

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**FERROSEN TÜREVİNİ TEMEL ALAN
ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR SİSTEMİNİN
HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI**

Övgü YILMAZ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ali KILINÇ

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Suna TİMUR

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 405.05.01

Sunuş Tarihi: 17.05. 2012

Bornova-İZMİR

2012

Övgü YILMAZ tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak sunulan “**Ferrosen Türevini Temel Alan Elektrokimyasal Biyosensör Sisteminin Hazırlanması ve Uygulanması**” 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 17 / 05 / 2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybilgi/ oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı :

Raportör Üye :

Üye :

ÖZET

FERROSEN TÜREVİNİ TEMEL ALAN ELEKTROKİYASAL BİYOSENSÖR SİSTEMİNİN HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI

YILMAZ, Övgü

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ali KILINÇ

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Suna TİMUR

Mayıs 2012, 69 sayfa

Kitosan-ferrosen (CHIT-Fc) hibriti kovalent bağlanmayla sentezlenmiş ve immobilize edilmiş hibritin elektrokimyasal özellikleri döngüsel voltametri kullanılarak belirlenmiştir. Hibrit film için $E^0 = +0,35$ V'ta (Ag/AgCl'ye göre) tersinir redoks piki tespit edilmiştir. CHIT matrisinde bulunan Fc molekülleri elektrokimyasal aktivitesini sürdürebilmiş ve matristen akmamıştır. Sentezlenen redoks aktif film daha sonra glukoz oksidazın (GOx) ve *Gluconobacter oxydans* hücrelerinin immobilizasyonu için destek materyal olarak kullanılmıştır. GOx ve *G. oxydans* hücreleri glutaraldehit vasıtasıyla camımsı karbon elektrot (GCE) yüzeyinde bulunan CHIT-Fc'ye immobilize edilmiştir. GOx ve *G. oxydans* biyosensörünün hazırlanma ve çalışma koşulları optimize edildikten sonra akışa enjeksiyonlu analiz (FIA) sistemi ile glukoz için analitik karakterizasyonları yapılmıştır. Optimum koşullarda hazırlanan biyosensörler geniş lineer aralığa sahiptir. Enzim biyosensörünün lineer aralığı 2,0-16,0 mM, mikrobiyal biyosensörün ise 1,5-25 mM'dır. Ayrıca FIA sisteminde ölçülen iki biyosensörün de cevap süreleri göreceli olarak kısadır. Biyosensörler iyi tekrarlanabilirliğe ve kararlılığa sahiptir. CHIT-Fc'nin enzim ve yaşayan hücreler için biyouyumlu bir mikro çevre ve elektron transferi için iletken bir yol sağladığı belirlenmiştir.

Bunların dışında, GOx ve *G. oxydans* biyosensörünün FIA sistemi ile birleştirilmesinin otomasyona uygunluk ve düşük maliyetle yüksek işlem hacmi gibi avantajları vardır. CHIT-Fc redoks hibriti daha etkin biyosensör sistemlerinin tasarlanması amacıyla başka enzimler ve biyomoleküller için immobilizasyon matrisi olarak kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: Biyosensör, FIA, Ferrosen, Kitosan, Yüzey modifikasyonu

ABSTRACT**FABRICATION OF AN ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR SYSTEM
BASED ON A FERROCENE DERIVATIVE AND ITS APPLICATIONS**

YILMAZ, Övgü

MSc in Biochemistry

Supervisor: Assoc. Dr. Ali KILINÇ

Co-Supervisor: Prof. Dr. Suna TİMUR

May 2012, 69 pages

Chitosan-ferrocene (CHIT-Fc) hybrid was synthesized through covalent modification and its electrochemical properties in immobilized form were studied by using cyclic voltammetry. The hybrid film exhibited a reversible redox peak at $E^{\circ} = +0.35$ V vs. Ag/AgCl. The Fc in CHIT matrix retained its electrocatalytic activity and did not diffuse from the matrix. This redox-active hybrid was further employed as a support for the immobilization of glucose oxidase (GOx) and whole cells of *Gluconobacter oxydans* using glutaraldehyde on a glassy carbon electrode (GCE). The experimental conditions were optimized and the analytical characteristics of enzyme and microbial biosensors were evaluated using glucose substrate via flow injection analysis (FIA) system. Under optimized conditions, the current responses of both enzyme and microbial biosensors exhibited wide linear ranges for glucose from 2.0 to 16.0 mM and from 1.5 to 25.0 mM, respectively. Moreover, both biosensors have the advantages of relatively fast response times, good reproducibility and stability in FI mode. It was demonstrated that CHIT-Fc provides a biocompatible microenvironment for enzyme and whole cells and conductive pathway of electron transfer.

Additionally, integration of the enzyme and microbial biosensors into FIA system has several advantages including capability of automation and high throughput at low cost. This redox hybrid can be utilized as an immobilizing matrix for other enzymes and biomolecules in the biosensors systems.

Keywords: Biosensor, FIA, Ferrocene, Chitosan, Surface modification

TEŞEKKÜR

Bu çalışma kapsamında değerli görüşlerini ve deneyimlerini benden esirgemeyen danışmalarım Doç. Dr. Ali Kılınç'a ve Prof. Dr. Suna Timur'a, desteklerinden dolayı Prof. Dr. Bekir Çetinkaya'ya, bu aşamaya gelmemde yardımlarını gördüğüm tüm hocamlarıma ve ayrıca Dr. Dilek Odacı Demirkol'a, Dr. Süleyman Gülcemal'e ve Biyosensör Laboratuvarı'ndaki çalışma arkadaşlarıma, çalışmanın makale haline getirilmesinde önemli katkıları olan teyzem Biyokimya Uzmanı Dr. Dilek Erdener'e ve beni her konuda destekleyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyosensörler	1
1.1.1. Dönüştürücülerine göre biyosensörler	1
1.1.2. Biyolojik bileşenine göre biyosensörler	4
1.2. Akışa Enjeksiyonlu Analiz (Flow Injection Analysis-FIA)	20
2. MATERYAL VE METOT	23
2.1. Materyal	23
2.2. Cihazlar ve Sistemler	23
2.3. Metot	25
2.4. CHIT-Fc Hibritlerinin Sentezi	25
2.5. <i>Gluconobacter oxydans</i> hücreleri için kültürasyon koşulları	25
2.6. Biyosensörlerin Hazırlanması	26
2.6.1. Camımsı karbon elektrot (GCE) yüzeyinin temizlenmesi	26
2.6.2. CHIT-Fc çözeltisinin hazırlanması	26
2.6.3. CHIT-Fc/GOx biyosensörünün hazırlanması	26
2.6.4. CHIT-Fc/ <i>G. oxydans</i> biyosensörün hazırlanması	27
2.7. Ölçüm Prensibi	28
2.7.1. CHIT-Fc/GOx biyosensörünün ölçüm prensibi	29
2.7.2. CHIT-Fc/ <i>G. oxydans</i> biyosensörünün ölçüm prensibi	30
2.8. Trinder Metodu ile Glukoz Tayini	31
2.9. CHIT-Fc'ye Yönelik Çalışmalar	31
2.9.1. CHIT-Fc'nin karakterizasyonu	31
2.9.2. CHIT-Fc filminin elektrokimyasal karakterizasyonu	32

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.10. CHIT-Fc/GOx Biyosensörüne Yönelik Çalışmalar	32
2.10.1. Optimum pH'ın belirlenmesi	32
2.10.2. Enzim miktarının biyosensör cevabına etkisi	32
2.10.3. Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi	33
2.10.4. CHIT-Fc /GOx biyosensörünün karakterizasyonu	33
2.10.5. Örneklerde glukoz analizi	34
2.11. CHIT-Fc/G. <i>oxydans</i> Biyosensörüne Yönelik Çalışmalar	34
2.11.1. Optimum pH'nın belirlenmesi	35
2.11.2. Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisi	35
2.11.3. Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi	35
2.11.4. CHIT-Fc/G. <i>oxydans</i> biyosensörünün karakterizasyonu	36
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	37
3.1. CHIT-Fc'ye İlişkin Bulgular	37
3.1.1. CHIT-Fc'nin karakterizasyonu	38
3.1.2. CHIT-Fc filminin elektrokimyasal karakterizasyonu	40
3.2. CHIT-Fc/GOx Biyosensörüne İlişkin Bulgular	42
3.2.1. Optimizasyon çalışmaları	42
3.2.2. Analitik karakterizasyon	46
3.2.3. Örnek uygulama	48
3.3. CHIT-Fc/G. <i>oxydans</i> Biyosensörüne İlişkin Bulgular	49
3.3.1. Optimizasyon çalışmaları	50
3.3.2. Analitik karakterizasyon	53
4. GENEL DEĞERLENDİRME	56
KAYNAKLAR DİZİNİ	58
ÖZGEÇMİŞ	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi.	1
1.2. Amperometrik enzim biyosensörlerinin sınıflandırılması.	6
1.3. Bazı inorganik redoks medyatör örnekleri.	9
1.4. Bazı ferrosen modifikasyonları.	11
1.5. Yaygın olarak kullanılan immobilizasyon yöntemleri.	13
1.6. <i>G. oxydans</i> hücrelerinin SEM görüntüsü.	17
1.7. <i>Gluconobacter</i> cinsinde şeker ve alkoller okside eden enzim sistemleri.	18
1.8. Çoklu Örnek Analizine Uygun FIA Sistemi.	22
2.1. FIA temelli biyosensör sisteminin şematik gösterimi.	24
2.2. Biyosensörlerin hazırlanma aşamaları.	28
2.3. Akış hücresi.	29
3.1. CHIT-Fc türevinin sentezi.	38
3.2. CHIT-Fc'nin ¹ H NMR spektrumu.	39
3.3. CHIT-Fc, CHIT ve Fc-CHO'nun FT-IR spektrumu.	40
3.4. CHIT-Fc/Glutaraldehit modifiye elektrodun sodyum asetat tamponunda (50 mM, pH 5,5) 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 mV s ⁻¹ tarama hızlarındaki döngüsel voltamogramları.	41
3.5. Akım değerleri ile tarama hızının karekökü arasındaki ilişkiyi gösteren grafik.	41
3.6. Biyosensör cevabına pH'ın etkisi.	43
3.7. Enzim miktarının biyosensör cevabına etkisi.	44
3.8. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabına etkisi.	45
3.9. Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon eğrisi.	46
3.10. FIA'da tekrarlı enjeksiyonlar sonrasında alınan akım cevapları.	47
3.11. Farklı günlerde hazırlanan CHIT-Fc/GOx biyosensörlerinin kalibrasyon grafikleri.	48
3.12. Biyosensör cevabına pH'ın etkisi.	51
3.13. Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisi.	52
3.14. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabına etkisi.	53
3.15. Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon eğrisi.	54
3.16. FIA'da tekrarlı enjeksiyonlar sonrasında alınan akım cevapları.	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

1.1. Amperometrik biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan bazı enzimler.....	5
2.1. <i>G. oxydans</i> hücreleri için ön kültür ve büyüme ortamı kompozisyonları.....	26
3.1. CHIT-Fc/GOx biyosensörü ve Trinder yöntemi kullanılarak yapılan örnek uygulama.....	49
4.1. Geliştirilen biyosensörlerden elde edilen sonuçların genel gösterimi.	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
mM	Milimolar
g	Gram
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
V	Volt
mV	Milivolt
I	Akım
μ A	Mikroamper
nA	Nanoamper
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
SS	Standart sapma
VK	Varyasyon katsayısı
CV	Döngüsel voltametri
GOx	Glukoz oksidaz
FAD	Flavin adenin dinükleotit (kinon formu)
FADH ₂	Flavin adenin dinükleotit (hidrokinon formu)
TCNQ	Tetrasiyanokinodimetan
TFF	Tetratiafulvalen
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
K_m	Michaelis sabiti
V_{max}	Maksimum hız
GDH	Glukoz dehidrogenaz
XO	Ksantin oksidaz

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
ATP	Adenozin trifosfat
Q ₁₀	Ubikinon-10
Cyt. <i>o</i>	o tipinde sitokrom
Cyt. <i>c</i>	c tipinde sitokrom
PQQ	Pirolokinolin kinon
FIA	Akışa enjeksiyonlu analiz
CHIT	Kitosan
Fc	Ferrosen
NaCNBH ₃	Sodyum siyanoborhidrür
FC-CHO	Ferrosenkarbaldehit
δ	Kimyasal kayma
DS	Bağlanma derecesi
FT-IR-ATR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi/Tam Yansıma Spektroskopisi
NMR	Nükleer manyetik rezonans
ICP-MS	Endüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi
GCE	Camımsı karbon elektrot
GlcN	Glukozamin
D ₂ O	Döteryum oksit
CF ₃ COOD	Döterotrifloroasetik asit
Cp	Siklopentadienil
E ^{o'}	Formal potansiyel

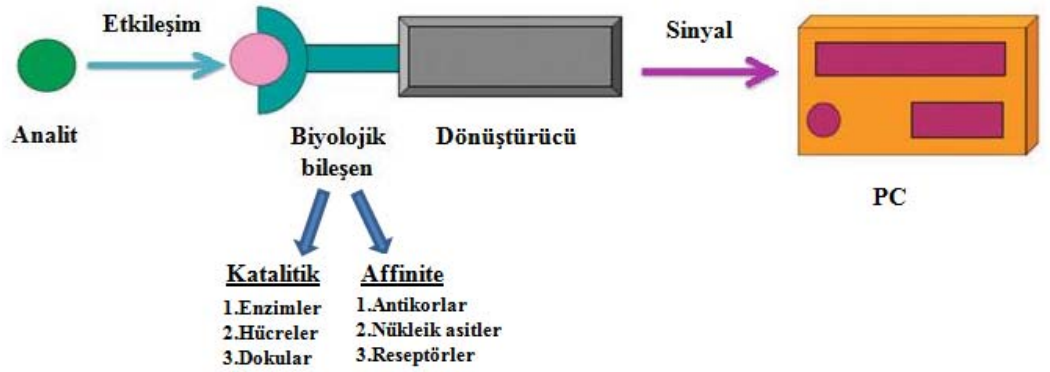
1. GİRİŞ

Bu bölümde biyosensörler ve akışa enjeksiyonlu analiz (FIA) sistemi hakkında genel bilgi verilmiştir.

1.1.Biyosensörler

Biyosensörler yüzeye immobilize edilmiş biyolojik sistemler ve bu sistemlerden gelen bilgiyi ölçülebilir bir sinyale dönüştüren cihazlardan oluşur (Şekil 1.1). Biyolojik bileşen sayesinde belirli bir analite veya analitlere bağlı olarak seçici cevap alınır ve böylece girişim etkisi en aza indirgenir. Biyosensörlerin içerdiği biyolojik bileşenler, seçici olarak hedef analitle reaksiyona girer ve analit konsantrasyonuna bağlı olarak elektriksel sinyal oluştururlar.

Dönüştürücünün temel görevi, analit ile biyolojik olarak aktif materyal arasındaki etkileşim nedeniyle meydana gelen fizikokimyasal değişiklikleri sinyale dönüştürmektir.



Şekil 1.1. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi.

1.1.1.Dönüştürücülerine göre biyosensörler

Kullanılan dönüştürücünün çeşidine bağlı olarak biyosensörler; optik, kalorimetrik, piezoelektrik ve elektrokimyasal biyosensörler olarak dörde ayrılırlar (Chaubey and Malhotra, 2002).

Optik biyosensörler

Optik biyosensörler biyolojik reaksiyon sonucunda oluşan lüminesan, floresan, kolorimetrik veya diğer optik sinyallerin ölçülmesi ilkesine dayanır. Optik algılama yöntemleri genellikle birden çok analitin aynı anda incelenmesini gerektiren biyosensörlerde kullanılır (Brogan and Walt, 2005).

Kalorimetrik (Termal) biyosensörler

Kalorimetrik biyosensörler, analitin ve uygun enzimin arasındaki ekzotermik reaksiyon sonucunda açığa çıkan ısı sayesinde analiti saptar. Çoğu biyolojik reaksiyon ekzotermik olduğundan (örneğin, enzim reaksiyonları) kalorimetrik tayin için tek bir dönüştürücü formatı kullanılır. Bu tip biyosensörlerde karşılaşılan en büyük sorun ortamın sıcaklığının değişmesidir. Bu değişikliklerden biyosensörün etkilenmemesi gerekmektedir (Griffin and Stratis-Cullum, 2009). Eskiden büyük hacimli olan kalorimetrik biyosensörler, silikon mikrofabrikasyonu teknolojileri ve mikrofluidikler sayesinde hem daha küçülmüş, hem de biyosensörlerin performansları artmıştır (Xie et al., 1992).

Piezoelektrik biyosensörler

Hedef molekül ile biyolojik tanıma elementi arasındaki etkileşimler nedeniyle meydana gelen kütle değişimini algılayabilen biyosensörler piezoelektrik dönüştürücüler ile saptanır. Bu tip dönüştürücüler, mekanik strese bağlı olarak oluşan elektriksel yükün tayinini sağlarlar. Mekanik değişimlerin nedeni biyolojik tanıma elementinin yüzeye bağlanmasıdır. Böylece, piezoelektrik cihazında kütle değişimi meydana gelir. Piezoelektrik biyosensörlerinde yüzeye bağlanma miktarı etiketleme yapılmaksızın ölçülebilir (Chaubey and Malhotra, 2002).

Bu üç tip biyosensörün bazı dezavantajları vardır. Örneğin, optik biyosensörler çok hassas olmalarına rağmen bulanık ortamlarda kullanılamazlar. Termal biyosensörler çok az bir ısı değişimine bile duyarlı olduklarından, bu tip sistemlerden yararlanamazlar. Ayrıca, kullanımları zordur. Bunların yanında, elektrokimyasal biyosensörler en çok kullanılan biyosensörlerdir. Diğer tip biyosensörlerin kullanımını zorlaştıran sorunlara elektrokimyasal biyosensörlerde rastlanmaz. Bu tip biyosensörler, hızlı, kolay kullanılabilir ve düşük maliyetlidirler (Chaubey and Malhotra, 2002).

Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler en sık rastlanan biyosensör çeşididir. Biyoetkileşim esnasında gerçekleşen reaksiyonda, elektrokimyasal olarak ölçülebilir bir akım (amperometri), ölçülebilir bir yük yığını veya potansiyel (potansiyometri) değişimleri veya elektrotlar arasındaki ortamın iletkenliğinde değişimler (kondüktometri) oluşur. Bu değişimler ise elektrokimyasal bir detektör ile ölçülür (Grieshaber et al., 2008). Bu tip biyosensörler bulanık ortamlarda bile çalışırlar, enstrümental olarak hassastırlar ve minyatürizasyon için uygundurlar.

Tayin edilecek elektrokimyasal özelliğe göre, elektrokimyasal biyosensörler üç ana gruba ayrılırlar: kondüktometrik, potansiyometrik ve amperometrik biyosensörler (Chaubey and Malhotra, 2002).

A. Kondüktometrik biyosensörler:

Kondüktometrik biyosensörler, biyokimyasal reaksiyon nedeniyle örnek çözeltide veya ortamda oluşan elektriksel iletkenlikteki değişimleri tespit eder. Tayin, yönetimin moduna göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler (Skoog et al., 2007).

B. Potansiyometrik biyosensörler:

Potansiyometrik biyosensörler ihmal edilebilir akım altında, elektrokimyasal hücredeki potansiyelin ölçülmesi prensibine dayanır. Denge koşullarında çalışırlar ve elektrot yüzeyindeki seçici bağlanma ile oluşan yük yığını tayin ederler. Cam pH elektrotu ve K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- gibi iyonları kompleks ortamlarda bile tayin edebilen iyon seçici elektrotlar örnek olarak verilebilir (Skoog et al., 2007).

C. Amperometrik biyosensörler:

Amperometrik biyosensörler, elektrokimyasal reaksiyon sırasında, türlerin indirgenme veya yükseltgenmesiyle oluşan akım değişikliklerini ölçerler. Ölçüm sırasında çalışma elektrotuna (referans elektrotuna göre) sabit bir potansiyel uygulanır. Amperometrik tekniklerde, ölçülen akım örnekteki elektroaktif türlerin konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. Amperometride potansiyel direkt olarak istenilen değere getirilebilir ve oluşan akım ölçülür veya potansiyel istenilen değerde sabit kalır. Amperometrik biyosensörler diğer tekniklerden daha fazla

seçiciliğe sahiptirler çünkü indirgenme veya yükseltgenme reaksiyonu sırasında uygulanan potansiyel, analit türlerine özgüdür (Chaubey and Malhotra, 2002).

Amperometrik tayin, basit olma özelliğine ve düşük belirtme sınırına sahip olduğu için genellikle biyokatalitik veya afinite sensörlerinde kullanılır. Amperometrik tayin sırasında uygulanan sabit potansiyel ihmal edilir bir yükleme akımına (sisteme potansiyel uygulamak için gerekli olan akım) neden olur. Bu sayede, belirtme sınırını olumsuz etkileyen arka plan sinyali de en aza indirgenmiş olur (Ronkainen et al., 2010).

1.1.2. Biyolojik bileşenine göre biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler biyolojik bileşenine göre biyokatalitik sensörler ve afinite biyosensörleri olarak ikiye ayrılırlar.

1.1.2.1. Biyokatalitik sensörler

Biyokatalitik sensörler, enzimleri, hücreleri veya doku dilimlerini içerirler.

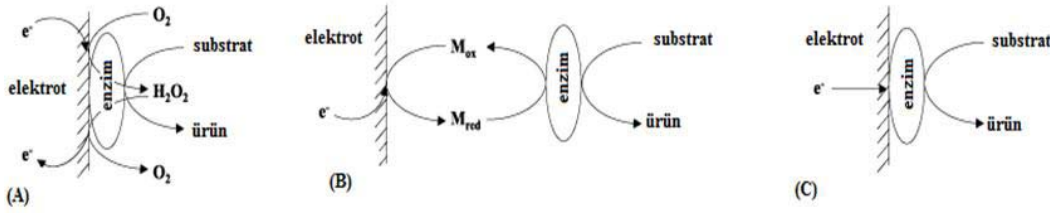
Enzim temelli elektrotlara genel bakış

Enzim elektrotları, çalışma elektrotu yüzeyine ince bir tabaka halinde enzim immobilize edilmiş elektrokimyasal problardır (Wang, 1995). Enzim, enzim elektrotlarının en önemli bileşenidir çünkü sensörün seçiciliği ona bağlıdır ve tayin için gerekli olan elektroaktif ürünün oluşumunu katalizler (Wang, 2001). Elektroaktif ürün, uygulanan sabit potansiyele bağlı olarak akımın ölçülmesiyle yani amperometri ile direkt olarak izlenebilir. Çizelge 1.1’de amperometrik biyosensörlerin hazırlanmasında biyobileşen olarak kullanılan bazı enzimler verilmiştir. İmmobilize edilmiş olan enzimin aktivitesi, çözeltinin özelliklerine ve elektrot tasarımına bağlıdır. Hızlı gerçekleşen enzim katalizi, biyosensörlerde genellikle belirgin sinyal artışına neden olur. Enzimlerin raf ömrü ve kararlılığı biyosensörlerin ömrünü belirler. Enzim biyosensörlerinin; kolay ve düşük maliyetle hazırlanabilmesi, hızlı tayin edebilme, kolay rejenere olma ve tekrar kullanılabilmesi gibi özelliklerinden dolayı kullanımı gitgide artmaktadır.

Çizelge 1.1. Amperometrik biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan bazı enzimler.

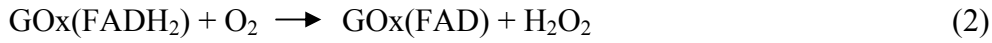
Enzim	Substrat	Referans
Glukoz oksidaz	Glukoz	(Parra-Alfambra et al., 2011)
Laktat oksidaz	Laktat	(Romero et al., 2008)
Peroksidaz	H ₂ O ₂	(Mathebe et al., 2004)
Kolin oksidaz	Kolin	(Shi et al., 2006)
Üreaz	Üre	(Soldatkin et al., 2000)
Alkol oksidaz	Etanol, metanol, formaldehid	(Akin et al., 2010)
Alkol dehidrogenaz	Alkol	(Manso et al., 2008)
Lakkaz	Fenolik bileşikler	(Odaci et al., 2007)
Glutatiyon redüktaz	İndirgenmiş glutatiyon	(Timur et al., 2008)
Tirozinaz	Fenolik bileşikler	(Zhang et al., 2003)
Piranoz oksidaz	Piran halkasına sahip şekerler	(Ozdemir et al., 2010)
Glutaminaz	Glutamin	(Cattaneo and Luong, 2004)

Enzim temelli biyosensörler üçe ayrılır. Birinci nesil biyosensörler, oksijen, ikinci nesil biyosensörler, medyatör temellidir. Üçüncü nesil biyosensörlerin diğer adı direkt olarak birleşmiş enzim elektrotlarıdır. Amperometrik enzim biyosensörlerinin sınıflandırılması Şekil 1.2’de gösterilmiştir. 1950’lili yıllarda enzim elektrodunu ilk kez tasarlayan bilim adamları Clark ve Lyons’tur. Clark ve Lyons’ın bu başarısı, glukoz oksidaz (GOx) ile kaplanmış elektrotların glukoz tayininde yaygın olarak kullanılmasına öncülük etmiştir (Clark and Lyons, 1962). Bu amperometrik sensörler birinci nesil biyosensörler veya Clark oksijen elektrotları şeklinde adlandırılır. Daha sonra, Updike ve Hicks glukoz tayininde kullanmak üzere ilk fonksiyonel biyokatalitik sensörü geliştirmiştir (Updike and Hicks, 1967). Birinci nesil biyosensörler, genellikle bir oksidaz enziminin Pt elektroduna, yarı geçirgen bir membran yardımıyla immobilize edilmesiyle meydana gelir. Bu tip elektrotlarda, Pt katottur ve O₂’nin indirgendiği yerdir. Ag ise anottur (Chaubey and Malhotra, 2002).



Şekil 1.2. Amperometrik enzim biyosensörlerinin sınıflandırılması. 1. nesil (A), 2. nesil (B), 3. nesil (C).

GOx; kolay bulunabilen, ucuz ve kararlı yapıda bir enzimdir. *Aspergillus niger*'den izole edilir ve biyosensör uygulamalarında ve endüstriyel işlemlerde kullanılan önemli bir enzimdir. GOx, β-D-glukoza spesifiktir ve glukoz tayini aşağıdaki reaksiyonlarla gerçekleşmektedir (Bankar et al., 2009; Wang, 2008):

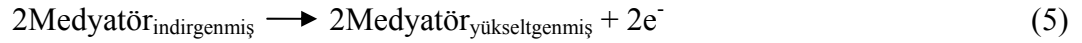


Denklem (1)'de enzimin prostetik grubu olan FAD indirgenir ve glukoz glukonolaktona yükseltgenir. O₂ molekülü kofaktördür ve yükseltgeyici ajan olarak görev alır ve H₂O₂ molekülünü üretir (denklem (2)). Çalışma elektrotunda, H₂O₂'nin yükseltgenmesi sırasında iki elektron direkt olarak elektrota aktarılır (denklem (3)). Bu şekilde, enzim elektrotunda akım cevabı meydana gelir. Bu tip birinci nesil biyosensörler, -0,7 V potansiyel uygulaması altında biyokatalitik reaksiyon sonucu katottaki O₂ tüketimini veya +0,65 V potansiyel uygulaması altında H₂O₂'nin biyokatalitik olarak üretimini incelerler (Dzyadevych et al., 2008). Bu nedenle, O₂'nin indirgenme hızı, oksijenin yığın çözeltiden difüzyon hızına yani yığın çözeltideki oksijen konsantrasyonuna bağlıdır. Eğer enzimin ideal bir şekilde çalışması isteniyorsa, ortamdaki oksijenin yeterli ve sabit miktarda olması gereklidir. Fakat oksijen sulu ortamda yeterince çözünür değildir ve çözünmüş oksijen miktarı farklılıklar gösterebilir. Böylece, ortamda analit varken oluşan akım cevapları kısıtlanır ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilemez (Ronkainen et al., 2010).

Enzimler ve elektrotlar arasındaki direkt gerçekleşen redoks reaksiyonlarına nadir olarak rastlanır çünkü çoğu protein elektrot yüzeyinde denatüre olmaya eğilimlidir ve direkt elektron transfer reaksiyonları yavaş ve tek yönlüdür. Bunun

dışında, enzimin analiti seçici olarak hedefleyen aktif bölgesi, enzimin tersiyer yapısının içine, proteinin merkezine gömülmüştür. Bu nedenle, enzim ile katalizlenen reaksiyonla oluşan elektronlar kolayca ve hızlı olarak elektrot yüzeyine transfer edilemezler. Başka bir deyişle, enzim ile dönüştürücü arasındaki elektriksel iletkenlik kısıtlanmış olur. Elektronların dönüştürücüye olan transferi sırasında enzimlere yardım gerekmektedir.

Birinci nesil biyosensörlerde karşılaşılan bu problemler, medyatör adı verilen yapay elektron taşıyıcı ajanlarla çözülebilir. Medyatörler, biyolojik bileşenle beraber redoks reaksiyonlarına katılırlar ve hızlı elektron transferini sağlarlar. Düşük moleküler ağırlığa sahip bu redoks çiftleri, enzimin redoks merkezinden gelen elektronları elektrotta taşırlar. Medyatörler, O₂ molekülünün yaptığı görevi üstlenirler ve glukoz sensörlerinde elektron taşıyıcısı (denklem (4)) olarak görev görürler. Katalitik reaksiyon esnasında önce indirgenmiş enzimle reaksiyona girerler. Medyatörler düşük potansiyellerde tekrar yükseltgenirler ve çalışma elektrotuyla iletişim halindeyken hızlı elektron transferi gerçekleşir ve akım oluşur (denklem (5)) (Ronkainen et al., 2010).



İndirgenmiş medyatörün üretim hızı, amperometrik olarak elektrottaki yükseltgenme reaksiyonu ile ölçülür (Chaubey and Malhotra, 2002). Bu tip medyatörlü enzim elektrotları ikinci nesil biyosensörler olarak adlandırılır.

Medyatörler, deney koşullarında kararlı değildir ve elektron transferi esnasında yan reaksiyonlara katılmamalıdır. Medyatörün redoks potansiyeli, örnek çözeltide bulunan girişimcilerin redoks potansiyelinden daha düşük olmalıdır. Böylece, askorbat, ürat ve parasetamol gibi girişimciler indirgenemez veya yükseltgenemez. Medyatörün redoks potansiyeli enzimin aktif bölgesi ve elektrot arasındaki elektron transferi için uygun bir potansiyel sağlamalıdır. Oksidatif biyokatalizde, medyatörün redoks potansiyeli enzimin aktif bölgesinin redoks potansiyelinden daha pozitif, eğer redüktif biyokataliz söz konusu ise, daha negatif bir değere sahip olmalıdır. Elektrokimyasal reaksiyonlarda yüksek hız sabitine ve düşük potansiyele sahip medyatörlerin kullanılması gereklidir.

Özellikle yüksek hız sabitine sahip medyatör kullanımıyla, elektrot kinetiğinden ötürü oluşan biyosensör cevabının kısıtlanması engellenmiş olur (Chaubey and Malhotra, 2002; Dzyadevych et al., 2008; Ronkainen et al., 2010).

İdeal bir medyatörün özellikleri şöyle sıralanabilir:

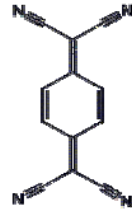
- Medyatör ve enzim arasındaki elektron transferi çok hızlı olmalıdır (Chaubey and Malhotra, 2002).
- İndirgenmiş ve yükseltgenmiş formları kararlı yapıda olmalıdır (Ronkainen et al., 2010).
- İndirgenmiş formdayken O_2 ile reaksiyona girmemelidir (Dzyadevych et al., 2008).
- Düşük potansiyelde rejenere olmalıdır (Dzyadevych et al., 2008).
- Toksik olmamalıdır (Ronkainen et al., 2010).
- pH'tan bağımsız olmalıdır (Ronkainen et al., 2010).

Medyatör kullanımının avantajları ise şöyledir:

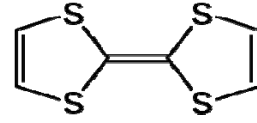
- Ölçümler oksijen konsantrasyonuna bağlı değildir (Chaubey and Malhotra, 2002).
- Enzim elektrotunun çalışma potansiyeli medyatörün yükseltgenme potansiyeline göre belirlenir (Chaubey and Malhotra, 2002).
- Düşük yükseltgenme potansiyeline sahip bir medyatör kullanıldığında, istenmeyen türlerin girişi engellenir (Chaubey and Malhotra, 2002).
- Eğer indirgenmiş formdaki medyatörün yükseltgenmesinde protonlar mevcut değilse, enzim elektrotu göreceli olarak pH'a karşı duyarsız olur (Chaubey and Malhotra, 2002).
- Sensörde, peroksidaz ve dehidrogenaz gibi oksidoredüktaz enzimleri biyolojik bileşen olarak kullanılabilir. Böylece, hedef analitlerin sayısı artmış olur (Ronkainen et al., 2010).

Medyatörler iki şekilde kullanılabilir. Birincisi, ölçümün yapıldığı çözeltiye karıştırılabilir. İkincisi ise, elektrot yüzeyine immobilize edilebilir. Birinci şekilde kullanımı daha kolaydır fakat teknolojik değildir. Ayrıca, metilen mavisi ve metil viyole gibi organik renklendiriciler toksiktir, kararlı yapıda değildir ve pH'a karşı duyarlıdır. Uygun ve teknolojik olan elektrot yüzeyine immobilize edilmiş medyatörlerdir (Dzyadevych et al., 2008).

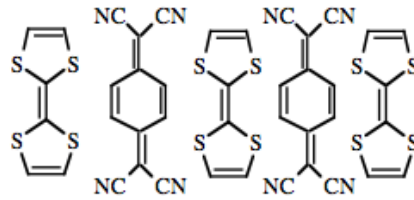
Organik boyalarda karşılaşılan problemlere çözüm olarak kararlı yapıda olan inorganik redoks medyatörleri kullanılmaktadır. Bu tip medyatörlere örnek olarak ferrosen ve türevleri, tetrasiyanokinodimetan (TCNQ), tetratiafulvalen (TTF), iletken tuzlar (örneğin TTF-TCNQ), kinonlar ve ferri/ferrosiyanür verilebilir. Bu medyatörlerden bazıları Şekil 1.3'te görülmektedir.



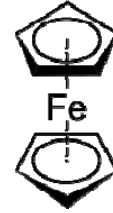
Tetrasiyanokinodimetan (TCNQ)



Tetratiafulvalen (TTF)



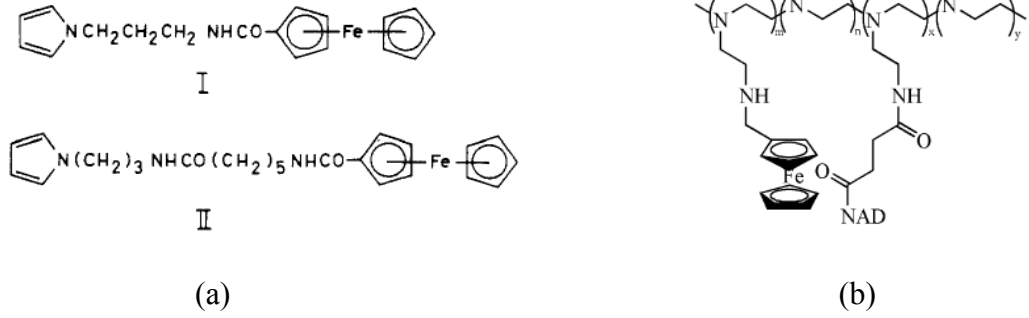
Tetratiafulvalen –tetrasiyanokinodimetan (TTF-TCNQ) Ferrosen



Şekil 1.3. Bazı inorganik redoks medyatör örnekleri.

Daha önce yapılan çalışmalarda TCNQ molekülünün etkin bir medyatör olduğu kanıtlanmıştır (Murthy and Anita, 1994). TCNQ pirolitik grafit elektrotu üzerine elektrokimyasal olarak immobilize edilmiş ve hazırlanan modifiye elektrotun NADH duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Murthy et al., 1994). TTF ise amperometrik biyosensörlerde kullanılan başka bir medyatördür. TTF medyatörü kullanılarak tasarlanan amperometrik biyosensör L-laktat'ı tayin edilebilmektedir (Mulchandani et al., 1995). TTF-TCNQ gibi iletken tuzlar da biyosensörlerde

elektron taşıyıcı ajan olarak sıkça kullanılmaktadır. Pt kablosuna tutturulmuş ve içine GOx hapsedilmiş olan elektrokimyasal polimerik heteropolipirol film ile kaplanmış olan TTF-TCNQ örnek olarak verilebilir (Li et al., 1999). Bu biyosensör düşük çalışma potansiyelinde glukoz tayini için tasarlanmıştır. Bazı kinon türevleri de biyosensörlerde medyatör görevi görmektedir. Redoks polimerinin, NADH'tan karbon pasta elektrotuna elektron transferini sağlayarak, dehidrogenaz kataliz reaksiyonu için gerekli olan NAD^+ üretimine dayanan amperometrik biyosensör tasarlanmıştır (Persson et al., 1993). Ferri/ferrosiyanür biyosensörlerde sıkça kullanılan inorganik medyatördür. GOx'un elektropolimerizasyon yöntemi ile Pt mikroelevtroda tutturulup, medyatör olarak ferrosiyanür kullanılmasıyla amperometrik glukoz tayini gerçekleştirilmiştir (Alonso Lomillo et al., 2005). Ferrosenin, enzimle hızlı reaksiyona girmesi, O_2 ile reaksiyona girmemesi, indirgenmiş ve yükseltgenmiş türlerinin kararlı yapıda olması, pH'tan bağımsız çalışması ve düşük potansiyelde rejenere olması gibi özelliklerinden dolayı ideal bir medyatörde olması gereken çoğu özelliğe sahiptir (Yoo and Lee, 2010). Bu nedenle, ferrosen ve türevleri kararlı ve duyarlı biyosensörlerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ferrosen medyatör olarak ilk kez 1984'te, glukoz tayini için geliştirilmiş amperometrik enzim biyosensöründe kullanılmıştır (Cass et al., 1984). Daha sonra literatürde, ferrosen ve türevlerine, enzimlerin aktif bölgesi ve elektrot arasında hızlı elektron transferini sağlayan redoks medyatörleri olarak sıklıkla rastlanmaktadır (Rahman et al., 2008; Vorotyntsev and Vasilyeva, 2008). Ferrosen ideal bir medyatörde olması gereken özelliklerin çoğuna sahip olmasının yanı sıra enzimin aktif bölgesine girebilecek kadar küçük ve hareketli olduğu için de kullanılmaktadır. Fakat ferrosenin elektrot yüzeyine adsorpsiyonu zayıftır ve küçük olduğu için yığın çözeltiye kolaylıkla karışabilir. Bu problemi ortadan kaldırmak için ferrosen polimerik matrise kovalent olarak bağlanır (Kandimalla et al., 2006). Bu şekilde, daha etkin bir elektron transfer sistemi oluşturulur. Buna örnek olarak, ferrosen ile modifiye edilmiş polipirol filmine GOx'un hapsedilmesiyle hazırlanan amperometrik enzim elektrotu verilebilir (Şekil 1.4a) (Foulds and Lowe, 1988). Diğer bir örnek ise NAD-bağlı alkol dehidrogenazın, NAD ve ferrosen ile modifiye edilmiş polietileniminine bağlanmasıyla hazırlanan alkole duyarlı amperometrik biyosensördür (Şekil 1.4b) (Zheng et al., 2009).



Şekil 1.4. Bazı ferrosen modifikasyonları (a) I [(Ferrosenil)amidopropil]pirol, II ([[(Ferrosenil)amidopentil]amidopropil)pirol (glukoz tayininde kullanılan oksidan) (Foulds and Lowe, 1988) (b) Polietilenimin-Ferrosen-NAD'n kimyasal yapısı (alkol tayininde kullanılacak kofaktör türevi) (Zheng et al., 2009).

İlk kez Gregg ve Heller tarafından tanımlanmış olan üçüncü nesil biyosensörlerin ölçüm prensibi enzim ve elektrot arasındaki direkt elektron transferine dayanmaktadır (Gregg and Heller, 1990). Biyosensördeki katalitik olaylar, sistemin bir bütün gibi davranmasıyla yani elektron transferi sırasında herhangi bir taşıyıcı kullanmadan gerçekleşir. Elektrot yüzeyine enzim ve medyatörün aynı anda birlikte immobilize edilmesiyle biyolojik bileşen ve elektrot birleştirilir. Enzim ve medyatör, iletken bir polimere yerleştirilir ve direkt elektriksel temas kurulur. Bu yöntemle, polimerik bir materyale bağlandığından medyatörde herhangi bir akma veya çözeltiye sızma söz konusu olmaz (Dzyadevych et al., 2008; Ronkainen et al., 2010).

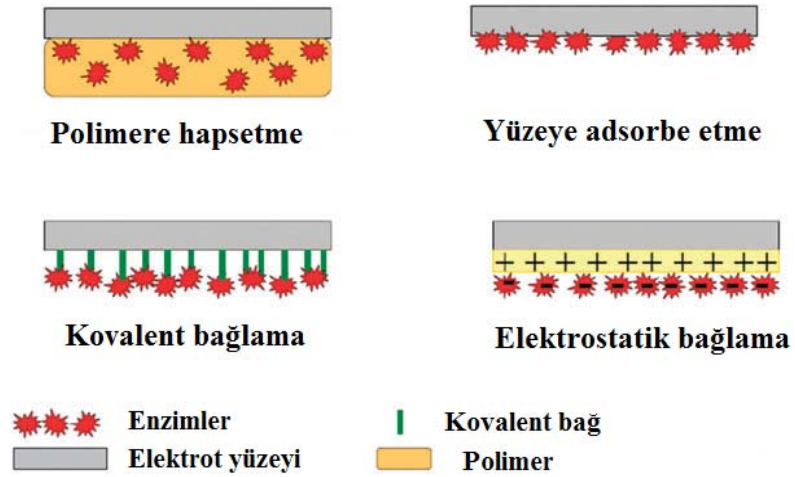
Enzimlerin elektrot yüzeyine immobilizasyon yöntemleri

Enzim elektrotları, yaygın olarak çalışılmaktadır ve enzimlerin elektrokimyasal dönüştürücüye bağlanması fiziksel veya kimyasal olarak gerçekleşmektedir. Burada hedef, enzimin aktif bölgesini bloke etmeden ve geometrisini fazla değiştirmeden, enzim ve dönüştürücünün yüzeyi arasında bağlantı kurmaktır. Eğer hazırlanan biyosensör, dayanıklı, tekrar kullanılabilir ve enzimin seçiciliğini devam ettiriyorsa, immobilizasyon yöntemi başarılı kabul edilir. Bazen immobilizasyon yöntemleri enzimin konformasyonunu değiştirip, aktivitesini düşürüyor olsa bile, çoğu yöntem başarılı sayılmaktadır. Hatta bazı yöntemler enzimin açılmasını en aza indirdiği için kararlılığını arttırmaktadır. Enzim dönüştürücüye bağlandıktan sonra, yüksek $V_{\max}$ 'a ve düşük K_m 'ye sahip olmalıdır. $V_{\max}$, enzim substrat ile doymuş haldeyken oluşan reaksiyonun

maksimum hızıdır. Yüzeye immobilize edilmiş, yüksek $V_{\max}$ değerindeki enzim sayesinde elektrokimyasal dönüştürücünün katalizlenen reaksiyona cevabı geniş aralıkta olur. Analitin güvenilir şekildeki tayininde, bu aralıktaki sinyaller substrat konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. K_m (Michaelis sabiti), reaksiyon hızının maksimum değerinin yarısına denk gelen substrat konsantrasyonudur. K_m değeri düşük olan enzimler maksimum katalitik aktivitelerine düşük substrat konsantrasyonlarında ulaşırlar. Enzimin aktivitesini ve biyosensörün performansını geliştirmek için immobilize edilmiş enzim ortamının dikkatli bir şekilde seçilmiş olması gereklidir (Bankar et al., 2009; Ronkainen et al., 2010).

İmmobilizasyon yöntemleri içinde en kolay uygulananı, enzim çözeltisinin fiziksel olarak elektrot yüzeyindeki membranlar arasında tutuklanmasıdır. Bu şekilde içteki membran, elektrot yüzeyini, girişime neden olabilecek maddelerden ve adsorpsiyona bağlı bozulmalardan korur. Dıştaki membran ise porlarının boyutuna veya polimerin kimyasal özelliklerine bağlı olarak seçicilik sağlar. Ayrıca, enzim tabakasına olan substrat difüzyonunu ayarlayarak sensör cevabını dengeler ve biyoyumlu bir dış yüzey oluşturur. Fiziksel immobilizasyon yöntemlerinde, herhangi bir kovalent yani kimyasal bağlanma söz konusu olmadığından, enzimin doğal yapısı korunur (Muhammad-Tahir and Alocilja, 2003). Kimyasal immobilizasyon yöntemleri ise elektrot ile enzimin fonksiyonel grupları arasındaki kovalent bağlanmayı içerir. Yaygın olarak kullanılan immobilizasyon yöntemleri arasında, elektrot yüzeyinde membran kullanılarak; kapsülleme ile; jel veya elektropolimerize film içine; karbon pastasına karıştırılarak ve biotin-avidin bağlanması gibi spesifik etkileşimler kullanılarak enzimin hapsedilmesi, adsorpsiyon, çapraz bağlama ve kovalent bağlama sayılabilir (Şekil 1.5) (Cosnier, 2005). Kovalent bağlanma yönteminin kararlılığı yüksektir. Bağlanma, enzimin katalitik aktivitesine etki etmeyen NH_2 , $COOH$, OH ve SH gibi fonksiyonel grupları ile elektrot yüzeyi arasında oluşur. Bağlanma reaksiyonları düşük sıcaklıkta ve fizyolojik pH'ta yapılmalıdır. Ayrıca, enzim-substrat ile yapılan bağlanmalarda enzimin katalitik özellikleri korunmuş olur. Biyomoleküllerin moleküller arası çapraz bağlanması bifonksiyonel veya multifonksiyonel reaktiflerle sağlanır. Bu reaktiflere örnek olarak glutaraldehit, heksametilen diizosiyanat ve 1,5-diflor 2,4-dinitrobenzen verilebilir (Ronkainen et al., 2010; Sharma et al., 2003). Çapraz bağlama işlemi, elektrot yüzeyine

olabileceği gibi enzimin katalitik aktivitesinin korunacağı bir immobilizasyon matrisine de olabilir. Bu nedenle son yıllarda doğal polimerler immobilizasyon matrisi olarak dikkat çekmektedir. Agar, aljinat, kitin ve kitosan gibi polisakkaritler literatürde karşılaşılan immobilizasyon matrislerinden bazılarıdır (Wang et al., 2005). Immobilizasyon yöntemleri arasında en dayanıksız olanı adsorpsiyondur. Adsorpsiyon yönteminde, biyolojik bileşeni dönüştürücüye bağlayan kuvvetler çok zayıf olan van der Waals kuvvetleridir. Bu kuvvetler geçici, zayıf ve rastgele hidrojen bağlarından oluşur. Bu yüzden, yüzeye bağlanma sırasında enzimin kararlı yapısını koruması için gerekli olan etkileşimler engellenebilir ve enzim denature olabilir. Yani, adsorpsiyon yöntemi ile hazırlanan biyosensörlerin ömürleri daha kısadır. İmmobilize edilmiş enzim tabakasının bir membran veya polimer ile kaplanmasıyla girişim etkisi en aza indirgenir (Ronkainen et al., 2010).



Şekil 1.5. Yaygın olarak kullanılan immobilizasyon yöntemleri.

Enzim elektrotlarının optimizasyonu

Hazırlanan birçok enzim elektrotunun sadece bazıları ticari aşamaya gelebilmiştir. Bunun nedeni, bazı faktörlerin sensörlerin adaptasyonunu ve sürekli kullanımını engelliyor olmasıdır. Günümüzde enzim aktivitesinin, çözeltinin pH, sıcaklık, iyonik güç ve tampon içeriği gibi özelliklerinden bağımsız olması için araştırmalar yapılmaktadır. İdeal olarak, çözeltinin özellikleri örnekten örneğe ve ölçüm sırasında değişmemelidir. Enzim elektrotları geniş bir lineer aralığa sahip olmalıdır. Enzimler yüksek substrat konsantrasyonlarında doygunluğa ulaşır

çünkü aktif bölgeleri sınırlayıcı bir faktör olmaya başlar. Böylece, artık sinyaller analit konsantrasyonu ile doğru orantılı değildir. Sensöre immobilize edilen enzim, sensör uygulamasına uygun olarak ayarlanabilir. Genellikle enzim elektrotları için örnek matris, kan ve diğer biyolojik sıvılar olduğundan katalitik biyosensör de biyouyumlu olmalıdır. Biyosensörün tasarımı için örneğin en iyi şekilde nasıl test edileceğinin ve optimum miktarının ve sensörün tekrarlanabilirliği, seçiciliği, hassaslığı, kararlılığı ve maliyetinin belirlenmesi gereklidir. Enzim elektrotlarının depo kararlılığı, sensörün nasıl hazırlandığına, tasarlandığına ve hangi ortamda saklandığına göre saatlerden aylara kadar değişir (Ronkainen et al., 2010).

Biyokatalitik sensör örnekleri

Biyokatalitik sensörlere örnek olarak glukoz, ksantin ve laktat sensörleri verilmiştir.

Glukoz sensörleri: Glukoz tayini birçok alanda önemlidir. Özellikle vücutta ciddi ve ağır zararları olan diyabetin, tanısının konulması ve kontrol edilmesi için kandaki glukoz miktarının ölçülmesi gerekir. Glukoz analizi yiyecek ve içecek endüstrisinde kullanılan biyoteknolojik işlemlerde de yapılmaktadır çünkü glukozun fazlası fermantasyonun verimliliğini ve ürün kalitesi düşürmektedir. Bu nedenle enzim biyosensörleri büyük önem taşımaktadır çünkü biyosensörler, yanıt süresi, kompleks matrislerde bile yüksek seçicilik, hassaslık ve maliyet gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Son yıllarda, enzim kullanılarak geliştirilen amperometrik biyosensör sistemleri, enzimin substratına karşı seçiciliği ile elektrokimyasal tayinin hassaslığını birleştirebilme özelliğinden dolayı ilerleme kaydetmiştir. Böylece, daha güvenilir ölçüm imkânı sunar. Glukozu yükseltgeyen enzimler glukoz dehidrogenaz (GDH) ve GOx'tur. GDH enzimi, glukoz ile reaksiyona girmesi için NAD^+ kaynağına ihtiyaç duyar ve reaksiyon sonucunda oluşan NADH ürününü indirgemek için bir redoks medyatörü gereklidir. NAD^+ kullanımı gerektirmeyen kinoprotein GDH enzimi ise kararsız yapısından dolayı tercih edilmemektedir. Bir flavoprotein olan GOx (β -D-glukoz: oksijen 1-oksidoredüktaz, EC 1.1.3.4) β -D-glukozu D-glukono-1,5-laktona yükseltir. Bu yükseltgenme işlemi, moleküler oksijeni (O_2) bir elektron taşıyıcısı olarak kullanıp, H_2O_2 üretimiyle gerçekleşir (Bankar et al., 2009; Wang, 2008). GOx,

klinik ve kişisel glukoz tayini için üretilen ticari enzim elektrotlarında ve fermantasyon işlemi sırasında glukoz miktarını görüntülemek üzere hazırlanan enzim biyosensörlerinde kullanılmaktadır (Ronkainen et al., 2010; Yuksel et al., 2011).

Ksantin sensörleri: Ksantin oksidaz (XO) ksantin ürik aside yükseltgenmesini katalizler (denklem (6)). XO immobilize edilmiş amperometrik biyosensörleri ksantini yüksek seçicilikte aşağıdaki redoks reaksiyonuna göre tayin eder:



Ksantin, adenosin trifosfat (ATP)'nin yıkımı sonrasında üretilir. Fizyolojik ortamda, ksantin ksantin oksidaz tarafından yükseltgenerek ürik aside dönüşmesi tıpta ilgi çekmektedir (Arslan et al., 2006). Ayrıca, XO biyosensörleri yiyecek endüstrisinde balığın tazeliğini test etmek için kullanılmaktadır (Agüi et al., 2006).

Laktat sensörleri: Laktik asidin tuzu olan laktat bir fermantasyon ürünüdür. Hücresel solunum sırasında glukozun yıkımı sonucu oluşur. Anaerobik metabolizmaya neden olan yorucu egzersizler sonucu kandaki konsantrasyonu yükselir. Laktat biyosensörleri sporcular tarafından ve tıp alanında kullanılmaktadır. Laktat biyosensörlerinde, biyolojik bileşen olarak dört çeşit enzim kullanılmaktadır: laktat dehidrogenaz, laktat oksidaz, laktat monooksidaz ve sitokrom b₂. Tüm bu enzimler, amperometrik olarak ölçülmek üzere, çalışma elektrotunda akım oluşumuna neden olur (Ronkainen et al., 2010)

Doku temelli ve mikrobiyal biyosensörler

Bazı biyokatalitik sensörler biyolojik bileşen olarak bitkisel dokular gibi hücresel materyalleri içerir. Bu tip biyokatalitik elektrotlar geleneksel enzim elektrotları gibi çalışır. Yani dokulardaki veya hücrelerdeki enzimler, elektrokimyasal olarak tayin edilebilir türleri üretir veya tüketir. Doku kesitlerinin bulunduğu biyosensör sistemleri ucuz, kararlı, yüksek katalitik aktiviteye sahip olmaları gibi avantajlara sahiptir. Doku kesitlerinin biyosensörlerde ilk kullanımına örnek olarak muz dokusuna sahip elektrotlar verilebilir (Arslan et al., 2006). Polifenol oksidaz enziminin zengin olan muz dokusu, karbon pastası ile

karıştırılarak, hızlı cevap veren ve hassas bir dopamin sensörü elde edilir. Bu amperometrik biyosensör yüksek biyokatalitik aktiviteye, iyi kararlılığa ve seçiciliğe sahiptir (Ronkainen et al., 2010).

Yaşayan organizmalar da elektrotlar gibi elektrokimyasal dönüştürücülerle birleştirilip, mayalanma, yiyecek üretimi, enerji üretimi ve ilaç sentezi gibi birçok biyoteknolojik işlemi görüntülemek için kullanılabilir. Bakteriler, elektrot yüzeyinde bulunan polimerik bir matris üzerine çapraz bağlayıcı vasıtasıyla immobilize edilebilir (Odaci et al., 2009). Bu tip sistemlerde, ortamda hedef analit varken, mikroorganizmanın solunumundan kaynaklanan, yüzeyde elektroaktif metabolitlerin (örneğin, oksijen) azalması sayesinde tayin gerçekleşir. Bazı mikroorganizmaların ürettiği elektroaktif metabolitler direkt olarak izlenebilir (Ronkainen et al., 2010).

Mikrobiyal biyosensörlerin enzim biyosensörlerine göre bazı avantajları vardır:

- Daha dayanıklıdır çünkü enzimler doğal ortamlarındadır (Su et al., 2011).
- Daha ucuzdur çünkü enzim izolasyonuna gerek yoktur (Ronkainen et al., 2010).
- Analit dışında bulunan diğer bileşenlerden kaynaklanan inhibisyona daha az duyarlıdır (Ronkainen et al., 2010).
- pH ve sıcaklık değişimlerine daha toleranslıdır (Ronkainen et al., 2010).
- Birçok reaksiyonu katalizleyebilir çünkü birçok enzim ve kofaktör içerir (Su et al., 2011).
- Dışarıdan kofaktör ilavesi gerekmez (Su et al., 2011).

Enzim biyosensörlerine göre bazı dezavantajları da vardır:

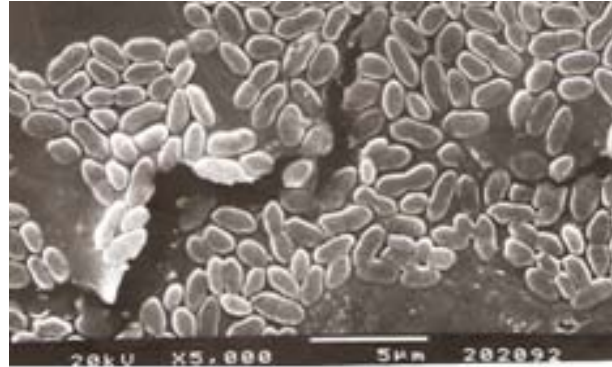
- Hücre membranı difüzyon bariyeri oluşturduğundan membrandan geçemeyen moleküller için uygun sensör hazırlanamaz (Su et al., 2011).
- Cevap süresi daha uzundur (Ronkainen et al., 2010).
- Hedef reaksiyon diğer enzimlerce etkilenebileceğinden, seçicilik daha az olabilir (Su et al., 2011).

Gluconobacter oxydans

Gluconobacter cinsi *Acetobacteraceae* ailesine aittir. *Gluconobacter* cinsine ait birçok tür, 1980lerde *G. oxydans* adı verilen tek bir türe indirilmiştir. Zaman içerisinde, *G. oxydans* türleri, tekrar alt sınıflara ayrılmıştır veya aynı cinse ait farklı türlerin olduğu öne sürülmüştür. Fakat son olarak *Gluconobacter* türlerinin arasındaki fenotip farklılıklarının belirsiz olmasından dolayı türlerin tekrar değerlendirilmesi gerektiği kanısına varılmıştır (De Muynck et al., 2007; Odacı, 2010).

Gram negatif olan *G. oxydans*, elipsoidal ile çubuk arasında bir şekildedir (Şekil 1.6). 0,5-0,8 x 0,9-4,2 µm boyutunda, tek ve/veya çift halinde, ender olarak da zincir gibi sıralı olarak bulunur. Hareketli veya hareketsiz olabilir. Endospor oluşturmaz. Bu bakteriler kemoorganotropiktir ve oksijenin son elektron alıcısı olduğu solunum metabolizmasına sahip, zorunlu aerobtur (De Muynck et al., 2007; Odacı, 2010).

G. oxydans türleri doğada çiçek ve meyve gibi şekerli ortamlarda bulunur. Bulaştığı topraktan, enfekte ettiği meyveden, biradan ve şaraptan izole edilebilir. Bu türün insanlar veya hayvanlar üzerinde patojenik bir etkisi yoktur (De Muynck et al., 2007; Odacı, 2010).

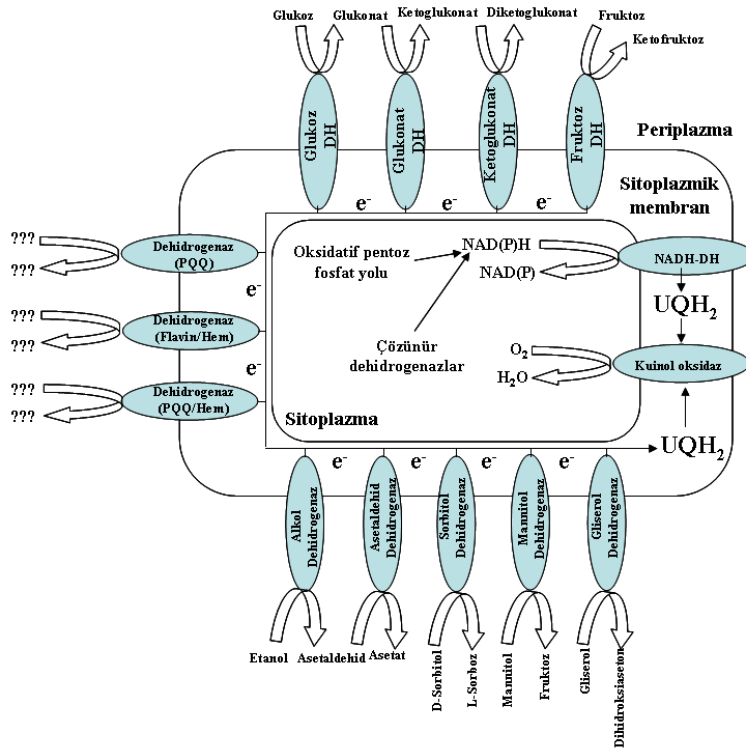


Şekil 1.6. *G. oxydans* hücrelerinin SEM görüntüsü (Odacı, 2010).

***G. oxydans* türünün metabolizması:** *Gluconobacter* en önemli yıkım yollardan biri olan pentoz fosfat yolu ile şekerlerin ve poliollerin yıkımını gerçekleştirir. *Acetobacteraceae* ailesinde fosfofruktokinaz eksikliğinden dolayı glikoliz yoktur. Ayrıca, trikarboksilik asit döngüsü yarım kaldığı için *Gluconobacter*, asetik asidi CO₂ ve H₂O'ya kadar parçalayamaz. Bunun nedeni

ise süksinat dehidrogenaz eksikliğidir. Pentoz fosfat yolu dışında Entner-Doudoroff yolu'nun da enzimlerini kodlayan tüm genler tespit edilmiştir fakat ikinci yolda bazı önemli enzimler eksik olduğu için pentoz fosfat yolu en geçerli yoldur. Pentoz fosfat yolunda substratlar (polioller ve şekerler) çoğu zaman önce özel kinaz enzimleriyle fosforillenir ve sonra dehidrogenazlar ve izomerazlar kullanılarak parçalanır. Pentoz fosfat yolu dışında, *G. oxydans* birçok membrana bağlı dehidrogenaz enzimleri içerir ve bu enzimler alkolleri ve şekerleri kısmi olarak okside eder (Şekil 1.7). Ürün olarak oluşan aldehytler, ketonlar ve asitler hücreden boşaltılır. Bu özelliğinden dolayı *G. oxydans* türü biyoteknolojik uygulamalarda sıkça kullanılmaktadır (De Muynck et al., 2007).

G. oxydans türlerinin elektron transport sisteminin bileşenleri hala tartışılmaktadır. Solunum zinciri ubikinon-10 (Q_{10}), iki çeşit *c* tipinde sitokrom (Cyt. *c*), iki çeşit *o* tipinde sitokrom (Cyt. *o*) içermektedir ve NADH oksidaz sisteminde de bu sırada kullanılmaktadır (Odaci, 2010).



Şekil 1.7. *Gluconobacter* cinsinde şeker ve alkolleri okside eden enzim sistemleri [Soru işaretleri henüz karakterize edilmeyen dehidrogenazları gösterir, DH: Dehidrogenaz, UQH₂: ubikinon] (Odaci, 2010).

Daha önce yapılan araştırmalarda, *G. oxydans* türünden sorumlu enzimlerin, dehidrogenasyonu iki farklı yoldan gerçekleştirdiği ispat edilmiştir. Bu iki enzim sistemi bulundukları yere, hücre içindeki işlevlerine ve substrat spesifikliğine göre değişkenlik gösterir. İlk grup membrana bağlı ve sitokrom sistemleriyle bağlantılı dehidrogenazları içerir. Bu enzimler pH 5,5'te maksimum oksidasyon kapasitesine ve yüksek substrat spesifikliğine sahiptir. İkinci grupta ise sitoplazmada çözünür pH 8,0'de maksimum aktiviteye sahip polioldehidrogenazlar bulunmaktadır. İlk gruptaki enzimler vasıtasıyla oluşan ürünler fermentasyon ortamına boşaltılır. Fakat ikinci gruptaki enzimlerin vasıtasıyla oluşan ürünler metabolik yollarla parçalanır. İkinci grup da ise en az 6 farklı çözünür polioldehidrogenaz bulunur. Bu enzimlerin her biri kendine özgü spesifikliğe ve kofaktör olarak NAD(P)⁺ya sahiptir (De Muynck et al., 2007).

Gluconobacter membrana bağlı birçok poliol dehidrogenaz içerir. Bu enzimler, D-glukoz, etanol, ribitol, D-sorbitol, L-sorboz, gliserol, D-arabitol gibi birçok poliol içeren moleküllerin oksidasyonundan sorumludur. Bu enzimler, prostetik grup olarak pirolokinolin kinon (PQQ) içerirler (De Muynck et al., 2007).

***G. oxydans* türünün glukoz oksidasyonu:** Glukoz iki yolla okside edilir. Bunlardan ilkinde, glukoz hücre içine alınır, hücre içinde oksidasyonu gerçekleşir ve pentoz fosfat yoluyla (oksidasyon ile) daha basit moleküllere ayrılır. Glukoz önce sitozolik glukoz dehidrogenaz ile glukonata dönüşür ve pentoz fosfat yoluyla basit moleküllere parçalanır. Ayrıca, sitoplazmada, D-glukonat, 2-keto-D-glukonat redüktaz ve 5-keto-D-glukonat redüktaz ile okside edilebilir. İkinci yolda ise periplazmik boşlukta membrana bağlı dehidrogenazlarla direkt olarak oksidasyonu gerçekleşir. Bu yolda, glukoz önce membrana bağlı glukoz dehidrogenaz ile glukonata, membrana bağlı glukonat dehidrogenaz ile 2-keto-D-glukonata ve son olarak 2-keto-D-glukonat dehidrogenaz ile 2,5-diketo-D-glukonata okside edilir (Krajewski et al., 2010).

G. oxydans hücrelerindeki glukonat üretiminin çoğu membrana bağlı glukoz dehidrogenazla yapılmaktadır, çünkü bu enzimin aktivitesi sitozolik glukoz dehidrogenazdan 30 kat daha fazladır (De Muynck et al., 2007).

1.1.2.2. Afinite biyosensörleri

Afinite biyosensörleri, antikor, reseptörler veya oligonükleotitler gibi biyomoleküllerin, hedef analit ile seçici ve sağlam bir şekilde bağlanması temeline dayanır. Bu bağlanma sonucunda ölçülebilir elektriksel bir sinyal oluşur. Moleküler tanıma, analitin tutunacağı bağlanma bölgesinin tamamlayıcı (komplemanter) kısmının boyutuna ve şekline göre tespit edilir. Biyomolekülün ligandına karşı gösterdiği yüksek afinite ve seçicilik, bu tip sensörleri çok hassas ve seçici yapar. DNA hibritleşmesi ve antikor-antijen oluşumu gibi bağlanma işlemleri termodinamik nedenlere dayanır (Ronkainen et al., 2010).

İmmunosensörler, antikor temelli afinite biyosensörleridir ve analit, antijen veya haptenin ölçümleri antikora bağlanmaları sonucu olur. Elektrokimyasal dönüştürücü bağlanmaya duyarlıdır ve elektriksel cevabı ölçülebilen bir sinyale dönüştürür. Antijen verildiği konakta üretimine neden olduğu antikorun tamamlayıcı bölgelerine yüksek seçicilik ve afinite ile bağlanır. İmmunosensörler analitik yöntemler arasında çok düşük belirtme sınırına sahip olmaları ile ünlüdür. Kalitatif ve kantitatif uygulamaları vardır. Eser miktarda (ppb,ppt) bakteri, virüs, ilaç, hormon ve tarım ilacı gibi birçok kimyasalın tayininde kullanılır (Ronkainen et al., 2010).

Afinite biyosensörlerinde biyolojik bileşen olarak nükleik asitler antikorlardan daha az kullanılmaktadır. DNA veya RNA parçaları kullanılarak gerçekleşen tanıma, sensördeki nükleik asit ile analit dizinin tamamlayıcı baz çiftleşmesine veya aptamer olarak bilinen nükleik asit yapılarının oluşumu ve bu yapıların proteinler gibi üç boyutlu bir yüzeye bağlanmasına dayanır. DNA afinite problemleri, kanserlerin, viral enfeksiyonların ve genetik hastalıkların teşhisinde kullanılır (Ronkainen et al., 2010).

1.2.Akışa Enjeksiyonlu Analiz (Flow Injection Analysis-FIA)

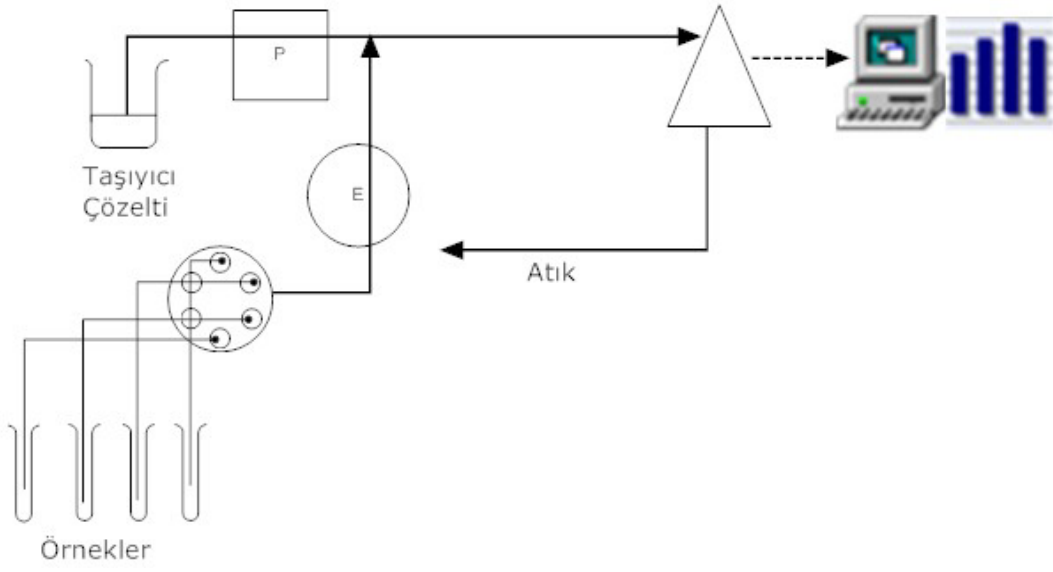
Akışa yönelik analiz sistemleri, biyokimya alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistemler, örnek çözeltinin akışı ve uygun bir detektörden geçmesiyle, ölçülen fiziksel parametrenin devamlı izlenmesine olanak sağlar. Böylece, fraksiyon toplama ve örnek hazırlama gibi işlemlere gerek kalmadan, otomatize bir sistem elde etmeye çalışılır. Ortaya çıkış kaynağı, kolon

kromatografik yöntemler olan bu teknik, akış analizine büyük katkı sağlamıştır. Geleneksel yöntemlerde insan eliyle gerçekleşen ölçüm, düzenli olarak sıvı akışını sağlayan bir sisteme devredilmiştir. Analit tayini, fazla cam malzeme kullanılması, hacim ölçümlerinin ve seyreltmelerin yapılması, örnek çözeltinin sisteme aktarılması gibi operatör gerektiren işlemlere ihtiyaç duymadan, otomatize sistemlerle, hassas ve kontaminasyon riski olmadan gerçekleşir (Ozdemir, 2010).

1970li yıllarda Ruzicka ve Hansen tarafından tasarlanan FIA sistemi şöyle tanımlanmıştır (Růžicka and Hansen, 1988a):

“Bölünmemiş ve akış halindeki uygun bir sıvı taşıyıcı sisteme sıvı örneğin enjekte edilmesine dayanan bir metottur. Enjekte edilmiş sıvı örneğin oluşturduğu absorbans, elektrot potansiyeli ya da herhangi bir fiziksel parametre bir detektörden geçerek sinyal oluşturur.”

Seri analizlerde kullanılmak üzere tasarlanmış bu sistemler, bazı modifikasyonlardan sonra örnek çözeltinin pH, iletkenlik gibi özelliklerini belirleme amacıyla da kullanılmaktadır (Růžicka and Hansen, 1986). Sistemin temel bileşenleri peristaltik pompa, selektör, enjektör ve detektördür. Günümüzde, pompa, selektör ve enjektör, çalışma koşullarını denetleyecek bir bilgisayar yazılımı ile desteklenmektedir (Şekil 1.8). Ayrıca, FIA sistemi analiz edilecek örnek sayısı, örnek çözeltinin geri kazanımı ve seyreltme gibi parametreler göz önünde bulundurularak da modifiye edilebilir. Bunun için sisteme pompa, karıştırıcı, ısıtıcı, filtre veya atığın geri dönüşümünü sağlayan kapalı sistemler ilave edilebilir. Tekniğin bu tip modifikasyonlara uygun olması, esneklik ve çok yönlülük gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır ve bu özellikleri gelecekte değişik kullanım alanlarının olabileceğini göstermektedir (Růžicka and Hansen, 1988b).



Şekil 1.8. Çoklu Örnek Analizine Uygun FIA Sistemi: Selektör tarafından seçilen örnekler taşıyıcı çözeltiliye enjekte edilir ve gerçekleşen tepkime sonucu ölçülecek fizikokimyasal parametre detektör ile belirlenir (Ozdemir, 2010).

2. MATERYAL VE METOT

Bu bölümde, araştırmada kullanılan materyal, cihazlar ve sistemler, metot ve konuya yönelik çalışmalar anlatılmıştır.

2.1. Materyal

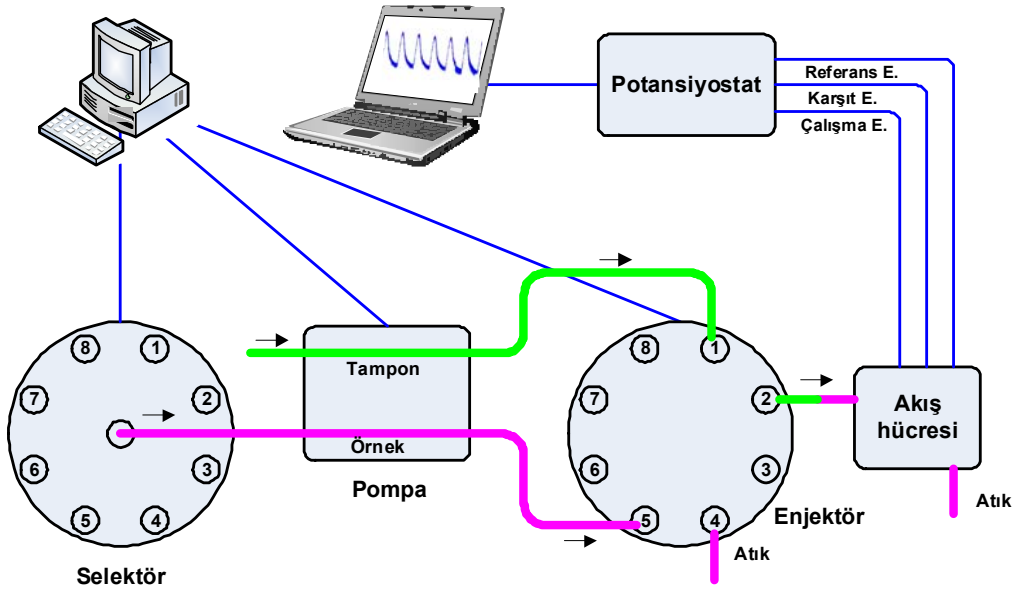
Kitosan (CHIT, yengeç kabuğundan, minimum % 85 deasetillenmiş) Fluka (Dorset, İngiltere) firmasından temin edilmiştir. Sodyum siyano borhidrür (NaCNBH_3 , % 95) ve etanol Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Ferrosen karbaldehit (Fc-CHO , % 98), glukoz oksidaz (GOx ; β -D-Glukoz: oksijen 1-oksidoredüktaz; *Aspergillus niger*'den; E.C 1.1.3.4; 50 U/mg), glutaraldehit çözeltisi (% 25) ve D-glukoz Sigma–Aldrich (Dorset, İngiltere) firmasından temin edilmiştir. *Gluconobacter oxydans* DSM 2343 hücreleri DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; Braunschweig, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Ticari enzim kiti (Barham and Trinder, 1972) (Katalog no: 1129010) Cromatest (Barcelona, İspanya) firmasından satın alınmıştır. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

2.2. Cihazlar ve Sistemler

GCE temizliğinde, ultrasonic banyo (Ultrasonic LC 30, Almanya), mikrobiyal biyosensör deneylerinin hazırlık aşamasında inkübatör (New Brunswick Scientific, ABD), otoklav (Hirayama, Japonya), santrifüj (Denley, İngiltere) kullanılmıştır. Tampon ve glukoz çözeltilerinin hazırlanmasında pH-metre (Hana Instrument, ABD) ve distile su cihazları (Fistream, England ve Milli-Q Milipore, ABD) kullanılmıştır.

Elektrokimyasal ölçümler PalmSens elektrokimyasal ölçüm sistemi (Palm Instruments, Houten, Hollanda) ile gerçekleştirilmiştir. Döngüsel voltametri (CV) deneyleri oda sıcaklığında bir elektrokimyasal hücrede üçlü elektrot sistemi kullanılarak yapılmıştır. Camımsı karbon elektrot (3,0 mm çapında) (Bioanalytical Systems, Inc. BAS) çalışma elektrotu, Ag/AgCl elektrot (3 M KCl , Metrohm, İsviçre) referans elektrodu ve platin elektrot (Metrohm, İsviçre) karşıt elektrot

olarak kullanılmıştır. Tüm amperometrik ölçümler FIA sistemi kullanılarak yapılmıştır. FIA sistemi, Teflon boru sistemine (0,5 mm iç çap) sahip peristaltik pompadan (FIATron, Oconomovoc, WI, ABD), 100 µL örnek döngüsüne sahip, 8 portlu enjeksiyon valfinden (FIATron Oconomovoc, WI), dizüstü bilgisayara bağlı PalmSens potansiyostattan ve üç elektrotlu akış hücresinden (ALS, Japonya) oluşmaktadır (Şekil 2.1). Pompa dakikada 0,9 mL tampon çözeltisi taşımaktadır. Camımsı karbon dual elektrot (3.0 mm çapında ve 1.0 mm elektrot aralığına sahip), Ag/AgCl ve platin tel (CHI 130, CH Instruments, Austin, ABD) sırasıyla çalışma elektrodu, referans ve karşıt elektrot olarak kullanılmıştır. Kolorimetrik ölçümler spektrofotometre (Pharmacia LKB Novaspec II, LKB Biochrom, İngiltere) ile yapılmıştır.



Şekil 2.1. FIA temelli biyosensör sisteminin şematik gösterimi.

^1H NMR (Nükleer Manyetik Resonans) spektrası Varian AS 400 Mercury spektrometresi ile kaydedilmiştir. Çözücü olarak, D_2O içinde % 2,0 CF_3COOD kullanılmıştır. Kimyasal kaymalar (δ) ppm olarak verilmiştir. FT-IR-ATR (Fourier Transform Infrared Spektroskopisi/Tam Yansıma Spektroskopisi) spektrası Perkin-Elmer Spectrum 100 series spektrometresi (Perkin-Elmer, ABD) ile kaydedilmiştir. ICP-MS (Endüktif Eşleşmiş plazma-Kütle Spektroskopisi) ölçümleri, elemente özel Agilent 7500 CE ICP-MS cihazı (Agilent Technologies, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

2.3. Metot

Tez kapsamında, kitosan-ferrosen (CHIT-Fc) filminin immobilizasyon materyali olarak iki çeşit uygulaması yapılmıştır.

CHIT-Fc'nin yapısal karakterizasyonu ^1H NMR, FT-IR-ATR ve ICP-MS kullanılarak, CHIT-Fc filminin elektrokimyasal karakterizasyonu döngüsel voltametri ile yapılmıştır. GOx ve *G. oxydans* hücreleri biyokatalizör olarak kullanılmış ve glutaraldehit vasıtasıyla camımsı karbon elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. FIA sistemi kullanılarak optimizasyon ve glukoz için karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2.4. CHIT-Fc Hibritlerinin Sentezi

CHIT-Fc hibritleri, ilk kez Yang et al. tarafından öne sürülmüş bir prosedürle (Yang et al., 2007) sentezlenmiştir. Öncelikle, CHIT (75,0 mg, 0,39 mmol NH_2) 15 mL 0,1 M asetik asitte çözeltisinde çözülmüştür. 15 mL metanolde çözülmüş olan Fc-CHO (39,0 mg, 0,18 mmol), ilk çözeltiye ilave edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 1 saat karıştırılmış, daha sonra NaCNBH_3 (23,0 mg, 0,36 mmol) karışıma eklenmiş ve 24 saat boyunca karıştırılmıştır. % 5,0 NaOH çözeltisi karışıma eklendiğinde, turuncu renkli bir katının çöktüğü görülmüştür. Turuncu çökelti süzülerek ayrılmış ve sırasıyla, distile su ve methanol ile yıkanmıştır. Son olarak, elde edilen ürün önce açık havada 3-4 saat, sonra vakumda kurutulmuştur. Ferrosenillerin polimere bağlanma derecesi (DS = degree of substitution) ^1H NMR spektroskopisiyle saptanmıştır.

CHIT-Fc polimerinde bulunan toplam demir içeriği ICP-MS ile tespit edilmiştir.

CHIT-Fc hibritlerinin sentezi Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde bulunan Katalizör Araştırma Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

2.5. *Gluconobacter oxydans* hücreleri için kültürasyon koşulları

G. oxydans hücrelerinin kültürasyonu için tek karbon kaynağı olarak glukoz içeren ortam kullanılmıştır (Çizelge 2.1). Ön kültür ortamı hücreleri depolama ve saklama amacıyla hazırlanmıştır. Hücreler 50 mL büyüme ortamı içeren 250

mL'lik erlenlerde, 175 rpm karıştırma hızında ve 28 °C'de kültive edilmiştir. Büyüme ortamları hazırlanırken ilk olarak 50 ml % 0,5 maya ekstraktı içeren erlenler otoklavlanmış, daha sonra ortama steril bir şekilde glukoz eklenmiştir (Odaci, 2010).

Çizelge 2.1. *G. oxydans* hücreleri için ön kültür ve büyüme ortamı kompozisyonları.

Ön kültür ortamı		Büyüme ortamı	
Bileşik	%	Bileşik	%
Glukoz	10	Glukoz	0,5
Maya ekstraktı	1		
Kalsiyum karbonat	2	Maya ekstraktı	0,5
Agar	2		

2.6. Biyosensörlerin Hazırlanması

Bu bölümde, elektrot temizliği, CHIT-Fc çözeltisinin, enzim ve mikrobiyal biyosensörlerin hazırlanması hakkında bilgi verilmiştir.

2.6.1. Camımsı karbon elektrot (GCE) yüzeyinin temizlenmesi

Elektrot modifikasyonlarından önce, GCE sırasıyla 1,0 ve 0,3 mm alumina süspansiyonları ile cılanmış ve distile suyla temizlenmiştir. Aynaya benzer bir yüzey elde etmek amacıyla yapılan bu işlemin son basamağında, GCE, etanol-distile su karışımında ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilmiştir.

2.6.2. CHIT-Fc çözeltisinin hazırlanması

% 1,0'lik (w/v) CHIT-Fc çözeltisi %1'lik asetik asit çözeltisi içinde hazırlanmış ve çözülmesi için oda sıcaklığında 1 saat karıştırılmıştır (Timur et al., 2008). Biyosensörlerin hazırlanmasında günlük CHIT-Fc çözeltisi kullanılmıştır.

2.6.3. CHIT-Fc/GOx biyosensörünün hazırlanması

- 1) 17 µL CHIT-Fc (%1,0 w/v) GCE yüzeyine damlatılmıştır.

- 2) Daha sonra, sodyum fosfat tamponunda (50 mM, pH 7,5) hazırlanmış, 5,0 μ L % 1,0 glutaraldehit çözeltisi damlatılmıştır.
- 3) Sodyum asetat çözeltisinde (50mM, pH 5,5) çözölmüş, 5,0 μ L GOx (= 125 U veya 2,5 mg) glutaraldehit vasıtasıyla matrise immobilize edilmiştir.
- 4) Modifiye elektrot, kuruması için oda sıcaklığında 90 dakika bekletilmiş ve distile suyla yıkanmıştır.

2.6.4. CHIT-Fc/*G. oxydans* biyosensörün hazırlanması

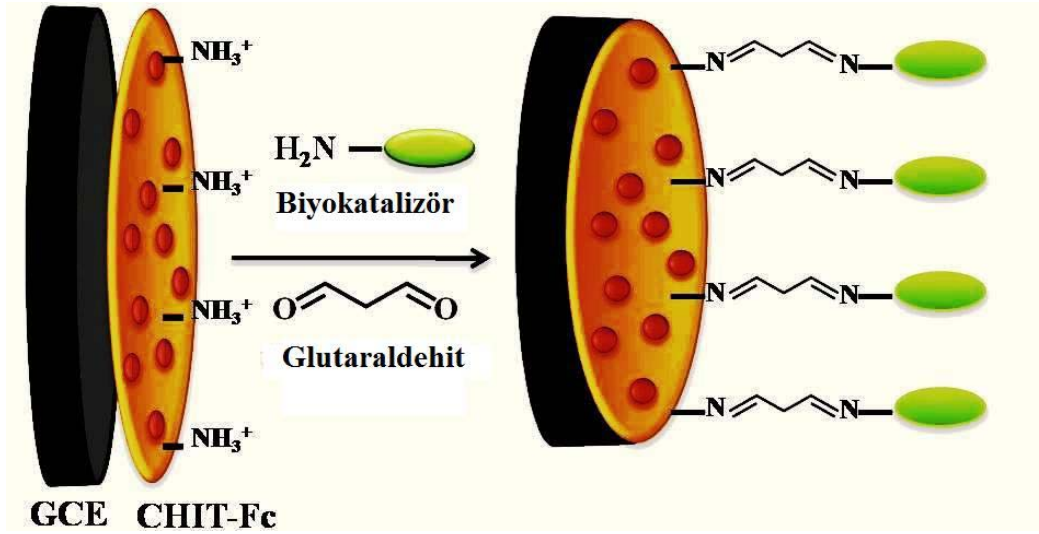
CHIT-Fc/*G. oxydans* biyosensörü, günlük inokulasyonlar sonucu elde edilen canlı *G. oxydans* hücrelerinin CHIT-Fc immobilizasyon matrisi aracılığıyla GCE yüzeyine immobilizasyonu ile hazırlanmıştır. Logaritmik fazın sonundaki hücrelerin optik yoğunlukları spektrofotometrik olarak ölçölmüştür. *G. oxydans* hücrelerinin optik yoğunlukları 600 nm’de (Gätgens et al., 2007) izlenmiştir. Hazırlanan her mikrobiyal biyosensörün aynı sayıda hücre içermesi biyosensörlerin performans faktörleri açısından önemlidir. Bu nedenle elde edilen optik yoğunluk sonuçlarına bağılı olarak gerekli seyreltmeler yapılarak biyosensörler hazırlanmıştır. Biyosensörlerin hazırlanışı sırasında ilk olarak hücreleri içeren 10 ml büyüme ortamı 10 dakika 4500 rpm karıştırma hızında santrifüjlenmiştir. Üst faz atılmış, çöken hücreler % 0,9 NaCl çözeltisinde seyreltilmiş, aynı koşullarda tekrar santrifüjlenmiştir. Üst faz atılmıştır. Elde edilen hücreler sodyum fosfat tamponunda (50 mM pH 6,0) çözölmüş ve bu karışım biyosensör hazırlanmasında kullanılmıştır.

Mikrobiyal biyosensörlerin hazırlanma aşamaları şöyledir:

- 1) 17 μ L CHIT-Fc (% 1,0 w/v) GCE yüzeyine damlatılmıştır.
- 2) Sodyum fosfat tamponunda (50 mM, pH 7,5) hazırlanmış, 5,0 μ L % 1,0 glutaraldehit çözeltisi CHIT-Fc matrisinin üzerine damlatılmıştır.
- 3) 5,0 μ L ($2,72 \times 10^9$ hücre) *G. oxydans* glutaraldehit vasıtasıyla matrise immobilize edilmiştir.

- 4) Modifiye elektrot, kuruması için oda sıcaklığında 90 dakika bekletilmiştir.
- 5) Elektrot yüzeyi distile su ile yıkanarak çalışma sıcaklığı ve tamponunda 10 dakika bekletilmiştir.

Şekil 2.2’de biyosensörlerin hazırlanma aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Biyosensörlerin hazırlanma aşamaları.

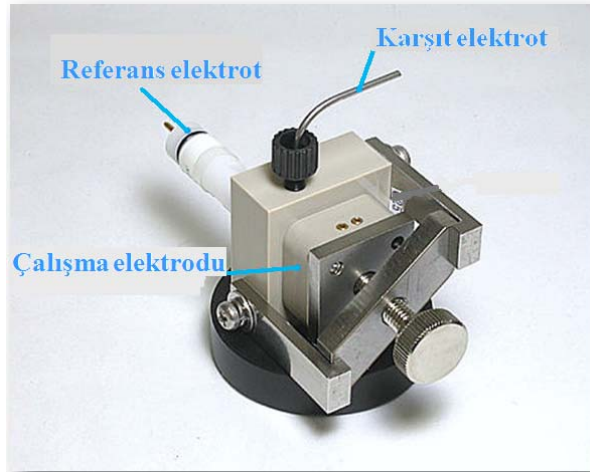
2.7. Ölçüm Prensibi

Redoks aktif CHIT-Fc filminin amperometrik deneylerde hangi potansiyelde (Ag/AgCl'ye karşı) maksimum aktivite gösterdiğini belirlemek amacıyla 0,5 V ile 0,0 V potansiyel aralığında döngüsel voltametri (CV) ölçümleri yapılmıştır. % 1,0 glutaraldehit çözeltisi kullanılarak CHIT-Fc kaplanmış GC elektrodun elektrokimyasal davranışı incelenmiştir. CV ölçümleri sırasında, üçlü elektrot sistemi kullanılmıştır. Ferrosenin indirgenip, yükseltgenmesiyle oluşan tersinir sinyaller kaydedilmiş, amperometrik ölçümlerde kullanılacak olan formal potansiyel belirlenmiştir.

2.7.1. CHIT-Fc/GOx biyosensörünün ölçüm prensibi

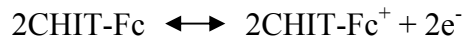
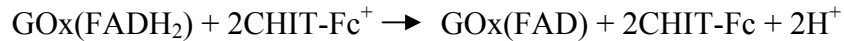
CHIT-Fc/GOx biyosensörünün kullanımıyla yapılan ölçümlerde, +0,35 V (Ag/AgCl'ye karşı) potansiyel uygulaması altında CHIT-Fc filminde bulunan ferrosenin yükseltgenmesiyle oluşan akım değerleri temel alınmıştır.

Amperometrik ölçümlerden önce, taşıyıcı çözelti olan 50 mM pH 5,5 sodyum asetat tamponu 0,9 mL/dakika sabit hızda 650 saniye boyunca sistemden geçirilmiştir. Bunun nedeni, yüzeye sıkı bağlanamamış GOx moleküllerini uzaklaştırıp, arka plan akımını düşürmektir. Arka plan akımı sabit duruma gelince, 100 µL standart glukoz çözeltisi (veya seyreltilmiş içecek örnekleri) sabit zaman aralıklarıyla akışa hücresine (Şekil 2.3) enjekte edilmiştir. Arka plan akımı ile enzimatik reaksiyondan dolayı oluşan pik akımı arasındaki fark ölçülmüştür. Oluşan akım farklılıkları substrat konsantrasyonu ile orantılıdır ve nA olarak belirlenmiştir. Yapılan deneyler sonucu, glukoz konsantrasyonu ile akım değerindeki farklılıklar arasındaki ilişkiyi göstermek amacıyla grafikler çizilmiş ve çeşitli parametrelerin biyosensör cevabına etkileri belirlenmiştir.



Şekil 2.3. Akış hücresi.

Akış hücresine enjekte edilen substrat sayesinde oluşan enzimatik reaksiyonlar aşağıdaki gibidir (Liang et al., 2009):



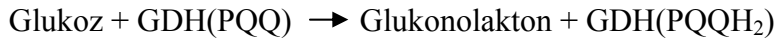
Öncelikle, glukoz, GOx varlığında enzimatik oksidasyona uğrar ve ürün olarak glukonolakton oluşur. Daha sonra indirgenmiş enzim, yükseltgenmiş redoks polimer (Fe(III)⁺) ile reaksiyona girer. Son olarak, indirgenmiş redoks polimer (Fe(II)) tekrar yükseltgenirken, elektronlarını çalışma elektroduna verir. Bu son reaksiyon sayesinde akım artışı olur. Yüksek glukoz konsantrasyonlarında, yüksek amperometrik cevaplar alınır.

2.7.2. CHIT-Fc/*G. oxydans* biyosensörünün ölçüm prensibi

Mikrobiyal biyosensörle yapılan ölçümlerde de, +0,35 V (Ag/AgCl'ye karşı) potansiyel uygulaması altında CHIT-Fc filminde bulunan ferrosenin yükseltgenmesiyle oluşan akım değerleri temel alınmıştır.

CHIT-Fc/*G. oxydans* biyosensörü ile yapılan çalışmalarda, +0,35 V'ta amperometrik ölçümler yapılmıştır. Ölçümlerden önce, 50 mM pH 6,0 sodyum fosfat tamponu 0,9 mL/dakika sabit hızda 650 saniye boyunca sistemden geçirilmiştir. 100 µL standart glukoz çözeltisi sabit zaman aralıklarıyla akışa hücresine enjekte edilmiştir. Metabolik aktivite sonucu, substrat enjekte etmeden önce ve ettikten sonraki akım değerleri birbirinden farklıdır. Oluşan pik akımı substrat yokluğundaki arka plan akımı arasındaki fark alınmıştır. Akım farklılıkları substrat konsantrasyonu ile orantılıdır ve nA olarak verilmiştir. Akım farklılıkları ve glukoz arasındaki ilişki grafiklerle belirtilmiş ve çeşitli parametrelerin biyosensör cevabına etkileri belirlenmiştir.

Medyatörlü mikrobiyal biyosensör sisteminde substrat varlığında oluşan katalitik reaksiyonlar şöyledir:



Oluşan ilk reaksiyonda, *G. oxydans* hücrelerinin membranına bağlı PQQ molekülünü prostetik grup olarak kullanan GDH, glukozu glukonolaktona yükseltgerken, kendisi indirgenir. İndirgenmiş enzim yükseltgenmiş redoks polimer (Fe(III)⁺) ile reaksiyona girer. Son olarak, indirgenmiş redoks polimer

(Fe(II)) tekrar yükseltgenirken, elektronlarını çalışma elektroduna verir. Bu son reaksiyon sayesinde akım artışı olur ve amperometrik ölçümler gerçekleşir.

2.8.Trinder Metodu ile Glukoz Tayini

Hazırlanan biyosensör sistemleri ile glukoz analizi için örnek uygulaması yapılmıştır. Daha sonra referans yöntem olarak Trinder metodu (Barham and Trinder, 1972) ile de örneklerde glukoz miktarı belirlenmiş ve çıkan sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Bu metotta gerçekleşen 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 kinon imin glukoz konsantrasyonu ile orantılıdır ve spektrofotometrik olarak izlenerek tayin gerçekleştirilir. Glukoz miktarının tayini için 500 nm'deki absorbans değerleri gereklidir.

Glukoz tayini için gazlı örneğin gazı alınmış ve örnekler 50 mM pH 5,5 asetat taponunda 1:20 oranında seyreltilmiştir. Günlük hazırlanmış CHIT-Fc/GOx biyosensörü ile kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve örneklerdeki glukoz miktarını saptamak için kullanılmıştır. Biyosensörden alınan değerlerle, referans yöntemden alınan değerler birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

2.9.CHIT-Fc'ye Yönelik Çalışmalar

Bu bölümde, sentezlenen CHIT-Fc hibritinin karakterizasyonuna ve elektrot yüzeyindeki CHIT-Fc filminin elektrokimyasal karakterizasyonuna yönelik çalışmalar anlatılmıştır.

2.9.1.CHIT-Fc'nin karakterizasyonu

Ferrosenin kitosana kovalent bağlanmasıyla sentezlenen redoks aktif biyopolimer CHIT-Fc'nin yapısal karakterizasyonu yapılmıştır. ICP-MS, FT-IR-ATR ve ¹H NMR CHIT-Fc polimerinin sentezini doğrulamak ve yapısını belirlemek için kullanılmıştır.

2.9.2. CHIT-Fc filminin elektrokimyasal karakterizasyonu

CHIT-Fc filminin elektrokimyasal aktivitesi incelenmiştir. %1,0 glutaraldehit çözeltisi ile hazırlanan CHIT-Fc elektrodu döngüsel voltametri yöntemiyle 0,5-0,0 V potansiyel aralığında taranmıştır.

2.10. CHIT-Fc/GOx Biyosensörüne Yönelik Çalışmalar

Redoks aktif biyopolimer olan CHIT-Fc filminin ilk uygulaması, üzerine GOx immobilize edilerek yapılmıştır. Hazırlanan CHIT-Fc/GOx biyosensörüne ilişkin ilk çalışma aktivitede etkili önemli bir parametre olan pH optimizasyonudur. Daha sonra, enzim ve glutaraldehitin optimum miktarı belirlenmiştir. Son olarak, biyosensörün glukoz için analitik karakterizasyonu ve örnek uygulaması gerçekleştirilmiştir.

2.10.1. Optimum pH'ın belirlenmesi

CHIT-Fc/GOx biyosensörünün optimum pH'ını belirlemek amacıyla 50 mM, pH 4,5; 5,0; 5,5 sodyum asetat ve pH 6,0; 6,5 sodyum fosfat tamponları hazırlanmıştır. Farklı tamponlar ve 8,0 mM glukoz sisteme enjekte edilerek biyosensörün akım değerlerindeki farklanma belirlenmiştir. Elde edilen biyosensör cevaplarından en yüksek akım değeri 100 olarak kabul edilerek diğer akım değerleri, en yüksek akım değeri ile oranlanarak bağıl değerler hesaplanmıştır. Bu veriler doğrultusunda pH değişimine bağlı % biyosensör cevabına ilişkin grafik çizilmiştir.

2.10.2. Enzim miktarının biyosensör cevabına etkisi

Optimum enzim miktarını belirlemek amacıyla diğer bileşenler sabit tutularak farklı miktarlarda GOx içeren biyosensörler hazırlanmış ve GOx miktarının biyosensör cevabına etkisi belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda 50 U (1,0 mg), 125 U (2,5 mg) ve 250 U (5 mg) aktiviteye sahip GOx kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle, değişen glukoz konsantrasyonu ve akım değerleri arasında grafik oluşturulmuştur. En iyi biyosensör cevabına sahip olan sistem belirlenmiştir. Taşıyıcı çözelti olarak 50 mM pH 5,5 sodyum asetat tamponu kullanılmış ve ölçümler oda sıcaklığında, + 0,35 V'ta gerçekleştirilmiştir.

2.10.3. Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

GOx enziminin CHIT-Fc matrisine kararlı bir şekilde immobilize edilmesinde çapraz bağlayıcı ajan olarak glutaraldehit kullanılmıştır. Optimum glutaraldehit yüzdesini belirlemek amacı ile % 0,5; 1,0; 2,5 ve 5,0 glutaraldehit içeren dört farklı biyosensör hazırlanmıştır. Bu biyosensörlerle, 8,0 mM glukoz konsantrasyonunda alınan akım cevapları arasında grafik oluşturulmuştur. Taşıyıcı çözelti olarak 50 mM pH 5,5 sodyum asetat tamponu kullanılmış ve ölçümler oda sıcaklığında, + 0,35 V'ta gerçekleştirilmiştir.

2.10.4. CHIT-Fc /GOx biyosensörünün karakterizasyonu

Enzim biyosensörünün analitik karakterizasyonuna yönelik olarak glukoz için doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik, operasyonel kararlılık ve depo kararlılığı belirlenmiş, tekrar üretilebilirlik incelenmiş ve örneklerde glukoz analizi yapılmıştır.

2.10.4.1. Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrası karakterizasyonu amacıyla kalibrasyon grafiği çizilerek glukoz için doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir. Taşıyıcı çözelti olarak 50 mM pH 5,5 sodyum asetat tamponu kullanılmış ve ölçümler oda sıcaklığında, + 0,35 V'ta gerçekleştirilmiştir.

2.10.4.2. Tekrarlanabilirlik, operasyonel kararlılık ve depo kararlılığının belirlenmesi

Tekrarlanabilirliğin belirlenmesine yönelik olarak optimum koşullarda hazırlanan biyosensöre, 8,0 mM glukoz standardı için 10 kere enjeksiyon yapılmıştır. Daha sonra, çizilen kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak elde edilen akım değerlerine karşılık gelen glukoz konsantrasyonları hesaplanmıştır. Son olarak, standart sapma (SS) ve % variasyon katsayısı (% VK) hesaplanmıştır.

Optimum koşullarda hazırlanan biyosensörün operasyonel kararlılığını belirlemek amacıyla 8,0 mM glukoz standardı ile 7,2 saatte 208 enjeksiyon

yapılmıştır. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevabı % 100 kabul edilerek tekrarlı enjeksiyonlardan sonra biyosensör cevabında meydana gelen azalmalar hesaplanmıştır.

Optimum koşullarda hazırlanan enzim biyosensörünün depo kararlılığının belirlenmesi amacıyla 2 veya 3 günde bir 8,0 mM glukoz standardı ile enjeksiyon yapılmıştır. Alınan ilk akım cevabı % 100 alınarak 14 gün sonunda biyosensörün aktivitesinin ne kadarının kaybolduğu tespit edilmiştir. Biyosensör kullanılmadığı zamanlarda pH 5,5 sodyum asetat tamponunun içinde + 4 °C’de saklanmıştır.

2.10.4.3. Tekrar üretilebilirliğin incelenmesi

Optimum koşullarda farklı günlerde hazırlanmış, 3 CHIT-Fc/GOx biyosensörünün, farklı glukoz konsantrasyonlarına karşılık gelen akım değerlerine göre kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Bu 3 farklı kalibrasyon grafiğinin doğru denklemleri birbiriyle karşılaştırılmış ve yorumlanmıştır.

2.10.5. Örneklerde glukoz analizi

Hazırlanan GOx biyosensörünün örneklerdeki glukoz analizine yönelik uygulanabilirliğini izlemek amacıyla iki tane içecek örneği kullanılmıştır. Akış hücrelerine glukoz yerine içecekler 1:20 oranında (50 mM pH 5,5 asetat tamponunda) seyreltilerek enjekte edilmiş ve günlük çizilmiş kalibrasyon grafiğinden içecek örneklerinin glukoz konsantrasyonları hesaplanmıştır. Ayrıca referans yöntem olarak Trinder metodu (Barham and Trinder, 1972) ile de örneklerdeki glukoz konsantrasyonları belirlenmiş ve sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

2.11. CHIT-Fc/*G. oxydans* Biyosensörüne Yönelik Çalışmalar

Mikrobiyal biyosensör sisteminin hazırlanmasında bir asetik asit bakterisi olan *G. oxydans* hücreleri kullanılmıştır. Canlı hücreler kullanılarak tasarlanmış mikrobiyal biyosensörde ölçümler, hücrelerin yaşamsal aktivitelerinden yararlanarak gerçekleştirilmektedir. Gram negatif bir bakteri olan *G. oxydans* kullanılarak hazırlanmış biyosensörlerde ilk olarak optimum pH belirlenmiştir. Daha sonra, hücre ve glutaraldehit miktarı gibi hazırlama koşulları optimize

edilmiştir. Optimum koşullarda hazırlanan CHIT-Fc/*G. oxydans* biyosensörünün glukoz için tayin aralığı belirlenmiştir. Son olarak, tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılık çalışmaları yapılmıştır.

2.11.1. Optimum pH'nın belirlenmesi

G. oxydans biyosensörünün optimum pH'sını belirlemek amacıyla 50 mM pH 5,5 sodyum asetat tamponu ve pH 6,0; 6,5; 7,0 sodyum fosfat tamponları kullanılarak akım değerlerindeki farklanmalar incelenmiştir. Oluşturulan grafikte en iyi akım cevabının alındığı pH değeri ile hazırlanan tampon sistemi tüm çalışmalarda taşıyıcı çözelti olarak kullanılmıştır.

2.11.2. Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisi

Hücre miktarı optimizasyonu için diğer bileşenler sabit tutularak dört farklı miktarda hücre içeren ($0,68 \times 10^9$, $1,36 \times 10^9$, $2,72 \times 10^9$, $5,45 \times 10^9$ hücre) mikrobiyal biyosensörler hazırlanmıştır. Biyosensörler hazırlanırken ilk önce hücreler santrifüjlenmiş ve hücre pastaları 50 mM pH 6,0 sodyum fosfat tamponunda çözölmüştür. Her biyosensör için sabit hacim olan 5,0 μ l hücre, 5,0 μ l % 1,0 glutaraldehit çözeltisi vasıtasıyla CHIT-Fc modifiye GC elektrodunun yüzeyine immobilize edilmiştir. Hazırlanan biyosensörler farklı glukoz konsantrasyonlarında ölçölmüştür. Elde edilen akım değeri ve glukoz konsantrasyonu arasında grafikler çizilmiştir. En yüksek biyosensör cevabına karşılık gelen hücre miktarı daha sonraki çalışmalarda kullanılmıştır. Taşıyıcı çözelti olarak 50 mM pH 6,0 sodyum fosfat tamponu kullanılmış ve ölçömler oda sıcaklığında, + 0,35 V'ta gerçekleştirilmiştir.

2.11.3. Glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

CHIT-Fc/*G. oxydans* biyosensörü için optimize edilen son parametre glutaraldehit yüzdesidir. Optimum glutaraldehit yüzdesini belirlemek amacı ile % 0,5; 1,0; 2,5 ve 5,0 glutaraldehit içeren dört farklı mikrobiyal biyosensör hazırlanmıştır. Bu dört farklı biyosensörle, 10 mM glukoz için alınan akım cevapları arasında grafik oluşturulmuştur. Taşıyıcı çözelti olarak 50 mM pH 6,0

sodyum fosfat tamponu kullanılmış ve ölçümler oda sıcaklığında, + 0,35 V'ta gerçekleştirilmiştir.

2.11.4. CHIT-Fc/*G. oxydans* biyosensörünün karakterizasyonu

Mikrobiyal biyosensörün karakterizasyonu için glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılık belirlenmiştir.

2.11.4.1. Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Optimum çalışma ve hazırlama koşullarında *G. oxydans* biyosensörleri ile glukoz tayini gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki glukoz çözeltileri taşıyıcı çözelti ile akış hücresine enjekte edilerek glukoz konsantrasyonuna bağlı akım değerleri kaydedilmiştir. Akım ve glukoz konsantrasyonu arasındaki kalibrasyon grafiği çizilerek, glukoz için doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir. Taşıyıcı çözelti olarak 50 mM pH 6,0 sodyum fosfat tamponu kullanılmıştır ve ölçümler oda sıcaklığında, + 0,35 V'ta gerçekleştirilmiştir.

2.11.4.2. Tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılığın belirlenmesi

Optimum koşullarda hazırlanmış *G. oxydans* biyosensörünün tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla, 10 mM glukoz standardı ile 10 kez enjeksiyon yapılmıştır. Mikrobiyal biyosensör için çizilmiş kalibrasyon grafiği kullanılarak, ölçülen akım değerlerine karşılık gelen konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Son olarak, SS ve % VK hesaplanmıştır.

Operasyonel kararlılığın belirlenmesine yönelik olarak hazırlanan biyosensöre 10 mM glukoz ile 3 saatte 72 enjeksiyon yapılmıştır. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevabı % 100 kabul edilerek tekrarlı enjeksiyonlardan sonra biyosensörde meydana gelen aktivite kaybı hesaplanmıştır.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Araştırmanın sonucunda elde edilen bulgular bu bölümde verilmiş ve tartışılmıştır.

3.1.CHIT-Fc'ye İlişkin Bulgular

Birçok redoks medyatör arasından, Fc ve türevleri ilgi çeken özelliklere sahiptir. Bu özellikleri; göreceli olarak düşük moleküler ağırlığa sahip olması, birçok elektroaktif maddeye karşı hızlı cevap vermesi, pH'tan bağımsız olması, hem yükseltgenmiş hem de indirgenmiş halinin kararlı olması, hızlı elektron transferi yapabilmesi, ortamda bulunan O₂ ile reaksiyona girmemesi ve düşük potansiyelde rejenere olması şeklinde sıralanabilir. Bu sayede kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrotların geliştirilmesinde en sık kullanılan medyatör sınıfı olmuştur (Chaubey and Malhotra, 2002; Raoof et al., 2009; Zhilei et al., 2010). Fakat Fc molekülünün elektrot yüzeyine adsorpsiyonu zayıftır ve yığın çözeltiye kolayca karışabilir. Bu yüzden, Fc bir polimere bağlanarak yığın çözeltiye sızma problemi çözülebilir (Zhilei et al., 2010).

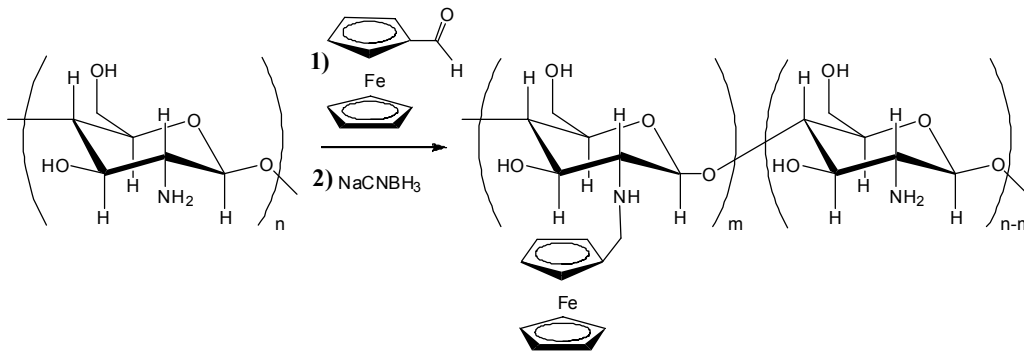
CHIT, dünyada selülozdan sonra en sık rastlanan polisakkarit olan kitinin kısmi deasetilasyonu ile sentezlenir (Rinaudo, 2006). CHIT, N-asetil-D-glukozamin birimlerinin $\beta(1 \rightarrow 4)$ biçiminde bağlanmasıyla meydana gelmiş, biyoyumlu bir polimerdir (Pillai et al., 2009). CHIT, D-glukozamin birimlerinin amino grupları sayesinde, asidik koşullarda katyonik ve çözünür bir polisakkarittir. Ayrıca, CHIT çok iyi membran oluşturma, iyi biyoyumluluk, suya karşı yüksek geçirgenlik, yüksek adezyon kuvveti, toksik olmama, dayanıklı olma ve kimyasal modifikasyona yatkın olma gibi eşsiz fizikokimyasal özelliklere sahiptir (Honarkar and Barikani, 2009; Pillai et al., 2009). Bu özelliklerinden dolayı CHIT'e, sensörlerde, biyosensörlerde ve immunosensörlerde sıkça immobilizasyon materyali olarak karşılaşılmaktadır (Kuralay et al., 2011; Pauliukaite et al., 2010; Wang et al., 2009). Fakat CHIT'in elektriksel iletkenliği düşüktür. CHIT ve Fc'nin kovalent bağlanmasıyla, hem Fc'nin yığın çözeltiye sızma hem de CHIT'in düşük iletkenlik problemi ortadan kalkmış olur (Kandimalla et al., 2006; Qiu et al., 2009; Zhang and Gorski, 2005).

Tüm elektrokimyasal deneylerde dönüştürücü olarak kullanılan GCE, elektrokimyasal çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. GC elektrodunun özellikleri arasında düşük elektriksel direnç ve kimyasal ataklara karşı çok yüksek kararlılık sayılabilir (Zhilei et al., 2010). Kullanılan tamponlar ölçümlerden önce nitrojen gazından geçirilmemiştir çünkü daha önce yapılan çalışmalarda tamponda çözünmüş oksijenin Fc modifiye elektrotların elektrokimyasal cevaplarını etkilemediği ve nitrojen geçirilmiş veya geçirilmemiş tamponların neredeyse aynı cevabı verdiği tespit edilmiştir (Chen et al., 2003).

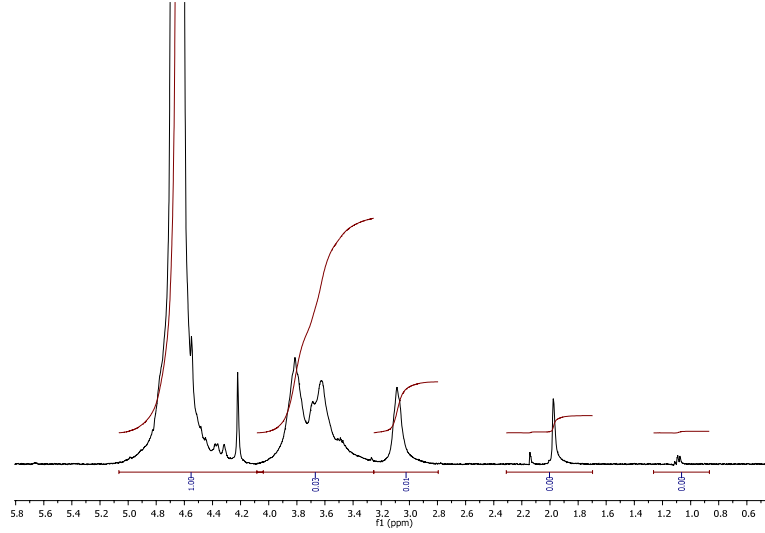
Bu kısımda, sentezlenen CHIT-Fc molekülünün yapısal özelliklerini saptamak için çeşitli yöntemlerle karakterizasyonuna ilişkin sonuçlar verilmiştir. Daha sonra, film şeklinde GC elektroduna kaplanmış olan CHIT-Fc'nin elektrokimyasal karakterizasyonu ile ilişkin veriler sunulmuştur.

3.1.1. CHIT-Fc'nin karakterizasyonu

CHIT-Fc biyopolimeri, Yang et al. tarafından önerilen iki basamaklı prosedüre göre sentezlenmiştir (Yang et al., 2007). İlk basamakta, Fc-CHO'nun aldehit grubu ile CHIT'in amino grubu arasındaki reaksiyonla Schiff bazı oluşur. İkinci basamakta ise Schiff bazı NaCNBH_3 ile amine indirgenir (Şekil 3.1). CHIT-Fc'nin yapısı ^1H MNR, ICP-MS ve FT-IR-ATR analizleri ile belirlenmiştir. Ferrosenillerin DS değeri ^1H NMR ile ferrosenil protonlarının ($\delta = 4,22\text{-}4,38$; $0,99$ H), glukozamin (GlcN) ve *N*-alkillenmiş glukozamin H^2 ($\delta = 3,09$; $0,71$ H) piklerinin alanları birbirine oranlandığında $0,16$ olarak bulunmuştur (Şekil 3.2). Bu değer CHIT polimerindeki 100 NH_2 grubundan 16 tanesinin ferrosenil grupları ile reaksiyona girdiğini göstermektedir.



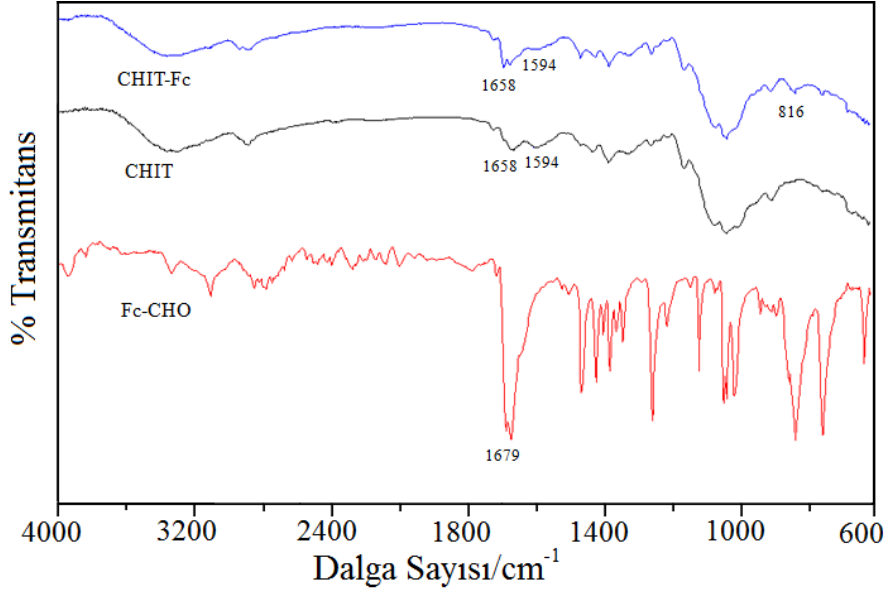
Şekil 3.1. CHIT-Fc türevinin sentezi.



Şekil 3.2. CHIT-Fc'nin ^1H NMR spektrumu.

CHIT-Fc (DS = 0,16) için ^1H NMR (D_2O içinde % 2,0 CF_3COOD): $\delta = 1,98$ (s, 0,23 H, GlcNAc'nin NHAc), 3,09 (s, 0,71 H, GlcN ve *N*-alkillenmiş GlcN'nin H^2), 3,63-3,81 (m, 3,15 H, FcCH_2N , GlcNAc'nin H^2 ve GlcN, GlcNAc ve *N*-alkillenmiş GlcN'nin $H^{3,4,5,6}$), 4,22-4,38 (m, 0,99 H, Fc'nin Cp-H).

ICP-MS ölçümlerine göre CHIT-Fc biyopolimerindeki demirin ağırlık yüzdesi % 6,2 olarak bulunmuştur. Yang et al. yapmış olduğu FT-IR-ATR analizinde, CHIT'deki amit bantlarının, 1654 ve 1596 cm^{-1} civarında karakteristik piklerini tespit etmiştir (Yang et al., 2007). Araştırmada, CHIT ve CHIT-Fc polimerleri için bu pikler 1658 ve 1594 cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir (Şekil 3.3). Glukozamin birimi ve Fc-CHO arasında oluşan *N*-alkilasyonu sayesinde, birincil amine (N-H) ait 1594 cm^{-1} 'deki pikin şiddeti azalmıştır. 1679 cm^{-1} 'de bulunan Fc-CHO'nun karakteristik C=O piki, CHIT-Fc spektrumunda görülmemiştir. Ayrıca, siklopentadienil grubundaki C-H piki de 816 cm^{-1} 'de diğer bir absorpsiyon bandı olarak tespit edilmiştir. Böylece, ferrosenillerin CHIT-Fc'de bulunduğu sonucuna varılmıştır.

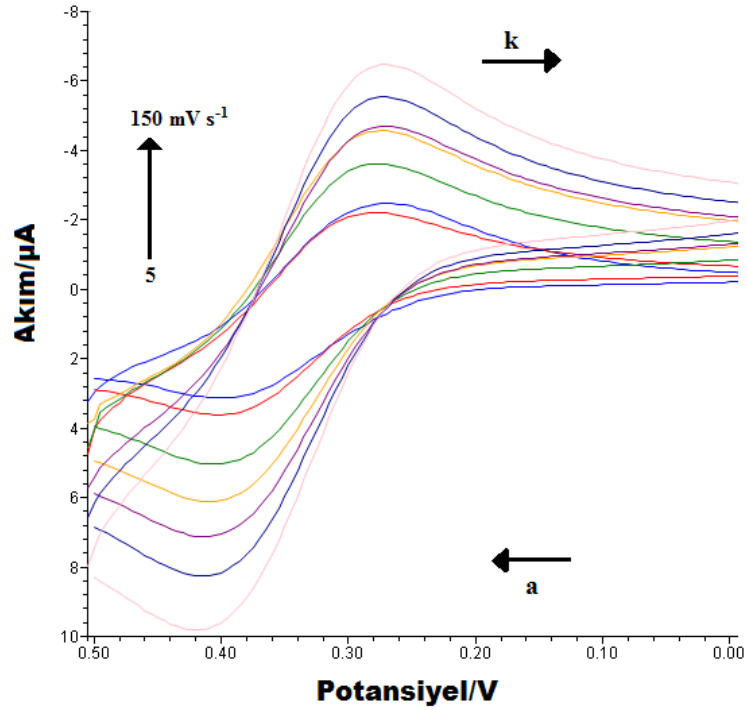


Şekil 3.3. CHIT-Fc, CHIT ve Fc-CHO'nun FT-IR spektrumu.

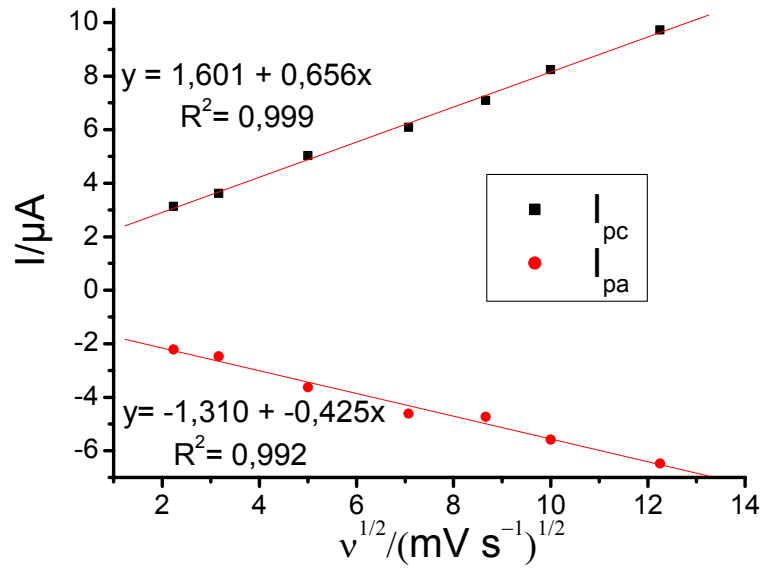
3.1.2. CHIT-Fc filminin elektrokimyasal karakterizasyonu

Amperometrik deneylerde belli bir potansiyel uygulaması altında akım değerleri ölçülür. Uygulanacak bu potansiyel, redoks aktif molekülün yani medyatörün formal potansiyelidir ve redoks reaksiyonlarının gerçekleşmesi bu potansiyele bağlıdır. Bu nedenle daha sonraki deneylerde biyosensörlerin ölçümlerinde kullanmak amacıyla, sentezlenen CHIT-Fc hibridinin elektrokimyasal aktivitesinin araştırılması için CV çalışmaları yapılmıştır. %1,0'lik CHIT-Fc ve % 1,0'lik glutaraldehit çözeltisiyle hazırlanan CHIT-Fc/Glutaraldehit modifiye elektrodun, 50 mM pH 5,5 asetat çözeltisinde, 5,0-150 mV s⁻¹ arasında artan tarama hızıyla, 0,5-0,0 V potansiyel uygulaması altında akım değerleri ölçülmüştür (Şekil 3.4). Açıkça görülen döngüsel voltamogramlarda Fc'nin indirgenmesi (katodik) ve yükseltgenmesine (anodik) ait iki tane tersinir redoks piki tespit edilmiştir. Tarama hızı 5,0'ten 150 mV s⁻¹'e arttıkça, pik akımları da artmış fakat katodik ve anodik pik potansiyelleri sabit kalmıştır. Hem anodik hem de katodik pik akımları, tarama hızının kareköküyle doğru orantılıdır (Şekil 3.5). Buradan elektrotta gerçekleşen reaksiyonların difüzyon kontrollü olduğu kanısına varılmıştır. Aynı olay ferrosen içeren nanokompozit kitosanda da görülmüştür (Qiu et al., 2007). Katodik ve anodik pik potansiyellerinin ortalaması olan 0,35 V (Ag/AgCl'ye göre) Fc'nin formal

potansiyelini (E^0) vermiştir. Bu potansiyel daha sonra yapılacak olan amperometrik deneylerde uygulama potansiyeli olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.4. CHIT-Fc/Glutaraldehyt modifiye elektrodun sodyum asetat tamponunda (50 mM, pH 5,5) 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 mV s^{-1} tarama hızlarındaki döngüsel voltamogramları.



Şekil 3.5. Akım değerleri ile tarama hızının karekökü arasındaki ilişkiyi gösteren grafik.

3.2.CHIT-Fc/GOx Biyosensörüne İlişkin Bulgular

Biyosensörler ve FIA sisteminin birlikte kullanımının çok çeşitli uygulamaları vardır (Lanyon et al., 2004; Liu et al., 2011; Piano et al., 2010; Rose et al., 2001; Yuksel et al., 2011). FIA sisteminde biyosensörler, ölçümler sırasında substrata kısa süreliğine maruz kalırken, kesikli sistemlerde substrat çözeltisinin içerisinde daha uzun süre kalırlar. FIA sistemi kullanılarak analiz süresi kısaltılabilir çünkü işlem hacmi daha yüksektir. Az miktarda substratla bile ölçüm yapılabilir ve böylece maliyet ve atık azalır (Baronas et al., 2011). Sistemde detektörden sürekli sıvı akışı olduğu için, ölçümlerden sonra oluşan reaksiyon ürünleri biyosensör yüzeyinden uzaklaştırılır ve kontaminasyon riski ortadan kalkar (Silva et al., 2005). Bu sayede, biyosensörün kararlılığı uzun süre korunmuş olur. FIA otomasyon için uygun bir sistemdir. Bu nedenle, dışarıdan müdahale gerekmeden, sistem, sabit hacimde örneği, devamlı akış halinde olan taşıyıcı çözeltiye enjekte edebilir ve sonrasında detektörde ölçüm gerçekleşir (Oliveira et al., 2010). FIA sisteminin tüm bu avantajlarından yararlanmak için tüm amperometrik ölçümlerde bu sistem kullanılmıştır. Çalışmanın bu bölümünde, işlevselleştirilmiş bir biyopolimer olan CHIT-Fc'nin üzerine GOx enzimi immobilize edilerek hazırlanan CHIT-Fc/GOx modifiye GC elektroduna ilişkin sonuçlar sunulmuştur. Öncelikle biyosensörü hazırlama ve çalışma koşulları belirlenmiştir. Daha sonra, glukoz için analitik karakterizasyon ve son olarak örnek uygulaması yapılmıştır.

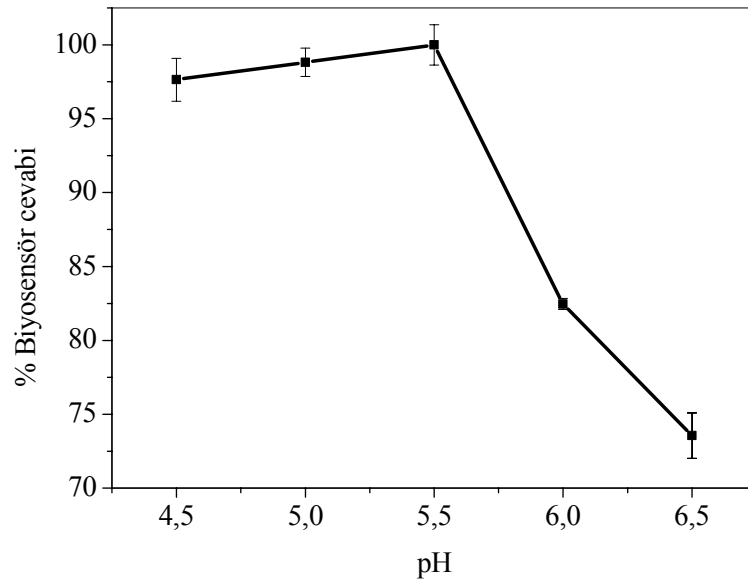
3.2.1.Optimizasyon çalışmaları

CHIT-Fc/GOx biyosensörü için yapılan optimizasyon çalışmalarında birçok parametrenin biyosensörün akım cevabını nasıl etkilediği araştırılmıştır. Bu çerçevede, çalışma koşullarının optimizasyonuna yönelik olarak pH'ın ve hazırlama koşullarının optimizasyonuna yönelik olarak enzim miktarının ve glutaraldehit yüzdesinin akım cevabına etkisine ilişkin incelemeler yapılmıştır.

3.2.1.1. Optimum pH

Tampon çözeltinin pH'ı enzim üzerinde etkili bir parametredir çünkü yapısında değişikliklere neden olabilir. Bu nedenle pH enzimin maksimum

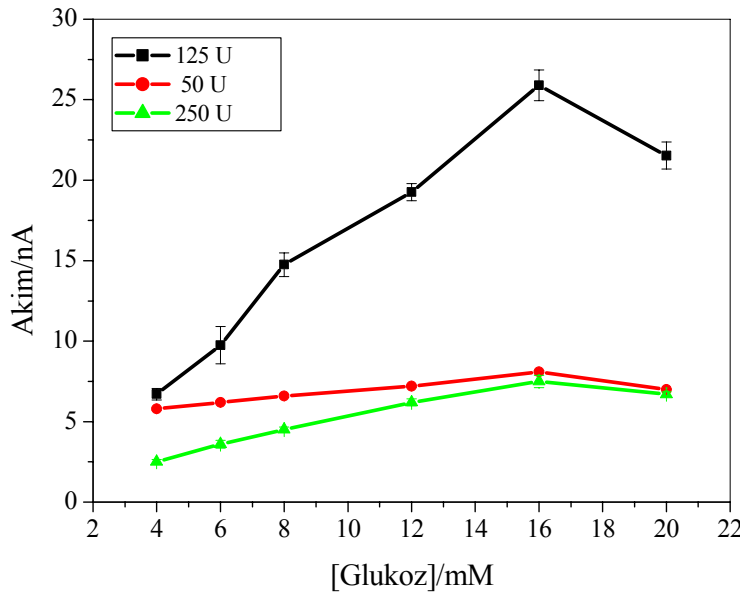
aktivitesinin ve katalizör etkinliğinin korunması açısından önemlidir (Bankar et al., 2009). Enzimin aktivitesi de biyosensörün performansını direkt olarak etkilediği için optimum pH'ı belirlemek gereklidir. CHIT-Fc/GOx biyosensörünün optimum pH'ını tespit etmek amacıyla, 8,0 mM glukoz substratı çeşitli pHlar'daki taşıyıcı çözeltilere enjekte edilmiştir (Şekil 3.6). Test edilen taşıyıcı çözeltiler, 50 mM pH 4,5; 5,0; 5,5 sodyum asetat ve pH 6,0; 6,5 sodyum fosfat tamponlarıdır. Gerçekleştirilen deneyler sonrasında pH ve % biyosensör cevabı arasında grafik oluşturulmuştur. Biyosensör cevabı pH 4,5-5,5 arasında artış göstermiş ve en yüksek cevap pH 5,5'ta alınmıştır. pH 5,5'tan sonra biyosensör cevabında düşüş gözlemlenmiştir. Bu nedenle sonraki deneyler için GOx biyosensörünün optimum taşıyıcı çözelti pH'ı 5,5 olarak seçilmiştir. Serbest GOx enzimin optimum pH'ı da 5,5'tur (Bright and Appleby, 1969; Weibel and Bright, 1971). Bu nedenle immobilizasyon sonrasında enzimin yapısının ve yüzeyindeki yük dağılımının değişmediği sonucuna varılmıştır.



Şekil 3.6. Biyosensör cevabına pH'ın etkisi (50 mM pH 4,5-5,5 sodyum asetat, pH 6,0-6,5 sodyum fosfat tamponları, 0,9 mL/dakika, % 1,0 CHIT-Fc, % 1,0 glutaraldehit, 50 U GOx, 8 mM glukoz, + 0,35 V, oda sıcaklığı, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

3.2.1.2. Enzim miktarının optimizasyonu

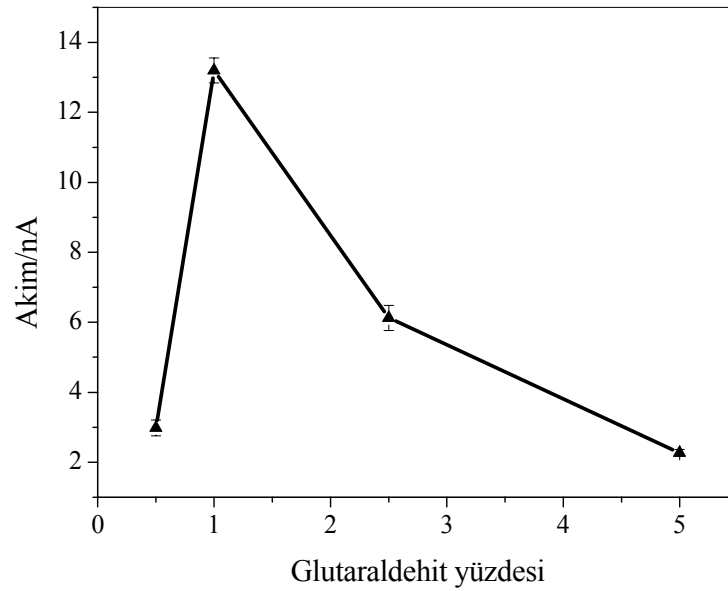
İkinci nesil amperometrik enzim biyosensörlerinde gerçekleşen katalitik reaksiyonların ilk basamağında enzim ile substrat etkileşir ve daha sonra indirgenen enzim medyatör sayesinde tekrar yükseltgenir. Son olarak elektrotta medyatör yükseltgenerek akım cevabı oluşur. Biyosensörlerde meydana gelen bu katalitik işlemlerden yola çıkılarak, biyosensörün performansının enzim miktarına bağlı olduğu görülmektedir. Bu yüzden, CHIT-Fc üzerine immobilize edilmiş GOx miktarının, FIA sistemine çeşitli konsantrasyonlarda glukoz enjekte edilerek, biyosensörün akım cevabına etkisi araştırılmıştır (Şekil 3.7). GOx miktarı 50 U'dan 125 U'ya arttırılınca, akım cevabında artış olmuştur. Fakat enzim miktarının 250 U'ya çıkartılmasıyla, akım cevabı azalmıştır. Bunun nedeni fazladan arttırılmış enzimin CHIT-Fc/GOx kompozitinin iletkenliğini azaltması olabilir (Kandimalla et al., 2006; Tripathi et al., 2006). Sonuç olarak, 125 U GOx daha sonraki enzim biyosensörü çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 3.7. Enzim miktarının biyosensör cevabına etkisi (50 mM pH 5,5 sodyum asetat, 0,9 mL/dakika, % 1,0 CHIT-Fc, % 1,0 glutaraldehit, 4,0-20 mM glukoz, + 0,35 V, oda sıcaklığı, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

3.2.1.3. Glutaraldehit miktarının optimizasyonu

Biyosensörün kararlılığını arttırmak amacıyla, GOx amino gruplarında CHIT-Fc'ye glutaraldehit yardımıyla çapraz bağlanmıştır. Glutaraldehit başka biyosensörlerin de hazırlanma aşamalarında kullanılan bir çapraz bağlayıcıdır. Buna örnek olarak, CHIT filmine horseradish peroksidaz enziminin glutaraldehit vasıtasıyla kovalent immobilizasyonu verilebilir (Garcia et al., 2007). CHIT-Fc/GOx biyosensörü için yapılan optimizasyon çalışmalarının son basamağında glutaraldehit miktarı optimize edilmiştir. Bunun için % 0,5; 1,0; 2,5 ve 5,0 glutaraldehit çözeltisi ile hazırlanmış dört biyosensör, glutaraldehit miktarının akım cevabına etkisinin belirlenmesi amacıyla, sisteme 8,0 mM glukoz enjekte edilerek ölçülmüştür (Şekil 3.8). En yüksek cevap % 1,0 glutaraldehit ile hazırlanmış biyosensör tarafından alınmıştır. Daha yüksek miktarlarda glutaraldehit içeren biyosensörlerde cevap enzim denaturasyonuna bağlı olarak düşmüştür. Daha az glutaraldehit kullanımı, biyosensörde kararlı olmayan CHIT-Fc/GOx filmine neden olmuştur. Bu nedenle, % 1,0'lik glutaraldehit optimum miktar olarak belirlenmiştir.



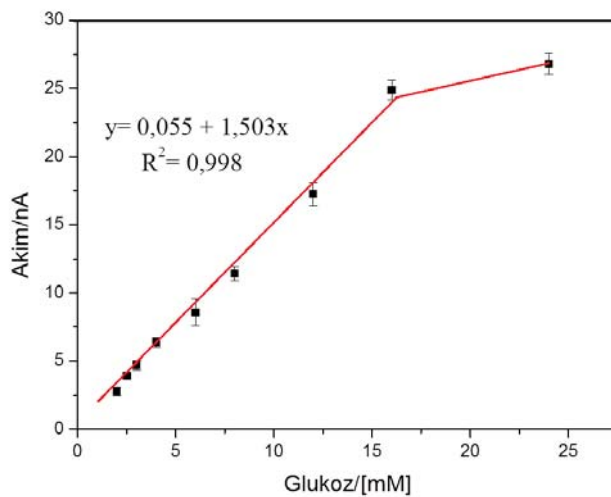
Şekil 3.8. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabına etkisi (50 mM pH 5,5 sodyum asetat, 0,9 mL/dakika, % 1,0 CHIT-Fc, 125 U GOx, 8 mM glukoz, + 0,35 V, oda sıcaklığı, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

3.2.2. Analitik karakterizasyon

Enzim biyosensörünün analitik karakterizasyonunu incelemek amacıyla glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik, operasyonel kararlılık ve depo kararlılığı, tekrar üretilebilirlik ve örnek uygulama deneyleri sonucunda elde edilen bulgular sunulmuş ve tartışılmıştır.

3.2.2.1. Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Optimum hazırlama ve çalışma koşullarının belirlenmesinin ardından, CHIT-Fc/GOx biyosensörünün akım cevabı taşıyıcı çözeltiye çeşitli glukoz standartlarının enjekte edilmesiyle incelenmiştir. Biyosensörün cevap süresi 22 saniye olarak belirlenmiştir. Şekil 3.9'daki kalibrasyon grafiğinde görüldüğü gibi GOx biyosensörü ile glukoz için lineer aralık 2,0-16 mM olarak bulunmuştur. Bu aralık, CHIT modifiye GCE üzerine Fc immobilize edilmiş glukoz biyosensörünün (0,8-4,0 mM) (Parra-Alfambra et al., 2011) ve polisiloksan/CHIT üzerine Fc'nin modifiye edilmesiyle hazırlanan glukoz sensörünün (1,0-6,0 mM) (Nagarale et al., 2009) lineer cevap aralığından daha geniştir. GOx biyosensörü için belirtme sınırı 0,565 mM (S/N = 3) olarak bulunmuştur fakat bu değer CHIT-Fc/MWNTs/GOx modifiye elektrot için saptanmış belirtme sınırından ($6,5 \times 10^{-3}$ mM) (Liang et al., 2009) daha yüksektir. Bulunan değerden daha düşük belirtme sınırları CHIT-Fc matrisine çeşitli nanomateryaller hapsedilerek elde edilebilir.



Şekil 3.9. Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon eğrisi (50 mM pH 5,5 sodyum asetat, 0,9 mL/dakika, % 1,0 CHIT-Fc, % 1,0 glutaraldehit, 125 U GOx, + 0,35 V, oda sıcaklığı, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

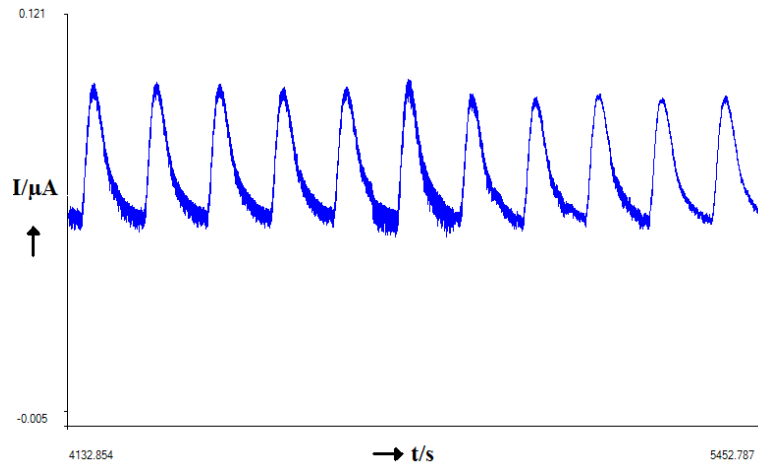
3.2.2.2. Tekrarlanabilirlik, operasyonel kararlılık ve depo kararlılığı

Bu bölümde ilk olarak hazırlanan biyosensörün tekrarlanabilirliği 8,0 mM glukoz çözeltisi ile ard arda 10 kez enjeksiyon yapılarak incelenmiştir. Glukoz için çizilen kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak, bu ölçümlerden elde edilen akım değerlerine karşılık gelen glukoz konsantrasyonları hesaplanmıştır. Bu işlemler sonucunda CHIT-Fc/GOx biyosensörü için SS: $\pm 0,41$ mM ve % VK: % 4,28 olarak saptanmıştır.

İkinci olarak biyosensörün operasyonel kararlılığı 7,2 saat boyunca 8,0 mM glukoz ile tekrarlı enjeksiyonlar sonrasında pik akımlarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. 208 enjeksiyon sonunda, biyosensörün başlangıçtaki aktivitesine göre % 13,0'lük bir kayıp gözlemlenmiştir. FIA sisteminde tekrarlı enjeksiyonlar sonrasında alınan amperometrik cevaplar Şekil 3.10'da görülmektedir.

Son olarak enzim biyosensörünün depo kararlılığı 14 gün incelenmiştir. 2-3 günde bir 8,0 mM glukoz ile enjeksiyon yapılmış ve elde edilen akım cevapları ölçülmüştür. Biyosensörden ilk gün alınan cevap % 100 olarak edilmiş ve 14 günün sonunda biyosensörün, aktivitesinin % 82'sinin korunduğu saptanmıştır.

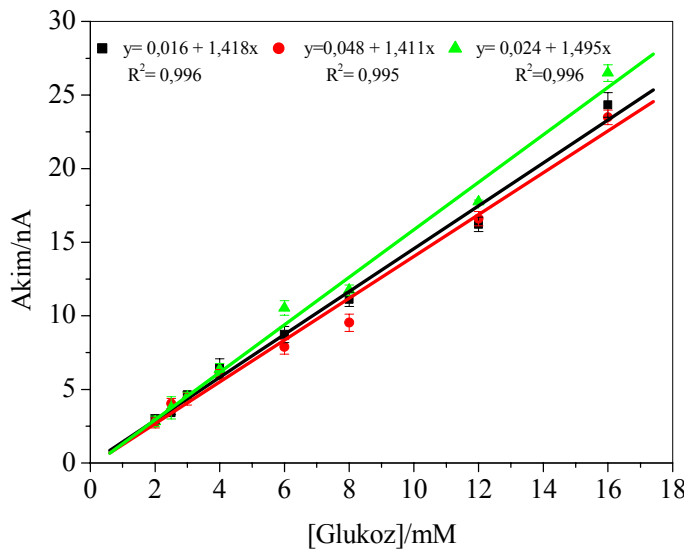
Biyosensörün iyi tekrarlanabilirlik ve kararlılığa sahip olması CHIT-Fc biyopolimerinin iyi biyoyumluluğu ve geliştirilmiş iletkenliğinin sonucudur. CHIT-Fc sayesinde, enzimin aktivitesini sürdürmesi için gerekli olan mikro çevre sağlanmıştır. Bu sonuçlar CHIT-Fc/GOx biyosensörünün FIA sisteminde yapılan glukoz analizi için uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.10. FIA'da tekrarlı enjeksiyonlar sonrasında alınan akım cevapları (50 mM pH 5,5 sodyum asetat, 0,9 mL/dakika, % 1,0 CHIT-Fc, % 1,0 glutaraldehit, 125 U GOx, 8 mM glukoz, + 0,35 V, oda sıcaklığı).

3.2.2.3. Tekar üretilebilirlik

Optimum koşullarda farklı zaman dilimlerinde hazırlanan biyosensörlerle aynı performansın sağlanıp sağlanmadığını kontrol etmek amacıyla biyosensörün tekrar üretilebilirliği araştırılmıştır. Bunun için farklı günlerde optimum koşullarda hazırlanan 3 tane CHIT-Fc/GOx biyosensörü ile glukoz için kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.11). Grafiklerin denklemleri ve eğimleri birbirleriyle karşılaştırıldığında yakın değerler elde edildiği görülmüştür. Bunun için tekrar üretilebilirliğin iyi olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 3.11. Farklı günlerde hazırlanan CHIT-Fc/GOx biyosensörlerinin kalibrasyon grafikleri (50 mM pH 5,5 sodyum asetat, 0,9 mL/dakika, % 1,0 CHIT-Fc, % 1,0 glutaraldehit, 125 U GOx, + 0,35 V, oda sıcaklığı, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

3.2.3. Örnek uygulama

Optimum koşullarda hazırlanan CHIT-Fc/GOx biyosensörünün ticari örneklerde glukoz analizine yönelik uygulanabilirliğini test etmek amacıyla iki adet içecek örneğindeki glukoz miktarları incelenmiştir. FIA sistemine glukoz standartları yerine kola ve vişne suyu 1:20 oranında 50 mM pH 5,5 asetat tamponunda seyreltilerek enjekte edilmiştir. Glukoz için hazırlanmış kalibrasyon grafiğinden yapılan ölçümler sonrasında elde edilen akım değerlerine karşılık gelen glukoz miktarları hesaplanmıştır. Her örnek için üç enjeksiyon yapılmıştır.

Daha sonra aynı örneklerde referans yöntem olan Trinder metodu (Barham and Trinder, 1972) ile glukoz miktarı belirlendikten sonra sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. İki farklı yöntem ile elde edilen sonuçlar Çizelge 3.1’de özetlenmiştir. Her iki yöntemle elde edilen glukoz miktarları birbirlerine yakın bulunmuştur. Geri kazanım oranları % 100’den fazla sapmadığı için analizlerin matris etkisinden bağımsız olduğu söylenebilir.

Çizelge 3.1. CHIT-Fc/GOx biyosensörü ve Trinder yöntemi kullanılarak yapılan örnek uygulama (50 mM pH 5,5 sodyum asetat, 0,9 mL/dakika, % 1,0 CHIT-Fc, % 1,0 glutaraldehit, 125 U GOx, + 0,35 V, oda sıcaklığı, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

Örnek	Glukoz (g/100mL) (Ort. ± SS)		% Geri kazanım
	Spektrofotometrik	GOx Biyosensörü	
Coca Cola	5,419 ± 0,285	5,993 ± 0,380	110
Vişne Suyu	4,361 ± 0,148	4,245 ± 0,211	97

3.3.CHIT-Fc/*G. oxydans* Biyosensörüne İlişkin Bulgular

G. oxydans hücrelerinin amperometrik biyosensörlerde biyokatalizör olarak yaygın bir şekilde kullanılmasının nedeni, katalitik aktivitenin kolay ulaşılabilir olması ve hazırlanmasının kısa sürmesidir. *Gluconobacter spp*’yi biyosensör için uygun hale getiren bazı özellikleri vardır. Bunlar basit bir kültürasyon ortamında hızlı büyüebilmeleri, yüksek enzimatik aktiviteye sahip olmaları, immobilize edildiklerinde kararlı olmaları ve PQQ dehidrogenazları sayesinde dışarıdan kofaktör ilavesine gerek duyulmamasıdır (Švitel et al., 2006). Biyosensörlerde *G. oxydans*’ın biyolojik bileşen olarak kullanımı iki şekilde olabilir. İlk olarak, *G. oxydans* hücrelerinden izole edilen enzimlerle biyosensörler hazırlanabilir. İkinci ve yaygın olarak, tüm hücreler kullanılarak mikrobiyal biyosensörler tasarlanabilir. Etanol (Valach et al., 2009), glukoz (Odaci et al., 2009), ksiloz (Li et al., 2012), D-sorbitol (Šefčovičová et al., 2009), 1,3-propandiol (Katrlik et al., 2007) tayini için *G. oxydans* hücreleri ile biyosensörler hazırlanmıştır. Bunların dışında *G. oxydans* biyoyakıt hücrelerinin tasarlanması ve geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Tkáč et al., 2009).

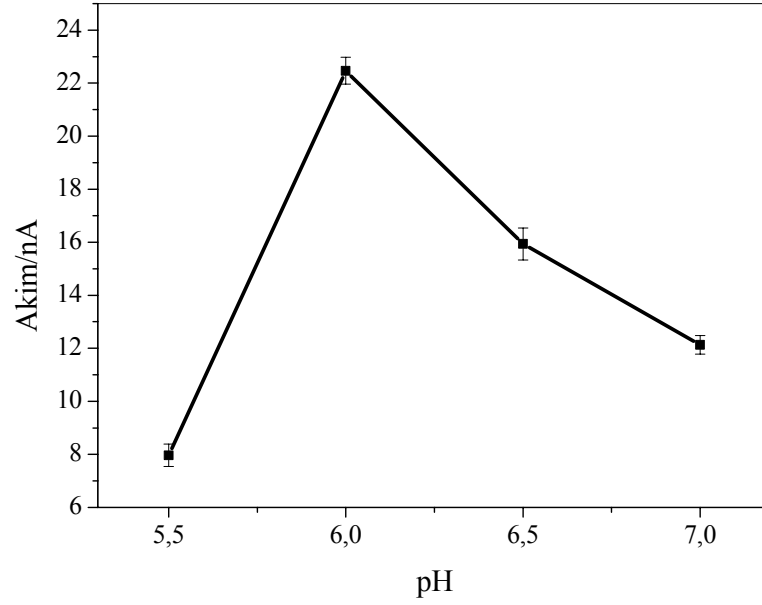
CHIT-Fc hibridinin diğerk bir uygulaması da biyokatalizör olarak *G. oxydans* hücreleri kullanılarak yapılmıştır. CHIT-Fc/*G.oxydans* biyosensörleri hazırlanırken hücreler geç logaritmik fazdan alınmıştır. Geç logaritmik faza ulaşabilmeleri için geçmesi gereken süre daha önceki çalışmalarla 16-20 saat olarak belirlenmiştir (Odaci, 2010). Canlı hücreler, CHIT-Fc matrisine çapraz bağlayıcı olan glutaraldehit vasıtasıyla immobilize edilmiştir. Bu bölümde mikrobiyal biyosensörün optimizasyonuna ve sonrasında glukoz için analitik karakterizasyonuna yönelik sonuçlar sunulmuştur.

3.3.1. Optimizasyon çalışmaları

Mikrobiyal biyosensörden en yüksek akım cevabının alınabileceği hazırlama ve çalışma koşullarının belirlenmesi için önce optimum pH tespit edilmiştir. Daha sonra, hücre ve glutaraldehit miktarlarının optimizasyonu yapılmış ve deneyler sonrasında elde edilen sonuçlar sunulmuştur.

3.3.1.1. Optimum pH

G.oxydans biyosensörünün optimum pH'ını belirlemek amacıyla, 50 mM pH 5,5 asetat tamponu ve 50 mM pH 6,0; 6,5; 7,0 fosfat tamponları taşıyıcı çözeltiler olarak test edilmiştir (Şekil 3.12). 10 mM glukoz substratına karşı oluşan akım cevapları karşılaştırılmıştır. Maksimum pik akımı 50 mM pH 6,0 fosfat tamponunda gözlemlenmiştir. Membrana bağlı GDH D-glukozun direkt oksidasyonunu optimum pH 6,0 civarında gerçekleştirmektedir (De Muynck et al., 2007). Bu nedenle, hücrelerin maksimum aktivite göstermeleri amacıyla daha sonraki deneyler için taşıyıcı çözeltinin pH'ı 6,0 olarak seçilmiştir.

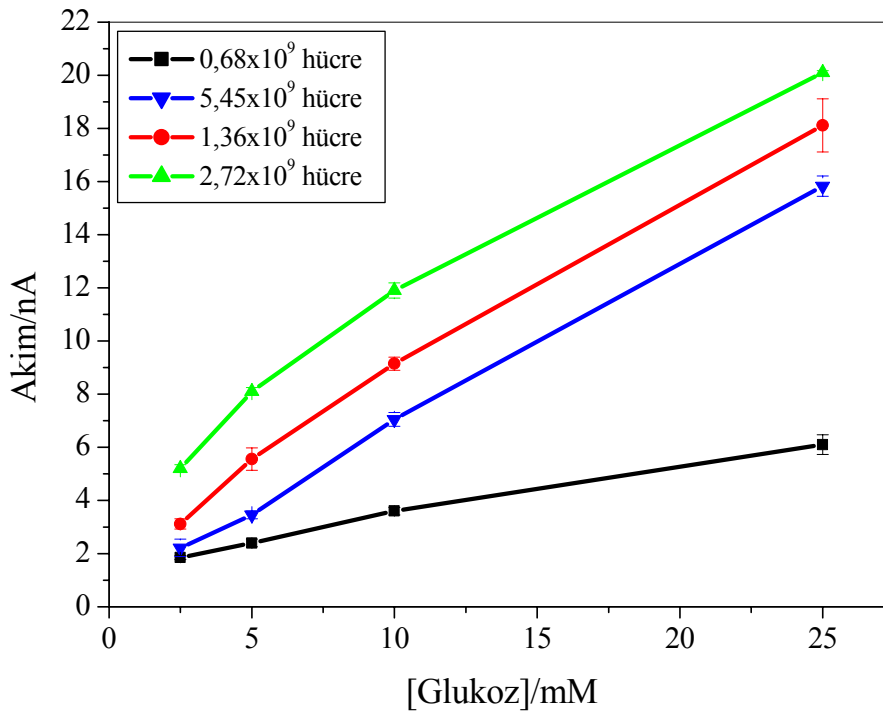


Şekil 3.12. Biyosensör cevabına pH'nın etkisi (50 mM pH 5,5 sodyum asetat, pH 6,0-7,0 sodyum fosfat tamponları, 0,9 mL/dakika, % 1,0 CHIT-Fc, % 1,0 glutaraldehit, $1,36 \times 10^9$ hücre, 10 mM glukoz, + 0,35 V, oda sıcaklığı, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

3.3.1.2. Hücre miktarının optimizasyonu

Mikrobiyal biyosensörlerde sıkça kullanılan *G. oxydans* hücreleri dış membranlarında bulunan porin proteinleri sayesinde substratlar ve medyatörler gibi küçük moleküllerin hücre içine difüzyonuna izin verirler (Ikeda and Kano, 2003; Vostiar et al., 2004). Bu şekilde sitoplazmik membranın yüzeyinde bulunan PQQ-bağlı GDH enzimi hızlı ve etkin olarak D-glukozu direkt oksidasyona uğratar (Reshetilov et al., 1998). Medyatörlü *G. oxydans* biyosensöründe meydana gelen katalitik olayların ilki budur. Daha sonra ise indirgenen enzim medyatör sayesinde yükseltgenirken, medyatörün kendisi indirgenir. En son elektrotta medyatör yükseltgenir ve pik akımı meydana gelir. Yani, mikrobiyal biyosensörden gelen amperometrik cevaplar CHIT-Fc matrisine immobilize edilmiş canlı hücrelere bağlıdır. Bu nedenle, hücre miktarının akım cevabını nasıl etkilediği FIA sistemine, 2,5-25,0 mM arasındaki konsantrasyonlarda glukoz çözeltileri enjekte edilerek incelenmiştir (Şekil 3.13). Öncelikle, hücreler

santrifüjlenmiş ve oluşan hücre pastası fosfat tamponunda çözülmüştür. Dört farklı miktardaki hücre ($0,68 \times 10^9$, $1,36 \times 10^9$, $2,72 \times 10^9$, $5,45 \times 10^9$) CHIT-Fc ile modifiye edilmiş GCE üzerine glutaraldehit vasıtasıyla immobilize edilmiş ve dört farklı *G. oxydans* biyosensörü hazırlanmıştır. Beklendiği gibi önce akım cevabı yükselmiş ve $2,72 \times 10^9$ hücre içeren biyosensörde maksimum değere ulaşmıştır. Daha sonra, yükselen hücre miktarıyla cevapta düşüş görülmüştür. Bu düşüşün nedeni difüzyon problemine bağlı olabilir. $2,72 \times 10^9$ hücre optimum hücre miktarı olarak belirlenmiştir.

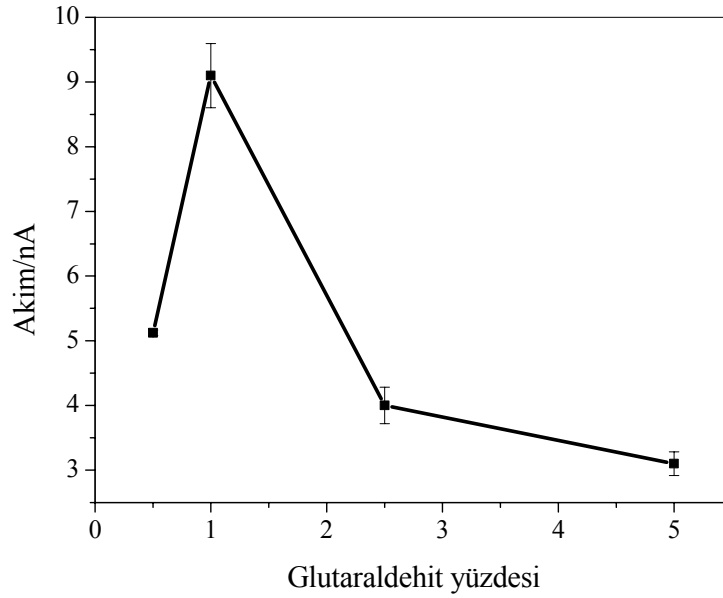


Şekil 3.13. Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisi (50 mM pH 6,0 sodyum fosfat, 0,9 mL/dakika, % 1,0 CHIT-Fc, % 1,0 glutaraldehit, 2,5-25 mM glukoz, + 0,35 V, oda sıcaklığı, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

3.3.1.3. Glutaraldehit miktarının optimizasyonu

CHIT-Fc/*G. oxydans* biyosensörü için optimize edilen son parametre glutaraldehit miktarıdır. Bunun için % 0,5; 1,0; 2,5 ve 5,0 glutaraldehit çözeltisi ile hazırlanmış dört biyosensör FIA sistemine 10 mM glukoz enjekte edilerek ölçülmüştür. Biyosensörlerden elde edilen akım değerleri Şekil 3.14'te

görülmektedir. En yüksek akım cevabı % 1,0 glutaraldehit çözeltisi kullanılarak hazırlanmış biyosensörle alınmıştır. Daha sonraki deneylerde % 1,0 glutaraldehit çözeltisi kullanılarak daha kararlı biyosensörlerin hazırlanması amaçlanmıştır.



Şekil 3.14. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabına etkisi (50 mM pH 6,0 sodyum fosfat, 0,9 mL/dakika, % 1,0 CHIT-Fc, $2,72 \times 10^9$ hücre, 10 mM glukoz, + 0,35 V, oda sıcaklığı, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

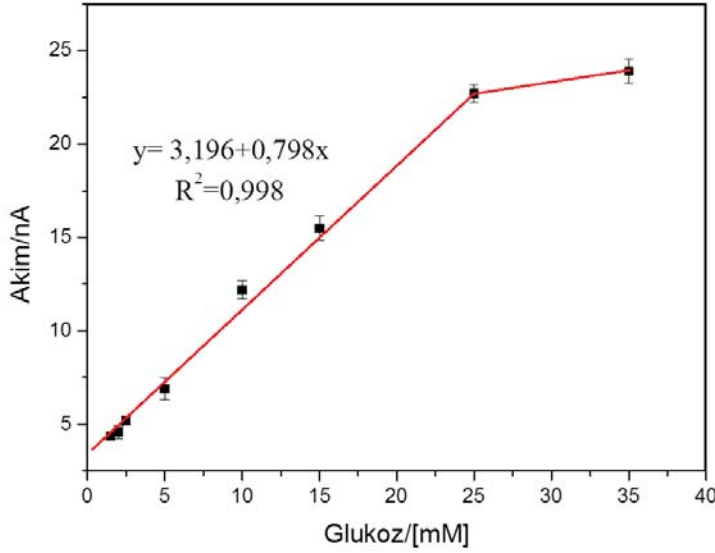
3.3.2. Analitik karakterizasyon

Bu bölümde, mikrobiyal biyosensörün, glukoz için doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılığı belirlenmiş ve yorumlanmıştır.

3.3.2.1. Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

CHIT-Fc/*G. oxydans* biyosensörünün optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra, sisteme glukoz standartlarının enjekte edilmesiyle glukoz tayini gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün cevap süresi 70 saniye olarak bulunmuştur. Bu değer kesikli sistemlerde kullanılmak üzere tasarlanmış medyatörlü *G. oxydans* biyosensörünün cevap süresinden (2-3 dakika) daha kısadır (Tkáč et al., 2000). Şekil 3.15'te, farklı konsantrasyonlardaki glukoz standartlarının taşıyıcı çözeltiliye enjekte edilmesiyle ölçülen akım değerleri kaydedilerek elde edilen, glukoz konsantrasyonu ile akım arasında çizilen grafik

verilmiştir. Mikrobiyal biyosensörle glukoz için lineer aralık 1,5-25 mM olarak belirlenmiştir. Lineer aralığın üst sınırı, osmiyum polimeri ve *G.oxydans* hücreleri ile modifiye edilmiş altın elektrotla tespit edilmiş olan üst sınırdan (2,0 mM) (Vostiar et al., 2004) daha yüksektir. Mikrobiyal biyosensörün belirtme sınırı 0,797 mM (S/N = 3) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.15. Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon eğrisi (50 mM pH 6,0 sodyum fosfat, 0,9 mL/dakika, % 1,0 CHIT-Fc, % 1,0 glutaraldehit, $2,72 \times 10^9$ hücre, + 0,35 V, oda sıcaklığı, hata çubukları 3 ölçüme ilişkin standart sapmayı ifade etmektedir).

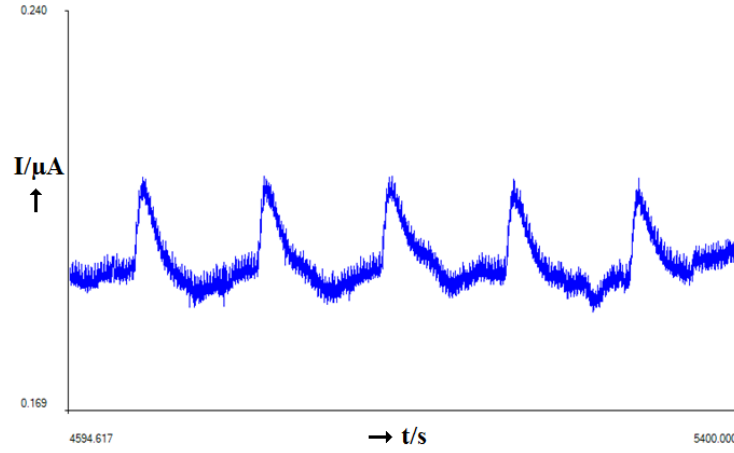
3.3.2.2. Tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılık

Optimum koşullarda hazırlanmış mikrobiyal biyosensörün tekrarlanabilirliği 10 mM glukoz standardı ile ard arda 10 kez enjeksiyon yapılarak test edilmiştir. Glukoz için çizilen kalibrasyon grafiği kullanılarak, ölçülen akım değerlerine karşılık gelen glukoz konsantrasyonları hesaplanmıştır. Sonuç olarak CHIT-Fc/*G. oxydans* biyosensörü için SS: $\pm 0,66$ mM ve % VK: % 4,80 olarak tespit edilmiştir.

Buna ek olarak, biyosensörün operasyonel kararlılığı belirlenmiştir. 3 saat boyunca 72 enjeksiyon yapılmış ve oluşan pik akımları ölçülmüştür. Buna göre, biyosensör 72 enjeksiyon sonrasında başlangıçtaki aktivitesinin % 15,1'ini kaybetmiştir. Kaydedilen operasyonel kararlılık diğer bir medyatörlü *G. oxydans* biyosensöründen (3 saat sonunda % 50 kayıp) daha yüksektir (Vostiar et al.,

2004). Mikrobiyal biyosensör ile FIA sisteminde tekrarlı enjeksiyonlar sonrasında alınan amperometrik cevaplar Şekil 3.16'da görülmektedir.

Bu sonuçlar redoks medyatörün polimerik matrise kovalent olarak bağlanmasıyla uygun bir platform oluştuğunu ve bu platformda yaşayan hücrelerin aktivitelerini sürdürebildiklerini göstermiştir. Redoks aktif hibrit materyal ile hazırlanan biyosensörlerin FIA sisteminde ölçülmesiyle iyi tekrarlanabilirliğin ve operasyonel kararlılığın elde edildiği görülmüştür.



Şekil 3.16. FIA'da tekrarlı enjeksiyonlar sonrasında alınan akım cevapları (50 mM pH 6,0 sodyum fosfat, 0,9 mL/dakika, % 1,0 CHIT-Fc, % 1,0 glutaraldehit, $2,72 \times 10^9$ hücre, 10 mM glukoz, + 0,35 V, oda sıcaklığı).

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Tez kapsamında, redoks medyatörü olarak kullanılan Fc molekülünün CHIT'e kovalent olarak bağlanması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. GCE yüzeyindeki CHIT-Fc filmi tersinir redoks sinyali $E^0 = 0,35 \text{ V}$ 'ta (Ag/AgCl'ye göre) göstermiştir. CHIT-Fc hibritinden, iki çeşit biyokatalizörü immobilize etmek için işlevselleştirilmiş bir matris olarak yararlanılmıştır. GOx ve *Gluconobacter oxydans* hücreleri biyolojik bileşen olarak kullanılmış ve matrise glutaraldehit kullanılarak immobilize edilmiştir. Hazırlanan CHIT-Fc/GOx ve CHIT-Fc/*G. oxydans* biyosensörleri FIA sisteminde ölçülmüş ve glukoz substratına karşı açıkça görülebilen amperometrik cevaplar alınmıştır. CHIT-Fc redoks filmi biyomoleküllerin aktivitelerini sürdürmeleri için gerekli olan çevreyi sağlamakla kalmayıp, elektrot ve biyomoleküller arasındaki elektron transferini kolaylaştırmıştır. Biyosensörlerin hazırlanma ve çalışma koşullarının optimizasyonu ve analitik karakterizasyonu için gerekli deneyler yapılmıştır. İki biyosensörün de geniş lineer aralığa, iyi kararlılığa ve tekrarlanabilirliğe sahip olduğu saptanmıştır. Çizelge 4.1'de geliştirilen GOx ve *G. oxydans* biyosensörlerinin optimizasyon ve karakterizasyon sonuçları verilmiştir.

Buna ek olarak enzim ve mikrobiyal biyosensörlerinin otomatikleştirilmiş FIA sistemi ile birlikte kullanımının tekrarlanabilirlik ve kararlılığa katkısı vardır. Ayrıca, bu sistem sayesinde maliyet ve atık miktarı düşüktür.

Belirtme sınırlarını düşürmek için çeşitli nanomateryaller CHIT-Fc matrisine hapsedilebilir. Sentezlenen redoks biyopolimer kullanılarak daha etkin algılama platformları hazırlanabilir ve böylece yeni biyosensörlerin tasarımı kolaylaşır. Ayrıca hazırlanan mikrobiyal biyosensörün biyoyakıt hücresi olarak kullanım imkânı vardır ve biyoyakıt hücrelerinin geliştirilmesini sağlayabilir.

Çizelge 4.1. Geliştirilen biyosensörlerden elde edilen sonuçların genel gösterimi.

Parametre	Biyosensör tipi	
	CHIT-Fc/GOx	CHIT-Fc/G.oxydans
Substrat	Glukoz	Glukoz
Elektrot	GCE	GCE
Çalışma potansiyeli	+0,35 V	+ 0,35 V
Optimum pH	5,5	6,0
Tampon	Sodyum asetat	Sodyum fosfat
Enzim miktarı (U)	125 U	-
Hücre miktarı	-	$2,72 \times 10^9$
Cevap süresi	22 saniye	70 saniye
Doğrusal tayin aralığı	2,0-16 mM ($y = 0,055 + 1,503x$)	1,5-25 mM ($y = 3,196 + 0,798x$)
Tekrarlanabilirlik	% VK 4,28	% VK 4,80
Operasyonel kararlılık	7,2 saat sonunda % 13,0 aktivite kaybı	3 saat sonunda % 15,1 aktivite kaybı
Depo kararlılığı	14 gün sonunda % 82 aktivite	-

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agüí, L., Manso, J., Yáñez-Sedeño, P. and Pingarrón, J.M.**, 2006, Amperometric biosensor for hypoxanthine based on immobilized xanthine oxidase on nanocrystal gold–carbon paste electrodes, *Sens. Actuators, B*, 113: 272-280.
- Akin, M., Yuksel, M., Geyik, C., Odaci, D., Bluma, A., Höpfner, T., Beutel, S., Scheper, T. and Timur, S.**, 2010, Alcohol biosensing by polyamidoamine (PAMAM)/cysteamine/alcohol oxidase-modified gold electrode, *Biotechnol. Prog.*, 26: 896-906.
- Alonso Lomillo, M.A., Ruiz, J.G. and Pascual, F.J.M.**, 2005, Biosensor based on platinum chips for glucose determination, *Anal. Chim. Acta*, 547: 209-214.
- Arslan, F., Yaşar, A. and Kılıç, E.**, 2006, An amperometric biosensor for xanthine determination prepared from xanthine oxidase immobilized in polypyrrole film, *Artif. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.*, 34: 111-126.
- Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S. and Ananthanarayan, L.**, 2009, Glucose oxidase — An overview, *Biotechnol. Adv.*, 27: 489-501.
- Barham, D. and Trinder, P.**, 1972, An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system, *Analyst*, 97: 142-145.
- Baronas, D., Ivanauskas, F. and Baronas, R.**, 2011, Mechanisms controlling the sensitivity of amperometric biosensors in flow injection analysis systems, *J. Math. Chem.*, 49: 1521-1534.
- Bright, H.J. and Appleby, M.**, 1969, The pH Dependence of the Individual Steps in the Glucose Oxidase Reaction, *J. Biol. Chem.*, 244: 3625-3634.
- Brogan, K.L. and Walt, D.R.**, 2005, Optical fiber-based sensors: application to chemical biology, *Current Opin. Chem. Biol.*, 9: 494-500.
- Cass, A.E.G., Davis, G., Francis, G.D., Hill, H.A.O., Aston, W.J., Higgins, I.J., Plotkin, E.V., Scott, L.D.L. and Turner, A.P.F.**, 1984, Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose, *Anal. Chem.*, 56: 667-671.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cattaneo, M.V. and Luong, J.H.T.**, 2004, Monitoring glutamine in animal cell cultures using a chemiluminescence fiber optic biosensor, *Biotechnol. Bioeng.*, 41: 659-665.
- Chaubey, A. and Malhotra, B.D.**, 2002, Mediated biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, 17: 441-456.
- Chen, X., Jia, J. and Dong, S.**, 2003, Organically Modified Sol-Gel/Chitosan Composite Based Glucose Biosensor, *Electroanalysis*, 15: 608-612.
- Clark, L.C. and Lyons, C.**, 1962, Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 102: 29-45.
- Cosnier, S.**, 2005, Affinity Biosensors Based on Electropolymerized Films, *Electroanalysis*, 17: 1701-1715.
- De Muynck, C., Pereira, C.S.S., Naessens, M., Parmentier, S., Soetaert, W. and Vandamme, E.J.**, 2007, The Genus *Gluconobacter oxydans*: Comprehensive Overview of Biotechnology Applications, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 27: 147-171.
- Dzyadevych, S.V., Arkhypova, V.N., Soldatkin, A.P., El'skaya, A.V., Martelet, C. and Jaffrezic-Renault, N.**, 2008, Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future, *IRBM*, 29: 171-180.
- Foulds, N.C. and Lowe, C.R.**, 1988, Immobilization of glucose oxidase in ferrocene-modified pyrrole polymers, *Anal. Chem.*, 60: 2473-2478.
- Garcia, A., Peniche-Covas, C., Chico, B., Simpson, B.K. and Villalonga, R.**, 2007, Ferrocene branched chitosan for the construction of a reagentless amperometric hydrogen peroxide biosensor, *Macromolecular Bioscience*, 7: 435-439.
- Gätgens, C., Degner, U., Bringer-Meyer, S. and Herrmann, U.**, 2007, Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76: 553-559.
- Gregg, B.A. and Heller, A.**, 1990, Cross-linked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor applications, *Anal. Chem.*, 62: 258-263.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J. and Reimhult, E.,** 2008, Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures, *Sensors*, 8: 1400-1458.
- Griffin, G.D. and Stratis-Cullum, D.N.,** 2009, Biosensors, Academic Press, Oxford, 15p.
- Honarkar, H. and Barikani, M.,** 2009, Applications of biopolymers I: chitosan, *Monatsh. Chem.*, 140: 1403-1420.
- Ikeda, T. and Kano, K.,** 2003, Bioelectrocatalysis-based application of quinoproteins and quinoprotein-containing bacterial cells in biosensors and biofuel cells, *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 1647: 121-126.
- Kandimalla, V.B., Tripathi, V.S. and Ju, H.,** 2006, A conductive ormosil encapsulated with ferrocene conjugate and multiwall carbon nanotubes for biosensing application, *Biomaterials*, 27: 1167-1174.
- Katrlík, J., Voštiar, I., Šefčovičová, J., Tkáč, J., Mastihubá, V., Valach, M., Štefuca, V. and Gemeiner, P.,** 2007, A novel microbial biosensor based on cells of *Gluconobacter oxydans* for the selective determination of 1,3-propanediol in the presence of glycerol and its application to bioprocess monitoring, *Anal. Bioanal. Chem.*, 388: 287-295.
- Krajewski, V., Simic, P., Mouncey, N.J., Bringer, S., Sahm, H. and Bott, M.,** 2010, Metabolic Engineering of *Gluconobacter oxydans* for Improved Growth Rate and Growth Yield on Glucose by Elimination of Gluconate Formation, *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 4369-4376.
- Kuralay, F., Vural, T., Bayram, C., Denkbaz, E.B. and Abaci, S.,** 2011, Carbon nanotube–chitosan modified disposable pencil graphite electrode for Vitamin B12 analysis, *Colloids Surf., B*, 87: 18-22.
- Lanyon, Y.H., Marrazza, G., Tothill, I.E. and Mascini, M.,** 2004, Flow Injection Analysis of Benzene Using an Amperometric Bacterial Biosensor, *Anal. Lett.*, 37: 1515-1528.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, L., Liang, B., Shi, J., Li, F., Mascini, M. and Liu, A.**, 2012, A selective and sensitive d-xylose electrochemical biosensor based on xylose dehydrogenase displayed on the surface of bacteria and multi-walled carbon nanotubes modified electrode, *Biosens. Bioelectron.*, 33: 100-105.
- Li, Q.-S., Ye, B.-C., Liu, B.-X. and Zhong, J.-J.**, 1999, Improvement of the performance of H₂O₂ oxidation at low working potential by incorporating TTF-TCNQ into a platinum wire electrode for glucose determination, *Biosens. Bioelectron.*, 14: 327-334.
- Liang, R.-P., Fan, L.-X., Wang, R. and Qiu, J.-D.**, 2009, One-Step Electrochemically Deposited Nanocomposite Film of CS-Fc/MWNTs/GOD for Glucose Biosensor Application, *Electroanalysis*, 21: 1685-1691.
- Liu, J., Sun, S., Liu, C. and Wei, S.**, 2011, An amperometric glucose biosensor based on a screen-printed electrode and Os-complex mediator for flow injection analysis, *Measurement*, 44: 1878-1883.
- Manso, J., Mena, M.L., Yáñez-Sedeño, P. and Pingarrón, J.M.**, 2008, Alcohol dehydrogenase amperometric biosensor based on a colloidal gold-carbon nanotubes composite electrode, *Electrochim. Acta*, 53: 4007-4012.
- Mathebe, N.G.R., Morrin, A. and Iwuoha, E.I.**, 2004, Electrochemistry and scanning electron microscopy of polyaniline/peroxidase-based biosensor, *Talanta*, 64: 115-120.
- Muhammad-Tahir, Z. and Alocilja, E.C.**, 2003, A conductometric biosensor for biosecurity, *Biosens. Bioelectron.*, 18: 813-819.
- Mulchandani, A., Bassi, A.S. and Nguyen, A.**, 1995, Tetrathiafulvalene-mediated Biosensor for L-lactate in Dairy Products, *J. Food Sci.*, 60: 74-78.
- Murthy, A.S.N. and Anita**, 1994, Electrochemical oxidation of L-ascorbic acid on 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane (TCNQ) modified electrode, *Biosens. Bioelectron.*, 9: 439-444.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Murthy, A.S.N., Anita and Gupta, R.L.**, 1994, NADH sensor with electrochemically modified TCNQ electrode, *Anal. Chim. Acta*, 289: 43-46.
- Nagarale, R.K., Lee, J.M. and Shin, W.**, 2009, Electrochemical properties of ferrocene modified polysiloxane/chitosan nanocomposite and its application to glucose sensor, *Electrochim. Acta*, 54: 6508-6514.
- Odaci, D.**, 2010, Karbohidrat analizine yönelik biyosensörler geliştirilmesi ve karakterizasyonu, Doktora tezi, EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, 56-61s.
- Odaci, D., Timur, S. and Telefoncu, A.**, 2009, A microbial biosensor based on bacterial cells immobilized on chitosan matrix, *Bioelectrochemistry*, 75: 77-82.
- Odaci, D., Timur, S., Pazarlioglu, N., Montereali, M.R., Vastarella, W., Pilloton, R. and Telefoncu, A.**, 2007, Determination of phenolic acids using *Trametes versicolor* laccase, *Talanta*, 71: 312-317.
- Oliveira, M.C.Q., Lanza, M.R.V., Tanaka, A.A. and Sotomayor, M.D.P.T.**, 2010, Flow injection analysis of paracetamol using a biomimetic sensor as a sensitive and selective amperometric detector, *Anal. Methods*, 2: 507-512.
- Ozdemir, C.**, 2010, Farklı nanomalzemeler ile glukoz biyosensörlerinin hazırlanması ve uygulama potansiyellerinin araştırılması, Yüksek lisans tezi, EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, 20-22s.
- Ozdemir, C., Yeni, F., Odaci, D. and Timur, S.**, 2010, Electrochemical glucose biosensing by pyranose oxidase immobilized in gold nanoparticle-polyaniline/AgCl/gelatin nanocomposite matrix, *Food Chem.*, 119: 380-385.
- Parra-Alfambra, A.M., Casero, E., Ruiz, M.A., Vázquez, L., Pariente, F. and Lorenzo, E.**, 2011, Carbon nanotubes/pentacyanoferrate-modified chitosan nanocomposites platforms for reagentless glucose biosensing, *Anal. Bioanal. Chem.*, 401: 883-889.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pauliukaite, R., Ghica, M.E., Fatibello-Filho, O. and Brett, C.M.A.**, 2010, Electrochemical impedance studies of chitosan-modified electrodes for application in electrochemical sensors and biosensors, *Electrochim. Acta*, 55: 6239-6247.
- Persson, B., Lan, H.L., Gorton, L., Okamoto, Y., Hale, P.D., Boguslavsky, L.I. and Skotheim, T.**, 1993, Amperometric biosensors based on electrocatalytic regeneration of NAD^+ at redox polymer-modified electrodes, *Biosens. Bioelectron.*, 8: 81-88.
- Piano, M., Serban, S., Pittson, R., Drago, G.A. and Hart, J.P.**, 2010, Amperometric lactate biosensor for flow injection analysis based on a screen-printed carbon electrode containing Meldola's Blue-Reinecke salt, coated with lactate dehydrogenase and NAD^+ , *Talanta*, 82: 34-37.
- Pillai, C.K.S., Paul, W. and Sharma, C.P.**, 2009, Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, *Prog. Polym. Sci.*, 34: 641-678.
- Qiu, J.-D., Guo, J., Liang, R.-P. and Xiong, M.**, 2007, A Nanocomposite Chitosan Based on Ferrocene-Modified Silica Nanoparticles and Carbon Nanotubes for Biosensor Application, *Electroanalysis*, 19: 2335-2341.
- Qiu, J.D., Liang, R.P., Wang, R., Fan, L.X., Chen, Y.W. and Xia, X.H.**, 2009, A label-free amperometric immunosensor based on biocompatible conductive redox chitosan-ferrocene/gold nanoparticles matrix, *Biosens. Bioelectron.*, 25: 852-857.
- Rahman, M., Kumar, P., Park, D.-S. and Shim, Y.-B.**, 2008, Electrochemical Sensors Based on Organic Conjugated Polymers, *Sensors*, 8: 118-141.
- Raoof, J.B., Ojani, R. and Kolbadinezhad, M.**, 2009, Voltammetric sensor for glutathione determination based on ferrocene-modified carbon paste electrode, *J. Solid State Electrochem.*, 13: 1411-1416.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reshetilov, A.N., Donova, M.V., Dovbnya, D.V., Il'yasov, P.V., Boronin, A.M., Leasers, T. and Green, R.,** 1998, Membrane-bound dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans*: Sensors for measuring sugars, alcohols, and polyols, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 126: 702-704.
- Rinaudo, M.,** 2006, Chitin and chitosan: Properties and applications, *Prog. Polym. Sci.*, 31: 603-632.
- Romero, M.R., Garay, F. and Baruzzi, A.M.,** 2008, Design and optimization of a lactate amperometric biosensor based on lactate oxidase cross-linked with polymeric matrixes, *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 131: 590-595.
- Ronkainen, N.J., Halsall, H.B. and Heineman, W.R.,** 2010, Electrochemical biosensors, *Chem. Soc. Rev.*, 39: 1747-1763.
- Rose, A., Scheller, F.W., Wollenberger, U. and Pfeiffer, D.,** 2001, Quinoprotein glucose dehydrogenase modified thick-film electrodes for the amperometric detection of phenolic compounds in flow injection analysis, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 369: 145-152.
- Růžička, J. and Hansen, E.H.,** 1986, The first decade of flow injection analysis: from serial assay to diagnostic tool, *Anal. Chim. Acta*, 179: 1-58.
- Růžička, J. and Hansen, E.H.,** 1988a, Flow Injection Analysis, Second Edition, John Wiley & Sons, Canada, 380p.
- Růžička, J. and Hansen, E.H.,** 1988b, Flow Injection Analysis, Second Edition.
- Šefčovičová, J., Vikartovská, A., Pätoprstý, V., Magdolen, P., Katrlík, J., Tkac, J. and Gemeiner, P.,** 2009, Off-line FIA monitoring of d-sorbitol consumption during l-sorbose production using a sorbitol biosensor, *Anal. Chim. Acta*, 644: 68-71.
- Sharma, S.K., Sehgal, N. and Kumar, A.,** 2003, Biomolecules for development of biosensors and their applications, *Curr. Appl. Phys.*, 3: 307-316.
- Shi, H., Yang, Y., Huang, J., Zhao, Z., Xu, X., Anzai, J.-i., Osa, T. and Chen, Q.,** 2006, Amperometric choline biosensors prepared by layer-by-layer deposition of choline oxidase on the Prussian blue-modified platinum electrode, *Talanta*, 70: 852-858.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Silva, M.L.S., Garcia, M.B.Q., Lima, J.L.F.C., Santos, J.L.M. and Barrado, E.**, 2005, Multicommutated Flow System with Amperometric Detection. Determination of Uric Acid in Urine, *Electroanalysis*, 17: 2156-2162.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Crouch, S.R.**, 2007, Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition, Thomson Brooks/Cole Publishing, Belmont, 1039p.
- Soldatkin, A.P., Volotovskiy, V., El'skaya, A.V., Jaffrezic-Renault, N. and Martelet, C.**, 2000, Improvement of urease based biosensor characteristics using additional layers of charged polymers, *Anal. Chim. Acta*, 403: 25-29.
- Su, L., Jia, W., Hou, C. and Lei, Y.**, 2011, Microbial biosensors: A review, *Biosens. Bioelectron.*, 26: 1788-1799.
- Švitel, J., Tkáč, J., Voštiar, I., Navrátil, M., Štefuca, V., Bučko, M. and Gemeiner, P.**, 2006, *Gluconobacter* in biosensors: applications of whole cells and enzymes isolated from *gluconobacter* and *acetobacter* to biosensor construction, *Biotechnol. Lett.*, 28: 2003-2010.
- Timur, S., Odaci, D., Dincer, A., Zihnioglu, F. and Telefoncu, A.**, 2008, Biosensing approach for glutathione detection using glutathione reductase and sulfhydryl oxidase bienzymatic system, *Talanta*, 74: 1492-1497.
- Tkáč, J., Gemeiner, P., Švitel, J., Benikovsky, T., Šturdík, E., Vala, V., Petruš, L. and Hrabárová, E.**, 2000, Determination of total sugars in lignocellulose hydrolysate by a mediated *Gluconobacter oxydans* biosensor, *Anal. Chim. Acta*, 420: 1-7.
- Tkáč, J., Švitel, J., Vostiar, I., Navratil, M. and Gemeiner, P.**, 2009, Membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter sp.*: Interfacial electrochemistry and direct bioelectrocatalysis, *Bioelectrochemistry*, 76: 53-62.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tripathi, V.S., Kandimalla, V.B. and Ju, H.**, 2006, Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on ferrocene-bovine serum albumin and multiwall carbon nanotube modified ormosil composite, *Biosens. Bioelectron.*, 21: 1529-1535.
- Updike, S.J. and Hicks, G.P.**, 1967, The Enzyme Electrode, *Nature*, 214: 986-988.
- Valach, M., Katrlík, J., Šturdík, E. and Gemeiner, P.**, 2009, Ethanol *Gluconobacter* biosensor designed for flow injection analysis: Application in ethanol fermentation off-line monitoring, *Sens. Actuators, B*, 138: 581-586.
- Vorotyntsev, M.A. and Vasilyeva, S.V.**, 2008, Metallocene-containing conjugated polymers, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 139: 97-149.
- Vostiar, I., Ferapontova, E.E. and Gorton, L.**, 2004, Electrical “wiring” of viable *Gluconobacter oxydans* cells with a flexible osmium-redox polyelectrolyte, *Electrochem. Commun.*, 6: 621-626.
- Wang, H.-S., Pan, Q.-X. and Wang, G.-X.**, 2005, A Biosensor Based on Immobilization of Horseradish Peroxidase in Chitosan Matrix Cross-linked with Glyoxal for Amperometric Determination of Hydrogen Peroxide, *Sensors*, 5: 266-276.
- Wang, J.**, 1995, Electroanalysis and biosensors, *Anal. Chem.*, 67: 487-492.
- Wang, J.**, 2001, Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges, *Electroanalysis*, 13: 983-988.
- Wang, J.**, 2008, Electrochemical glucose biosensors, *Chem. Rev.*, 108: 814-825.
- Wang, X., Gu, H., Yin, F. and Tu, Y.**, 2009, A glucose biosensor based on Prussian blue/chitosan hybrid film, *Biosens. Bioelectron.*, 24: 1527-1530.
- Weibel, M.K. and Bright, H.J.**, 1971, The Glucose Oxidase Mechanism, *J. Biol. Chem.*, 246: 2734-2744.
- Xie, B., Danielsson, B., Norberg, P., Winqvist, F. and Lundström, I.**, 1992, Development of a thermal micro-biosensor fabricated on a silicon chip, *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 6: 127-130.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, W., Zhou, H. and Sun, C.,** 2007, Synthesis of Ferrocene-Branched Chitosan Derivatives: Redox Polysaccharides and their Application to Reagentless Enzyme-Based Biosensors, *Macromol. Rapid Commun.*, 28: 265-270.
- Yoo, E.-H. and Lee, S.-Y.,** 2010, Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice, *Sensors*, 10: 4558-4576.
- Yuksel, M., Akin, M., Geyik, C., Demirkol, D.O., Ozdemir, C., Bluma, A., Höpfner, T., Beutel, S., Timur, S. and Scheper, T.,** 2011, Offline glucose biomonitoring in yeast culture by polyamidoamine/ cysteamine-modified gold electrodes, *Biotechnol. Prog.*, 27: 530-538.
- Zhang, M. and Gorski, W.,** 2005, Electrochemical Sensing Platform Based on the Carbon Nanotubes/Redox Mediators-Biopolymer System, *J. Am. Chem. Soc.*, 127: 2058-2059.
- Zhang, T., Tian, B., Kong, J., Yang, P. and Liu, B.,** 2003, A sensitive mediator-free tyrosinase biosensor based on an inorganic-organic hybrid titania sol-gel matrix, *Anal. Chim. Acta*, 489: 199-206.
- Zheng, H., Zhou, J., Zhang, J., Huang, R., Jia, H. and Suye, S.-i.,** 2009, Electrical communication between electrode and dehydrogenase by a ferrocene-labeled high molecular-weight cofactor derivative: application to a reagentless biosensor, *Microchim. Acta*, 165: 109-115.
- Zhilei, W., Zaijun, L., Xiulan, S., Yinjun, F. and Junkang, L.,** 2010, Synergistic contributions of fullerene, ferrocene, chitosan and ionic liquid towards improved performance for a glucose sensor, *Biosens. Bioelectron.*, 25: 1434-1438.

ÖZGEÇMİŞ

1. Kişisel Bilgiler:

Adı Soyadı : Övgü Yılmaz
Doğum Yeri : İzmir
Doğum Tarihi : 27 Temmuz 1987
Medeni Durumu : Bekâr
Adres : 2040/5 Sok. Kırlangıç 3 D: 15 Mavişehir/İzmir
Tel : (232) 324 64 38
E-mail : ovguyilmaz@gmail.com

2. Eğitim:

2009- 2012 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya
 Bölümü'nde yüksek lisans
 2005 – 2009 Bilkent Üniversitesi Kimya Bölümü'nden 2.69 not
 ortalaması ile mezun
 2004 – 2005 Bilkent Üniversitesi İngilizce Hazırlık Okulu
 2001 – 2004 İzmir Özel Türk Fen Lisesi
 1993 – 2001 5. sınıfa kadar Mustafa Reşit Paşa İlköğretim Okulu
 (1993 – 1997). 8.sınıfa kadar TED Aliğa Koleji
 (1997 – 2000).
 8. sınıfa İzmir Özel Türk Koleji

3. Yabancı Dil:

ÜDS (İngilizce) : 87,5
ALES : 73

4. Bilgisayar Bilgisi:

Programlama Dilleri : Java
Office Ürünleri : Microsoft Word, PowerPoint.
Bildiği Yazılımlar : MATLAB, OriginPro 6.1, Gaussian 03.

5. Staj Deneyimi:

Akzo Nobel Boya Üretim Renk Laboratuvarı 04.08.2008-12.09.2008 (6 Hafta)

6. Tamamlanmış Projeler/ Bildiriler:

1. Bitirme Projesi I (Danışman: Doç. Dr. Ulrike Salzner): Influence of Nonplanarity on Energy Gap and Excited States in Bipyrrrole.

2. Bitirme Projesi II (Danışman: Doç. Dr. Ulrike Salzner): Theoretical Investigation of Fluoro Substitution of Polypyrrole.
3. Uluslar arası Bilimsel Toplantıda Sunulan Bildiri: Yılmaz, Ö., Kılıçkaya, O., Kara, P., Yurtman, A., Özsöz, M., Direct Electrical Detection of E. Coli Based on Different DNA Modified Genosensors, 6. *Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, 15-18 Haziran İzmir*, 89.

7. Katıldığı Uluslararası Kongreler:

- 10th Workshop on (Bio)sensors and Bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis, 2011, Weimar/Germany.
- International Conference on Enzyme Science and Technology, 2011, Kuşadası/Turkey.