biyosensör cevabına pH'nın etkisi (Sodyum asetat tamponu pH 5-5,5; sodyum fosfat tamponu pH 6-7; 50 mM, -0,7 V, oda sıcaklığı).....	50

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

- 4.16 Biyosensör cevabına biyonanopartikül miktarının etkisi (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50mM, 0,7 V, oda sıcaklığı).51
- 4.17 Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50mM, -0,7 V, oda sıcaklığı).....52
- 4.18 Farklı günlerde hazırlanan glukoz oksidaz biyosensörlerinin kalibrasyon grafikleri (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50 mM, -0,7 V, oda sıcaklığı)....53

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 Örnek uygulama (Sodyum fosfat tamponu pH 6,5; 50 mM; piranoz oksidaz 0,75 U; -0,7 V; oda sıcaklığı).	48
4.2 Örnek uygulama (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50 mM; -0,7 V; oda sıcaklığı).	53
5.1 Geliştirilen biyosensör sistemlerinin analitik karakterizasyonları	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
mM	Milimolar.
L	Litre.
μ L	Mikrolitre.
V	Volt.
I	Akım
μ A	Mikroamper
$^{\circ}$ C	Santigrat Derece
S.D	Standart sapma.
c.v	Varyasyon katsayısı.
CV	Döngüsel voltametri

1. GİRİŞ

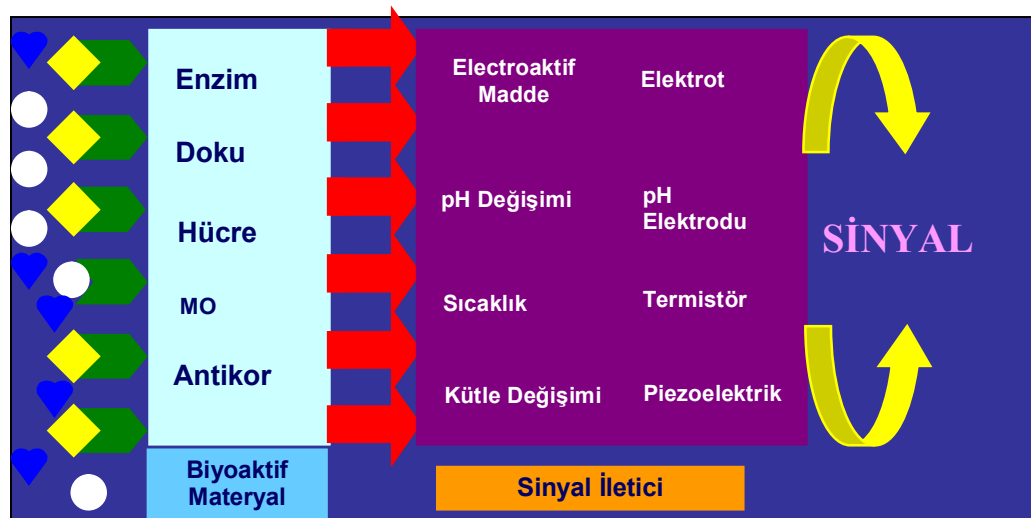
1.1 Biyosensörlere Genel Bakış

Biyosensörler biyospesifik elektrodlardır. Biyokomponentleri (biyoajanları) immobilize halde kullanan, çeşitli gaz, iyon, çözünmüş gaz ve biyolojik maddelerin teşhisi, kantitatif tayini ve orijinal sistemlerde izlenmesi amacıyla geliştirilmiş problara BİYOSENSÖR denir. Kısaca biyosensörün görevi, biyolojik bir olayın elektriksel sinyale dönüştürülmesidir.

Tüm canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin *in vitro* kullanımı için temel oluşturmuştur (Telefoncu, 1999). Canlılarda ilgili mesajları algılamayı sağlayan sistemlerin, analiz sistemleri ile kombinasyonu biyosensörleri oluşturmuştur (Timur, 2001). Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensör hazırlanabilirken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini mümkündür (Telefoncu, 1999)

1.1.1 Biyosensörlerin yapısı ve fonksiyonu

Biyosensörler biyokomponentler (reseptör) ile fiziksel komponentlerden (transdüser) oluşurlar.



Şekil 1.1 Biyosensörün bileşenleri

Biyosensörlerin yapısında görev alan biyokomponentler çoğu kez reseptör olarak da adlandırılırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılan enzimler ve antikorlardır. Transdüserler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyona göre transdüser seçilir.

Reseptörlerin transdüserler üzerinde immobilizasyonu fiziksel (adsorbsiyon, polimer, matriste tutuklama vb.) veya kimyasal (kovalent bağlama, bi veya multi fonksiyonel reaktifler ile çapraz bağlama) yöntemleri ile gerçekleştirilir. Doku kültürleri, organeller ve mikroorganizmaların immobilizasyonunda daha çok polimer jellerde tutuklama yöntemleri kullanılır. Polimer matris biyokatalizörün kaçışını engellerken küçük substratlar ve ürün moleküllerinin geçişine engel olmaz (Telefoncu, 1999).

1.1.2 Biyosensörlerin uygulama alanları

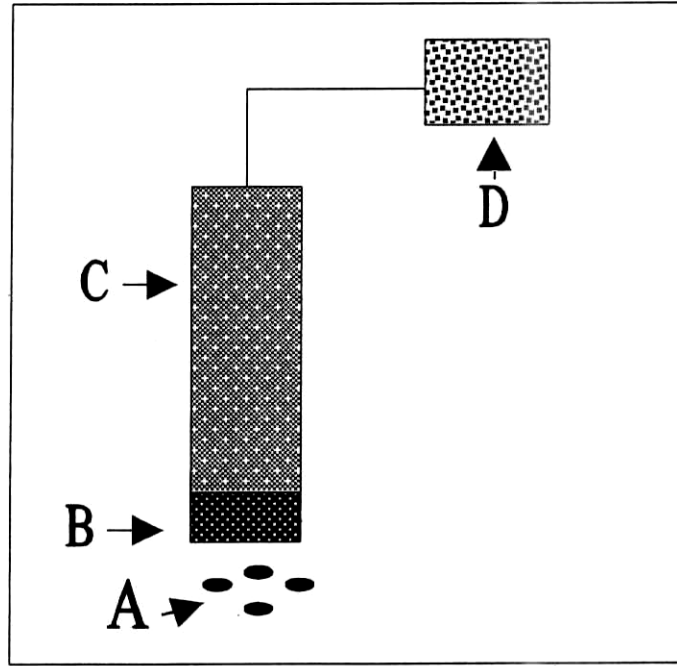
Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve bir çok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrol, durum tespiti ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar:

- Klinik diyagnostik, biyomedikal sektör
- Biyoteknolojide proses kontrolü
- Tarla tarımı, bağ-bahçe tarımı ve veterinerlik
- Bakteriyel ve viral diyagnostik
- İlaç analizi
- Endüstriyel atık su kontrolü
- Çevre koruma ve kirlilik kontrolü
- Askeri uygulamalar
- Maden işletmelerinde toksik gaz analizleri

1.1.3 Biyosensörlerin sınıflandırılması

1.1.3.1 Enzim sensörleri

En genel anlamda bakıldığında diğer biyosensörlerde olduğu gibi enzim sensörleri de biyoaktif tabaka, iletici ve ölçüm sistemlerinden oluşur. Diğer biyosensörlerden tek fark biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimlerin yer almasıdır.



Şekil 1.2 Bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi (Dinçkaya, 1999). (A=analizlenecek Madde, B= immobilize enzim tabakası, C= iletici tabaka, D= ölçüm sistemi)

Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

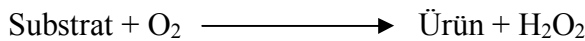
Enzim sensörleri enzimler ile hazırlanan sensörlerdir. Enzim sensörlerinin sınıflandırılması en yaygın şekilde, reaksiyon uyarınca sinyalin belirlenme ilkesine göre yapılmaktadır (Dinçkaya, 1999).

Elektrokimyasal esaslı enzim sensörleri

Amperometrik Esaslı Enzim Sensörleri

Amperometri en genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen yada indirgenen elektro aktif türlerin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrod referans elektrod olarak iş görür. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde yararlanılır (Dinçkaya, 1999).

Oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyen oksidaz enzimleri monoenzimatik sistemlerde amperometrik enzim elektrodunda kullanılan en genel enzimlerdir. Oksidazlar genellikle reaksiyon sırasında O₂ kullanırlar.



Potansiyometrik Esaslı Enzim Sensörleri

Elektrokimyasal esaslı enzim sensörlerinin ikinci önemli grubunu potansiyometrik enzim elektrodları oluşturmaktadır. Potansiyometri bilindiği gibi en genel anlamda çalışma ve referans elektrod arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrod potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlar. Elde edilen sinyal Nerst Kanunu uyarınca konsantrasyonunun logaritması ile orantılıdır. Potansiyometrik enzim elektrodlarında kullanılan temel sensörler pH yada tek değerlikli iyonlara duyar cam elektrodlar, anyon yada katyonlara duyar iyon seçimli elektrodlar ve karbondioksit yada amonyağa yönelik gaz duyar elektrodlardır. Potansiyometrik esaslı enzim elektrodları söz konusu sensörler üzerine bir veya birden çok enzimin uygun immobilizasyon yöntemleriyle genelde pratik metodlarla monte edilmesiyle hazırlanır (Dinçkaya, 1999).

Yarı İletken Esaslı Enzim Sensörleri

Temel sensör olarak metal oksit yarı iletken alan etkili transistörleri yada iyon duyar alan etkin transistörleri esas alan bu tür enzim sensörleri, enzim ile alan etkin transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etkili transistörü olarak adlandırılır (Dinçkaya, 1999).

Optik esaslı enzim sensörleri

Optik enzim sensörleri iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle enzim immobilize edilerek hazırlanan ölçüm aygıtlarıdır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen kimyasal yada fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alır. Sinyal ışık yansıması, saçılımı yada yayımı sonucu meydana gelir. Dolayısıyla optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen optik esaslı enzim sensörleri temelde absorpsiyon, flouresans, biyoluminesans gibi temel ilkeler çerçevesinde işlev görürler (Dinçkaya, 1999).

Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri

Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri, termal enzim sensörleri, enzim termistörleri yada entalpik enzim sensörleri gibi değişik isimlerle tanımlanırlar. Temel ilkeleri bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanılarak substrat konsantrasyonunu belirlemekten oluşur. Genel olarak enzimatik reaksiyonlarının ekzotermik doğasından yararlanılır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır ve oldukça küçük sıcaklık değişimleri termal olarak yalıtılmış ortamlarda termistör veya termofiller yardımıyla izlenir (Dinçkaya, 1999).

Piezoelektrik esaslı enzim sensörleri

Piezoelektrik sensörler genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlelerinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensör seçimliliği kristal yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir.

Bir piezoelektrik sensörün üzerinde enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen piezoelektrik enzim sensörlerinde, enzim moleküllerine substratların bağlanmasından dolayı meydana gelen kütle değişimlerinin, piezoelektrik kuartz diskin vibrasyonunda sebep oldukları farklanmadan yararlanılarak madde miktarına ulaşılır (Dinçkaya, 1999).

1.1.3.2 Mikrobiyal sensörler

Enzimler yerine mikroorganizmalarla hazırlanan sensörlere mikrobiyal sensörler denir.

Mikrobiyal sensörlerin enzim sensörlerine göre bazı avantajları vardır:

- Enzimler doğal ortamlarında bulunacaklarından dış etkilere karşı daha dayanıklıdır.
- Koenzimlerle çalışan enzimler için dışarıdan koenzim ilavesi gerekmez, koenzim rejenerasyonu hücre içinde olur.
- Enzim elektrodlarından genelde uzun ömürlüdürler.
- Saf enzim yerine hücre kullanılması ekonomiktir.

Enzim sensörlerine göre bazı dezavantajlara da sahiptirler:

- Hücre membranı difüzyon bariyeri oluşturduğundan membrandan geçemeyen moleküller için uygun sensör hazırlanamaz.
- Mikrobiyal sensörlerin cevap süresi enzim sensörlerinden daha uzundur.
- Hücre birçok enzim içerdiğinden hedef reaksiyonun diğer enzimlerce etkilenmesi söz konusudur.

1.1.3.3 İmmunosensörler

Yüksek seçicilikte antijen-antibadi reaksiyonlarının duyarlı dedektörlerle kompozisyonu immunosensörleri oluşturur. Antibadiler (Ab) vücuda giren yabancı maddelere karşı üretilen ve immunoglobülinler denen (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) bir glikoprotein ailesidir. Bir bağışık yanıt oluşturan yabancı makromoleküler maddelere antijen (Ag) veya immunojen denir.

İmmunolojik temelli sensörler çevre, klinik ve savunma amaçlı kullanılabilirler. İmmunosensörlerle hücreler, sporlar, toksinler, mikroorganizmalar, virüsler, pestisitler ve endüstriyel kirleticiler analizlenebilirler (Malhotra, Chaubey, 2003).

1.2 Biyosensörlerde Biyokomponentlerin İmmobilizasyonu

1.2.1 İmmobilizasyonun önemi

Enzimler, biyolojik hücrelerde sentezlenen, canlı organizmalarda oluşan tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda gerçekleşmesini ve bu reaksiyonların uyumlu bir biçimde koordinasyonunu sağlayan protein yapısındaki spesifik katalizörlerdir. Enzimler suda çözünürler. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için inhibitör katılması düşünülebilir. Ancak serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürünlerine böylece yeni bir kirlilik unsuru eklenmiş olacaktır. Ürün veya ürünlerin bu kirlilik unsurlarından arıtılması maliyeti çok arttırmaktadır. Belirtildiği gibi katalizör olarak kullanılan serbest enzimi reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden çıkarabilmek olanaksız olduğundan enzimin yeniden kullanılması da söz konusu değildir. Bu ise enzimlerin çok spesifik ama o ölçüde pahalı katalizörler olmaları nedeniyle maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli sistemlere de uygulanamazlar.

Bu sorunların giderilmesi için yapılan araştırmalar sonucu immobilize enzimlerin kullanılması ortaya çıkmıştır.

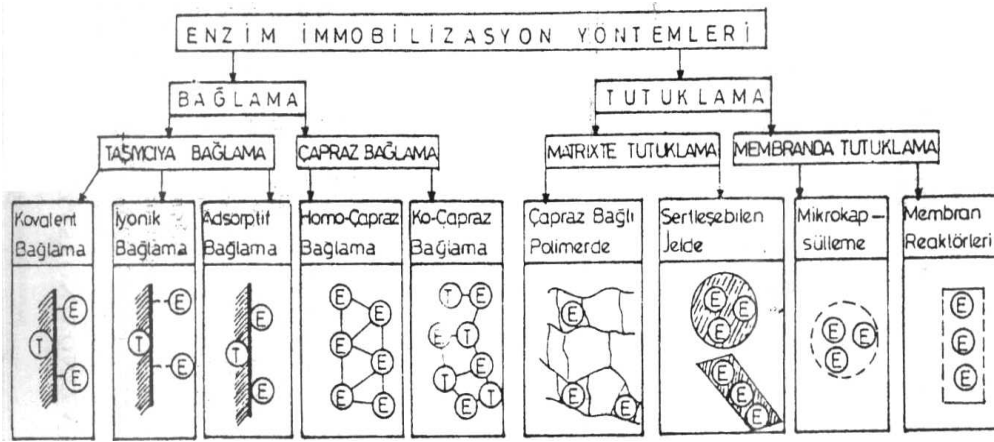
Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel yada kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matris veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanmasıyla immobilize edilirler.

İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere üstünlükleri

- Reaksiyon sonunda ortamdaki kolayca uzaklaştırılabilirler ve ürünlerin enzimler tarafından kirletilmesi gibi bir problem oluşmaz.
- Çevre koşullarına (pH,sıcaklık v.s.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilirler.
- Sürekli işlemlere uygulanabilirler.
- Serbest enzimlere kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalaması (autolysis) olasılığı azalır.
- Mekanistik çalışmalar için uygundur.

1.2.2 İmmobilizasyon yöntemleri

Kelime olarak immobilizasyon hareketi sınırlandırma demektir.



Şekil 1.3 Enzim immobilizasyon yöntemleri

Taşıyıcıya bağlama yöntemleri

Taşıyıcıya bağlama yöntemi uygulamalarında enzimin moleküler yapısının bilinmesi ve enzime uygun taşıyıcı seçimi çok önemli iki noktadır. Yöntemde bağlanma kimyasal (kovalent veya iyonik) yada fiziksel (adsorbsiyon) yolla gerçekleşeceği için enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgeler dikkate alınmalıdır. Taşıyıcı seçiminde partikül büyüklüğü,

toplam yüzey hidrofobik grupların hidrofobik gruplara oranı ve taşıyıcının kimyasal bileşimi gibi kriterler esas alınır.

Taşıyıcıya bağlama yöntemlerinin yararları :

- Reaktif taşıyıcıya enzim bağlanması kolaydır ve bağlı olmayan enzim yıkama ile uzaklaştırılabilir.
- Katı taşıyıcıya bağlı katalizör kullanışlıdır.
- Reaksiyon ortamından istenilen anda uzaklaştırılabilir.
- Ürünleri kirletmez.
- Taşıyıcının yapısına bağımlı olarak yeni spesifiklikler kazanabilir.
- Sürekli sistemlere uygundur.
- Değişik fiziksel formlarda imal edilebilirler.

Taşıyıcıya bağlama yönteminin sakıncaları :

- Enzim immobilizasyon koşullarından etkilenebilir.
- Bağlanma aktivite için zorunlu amino asit artıkları üzerinden gerçekleşebilir.
- Enzimin taşıyıcıya bağlanması özel ve masraflı preparasyonları gerekli kılabilir.
- Polimer taşıyıcının sebep olduğu sterik engelleme nedeniyle aktivite azalabilir.

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir.

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aranan nitelikler :

- Hidrofilik karakter
- Suda çözünmeme
- Gözenekli (poröz) yapı
- Mekanik stabilite ve uygun partikül formu
- Kimyasal ve termel stabilite
- Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar yumuşak koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşımali

- Mikroorganizmalara karşı dirençli olmalı
- Ucuz olmalı
- Zehirsiz olmalı
- Rejenere olabilmeli

Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan taşıyıcılar :

<u>Anorganik</u>	<u>Doğal Polimerler</u>	<u>Sentetik Polimerler</u>
Kil, cam	Selüloz	Polistiren türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamid
Bentonit	Dextran	Naylon
Hidroksiapatit	Agar ve agaroz	Vinil ve alil polimerler
Titandioksit	Karragenan	Oxiranlar
Nikeloksit	Kollagen	Metakrilat
Pomza taşı	Kitin ve Kitozan	İ. değiştirici reçineler
Aktif karbon	Jelatin	M. anhidrid polimerler
Metaller	Albumin	

Enzim immobilizasyonu ılımlı koşullarda (oda sıcaklığı, nötr pH vb.) yapılmalıdır. Yüksek sıcaklık, kuvvetli asidik veya bazik ortam, organik çözenler ve yüksek tuz konsantrasyonu ile muamele, denatürasyona ve böylece enzim aktivitesinin kaybına neden olur. Aktif merkezde farklı fonksiyonlara sahip iki bölge vardır. Katalitik merkez ve substrata spesifikliği sağlayan merkezdir. Aktif merkezdeki amino asitler veya merkezin üç boyutlu yapısı değişirse katalitik aktivite de düşer ve substrat spesifikliği değişir. Bu yüzden yapılacak immobilizasyon işleminde herhangi bir kovalent bağlama söz konusu ise bu bağlamanın enzim aktivitesi için esansiyel olan amino asitler üzerinden gerçekleşmemesine ve bu grupların bağlanma sırasında sterik olarak rahatsız edilmemesine dikkat edilmelidir. Kovalent bağlama enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşebilir.

Enzim immobilizasyonu yaparken, enzim immobilizasyonu esnasında veya sonrasında enzim aktif merkezine zarar vermeyecek bir yöntem seçilmelidir. İşlem sırasında herhangi bir bağlanma söz konusuysa (iyonik veya kovalent bağlanma) bu bağlanmanın ya aktif merkez için esansiyel amino asitler üzerinden

gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmeli veya bu esnada aktif merkez, substrat yada kompetitif inhibitör tarafından korunmalıdır.

İmmobilizasyonda bahsedilen yöntemler ayrı ayrı da kullanılabildiği gibi, kombine olarak kullanılmaları da mümkündür.

Kovalent bağlama

Enzimlerin reaktif taşıyıcılara kovalent bağlanması protein kimyasında bilinen yöntemler ile ve genelde sulu ortamda gerçekleştirilir. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Taşıyıcıya kovalent bağlanma enzim zincirindeki amino asitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak büyük ölçüde de hidrofobik karakterde olmamalı, suda ıslanabilmeli, ayrıca mekanik kararlılığa sahip olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözümlere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilir.

Kimyasal kovalent bağlama yöntemleri :

- Açılleme Reaksiyonları
- Alkilleme ve Arilleme Reaksiyonları
- Diazolama Reaksiyonları
- Karbamilasyon ve Tiyokarbamilasyon Reaksiyonları
- CN-Br Yardımı ile Bağlama
- İmidoesterler ile Bağlama
- Polimerik Aldehitler ile Bağlama
- SH-Disülfid Değişimi Reaksiyonları
- Ugi Reaksiyonları
- Diğer Bağlanma Reaksiyonları

Adsorpsiyon

Yöntem; yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan Van der Waals kuvvetleridir. Adsorbanlar çok değişik türde olmakla birlikte iyi bir adsorbsiyon sağlayabilmek için genellikle adsorbanın bir ön işleminden geçirilmesi gerekmektedir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar; aktif karbon, gözenekli cam, diatome toprağı, CaCO₃, kül, kollodyum, silikajel, bentonit, hidroksiapatit, nişasta, gluten ve kalsiyum fosfattır.

Adsorbsiyon yönteminin yararları; enzim immobilizasyon işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve bir yandan immobilizasyon gerçekleştirilirken diğer yandan da enzim saflaştırılmasına olanak sağlamasıdır. İşlem kolay olduğu gibi ılımlı koşullarda gerçekleşmekte ve önemli ölçüde enzim inaktivasyonuna da neden olmamaktadır.

Yöntemin sakıncaları ise; her ne kadar immobilizasyon işlemi kolaysa da optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest hale geçmekte ve ürünlerin kirlenmesine neden olmaktadır.

İyonik bağlama

Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlama yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır.

İyonik bağlama ılımlı koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçışı söz konusudur.

Şelat bağlama

Bazı geçiş metallerinin şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması mümkündür.

Biyospesifik bağlama

Enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimden yararlanarak enzim immobilize edilebilir. Lektinler spesifik karbohidrat artıklarını içeren enzimlere kuvvetlice bağlanırlar.

Çapraz bağlama yöntemleri

Küçük moleküllü bi- veya multi-fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak sonuçta suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH'ya ve immobilize edilecek enzime çok bağlıdır. İntermoleküler bağlanmalar yanında intramoleküler bağlanmalar da söz konusudur (Telefoncu, 1997).

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu dört farklı şekilde gerçekleştirilir:

- a)Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- b)Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- c)Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu
- d)Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonudur.

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehid, klorformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bisoksiranlar, divinilsulfanlar, p-benzokinonlar, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir.

Çapraz bağlama reaksiyonu ılımlı koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur (Telefoncu,1997).

1.2.2.2. Tutuklama yöntemleri

Tutuklama yönteminde, bağlama yöntemlerinde yapılan immobilizasyondan farklı enzim molekülünün kimyasal veya fiziksel yollarla herhangi bir taşıyıcıya bağlanmadan belirli bir mekanda tutulması sağlanır. Tutuklama işlemleri sırasında enzim moleküllerinin polimer matris içindeki

kafeslerde veya yarı geçirgen membranlar içinde veya mikrokapsülleme ve misellerde tutulması sağlanır.

Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama immobilizasyonundan ayıran en önemli özellik, enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır.

Polimer matriste tutuklama

Polimerizasyon ve çapraz bağlamanın olduğu ortamda enzim de bulunduğu takdirde enzim çapraz bağlama sonucu oluşan odacıklarda (kafes) tutuklanmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir.

Yöntem, yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağ ağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir. Çapraz bağ yüzdesi öyle ayarlanmalıdır ki, enzim molekülleri tutuklanabilsin ama substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşmasına engel olmasın. Çapraz bağ yüzdesini aşırı olması substratın enzimin aktif merkezine ulaşmasını engellemekle kalmayıp enzimin zincir yapısını da zorlayıp aktivite kaybına veya tamamen inaktif olmasına neden olabilir. Bu nedenle optimal bir çapraz bağ yüzdesi saptanması önemlidir. Bu oran enzime ve taşıyıcıya bağımlı olarak değişir. Uygun çaplı substrat molekülleri polimer kafes içinde tutuklanmış enzim moleküllerine ulaşır ve reaksiyon ürünleri de dışarı çıkar. Tutuklama yöntemi ile immobilize edilecek enzimin substratının küçük molekülü olması gerekir.

Bu yöntemin yararları; çok kolay uygulanması, gerçek bir fiziksel yöntem oluşu ve çok az miktar enzimle gerçekleştirilmesidir. Nötral, suda çözünmeyen taşıyıcılarla da immobilizasyon gerçekleştirilmekte ve kimyasal bir bağlanma olmadığından yüklü taşıyıcıya gerek duyulmamaktadır.

Yöntemin sakıncaları ise; immobilizasyon işlemi sırasında inaktivasyonun deney koşullarına çok sıkı bağımlı oluşu ve immobilize enzimin ancak küçük molekülü substratlara karşı iyi bir aktivite göstermesidir.

Membranda tutuklama (mikrokapsülleme)

Tutuklama yönteminin bu tipinde ortam yarı geçirgen membran ile üç boyutlu olarak kuşatılmıştır. Kullanılan membranın gözenek çapları ve immobilize edilecek enzim substratının molekül büyüklüğü, substrat girişi ve ürün çıkışlarını engellemeyecek boyutta olmalıdır. Bu yöntem, substrat molekülleri küçük olan enzim immobilizasyonunda kullanılmakta olup, substratı makromoleküler olan enzimler için uygun değildir. Enzimler daha çok kimyasal mikrokapsülleme ile immobilize edilmektedir.

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu sürekli ve sürekli olmayan yarı geçirgen mikrokapsüllerde tutuklama olmak üzere iki grupta incelenebilir. Sürekli mikrokapsüllerde çerçeve membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde ise bir sıvı tabakadır. Immobilizasyonda kullanılan çerçeve maddesinin (membran) yarı geçirgen olması zorunludur. Ayrıca bu yarı geçirgen membranların gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına imkan verecek bir büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntem ile immobilize enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır (Menek,1999).

1.3 Glukoz Tayini

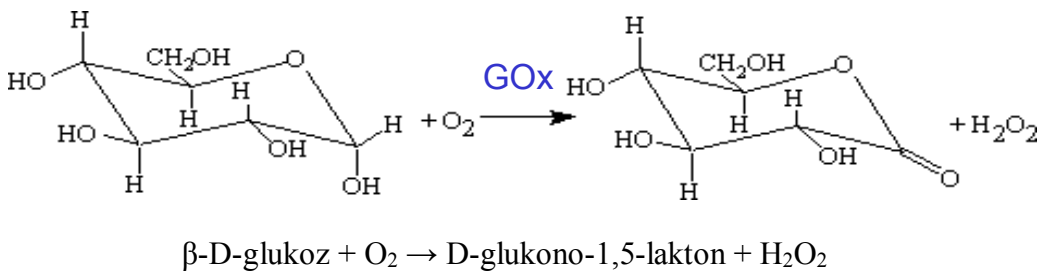
Karbohidratlar, biyosferde en bol bulunan organik bileşiklerdir ve metabolik sistemlerin birçoğunda önemli rol oynarlar. Bu yüzden onların analizleri yaşam, gıda, tarım ve medikal bilimlerde büyük öneme sahiptir (Zhang et al., 1996). Fizyolojik sıvılarda karbohidrat analizi, belirli hastalıkların tanısı ve ilaçların etkilerinin belirlenmesinde önemlidir. Örneğin, kan glukoz konsantrasyonunun bilinmesi, diyabet hastalığının izlenmesinde gereklidir ve rutin olarak yapılan analizdir. Glukoz hayvan ve bitkilerin başlıca bileşenlerinden biridir. Glukozun nicel tayini biyokimya, klinik kimya, gıda ürünleri ve fermentasyonda çok önemli yere sahiptir. Refraktif indeks, UV ve kolorimetri gibi geleneksel karbohidrat tayin yöntemlerinin seçimliliği yoktur ve duyarlılık

düşüktür (Nogueira et al., 2005). Kromatografik metotlar ya da kapiler elektroforezde kullanılan dedektöre bağlı olarak kompleks matrislerde tayinler zor olabilmektedir, çünkü çok fazla sinyal algılanır ya da bazı analitler için tayin limitleri uygun değildir ve analitlerin türevlendirilmesine ihtiyaç duyulur. Ancak, uygun doku, mikroorganizma ya da enzimlerin biyobileşen olarak kullanıldığı biyosensör sistemleri ile bu tip sınırlamalar ortadan kaldırılabilir (Baldwin et al., 1999). Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde dünyada biyosensör teknolojisine olan ilgi açıktır ki ülkemizde de bu konuda çalışmalar hızla artmaktadır.

1.4 Glukoz Biyosensörleri

1.4.1 Glukoz oksidaz

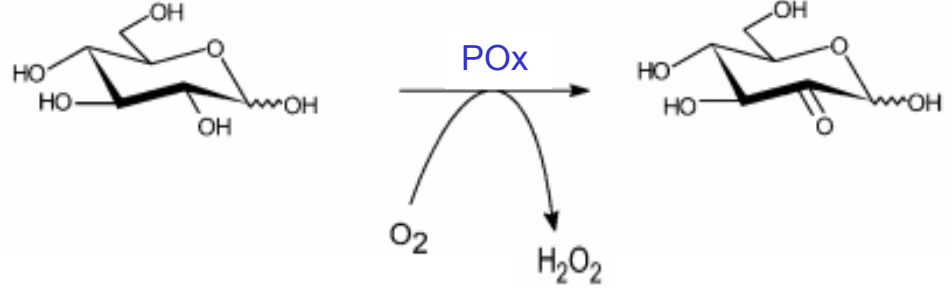
Glukoz oksidaz (GOx, β -D-glukoz: oksijen 1-oksidoredüktaz, EC 1.1.3.4, glukoz 1-oksidaz) β -D-glukozun C-1 oksidasyonu sonucu D-glukono-1,5-lakton ve H_2O_2 oluşumunu katalizler (Karmali and Oliveira, 1999). GOx, biyosensör çalışmalarında, farklı formlarda biyoanalitik cihazlarda, biyoyakıt araştırmalarında en çok kullanılan, glukoz oksidasyonunu gerçekleştiren enzimdir (Olea et al., 2007; Yin et al., 2007; Li and Lin, 2007; Ivniński et al., 2006; Barriere et al., 2006; Wang, 2001; Wilson and Turner, 1992).



1.4.2 Piranoz oksidaz

Piranoz oksidaz (POx, piranoz: oksijen 2-oksidoredüktaz) FAD glikoproteinidir. D-glukozun C-2 oksidasyonu sonucu 2-keto şeker ve H_2O_2 oluşumunu katalizler. Janssen ve Ruelius tarafından karakterizasyonu gerçekleştirildiğinden (Janssen et al., 1975) bu yana biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadırlar (Baminger et al., 1988). Glukoz oksidazdan farklı olarak,

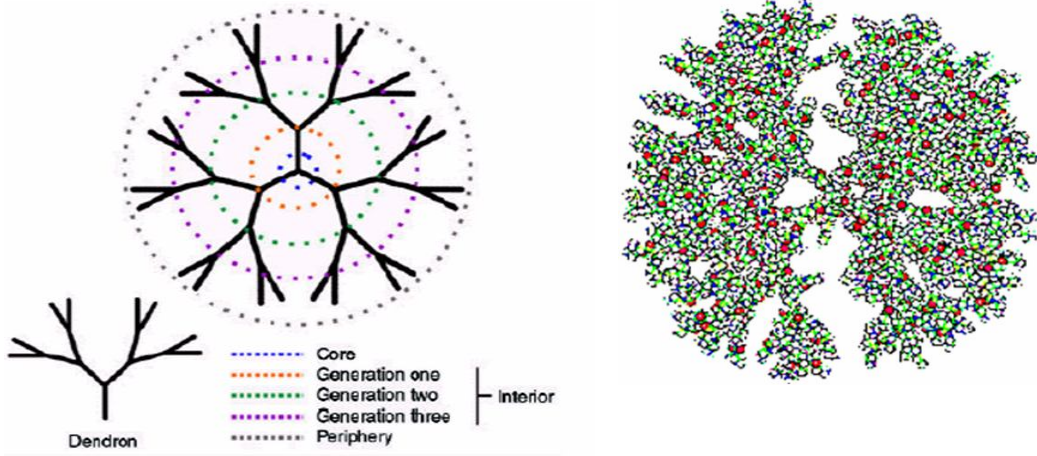
anomerik seçimliliği yoktur, glukozun α - ve β - formlarını oksitler, ayrıca D-glukoz için yüksek afinite gösterir (Schmid et al., 1988), (Leitner et al., 2001), (Costa-Ferreira et al., 2003).



1.4.3 Poliamidoamin (PAMAM) dendrimerleri

Organik ince filmlerin yapımında yüksek derecede dallanmış dendritik makromolekülleri kullanmak büyük bir ilgi konusudur (Tomalia et al., 1990; Fischer et al., 1999). Dendrimerler birbirine eş çoklu zincir uçlarına sahiptir. Bu uçlar amaca uygun olarak sentetik jenerasyonların yapımında istenilen şekilde kontrol edilebilen yüzey gruplarından oluşmaktadır. Buna ek olarak moleküler olarak düzenlenmiş nano yapıların sentetik modifikasyonlarında dendrimerlerin yüksek konsantrasyonlardaki fonksiyonel uç grupları kullanılabilir (Ulman, 1991). Biyosensör uygulamaları açısından bakıldığında dendrimerlerin çok tabakalı konfigürasyonlarından dolayı birçok avantajları vardır. Bunlardan ilki, dendrimerler çoklu konjugasyon bölgelerine sahip olmalarıdır. Bu sayede yoğun bir olarak fonksiyonlandırılmış ve yapısal açıdan kararlı yapılar kolaylıkla elde edilebilmektedir. İkincisi, yapılarında barındırdıkları iç boşluklar sayesinde (Tomalia et al., 1990) oluşan çok tabakalı film, analitlere ve elektron transfer edici substratlara (mediyatörler) karşı difüzyonu kolaylaştırıcı etki göstermektedir (Zhao et al., 1997; Tokuhisa et al., 1998). Ayrıca bu özelliği beklenen enzimatik ve elektrokatalitik reaksiyonların çoklu tabakalar boyunca gerçekleşmesini sağlamaktadır. Üçüncüsü, film oluşumundan sonra geride kalan serbest reaktif gruplar sentetik redoks mediyatörleri ile birlikte biyosensör yada spesifik amaçlı asılı grupların oluşturulması sonrası modifikasyonlara imkan vermektedirler (Hyun and Kim, 2000). 4. Jenerasyon poliamidoamin (PAMAM) dendrimerleri 64

tane yüzey amin grubuna sahiptirler. Bu amin grupları biyosensör yapımında ilgili enzimin bağlanması için çok geniş bir yüzey alanı oluşturmaktadırlar. Biyosensörlerde, biyomimetik sistemlerde, kaplama, membran kimyası, kontrollü ilaç salınımı ve nanoteknoloji gibi alanlarda kullanım potansiyeline sahiptirler.



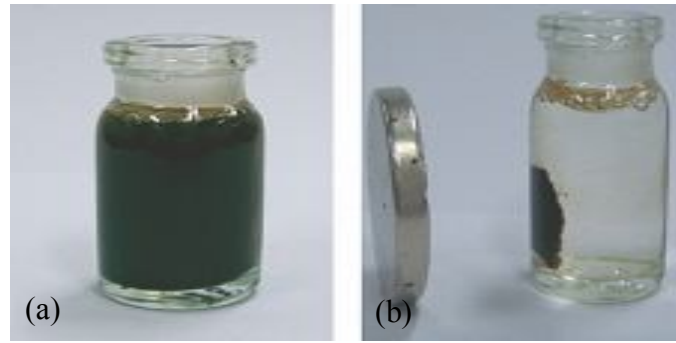
Şekil 1.4 PAMAM dendrimeri

1.4.4 Altın nanopartiküller

Metal nanopartiküllerin biyosensör uygulamalarında kullanımı gittikçe artmaktadır. Altın nanopartiküller (AuNP), kolloidal altın, biyolojik uyumluluğu iyi olması, yüksek iletkenlik kapasitesi, yüksek yüzey-hacim oranı gibi özellikleri nedeniyle birçok uygulamada kullanım alanı bulmuştur (Guo and Wang, 2007). Biyomoleküllerin aktivite kaybı olmadan kararlı olarak immobilizasyonuna imkan sağlaması biyosensör hazırlanmasındaki asıl avantajıdır. Altın nanopartiküller redoks proteinleri ve elektrot arasında direkt elektron transferine izin verir aynı zamanda bir çok önemli biyokimyasal reaksiyonda gözlenen H_2O_2 , O_2 , NADH gibi moleküllerin redoks proseslerinin katalizi için bir ara yüzey oluşturur (Pingarron et al., 2008). Son yıllarda yapılan çalışmalarda altın nanopartiküllerin, glukoz oksidaz (Lan et al., 2008), ksantin oksidaz (Çubukçu vd., 2007), peroksidaz (Lan et al., 2008), L-laktat dehidrogenaz (Jena and Raj, 2007), asetilkolin esteraz (Liu et al., 2006) gibi enzimlerle hazırlanmış biyosensörlerdeki kullanımı üzerine yoğunlaşmıştır.

1.4.5 Manyetik Fe₃O₄ nanopartiküller

Manyetik Fe₃O₄ nanopartiküller (Nano-Fe₃O₄) biyoteknoloji ve tıp alanında yoğun olarak kullanılmaktadır. Manyetik özellik göstermeleri nedeniyle bu nanopartiküller manyetik alanda yönlendirilebilmektedir. Manyetik özellik gösteren parçacıklara ilaç molekülleri yükleyerek ilacın vücutta yönlendirilmesinde de kullanmak mümkündür (See et al., 2005; Liu et al., 2005). Biyouyumlu katalitik aktiviteye sahip olması ve düşük toksisite göstermesi Fe₃O₄ nanopartiküllerin biyosensör alanında kullanımı açısından uygun olduklarını göstermektedir (Chen and Liao, 2002). Ayrıca manyetik nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş enzimlerin yüzey alanının artmasına bağlı olarak aktivitesinin arttığı ve kütle transferi sınırlaması olmadığından enzim substrat etkileşiminin daha hızlı gerçekleştiği belirtilmiştir (Rossi et al., 2004).



Şekil 1.5 Manyetik Fe₃O₄ nanopartiküller a) manyetik alan olmadığı durum b) manyetik alan altında olduğu durum.

1.4.6 Nanokompozit Materyaller

Spesifik geniş yüzey alanıyla nanoyapılar, kataliz (Corma, 1997), ayrılma (Han et al., 1999), absorpsiyon (Xu et al., 2001), algılama (Walcarius et al., 1999; Ramanathan et al., 2005) ve yakıt hücreleri (Mamak et al., 2001; Liu et al., 2006) için önemli ve uygun bir platform sağlar. Kompozitler son yıllarda ilgi çeken geniş yüzey alanına sahip yapılardır. Nanokompozit materyaller, polimer matris içinde dağılmış metal nanopartikülleri içerir. Nanokompozitler bilimsel ve teknolojik açıdan önemli farklı fiziksel ve kimyasal özellikler gösterir (Carotenuto, 2003). Küçük boyutlu metal nanopartiküllerle polimerik materyallerin kombinasyonu çok yönlü ve farklı özelliklere sahip hibrid materyalleri oluşturur.

Gelişmiş optoelektronik ve sensor cihazları bu materyallerle üretilebilmektedir (Watson et al., 2000; Park et al., 2004; Shenar et al., 2005; Loos et al., 2005).

1.4.6.1 Gümüş klorür (AgCl) @ polianilin (PANI) nanokompozit (AgCl@PANI) materyal

Polianilin, üstün elektriksel, elektrokimyasal ve optik özellikleri ile en çok kullanılan iletken polimerlerden biridir (Singh et al., 2006). Polianilinin yüksek iletken formunun eldesi için genellikle asidik koşullara ($pH < 4$) gerek duyulmaktadır ve bu durum polianilinin biyoelektrokimya alanındaki kullanımını kısıtlamaktadır (Yan et al., 2008). Bu yüzden, nötral pH değerlerinde yüksek iletkenliğe sahip PANI/AgCl, PANI/BaSO₄, PANI/TiO₂ gibi polianilin/inorganik nanokompozitlere olan ilgi giderek artmaktadır (Sui et al., 2004; Lee et al., 2000; Khiew et al., 2004; Bian et al., 2007).

1.5 Akışa Enjeksiyonlu Analiz (Flow Injection Analysis – FIA)

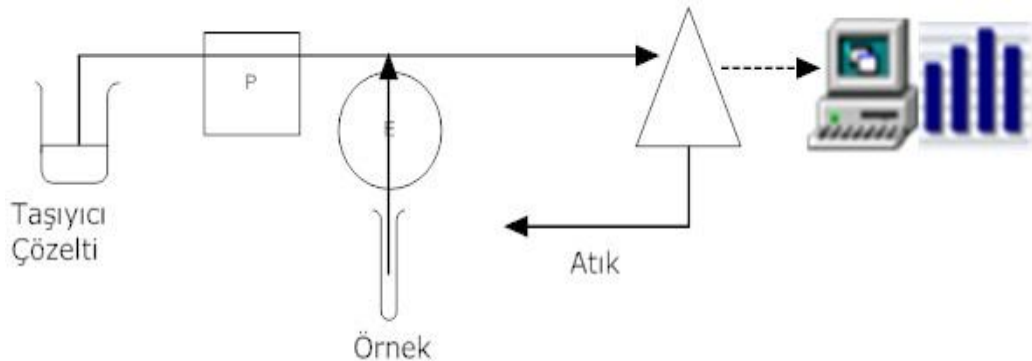
Akışa yönelik analiz sistemleri kimyasal analizde oldukça önemli bir role sahiptir. Analitin bulunduğu ortamın uygun bir detektörden akışı, ölçülen fizikokimyasal parametredeki değişimin sürekli izlenmesini sağlar. Bu sayede fraksiyon toplama veya proses izlenmesinde örnek hazırlama gibi işlemler bertaraf edilerek sistem otomasyona uygun hale getirilmeye çalışılmıştır. Buna ek olarak kromatografik detektörler kullanılmadan geliştirilen teknikler, akış analizine büyük katkı sağlamıştır. Prensip olarak, analiz edilecek sıvı örneğin işlenmesi, geleneksel yöntemlerdeki gibi insan eli yerine düzenli bir akış sağlayacak şekilde kurulmuş bir sisteme devredilir. Böylece birçok cam malzemenin kullanılması, hacim ölçümlerinin ve seyreltmelerin yapılması, örneğin akış sistemine aktarılması gibi operatör gerektiren, hassas olmayan ve kontaminasyona açık işlemlerden kurtulup otomasyona uygun sistemler geliştirilir ve duyarlı analiz sağlanır (Trojanowicz, 2000).

1970 lerin ortalarında Ruzicka ve Hansen tarafından geliştirilen Akışa Enjeksiyonlu Analiz (FIA) sistemi:

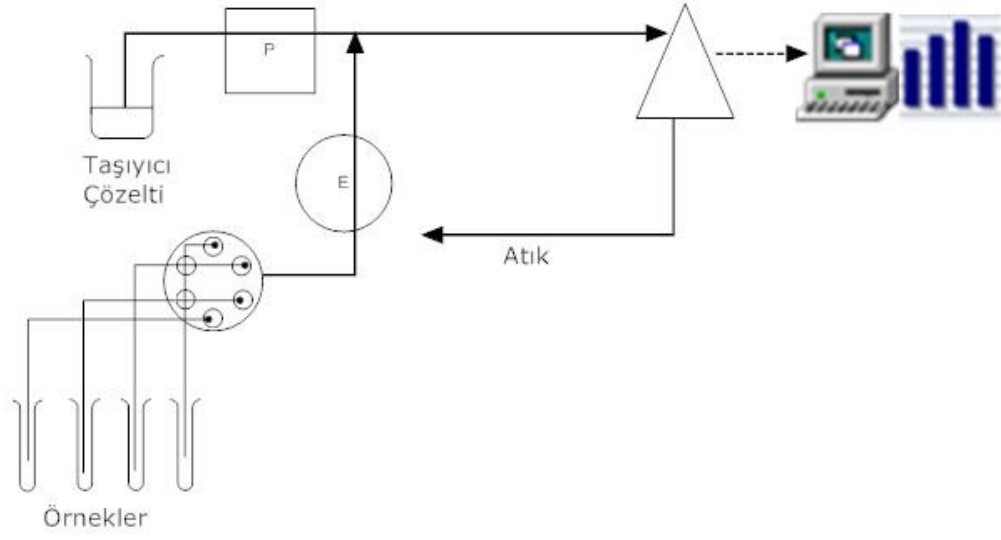
“Bölünmemiş ve akış halindeki uygun bir sıvı taşıyıcı sisteme sıvı örneğin enjekte edilmesine dayanan bir metottur. Enjekte edilen sıvı absorban, elektrot potansiyeli ya da herhangi bir fiziksel parametreyi kaydeden bir detektörden geçer.”

olarak tanımlanmıştır (Ruzicka and Hansen, 1988). Fakat seri analizler için geliştirilmiş bu teknik çeşitli modifikasyonlarla çözelti özelliklerinin belirlenmesi (pH, iletkenlik, pKa vb.) ve veri toplama amaçlı da kullanılmaya başlamıştır (Ruzicka and Hansen, 1986). Sisteme yapılacak modifikasyonlar da gelecekte daha değişik kullanım alanları olabileceğini göstermektedir. Sistemin temel bileşenleri peristaltik pompa, selektör, enjektör ve detektördür. Günümüzde pompa, selektör ve enjektörün çalışma koşullarını denetleyecek bilgisayar yazılımı ile sistem desteklenmektedir. FIA sistemi analiz yapılacak örnek sayısı, analizden sonra detektörden çıkan çözeltinin geri kazanımı, seyreltme gerekliliği vb. parametreler göz önünde bulundurularak modifiye edilebilir. Bunun için sisteme ilave pompalar, karıştırıcı, ısıtıcı, filtre, bobin reaktör veya atığın geri dönüşünü sağlayacak kapalı sistemler eklenebilmektedir.

Enzimlerin immobilize edilmesi ile hazırlanan biyosensörlerin FIA ile birlikte kullanımı endüstriyel analizlerde otomasyon amacına yönelik ilave avantajlar sağlamıştır (Maestre et al., 2001). Sistemin esnekliği ve çok yönlülüğü de endüstriyel proseslerin analizi için öne çıkan avantajlarıdır (Ruzicka and Hansen, 1988).



Şekil 1.6 Tek-Çizgi FIA Sistemi: Analizlenecek örnek reaktifin bulunduğu taşıyıcı çözeltiye enjekte edilir ve gerçekleşen tepkime sonucu ölçülecek fizikokimyasal parametre detektör ile belirlenir.



Şekil 1.7 Çoklu Örnek Analizine Uygun FIA Sistemi: Selektör tarafından seçilen örnekler taşıyıcı çözeltiye enjekte edilir ve gerçekleşen tepkime sonucu ölçülecek fizikokimyasal parametre detektör ile belirlenir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Kimyasal ve Reaktifler

Piranoz Oksidaz (POx; Piranoz : oksijen 2-oksidoredüktaz) *Coriolus sp* E.C 1.1.3.10, Glukoz oksidaz (GOx; β -D-Glukoz: oksijen 1-oksidoredüktaz) *Aspergillus niger* E.C 1.1.3.4), PAMAM- 25% C₁₂ Dendrimer Jenerasyon 4, glutaraldehid çözeltisi (% 25), jelatin (calf skin 300 bloom), D-glukoz, D(+)-mannoz, D(+)-glukoz, D(+)-ksiloz, D(+)-sükroz, gümüş nitrat AgNO₃, altın (III) klorür trihidrat HAuCl₄, sodyum sitrat Na₃C₆H₅O₇, sodyum borhidrür NaBH₄, mineral yağı ve grafit tozu Sigma (St. Louis-ABD) firmasından temin edildi. Sistamin hidroklorür, anilin, demir (III) klorür anhidrid FeCl₃, sodyum sülfid Na₂SO₃ Fluka (Steinheim, Almanya) firmasından temin edildi. Amonyum persülfat (APS), polivinilpirolidon (PVP), hidroklorik asit HCl, tetra etil orta silikat (TEOS) C₈H₂₀O₄Si, amonyak NH₃, metanol CH₃OH, etanol C₂H₅OH, SG-Si 900 [N-(2-aminoetil)-3-aminopropil-trimetoksisilan] C₈H₂₂N₂O₃Si Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi.

Örnek uygulamada spektrofotometrik ölçümler için kullanılan glukoz kiti; Cromatest (Katalog no: 12264) Linear Chemicals (Spain)'den temin edilmiştir. Sistemde tayin, Trinder reaksiyonu ile gerçekleştirilir. Bu reaksiyonda glukoz, glukoz oksidaz enzimi tarafından D-glukonata oksitlenir ve hidrojen peroksit oluşur. Peroksidaz varlığında fenol ve 4-aminoantipirin karışımı hidrojen peroksit tarafından oksitlenir. Oluşan kırmızı renkli kinin imin glukoz konsantrasyonu ile orantılıdır ve spektrofotometrik olarak izlenerek tayin gerçekleştirilir.

Diğer kullanılan tüm kimyasallar da analitik saflıktadır.

2.2 Ekipmanlar

Denemeler sırasında Palmsens Elektrokimyasal Ölçüm Sistemi (Palm Instruments, Houten, Hollanda) kullanıldı. Biyosensör sistemlerine ait cevaplar akım (ΔI , μA) olarak elde edildi. Amperometrik ölçümler çalışma potansiyeli olarak kullanılan -0,7 V'da, 50 mM sodyum fosfat tamponlarında oda sıcaklığında alındı.

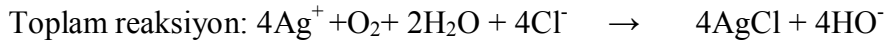
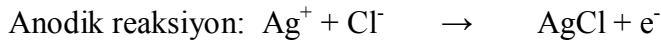
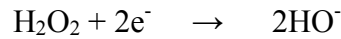
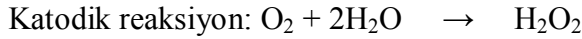
Ölçümler; çalışma elektrodu olarak modifiye FIA-altın elektrot (ALS, Japonya), altın elektrot, camımsı karbon elektrot, karbon pasta elektrot, karışık elektrot olarak platin (Metrohm, İsviçre) ve referans elektrot olarak Ag/AgCl (Metrohm, İsviçre, CH-9101) kullanılarak 3'lü elektrot sistemi ile gerçekleştirildi.

FIA ekipmanı olarak, FIA akış hücresi (ALS, Japonya), selektör, pompa ve enjektör (EVA, Eppendorf, Madison, ABD) kullanıldı.

JEOL JSM-6400 model taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Q-Scope 250 model atomik kuvvet mikroskobu (AFM) hazırlanan biyosensör yüzeylerinin görüntülenmesinde kullanıldı. Phillips XL-30 S FEG model taramalı elektron mikroskobu manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerin görüntülenmesinde kullanıldı.

2.3 Ölçüm Prensipleri

Üçlü elektrot sisteminin kullanıldığı amperometrik ölçümlerde referans elektrot olan Ag/AgCl'e karşı -0,7 V sabit potansiyel uygulanır. O₂ aşağıdaki eşitliğe göre indirgenir ve tüketilen O₂ konsantrasyonu ile orantılı olarak akım elde edilir. Oksijen tüketimine ilişkin reaksiyonlar aşağıda verilmiştir (Dinçkaya, 1999).



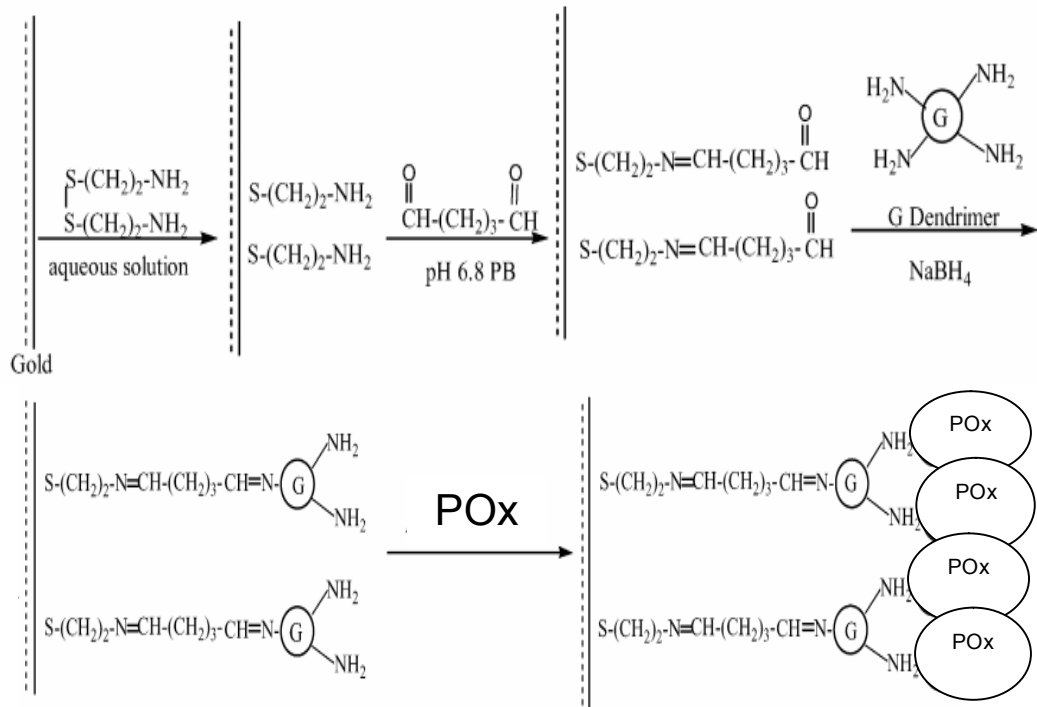
Geliştirilen sistem glukozun enzimatik reaksiyon sonucu oksidasyonuna bağlı olarak meydana gelen akım farklanmalarının kronoamperometrik olarak izlenmesine dayanmaktadır. Bütün ölçümler oda koşullarında gerçekleştirilmiştir. Üçlü elektrot sistemi 10 mL sodyum fosfat tamponu içeren ölçüm hücresine daldırılmıştır. Taban akım değeri sabitlendiğinde hücreye çeşitli miktarlarda standart glukoz çözeltileri eklenmiştir. Reaksiyon bitimi oluşan yeni denge durumundaki akım miktarları kaydedilmiştir. Amperometrik cevaplar (akımlar) -0,7 V' nin uygulandığı potansiyostat tarafından görüntülenmiştir. Belirli

konsantrasyonlardaki glukoz standartlarına ilişkin alınan akım değerleri ile kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Kalibrasyon grafiğinin eğimi kullanılarak doğal örneklerdeki glukoz miktarı da tayin edilebilmiştir.

2.4 Glukoz Biyosensörlerinin Hazırlanması

2.4.1 PAMAM temelli glukoz biyosensörünün hazırlanması

Bu biyosensör sisteminde, altın elektrot yüzeyinin aktifleştirilmesi amacıyla kullanılan sistamin aracılığıyla PAMAM dendrimer tabakası oluşturuldu. Oluşan schiff bazlarının indirgenmesinde sodyum borhidrür kullanıldı. Yüzeye Piranoz oksidaz enzimi PAMAM dendrimerinin amino uçlarından kovalent bağlar oluşturması sağlanarak immobilize edildi.



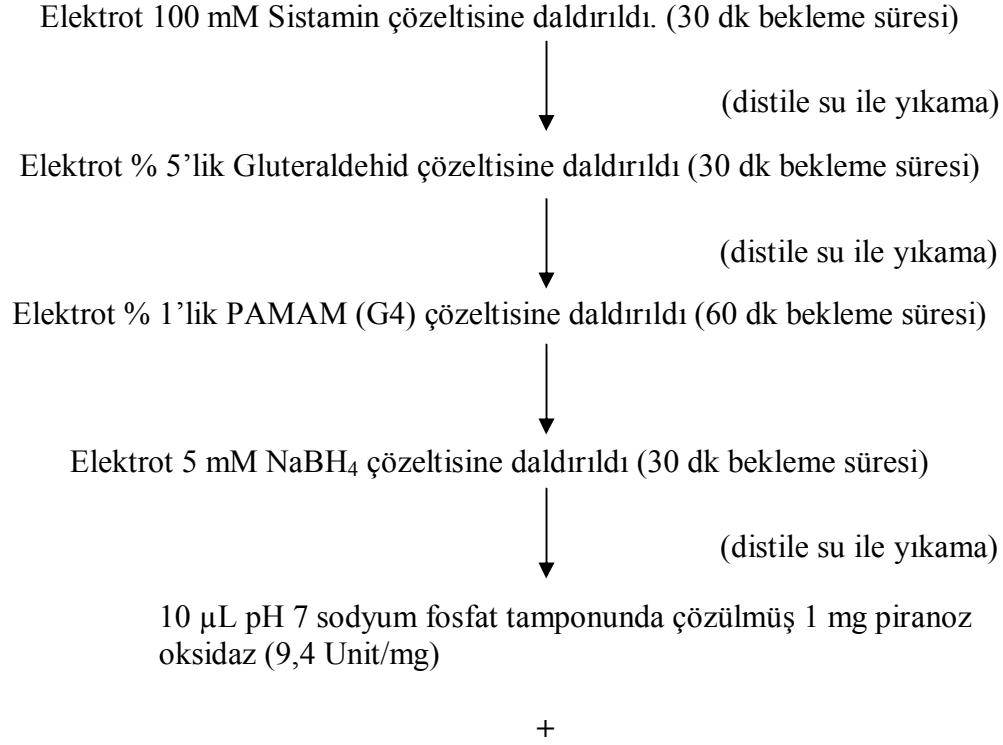
Şekil 2.1 PAMAM temelli glukoz biyosensörünün hazırlanma şeması

Glukoz biyosensörünün hazırlanmasında izlenen prosedür şöyledir:

2.4.1.1 Elektrodun temizlenmesi

1. Alumina ile parlatma (Fiziksel temizleme)
2. 0,5 mM H₂SO₄ ile 0- 1,5 V arasında 10 CV (Kimyasal temizleme)

2.4.1.2 Elektrodun hazırlanması



10 µL % 1'lik Glutaraldehid çözeltisi pipetlenerek enzim immobilize edildi.

Elektrot yüzeyi kuruyana kadar (~ 30 dk) oda sıcaklığında bekletildi.

2.4.2 Nanokompozit temelli glukoz biyosensörünün hazırlanması

Bu biyosensör sisteminde, PANI/AgCl kompozit materyal jelatin yardımıyla yüzeye immobilize edildi.

2.4.2.1 AuNP sentezi

$2,5 \times 10^{-4}$ M HAuCl₄ ve $2,5 \times 10^{-4}$ M trisodyum sitrat içeren 20 mL çözelti bir konik balon içinde hazırlandı. Ardından 0,6 mL 0,1 M buz soğukluğundaki NaBH₄ çözeltisi karışmakta olan çözeltiye eklendi. NaBH₄ eklendikten hemen sonra çözeltide partikül oluştuğunu gösteren pembe renk gözlenmiştir (Pan et al., 2007).

2.4.2.2 AuNP-PANI/AgCl hibrid materyalin sentezi

PVP (% 3) çözeltisine AgNO_3 (0,012 M) ve anilin (0,012 M) eklendi. 5 mL 1 M HCl ve oksidant olarak amonyum persülfat oda sıcaklığında karıştırma ile birlikte yukarıdaki karışıma damlatıldı ve 24 saat boyunca karıştırıldı (Anilin, amonyum persülfat molar oranı ($[\text{An}]:[\text{APS}]$); 1:1) (Feng et al., 2006). Bu işlemten sonra 0,3 mL of PANI/AgCl nanokompozit solüsyonu 1 mL koloidal AuNP solüsyonuna eklendi ve 12 saat karıştırıldı. 12 saatin sonunda elde edilen ürün santrifüjlendikten sonra suda disperse edildi. Böylece AuNP, PANI/AgCl nanokompozit yüzeyinde tutuklandı ve AuNP-PANI/AgCl hibrid materyal elde edildi. (Yan et al., 2008).

2.4.2.3 Elektrodun hazırlanması

0,3 ml PANI/AgCl + 1ml AuNP kolloid (12 saat inkübasyon)



38 °C deki 25 μL AuNP-PANI/AgCl içinde 5 μL sodyum fosfat tamponunda çözülmüş 1 mg POx (4,32 U/mg) çözeltisi ve jelatin (1 mg) karıştırıldı



Elektrot yüzeyine karışımdan 10 μL damlatıldı ve 4 °C' de 30 dakika kurumaya bırakıldı



Elektrot, % 2,5 glutaraldehid içerisinde 5 dk bekletildi

2.4.3 Manyetik nanopartikül temelli glukoz biyosensörünün hazırlanması

2.4.3.1 Nano-Fe₃O₄ sentezi ve modifikasyonları

Nano-Fe₃O₄ sentezi

12 mL 2 M FeCl₃, 2 M HCl'de hazırlandı ve 500 mL'lik üç boyunlu balonjojeye konulup 100 mL saf su ile seyreltildi. Balonjojeye azot gazı gönderilirken taze hazırlanan 50 mL 0,08 M Na₂SO₃ yavaşça ilave edildi. %28'lik 8 mL NH₃, 40 mL saf su ile seyreltildikten sonra azot gazı altında yavaş karıştırma ile eklendi. Çözelti sıcaklığı 70°C'de 15-30 dakika korundu. Sonrasında 45°C'nin altına kadar soğutuldu. Siyah manyetik çökelekler harici bir mıknatıs ile uzaklaştırılarak birkaç kez saf suyla yıkandı ve daha sonra su-etanol (2-1) karışımı ile yıkamaya devam edildi. Çökelek 80 mL etanol ve 20 mL su içerisinde tekrar dağıtıldı (Medine, 2008).

Nano-Fe₃O₄' nun tetraetil ortosilikat ile kaplanması

80 mL etanol ve 20 mL su içerisinde dağıtılan manyetik nanopartiküller 5 mL tetra etil orto silikat (TEOS) ve %10'luk 5 mL NH₃ sırası ile ilave edildi. 40°C'de 12 saat karıştırmanın ardından parçacıklar metanol ile birkaç kez yıkanarak reaksiyona girmeyen TEOS ve bağlanmamış silika uzaklaştırıldı. Son olarak çökelek 100 mL metanolde süspanse edildi (Medine, 2008).

Silika kaplı Nano-Fe₃O₄' nun amino silan ile konjugasyonu

%20'lik bir konsantrasyona ulaşınca kadar metanol süspansiyonu içerisinde bulunan silika kaplı manyetik parçacıklar üzerine silan çifti ajanı SG-Si 900 [N-(2-aminoetil)-3-aminopropil-trimetoksisilan] eklendi. Çözelti 5 dakika ultrasonik banyoda tutulduktan sonra 60°C'de 12 saat süre ile geri soğutma altında bekletildi. Reaksiyona girmeyen SG-Si 900'u uzaklaştırmak için çözelti metanol ile birkaç kez yıkandı. Oluşan çökelek küçük miktarlarda vakum altında kurutularak analiz için kullanıldı (Medine, 2008).

2.4.3.2 Manyetik biyonanopartiküllerin hazırlanması

Silika ile kaplanıp amino silanlanmış Fe_3O_4 nanopartikül (2mg) 900 μL pH 7 sodyum fosfat tamponunda disperse edildi



(15 dk ultrasonik banyoda bırakıldı)

100 μL % 25 glutaraldehid ilave edildi



(4 °C de 24 saat boyunca karıştırıldı)

Manyetik etki yardımıyla nanopartiküller çözeltiden ayrılıp glutaraldehid uzaklaştırıldı



20 mg GOx (4 mg protein-424 U) 200 μL pH 7 sodyum fosfat tamponunda çözüldü ve ayrılan manyetik nanopartiküller üzerine enzim çözeltisi eklendi



(4 °C de 24 saat boyunca karıştırıldı)

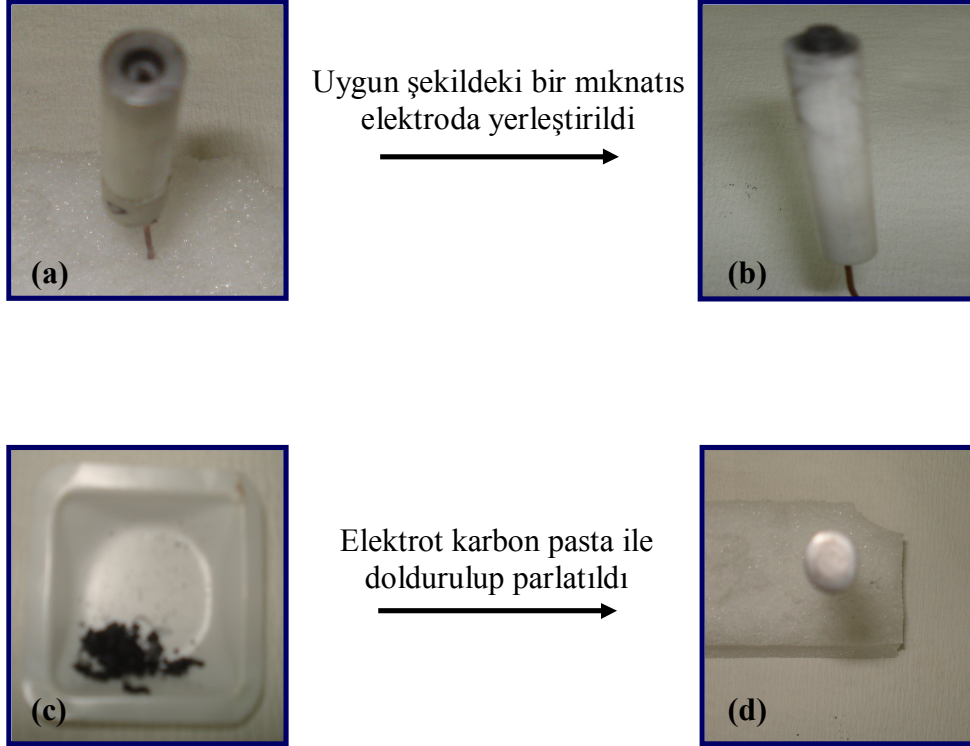
Manyetik etki yardımıyla nanopartiküller çözeltiden ayrılıp bağlanmayan enzim uzaklaştırıldı



(2 kez fosfat tamponu ile yıkama yapıldı)

Manyetik nanopartiküller 200 μL pH 7 sodyum fosfat tamponunda disperse edildi.

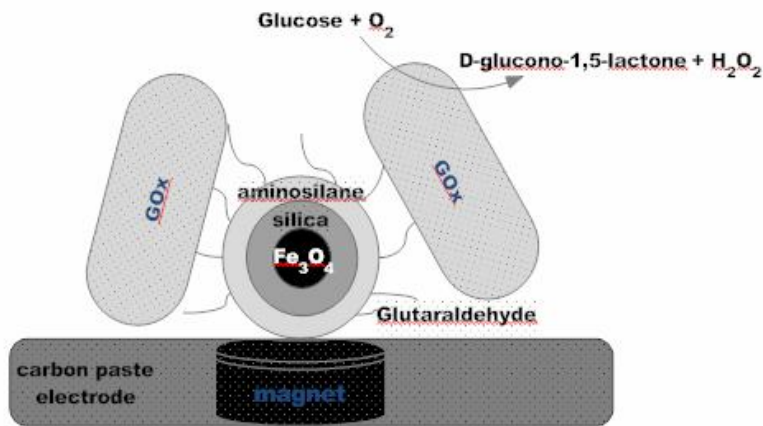
2.4.3.3 Karbon pasta elektrodun dizaynı



Şekil 2.2 Karbon pasta elektrodun dizaynı a) Boş karbon pasta elektrot, b) Mıknatıs yerleştirilmiş elektrot, c) Karbon pasta d) Karbon pasta doldurulmuş ve parlatılmış elektrot

2.4.3.4 Karbon pasta elektrodun hazırlanması

Elektrot yüzeyine 10 μL manyetik biyonanopartikül karışımdan damlatıldı ve 25 $^{\circ}\text{C}$ ' de 30 dakika kurumaya bırakıldı.



Şekil 2.3 Manyetik biyonanopartiküllerle modifiye edilmiş karbon pasta elektrot

3. GLUKOZ BİYOSENSÖRLERİNE İLİŞKİN ÇALIŞMALAR

3.1 PAMAM Temelli Glukoz Biyosensörüne ilişkin Çalışmalar

3.1.1 Yüzey karakterizasyonu

Elektrodun hazırlanmasındaki her aşamada yüzey, AFM ile karakterize edildi. Bu bağlamda, boş elektrot, sistamin ile yüzey modifikasyonu sonrası, PAMAM ile yüzey modifikasyonu sonrası ve enzim immobilizasyonu sonrasında elektrot yüzeyi AFM ile görüntülendi

3.1.2 Kesikli sistemde biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu

3.1.2.1 Optimum pH

Piranoz oksidaz biyosensörünün optimum pH'sını belirlemek amacıyla sodyum fosfat ve sodyum asetat tamponları kullanıldı. 50 mM konsantrasyonda sodyum fosfat ve sodyum asetat ile pH'sı 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 olan tamponlar hazırlandı. Hazırlanan her bir tampon ile alınan biyosensör cevapları kaydedilerek glukoz biyosensörünün optimum pH değeri belirlendi.

3.1.2.2 Enzim miktarının optimizasyonu

Biyoaktif tabakadaki piranoz oksidaz enzim miktarının değişen oranlarıyla biyosensörler hazırlandı ve piranoz oksidaz miktarının biyosensör cevabına etkisi belirlendi. Bu amaç doğrultusunda 4,7 U, 9,4 U ve 23,5 U aktiviteye sahip piranoz oksidaz miktarları kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Farklı enzim oranlarında hazırlanan biyosensörlerin enzimatik reaksiyon sonucunda tüketilen oksijen konsantrasyonlarına karşılık verdikleri akım değerleri ölçülerek karşılaştırıldı.

3.1.3 Kesikli sistemde biyosensörün karakterizasyonu

3.1.3.1 Doğrusal tayin aralığı

Geliştirilen biyosensörlerin biyoaktif tabaka bileşenleri ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrası karakterizasyonu amacıyla standart grafiği

izilerek glukoz ölçüm aralığı belirlendi. Ölçümler 50 mM pH 6 sodyum fosfat tamponunda oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

3.1.3.2 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği ve operasyonel stabilite

Optimize edilmiş çalışma koşullarında hazırlanan piranoz oksidaz enzim elektrodu ile doğrusal tayin aralığındaki bir glukoz konsantrasyonu seçilerek tekrarlı 7 ölçüm alındı. Kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptanarak standart sapma (S.D) ve varyasyon katsayıları (c.v) hesaplandı.

Operasyonel stabiliteyi belirlemek amacıyla hazırlanan glukoz biyosensörü ile alınan tekrarlı ölçüm sonuçlarına göre sensör cevabında meydana gelen azalmalar kaydedilerek yüzdesel olarak hesaplandı.

3.1.3.3 Enzim elektrodunun yeniden hazırlanabilirliği

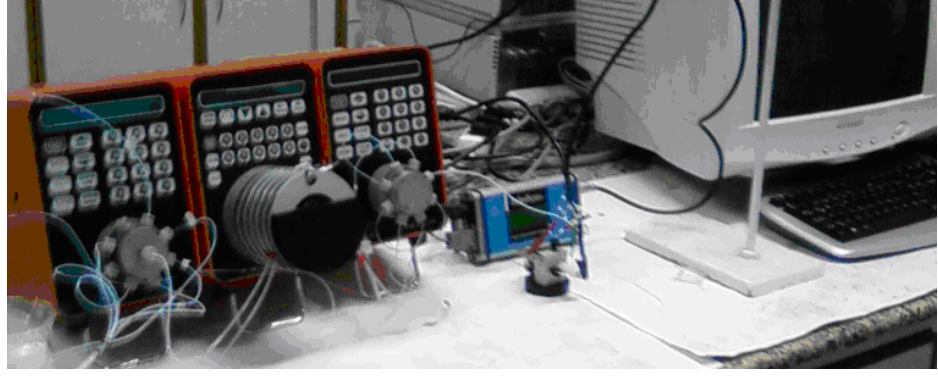
Optimize edilmiş koşullarda (50 mM sodyum fosfat tamponu pH 6, oda sıcaklığında), optimum enzim miktarının kullanıldığı piranoz oksidaz biyosensörleri, farklı zaman dilimlerinde hazırlanarak substrat konsantrasyonlarına karşılık gelen akım değerlerine göre kalibrasyon grafikleri çizildi. Bu işlemler 3 kez tekrar edildi. Farklı zaman diliminde hazırlanan bu 3 enzim elektrodunun ölçüm değerleri karşılaştırılarak sonuçlar yorumlandı.

3.1.3.4 Substrat spesifikliği

Hazırlanan biyosensör sisteminin farklı substratlara karşı ne ölçüde cevap verdiği farklı substratlar kullanılarak yapılan ölçümlerle belirlendi.

3.1.4 FIA sisteminde biyosensörün karakterizasyonu

Piranoz oksidaz biyosensörleri hazırlanarak FIA sistemi ile kombinasyonları gerçekleştirildi. Kesikli sistem kullanılarak optimize edilen hazırlama koşullarına paralel olarak 9,4 U piranoz oksidaz aktivitesine sahip biyosensörler hazırlandı. Optimize edilen koşullarda biyosensörün karakterizasyonuna yönelik çalışmalar yapıldı. şekil 3.1' de Piranoz oksidaz biyosensörü ile kombine edilmiş FIA sistemi görülmektedir.



Şekil 3.1 Piranoz oksidaz biyosensörü ile kombine edilmiş FIA sistemi

3.1.4.1 Doğrusal tayin aralığı

Piranoz oksidaz biyosensörünün farklı substrat konsantrasyonlarında biyosensör cevabını incelemek amacıyla glukozun farklı konsantrasyonları kullanıldı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen biyosensör cevapları ile glukoz ölçüm aralığı belirlendi. Ölçümler 50 mM pH 6 sodyum fosfat tamponunda oda sıcaklığında gerçekleştirildi

3.1.4.2 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği ve operasyonel stabilite

Kesikli sistemde optimize edilmiş çalışma koşullarında hazırlanan piranoz oksidaz enzim elektrodu ile doğrusal tayin aralığındaki bir glukoz konsantrasyonu seçilerek tekrarlı 10 ölçüm alındı. Kalibrasyon grafiği yardımıyla ölçüm sonuçlarına karşılık gelen glukoz konsantrasyon değerleri saptanarak standart sapma (S.D) ve varyasyon katsayıları (c.v) hesaplandı.

FIA sisteminde akış durdurulmaksızın her 200 saniyede bir alınan tekrarlı ölçüm sonuçlarına göre sensör cevabında meydana gelen azalmalar kaydedilerek yüzdesel olarak hesaplandı.

3.2 Nanokompozit Temelli Glukoz Biyosensörüne İlişkin Çalışmalar

3.2.1 Yüzey karakterizasyonu

Matrislerin yüzey karakteristiklerinin belirlenmesi amacıyla SEM kullanıldı. AuNP-/AgCl ve AuNP-PANI/AgCl/jelatin matrislerin morfolojileri

belirlendi.

3.2.2 Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu

3.2.2.1 Optimum pH

Piranoz oksidaz biyosensörünün optimum pH'sını belirlemek amacıyla sodyum fosfat tamponları kullanıldı. 50 mM konsantrasyonda sodyum fosfat ile pH'sı 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 olan tamponlar hazırlandı. Hazırlanan her bir tampon ile alınan biyosensör cevapları kaydedilerek glukoz biyosensörünün optimum pH değeri belirlendi

3.2.2.2 Enzim miktarının optimizasyonu

Biyoaktif tabakadaki piranoz oksidaz enzim miktarının değişen oranlarıyla biyosensörler hazırlandı ve piranoz oksidaz miktarının biyosensör cevabına etkisi belirlendi. Bu amaç doğrultusunda 0,1 U; 0,75 U; 1,44 U; 2 U ve 4 U aktiviteye sahip piranoz oksidaz miktarları kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Farklı enzim oranlarında hazırlanan biyosensörlerin enzimatik reaksiyon sonucunda tüketilen oksijen konsantrasyonlarına karşılık verdikleri akım değerleri ölçülerek karşılaştırıldı.

3.2.3 Biyosensörün karakterizasyonu

3.2.3.1 Doğrusal tayin aralığı

Geliştirilen biyosensörlerin biyoaktif tabaka bileşenleri ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrası karakterizasyonu amacıyla standart grafiği çizilerek glukoz ölçüm aralığı belirlendi. Ölçümler 50 mM pH 6,5 sodyum fosfat tamponunda oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

3.2.3.2 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği ve operasyonel stabilite

Optimize edilmiş çalışma koşullarında hazırlanan piranoz oksidaz enzim elektrodu ile doğrusal tayin aralığına giren bir glukoz konsantrasyonu seçilerek

tekrarlı ölçüm alındı. Kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptanarak standart sapma (S.D) ve varyasyon katsayıları (c.v) hesaplandı.

Operasyonel stabiliteyi belirlemek amacıyla hazırlanan glukoz biyosensörü ile alınan tekrarlı ölçüm sonuçlarına göre sensör cevabında meydana gelen azalmalar kaydedilerek yüzdesel olarak hesaplandı.

3.2.3.3 Sensör cevabına AuNP etkisi

AuNP etkisini belirlemek amacıyla AuNP içeren ve AuNP içermeyen kompozit materyaller ile iki farklı elektrot hazırlandı. Optimum koşullarda elektrotların substrata karşı verdikleri cevaplar kıyaslandı.

3.2.3.4 Substrat spesifikliğı

Hazırlanan biyosensör sisteminin farklı substratlara karşı ne ölçüde cevap verdiği farklı substratlar kullanılarak yapılan ölçümlerle belirlendi.

3.2.3.5 Örnek uygulama

Piranoz oksidaz temelli biyosensör sisteminin uygulanan örneklerle; nar suyu, ahududu nektarı (Aroma); yeşil çay (Lipton, Unilever); enerji içeceği (Red Bull); şeftali suyu, portakal suyu, karışık meyve suyu (Cappy); kola (Coca Cola); beyaz şarap, kırmızı şarap (Nevzade) cevapları belirlendi ve kalibrasyon grafiğı yardımıyla uygulanan örneklerdeki glukoz miktarı tayin edildi. Sonuçlar referans yöntem olan ticari glukoz kitleri kullanılarak elde edilen değerlerle kıyaslandı.

3.3 Nano-Fe₃O₄ Temelli Glukoz Biyosensörüne İlişkin Çalışmalar

3.3.1 Yüzey karakterizasyonu

Fe₃O₄ nanopartiküller ve yapılan modifikasyonlar SEM ile karakterize edildi.

3.3.2 Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu

3.3.2.1 Optimum pH

Glukoz oksidaz biyosensörünün optimum pH'sını belirlemek amacıyla sodyum fosfat ve sodyum asetat tamponları kullanıldı. 50 mM konsantrasyonda sodyum asetat ile pH' sı 5; 5,5 sodyum fosfat ile pH' sı 6,0; 6,5; 7,0; olan tamponlar hazırlandı. Hazırlanan her bir tampon ile alınan biyosensör cevapları kaydedilerek glukoz biyosensörünün optimum pH değeri belirlendi.

3.3.2.2 Biyonopartikül miktarının optimizasyonu

Biyoaktif tabakadaki biyonopartikül (dolayısıyla enzim) miktarının değişen oranlarıyla biyosensörler hazırlandı ve biyonopartikül miktarının biyosensör cevabına etkisi belirlendi. Bu amaç doğrultusunda 1 µL; 2,5 µL; 5 µL; 10 µL; 20 µL biyonopartikül miktarları kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Farklı biyonopartikül miktarlarıyla hazırlanan biyosensörlerin enzimatik reaksiyon sonucunda tüketilen oksijen konsantrasyonlarına karşılık verdikleri akım değerleri ölçülerek karşılaştırıldı.

3.3.3 Biyosensörün karakterizasyonu

3.3.3.1 Doğrusal tayin aralığı

Geliştirilen biyosensörlerin biyoaktif tabaka bileşenleri ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrası karakterizasyonu amacıyla standart grafiği çizilerek glukoz ölçüm aralığı belirlendi. Ölçümler 50 mM pH 6 sodyum fosfat tamponunda oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

3.3.3.2 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği ve operasyonel stabilite

Hazırlanan enzim elektrodu ile işlemler 10 kez tekrarlandı ve kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptanarak standart sapma (S.D) ve varyasyon katsayıları (c.v) hesaplandı.

Operasyonel stabiliteyi belirlemek amacıyla hazırlanan glukoz biyosensörü ile alınan tekrarlı ölçüm sonuçlarına göre sensör cevabında meydana gelen azalmalar kaydedilerek yüzdesel olarak hesaplandı.

3.3.3.3 Enzim elektrodunun yeniden hazırlanabilirliği

Optimize edilmiş koşullarda (50 mM sodyum fosfat tamponu pH 6, oda sıcaklığında), optimum biyonanopartikül miktarının kullanıldığı glukoz biyosensörleri, farklı zaman dilimlerinde hazırlanarak substrat konsantrasyonlarına karşılık gelen akım değerlerine göre kalibrasyon grafikleri çizildi. Bu işlemler 3 kez tekrar edildi. Farklı zaman diliminde hazırlanan bu 3 enzim elektrodunun ölçüm değerleri karşılaştırılarak sonuçlar yorumlandı.

3.3.3.4 Örnek uygulama

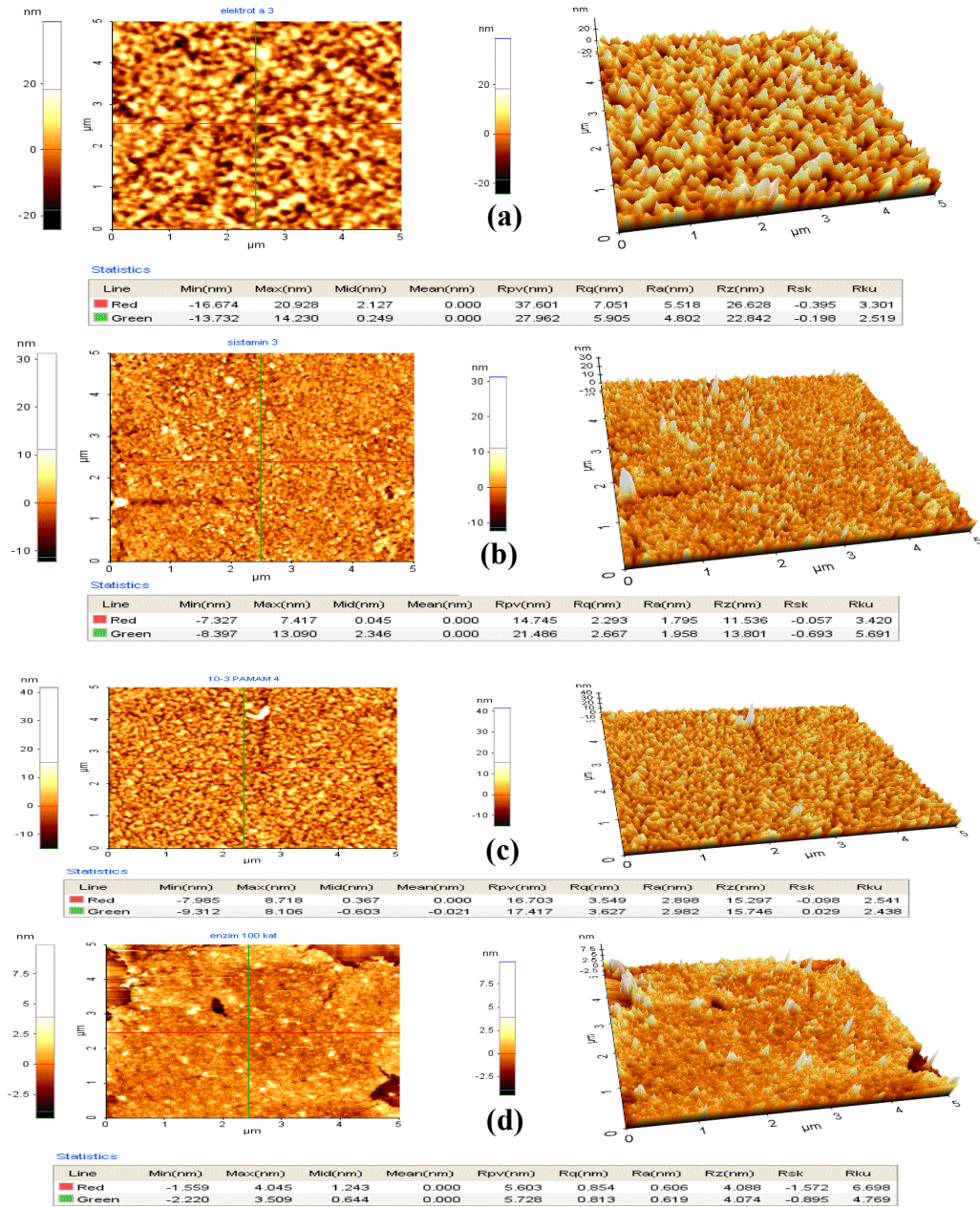
Manyetik Fe₃O₄ nanopartikül temelli biyosensör sisteminin uygulanan örneklerle; yeşil çay, ice tea (Lipton, Unilever); limonata (Uludağ); kola, sprite (Coca Cola); şeftali suyu, portakal suyu, vişne suyu, karışık meyve suyu (Cappy, Coca Cola); fruko (Pepsico) cevapları belirlendi ve kalibrasyon grafiği yardımıyla uygulanan örneklerdeki glukoz miktarı tayin edildi. Sonuçlar referans yöntem olan ticari glukoz kitleri kullanılarak elde edilen değerlerle kıyaslandı.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 PAMAM Temelli Glukoz Biyosensörüne ilişkin Sonuçlar

4.1.1 Yüzey karakterizasyonu

Elektrodun hazırlanmasındaki her aşamada yüzey, AFM ile karakterize edildi. Elde edilen AFM görüntüleri Şekil 4.1’ de görülmektedir.

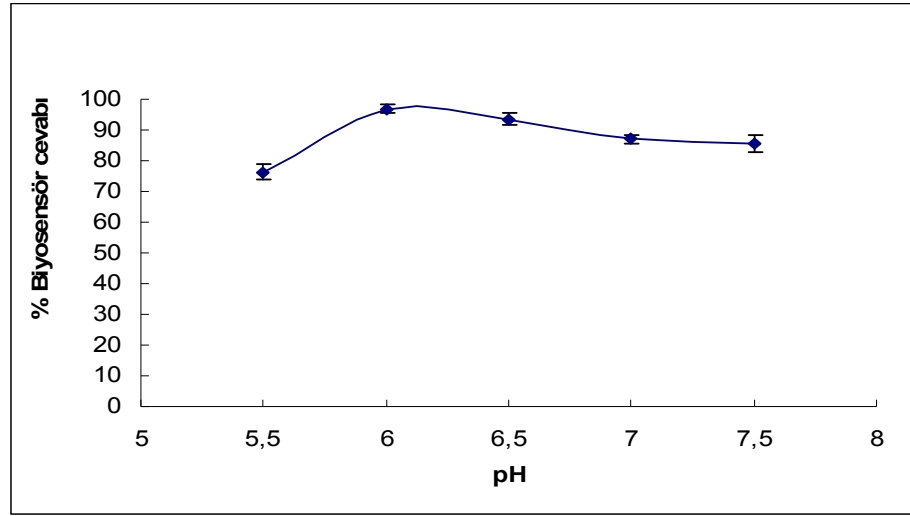


Şekil 4.1 Elektrot yüzeyinin AFM görüntüleri a) Boş elektrot, b) Sistamin modifikasyonu sonrası, c) PAMAM modifikasyonu sonrası, d) Enzim immobilizasyonu sonrası

4.1.2 Kesikli sistemde biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu

4.1.2.1 Optimum pH

Hazırlanan biyosensör ile pH optimizasyonu yapıldı. Denemeler sonucunda elde edilen verilere göre biyosensörün optimum pH grafiği Şekil 4.2' de verilmiştir.

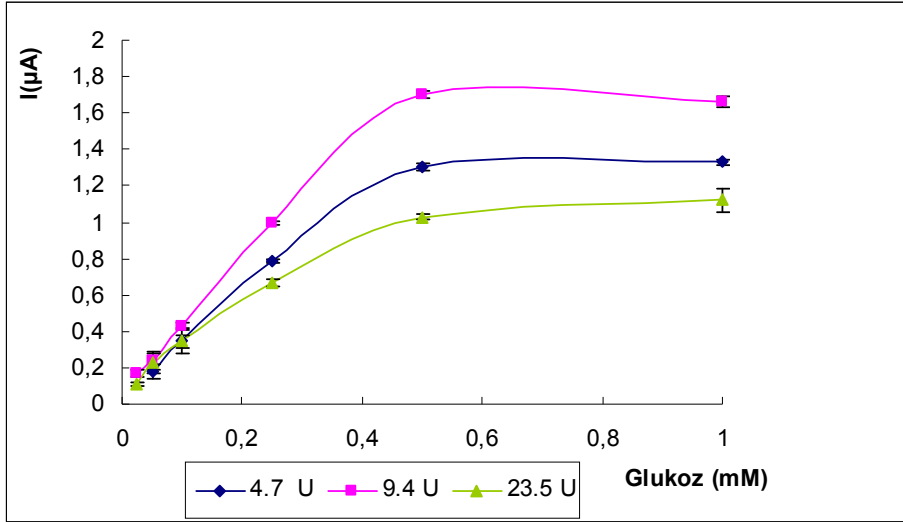


Şekil 4.2 Biyosensör cevabına pH'nın etkisi (Sodyum asetat tamponu; pH 5,5; sodyum fosfat tamponu pH 6-8; 50 mM, piranoz oksidaz 9,4 U, -0,7 V, 0,5 mM glukoz, oda sıcaklığı, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)

Şekil 4.2' de görüldüğü gibi en yüksek biyosensör cevabı pH 6; 50 mM fosfat tamponunda alındı. Bunu takip eden çalışmalarda pH 6 sodyum fosfat tamponu kullanıldı.

4.1.2.2 Enzim miktarının optimizasyonu

Bu çalışmada piranoz oksidaz miktarının biyosensör cevabı üzerindeki etkisi belirlendi. Bu amaca yönelik olarak; biyosensör hazırlanmasında kullanılan piranoz oksidaz miktarı ile biyosensör cevabı arasındaki ilişki Şekil 4.3' de verilmiştir.



Şekil 4.3 Biyosensör cevabına enzim miktarının etkisi (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50mM, -0,7 V, oda sıcaklığı, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

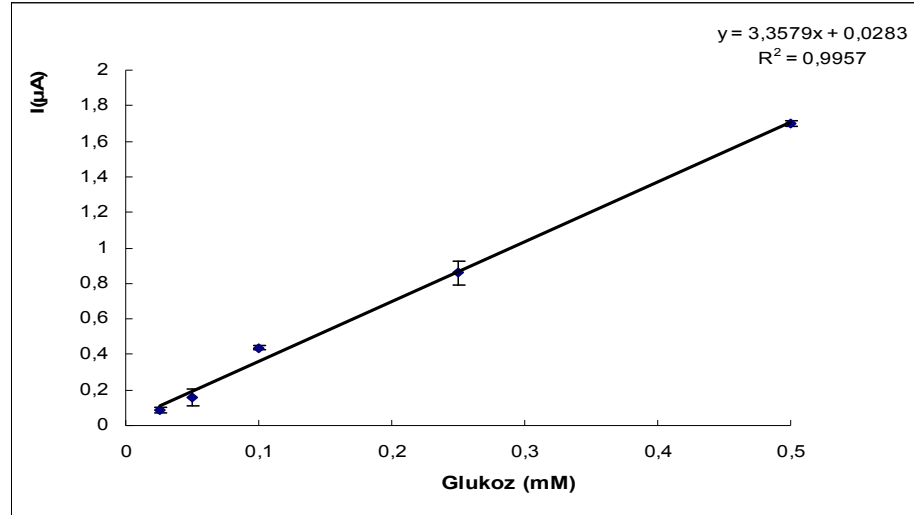
Şekil 4.3' de görüldüğü gibi optimum enzim miktarı 1 mg (9,4 U) olarak bulunmuştur. Daha düşük enzim miktarında biyosensörün cevabı da daha düşük bulunmuştur. Daha yüksek enzim miktarında ise biyosensör cevabının azalmasının nedeni artan enzim tabakasının kalınlığı nedeniyle substratın enzimin aktif bölgesine difüzyonunun zorlaşması olarak gösterilebilir.

4.1.3 Kesikli sistemde biyosensörün karakterizasyonu

4.1.3.1 Doğrusal tayin aralığı

Biyosensörün farklı substrat konsantrasyonlarındaki cevabını incelemek amacıyla glukozun farklı konsantrasyonları kullanıldı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen biyosensör cevapları Şekil 4.4' de verilmiştir.

Şekil 4.4' de görüldüğü gibi 0,025-0,5 mM glukoz konsantrasyonu aralığında doğrusallık gözlemlendi.



Şekil 4.4 Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50mM, piranoz oksidaz 9,4 U, -0,7 V, oda sıcaklığı, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)

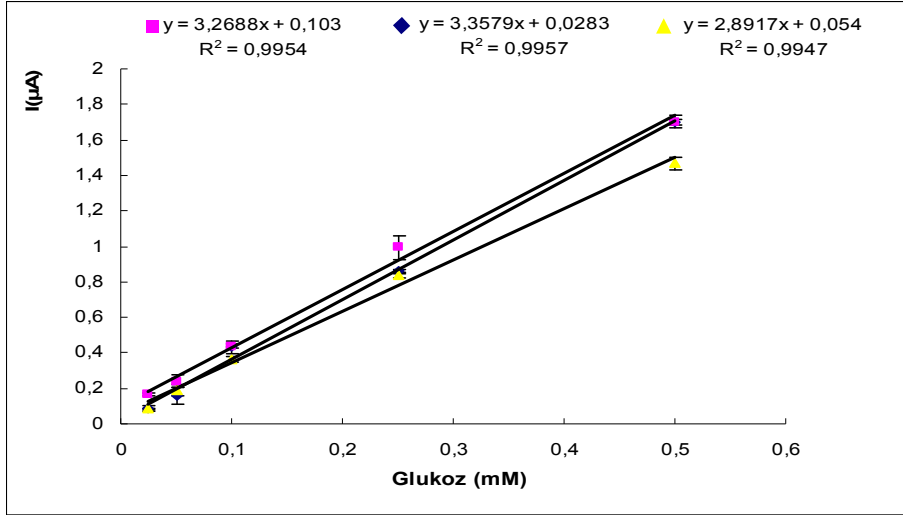
4.1.3.2 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği ve operasyonel stabilite

Hazırlanan piranoz oksidaz biyosensörünün belirli glukoz konsantrasyonlarında çalışma tamponu ve çalışma sıcaklığında tekrar kullanılabilirliği incelendi. Tekrarlanan ölçümler sonrasında ilgili substratın kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptandı. Bu işlemler sonrasında piranoz oksidaz biyosensörü ile glukoz için standart sapma (S.D) $0,3 \pm 0,011$ mM (n=7) ve varyasyon katsayısı (c.v) % 3,57 olarak bulundu. İlk 2 günde alınan 30 ölçüm sonunda kayda değer bir aktivite kaybı gözlenmezken 9 günde alınan toplam 80 ölçüm sonunda % 50 aktivite kaybı gözlemlendi.

4.1.3.3 Enzim elektrodunun yeniden hazırlanabilirliği

Farklı günlerde, aynı oranlarda enzim içeren piranoz oksidaz biyosensörleri hazırlandı ve bu üç farklı elektrotla glukoz tayinine yönelik çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.5' de verilmiştir.

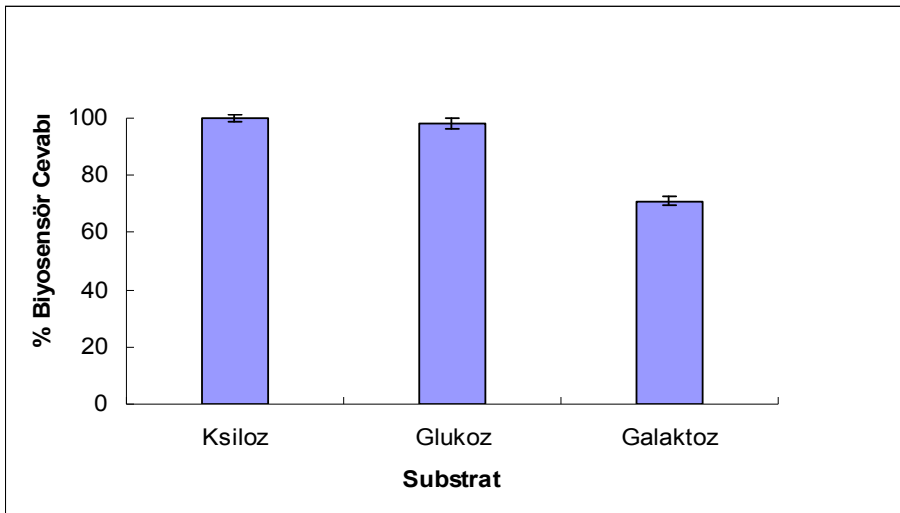
Elde edilen bu üç kalibrasyon grafiğine göre, biyosensörün optimum koşullarda aynı lineer aralığı verecek şekilde tekrar hazırlanabildiği görülmüştür.



Şekil 4.5 Farklı günlerde hazırlanan piranoz oksidaz biyosensörlerinin kalibrasyon grafikleri (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50 mM, piranoz oksidaz 9,4 U, -0,7 V, oda sıcaklığı, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

4.1.3.4 Substrat spesifikliğı

Farklı substratlar kullanılarak biyosensör sisteminin cevapları ölçüldü. Biyosensörün Ksiloz'a verdiği cevap % 100 olarak alındı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substratların (glukoz, galaktoz, mannoz, sükroz, laktoz, maltoz) kullanımı sonucu elde edilen biyosensör cevapları Şekil 4,6' da verilmiştir. Mannoz, sükroz, laktoz ve maltoza karşı cevap alınamamıştır. Ölçümler 2 kez tekrarlanmıştır.

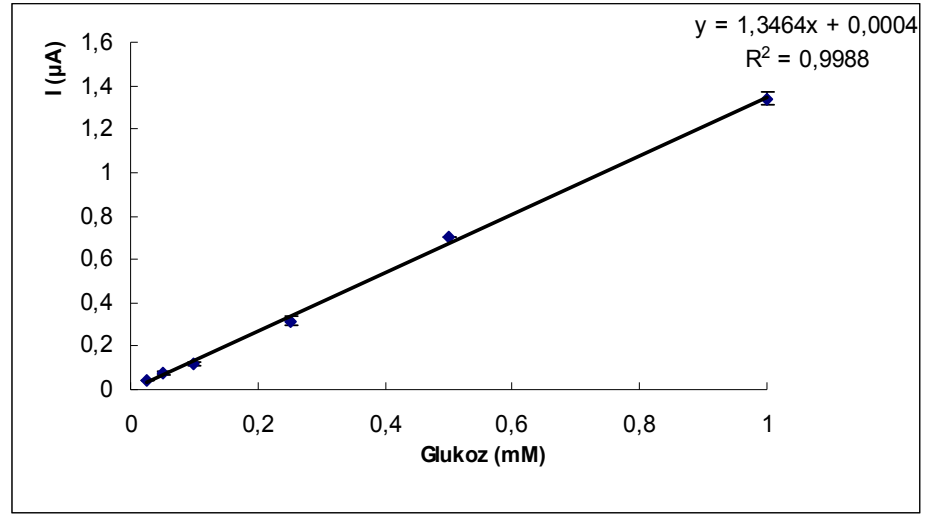


Şekil 4.6 Biyosensörün farklı substratlara (0,25 mM) cevabı (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50 mM, piranoz oksidaz 9,4 U, -0,7 V, oda sıcaklığı, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

4.1.4 FIA sisteminde biyosensörün karakterizasyonu

4.1.4.1 Doğrusal tayin aralığı

Biyosensörünün farklı substrat konsantrasyonlarındaki cevabını incelemek amacıyla glukozun farklı konsantrasyonları kullanıldı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarında elde edilen biyosensör cevapları Şekil 4.7’ de verilmiştir.



Şekil 4.7 Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50mM, piranoz oksidaz 9,4 U, -0,7 V, oda sıcaklığı, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)

Şekil 4.7’ de görüldüğü gibi 0,025-1 mM glukoz konsantrasyonu aralığında doğrusallık gözlemlendi.

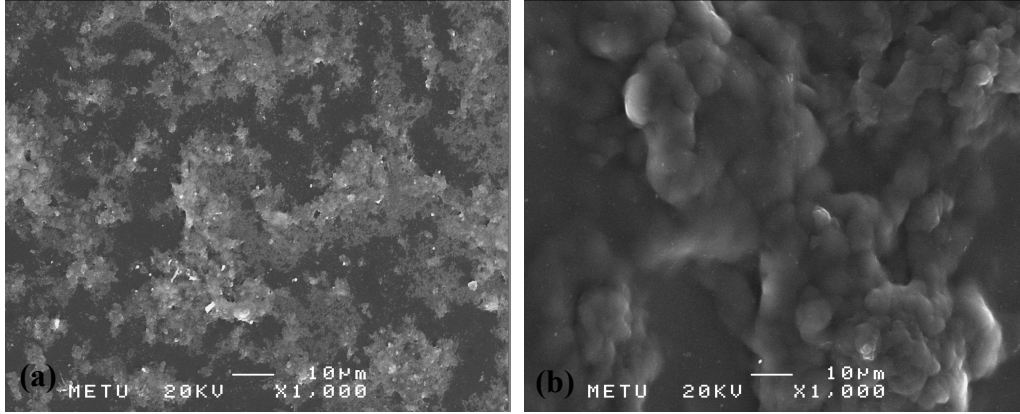
4.1.4.2 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği ve operasyonel stabilite

Hazırlanan piranoz oksidaz biyosensörünün belirli glukoz konsantrasyonlarında çalışma tamponu ve çalışma sıcaklığında tekrar kullanılabilirliği incelendi. Tekrarlanan ölçümler sonrasında ilgili substratın kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptandı. Bu işlemler sonrasında piranoz oksidaz biyosensörü ile glukoz için standart sapma (S.D) $0,51 \pm 0,019$ mM (n=10) ve varyasyon katsayısı (c.v) % 3,69 olarak bulundu. 6 saatte alınan toplam 15 ölçüm sonunda % 9,3 aktivite kaybı gözlemlendi.

4.2 Nanokompozit Temelli Glukoz Biyosensörüne İlişkin Sonuçlar

4.2.1 Yüzey karakterizasyonu

Matrisin yüzey karakteristiklerinin belirlenmesi amacıyla SEM kullanıldı. AuNP-PANI/AgCl ve AuNP-PANI/AgCl/jelatin matrislerin SEM görüntüleri Şekil 4.8’ de verilmiştir.



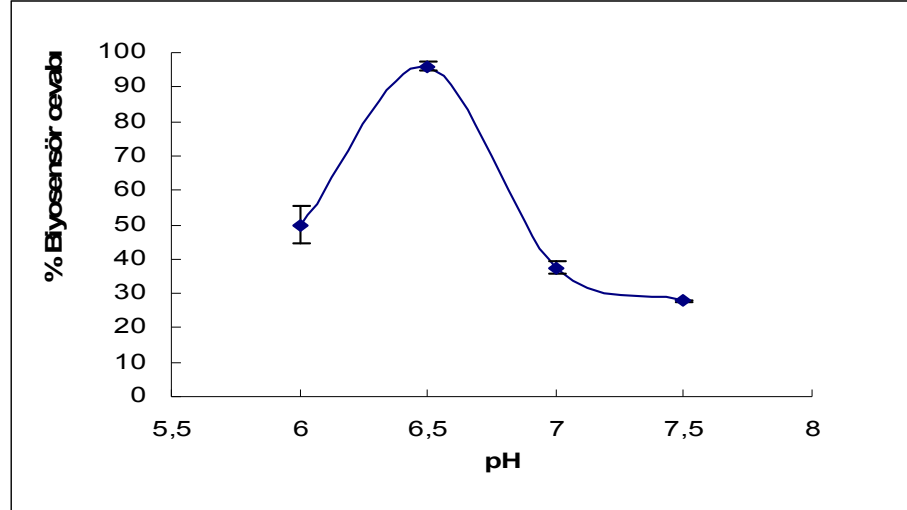
Şekil 4.8 Kompozit matrislerin SEM görüntüleri a) AuNP-PANI/AgCl, b) AuNP- PANI/AgCl/ Jelatin.

Şekil 4.8’ de görüldüğü gibi jelatinli kompozit materyal, jelatinsiz kompozit materyalden daha kompakt yapıdadır. Jelatinin enzim immobilizasyonu için daha uygun bir matris sağladığı açıktır.

4.2.2 Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu

4.2.2.1 Optimum pH

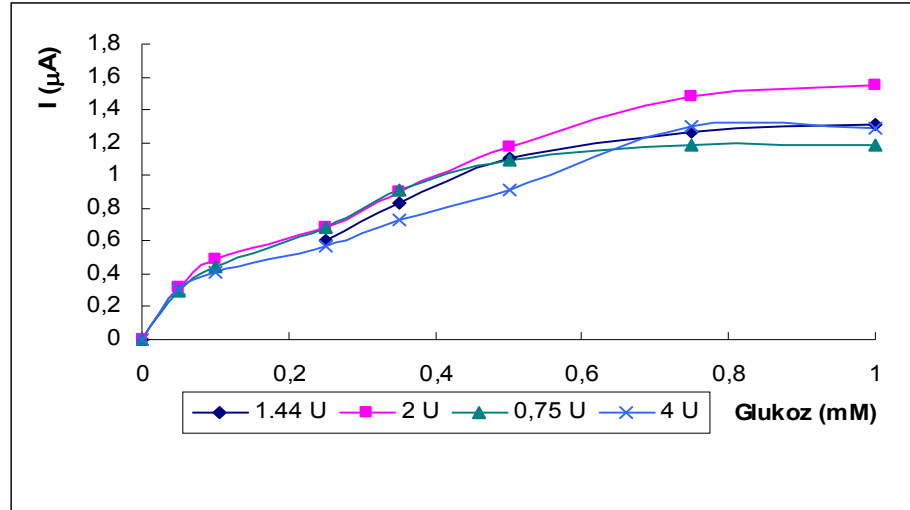
Hazırlanan biyosensör ile pH optimizasyonu yapıldı. Denemeler sonucunda elde edilen verilere göre biyosensörün optimum pH grafiği Şekil 4.9’ da verilmiştir.



Şekil 4.9 Biyosensör cevabına pH'nın etkisi (Sodyum fosfat tamponu pH 6-7,5; 50 mM, -0,7 V, 0,5 mM glukoz, oda sıcaklığı, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

4.2.2.2 Enzim miktarının optimizasyonu

Bu çalışmada piranoz oksidaz miktarının biyosensör cevabı üzerindeki etkisi belirlendi. Bu amaca yönelik olarak; biyosensör hazırlanmasında kullanılan piranoz oksidaz miktarı ile biyosensör cevabı arasındaki ilişki Şekil 4.10' da verilmiştir.



Şekil 4.10 Biyosensör cevabına enzim miktarının etkisi (Sodyum fosfat tamponu pH 6,5; 50mM, 0,7 V, oda sıcaklığı).

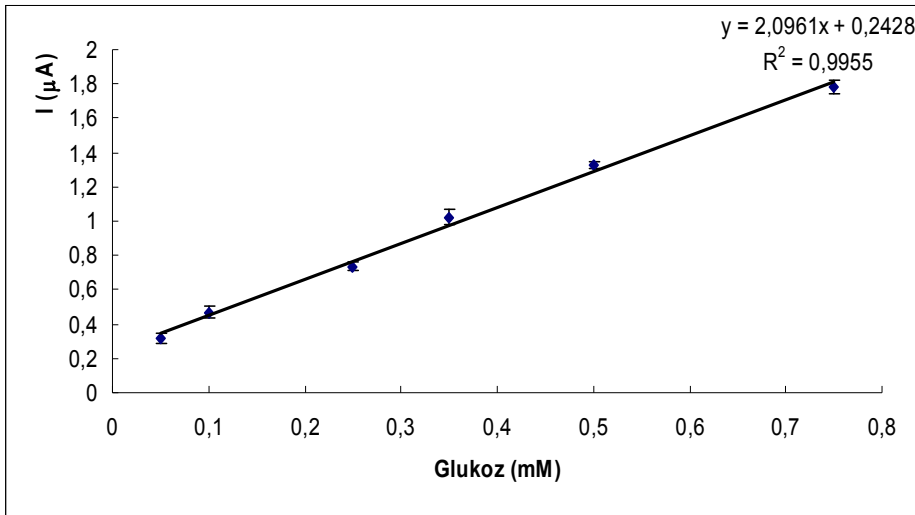
Farklı enzim miktarlarıyla hazırlanan elektrotlardan 0,1 U aktiviteye sahip enzim miktarı içeren elektrottan cevap alınamadı. Diğer elektrotlarda ise doğrusal

tayin aralığı ve biyosensör cevapları birbirine çok yakın olarak bulundu. Bu nedenle en düşük miktar olan 0,75 U aktiviteye sahip enzim miktarı optimum olarak belirlendi ve daha sonraki denemelerde elektrotlar bu enzim miktarı ile hazırlandı.

4.2.3 Biyosensörün karakterizasyonu

4.2.3.1 Doğrusal tayin aralığı

Biyosensörün farklı substrat konsantrasyonlarındaki cevabını incelemek amacıyla glukozun farklı konsantrasyonları kullanıldı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarına karşı elde edilen biyosensör cevapları Şekil 4.11’ de verilmiştir.



Şekil 4.11 Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (Sodyum fosfat tamponu pH 6,5; 50mM; piranoz oksidaz 0,75 U, -0,7 V, oda sıcaklığı, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir)

Şekil 4.11’ de görüldüğü gibi 0,05-0,75 mM glukoz konsantrasyonu aralığında biyosensör cevabında doğrusallık gözlemlendi.

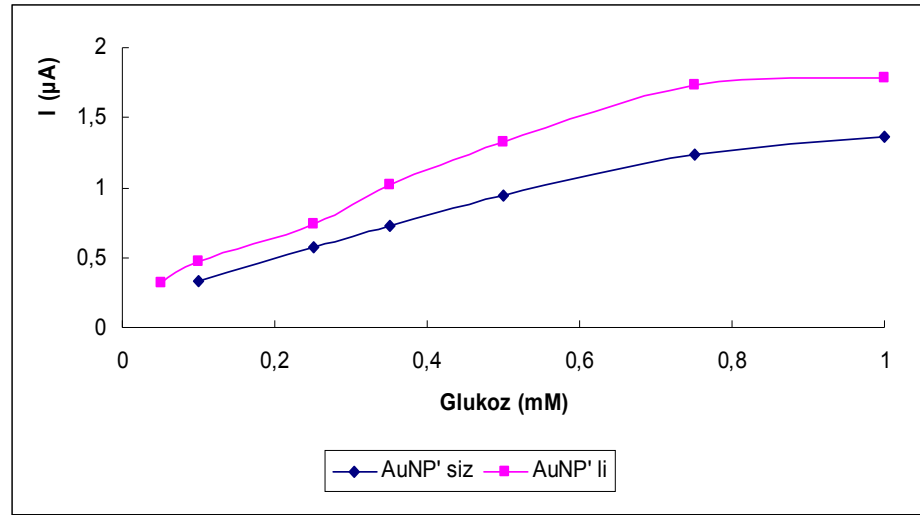
4.2.3.2 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği ve operasyonel stabilite

Hazırlanan piranoz oksidaz biyosensörünün belirli glukoz konsantrasyonlarında çalışma tamponu ve çalışma sıcaklığında tekrar kullanılabilirliği incelendi. Tekrarlanan ölçümler sonrasında ilgili substratın

kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptandı. Bu işlemler sonrasında piranoz oksidaz biyosensörü ile glukoz için standart sapma (S.D) $0,25 \pm 0,005$ mM (n=6) ve varyasyon katsayısı (c.v) % 2,16 olarak bulundu. 6 saatte alınan toplam 8 ölçüm sonunda % 12 aktivite kaybı gözlemlendi.

4.2.3.3 Sensör cevabına AuNP etkisi

AuNP içeren ve AuNP içermeyen kompozit materyaller ile hazırlanan iki elektrodun optimum koşullarda substrata karşı verdikleri cevaplar kıyaslandı. Elde edilen biyosensör cevapları Şekil 4.12’ de verilmiştir.

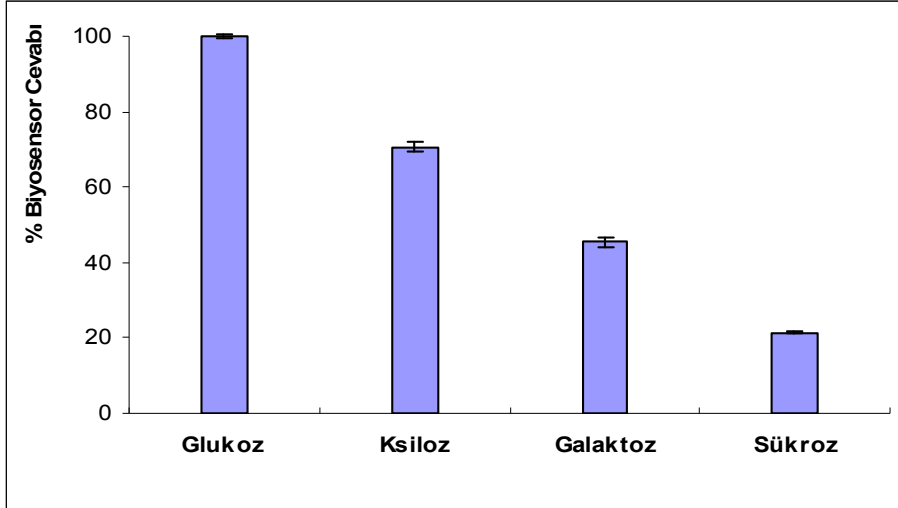


Şekil 4.12 AuNP’ nin biyosensör cevabı üzerine etkisi (Sodyum fosfat tamponu pH 6,5; 50mM, piranoz oksidaz 0,75 U, -0,7 V, oda sıcaklığı).

Şekil 4.12’ de görüldüğü gibi AuNP’ li kompozit ile hazırlanan biyosensörde daha duyar ölçümler ve daha yüksek biyosensör cevapları alınmıştır.

4.2.3.4 Substrat spesifikliğı

Farklı substratlar kullanılarak biyosensör sisteminin cevapları ölçüldü. Biyosensörün glukozu verdiği cevap % 100 olarak alındı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substratların (ksiloz, galaktoz, süktroz) kullanımı sonucu elde edilen biyosensör cevapları Şekil 4.13’ de verilmiştir. Ölçümler 2 kez tekrarlanmıştır.



Şekil 4.13 Biyosensörün farklı substratlara (0,25 mM) cevabı (Sodyum fosfat tamponu pH 6,5; 50 mM, piranoz oksidaz 0,75 U, -0,7 V, oda sıcaklığı, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

4.2.3.5 Örnek uygulama

Piranoz oksidaz temelli biyosensör sisteminin uygulanan doğal örneklerle karşı verdiği cevaplar ve dolayısıyla örneklerdeki glukoz miktarı belirlendi. Aynı örneklerde spektrofotometrik yöntemle glukoz tayini gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçla referans yöntemle kıyaslamalı olarak Çizelge 4.1’ de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Örnek uygulama (Sodyum fosfat tamponu pH 6,5; 50 mM; piranoz oksidaz 0,75 U, -0,7 V, oda sıcaklığı, 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmalar verilmiştir).

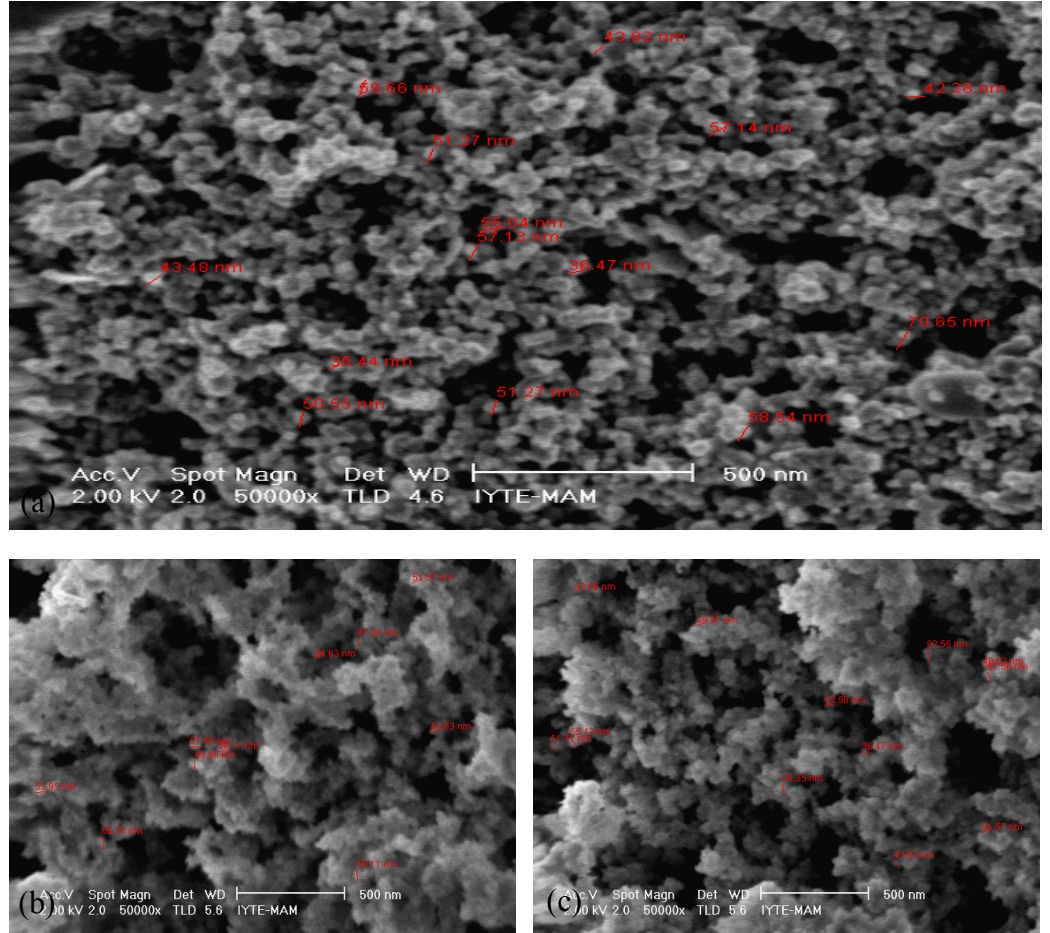
Örnek	Glukoz (g/L)		Gerikazanım (%)
	Biyosensör	Spektrofotometrik	
Nar suyu	10,22±0,252	11,15±0,325	109
Yeşil çay	11,58±0,115	11,91±0,788	103
Enerji içeceği	25,35±0,333	23,68±1,273	93
Ahududu nektarı	32,12±1,659	29,89±0,021	93
Şeftali suyu	36,88±0,333	34,19±5,413	93
Portakal suyu	55,33±0,499	54,46±3,106	98
Karışık meyve suyu	22,41±2,345	24,25±0,159	108
Kola	58,54±1,547	54,19±3,852	93
Beyaz şarap	0,08±0,004	0,075±0,0003	94
Kırmızı şarap	0,049±0,001	0,045±0,005	92

Çizelge 4.1’ de görüldüğü gibi biyosensör sistemi ve spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlar birbirine oldukça yakın bulunmuştur. Geri kazanım oranları % 100’e yakın olup, analizlerin örnek matris etkisinden bağımsız olarak yapılabildikleri açıktır.

4.3 Nano-Fe₃O₄ Temelli Glukoz Biyosensörüne İlişkin Sonuçlar

4.3.1 Yüzey karakterizasyonu

Manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerin, silika kaplı manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerin, silika kaplı silanlanmış manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerin morfolojileri SEM ile karakterize edildi. Elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.14’ de görülmektedir.



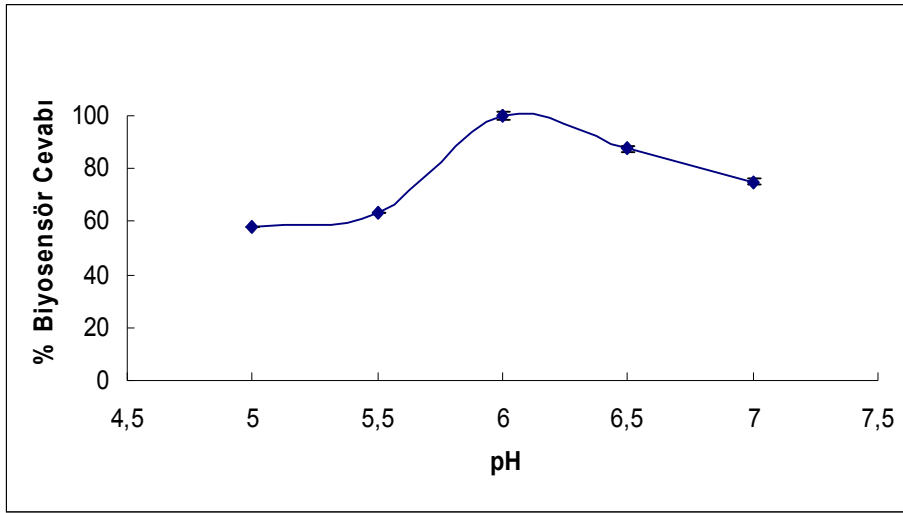
Şekil 4.14 Manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerin SEM görüntüleri (50000X), a) Manyetik Fe₃O₄ nanopartiküller, b) Silika kaplı manyetik Fe₃O₄ nanopartiküller, c) Silika kaplı silanlı manyetik Fe₃O₄ nanopartiküller.

SEM görüntüleri ile manyetik parçacıkların ortalama olarak 40-55 nm aralığında ve küresel olduğu tespit edilmiştir.

4.3.2 Biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonu

4.3.2.1 Optimum pH

Hazırlanan biyosensör ile pH optimizasyonu yapıldı. Denemeler sonucunda elde edilen verilere göre biyosensörün optimum pH grafiği Şekil 4.15’ de verilmiştir.

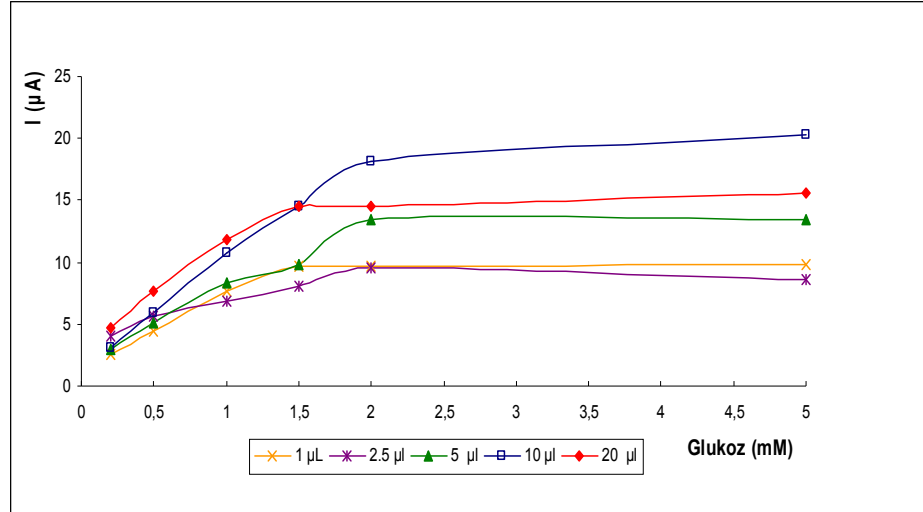


Şekil 4.15 Biyosensör cevabına pH'nın etkisi (Sodyum asetat tamponu pH 5-5,5; sodyum fosfat tamponu pH 6-7; 50 mM, -0,7 V, 1 mM glukoz, oda sıcaklığı, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

En yüksek biyosensör cevabının pH 6; 50 mM fosfat tamponunda alındığı Şekil 4.15’ de görülmektedir. Bunu takip eden çalışmalarda pH 6 sodyum fosfat tamponu kullanıldı.

4.3.2.2 Biyonopartikül miktarının optimizasyonu

Bu çalışmada biyonopartikül miktarının biyosensör cevabı üzerindeki etkisi belirlendi. Bu amaca yönelik olarak; biyosensör hazırlanmasında kullanılan biyonopartikül miktarı ile biyosensör cevabı arasındaki ilişki Şekil 4.16’ da verilmiştir.



Şekil 4.16 Biyosensör cevabına biyonanopartikül miktarının etkisi (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50mM, 0,7 V, oda sıcaklığı).

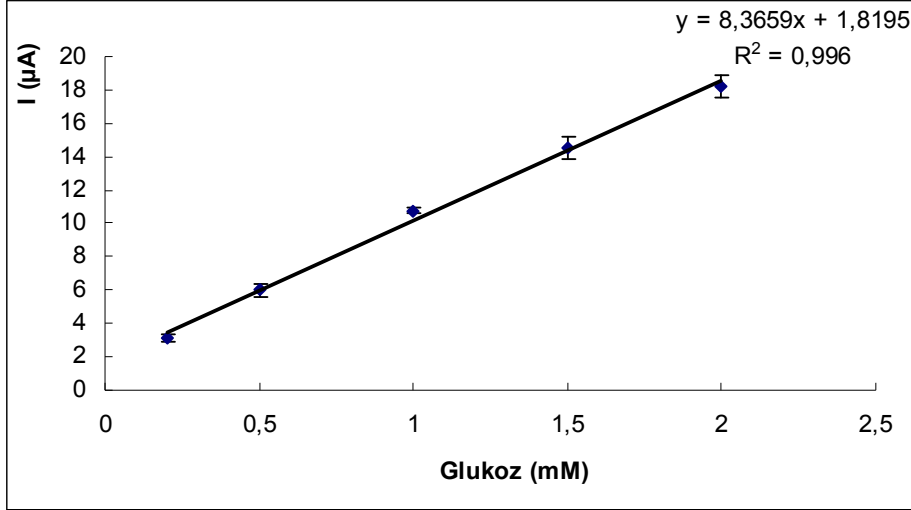
Şekil 4.16' da görüldüğü gibi optimum biyonanopartikül miktarı 10 µL olarak bulunmuştur. Daha düşük biyonanopartikül miktarında biyosensörün cevabı da daha düşük bulunmuştur. Daha yüksek enzim miktarında ise biyosensör cevabının azalmasının nedeni artan biyonanopartikül tabakasının kalınlığı nedeniyle substratın enzimin aktif bölgesine difüzyonunun zorlaşması olarak gösterilebilir.

4.3.3 Biyosensörün karakterizasyonu

4.3.3.1 Doğrusal tayin aralığı

Biyosensörünün farklı substrat konsantrasyonlarındaki cevabını incelemek amacıyla glukozun farklı konsantrasyonları kullanıldı. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı substrat konsantrasyonlarına karşı elde edilen biyosensör cevapları şekil 4.17' de verilmiştir.

0,25-2 mM glukoz konsantrasyonu aralığında biyosensör cevabında doğrusallık gözlenmiştir.



Şekil 4.17 Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50mM, -0,7V, oda sıcaklığı, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

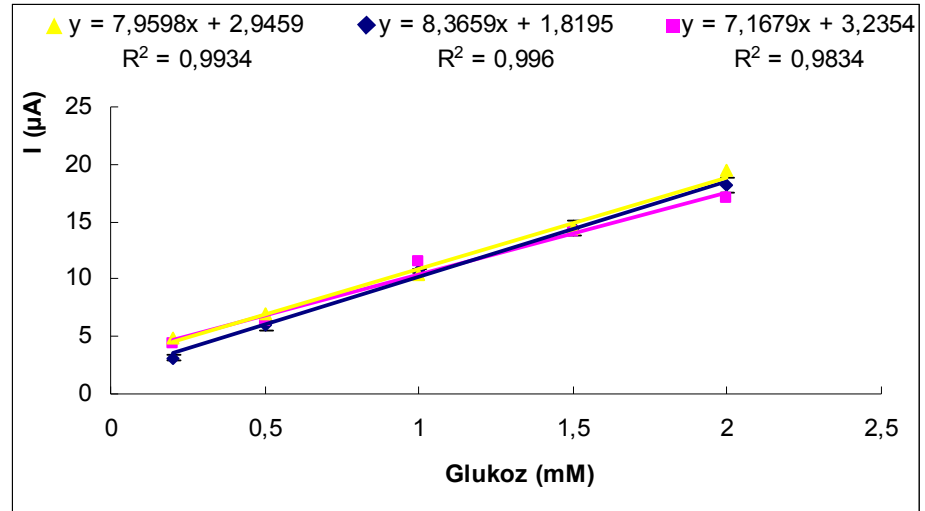
4.3.3.2 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği ve operasyonel stabilite

Hazırlanan glukoz oksidaz biyosensörünün belirli glukoz konsantrasyonlarında çalışma tamponu ve çalışma sıcaklığında tekrar kullanılabilirliği incelendi. Tekrarlanan ölçümler sonrasında ilgili substratın kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptandı. Bu işlemler sonrasında glukoz oksidaz biyosensörü ile glukoz için standart sapma (S.D) $2 \pm 0,051$ mM (n=10) ve varyasyon katsayısı (c.v) % 2,51 olarak bulundu. İlk alınan 10 ölçüm sonunda kayda değer bir aktivite kaybı gözlenmezken 6 saatte alınan toplam 15 ölçüm sonunda % 17 aktivite kaybı gözlemlendi.

4.3.3.3 Enzim elektrodunun yeniden hazırlanabilirliği

Farklı günlerde, aynı oranlarda biyonanopartikül içeren glukoz oksidaz biyosensörleri hazırlandı ve bu üç farklı elektrotla glukoz tayinine yönelik çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.18' de verilmiştir.

Elde edilen bu üç kalibrasyon grafiğine göre, biyosensörün optimum koşullarda aynı lineer aralığı verecek şekilde tekrar hazırlanabildiği görülmüştür.



Şekil 4.18 Farklı günlerde hazırlanan glukoz oksidaz biyosensörlerinin kalibrasyon grafikleri (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50 mM, -0,7 V, oda sıcaklığı, her bir hata çubuğu 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

4.3.3.4 Örnek uygulama

Glikoz oksidaz temelli biyosensör sisteminin uygulanan doğal örneklerle karşı verdiği cevaplar ve dolayısıyla örneklerdeki glukoz miktarı belirlendi. Aynı örneklerde spektrofotometrik yöntemle glukoz tayini gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçla referans yöntemle kıyaslamalı olarak Çizelge 4.2’ de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Örnek uygulama (Sodyum fosfat tamponu pH 6; 50 mM; -0,7 V; oda sıcaklığı 2 ya da 3 ölçüme ilişkin standart sapmalar verilmiştir).

Örnek	Glukoz (g/L)		Gerikazanım (%)
	Biyosensör	Spektrofotometrik	
Sprite	41,59±0.568	38,89±0,284	93
Yeşil çay	19,3±0.054	17,89±0.061	92
Limonata	15,13±0.109	16,14±0,036	106
Ice tea	9,19±0,075	9,85±0,006	107
Şeftali suyu	40,02±0.114	37,8±0,149	94
Portakal suyu	41,85±0.614	41,38±0,192	99
Karışık meyve suyu	38,79±0,193	36,94±0,092	95
Vişne	43,61±0,148	40,24±0,046	92
Fruko	36,71±0.079	36,38±0,109	99
Kola	7,46±0,252	6,98±0,029	93

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi biyosensör sistemi ve spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlar birbirine oldukça yakın bulunmuştur. Geri kazanım oranları % 100’e yakın olup, analizlerin örnek matris etkisinden bağımsız olarak yapılabildikleri açıktır.

5. GENEL DEĞERLENDİRME

Bu tez projesi kapsamında, üç farklı glukoz biyosensörü tasarlandı. Piranoz oksidaz (POx) ve glukoz oksidaz (GOx) enzimleri farklı immobilizasyon metodlarıyla elektrot yüzeyine immobilize edildi. Glukozun substrat olarak kullanılmasıyla biyosensör sistemleri optimize edilerek, analitik karakterizasyonları gerçekleştirildi

İlk biyosensör sisteminde piranoz oksidaz enzimi glutaraldehid aracılığıyla PAMAM ile modifiye edilmiş altın elektrot yüzeyine immobilize edildi. PAMAM'ın varlığında yüzeydeki serbest amino gruplarının sayesinde daha etkili bir immobilizasyon sağlandı. Aynı immobilizasyon yöntemi FIA elektroduna da uygulanarak FIA ile kombine edilmiş biyosensör sistemi başarıyla oluşturuldu. Kesikli sistemde yapılan optimizasyon çalışmalarına göre optimum enzim miktarı 9,4 U aktiviteye sahip enzim miktarı, optimum pH ise pH 6 sodyum fosfat tamponu olarak bulundu. Ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

İkinci biyosensör sisteminde piranoz oksidaz enzimi AuNP-(PANI)/AgCl/jelatin (nanokompozit-jelatin) matriste tutuklanarak camımsı karbon elektrodun yüzeyine immobilize edildi. Yapılan optimizasyon çalışmalarına göre optimum enzim miktarı 0,75 U aktiviteye sahip enzim miktarı optimum pH ise pH 6,5 sodyum fosfat tamponu olarak bulundu. Ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. AuNP'nin daha önce yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi daha etkin bir biyosensör sisteminin eldesinde önemli olduğu belirlendi. Son olarak biyosensör, doğal örneklerdeki glukoz miktarının analizi için kullanıldı. Biyosensörden elde edilen veriler referans metod olarak spektrofotometrik Trinder reaksiyonuna dayanan ticari glukoz deney kitlerinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. Geri kazanım oranları % 100'e yakın oldukları ve analizlerin örnek matris etkisinden bağımsız olarak yapılabildikleri belirlendi. Bilindiği gibi piranoz oksidaz enzimi fruktoza karşı cevap vermemektedir elde edilen sonuçlar da bunu desteklemektedir. Bu sayede glukoz/fruktoz şurubu içeren içeceklerde glukoz tayini, geliştirilen piranoz oksidaz biyosensörü ile de rahatlıkla yapılabilmektedir.

Üçüncü biyosensör sisteminde glukoz oksidaz enzimi öncelikle yüzeyi modifiye edilmiş manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllere kovalent olarak immobilize edildi. Elde edilen biyonanopartiküller, uygun şekildeki mıknatıs ile dizayn edilen karbon pasta elektrodun yüzeyine immobilize edildi. Yapılan optimizasyon çalışmalarına göre optimum biyonanopartikül miktarı 10 μL ve optimum pH ise pH 6 sodyum fosfat tamponu olarak belirlendi. Ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Bu sistemde immobilizasyon elektrot yüzeyine sadece manyetik etki ile gerçekleştirildiğinden herhangi bir kütle transfer sınırlaması söz konusu değildir dolayısıyla bu biyosensör sistemine ait cevap zamanının oldukça kısa olduğu belirlenmiştir. Biyosensör, aynı zamanda doğal örneklerdeki glukoz miktarının analizi için de kullanıldı. Biyosensörden elde edilen veriler referans metod olarak spektrofotometrik Trinder reaksiyonuna dayanan ticari glukoz deney kitlerinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. Geri kazanım oranları % 100' e yakın oldukları ve analizlerin örnek matris etkisinden bağımsız olarak yapılabildikleri belirlendi.

Geliştirilen biyosensör sistemlerine ait analitik karakterizasyon sonuçları Çizelge 5.1' de görülmektedir.

Sonuç olarak, nanomateryaller ile modifiye edilmiş, FIA sistemine uygulanabilen, operasyonel stabilitesi yüksek, kolay hazırlanabilen, matris etkisinden bağımsız olarak doğal örneklerdeki glukoz analizlerini gerçekleştirebilen biyosensör sistemleri tasarlanmıştır.

Çizelge 5.1 Geliştirilen biyosensör sistemlerinin analitik karakterizasyonları

Analitik Karakterizasyon	1. PAMAM temelli biyosensör sistemi	2. Nanokompozit temelli biyosensör sistemi	3. Nano-Fe₃O₄ temelli biyosensör sistemi
Kalibrasyon denklemi	$y = 3,358x + 0,028$ ($R^2=0,996$)	$y = 2,096x + 0,243$ ($R^2=0,995$)	$y = 8,366x + 1,819$ ($R^2=0,996$)
Doğrusal aralık	0,025-0,5 mM	0,05-0,75 mM	0,25-2 mM
Standart sapma	$0,3 \pm 0,011$ mM	$0,25 \pm 0,005$ mM	$2 \pm 0,051$ mM
Varyasyon Katsayısı	% 3,57 (n:7)	% 2,16 (n:6)	% 2,51 (n:10)

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Baldwin, R.P.**, 1999 Electrochemical determination of carbohydrates: Enzyme electrodes and amperometric detection in liquid chromatography and capillary electrophoresis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19: 69-81.
- Baminger, U.**, 2001, Continuous enzymatic regeneration of redox mediators used in biotransformation reactions employing flavoproteins, *J. Mol. Catal.B. Enzym*, 11: 541-550.
- Barriere, F., Kavanagh, P. and Leech, D.**, 2006, A laccase–glucose oxidase biofuel cell prototype operating in a physiological buffer, *Electrochim. Acta*, 51: 5187-5192.
- Bian, C. and Xue, G.**, 2007, Nanocomposites based on rutile-TiO₂ and polyaniline, *Materials Letters*, 61: 1299-1302.
- Carotenuto, G., Martorana, B., Perlo, P. and Nicolais L.**, 2003, A universal method for the synthesis of metal and metal sulfide clusters embedded in polymer matrices, *J. Mater. Chem.*, 13: 2927-2930.
- Chen, D.H., Liao, M.H.**, 2002, Preparation and characterization of YADH-bound magnetic nanoparticles *J. Mol. Catal. B Enzyme.*, 16: 283-291.
- Corma A.**, 1997, From microporous to mesoporous molecular sieve materials and their use in catalysis, *Chem. Rev.*, 97: 2373-2419.
- Costa-Ferreira, M.**, 2003, High ionic strength tolerance of pyranose oxidase from *Trametes versicolor* and its purification, *Process Biochem.*, 38: 1019-1023.
- Cubukcu, M., Timur, S. and Anik, U.**, 2007, Examination of performance of glassy carbon paste electrode modified with gold nanoparticle and xanthine oxidase for xanthine and hypoxanthine detection, *Talanta.*, 74: 434-439.
- Dinçkaya, E.**, 1999, Enzim Sensörleri, Biyosensörler, Ege Üniversitesi, İzmir, 81-142s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Feng, X., Liu, Y., Lu, C., Hou, W. & Zhu. J.J.**, 2006, One-step synthesis of AgCl/polyaniline core-shell composites with enhanced electroactivity, *Nanotechnology*, 17: 3578-3583.
- Fischer, M. and Vögtle, F.**, 1999, Dendrimers: From design to application, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 38: 884-905.
- Han, Y. J., Stucky, G. D. and Butler, A.**, 1999, Mesoporous silica sequestration and release of proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 9897-9898.
- Ivnitski, D., Branch, B., Atanassov, P. and Apblett, C.**, 2006, Glucose oxidase anode for biofuel cell based on direct electron transfer, *Electrochem. Commun.*, 8: 1204-1210.
- Janssen, F.W. and Ruelius, H.W.**, 1975, Pyranose oxidase from Polyporus obtusus, *Meth. Enzymol.*, 41: 170-173.
- Jena, B.K. and Raj, C.R.**, 2007, Amperometric L-Lactate biosensor based on gold nanoparticles, *Electroanalysis*, 19: 816-822.
- Karmali, A. and Oliveira, P.**, 1999, Glucose 1- and 2-oxidases from fungal strains: isolation and production of monoclonal antibodies, *J. Biotechnol.*, 69: 151-162.
- Khiew, P.S., Huang, N.M., Radiman, S. and Ahmad M.S.**, 2004, Synthesis and characterization of conducting polyaniline-coated cadmium sulphide nanocomposites in reverse microemulsion, *Mater. Lett.*, 58: 516-521.
- Kiba, N.**, 1997, Glucose Highly sensitive flow-injection determination of glucose in plasma using an immobilized pyranose oxidase and a chemiluminometric peroxidase sensor, *Anal. Chim. Acta.*, 354: 205-210.
- Lan, D., Li, B. and Zhang, Z.**, 2008, Chemiluminescence flow biosensor for glucose based on gold nanoparticle-enhanced activities of glucose oxidase and horseradish peroxidase, *Biosens. Bioelectron.*, In press.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lee, D., Lee, S.H., Char, K. and Kim, J.,** 2000, Expansion distribution of basal spacing of the silicate layers in polyaniline/Na⁺-montmorillonite nanocomposites monitored with X-ray diffraction. *Macromol. Rapid Comm.*, 21; 1136-1139.
- Leitner, C.,** 2001, Purification and characterization of pyranose oxidase from the white rot fungus *Trametes multicolor*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 3636-3644.
- Li, J. and Lin, X.,** 2007, Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in poly (o-aminophenol) film on polypyrrole-Pt nanocomposite modified glassy carbon electrode, *Anal Biosens. Bioelectron*, 22: 2898-2905.
- Liu, H., Song, C., Zhang, L., Zhang, J., H. Wang and Wilkinson D. P.,** 2006, A review of anode catalysis in the direct methanol fuel cell, *J. Power Sources.*, 155: 95-110.
- Liu, Z., Liu, J., Shen, G. and Yu, R.,** 2006, A reagentless tyrosinase biosensor based on 1,6-hexanedithiol and nano-Au self-assembled monolayers, *Anal Electroanalysis*, 18: 1572-1577.
- Liu, Z.M., Liu, Y.L., Yang, H.F., Yang, Y., Shen, G.L. and Yu, R.Q.,** 2005, Phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to modified core-shell magnetic nanoparticles supported at a carbon paste electrode, *Anal. Chim. Acta*, 533: 3-9.
- Loos, F., Reynhout, I. C., Cornelissen, J. J. L. M., Rowan, A. E. and Nolte, R. J. M.,** 2005, Construction of functional porphyrin-polystyrene nano-architectures by ATRP, *Chem. Commun.*, 1: 60-62.
- Maestre, E., Katakis, I. and Dominguez, E.,** 2001, Amperometric Flow Injection Determination of Sucrose with a mediated tri-enzyme electrode based on sucrose phosphorylase and electrocatalytic oxidation of NADH, *Biosens. Bioelectron.*, 16: 61-68.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Malhotra, B.D.**, Biosensors for clinical diagnostics industry, *Sensor Actuator B*, 9
- Mamak, M., Coombs, N. and Ozin, G. A.**, 2001, Electroactive mesoporous yttria stabilized zirconia containing platinum or nickel oxide nanoclusters: A new class of solid oxide fuel cell electrode materials, *Adv. Funct. Mater.*, 11: 59-63.
- Medine, İ.**, 2008, $^{125/131}\text{I}$ işaretli urasil'in glukuronid sentezi ve manyetik özellik kazandırılarak yeni bir manyetik ilaç taşıyıcı oluşturulması. Doktora Tezi, EÜ Nükleer Bilimler Enstitüsü, 69-72s.
- Menek, A.**, 1999, Glutasyon-S-Transferaz enziminin immobilizasyonu ve bazı özelliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, 70s.
- Nogueira, L.C.**, 2005, Separation and quantification of beer carbohydrates by high- performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection, *J. Chrom.*, 1065: 207-210.
- Olea, D., Moreau, P. and Faure, C.**, 2007, Polypyrrole–glucose oxidase biosensor. Effect of enzyme encapsulation in multilamellar vesicles on film growth and morphology, *J. Electroanal. Chem.*, 605: 125-135.
- Pan, B., Cui, D., Xu, P., Li, Q., Huang, T., He, R. and Gao, F.**, 2007, Study on interaction between gold nanorod and bovine serum albumin, *Colloids Surf.*, 295: 217-222.
- Park, J. H., Lim, Y. T., Park, O.O., Kim, J. K., Wu, J. W. and Kim, Y. C.**, 2004, Polymer/Gold nanoparticle nanocomposite light-emitting diodes: Enhancement of electroluminescence stability and quantum efficiency of blue-light-emitting polymers, *Chem. Mater.*, 16: 688-692.
- Pingarron, J.M., Yanez-Sedeno, P. and Gonzalez-Cortes, A.**, 2008, Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, *Electrochimic. Acta*, 53: 5848-5866.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ramanathan, K., Bangar, M. A., Yun, M., Chen, W., Myung, N. V. and Mulchandani, A.,** 2005, Bioaffinity sensing using biologically functionalized conducting-polymer nanowire, *J. Am. Chem. Soc.*, 127: 496-497.
- Rossi, L.M., Quach, A.D. and Rosenzweig, Z.,** 2004, Glucose oxidase-magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing, *Anal. Bioanal. Chem.*, 380: 606-613.
- Ruzicka, J. and Hansen, E.H.,** 1998, Flow Injection Analysis, 2nd ed. John Wiley & Sons, Canada, 2–13p.
- Ruzicka, J., Hansen, E. H.,** 1986, The first decade of Flow Injection Analysis: From serial assay to diagnostic tool, *Anal. Chim. Acta*, 179: 1-58.
- See, K. H., Mullins M. E., Mills, O. P. and Heiden, P. A.,** 2005, A reactive core-shell nanoparticle approach to prepare hybrid nanocomposites: Effects of processing variables, *Nanotechnology*, 16: 1950-1959.
- Shenar, R., Norsten, T. B. and Rotello, V. M.,** 2005, Polymer-mediated nanoparticle assembly: Structural control and applications, *Adv. Mater.*, 17: 657-669.
- Singh, S., Solanki, P. R., Pandey, M. K. and Malhotra, B. D.,** 2006, Covalent immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase on polyaniline films for application to cholesterol biosensor, *Anal. Chim. Acta*, 568: 126-132
- Sui, X., Chu, Y., Xing, S. and Liu, C.,** 2004, Synthesis of PANI/AgCl, PANI/BaSO₄ and PANI/TiO₂ nanocomposites in CTAB/hexanol/water reverse micelle, *Mater. Lett.*, 58: 1255-1259.
- Telefoncu, A.,** 1997, Enzimoloji, Ege Üniversitesi, İzmir, 446s
- Telefoncu, A.,** 1999, Biyosensörlere Genel Bakış, Biyosensörler, Ege Üniversitesi, İzmir, 42s.
- Timur, S.,** 2001, Pestisit tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi ve karakterizasyonu, Doktora Tezi, EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tokuhisa, H., Zhao, M., Baker, L. A., Phan, V. T., Dermody, D. L., Garcia, M. E., Peez, R. F., Crooks, R. M., Mayer, T. M.,** 1998, *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 4492-4501.
- Tomalia, D. A., Naylor, A.M. and Goddard, W.A.,** 1990, Starburst Dendrimers: Molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 29: 138-175.
- Trojanowicz, M.,** 2000, Flow Injection Analysis. Instrumentation and applications, World Scientific Publishing Co Ltd, Singapore.
- Ulman, A.,** 1991, An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir–Blodgett to Self-Assembly, Academic Press, Boston.
- Walcarius A., Despas, C., Trens, P., Hudson, M. J. and Bessiere J.,** 1998, Voltammetric in situ investigation of an MCM-41-modified carbon paste electrode-a new sensor, *J. Electroanal. Chem.* 453: 249-252.
- Wang J.,** 2001, Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges, *Electroanalysis*, 13: 983-988.
- Watson, K. J., Zhu J., Nguyen, S. T. and Mirkin, C. A.,** 2000, Redox-active polymer-nanoparticle hybrid materials, *Pure Appl. Chem.*, 72: 67-72.
- Wilson R., and Turner A. P. F.,** 1992, Glucose oxidase: an ideal enzyme, *Biosens. Bioelectron.*, 7: 165-185.
- Xu, Y. M., Ning, A. R. and Zhao J.,** 2001, Preparation and defluorination performance of activated Cerium(IV) Oxide/SiMCM-41 adsorbent in water, *J. Coll. Interf. Sci.*, 235: 66-69.
- Yan W., Feng X., Chen X., Hou W. and Zhu J. J.,** 2008, A super highly sensitive glucose biosensor based on Au nanoparticles–AgCl@polyaniline hybrid material, *Biosens. Bioelectron.*, 23: 925-931.
- Yin, F., Ryu, K. Y., Shin, H. K. and Kwon, Y. S.,** 2007, Study of glucose oxidase-l-a-lecithin Langmuir film formation on air–water interface, *Curr. Appl. Phys.*, 7: 490-495.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yoon, H. C. and Kim, H. S.,** 2000, Multilayered assembly of dendrimers with enzymes on gold: Thickness-controlled biosensing interface, *Anal. Chem.*, 72: 922-926.
- Zhang, Z.E., A.,** 1996, A glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized o-aminophenol film on platinized glassy carbon electrode, *Anal. Chem.*, 68: 1632-1639.
- Zhao, M., Tokuhisa, H., Crooks, R. M.,** 1997, Molecule-sized gates based on surface-confined dendrimers, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 36: 2596-2598.

ÖZGEÇMİŞ

ÇAĞLAR ÖZDEMİR

Arda Mh. Üçel (3219) Sk. No:3/2 Manisa
(554) 333 88 23 ---- (236) 234 85 60
caglar.ozdemir@yahoo.com

Doğum Yeri : MANİSA
Doğum Tarihi : 19.05.1984
Askerlik Durumu : Tecilli (2011)
Medeni Durum : Bekar

Eğitim

2008 - Devam Ege Üniversitesi, İzmir Biyokimya A.B.D
(Y.Lisans)
Ekim-Aralık 2009 (3 Ay) University of Applied Sciences Jena,
Jena/Almanya (Y.Lisans tez çalışması)
2003 - 2008 Ege Üniversitesi, İzmir Biyokimya (Lisans)
1999 - 2002 Manisa Lisesi, Manisa

İş Deneyimleri

Ekim 2008 - Ekim 2009 Taylan Gıda San. Ltd.Şti, Manisa
Mesul Müdür
Haziran - Eylül 2006 Özsüt-Özgürsüt Süt Ürünleri, Manisa
Kalite Kontrol
Ocak - Nisan 2006 TNS Piar Araştırma, Manisa
Anketör
Haziran - Eylül 2005 Türkiz Otel, Mersin
Tanıtım ve Satış Görevlisi
Haziran-Eylül 1998-2004 Doğanlar Ltd.Şti, – Manisa
(yaz dönemleri) Satış Görevlisi

Staj Yeditepe Üniversitesi Nanobiyoteknoloji
laboratuvarı, 2007, İstanbul

Bilgisayar Bilgisi	Windows XP, MS Word, MS Excel, MS PowerPoint.
Dil bilgisi	İngilizce (İyi Seviyede), Almanca (Temel Seviyede).
Kişisel Özellikler	Sorumluluk sahibi, çalışkan, araştırmacı, yeniliklere açık, dürüst, sabırlı, takım çalışmasına yatkın

Seminer ve Kurslar

- **Marka Yönetim Süreci (Başarılı Markalar Yaratmak),** Ü.E.M.T.E.M., 08.09.2006 (7 saat)
- **Temel Kalibrasyon,** Ü.E.M.T.E.M., 11.09.2006 (7 saat)
- **TS-EN İSO 14001:2004 Çevre Yönetim Sistemi,** Ü.E.M.T.E.M., 20-21.09.2006 (14 saat)
- **Sözsüz İletişim(Beden Dili),** Ü.E.M.T.E.M. , 07.10.2006 (7 saat)
- **NLP (Beyin Dili Programı),** Ü.E.M.T.E.M. , 29.04.2007 (7 saat)
- **Windows XP – Office XP ,** Ü.E.M.T.E.M , 01.10.2007-10.11.2007 (Kurs-100 saat)
- **Zaman Yönetimi,** Ü.E.M.T.E.M , 27.06.2008 (7 saat)
- **TS-EN ISO 22000 Güvenli Gıda Yönetim Sistemi ,** Ü.E.M.T.E.M, 16.02.2009 (7 saat)
- **OHSAS 18001 İş Sağlığı ve Güvenliği İç Denetçisi,** Ü.E.M.T.E.M, 25-26.02.2009 (14 saat)
- **Etkili Sunuş Teknikleri,** Ü.E.M.T.E.M, 21.04.09 (6 saat)

Etkinlikler

- TEMA vakfı gönüllü üyeliği, 2004
- Ege Üniversitesi Fotoğraf Topluluğu, 2005
- Kimyagerler Derneği üyeliği, 2008

İlgi Alanları

- Biyoteknoloji, Biyosensörler, Nanoteknoloji.

Uluslararası Science Citation Index ve Social Science Citation Index'ce taranan dergilerde yayınlanmış makaleleri

- **Cağlar ÖZDEMİR**, Fatma YENİ, Dilek ODACI, Suna TİMUR, 2009, *Food Chemistry*, 119: 380-385, Electrochemical Glucose Biosensing by Pyranose Oxidase Immobilized in Gold nanoparticle-Polyaniline/AgCl/Gelatin Nanocomposite matrix, *Food Chemistry*, Kabul edildi.

Bilimsel toplantılarda yayınlanmış bildirileri

Ulusal;

- **Çağlar ÖZDEMİR**, Baran GÜLSÜNOĞLU, Dilek ODACI, Walter VASTARELLA, Roberto PILLOTTON, Karbohidrat analizine yönelik ince film biyosensörleri, XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 28-31 Ekim 2007, ANTALYA.
- Baran GÜLSÜNOĞLU, **Çağlar ÖZDEMİR**, Dilek ODACI, Suna TİMUR, Selektif kafeik asit tayinine yönelik karbon nanotüp modifiye enzim elektrotlarının hazırlanması, XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 28-31 Ekim 2007, ANTALYA.
- Dilek ODACI, **Çağlar ÖZDEMİR**, Fatma YENİ, Suna TİMUR, Glukoz analizine yönelik piranoz oksidaz ve nanopartikül ile modifiye ince film sensörlerin geliştirilmesi, XIII. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı (BİYOMUT), 29-31 Mayıs 2008, ANKARA.(SÖZLÜ SUNUM)
- **Çağlar ÖZDEMİR**, Dilek ODACI, Suna TİMUR, Farklı nanomalzemeler ile glukoz biyosensörlerinin hazırlanması, 16-20 Haziran 2009, SİVAS (SÖZLÜ SUNUM).
- Caner GEYİK, Mehriban AKIN, Merve YÜKSEL, **Çağlar ÖZDEMİR**, Dilek ODACI, Suna TİMUR, Alkol oksidaz biyosensörünün hazırlanması ve akışa enjeksiyon analize (FIA) yönelik uygulamaları, 16-20 Haziran 2009, SİVAS (SÖZLÜ SUNUM).
- Merve YÜKSEL, Mehriban AKIN, Caner GEYİK, **Çağlar ÖZDEMİR**, Dilek GELEN, Dilek ODACI, Suna TİMUR, Poliamidoamin (PAMAM)/sisteamin modifiye altın elektrodu temel alan alkol oksidaz biyosensörü ve karakterizasyonu, 16-20 Haziran 2009, SİVAS.
- Sinem SUNGUR, Murat KARADAĞ, Caner GEYİK, **Çağlar ÖZDEMİR**, Dilek ODACI, Suna TİMUR, 6-(ferrosenil)hegzantiyol

ve PAMAM (Poliamidoamin) dendrimerleriyle modifiye ikinci nesil glukoz oksidaz (GOX) biyosensörü, 16-20 Haziran 2009, SİVAS.

Uluslararası;

- **Caglar OZDEMİR**, Fatma YENİ, Dilek ODACI, Suna TIMUR, Electrochemical glucose biosensing by pyranose oxidase immobilized in au-nanoparticle/agcl @ polyaniline-gelatin hybrid material, International Enzyme Engineering Symposium, 1-5 October 2008, Kusadası-Aydın, TURKIYE.
- Dilek ODACI, **Caglar OZDEMİR**, Fatma YENİ, Suna TIMUR, Glucose biosensing by pyranose oxidase biosensors modified with nanoparticles, International Enzyme Engineering Symposium, 1-5 October 2008, Kusadası-Aydın, TURKIYE.
- **Caglar OZDEMİR**, Ozlet AKCA, E.İlker MEDİNE, Perihan UNAK, Suna TIMUR, Glucose Biosensors Using Modified Core–Shell Magnetic Nanoparticles Supported on Carbon Paste Electrode, Conference on Nanomaterials and Nanosystems - (Nanomats2009), 10-13 Ağustos 2009, İstanbul/TURKIYE

Tezler

Lisans;

- İnce film biyosensörlerin karbohidrat analizinde kullanılabilirlikleri ve nanopartikül etkisinin sensör performansları üzerine etkilerinin incelenmesi. (Tamamlandı – Tübitak tarafından 2209 nolu program kapsamında desteklenmiştir.)

Y. Lisans;

- Farklı nanomalzemeler ile glukoz biyosensörlerinin hazırlanması ve uygulama potansiyellerinin araştırılması.

Görev aldığı araştırma projeleri

- İnce film biyosensörlerin karbohidrat analizinde kullanılabilirlikleri ve nanopartikül etkisinin sensör performansları üzerine etkilerinin incelenmesi – TÜBİTAK 2209 No' lu Öğrenci Projesi (Yürütücü-2008-tamamlandı).
- 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) 2009- Devam ediyor