

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**GALAKTOZ OKSİDAZ – MİYOGLOBİN HİBRİD
SİSTEMİNE DAYALI MEDİYATÖR ESASLI YENİ
BİR BİYOSENSÖR TASARIMI**

Belgin SERT SERDAR

Tez Danışmanı :Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 405.05.01

Sunuş Tarihi: 17.09.2014

Bornova – İZMİR

2014

Belgin SERT SERDAR tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Galaktoz Oksidaz-Miyogloblin Hibrid Sistemine Dayalı Mediyatör Esaslı Yeni Bir Biyosensör Tasarımı” 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 17.09.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

Raportör Üye : Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA

Üye : Doç. Dr. Şenol ALPAT

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Galaktoz Oksidaz - Miyogloblin Hibrid Sistemine Dayalı Mediyatör Esaslı Yeni Bir Biyosensör Tasarımı” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

17/ 09 /2014

Belgin SERT SERDAR

ÖZET**GALAKTOZ OKSİDAZ-MİYOglobİN HİBRİD SİSTEMİNE
DAYALI MEDİYATÖR ESASLI YENİ BİR BİYOSENSÖR
TASARIMI****SERT SERDAR, Belgin**

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erol AKYILMAZ
Eylül 2014, 61 sayfa

Bu tez çalışmasında biyosensör teknolojisine yeni ve orijinal bir bakış açısı getiren D-galaktoz tayinine yönelik, altın elektrod (Au)-tiyonin-glutaraldehit (GA)-nafyon modifiye galaktoz oksidaz- miyoglobin hibrid biyosensörü tasarımı amaçlanmıştır. Geliştirilen biyosensör sisteminde öncelikle altın elektrod yüzeyine tiyoninin elektropolimerizasyonu gerçekleştirildi. Ardından elektrod üzerine glutaraldehit damlatılarak enzim-protein çözeltisinin (galaktoz oksidaz ve miyoglobin) çapraz bağlanma ile immobilizasyonu sağlandı. Son olarak elektrod nafyon çözeltisi ile muamele edilerek altın-tiyonin-GA-nafyon modifiye biyosensör hazırlanması için gerekli tüm basamaklar tamamlanmış oldu.

Tasarlanan biyosensör sistemiyle galaktoz ölçümleri (-0,3) ve (0,5) V potansiyel aralığında differansiyel puls (DP) metodu kullanılarak yapılmıştır. D-galaktoz konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak azalan akım değerlerinden çıkılarak tayin yapılmıştır.

Hazırlanan biyosensörün optimizasyon çalışmalarında öncelikle optimum tiyonin miktarı, optimum glutaraldehit miktarı, optimum galaktoz oksidaz aktivitesi, optimum miyoglobin miktarı, optimum nafyon miktarı gibi parametreler çalışıldı. Çalışma koşullarının optimizasyonunda pH optimizasyonu ve sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirildi. Biyosensörün karakterizasyon çalışmalarında D-galaktoz için doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik, substrat spesifikliğı, girişim etkisi ve depo kararlılığı gibi parametreler araştırılmıştır.

Optimizasyon alışmaları sonucunda D-galaktoz biyosensörü için en uygun tiyonin miktarı, glutaraldehit miktarı ,enzim aktivitesi, miyoglobin miktarı, nafyon miktarı sırasıyla 0,5 mmol/L ,10µL, 1,177 U/mL , 10mg/ml, 10µL bulunmuştur. Çalışma koşullarının optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde D-galaktoz biyosensörü için çalışma tamponu olarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu ve çalışma sıcaklığı olarak 32°C bulunmuştur. Geliştirilen biyosensör için yapılan karakterizasyon çalışmalarında ise D-galaktoz için 0,1 - 1 mM aralığında doğrusal sonuçların alındığı belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik denemelerinde (n=7) 0,5 mM D-galaktoz konsantrasyonunda ortalama değer (\bar{x}) , standart sapma (S.S) ve % varyasyon katsayısı (%V.K) sırasıyla 0,5376 mM, \pm 0,0236 ve % 4,40 olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler : Elektropolimerizasyon, galaktoz oksidaz, miyoglobin, galaktoz, biyosensör

ABSTRACT**DESIGN OF A NEW MEDIATED BIOSENSOR BASED ON
GALACTOSE OXIDASE – MYOGLOBIN HYBRID SYSTEM****SERT SERDAR, Belgin**

MSC Thesis, Biochemistry Department
Supervisor: Prof. Dr. Erol AKYILMAZ
September 2014, 61 pages

In this thesis, design of a gold electrode (Au) surface thionine – glutaraldehyde nafion modified galactose oxidase- myoglobin hybrid biosensor which brings a new and original perspective to biosensor technology intended for D-galactose determination. Firstly, electropolymerization of thionine was applied on surface of gold to develop biosensor system. Then, provided immobilization of enzyme-protein solution (galactose oxidase and myoglobin) with cross-linking via dropping glutaraldehyde on the electrode. Finally electrode coating with a nafion was completed that gold –thionine-GA-nafion modified all the steps required for the biosensor preparation.

D-Galactose measurements were carried out by using differential pulse method between potential of (-0.3) and (0.5 V). The measurements were carried out with the determination of decreasing current values directly proportional with D-galactose concentration using differential pulse method.

In the optimization studies of the biosensor firstly bioactive layer components such as optimum thionine amount, optimum glutaraldehyde amount, optimum galactose oxidase activity, optimum myoglobin amount, optimum nafion amount were carried out. In the optimization of working conditions; optimum pH and optimum temperature were also investigated. Afterwards, in the characterization studies of the biosensor some parameters such as linearity, reproducibility, storage stability were determined.

From the result of the optimization studies optimum thionine amount , optimum glutaraldehyde amount, optimum galactose oxidase activity – myoglobin amount and nafion amount were determined to be 0.5 mg/ml, 10 μ L, 1.177 U/ml-10mg/ml, 10 μ L respectively. From the experiments the phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) and 32°C were chosen to be optimum working conditions for the biosensor. It was determined from the characterization studies of the biosensor that linear curves were obtained galactose concentration between the ranges of 0.1 mM to 1 mM. At the repeatability experiments (n=7), the average value (\bar{x}), standard deviation, (SD) and coefficient of variation (CV %) were calculated to be 0.5376 mM, \pm 0.0236 and % 4.40 for 0.5mM galactose concentration, respectively.

Keywords : Electropolymerization, galactose oxidase ,myoglobin ,galactose, biosensor

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca maddi manevi her anlamda desteğini esirgemeyen, yol gösteren sorumluluk vererek gelişmemi sağlayan saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Erol AKYILMAZ'a, kıymetli görüşlerinden faydalandığım Doktora öğrencisi araştırma görevlisi Sayın Çağrı ALTUĞ' a, ve bu aşamaya gelmemde önemli katkıları olan tüm Hocalarıma teşekkürü borç bilirim. Ayrıca lisansüstü eğitimime başlamamdaki en büyük desteğim olan ve bana her zaman inanan bana verdikleri destek göstermiş oldukları sabır ve fedakârlıklar için başta AİLEM olmak üzere Engin SERT' e, Pelin SERT' e, Bilge BOZDAĞ' a, laboratuvar çalışmalarında engin bilgilerini benimle paylaşan Doktora Öğrencisi Erhan CANBAY' a, Cansu GÜVENÇ' e, Zeynep ÇELİK' e ve nihayetinde her zaman yanımda olan eşim EMRE SERDAR' a teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 13 FEN 028 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZETvii
ABSTRACTix
TEŞEKKÜRxi
ŞEKİLLER DİZİNİ xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	. xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	. xxiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Biyosensörler	1
1.1.1. Amperometrik enzim sensörleri	3
1.1.2.Mikrobiyal biyosensörler.....	5
1.1.3. İmmünoensörler	5
1.1.4. DNA sensörleri	6
1.1.5.Doku temelli sensörler	6
1.2. Voltametre	6
1.2.1. Voltametre tarihi ve prensipleri	7

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.3. İletken polimerler.....	9
1.3.1. İletken polimerlerde elektronik iletkenlik.....	10
1.3.2. İletken polimerlerin sentez yöntemleri	11
1.3.2.1.Elektrokimyasal yöntemler	12
1.3.3. İletken polimerlerle enzim immobilizasyonu	13
1.4. Galaktoz oksidaz.....	13
1.5. Galaktoz	14
1.5.1. Galaktoz metabolizma hastalıkları.....	16
1.6. Miyogloblin.....	17
1.6.1.Proteinlerin direkt elektrokimyası.....	18
1.7. Glutaraldehit.....	19
1.8. Nafyon.....	20
2. MATERYAL VE METOD.....	21
2.1. Materyal	21
2.1.1. Cihaz ve diğer ekipmanlar	21
2.1.2. Kimyasallar	21
2.2. Yöntem.....	22

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

2.2.1. Biyosensörün hazırlanması.....	22
2.2.2. Biyosensörün çalışma ilkesi	24
2.3. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalar	24
2.3.1. Tiyonin konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi	24
2.3.2. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	25
2.3.3. Enzim aktivitesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	25
2.3.4. Miyogloblin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi	25
2.3.5. Nafyon miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi	26
2.4. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu.....	26
2.4.1. Optimum pH'nın belirlenmesi.....	26
2.4.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	26
2.5.Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün karakterizasyonuna ilişkin çalışmalar.....	26
2.5.1.D-Galaktoz için doğrusal tayin aralığı.....	26
2.5.2.Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün tekrarlanabilirliği.....	27

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.5.3. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün substrat spesifikliği.....	27
2.5.4. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensör cevabı üzerine girişimcilerin etkisi	27
2.5.5. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün depo kararlılığı	27
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.	29
3.1.Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon Modifiye Biyosensörün Optimizasyon ve Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular	28
3.1.1. Tiyonin konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisine yönelik bulgular	32
3.1.2. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisine yönelik bulgular.....	35
3.1.3. Enzim aktivitesinin ve miyogloblin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi	37
3.1.4. Nafyon konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisine yönelik bulgular.....	40
3.2. Çalışma koşullarının optimizasyonuna yönelik bulgular.....	42

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.2.1. pH optimizasyonu	42
3.2.2. Sıcaklık optimizasyonu.....	43
3.3. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye elektrodun karakterizasyonuna ilişkin bulgular	44
3.3.1 D-Galaktoz için doğrusal tayin aralığının belirlenmesi.....	44
3.3.2. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün tekrarlanabilirliğine ilişkin bulgular	48
3.3.3. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün substrat spesifikliğine ilişkin bulgular	48
3.3.4. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün cevabı üzerine girişimcilerin etkisine yönelik bulgular	49
3.3.5. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün depo kararlılığına yönelik bulgular.....	50
4. GENEL DEĞERLENDİRME	52
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi	1
1.2. Konjuge yapıya sahip poliasetilen	10
1.3. İletkenlik mekanizması	11
1.4. Galaktoz oksidazın kataliz reaksiyonu	13
1.5. a) Galaktoz oksidaz 3 boyutlu yapı b) Galox aktif merkezindeki Cu kare piramityapısı	14
1.6. Galaktozun yapısı.....	14
1.7. Galaktoz 4. Karbon atomunda glukozun epimeri	15
1.8. Galaktoz metabolizması.....	15
1.9. Miyogloblin.....	17
1.10. Glutaraldehit ile bir enzim molekülünün bağlanması	19
1.10. Glutaraldehitin formülü.....	20
1.12. Nafyonun formülü	20
2.1. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye elektroda ait immobilizasyon şeması	23
2.2. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörünün çalışma ilkesi.....	24

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Biyoaktif tabakanın optimizasyon voltagramları.....	29
3.2. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon 1,5 mM stok çözeltilerden 100-1000 µM galaktoz ilavesi CV.....	30
3.3. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon 1,5 mM stok çözeltilerden 100-1000 µM galaktoz ilavesi DP şeması	31
3.4. Tiyonin polimerizasyon döngüsel voltammogramları.....	32
3.5. 0,25mM Tiyonin konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B)	33
3.6. 0,5mM Tiyonin konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere kalibrasyon grafiği (B)	33
3.7. 0,5mM Tiyonin konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B)	34
3.8. Tiyonin konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisine ait kalibrasyon grafiği.....	34
3.9. %1,25'lik Glutaraldehit konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B)	35
3.10. % 2,5'lik Glutaraldehit konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B)	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.11. % 5'lik Glutaraldehit konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B)	36
3.12. 1,177 U/ml galaktoz oksidaz- 2mg Mb miktarının DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlerine ait kalibrasyon grafiği (B)	37
3.13. 2,35 U/ml galaktoz oksidaz- 2mg Mb miktarının DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A). ve DP ölçümlerine ait kalibrasyon grafiği (B)	38
3.14. 1,177 U/ml galaktoz oksidaz- 4mg Mb miktarının DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A). ve DP ölçümlerine ait kalibrasyon grafiği (B)	38
3.15. 2,35 U/ml galaktoz oksidaz- 4mg Mb miktarının DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A). ve DP ölçümlerine ait kalibrasyon grafiği (B)	39
3.16. % 0,05'lik Nafyon konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B))	40
3.17. % 1'lik Nafyon konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B)	41
3.18. % 2'lik Nafyon konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B)	41
3.19. Biyosensör cevabına pH'nın etkisi	43
3.20. Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisi	44
3.21. a) Tayin aralığı denemesi için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (0,01-0,1mM)	45

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.21. b) Doğrusal tayin aralığı standart grafiği (0,01-0,1mM)	45
3.22. a) Tayin aralığı denemesi için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (0,1-1mM).....	46
3.22. b) Doğrusal tayin aralığı standart grafiği (0,1-1mM)	46
3.23. a) Tayin aralığı denemesi için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar(1-10mM).....	47
3.23. b) Doğrusal tayin aralığı standart grafiği (1-10mM)	47
3.24. D-Galaktoz biyosensörü için substrat spesifikliğine ilişkin grafik.....	49
3.25. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye elektrodunun çeşitli bileşiklere verdiği yanıtlar.....	50
3.26. D-Galaktoz biyosensörü için depo kararlılığı denemesi	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Amperometrik biyosensörlerde kullanılan çeşitli enzimler	4
1.2. İletken polimerlerin uygulama alanları.....	10
3.1. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik bulguları.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

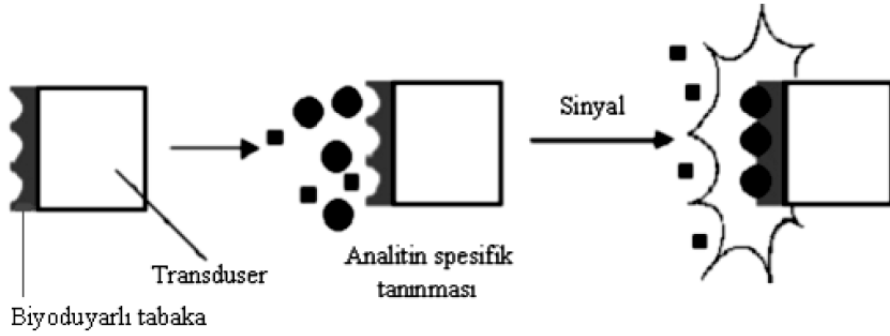
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Au	Altın elektrod
CV	Döngüsel voltammogram
Tiy	Tiyonin
Glu	Glutaraldehit
Gaox	Galaktoz oksidaz
Mb	Miyoglobin

1.GİRİŞ

1.1. Biyosensörler

Biyosensörler, biyolojik sistemler ve bu sistemlerden gelen bilgiyi analitik olarak kullanışlı bir sinyale dönüştüren iletici sistemlerden meydana gelir (Şekil 1.1). Spesifik bir analit ya da analitler grubunun konsantrasyonuna bağlı olarak sinyal oluşturur. Biyosensörlerin biyolojik bileşeni; katalitik özellik taşıyan ve katalitik özellik taşımayan biyomateryaller olarak iki önemli gruba ayrılır. Katalitik özellikteki grup enzim, mikroorganizma ve dokuları içerirken, katalitik özellik göstermeyen grup ise antikorlar, reseptörler ve nükleik asitlerden oluşur (Sharma et al., 2003). Biyosensörlerin, analit tayini için gerekli olan iletici kısmı ise elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik ve kondüktometrik), optik, termometrik, piezoelektrik ya da manyetik özellikteki gruplardan oluşabilir (Sharma et al., 2003; Velasco-Garcia and Mottram, 2003) (Şekil 1.1). Bir biyosensörün fonksiyonu biyolojik aktif materyalin biyokimyasal spesifikliğine bağlıdır. Biyolojik materyalin seçimi spesifiklik, depolama, operasyonel stabilite gibi birçok faktöre bağlıdır. Aynı zamanda kimyasal bileşik, antijenler, mikroplar, hormonlar, nükleik asitler ya da tat ile koku parametrelerinin hangisinin tayin edileceği biyolojik materyalin seçimini etkiler (D'Souza, 2001). Biyolojik sistem ve iletici sistemin iyi bir şekilde etkileşmesi yani başarılı bir immobilizasyon tekniğinin kullanılması etkili bir biyosensörün hazırlanmasında önemlidir (Tkac et al., 2005).

Günümüzde birçok tipte biyosensör sistemi geliştirilmiştir ve bunlar klinik, medikal, çevresel görüntüleme, endüstriyel proseslerin kontrolü ve diğer pek çok alanda çeşitli analizler için kullanılmıştır.



Şekil 1.1. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi (Urban 2000)

Biyosensörler real-time analiz için uygundur ve özellikle endüstride örneğin; proses görüntüleme ve kontrolde hızlı ölçüm yapılabilmesi açısından önemlidir. Bunların yanı sıra biyosensörler farmasötik endüstrisi, medikal diyagnostik, yiyecek ve ilaç testleri ve çevresel analizlerde gibi birçok alanda uygulama olanağı bulmaktadır (Karube and Nakanishi et al., 1994).

Biyosensörlerin değerlendirilmesinde dikkate alınan parametreler;

Seçicilik: İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden birisi seçicilik özelliğidir. Cihazın sadece analite özgünlüğünü gösterir. Cihaz başka reaktiflere ilgi göstermez ve hatalı sonuç vermez.

Kullanım Ömrü: Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca, biyosensörün kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametrelerini de etkilemektedir.

Tekrarlanabilirlik: İdeal bir biyosensör için, elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde mümkün oldukça birbirine yakın sonuçların okunması istenir.

Kararlılık: Stabilite, biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca; pH, ısı, nem, ortam, O₂ derişimi gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

Yüksek Duyarlılık: Biyosensörün yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması ideal biyosensörlerin özelliklerindedir.

Geniş Ölçüm Aralığı: Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörlerden alınan akım - derişim eğrilerinin doğrusal olduğu derişim aralığıdır.

Hızlı Cevap Zamanı: Bir biyosensör elektrodunun cevap zamanı elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Örneğin elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı kısa (hızlı)'dır.

Basitlik ve Ucuzluk: Tasarımı basit ve ucuz, kullanımı rahat biyosensörler ideal biyosensörlerdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve de pahalı olan yapılar daha sonra basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da maliyeti düşürülmüştür.

1.1.1 Amperometrik enzim sensörleri

Enzim ile modifiye edilmiş elektrotlar amperometrik biyosensörlerin ve biyoyakıt hücrelerinin temel parçalarındandır. Enzim elektrotları elektrokimyasal prosesi immobilize enzimin aktivitesi ile kombine eden minyatür kimyasal iletici sistemlerdir (Dzyadevych et al., 2008). Bu sistemler enzimin biyolojik fonksiyonu sayesinde biyolojik orijinli olan substrat moleküllerine karşı genellikle yüksek seçicilik gösterir. Bu nedenle, enzimlerin sahip olduğu bu özellik enzim sensörleri oluşturulmasında avantaj sağlar. Tipik olarak, enzim reaksiyonunun kinetiği ürün oluşumunun ya da reaktantın eksilmesinin hızı olarak izlenir. Eğer ürün ya da reaktant elektroaktif ise reaksiyon direkt olarak amperometri ile izlenebilir. Böylece bu tip elektrokimyasal reaksiyonlar amperometrik biyosensörlerin oluşturulmasında kullanılabilir. Elektrokimyasal biyosensörlerin büyük bir kısmı katalitik reaksiyon sırasında elektronlar kullanan ya da üreten oksidoredüktaz sınıfı enzimleri içerir. Bu elektrokimyasal reaksiyonlar elektrot yüzeyinde gerçekleşir ve akım oluşturmak için kullanılır. Enzimatik oksidasyon sonucu açığa çıkan elektronlar anoda transfer edilir. Burada, oksijen gibi yüksek bir elektron alıcısına taşınır.

Enzim elektrotlarının değişmez parçaları enzimler ve elektrot materyalidir. Elektrot materyalinin seçiminde önemli olan parametreler elektriksel iletkenlik ve materyalin sertliğidir. Bu nedenle, altın (folyo ya da çubuk), platin (folyo ya da çubuk) ya da karbon (kâğıt, çubuk, pasta, metallenmiş karbon, camımsı karbon, karbon fiber, nanotüp film) gibi katı destek elektrotlar kullanılır. Enzim elektrotlarını oluşturmak amacıyla kullanılan enzimler analizlemek isteğimiz analitin reaksiyon tipine bağlı olarak seçilir. Redoks enzimleri (oksidoredüktazlar) en çok kullanılan enzimlerdir. Ayrıca lipazlar ve esterazlar gibi hidrolaz sınıfı enzimler de redoks enzimleri ile beraber kullanılabilir. Enzim biyosensörlerinin hazırlanmasında biyolojik materyal olarak en çok kullanılan enzimler Tablo 1.1’de verilmiştir. Tüm bu enzimlerin içinde glukoz oksidaz kan glukoz tayininin öneminden dolayı en çok kullanılan enzimdir. Enzim elektrotlarının en önemli problemi ko-substrat olarak oksijene ihtiyaç duymaları ve reaksiyonun amperometrik yöntemlerle izlenmesinin hidrojen peroksida dayalı olmasıdır. Bu problem medyatörler kullanılarak aşılmaya çalışılmaktadır (Sarma et al., 2009).

Çizelge 1.1. Amperometrik biyosensörlerde kullanılan çeşitli enzimler

Enzim	Substrat	Referans
Glukoz oksidaz	Glukoz	Newman and Tumer, 2004
Galaktoz Oksidaz	Galaktoz	Tkac et al.,1999
Peroksidaz	H ₂ O ₂	Mathebe et. al.,2004
Kolin oksidaz	Kolin	Shi et al.,2006
Alkol Oksidaz	Etanol, metanol, Formaldehid	Akin et al.,2009
Glutamat oksidaz	Glutamat	Mikeladze et al., 2002
Lizin oksidaz	Lizin	Saurina et al., 1999
Tirozinaz	Fenolik bileşikler	Zhang et al., 2003
Glutaminaz	Glutamin	Cattaneo and luong 2004
Kreatinin amidohidrolaz	Kreatinin	Altug and Dinckaya,2007
Laktat oksidaz	Laktat	Romero et al., 2008
Alkol dehidrogenaz	Alkol	Manso et al., 2008
Piranoz oksidaz	Piran halkasına sahip şekerler	Ozdemir et al., 2010
Üreaz	Üre	Soldatkin et al., 2000

Enzim sensörleri hazırlanırken immobilizasyon materyali olarak iletken polimerler, fonksiyonelleştirilmiş polimerler, kompozit materyaller, sol-gel ve nanomateryaller kullanılabilir (Sarma et al., 2009).

1.1.2. Mikrobiyal biyosensörler

İmmobilize mikrobiyal hücreler biyoreaktörlerde, hidrojen üretiminde, amino asitler, organik asitler, antibiyotikler, steroidler, ekzopolisakkaritler gibi yararlı birçok bileşiğin sentezinde ve çevre ile ilgili endüstriyel ve bilimsel çalışmalarda kullanılmaktadır (Cassidy et al., 1996; Amin et al., 2007; Deo et al., 2004a; Jo et al., 2008; Sauer et al., 2008; Jenkins et al., 2004; Kapoor et al., 2008; Singh et al.; 2008). Aynı zamanda mikrobiyal hücrelerin biyobileşen olarak kullanıldığı mikrobiyal biyosensörlerin hazırlanmasındaki uygulamaları oldukça sık karşımıza çıkmaktadır (Reshetilov et al., 2001). Son zamanlarda, organik bileşiklerin tayini için birçok biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Bunların büyük bir kısmı enzim katalizli ya da mikrobiyal katalizli reaksiyonları temel almaktadır. Enzim sensörleri ilgili substratlarına karşı yüksek spesifiklik gösterir, ancak enzimler genelde pahalıdır ve stabil değildir.

1.1.3. İmmünoensörler

Stabil bir kompleks oluşturarak antikorların antijenleri moleküler tanınmasının spesifikliğı; hem analitik immünoassaylerde hem de katı destek materyali ile oluşturulan immünoensörlerde temel alınmaktadır. İmmonuassay teknolojisi özellikle klinik laboratuvarları için oldukça önemlidir ve bu konudaki araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

İmmünoensörlerde ölçüm direkt (işaretlenmemiş) ya da indirekt (işaretlenmiş) yolla yapılabilmektedir. Direkt sensörlerde immün kompleksin oluşumu sonrasındaki fiziksel değişim dedekte edilebilirken, indirek sensörlerde sinyal üreten işaretleyiciye ihtiyaç duyulur. İşaretleyici olarak peroksidaz, fosfataz, katalaz, lüsiferaz gibi çeşitli enzimler, ferrosen, In^{2+} tuzları ya da floresans moleküller (rodamin, floressein, rutenyum dimin kompleksleri, fosforesans porfirin boyalar) kullanılabilir (Luppa et al., 2001). İşaretleyici kullanmadan yapılan ölçümler döngüsel voltammetri, kronoamperometri, impedimetri, yüzey plazmon rezonans, ya da quartz kristal mikrobals sistemlerini temel alırken, işaretleyici kullanılan immünoensörlerde genellikle amperometrik ya da florimetrik yöntemler yaygındır (Warsinke et al., 2000; Luppa et al., 2001; Prodromidis, 2010; Skladal, P., 1997).

1.1.4. DNA sensörleri

Deoksiribonükleik asit (DNA) kalıtsal karakteristiklerin belirlenmesinde ve replikasyon için gerekli olan bilginin taşınmasında önemli bir moleküldür. Kimyasal ve biyofiziksel özelliklerinden dolayı, DNA genetik kodun ve genom dizisinin keşfi için gerekli olan analizlerde önemli bir konu olmuştur (Diculescu et al., 2005). DNA biyosensörleri reseptör ve iletici sistemin kombinasyonu ile oluşturulur. DNA biyosensörlerinin hazırlanmasında önemli parametrelerden bir tanesi, tek zincir probun doğru bir oryantasyonla yüzeyde immobilizasyonudur. Analizlenmek istenen DNA tek zincirinin proba hibridizasyonu sonrasında sinyal elde edilmiş olur. DNA hibridizasyonunun sinyalinin belirlenmesi direkt (işaretleyici olmadan) ya da indirekt (enzimler, floroforlar, manyetik boncuklar, metal kompleksleri, organik redoks boyalar işaretleyici olarak kullanılabilir) metotlar olarak iki grupta toplanabilir. Direkt iletimde mikrogravimetrik, elektriksel, elektrokimyasal ya da optik yöntemler kullanılırken indirekt metotlar elektrokimyasal ya da florimetrik ölçümler yapılmaktadır (Cosnier, S., and Mailley, P., 2008; Teles and Fonseca, 2008; Drummond et al., 2003).

1.1.5. Doku temelli biyosensörler

İzole enzimler yerine doku kesitlerinin kullanıldığı biyosensörler çeşitli çalışmalarda karşımıza çıkmaktadır. Bu sistemler enzimin daha stabil olması, yüksek enzim aktivitesine sahip olmaları, ucuz olmaları, kolay hazırlanmaları ve enzimin kofaktörüne ihtiyaç duymamaları gibi avantajlara sahiptir. Özellikle bitki dokuları kullanılarak hazırlanan biyoelektrotlarda hidrojen peroksidin ya da oksijenin izlenmesiyle sinyal elde edilmektedir.

1.2 Voltametri

Voltametri polarize olmuş çalışma elektrodunda, akım, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülür. Diğer bir deyişle voltametri, tam derişim polarizasyonu koşulu altında bir elektrokimyasal hücrede oluşan akımın ölçülmesi esasına dayanan elektrokimyasal bir yöntemdir. Genel olarak voltametri

kullanılan çalışma elektrotları, polarizasyonu arttırmak için, yüzey alanları çoğunlukla birkaç milimetre kare ve bazı uygulamalarda ise birkaç mikrometre veya daha küçük olan mikro elektrotlardır.

1.2.1 Voltametri tarihi ve prensipleri

Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920' lerin başında geliştirilen ve voltametrinin özel bir tipi olan polarografi tekniğine dayanarak geliştirilmiştir. Voltametri inorganik, fiziko ve biyokimyacılarla çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin incelenmesi, yüzeydeki adsorbif işlemlerinin araştırılması ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde oluşan elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması gibi amaçlar için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Voltametrinde çalışma elektrodunu içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali yöntemin temelini teşkil eden özgün akım yanıtları oluşturur.

1.2.2 Voltametrinde kullanılan uyarma sinyalleri

Voltametrinde çalışma elektrodu içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali yöntemin temelini oluşturan karakteristik akım cevapları oluşturur. Uyarma sinyalinin çeşidine göre voltametrik yöntemler dört başlık altında incelenebilir:

Doğrusal taramalı voltametri (DTV): Elektrokimyasal hücreye uygulanan doğru akım (dc) potansiyeli zamanın fonksiyonu olarak doğrusal bir şekilde artırılır. Bu sırada hücrede oluşan akım, zamanın (dolayısıyla uygulanan potansiyelin) bir fonksiyonu olarak kaydedilir ve voltamogram denilen grafikler elde edilir.

Diferansiyel puls voltametrisi (DPV): Bu yöntemde uyarma sinyali, periyodik bir darbenin doğrusal bir tarama sırasında oluşturulmasıyla elde edilir. Bu yöntemin önemli bir avantajı, yarı-dalga potansiyelleri arasında yaklaşık 0.005 V fark olan maddeler için bile özgün pik maksimumunun elde edilmesidir. Buna

karşın DTV' de yarı-dalga potansiyel farkı en az 0.2 V olmalıdır, eğer bu farka ulaşamazsa voltamogramlarda iyi pik maksimumları elde edilemez. DPV ' nin tayin sınırı, DTV' nin tayin sınırından 100-1000 kat daha düşük olup 10^{-7} - 10^{-8} M aralığındadır. DPV' nin tayin duyarlılığının daha yüksek olmasının nedeni faradayik akımın en yüksek, faradayik olmayan kapasitif akımın en düşük olduğu anda ölçüm yapmasıdır.

Kare dalga voltametrisi (KDV): Hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü taşıyan bir darbe voltametri yöntemidir. Bu yöntemde voltamogramın tamamı 10 milisaniyeden daha kısa sürede elde edilir. KDV asılı civa damla elektrodu, katı elektrotlar veya kromatografik detektörler ile kullanılabilir. Uyarma sinyali, darbenin basamak sinyali üzerine bindirilmesi ile elde edilir. Basamaklı sinyalde, her basamağın boyu ve darbe periyodu eşit olup yaklaşık 5 ms' dir. Kare dalga voltamogramları elde etmek için, ileri darbe akım ve geri darbe akımın farkı, potansiyele karşı grafiğe geçirilir. Tayin sınırı 10^{-7} - 10^{-8} M aralığındadır.

Dönüşümlü voltametri (DV/CV): Çeşitli koşullar altında yükseltgenme indirgenme tepkimelerinin mekanizmaları hakkında bilgi veren bir tanı aracı olarak önemli bir uygulama alanı bulmuştur. Fakat nicel analizlerle ilgili uygulamaları sınırlıdır. Yöntemin, uyarma sinyalinin şeklinden kaynaklanan bir diğer adı da üçgen dalga voltametrisidir. DV' de durgun çözeltide, sabit hızda potansiyel, başlangıç potansiyelinden bitiş potansiyeline doğru pozitif veya negatif yönde taranır. Daha sonra taramanın yönü değiştirilerek gene aynı tarama hızıyla ilk potansiyele kadar tarama yapılır. Bu sırada elektrot tepkimeleri sonucu ortaya çıkan akım, taranan potansiyele karşı grafiğe geçirilir. Elde edilen eğrilere dönüşümlü voltamogram denir. Bir dönüşümlü voltamogramın en önemli parametreleri, katodik pik potansiyeli, anodik pik potansiyeli, katodik pik akımı ve anodik pik akımıdır. Tersinir bir elektrot için anodik ve katodik pik akımları mutlak değerce yaklaşık birbirine eşit, fakat zıt yönlüdür. Pik potansiyellerinin farkı $0.0592/n$ ' dir. Burada n, yarı reaksiyonda yer alan elektron sayısıdır (Yüce, 2011).

1.3. İletken Polimer

Polimer, monomer denen küçük moleküllü yapıların polimerizasyon tepkimesi sonucu yan yana gelerek oluşturdukları büyük mol kütleli, uzun zincirli yapılara denir. Polimerler metallerle kıyaslandığında, polimerlerin genellikle metallerden daha hafif ve ucuz olduğu, kolay şekil alabildiği fakat iletken olmadıkları göze çarpmaktadır. Metallerin ise zor işlenebilen, ağır, pahalı olmalarının aksine iletkenlikleri yüksek maddeler olduğu bilinmektedir. Polimerler ile metallerin üstün özellikleri bir araya getirilerek iletkenlik özelliği taşıyan polimerlerin elde edilmesi mümkün olmuştur. Bu amaçla hazırlanan polimerler, iletken polimerler olarak isimlendirilmiştir (Çoşkun, 2009; Aydın, 2012).

İletken polimerler konusunda çalışmalar 1950'lerde başlamıştır. İletkenlikleri oda sıcaklığında 10^{-5} S/ cm olan yarı iletken polimerler 1950-1960 yılları arasında üretilmiştir. Günümüzdeki anlayışına uygun iletken polimerler 1970'lerin sonunda ortaya çıkmaya başlamıştır. Shirakawa yöntemiyle üretilen poliasetilenin yükseltgen ile dop edilmesi sonucunda iletkenliğinin 10^8 kat arttırıldığı görülmüştür (Akbulut, 1999).İletkenlik konusunda en önemli adım 1970' da Diaz 'ın pirolü elektrokimyasal yöntemle yükseltgeyerek polipirolü üretmesiyle anlatmıştır. Polipirol anot üzerinde üretilebilmiş ve güçlü bir film olarak yüzeyden çıkarıldığında iletkenliği 100 S / cm^2 ye ulaşabilmiştir. Benzer şekilde, elektro yükseltgenme yöntemiyle iletken politiyofen anot üzerinde üretilebilmiştir (Muhammet, 2008).

İletken polimerler, ana iskelet zincirlerinde zayıf bağ olarak tanımlanırlar. Polimerlerin elektronik iletkenlik gösterebilmesi için, polimer örgüsünde, elektronların zincir boyunca taşınmasını sağlayan uygun yerlerin bulunması gerekir. Bu koşulu ana zincirinde konjuge çift bağlar bulunan polimerler sağlar. İletken polimerleri, diğer polimerlerden ayıran temel özellik, sırasıyla değişen tek ve çift bağlardan oluşan bir zincir yapısına sahip olmalarıdır. Bu şekilde sırasıyla değişen bağ yapısına; "konjügasyon" denir. Bu nedenle iletken polimerlere "konjüge polimerler" de denmektedir.



Şekil 1.2. Konjuge yapıya sahip poliasetilen

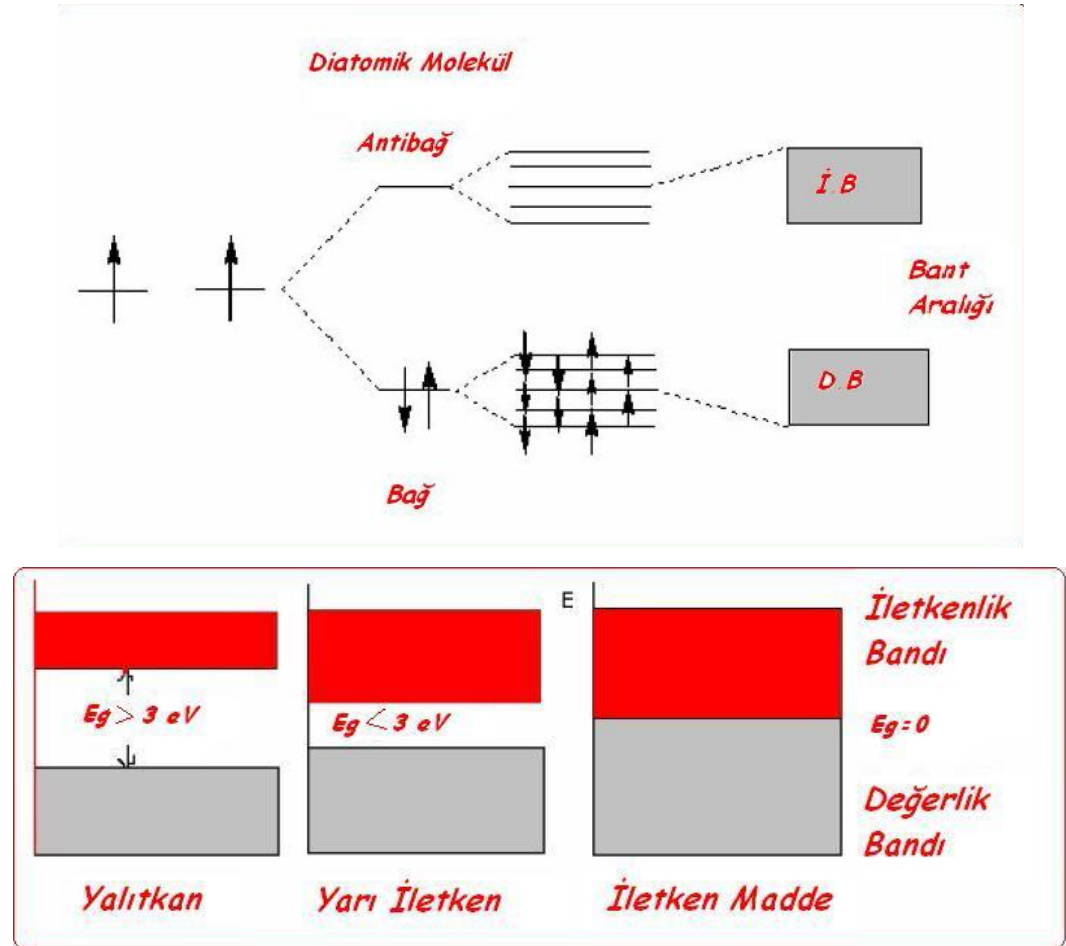
Çizelge 1.2. İletken polimerlerin uygulama alanları

Şarj olabilen piller	Elektrokromik aletler
pH sensörleri	İyon seçici elektrot yapımı
Gaz sensörleri	Korozyon inhibitörü
Biyosensörler	Kontrollü ilaç salınımı
Elektronik aletler	Radar absorbeleri olarak askeri alanda
Fotoelektrokimyasal hücreler	Antenlerde, kamuflaj ve diğer koruyucu tip cihazlarda

1.3.1. İletken polimerlerde elektronik iletkenlik

Elektriği, elektronik yolla ileten poliasetilen, polianilin, polipirol gibi polimerlerde iletkenlik mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Elektronik iletkenliğin açıklanmasına yönelik kuramsal yaklaşımlardan birisi band kuramıdır. Birer elektronu bulunan benzer iki atomun bir araya gelerek oluşturduğu iki atomlu bir bileşiğin (H_2), bağ yapmadan önceki ve bağ yaptıktan sonraki elektron düzeyleridir (Batır, 2009). Polimerlerde delokalize elektronlar tarafından sağlanan elektriksel iletkenlik metallerde ve yarı iletken sistemlerde olduğu gibi Band Teorisi ile açıklanır. Bu teoriye göre organik maddeler yüksek enerjili elektronlar ile iletkenlik bandı arasında geniş enerji aralığına sahip delokalize elektronlara sahiptir ve bu nedenle yalıtıcıdır. Elektriksel iletkenliğin olabilmesi için elektronların serbestçe hareket etmesi gerekir. Bu da dolu boş bantların birbirine bitişik olması ile sağlanabilir. Eğer bir maddede enerji bantlarından biri elektronlarla tamamen dolu ve kendisinden sonra gelen boş enerji bandı ile arasındaki enerji farkı büyük ise, madde yalıtıcıdır. Metallerde ise bu enerji bandı olmadığı için elektronlar kolayca hareket edebilecek ve böylece iletkenlik sağlanmış olacaktır. Buna göre bazı polimerler, metallere

yalıtkanlar arası bir iletkenliğe sahiptir. Bir polimerin iletkenliğinin büyüklüğü, örgüsündeki yük taşıyıcıların sayısı (n) ve bunların hareket yetenekleriyle (μ) yakından ilişkilidir. Bu ilişki, e elektron yükünü göstermek üzere, $\sigma = n \cdot \mu \cdot e$ şeklindedir. Artı yük taşıyıcıların (katyon veya artı yüklü boşluklar) bulunduğu tuz çözeltilerinde ve yarı iletkenlerde, artı yük taşıyıcıların iletkenliğe olan katkısı yukarıdaki bağıntıya eklenmelidir (Saçak, 2004).



Şekil 1.3. İletkenlik mekanizması

1.3.2. İletken polimerlerin sentez yöntemleri

İletken polimerleri sentezlemek için belli başlı dört metot kullanılmaktadır.

- Elektrokimyasal polimerizasyon
- Kimyasal polimerizasyon
- Piroliz
- Katalitik polimerizasyon

İletken polimerlerin sentezinde, başlangıçta kullanılan monomerler sonuçta oluşan polimerlerin yapısında korunabilen tipik aromatik veya çoklu konjuge

bağ yapısına sahiptirler. Örneğin asetilenin polimerizasyonu sonucu konjuge etilen birimleri içeren polietilen oluşturmaktadır. Benzenin polimerizasyonunda ise birbirine kovalent bağlı aromatik zincirli poli(p-fenilen) oluşur. Bu şekilde elde edilen iletken polimerlerin yapısında Π -konjugasyonunun uzatılması çok önemlidir.

1.3.2.1. Elektrokimyasal yöntem

Elektrokimyasal yöntem, iletken polimer sentezinde eskiden beri bilinen bir yöntem olup, değişik tekniklerle beraber günümüzde de sıkça uygulanmaktadır. Bu metotta, monomer uygun bir çözücü veya destek elektrolitle beraber polimerleşme hücresine konularak yapılan elektroliz sonucunda, elektrod yüzeyinde veya çözültide polimer elde edilebilmektedir. Polimerleşme hücresi genellikle, çalışma, karşı ve referans elektrottan oluşan üç elektrotlu bir sistemdir. Hücre içine konulan sulu veya susuz ortamdaki monomer çözeltinin, dönüşümlü voltametri (CV) tekniği ile uygun bir voltamogramı alınarak sabit akım veya sabit potansiyelde polimerleşme gerçekleştirilmektedir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, monomerin yükseltgenme veya indirgenme potansiyelinde çözücü olarak, destek elektrolit ve elektronların reaksiyon vermemesidir. Monomerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi ile oluşan radikal anyon veya radikal katyon zinciri büyümekte ve bunlar da iletken polimer zincirleri oluşturmaktadır. Elektrokimyasal polimerleşmede kontrollü potansiyel veya akım uygulanması (sabit potansiyel ve sabit akım elektroliz), başlangıcı ve bitiş basamaklarının kontrol edilebilmesi gibi üstünlükleri vardır. Bu yüzden kimyasal yöntemle göre daha saf, yan ürünlerden ve kirlilikten arınmış ürünler elde etmek mümkündür (Batır, 2009).

Elektrokimyasal polimerleşmenin avantajları;

- Polimerizasyonun oda sıcaklığında yapılabilmesi
- Polimerin, monomer, katalizör ve çözücünden ayrılması gibi hiçbir işlem gerektirmemesi
- Polimerin elektrot yüzeyinde film olarak oluşması

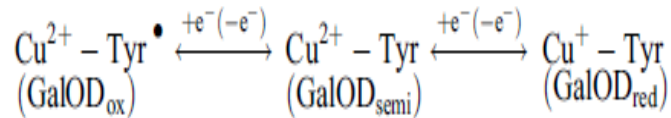
- Potansiyelin ya da zamanın değiştirilmesiyle film kalınlığının kontrol edilebilmesi
- Homojen filmler elde edilmesi
- Başlangıç ve bitiş basamaklarının kontrol edilmesi
- Seçici potansiyel kontrolü ile istenilen özellikte kopolimerlerin üretilmesi
- Elektrot potansiyeli, monomeri kimyasal başlatıcılara göre daha kuvvetli etkileyebildiği için kimyasal yöntemlerle aktivasyonu mümkün olmayan monomerleri uygun elektrot potansiyeli ile kolayca aktifleştirilebilmesi
- Hiçbir çözücüde çözünmeyen iletken polimerlerin elektrot yüzeyinde film oluşumu sırasında IR, UV, ESR gibi spektroskopik yöntemlerle karakterize edilebilmesine imkan vermesi (Gülce, 2011).

1.3.3. İletken polimerlerle enzim immobilizasyonu

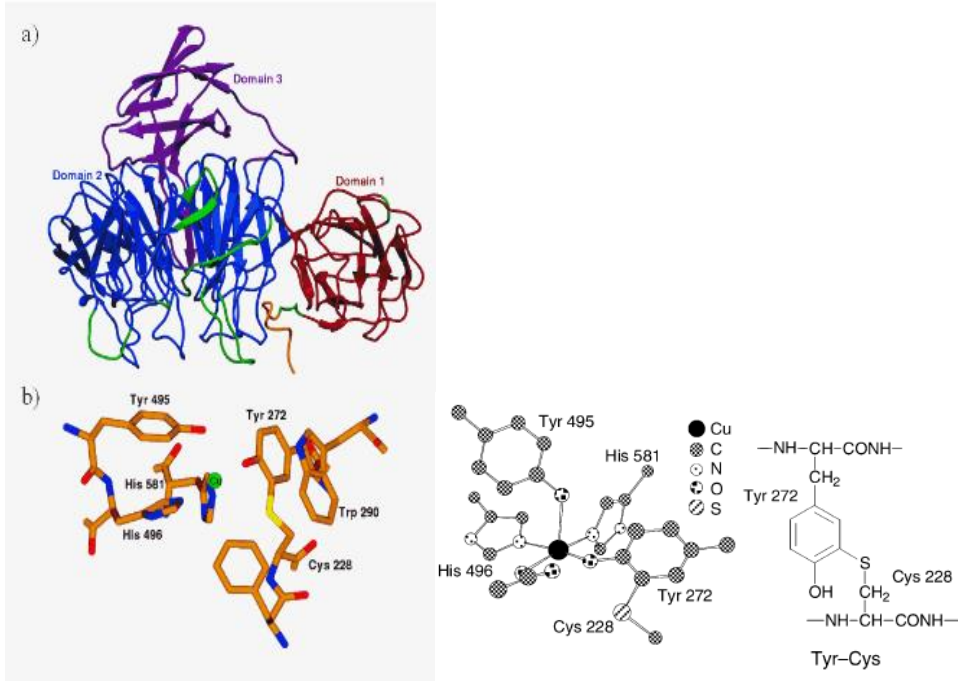
İletken polimer elektrotların elektroanalitik uygulamalarında, enzim immobilizasyonuna sıklıkla rastlanmaktadır. Aizawa ve Foulds tarafından yapılan çalışmaların ardından enzimler çeşitli iletken polimerlerle immobilize edilmiştir. Enzim molekülüne monomer kimyasal olarak bağlanabilmekte ve ardından iletken polimer elektrolizle üretilmektedir. Bu yöntem ile kovalent bağlı enzim elektrod elde edilmektedir (Akbulut, 1999).

1.4. Galaktoz Oksidaz

Galaktoz oksidaz geniş bir substrat spesifikliğine sahip bakır oksidazların çift radikalleri ailesine ait bir enzimdir. Hücrelerde, alkolün seçici olarak dioksijen ile aldehite oksitlendiği enzimatik tepkime galaktoz oksidaz enzim ile katalize edilir. Tirozin radikal grubu hidrojen atomu alıcısı olarak görev alır (Whittaker,1998).



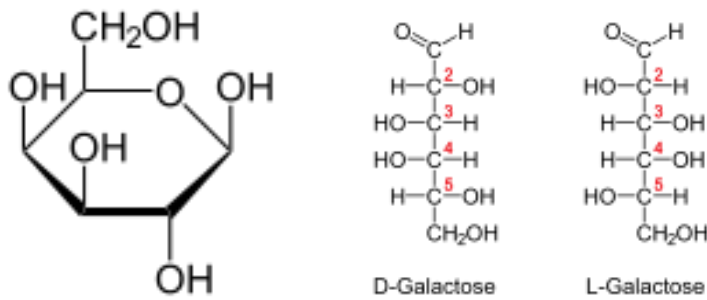
Şekil 1.4. Galaktoz –oksidazın kataliz reaksiyonu



Şekil 1.5. a) Galaktoz oksidaz 3 boyutlu yapısı b) Galox aktif merkezindeki Cu kare piramityapısı

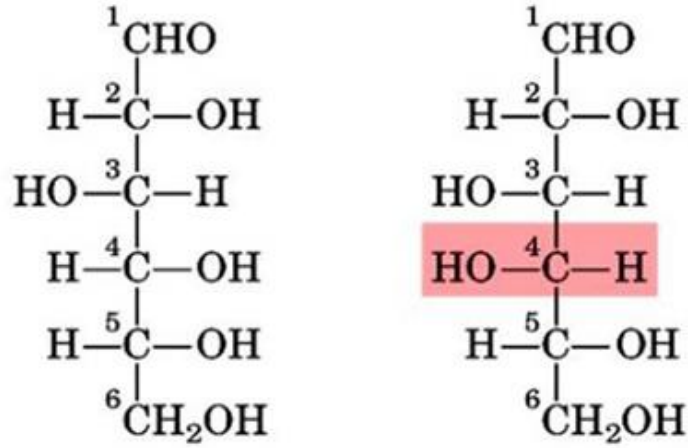
1.5. Galaktoz

Galaktozun en önemli kaynağı süt ve süt ürünlerinde bulunan laktozdur. Barsak mukoza hücrelerinde bulunan β -galaktozidaz (laktaz) tarafından eşit miktarda galaktoz ve glukozu parçalanır. Galaktoz, ince barsaktan en hızlı emilen heksoz olup laktoz, glikolipid, proteoglikan, glikoprotein sentezlerinde kullanılır. Hücre içine girişi früktoz gibi insülininden bağımsızdır.



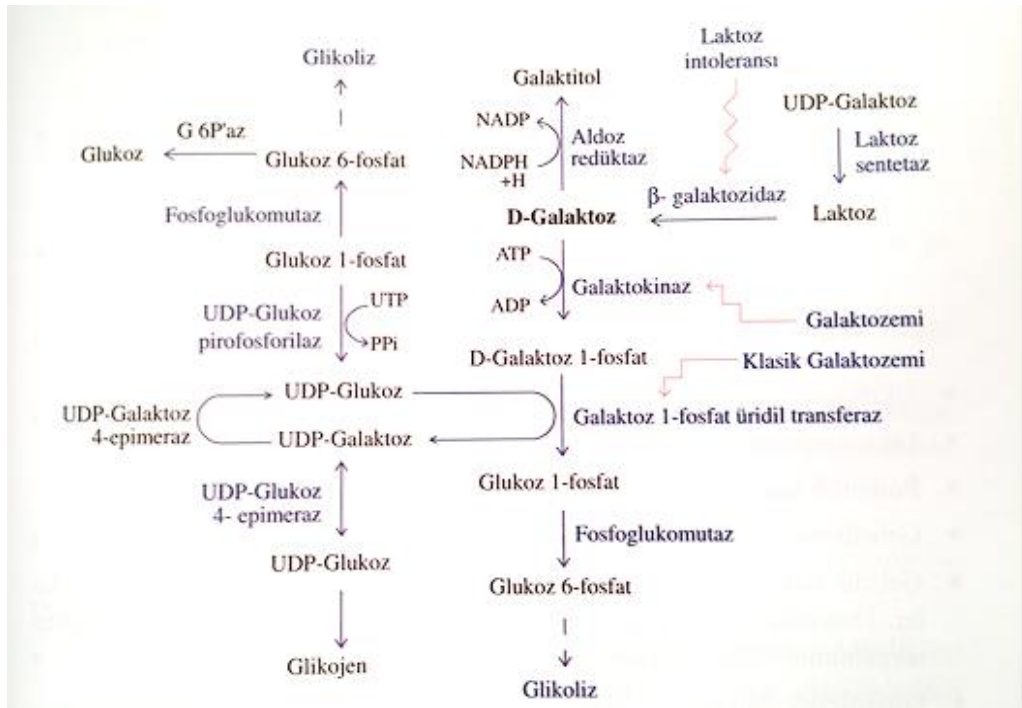
Şekil 1.6. Galaktozun yapısı

Eğer iki monosakkarid yalnızca özgün bir karbon atomu etrafında konfigürasyon farkı gösteriyorsa, bunlar birbirinin epimeridir.



Şekil 1.7. Galaktoz 4. Karbon atomunda glukozun epimeri

Galaktozun metabolize edilebilmesi için önce, galaktokinaz aracılığı ile galaktoz 1-fosfata fosforillenmesi gerekir. Galaktoz 1-fosfat, galaktoz 1-fosfat uridil transferaz enzimi aracılığı ile glukoz 1-fosfata dönüşerek glikolize girer. Bu ise, UDP-Galaktoz oluşumu ile sağlanır. Bu enzimin yokluğunda galaktoz 1-fosfat ve galaktoz hücrelerde birikir. Biriken galaktoz yan yollara saparak galaktozemi adı verilen klinik tabloya yol açar. Aktif galaktoz (UDP-galaktoz) laktoz, glikoprotein, glikolipid ve glikozaminoglikan sentezi gibi pek çok sentez reaksiyonunda galaktoz vericisi olarak rol alır.



Şekil 1.8. Galaktoz metabolizması

Galaktozun besin yoluyla sağlanamadığı (β -galaktozidaz eksikliğigibi) durumlarda dokuların UDP-galaktoz ihtiyacı, glukoz 1-fosfattan oluşan UDP-glukozun UDP-heksoz 4-epimeraz enzimi tarafından UDP-galaktoza çevrilmesi ile sağlanır (Adam ve Yiğitoğlu, 2012).

1.5.1. Galaktoz metabolizması hastalıkları

Galaktoz metabolizmasında, galaktokinaz, üridin difosfat galaktoz-4-epimeraz ve galaktoz 1-fosfat üridil transferaz enzimleri yetersizliği sonucu çeşitli bozukluklar oluşmaktadır.

1.5.1.1. Galaktozemi

Galaktozemi 1908 yılında ilk "keşfeden Von Ruess " idi. 1908 yayın başlıklı, "Bebekte Şeker Atılımı," büyüme geriliği, karaciğer ve dalak genişlemesi ve "galactosuria" ile anne sütüyle beslenen bebek bildirdi. 1917 yılına kadar, "galactosuria" genel olarak kabul görmüş bir kalıtsal bir hastalık idi.

Tip1 Galaktozemi (klasik galaktozemi);

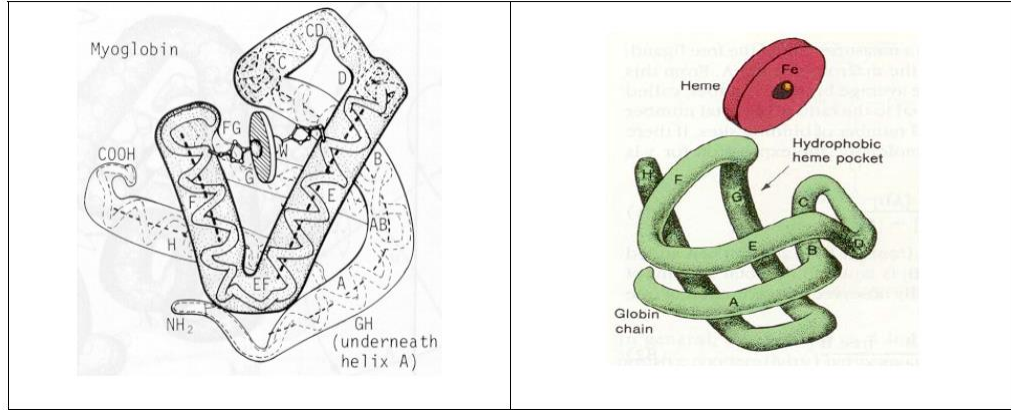
Galaktoz-1-fosfat üridil transferaz eksikliği sonucu ortaya çıkar. Galaktoz kompleks glikoproteinlere ve glikolipidlere dönüşemez. Galaktoz-1-fosfat birikimi; sonucu mental gerilik, gözde katarakt, karaciğerde siroz ve böbreklerde harabiyetele ortaya çıkar. 1/50.000 doğumda rastlanılan bu herediter hastalık otozomal resessif olarak geçiş yapar. Tedavi için diyetten galaktoz ve galaktoz içeren gıdaların kaldırılması şarttır.

Tip2 Galaktozemi ; Hastalığın sebebi galaktokinaz noksanlığıdır.

Tip3 Galaktozemi; Noksan olan enzim uridil difosfogalaktoz-4-epimeraz dır (Köksal vd; 2008).

1.6. Miyoglobin

Miyoglobin, prostetik grubu hem olan bir kromoproteindir; başlıca kırmızı kaslarda özellikle kalp kasında yüksek konsantrasyonda bulunur; miyokartta 1,4 mg/g doku kadar bulunur. Miyoglobin, 153 amino asitten oluşan bir polipeptit zinciri ve bir hem grubu içerir:



Şekil 1.9. Miyoglobin yapısı

Miyoglobin, proteinlerin tersiyer yapısına iyi bir örnektir. Miyoglobinin globin zincirinde sekiz α -heliks segmenti bulunur; hepsi sağa dönüşlüdür; en kısıtı 7 ve en uzun 23 amino asitten oluşur; A'dan H'ye kadar harflerle isimlendirilirler. Prostetik hem grubu, F ve E heliksler arasında bulunur. Hem grubu yapısındaki demir, Fe^{2+} şeklindedir; demir, dört bağımlı pirol halkalarıyla, 5.bağımlı F8 histidinle yapar. F8'in karşısındaki E7 histidin hem ile bağ yapmaz. Miyoglobin, hem grubu nedeniyle kırmızı kahverenkli; miyoglobinden zengin kaslar kahverengi renkli olur.

Miyoglobinin elektron transfer zincirinde bir fonksiyonu yoktur ancak in vitro koşullarda çeşitli oksidatif reaksiyonları ve prosesleri katalizlediği ispatlanmıştır. Mb ile biyolojik peroksitler arasındaki reaksiyon (hidrojen peroksit, lipid hidroperoksitler, ve peroksinitrit) peroksidaz I deki duruma benzer hem merkezli radikal okzoferril ve globin merkezli radikalleri oluşturur. Bu oksidatif proseslerin bazı hastalık durumlarının patolojik fizyolojisinde kritik rol oynadığına dair kanıtlar artmaktadır (Hong Liu et al, 2006; Türemiş 2010). Ayrıca Mb nin hem

cebinin yakın bölgesindeki uzantı aksiyal ligand olarak işlev görür ve hemin uzak bölgesindeki diğer kordinasyon bölgesi boş yada hemoenzimlerin yapısına benzer olarak oksijen veya hidrojen peroksit gibi ligandlarla kolaylıkla yer değişebilen suyla bağlıdır. Bu nedenle Mb peroksidaz, katalaz, nitrik oksit sentaz ve sitokrom P450 gibi bazı hemoenzimlerle birçok fiziksel spektroskopik ve kimyasal benzerlikleri paylaşır. Dahası, küçük ligantlar Mb de hemin altıncı kordinasyon bölgesindeki demire bağlanabilir ve bu durum tüm yapıyı kapsayan konformasyonel değişime, sonrasında geometrik yapıda değişime sebep olur ve Mb nin elektronik dağılımı etkilenir. Ayrıca bu allosterik etkileşim enzimin substratıyla etkileşime girdiğindeki konformasyonel değişimle benzerdir. Bundan dolayı miyogloblin yaygın olarak enzimlerin yapı ve fonksiyonları arasındaki ilişkinin çalışılmasında model olarak kullanılmaktadır (Hong Liu et al, 2006; Türemiş, 2010).

Elektrokimyasal metodlar Mb nin fizyolojik fonksiyonlarının çalışılması için avantajlıdır. Ancak, konvensiyonel elektrodta Mb nin elektron transferi genellikle zordur. Bunun gerekçesi üç boyutlu yapısının elektrotla etkileşimi yada adsorbsiyonunu engellemesi, ve daha sonra elektrot yüzeyinin pasivasyonuna/dinginleştirilmesine yorulmaktadır (Chao Zhao et al, 2003). Mb nin hem grubu ile elektrot yüzeyi arasındaki ilişki Mb deki hem grubunun globinlerin derinlerine gömülü olmasından dolayı engellenmektedir. Mb ile elektrod arasındaki elektron transfer hızını arttırmak için büyük efor sarfedilmekte ve bu amaçla yüzey aktif maddeler, DNA, sol-gel, polimer, ve nano-materyal filmlerle modifiye elektrodlar kullanılmaktadır. Bu filmler Mb nin tutuklanması ve elektron transfer hızının artırılması için uygun mikroçevre sağlarlar.

1.6.1. Proteinlerin direkt elektrokimyası

Proteinler büyük moleküller olduğundan elektrod yüzeyine direkt elektron transferlerini sağlamak zordur. Bunun sebeplerinden biri protein aktif bölgesi ile destek elektrod arasında etkin elektron transferinin elektron-transfer mediyatörlerinden yoksun gerçekleştirilmesi gerekmesidir. İkincisi, proteinlerin metal redoks merkezleri elektrod yüzeyinden uzakta içeri gömülmekte. Üçüncüsü proteinlerin düşük difüzyon katsayısı ve elektrod yüzeyine adsorbe edilen proteinlerin denatürasyonunun direkt elektron transferini etkileyeceği göz önünde

bulundurulmalı. Son olarak immobilizasyon materyalinin üzerine / içine yerleştirilmiş ya da kovalent bağlanmış redoks proteinlerinin pozisyonu rastgele yada optimize edilmemiş olmamalıdır. Bu nedenle metal redoks merkezlerinin elektrodlarla elektriksel iletişimi elektroanalitik uygulamalar için protein-elektrodlarının uygun hale getirilmesinde kilit noktadır. Sonuç olarak redoks proteinleri ile elektrodlar arasında etkin elektriksel iletimi gerçekleştirmek için polimerler, çözünmez yüzey aktif maddeler ve inorganik mezogözenekli maddeler gibi farklı materyal ve metodlar kullanılmaktadır. Protein-yüzey aktif madde etkileşimleri endüstriyel biyolojik, farmasötik ve kozmetik sistemleri içeren geniş bir alanda önemli rol oynadığı için son on yıldaki kapsamlı çalışmaların konusudur (Wang and Hu, 2008).

1.7. Glutaraldehit

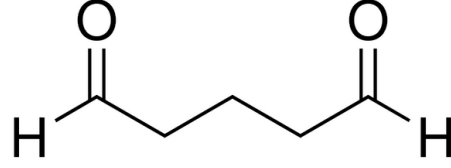
Glutaraldehit, özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan biyofonksiyonel bir reaktiftir. Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan biyoaktif materyallerin (enzim, hücre, doku, vb.), jelatin, kollajen, kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehit ile çapraz bağlar oluşturması esasına dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Guilbault and Kauffmann, 1987; Scouten et al., 1995). Yöntem kolay uygulanabilir olması yanında immobilize sistemin termal ve operasyonel aynı zamanda da depo kararlılığını artırması bakımından tercih edilmektedir.

Glutaraldehit ilk olarak Quioco ve Richards tarafından karboksipeptidaz enzimini stabilize etmek için kullanıldı (Quioco,1964). Glutaraldehit proteinleri birbirlerine bağlayarak stabilitesini artırır.

Glutaraldehit ile bir enzim molekülü aşağıda gösterildiği şekilde bağlanır.



Şekil 1.10. Glutaraldehit ile bir enzim molekülünün bağlanması



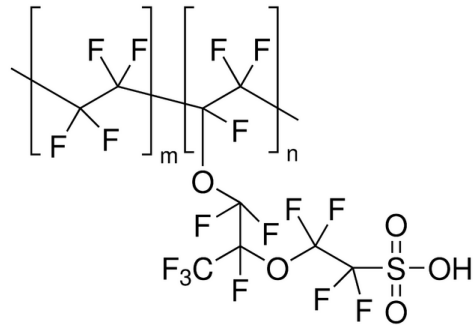
Şekil 1.11. Glutaraldehitin formülü

Glutaraldehit ile enzimlerin bağlanması genellikle nötral pH veya ona yakın bir değerde gerçekleştirilir. Reaksiyon, oda sıcaklığında kullanılan glutaraldehit miktarına göre 1-60 dakika süresinde gerçekleştirilir. Optimal şartlar kullanılacak enzime göre değişebilir. Ayrıca enzimin aktif bölgesini korumak amacıyla glutaraldehit ile muamele edilirken ortama enzimin substratı da ilave edilebilir.

Mikroorganizmalar için toksik etki göstermesine rağmen biyoaktif sisteme kazandırdığı avantajlardan dolayı % 1,0[']in altındaki konsantrasyonlardaki glutaraldehitin kullanılmasıyla hücre immobilizasyonları da gerçekleştirilmektedir (Hemachander et al., 2001).

1.8. Nafyon

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



Şekil 1.12. Nafyonun formülü

2. MATERYAL METOD

2.1 Materyal

2.1.1. Cihaz ve diğer ekipmanlar

Denemelerde Palm Sens Ins. (Hollanda) marka potansiyostat; CHI 104 model Altın (Au) alışma elektrodu, CHI 111 model Ag/AgCl doğun referans elektrodu, CHI 115 model Pt yardımcı elektrodu; Gibson P1000 otomatik pipetleri, Nuve (TR) marka termostat, Yellow line manyetik karıştırıcı kullanıldı.

2.1.2 Kimyasallar

Deneysel alışmalar için temin edilen kimyasallar:

- Glutaraldehit (Sigma)
- Nafyon (%5'lik) (Sigma)
- Galaktoz oksidaz (Sigma)
- Miyogloblin
- Galaktoz (Sigma)
- Glukoz
- Fruktoz
- Laktoz
- Askorbik asit
- Sitrik asit
- Ürik asit (Riedel-de-Haen)
- Potasyum fosfat monobazik
- Glisin
- Sülfürik asit
- Gamma alumina (0,1-0,05 micron)
- Tiyonin

Deneysel çalışmalarda aşağıdaki çözeltiler kullanıldı:

- 50 mM fosfat tamponları (pH: 6,0 - 6,5 –7,0 – 7,5- 8,0)
- 50 mM Sitrat Tamponu (pH: 5,0 - 5,5)
- 50 mM Glisin Tamponu (pH: 8,5 - 9,0)
- Galaktoz oksidaz (0,5885 U/ml - 1,177 U/ml- 2,35 U/ml)
- Miyogloblin (10mg/mL- 20mg/mL)
- % 1,25'lik, %2,5'luk ve %5 'lik glutaraldehit
- 1,5 mM D-galaktoz, D-laktoz, D-fruktoz, , D- glukoz, L- askorbik asit, sitrik asit ,
ürik asit, (Fosfat tamponu içinde)
- % 0,05-% 1,0-% 2,0 'lik Nafyon
- 0,25mmol/L-0,5mmol/L -1mmol/LTiyonin

2.2. Yöntem

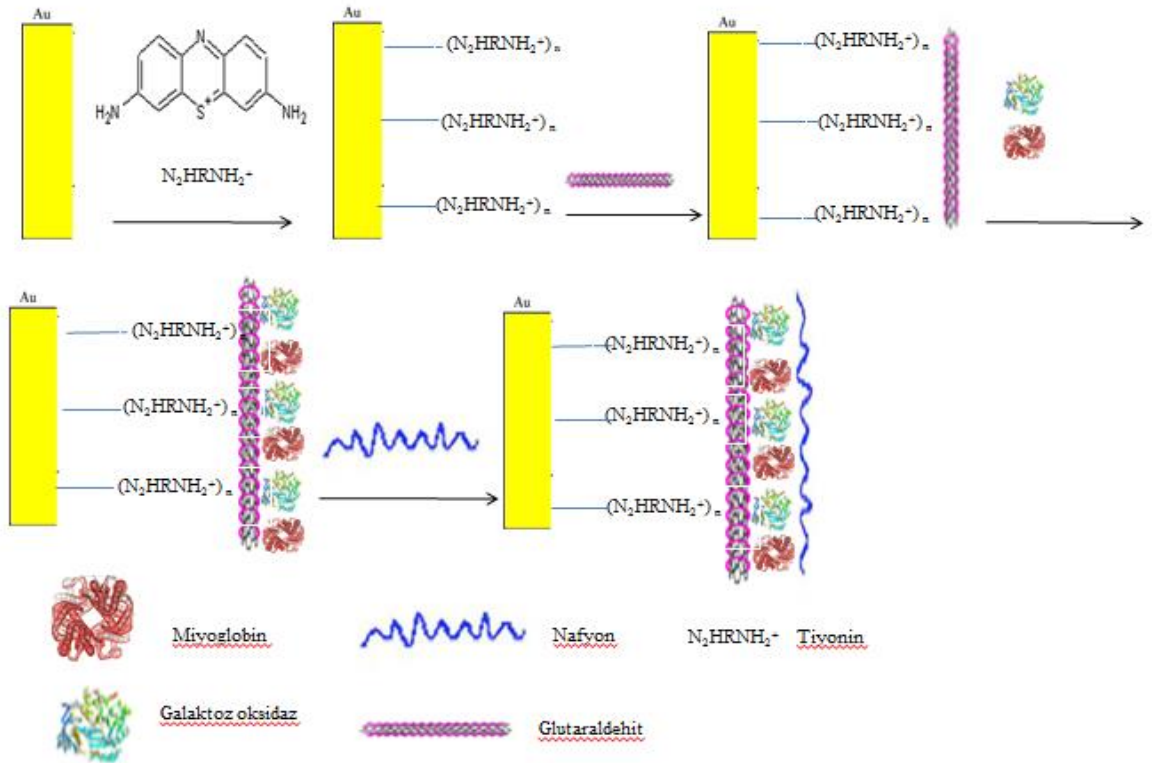
2.2.1 Biyosensörün hazırlanması

Öncelikle Au elektrot fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal olarak temizlenir. Temizlik aşamaları aşağıdaki gibidir:

- Altın elektrod (-0,2) – (1,2) V potansiyelleri arasında tarama hızı 50mv/s olacak şekilde KOH çözeltisi içerisinde on beş tane lineer sweep voltammogramı alınır.
- Bir miktar bulamaç halindeki Gamma alumina kadife bir yüzey üzerine belli bir miktar damlatılır. Altın elektrot önce 0,05 mikronluk gamma alüminada sekiz çizerek yavaşça gezdirilir. Bu şekilde elektrot yüzeyindeki kirlilikler mekanik olarak temizlenmiş olur.
- Au elektrot bidistile suyla durulandıktan sonra adsorblanmış partikülleri uzaklaştırmak için on dakika etanol (%96) içerisinde sonikatörde bekletilir. Tekrardan bidistile suyla durulandıktan sonra on dakika da bidistile su içerisinde sonikatörde bekletilir.

- Au elektrodun yüzeyinin elektrokimyasal olarak temizlenmesi için 0,1 N H₂SO₄ çözeltisi içerisinde (-0,3) – (1,5) V potansiyelleri arasında 100mv/s tarama hızında otuz tane döngüsel voltammogram alınır.

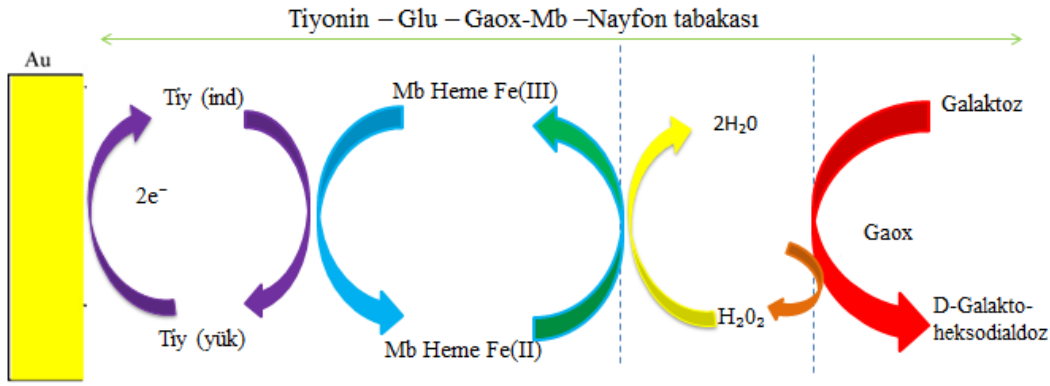
Elektropolimerizasyon gerçekleştirmek üzere 0,1M H₂SO₄'de 0,5 mM thionine son hacim 10 ml olacak şekilde hazırlanır. Hazırlanan bu çözelti ölçüm hücresine konur. Üç'lü elektrot sistemi (Altın çalışma elektrodu, Ag/AgCl referans elektrodu, Pt yardımcı elektrot) çözeltiye daldırılarak (-0,3) - (1,2) V arasında 20 döngü alınarak Au elektrot üzerinde politiyonin film oluşması sağlanır. Fazla tiyonin uzaklaştırmak için Au/Tiy bidistile suyla yıkanır. % 2,5 glutaldehitin 10µL'si elektrod yüzeyine damlatılıp kuruması beklenir. 1,177 U/ml galaktoz oksidaz ve 10mg/mL miyogloblin bir ependorf tüpünde tartılır ve pH: 7,0 fosfat tamponunda çözünüp 10µL'si elektrod yüzeyine damlatılır. Kurumasının ardından 0,1 ml %0,1'lik (etanolde) nafyon çözeltisi hazırlanarak elektrod üzerine damlatılıp kurumaya bırakılır (Deng, et. al., 2006). Au/Thi/Glu/Galox-Myb/Nafyon elektrodu kullanılmadığı zamanlarda +4 ° C' de bekletilir. Şekil 2.1. 'de tasarlanan modifiye elektrodun şematik gösterimi mevcuttur.



Şekil 2.1. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye elektroda ait immobilizasyon şeması.

2.2.2. Biyosensörün çalışma ilkesi

Şekil 2.2.'de tasarlanan biyosensörün çalışma ilkesi şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörünün çalışma ilkesi

2.3. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon Modifiye Biyosensörün Optimizasyon ve Karakterizasyonuna Yönelik Çalışmalar

Bu kısımda, galaktoz tayini amacı ile Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye elektrotlar kullanılarak hazırlanan galaktoz biyosensörlerinin optimizasyon ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Öncelikle biyosensörlerin biyoaktif ilişkin parametrelere yönelik çalışmalarda tiyonin ile elektropolimerizasyon, tiyonin konsantrasyonunun, glutaraldehit konsantrasyonunun, enzim aktivitesi – protein konsantrasyonu ve nafyon konsantrasyonlarının biyosensör cevabına etkisi belirlendi. Daha sonra çalışma koşullarının optimizasyonu amacıyla optimum pH ve sıcaklığın belirlendiği denemeler gerçekleştirildi. Son olarak Biyoaktif tabaka bileşenleri ve çalışma koşulları optimize edilen biyosensörün analitik karakterizasyonuna yönelik çalışmalar gerçekleştirildi.

2.3.1. Tiyonin konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Denemeler $32^\circ C$ 'de potasyum fosfat tamponunda (pH 7,0 ; 50 mM) gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi (1,177 U/ml), Mb miktarı (10mg/mL), %2,5 glutaraldehit (10 μ L), %1,0 nafyon(10 μ L)sabit tutularak hazırlanan biyosensörlerde

tiyonin konsantrasyonu 0,25 mM, 0,5 mM ve 1,0 mM olarak değiştirildi. Yapılan denemeler diferansiyel puls (DP) metoduyla (-0,3) ve (0,5) V potansiyel aralığında D-galaktoz katım yoluyla gerçekleştirilmiştir. Her bir grafik en az er kez ölçüm alınarak elde edilmiştir.

2.3.2. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Denemeler 32° C’de potasyum fosfat tamponunda (pH 7,0 ; 50 mM) gerçekleştirildi. Tiyonin konsantrasyonu (0,5 mM), enzim aktivitesi 1,177 U/ml, Mb miktarı 10mg/mL, nafyon miktarı (10 L, %1,0’lik) sabit tutularak hazırlanan biyosensörlerde glutaraldehit konsantrasyonu %1,25; %2,5; %5,0 olarak değiştirildi. Yapılan denemeler differansiyel puls (DP) metoduyla (-0,3) ve (0,5) V potansiyel aralığında D-galaktoz katım yoluyla gerçekleştirilmiştir. Her bir grafik en az er kez ölçüm alınarak elde edilmiştir.

2.3.3. Enzim aktivitesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi

Denemeler 32° C’de potasyum fosfat tamponunda (pH 7,0 ; 50 mM) gerçekleştirildi. Tiyonin konsantrasyonu (0,5 mM), Mb miktarı 10mg/mL, glutaraldehit miktarı 10L %2,5, nafyon miktarı (10 L, %1,0’lik) sabit tutuldu. Enzim aktivitesi 0,5885 U/ml, 1,177 U/ml, 2,35 U/ml olarak değiştirildi. Yapılan denemeler differansiyel puls (DP) metoduyla (-0,3) ve (0,5) V potansiyel aralığında D-galaktoz katım yoluyla gerçekleştirilmiştir. Her bir grafik en az er kez ölçüm alınarak elde edilmiştir.

2.3.4. Miyogloblin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Denemeler 32° C’de potasyum fosfat tamponunda (pH 7,0 ; 50 mM) gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi (1,177 U/ml), tiyonin konsantrasyonu (0,5 mM), glutaraldehit miktarı 10L %2,5 nafyon miktarı (10 L, %1,0’lik) sabit tutuldu. Miyogloblin miktarı 10mg/mL, 20mg/mL olarak değiştirildi. Yapılan denemeler differansiyel puls (DP) metoduyla (-0,3) ve (0,5) V potansiyel aralığında D-galaktoz katım yoluyla gerçekleştirilmiştir. Her bir grafik en az er kez ölçüm alınarak elde edilmiştir.

2.3.5. Nafyon miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Denemeler 32° C'de potasyum fosfat tamponunda (pH 7,0 ; 50 mM) gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi (1,177 U/ml) Mb miktarı (10mg/mL), tiyonin konsantrasyonu (0,5 mM), glutaraldehit miktarı 10µL %2,5 sabit tutuldu. Nafyon konsantrasyonu %0,05, %1,0 , %2,0 olarak değiştirildi. Yapılan denemeler differansiyel puls (DP) metoduyla (-0,3) ve (0,5) V potansiyel aralığında D-galaktoz katım yoluyla gerçekleştirilmiştir. Her bir grafik en az üçer kez ölçüm alınarak elde edilmiştir.

2.4. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

2.4.1. Optimum pH'nın belirlenmesi

Denemelerde 50 mM derişiminde pH 5,0-5,5 sitrat; pH 6,0-6,5-7,0-7,5-8,0 fosfat; pH 8,5-9,0 glisin tamponları kullanılarak tasarlanan biyosensör için en uygun pH belirlenmeye çalışıldı. Ölçümler 32°C'de ve 0,5mM D-galaktoz konsantrasyonu kullanılarak (-0,3) ve (0,5) V potansiyel aralığında differansiyel pıls (DP) metotla gerçekleştirilmiştir.

2.4.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Denemeler 20 ° C; 23 ° C; 26 ° C; 29 ° C; 32 ° C; 35 ° C; 38 ° C; 41 ° C sıcaklıklarda soğuktan sığağa doğru geçiş yapılarak fosfat tamponunda (pH 7,0; 50 mM) ve 0,5mM D-galaktoz konsantrasyonu kullanılarak (-0,3) ve (0,5) V potansiyel aralığında differansiyel pıls (DP) metotla gerçekleştirilmiştir.

2.5. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün karakterizasyonuna ilişkin çalışmalar

2.5.1. D-Galaktoz için doğrusal tayin aralığı

D-Galaktoz için doğrusal tayin aralığı belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerde 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 mM D-galaktoz derişimleri için (-0,3) ve (0,5) V potansiyel aralığında differansiyel puls (DP) metodu ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Çizilen kalibrasyon grafikleri

yardımıyla D-galaktoz için biyosensörün doğrusal tayin aralığı ve tayin limiti belirlendi. Her bir grafik en az üçer kez ölçüm alınarak elde edilmiştir.

2.5.2. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün tekrarlanabilirliği

Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye elektrod ile (-0,3) ve (0,5) V potansiyel aralığında differansiyel puls (DP) ölçüm yoluyla 0,5 mM D-galaktoz için 7 kez ölçüm alındı. Elde edilen verilerden faydalanarak ortalama değer (\bar{x}) standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayısı (%V.K) hesaplandı.

2.5.3. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün substrat spesifikliğı

D-Galaktoz tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensörün substrat spesifikliğinin belirlenmesi denemesinde D-galaktoz yerine 0,5mM D-Laktoz, D-glukoz, D-fruktoz, sitrik asit, L-askorbik asit, ürik asit reaktifleri kullanıldı. D-Galaktoz cevabı % 100 kabul edilerek diğer reaktifler için bulunan biyosensör cevapları ile kıyaslandı ve % biyosensör cevabı substrat çeşiti olarak grafiğı çizildi.

2.5.4. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensöre girişimcilerin etkisi

Bu amaç doğrultusunda 0,5mM D-Laktoz, D-glukoz, D-fruktoz, sitrik asit, L-askorbik asit, ürik asit reaktifleri 0,5 mM D-galaktoz ile birlikte kullanılmıştır. Tek başına D-galaktoz cevabı % 100 kabul edilerek diğer reaktiflerin D-galaktoz ile birarada iken verdikleri cevaplar D-galaktoz cevapları ile kıyaslandı ve % biyosensör cevabı- girişimci grafiğı çizildi.

2.5.5. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün depo kararlılığı

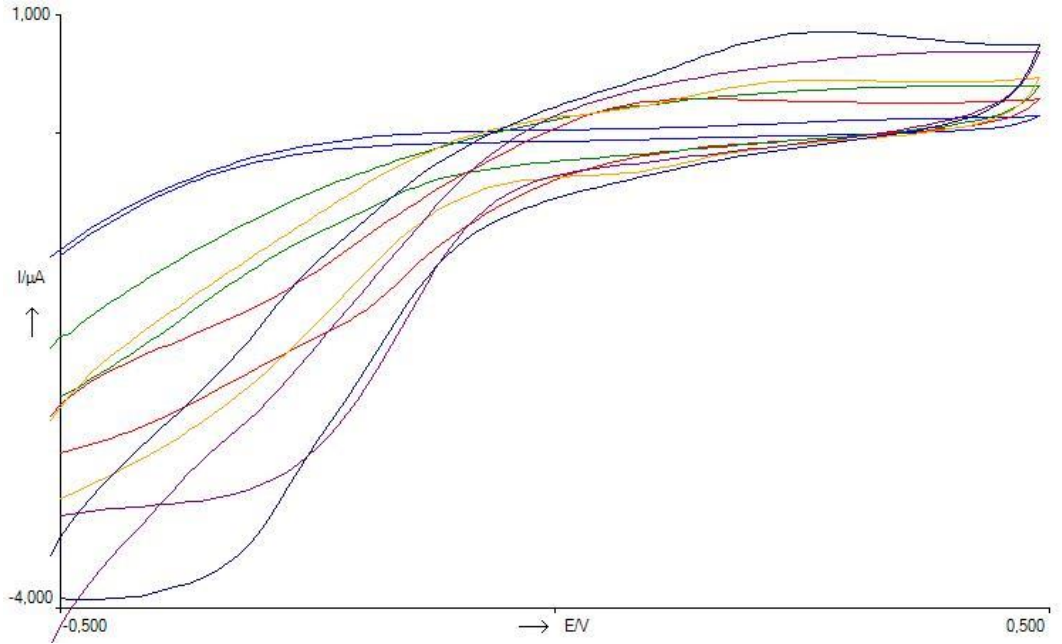
Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon biyosensörünün hazırlandığı günden itibaren ilk hafta iki günde bir ilerleyen haftalarda haftada bir 0,5mM D-galaktoz derişimleri için ölçümler alınarak biyosensör cevabı izlendi. Bu süre zarfı

içerisinde ölçüm alınmadığında biyosensör +4 °C'de tutuldu. Denemeler 32 °C'de ve potasyum fosfat tamponunda (pH 7,0 ; 50 mM) gerçekleştirildi.

3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

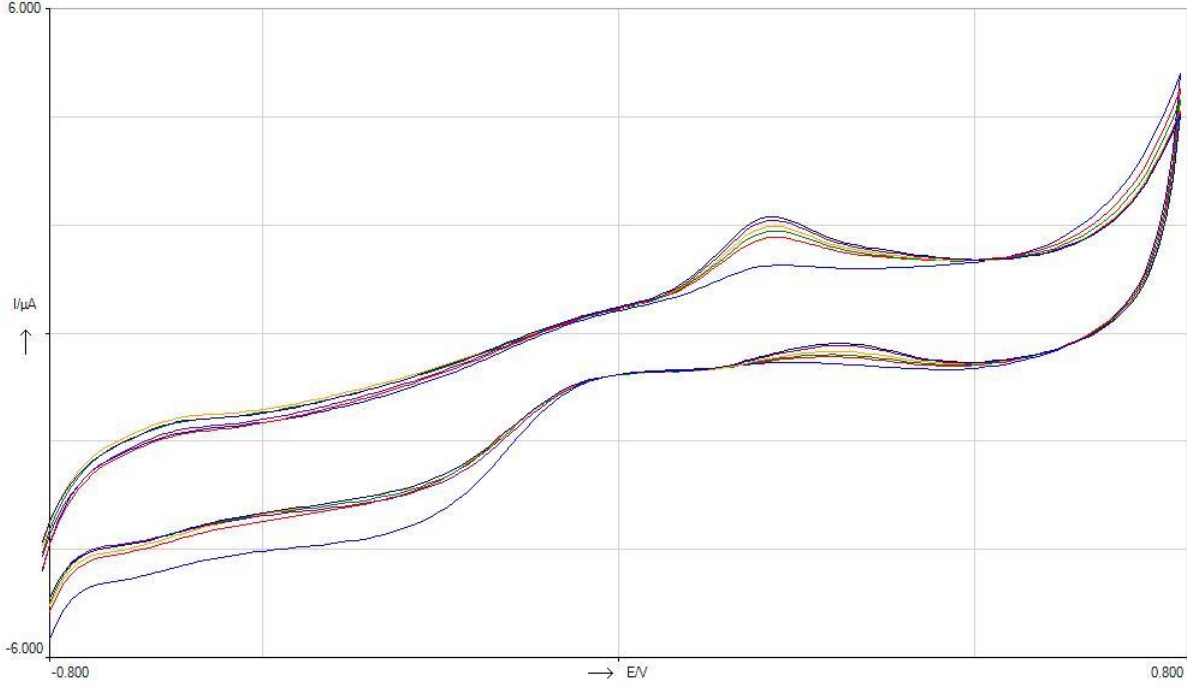
3.1. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon Modifiye Biyosensörün Optimizasyon ve Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

Öncelikle hazırlanan biyosensörle 50 mM fosfat tamponunda (-0,5) - (0,5) V arası immobilizasyon adımlarına dair CVler alınarak farklanmalar yorumlanmıştır. Şekil 3.1.'de immobilizasyon öncesi altın elektrotla alınan CVnin akım değerleri, altın elektrotun immobilizasyon basamakları sonucunda CVlerde farklanma gözlenmiştir. Bu hazırladığımız biyosensör immobilizasyon basamaklarında tabakalaşma olduğunu göstermektedir. Şekil 3.1.'de immobilizasyon basamaklarının ardından oluşturulan biyosensör ile D-galaktoz ve D-galaktoz olmayan durumlarda CVler alınmış ve D-galaktoz ilavesi sonucunda belirgin bir anodik pik elde edilmiştir.



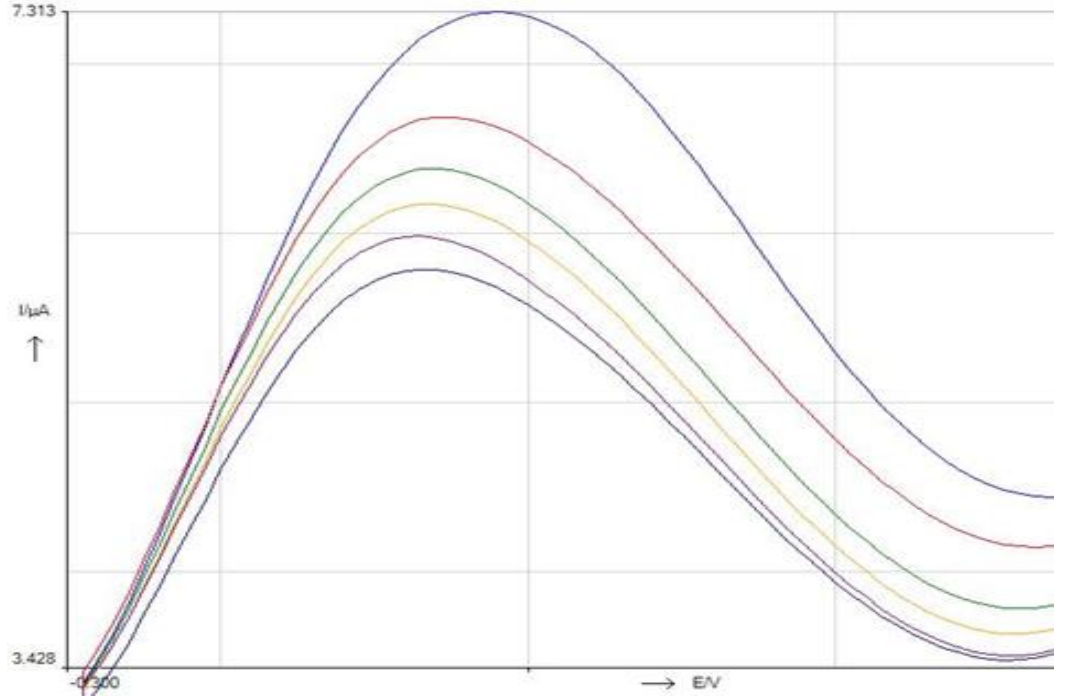
Şekil 3.1. Mavi: Au elektrod baseline; Kırmızı: Au/Tiy; Yeşil: Au/Tiy/Glu; Sarı: Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb; Mor: Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon; Lacivert: Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon 0,5mM galaktoz ilaveli. Ölçümler 50mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32 ° C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.)

(-0,8) – (0,8) V arası artan konsantrasyonlarda CVler alınarak yorumlanmıştır.



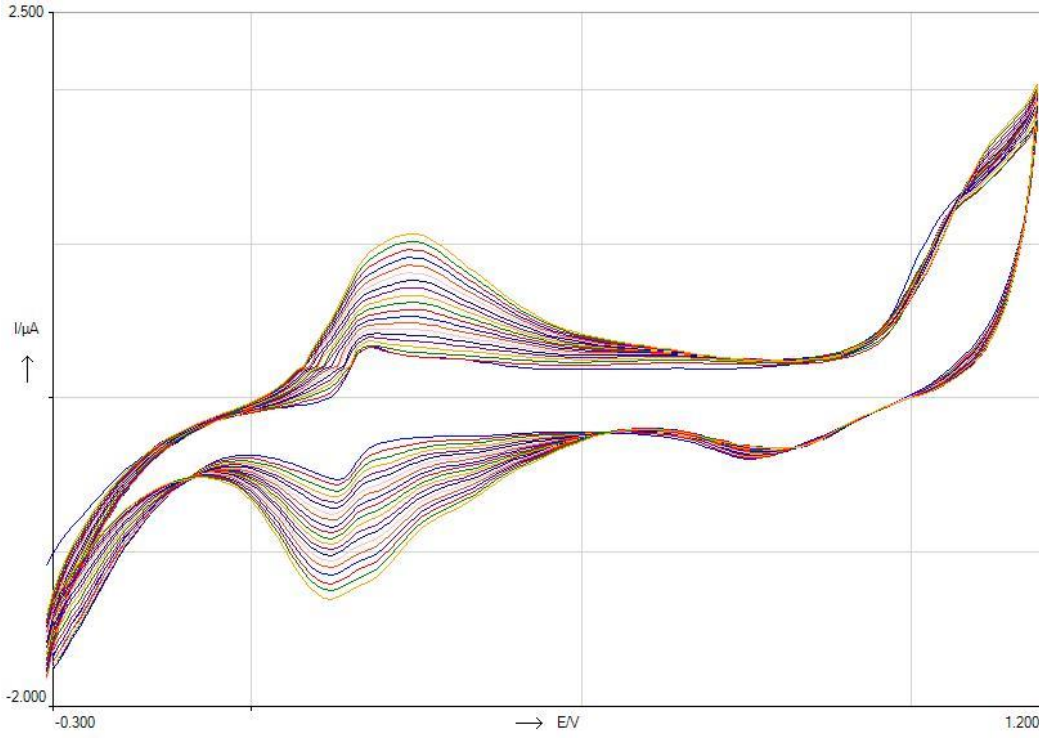
Şekil 3.2. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon 1.5 mM stok çözeltiden 100-1000 μ M galaktoz ilavesi CV (Mavi: baseline ; Kırmızı: 0,1mM galaktoz; Yeşil: 0,25mM galaktoz; Sarı: 0,5 mM galaktoz; Mor: 0,75 mM galaktoz ;Lacivert: 1 mM galaktoz .Ölçümler 50mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32 ° C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.)

Şekil 3.1.'de Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün D-galaktoza verdiği cevabın döngüsel voltametri metodu ile incelenmesi verilmiştir.(-0,8) ve (0,8) V arası alınan ölçümlerden artan konsantrasyonlara bağlı olarak anodik pikte bir artış gözlemlendi. Bu değişim göz önünde bulundurularak çeşitli potansiyel aralıklarında DP metodu ile ölçümlerin alınması öngörüldü.



Şekil 3.3. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon 1,5 mM stok çözeltiliden 100-1000 μM galaktoz ilavesi DP (Mavi: baseline ;Kırmızı: 0,1mM galaktoz; Yeşil: 0,25mM galaktoz;Sarı: 0,5 mM galaktoz;;Mor: 0,75 mM galaktoz; Lacivert: 1 mM galaktoz .Ölçümler 50mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32 ° C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.)

Çeşitli aralıklarda DP ölçümlerin alınmasının ardından, en iyi cevabın Şekil 3.3. 'de alınmış (-0,3) ve (0,5) V potansiyelleri arasında anodik pikte D-galaktoz ilavesinin akımı düşürdüğü gözlenmiş ve biyosensörün optimizasyonu ve karakterizasyonunda bu yöntem kullanılmıştır.

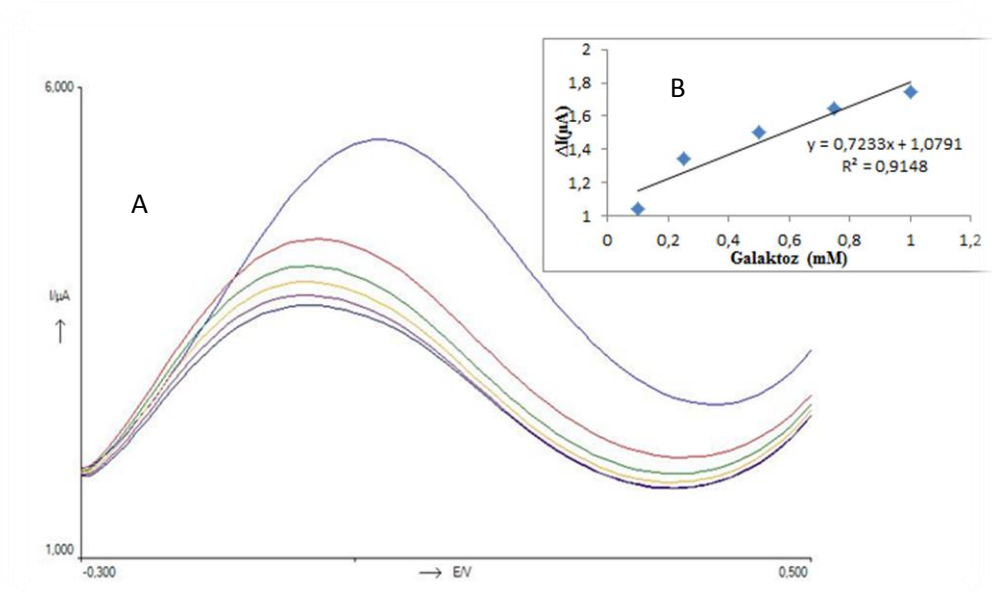


Şekil 3.4. 0,5 mmo/L Tiyonin için polimerizasyon döngüsel voltammogramları Tarama Hızı: 30mV/ s n: 20 döngü 25° C

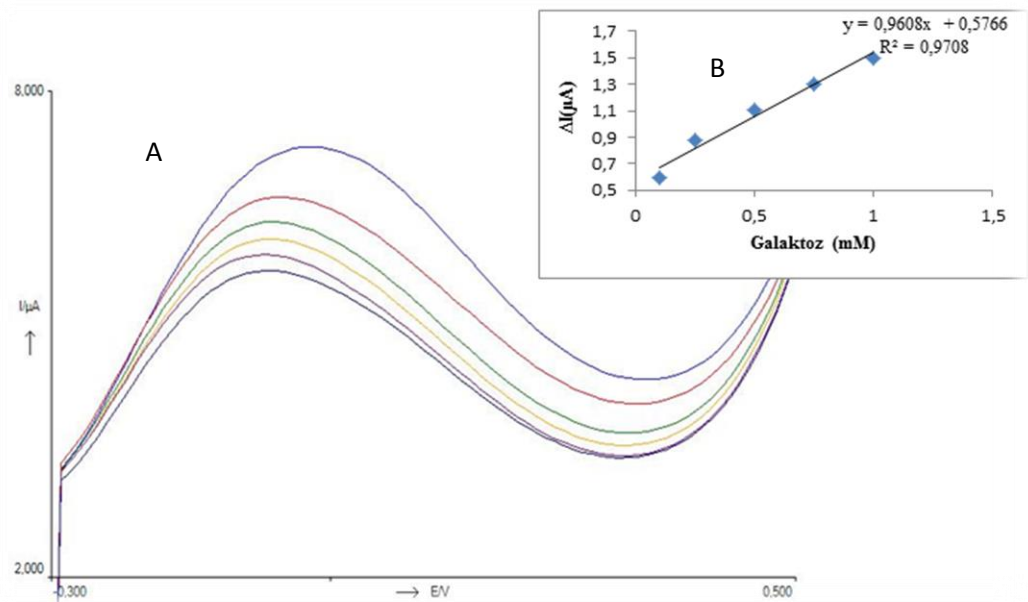
Son zamanlarda polimerler elektron transferini kolaylaştırmalarından dolayı biyosensör tasarımlarında mediyatör olarak kullanılmaktadır. Tiyonin (tiy) aromatik halkanın her bir yanına yayılmış iki amino gruplu bir fenotiyazın bir boyadır. Bir volt uygulandığında, tiyonindeki aromatik NH köprü bağları vasıtasıyla birbirine bağlanarak politiyonin formunu oluşturur. Şekil 3.4.'de görülen grafik tiyonin polimerizasyon CV leri göstermektedir. Tiyoninin elektropolimerizasyon süreci sırasında, tersinir redoks pik akımları elektrod yüzeyinde politiyonin redoks reaksiyonuna bağlı olarak artan döngü sayısı ile aşamalı olarak artar (Uygun,2009; Shirsat et al, 2008; Qingxia et al, 2011).

3.1.1. Tiyonin konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisine yönelik bulgular

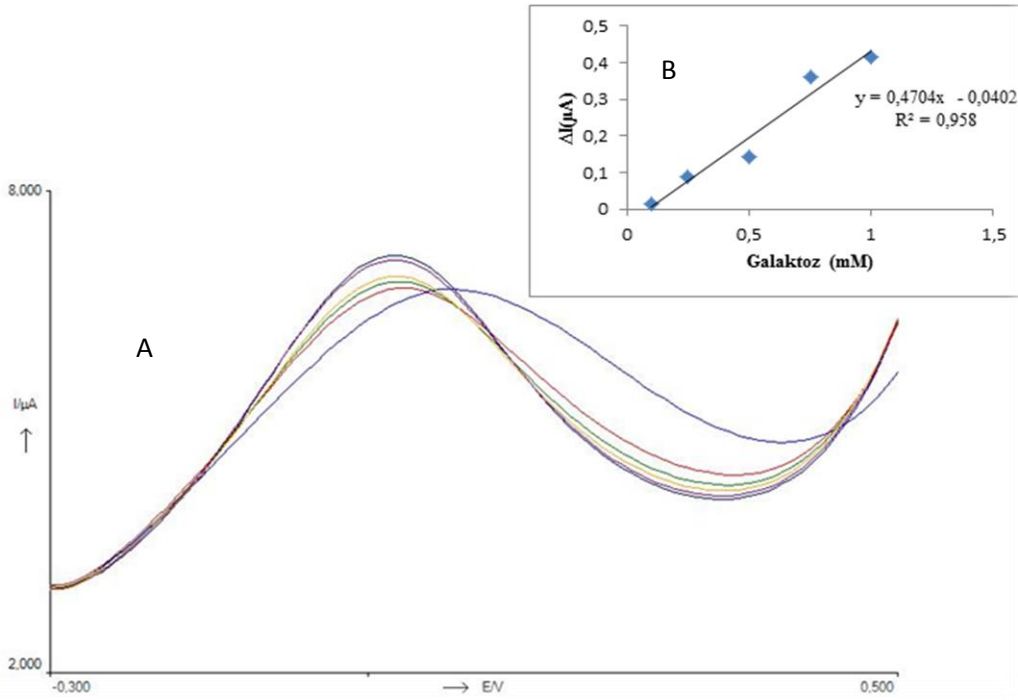
Tiyonin konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi belirlendi. Denemeler sonucunda galaktoza verilen cevaplara ilişkin Diferansiyel puls (DP) ölçümler Şekil 3.5.'de verilmiştir.



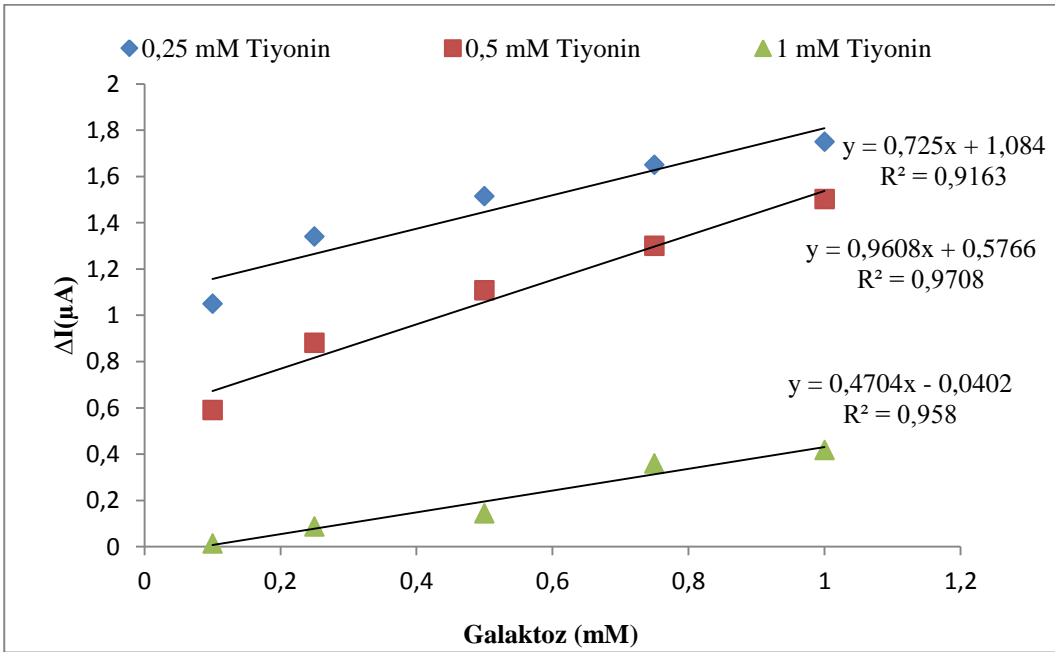
Şekil 3.5. 0,25mM Tiyonin konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B). D-Galaktoz konsantrasyonları sırasıyla Mavi: baseline; Kırmızı: 0,1mM; Yeşil: 0, 25 mM; Sarı: 0,50mM; Mor: 0,75mM; Lacivert:1,0 mM. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6. 0,5mM Tiyonin konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere kalibrasyon grafiği (B). D-Galaktoz konsantrasyonları sırasıyla Mavi: baseline; Kırmızı: 0,1mM; Yeşil: 0, 25mM; Sarı: 0,50mM; Mor: 0,75mM; Lacivert: 1,0 mM . Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir



Şekil 3.7. 1mM Tiyonin konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B). D-Galaktoz konsantrasyonları sırasıyla Mavi: baseline ; Kırmızı 0,1mM; Yeşil: 0,25mM; Sarı: 0,50mM; Mor: 0,75mM; Lacivert: 1,0 mM. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.

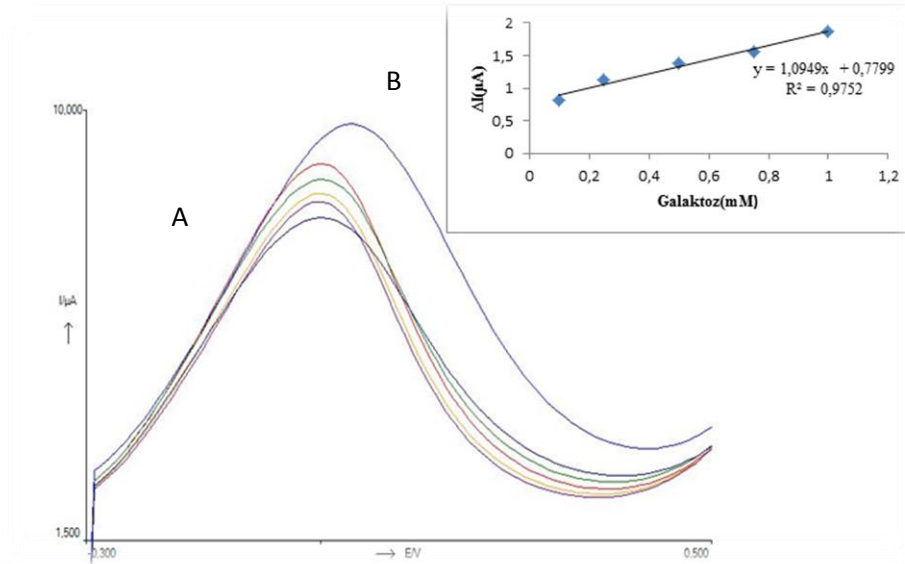


Şekil 3.8. Tiyonin konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisine ait kalibrasyon grafiği.

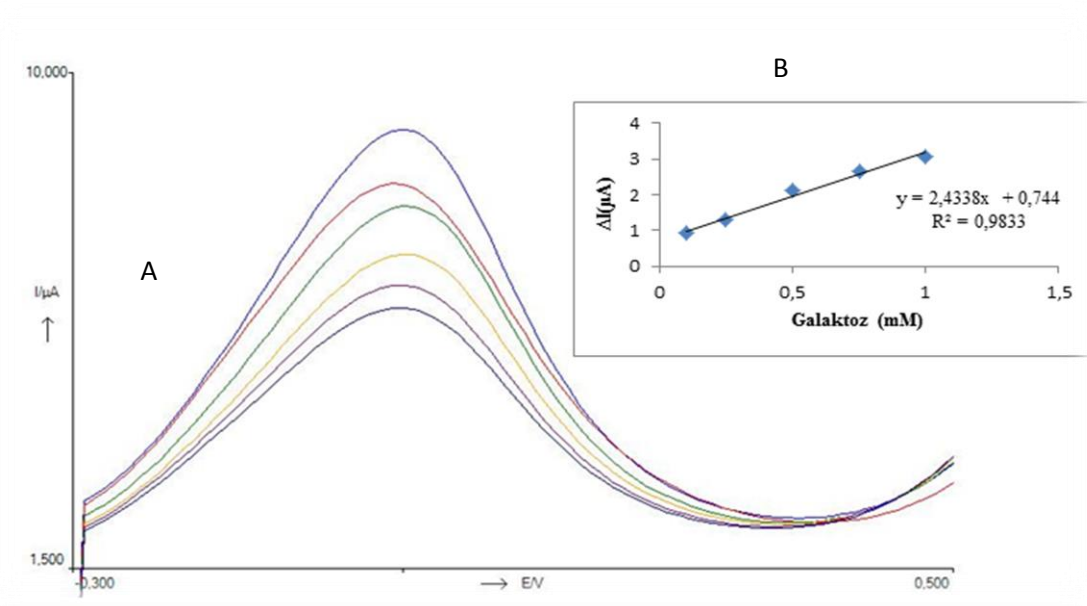
Şekillerden anlaşılacağı üzere en yüksek biyosensör cevapları 0,5mM tiyonin kullanılarak hazırlanan biyosensörle elde edildi. En yüksek tiyonin konsantrasyonu 1mM olacak şekilde seçilmiştir. Ancak elde edilen akım farklanmaları doğrultusunda yoğun tiyonin miktarının elektrod yüzeyinde enzim-substrat etkileşimi için difüzyon bariyeri oluşturduğudur. 0,25 mM tiyonin konsantrasyonunda akım farklanması elde edilen diğer farklanmalara oranla daha düşük olması tiyoninin elektropolimerizasyonu yeterli kılmayıp mediyatör özelliğini yeterince gösteremediği düşünülmektedir. Sonuç olarak akım farklanmasının en yüksek değeri olarak ideal konsantrasyon miktarı 0,5 mM olarak alınmıştır. Bundan sonraki çalışmalar bu parametre dikkate alınarak yapılmıştır.

3.1.2. Glutaraldehit konsantrasyon miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

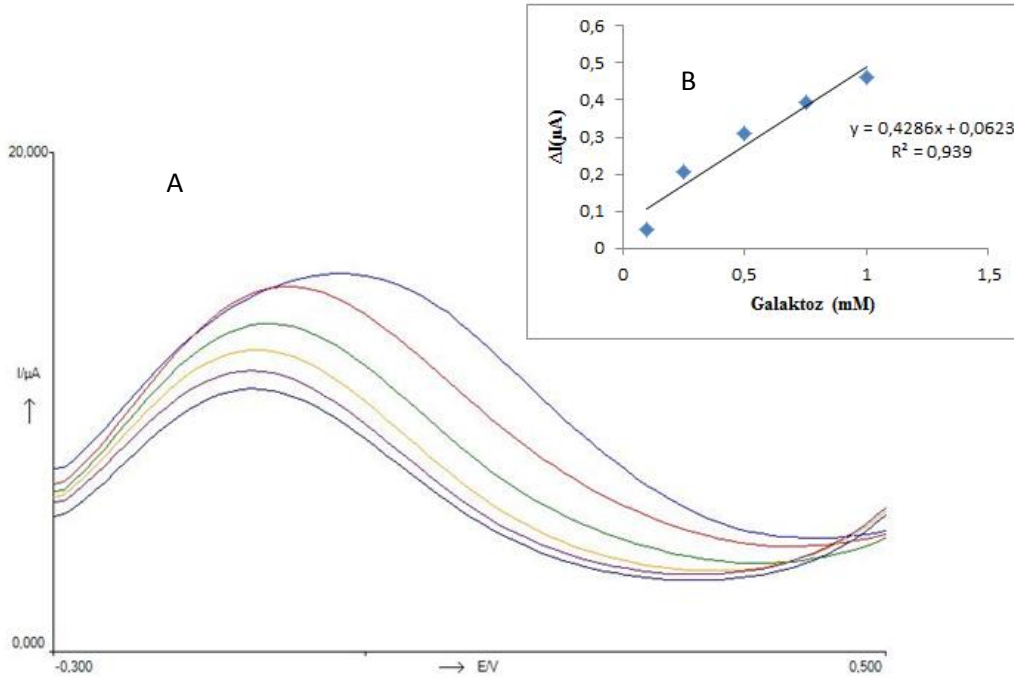
Kullanılan glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine olan etkisi belirlendi. Şekil 3.9.'de, Şekil 3.10.'da ve Şekil 3.11.'da D-galaktoza verilen cevaplara ilişkin diferansiyel puls grafikleri verilmiştir.



Şekil 3.9. %1,25'lik Glutaraldehit konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B). D-Galaktoz konsantrasyonları sırasıyla Mavi: baseline; Kırmızı:0,1mM; Yeşil: 0, 25mM; Sarı:0,50mM; Mor: 0,75mM; Lacivert:1,0 mM. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.10. % 2,5'lik Glutaraldehyt konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B). D-Galaktóz konsantrasyonları sırasıyla Mavi:baseline; Kırmızı: 0,1mM ;Yeşil: 0, 25mM; Sarı:0,50mM; Mor:0,75mM; Lacivert: 1,0 mM. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir



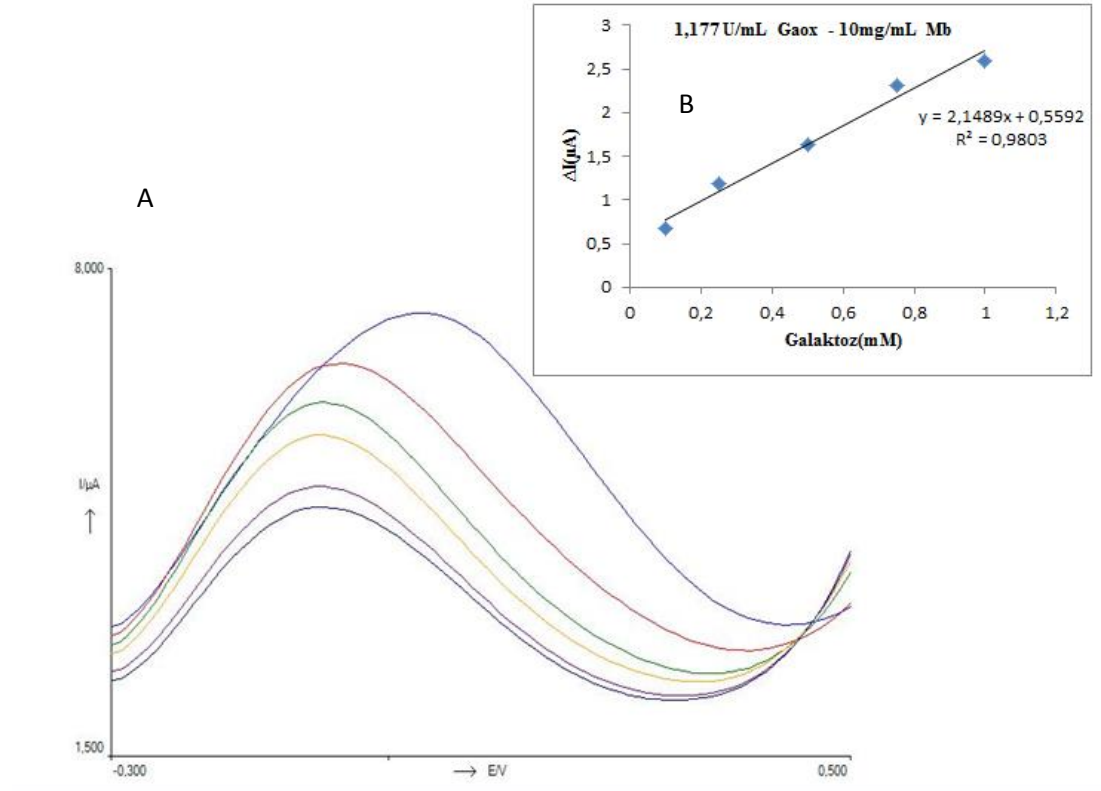
Şekil 3.11. % 5'lik Glutaraldehyt konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B). D-Galaktóz konsantrasyonları sırasıyla Mavi:baseline; Kırmızı:0,1mM ; Yeşil:0, 25mM; Sarı:0,50mM; Mor: 0,75mM; Lacivert: 1,0 mM. Ölçümler 50

mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir

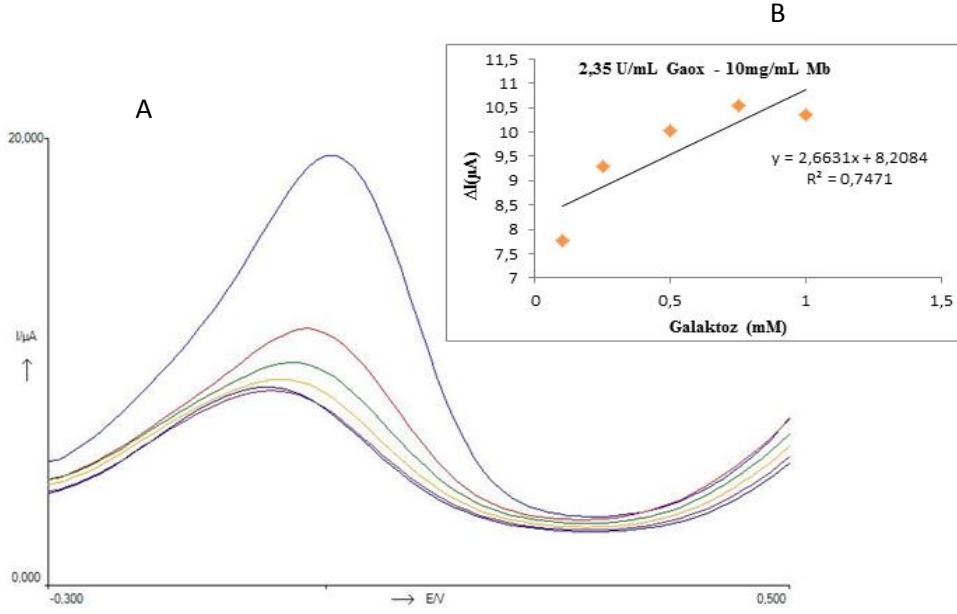
Yukarıdaki şekillerden görüldüğü gibi %2,5 'luk Glutaraldehit konsantrasyonu hem akım farklanması hemde doğrusallığın daha yüksek olmasından dolayı seçilmiştir.

3.1.3. Enzim aktivitesinin ve miyogloblin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

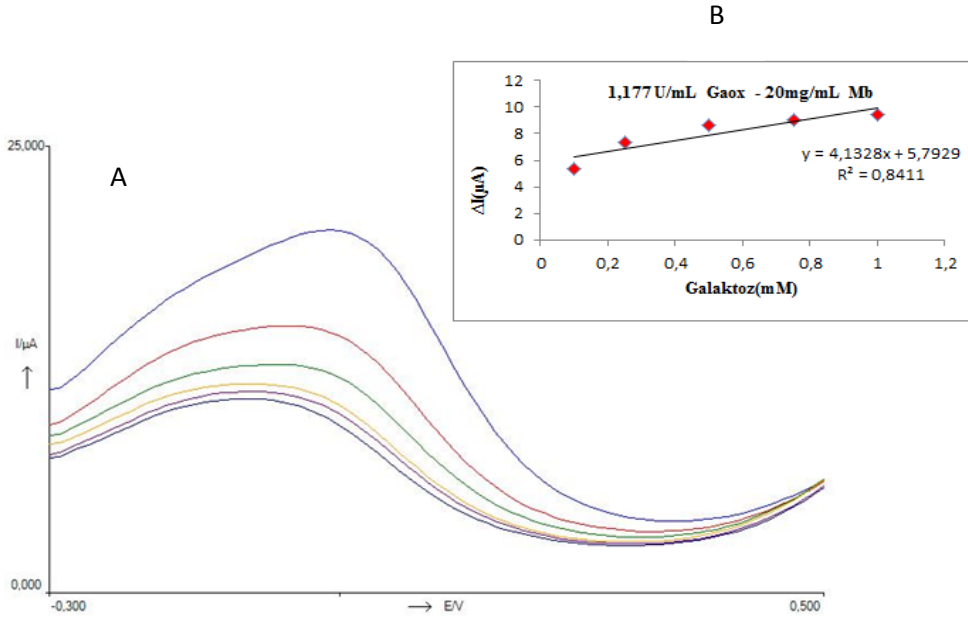
Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan galaktoz oksidaz enzimi aktivitesinin ve miyogloblin miktarının biyosensör cevabı üzerine olan etkisi belirlendi. Şekil 3.12.'da, Şekil 3.13.'de, Şekil 3.14.'de ve Şekil 3.15.'de D-galaktoza verilen cevaplara ilişkin diferansiyel puls grafikleri verilmiştir.



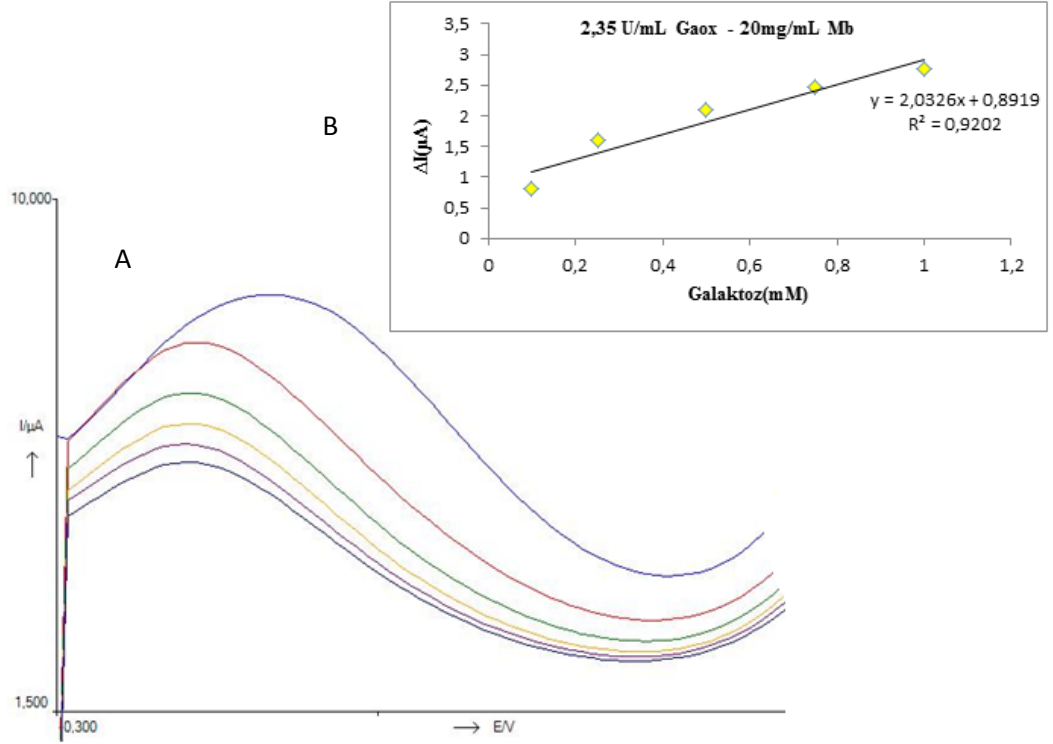
Şekil 3.12. Enzim aktivitesi - miyogloblin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi. 1,177 U/mL galaktoz oksidaz- 10mg/mL Mb miktarının DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlerine ait kalibrasyon grafiği (B). Mavi:baseline; Kırmızı:0,1mM ; Yeşil:0, 25mM; Sarı:0,50mM; Mor: 0,75mM; Lacivert: 1,0 mM. Ölçümler 50mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32 ° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.13. Enzim aktivitesi - miyogloblin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi. 2,35 U/mL galaktoz oksidaz- 10mg/mL Mb miktarının DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A). ve DP ölçümlerine ait kalibrasyon grafiği (B). Mavi:baseline; Kırmızı:0,1mM ; Yeşil:0, 25mM; Sarı:0,50mM; Mor: 0,75mM; Lacivert: 1,0 mM. Ölçümler 50mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32 ° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.14. Enzim aktivitesi - miyogloblin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi. 1,177 U/mL galaktoz oksidaz- 20mg/mL Mb miktarının DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A). ve DP ölçümlerine ait kalibrasyon grafiği (B). Mavi:baseline; Kırmızı:0,1mM ; Yeşil:0, 25mM; Sarı:0,50mM; Mor: 0,75mM; Lacivert: 1,0 mM. Ölçümler 50mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32 ° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.

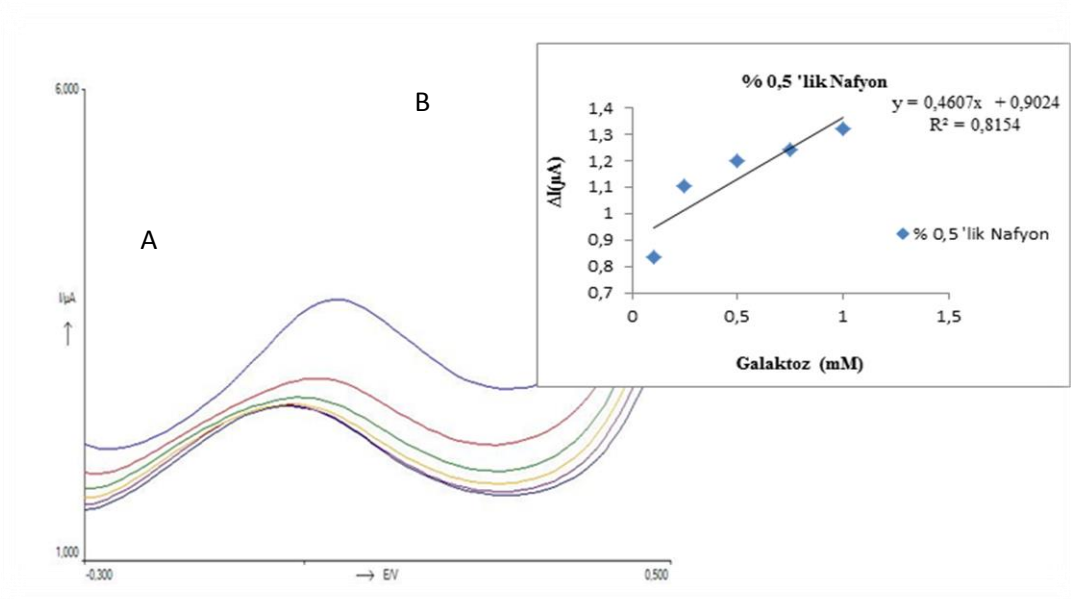


Şekil 3.15. Enzim aktivitesi - miyoglobin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi. 2,35 U/mL galaktoz oksidaz- 20mg/mL Mb miktarının DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A). ve DP ölçümlerine ait kalibrasyon grafiği (B). Mavi:baseline; Kırmızı:0,1mM ; Yeşil:0, 25mM; Sarı:0,50mM; Mor: 0,75mM; Lacivert: 1,0 mM. Ölçümler 50mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32 ° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.

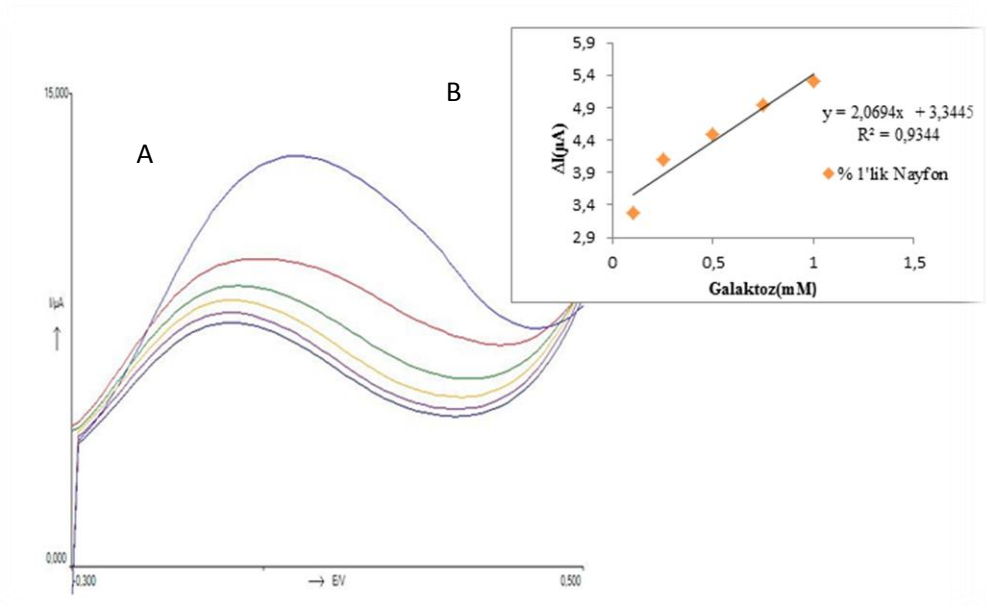
Yukarıda yer alan grafiklere ilaveten galaktoz oksidaz 0,585 U/mL - miyoglobin 10mg/mL olacak şekilde elektrod hazırlanıp (-0,3) ve (0,5) V potansiyelleri arasında ölçüm alınmış olup konsantrasyonla doğru orantılı herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu durumun ölçüm süresi içerisinde substrat-enzim etkileşimi için yeterli olmadığı sonucu çıkarılmıştır. Şekillerden görüldüğü gibi Mb miktarının artması substratın galaktoz oksidazın katalitik aktivite gösteren merkezine yaklaşmasını sterik olarak engelleyeceği düşünülmüştür. Düşük Mb konsantrasyonunda ise yeterli miyoglobin tabakaya bağlanamayacağından yine biyosensörde cevap gözlenemeyecektir Bu nedenlerden dolayı akım farklanması ve doğrusallığın galaktoz oksidaz 1,177 U/mL, miyoglobin 10mg/mL miktarı ile hazırlanan biyosensör için en ideal olduğu düşünülmüştür. Bundan sonraki çalışmalar bu parametre dikkate alınarak yapılmıştır.

3.1.4. Nafyon konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi

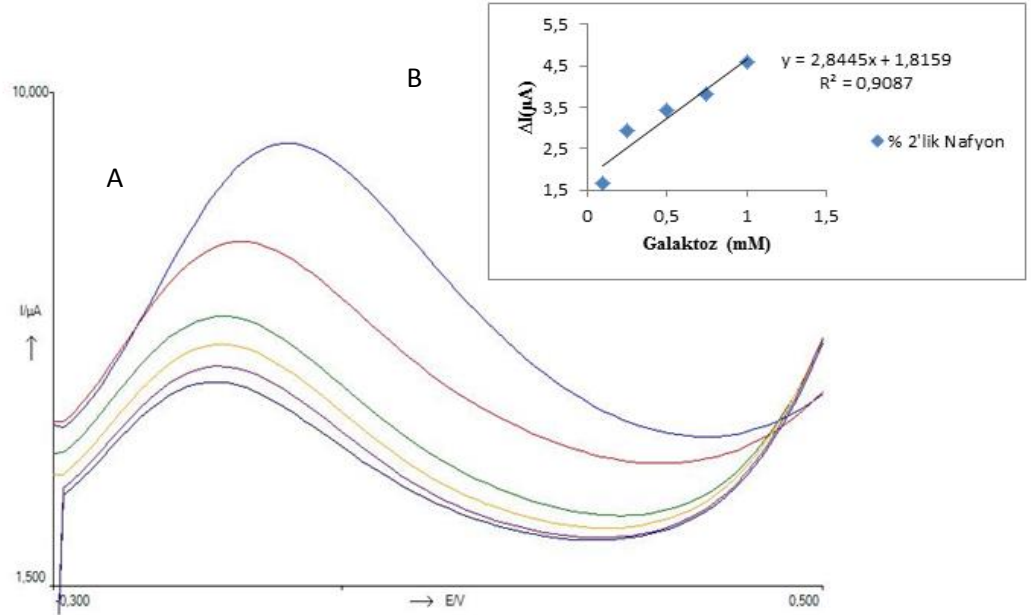
Bu çalışmada biyosensör hazırlanmasında kullanılan nafyon miktarının biyosensör cevabı üzerine olan etkisi belirlendi. Şekil 3.16.'da, Şekil 3.17.'da, Şekil 3.18.'de D-galaktoza verilen cevaplara ilişkin diferansiyel puls grafikleri verilmiştir.



Şekil 3.16. % 0,05'lik Nafyon konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B). D-Galaktoz konsantrasyonları sırasıyla Mavi: baseline; Kırmızı:0,1mM; Yeşil:0,25mM; Sarı:0,50mM; Mor: 0,75mM; Lacivert: 1,0 mM. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.17. % 1'lik Nafyon konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B). D-Galaktoz konsantrasyonları sırasıyla Mavi: baseline; Kırmızı: 0,1mM; Yeşil: 0,25mM; Sarı:0,50mM; Mor: 0,75mM; Lacivert: 1,0 mM. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.18. % 2'lik Nafyon konsantrasyonu için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar (A) ve DP ölçümlere ait kalibrasyon grafiği (B). D-Galaktoz konsantrasyonları sırasıyla Mavi: baseline; Kırmızı:0,1mM ;Yeşil:0, 25mM; Sarı:0,50mM; Mor: 0,75mM; Lacivert: 1,0 mM. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.

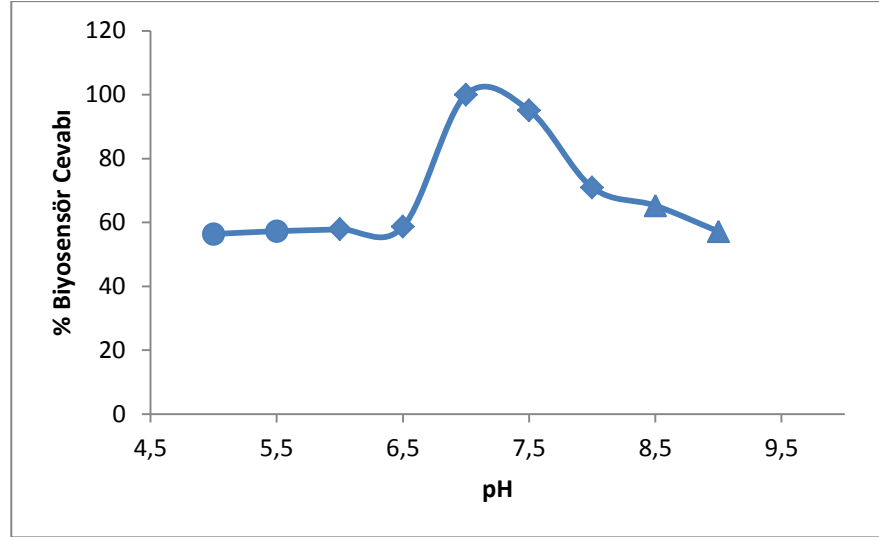
Nafyon elektrod yüzeyindeki tabakayı ölçüm ortamında bulunabilecek bazı girişimci moleküllerin etkisinden koruma amacıyla kullanılmıştır. %2,0 nafyon akım farklanması daha fazla olmasına rağmen doğrusallığı daha düşüktür. Ayrıca % 2,0' lik nafyonun difüzyon problemine sebep olabileceği düşünülmüştür. % 0,05 lik nafyonun ise hem akım değerinin hemde doğrusallığının düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca % 0,05 nafyon miktarının tabakayı korumada yetersiz olabileceği düşünülmüştür. Gerek en iyi akım farklanması ve gerekse en iyi doğrusallığın elde edildiği % 1,0'lik nafyon konsantrasyonu optimal olarak belirlenmiştir.

3.2 Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna Yönelik Bulgular

3.2.1 pH optimizasyonu

Enzimlerin katalitik aktiveleri çevre koşullarından oldukça fazla etkilenir. Bu çevre koşullarından biriside ortamın pH değeridir. Bu etkilenme nedeniyle immobilizasyon sonrasındaki pH-aktivite davranışlarındaki değişimler hakkında elde edilen bilgilerle, biyosensörün optimum çalışma koşullarını belirlemek en önemli optimizasyon aşamalarından biridir.

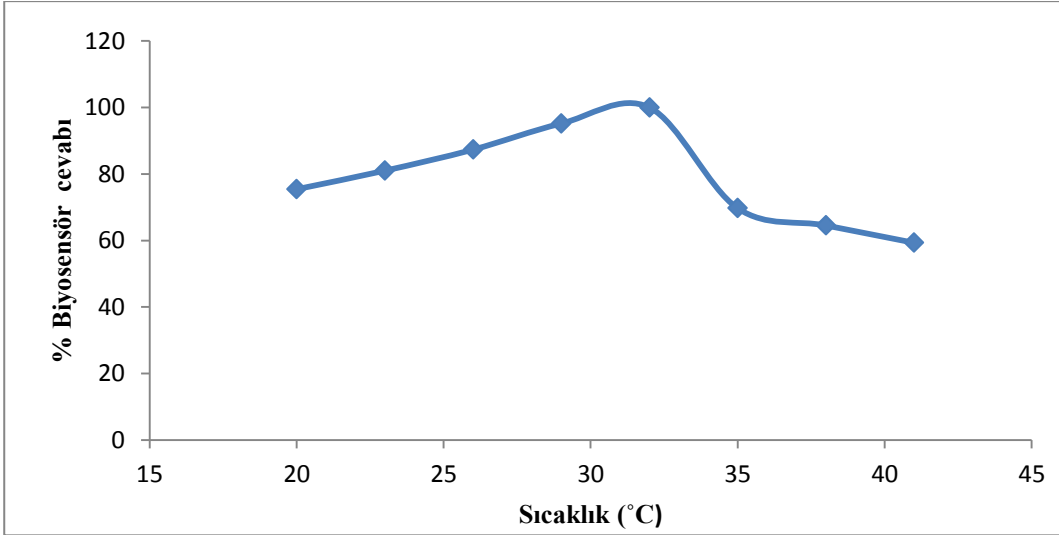
D-Galaktoz biyosensörünün optimum pH'ını belirlemek amacıyla yapılan denemelerde elde edilen pH ve % biyosensör cevabı arasında çizilen grafik Şekil 3.19.' da verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi biyosensör için optimum pH; 7,0 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.19. Biosensör cevabına pH'nın etkisi. Ölçümler (-0,3) ve (0,5) V potansiyelleri arasında DP yöntemi kullanılarak 32 °C'de gerçekleştirildi. ● pH: 5,0-5,5 Sitrata Tamponu, ■ pH:6,0-6,5-7,0-7,5-8,0 Fosfat Tamponu, ▲ pH:8,5-9,0 Glisin Tamponu.

3.2.2 Sıcaklık optimizasyonu

D-Galaktoz tayinine yönelik olarak geliştirilen modifiye biosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik çalışmalarda 20°C'de düşük sıcaklıktan her 3°C'de bir artış olacak şekilde yüksek sıcaklığa doğru ölçümler yapılarak akım farklanmaları gözlemlenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda sıcaklık ve % biosensör cevabı arasında oluşturulan grafikten optimum sıcaklık 32° C olarak bulunmuştur (Şekil 3.20.). Elde edilen bulgular galaktoz oksidaz enzimin aktivite sıcaklık profiline uygun bir veri niteliğindedir (Shaolin, 1994 ; Tkac et al, 1999; Szabo et al, 1996).



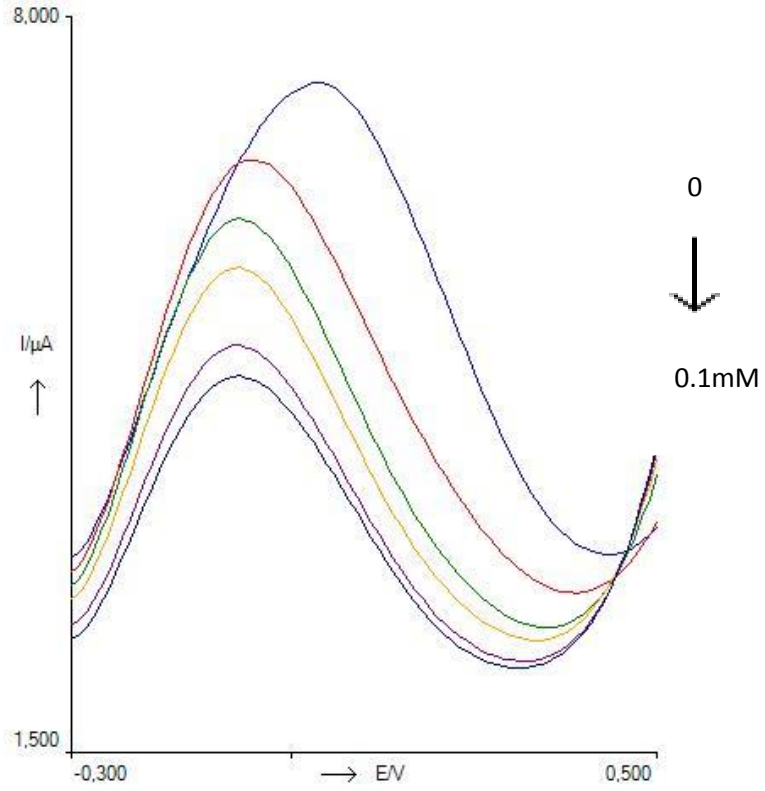
Şekil 3.20. Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisi. Ölçümler (-0,3) ve (0,5) V potansiyelleri arasında DP yöntemi kullanılarak 50 mM fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir.

3.3 Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon Modifiye Elektrodun

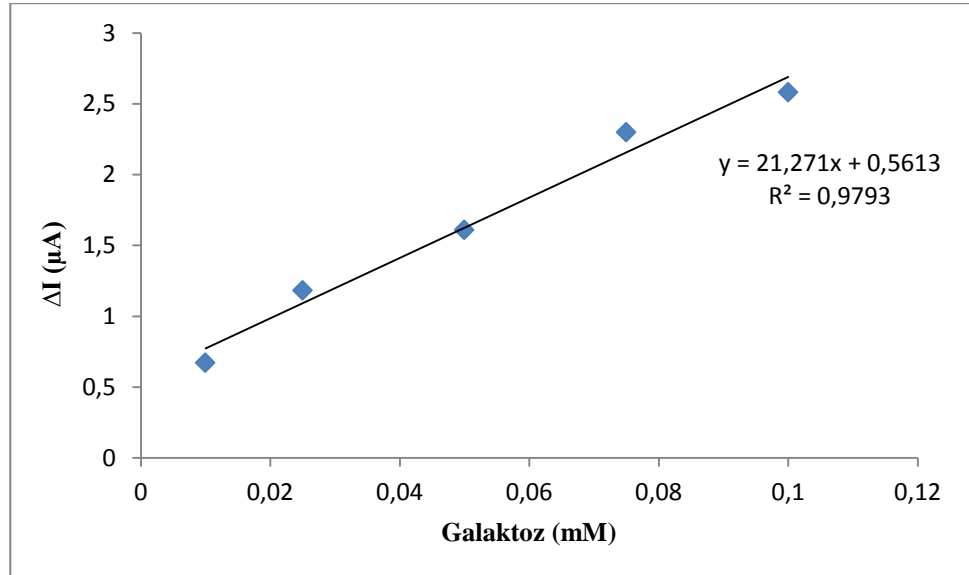
Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

3.3.1 D-Galaktoz için doğrusal tayin aralığı

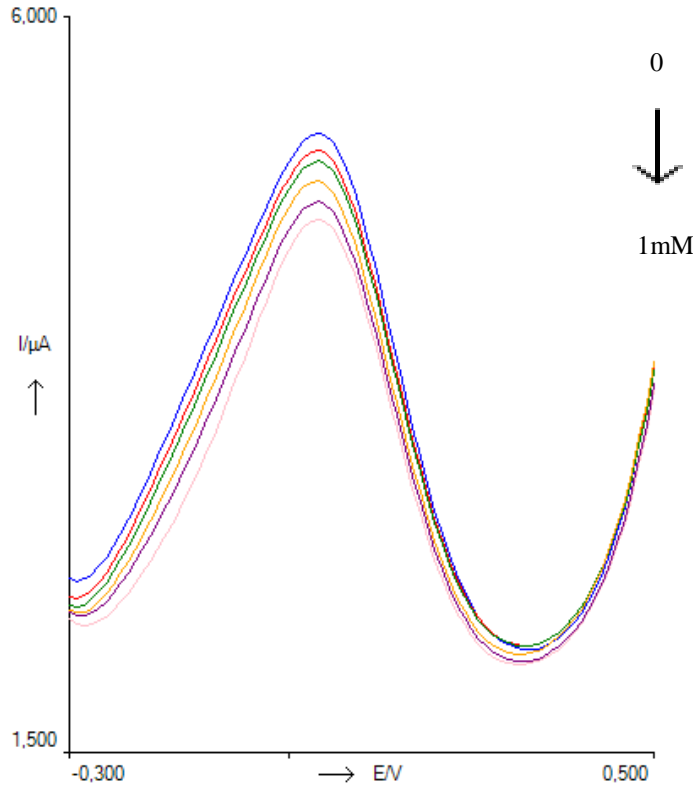
Geliştirilen Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon biyosensörlerinin biyoaktif tabaka ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrasında, karakterizasyonu amacıyla öncelikle D-galaktoz için ölçüm aralığı belirlenmiştir. Şekil 3.21. a'da 0,01-0,1mM için, Şekil 3.22. a 'da 0,1-1 mM, Şekil 3.23. a 'da ise 1-10 mM arası D-galaktoz konsantrasyonuna karşılık gelen diferansiyel yoluyla elde edilen ölçüm grafikleri verilmiştir. Şekil 3.21. b'de 0,01-0,1 mM için, Şekil 3.22. b'de 0,1-1mM, Şekil 3.23.b'de ise 1-10 mM ise DP metodu ile elde edilen akım farklanması ΔI ile D-galaktoz konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren standart grafikler verilmiştir.



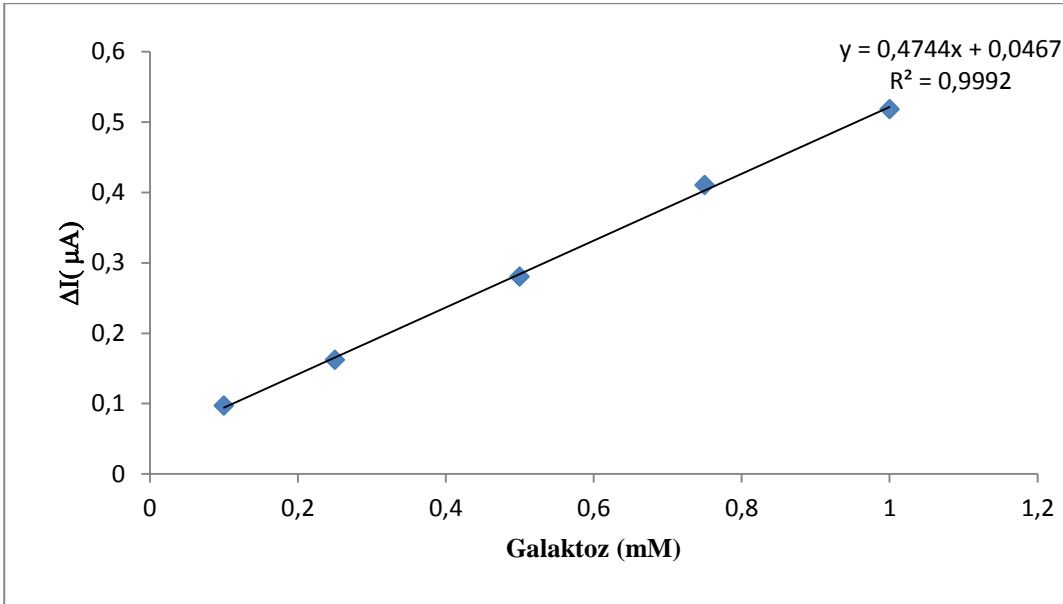
Şekil 3.21.a) Tayin aralığı denemesi için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar D-Galaktoz konsantrasyonları sırasıyla. Mavi: baseline; Kırmızı:0,01mM; Yeşil: 0,025mM; Sarı:0,05mM; Mor: 0,075mM; Lacivert: 0,1 mM. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.



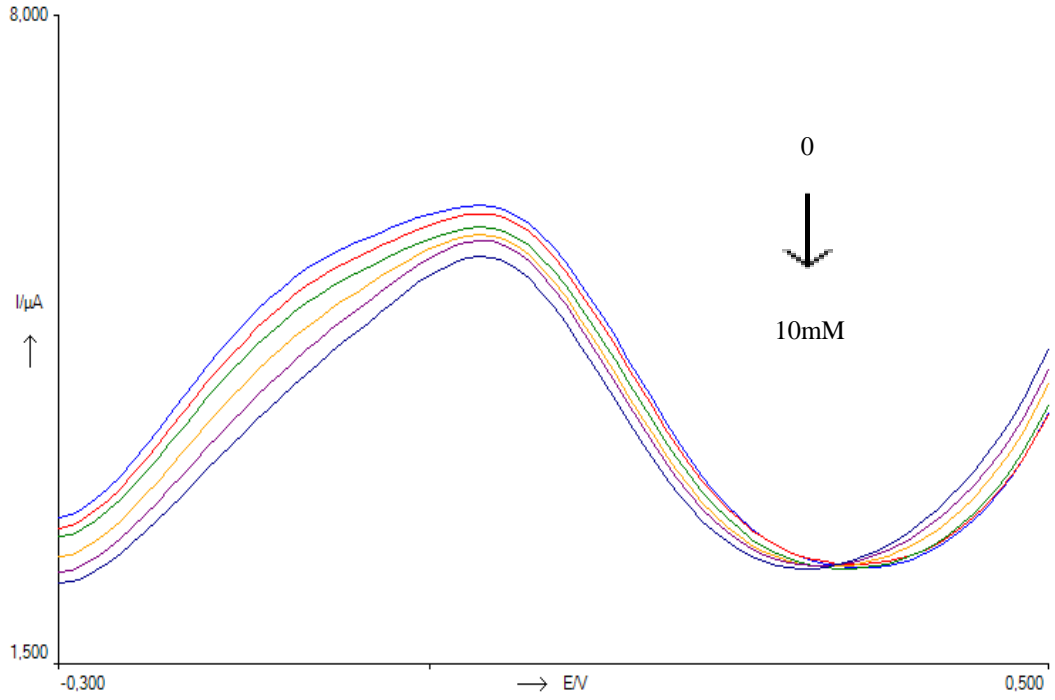
Şekil 3.21. b) Doğrusal tayin aralığı standart grafiği Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.



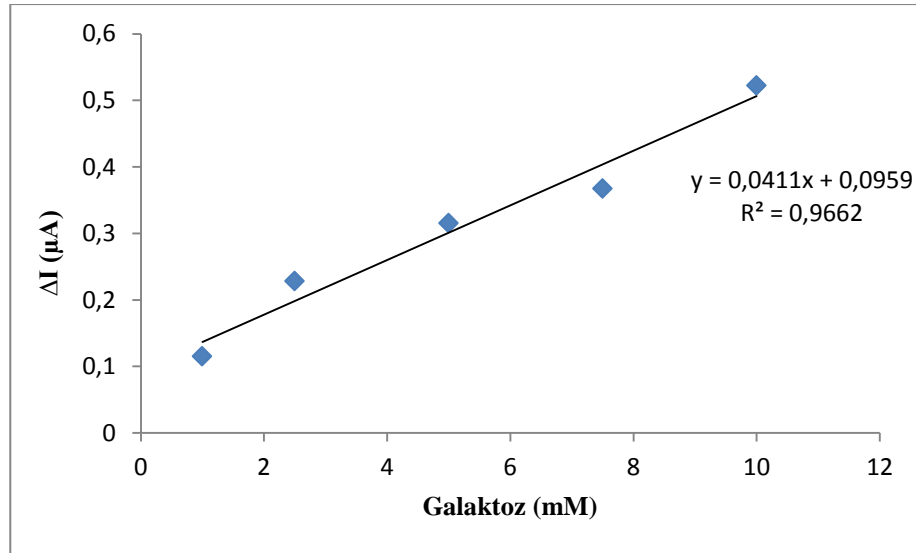
Şekil 3.22. a) Tayin aralığı denemesi için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar D-Galaktoz konsantrasyonları sırasıyla Mavi: baseline; Kırmızı:0,1mM ;Yeşil:0, 25mM; Sarı:0,50mM; Mor: 0,75mM; Lacivert: 1,0 mM. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.22.b) Doğrusal tayin aralığı standart grafiği Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.23.a) Tayin aralığı denemesi için DP yöntemiyle elde edilen sonuçlar D-Galaktoz konsantrasyonları sırasıyla Mavi: baseline; Kırmızı:1mM ;Yeşil:2,5mM; Sarı:5,0mM; Mor: 7,5mM; Lacivert: 10 mM.. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.23. b) Doğrusal tayin aralığı standart grafiği Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda ve 32° C sıcaklıkta 3 dakika karıştırılmalı ortamda gerçekleştirilmiştir.

Grafiklerden görüldüğü gibi doğrusallığın 0,1-1mM ve 1-10mM D-galaktoz konsantrasyonları için yüksek ve birbirine yakın olmalarına rağmen 0,1-1mM D-galaktoz konsantrasyonu sonuçlarından doğrusallığın ve akım farklanmalarının

yüksek olmasından dolayı biyosensörün galaktoz için tayin aralığı 0,1-1 mM olarak bulunmuştur.

3.3.2 Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün tekrarlanabilirliğine ilişkin bulgular

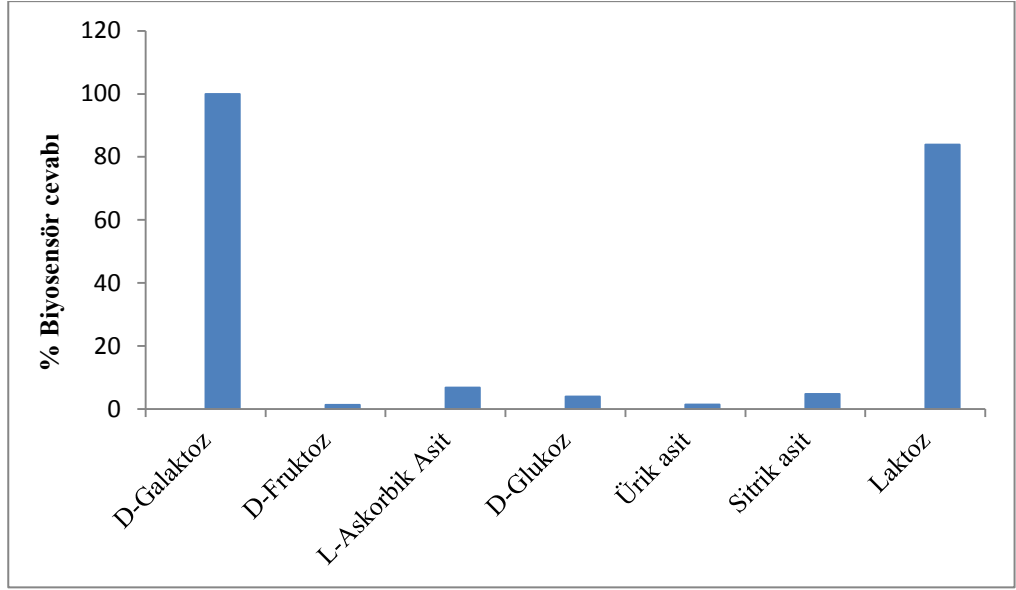
Bu çalışmada geliştirilen modifiye biyosensörün tekrarlanabilirliği incelenmiştir. Çözelti içerisinde 0.5mM D-galaktoz olacak şekilde 7 kez tekrar edilen ölçümler ve çizilen standart grafik yardımıyla örnek derişimleri saptanmış ve çizelge 3.1 'de verilmiştir. Elde edilen veriler kabul edilebilir sınırdadır.

Çizelge 3.1. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik bulguları

Aritmetik Ortalama (\bar{x})	Standart Sapma (S.S)	Varyasyon Katsayısı(%)
0,5376 mM	$\pm 0,0236$ mM	4,40

3.3.3 Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün substrat spesifikliğine ilişkin bulgular

Galaktoz oksidaz oksidoredüktaz sınıfı bir enzim olup substrat olarak D-galaktozu kullanmaktadır. Diğer bazı monosakkaritleri ve elektroaktif anyonik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyip katalizlemediği bu çalışmada test edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda Galaktoz oksidaz biyosensörü ile D-Laktoz , D-glukoz, D-fruktoz elektroaktif anyonik bileşikler olan L-askorbik asit, sitrik asit ve ürik asit kullanılarak ölçümler yapılmıştır. Ölçümlerden elde edilen biyosensör cevapları Şekil 3.24.' de verilmiştir.

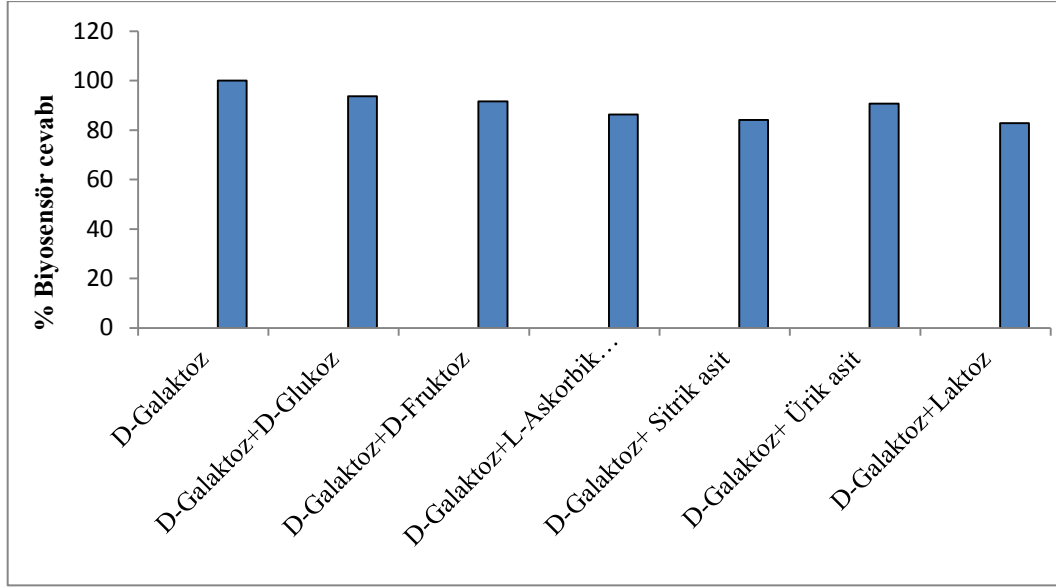


Şekil 3.24. D-Galaktoz biyosensörü için substrat spesifikliğine ilişkin grafik. Ölçümler (-0,3) ve (0,5) V potansiyelleri arasında 500 μ M substrat derişimi için 50 mM fosfat tamponu pH: 7,0 ve 32 ° C gerçekleştirildi.

Şekil 3.24.'e göre geliştirilen biyosensör D-galaktozun 4-epimeri olan d-glukoza kısmende olsa cevap verirken D-fruktoza çok daha az cevap vermiştir. D-glukoz ve D-galaktozdan meydana gelmiş bir disakkarit olan D-Laktoza cevapsa oldukça yüksektir. Evrensel girişimciler olan L-askorbik asit, ürik asit ve sitrik asite verilen cevaplar irdelendiğinde biyosensörün L-askorbik asite ve sitrik asite daha fazla, ürik asite daha az cevap verdiği gözlenmiştir. Bununla birlikte modifiye biyosensör en yüksek cevabı D-galaktoz için vermiştir.

3.3.4 Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensöre girişimcilerin etkisi

Galaktoz oksidaz biyosensörüyle D-galaktoz tayinine yönelik yapılan ölçümlere D-galaktoz varlığında diğer monosakkaritlerin, D-Laktozun, L-askorbik asitin, sitrik asitin ve ürik asitin etkisi belirlenmiştir. Şekil 3.25.'de (-0,3) ve (0,5) V potansiyelleri arasında söz konusu girişimcilerin tek tek ilavesi yoluyla girişim etkisinin olup olmadığı izlenmiştir.

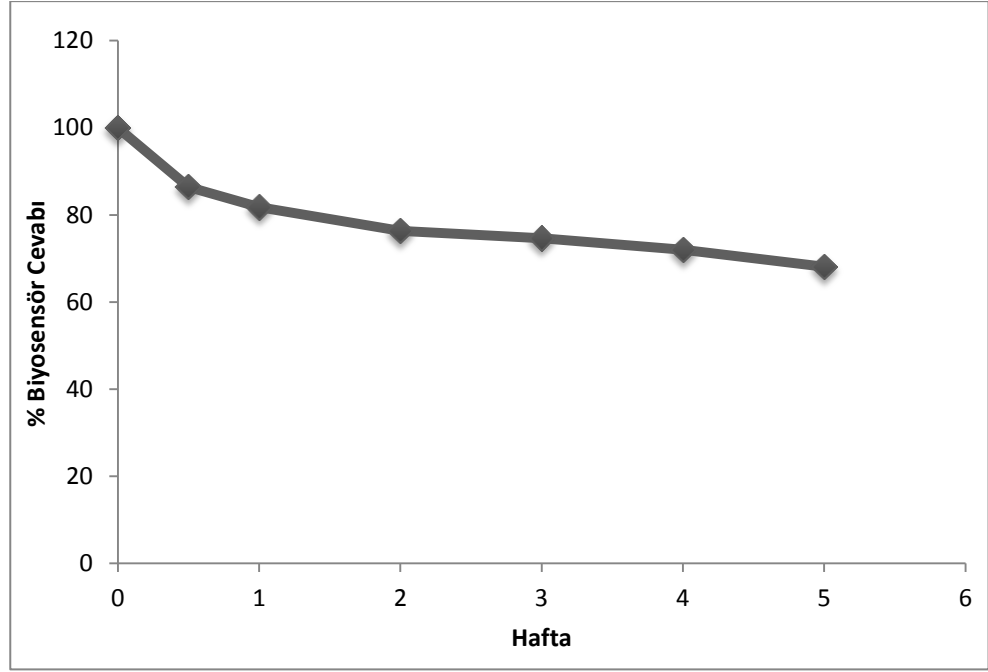


Şekil 3.25. Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye elektrodunun çeşitli girişimcilere verdiği yanıtlar. Ölçümler $(-0,3)$ ve $(0,5)$ V potansiyelleri arasında $500\mu\text{M}$ substrat derişimi için 50 mM fosfat tamponunda $\text{pH}:7,0$ ve 32°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Aynı konsantrasyondaki D-laktöz, D-glukoz, D-fruktoz, L-askorbik asit, sitrik asit ve ürik asit varlığının biyosensör cevabını azalttığı gözlenmiştir. Askorbik asit yükseltgenmeye çok elverişli bir girişimcidir. Bu anlamda açığa çıkan elektronların sinyale neden olması beklenen bir durumdur. Bu denemede de görülmüştürki tek başlarına en yüksek etkiyi göstren L-askorbik asit ve sitrik asit D-galaktoz varlığında da yine en yüksek etkiyi göstererek biyosensör cevabında düşüşlere neden olmuştur.

3.3.5 Au/Tiy/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye biyosensörün depo kararlılığına yönelik bulgular

Denemelerde elde edilen bulgular Şekil 3.26.' da verilmiştir.



Şekil 3.26. D-Galaktoz biyosensörü için depo kararlılığı denemesi. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 32 °C sıcaklıkta (-0,3) ve (0,5) V potansiyel aralığında DP ölçümler yoluyla yapılmıştır.

Grafik ilk hafta iki günde bir, diğer haftalarda haftada bir olacak şekilde alınan ölçümler yoluyla elde edilmiştir. Elektrot kullanılmadığı zaman + 4 C' de buzdolabında bekletilmiştir. Şekil 3.26.'dan anlaşıldığı gibi ilk haftada biyosensör cevabında % 16'lık, ikinci haftada %24'lük, üçüncü hafta %26'lık, dördüncü hafta % 28' lik en son haftada % 32' lik bir kaybın olduğu gözlenmiştir.

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Karbohidratlar farklı alanlarda büyük öneme sahip moleküllerdir. Önemli karbohidratlardan biri olan D-galaktoz, D- glukoza göre daha az tatlı olan ve sudaki çözünürlüğü fazla olmayan bir şeker türüdür. D-Galaktozun tayini gıda teknolojisi, beslenme, tıp ve fermentasyon endüstrisinde çok önemli rol oynamaktadır. Ayrıca D-galaktoz tayini galaktozemi ve galaktoz intoleransının teşhisinde önemli yer tutmaktadır. Galaktozun metabolizması diyabetik bebeklerin kanındaki glukoz seviyelerinin düzenlenmesinin derecelerini ortaya çıkarabilir (Berry et al., 2004). Tüm bu gerekçelerden dolayı insan kanındaki galaktoz seviyesi önlem altında tutulur ve katalize edilmiş galaktoz reaksiyon çalışmaları çok büyük öneme sahiptir. Galaktozun dönüşüm bozukluğu ile ilgili karbohidrat dönüşüm bozuklukları; galaktozemilerdir. Galaktozemiler, galaktoz metabolizmasının üç önemli enziminden (galaktoz-1-fosfat üridil transferaz, galaktokinaz, üridil difosfogalaktoz-4-epimeraz) birinin eksikliğinin sonucu olarak ortaya çıkarlar. Galaktoz tayinine yönelik genel iki metod vardır, bunlar gaz yada sıvı likid kromatografisi bir diğeri galaktoz oksidaz enziminin ürünlerinin elektrokimyasal, spektrometrik ve florometrik ölçümlerini içermektedir (Tac et al., 1999).

Galaktoz tayinlerine yönelik olarak galaktaz oksidazın immobilizasyonu ile gerçekleştirilen birçok biyosensör sistemi bulunmaktadır. Bu biyosensörler, galaktoz oksidazın asetil selüloz, naylon mesh, polipirol, polianilin, polivinilferrosenin membran yüzeyine immobilizasyonu ile geliştirilmiş CNT, karbon pasta gibi çeşitli kompozit elektrot sistemlerinden oluşturulan biyosensör sistemleridir (Altınışık,2009).

Kullandığımız hibrid enzim tekniğinin daha önce kullanılmadığından, yaptığımız uygulamalar biyosensör alanındaki biyosensör sistemlerine yeni bir bakış açısı getirecektir. Galaktoz oksidaz ve miyogloblin hibrid sisteminden oluşturulmuş olan modifikasyonlu biyosensörler bu alanda içeriği bakımından orijinal olup ilk defa denenmiştir.

Çalışmada altın elektrot elektrod yüzeyine tiyoninin elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiş ardından elektrod üzerine glutaraldehit damlatılarak enzim-protein çözeltisinin (galaktoz oksidaz ve miyoglobin) çapraz bağlanma ile immobilizasyonu sağlanmıştır. Son olarak elektrod yüzeyindeki tabakayı ölçüm ortamında bulunabilecek bazı girişimci moleküllerin etkisinden koruma amacıyla nafyon çözeltisi ile muamele edilerek biyosensör hazırlanması, Au/Tyi/Glu/Gaox-Mb/Nafyon modifiye galaktoz biyosensörü geliştirilmiştir. Çalışmanın temel yöntemi galaktoz oksidazın D-galaktozdaki alkolün seçici olarak dioksijen ile aldehite oksitlendiği enzimatik tepkimenin katalize edilmesine dayanır. Ölçümler (-0,3) - (0,5) V arası DP ile değerlendirilmiştir. D-Galaktoza verilen cevap biyosensörün substrata özgüdür. Galaktoz oksidaz ile katalize edilen oksitlenme tepkimesi alkolün aldehite oksitlenmesi ile dioksijenin hidrojen peroksitle iki elektronlu olarak indirgenmesidir. Üretilen aldehit hidrojen peroksitle birlikte salınmaktadır. Tepkime mekanizmasında dioksijen molekülü suya indirgenir, peroksit sadece iki bakır fenontrolin bileşiği arasında köprü görevi yapmaktadır ve iyon çözeltisinde bulunmak üzere salınmaz. Bu tepkime mekanizmasında hidrojen peroksit alıcısı olarak görev yapacak olan miyoglobin yer almaktadır.

Miyoglobin (Mb) peroksidazlara benzer yakınlıklarından dolayı peroksidaz aktivitatörleri olarak bilinirler. Bu verilerden yola çıkarak, peroksitin (H_2O_2) azalan katalizinin miyoglobinin aktif merkezindeki hem grubundan ileri geldiği düşünülür (Stargardt, et. al., 1978). Fakat miyoglobinin elektrot yüzeyindeki elektron transferi genellikle yavaştır ve protein denatürasyonları geri dönüşümsüzdür. Bu yüzden Mb modifiye elektrodu elektrokimyasal olarak daha kararlı ve daha hızlı duruma getirmek için tiyonin mediyatörü kullanılmaktadır.

Biyosensör yüzeyi ve çalışma koşullarının optimizasyonu sağlandıktan sonra tekrarlanabilirlik, substrat spesifikliğı ve girişim etkisi denemeleri yapılmış, biyosensörün depo kararlılığı belirlenmiştir. Sonuç olarak bu yüksek lisans tezi kapsamında galaktoz oksidaz ve miyoglobin hibrid sistemine dayalı biyosensör hazırlanmasıyla galaktoz tayini için başarıyla kullanılabilceğini gösterilmiştir. Sonuçlar literatüre önemli bir yenilik kazandıracak niteliktedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adam, B. ve Yiğitoğlu, M. R.**, 2012, Tıbbi Biyokimya, Atlas yayınları, 119-120s. Konya.
- Akbayırılı, P.**, 2007, Aktivasyon temeline dayalı amperometrik biyosensör sistemleri geliştirilmesi ve uygulamaları, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Ent.,39s.
- Akbulut, U.**, 1999, “İletken polimerlerle transduser hazırlanması” Biyosensörler, Telefoncu A, Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu , kuşadası, 10-16s.
- Akin, M., Yuksel, M. Geyik C., Odaci, D., Bluma, A., Höpfner, T. Beutel, S., Scheper and T., Timur, S.**, 2010, Alcohol biosensing by polyamidoamine (PAMAM)/cysteamine/alcohol oxidase-modified gold electrode, Biotechnol. Prog., DOI: 10.1002/bp.372s.
- Altınışık, M.**, 2009, Karbonhidrat Metabolizması Bozuklukları “Ders Notları ADÜTF Biyokimya Ana bilim dalı.
- Altug C. and Dinckaya E.**, 2007, Kreatin ve kreatinin tayinlerine yönelik enzim temelli hibrit biyosensörlerin geliştirilmesi, Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Amin, G. A. and Talhi, A. A.**, 2007, Production of L-glutamic acid by immobilized cell reactor of the bacterium corynebacterium glutamicum entrapped into carrageenan gel beads, World Appl. Sci. J., 2: 62–67pp.
- Andrieux, C.P., Audebert P., Divisia-Blohorn B.,Aldebert P. and Michalak F.**, 1990,Electrochemistry in hydrophobic nafion gels, J. Electroanal. Chem., 296, 117–139pp.
- Aydın , Y.**, 2012, İletken polimerlerin içerisinde enzim tutuklamasıyla yapılan biyosensörler, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Ent. 16s.
- Batır, G.**, 2009, 3-[(2,5-dimetil-4-brom)fenil] Tiyofenin elektrokimyasal polimerizasyonu, karakterizasyonu ve glikoz biyosensörü olarak geliştirilmesi ,süleyman demirel üniversitesi fen bilimleri enstitüsü, ısparta, 5s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Berry , G., Moate P., Reynolds R., Yager, C., Ning, C., Boston and R., Segal, S.,** 2004, The rate of de novo galactose synthesis in patients with galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency, 81(1):22-30pp.
- Canbay E.,** 2013, Çok duvarlı karbon nanotüp nasyon sistemin modifiye tirozinaz biyosensörü tasarımı ve dopamin tayinine adaptasyonu, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Ent.,24s.
- Cassidy, M. B., Lee, H. and Trevors, J. T.,** 1996, Environmental applications of immobilized microbial cells: a review, J. Ind. Microbiol. Biot., 16: 79-101pp.
- Cattaneo, M. V., Luong, J. H. T.,** 2004, Monitoring glutamine in animal cell cultures using a chemiluminescence fiber optic biosensor, Biotechnol. Bioeng., 41: 659 – 665pp.
- Chao Zhao, G.,Zhang, L., Wen Wei, X. and Sheng Yang, Z.,** 2003, Myoglobin on multi-walled nanotubes modified electrode: direct electrochemistry and electrocatalysis, Electrochemistry Communications, 5: 825-829pp.
- Cosnier, S., and Mailley, P.,** 2008, Recent advances in DNA sensors, Analyst, 133: 984–991pp.
- Çelik Z.,** 2014 Kalem grafit elektrotların (pge) pratik ve ekonomik enzim temelli biyosensörler hazırlanmasında sensör olarak kullanılma potansiyellerinin araştırılması , Ege Üniversitesi Fen Bilimleri ent.,8s.
- Çoşkun, K.,** 2009. Kimyasal ve elektrokimyasal yöntemlerle iletken polimerlerin sentezi ve membran uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Deng,C.,** 2006, Construction as well as EQCM and SECM characterizations of a novel Nafion/ glucose oxidase-glutaraldehyde / poly(thionine) Au enzyme electrode for glucose sensing, Sensors and Actuators B 122(2007) 148-157pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Deo, Y. M., Gaucher and G. M.,** 2004a, Semicontinuous and continuous production of penicillin-G by *Penicillium chrysogenum* cells immobilized in carragenan beads, *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 285–295pp.
- Diculescu, V. C., Paquim, A. M. C. and Brett, A. M. O.,** 2005, Electrochemical DNA sensors for detection of DNA damage, *Sensors*, 5: 377-393pp.
- Drummond, T. G., Hill, M. G. and Baton, J. K.,** 2003, Electrochemical DNA sensors, *Nat. Biotechnol.*, 21: 1192-1199pp.
- 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, *ITBM-RBM*, 29: 171–180pp.
- D'Souza, S.F.,** 2001, Microbial biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, 16: 337–353pp.
- Furbee Jr. J.W., Thomas C.R., Kelly R.S. and Malachowski M.R.,**1993, Mediated electrochemical reduction of cytochrome C and tyrosinase at perfluorosulfonated ionomer coated electrodes, *Anal. Chem.*, 65, 1654-1657pp.
- Gülce, H.,** 2011, Kimya Lisans Öğrencileri Araştırma Projesi Eğitimi Çalıştayı, Selçuk Üniversitesi.
- Guilbault, G.G., and Kauffmann, J.M.,** 1987, Enzyme-based electrodes as analytical tools, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 9: 95-113pp.
- Hong Liu, H., Qing Wan. and Lin Zou, G.,** 2006, Redox reactions and enzyme-like activities immobilized myoglobin in aqueous/ organic mixtures, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 594: 111-117pp.
- Liu H.-Y. and Deng J.-Q.,** 1995, An Amperometric Lactate Sensor Employing Tetrathiafulvalene in Nafion Film as Electron Shuttle, *Electrochim. Acta*, 40, 1845-1849pp.
- Luppa P. B., Sokoll, L. J. and Chan, D. W.,** 2001, Immunosensors-principles and applications to clinical chemistry, *Clin. Chim. Acta*, 314: 1-26pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jenkins R. L., Wilson, E. M., Angus, R. A., Howell, W. M., Kirk, M., Moore, R., Nance, M. and Brown, A.,** 2004, Production of androgens by microbial transformation of progesterone in vitro: a model for androgen production in rivers receiving paper mill effluent, *Environ. Health Perspect.*, 112: 1508–1511pp.
- Jo, J. H., Sung Lee, D., Park, D. and Park, J. M.,** 2008, Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment proces, *Bioresource Technol.*, 99: 6666-6672pp.
- Kapoor, M., Nair, L. M. and Kuhad, R. C.,** 2008, Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*, *Biochem. Eng. J.*, 38: 88–97pp.
- Karube, I. and Nakanishi, K.,** 1994, Microbial biosensors for process and environmental control, *IEEE Eng. Med. Biol.*, 13: 364-374pp.
- Köksal ,G., ve Özel, Gökmen, H.,** 2008, Metabolik hastalıklarda beslenme, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara.
- Manso, J., Mena, M. L., Seden, P. Y. and Pingarron J. M.,** 2008, Alcohol dehydrogenase amperometric biosensor based on a colloidal gold–carbon nanotubes composite electrode, *Electrochim. Acta*, 53: 4007-4012 pp.
- Mathebe, N. G. R., Morrin, A. and Iwuoha, E. I.,** 2004, Electrochemistry and scanning electron microscopy of polyaniline/peroxidase based biosensor, *Talanta*, 64: 115-120pp.
- Mikeladze, E., Collins, A., Sukhacheva,M., Netrusov, A. and Csöregi, E.,** 2002, Characterization of a glutamate biosensor based on a novel glutamate oxidase integrated into a redox hydrogel, *Electroanal.*, 14: 1052-1059pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Muhammet, S.M.**, 2008, Kolesterol tayini için biyosensör hazırlanması, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Newman, J. D. and Turner, A. P. F.**, 2004, Biosensors for monitoring glucose, In: sensors in medicine and health care, P. A. Öberg, T. Togawa, and F. A. Spelman (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim.
- 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: 380–385pp.
- Quioco FA. and Richards F.M.**, 1964, "Intermolecular crosslinking of a protein in the crystalline satte. Carboxypeptidase-A", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 52.833-839pp.
- Qingxia, W., Haili Z., Yiwei, W. and Aimin Y.**, 2011 ‘‘Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on a glassy carbon electrode modified with polythionine and gold nanoparticles’’ 176:279-285pp. Hubei Normal University, China.
- Prodromidis, M. I.**, 2010, Impedimetric immunosensors—A review, Electrochim. Acta, DOI:10.1016 /j.electacta.2009.01.081.
- Reshetilov, A. N., Trotsenko, J. A., Morozova, N. O., Iliasov, P. V. and Ashin, V. V.**, 2001, Characteristics of Gluconobacter oxydans B-1280 and Pichia methanolica MN4 cell based biosensors for detection of ethanol, Process Biochem., 36: 1015–1020pp.
- 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: 590-595pp.
- Saçak, M.**, 2004, Polimer Kimyası, Gazi Kitabevi, 525s, Ankara.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Saurina, J., Hernandez-Cassou, S., Alegret S. and Fabregas, E.,** 1999, Amperometric determination of lysine using a lysine oxidase biosensor based on rigid-conducting composites, *Biosens. Bioelectron.*, 14: 211-220pp.
- Sarma, K., Vatsyayan, P., Goswami, P. and Minteer, S. D.,** 2009, Recent advances in material science for developing enzyme electrodes, *Biosens. Bioelectron.*, 24: 2313-2322pp.
- Scouten, H.W., Luong, J.H.T., and Brown, R.S.,** 1995, Enzyme or protein immobilization techniques for application in biosensor desing, *Trends in Biotechnology*,13:178-185pp.
- Shaolin, M.,** 1994, Bioelectrochemical response of the polyaniline galactose oxidase electrode , *Journal of Electroanalytical Chemistry* 135-139pp.
- Sharma, S. K., Sehgal, N., Kumar, A.,** 2003, Biomolecules for development of biosensor and their applications, *Curr. Appl. Phys.*, 3: 307-316pp.
- Shi, H., Yang, Y., Huang, J., Zhao, Z., Xu, X., Anzai, J., 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: 852-858pp.
- Shirsat, MD., Too, CO. and Wallace GG.,** 2008 Amperometric glucose biosensor on layer by layer assembled carbon nanotube and polypyrrole multilayer film. *Electroanal* 20:150p.
- Singh, R. S., Saini, G. K. and Kennedy, J. F.,** 2008, Pullulan: microbial sources, production and applications, *Carbohydr. Polym.*, 73: 515-531pp.
- Skladal, P.,** 1997, Advances in electrochemical immunosensors, *Electroanal.*, 9: 737-745pp.
- Stargardt, J.F., Hawkrige, F.M. and Landrum, H.L.,** 1978, Reversible heterogeneous reduction and oxidation of sperm whale myoglobin at a surface modified gold minigrad electrode'', *Anal. Chem.* 50 930–932pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Szabo ,E., Adanyi, N. and Varadi, M.,** 1996, Application of biosensor for monitoring galactose content. *Biosens. Bioelectron.* 11: 1051– 1058pp.
- Teles, F. R. R. and Fonseca, L. P.,** 2008, Trends in DNA biosensors, *Talanta*, 77: 606–623pp.
- Tkac, J., Gemeiner and P., Sturdik E.,** 1999 Rapid and sensitive galactose oxidase-peroxidase biosensor for galactose detection with prolonged stability *Biotechnology Techniques* 13: 931–936pp.
- Türemiş, M.,** 2010, Miyoglobinin elektrokatalitik indirgenmesine dayalı 2.nesil amperometrik biyosenör geliştirilmesi ve H₂O₂ tayininde kullanılması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Ent., 6-8s.
- Urban, G.,** 2000, Biosensors Microsystems, *Sensors Update*, Vol.8(1); 189-214s.
- Uygun,A.,** 2009, DNA hybridization electrochemical biosensor using a functionalized polythiophene. *Talanta* 79:194pp.
- Velasco-Garcia, M. N. and Mottram, T.,** 2003, Biosensor technology addressing agricultural problems, *Biosyst. Eng.*, 84: 1-12pp.
- Yüce, M.,** 2011, Bazı ağır metallerin tayininde kullanılmak üzere mikrobiyal biyosenör geliştirilmesi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Doktora Tezi, 123: 8-10pp.
- Wang, F. and Hu, S.,** 2008, Direct electron transfer of myoglobin within a new zwitterionic gemini surfactant film and its analytical application for H₂O₂ detection, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63: 262-268pp.
- Warsinke, A., Benkert, A. and Scheller, F. W.,** 2000, Electrochemical immunoassays, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366: 622–634pp.
- Whittaker MM, Ballou DP and Whittaker JW ,** 1998 Kinetic isotope effects as probes of the mechanism of galactose oxidase . *Biochemistry* 37: 8426-8436pp.

ÖZGEÇMİŞ**Adı, Soyadı:** Belgin SERT**Doğum tarihi, yeri:** 08.06.1988- Kuveyt**Medeni hali:** Evli**Uyruğu:** T.C**Adres:** Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü 35100 Bornova
/ İZMİR**Tel :** 0 554 609 49 78**e-mail:** belginsrt@gmail.com**Eğitim Durumu:**

OKUL	DERECE	YIL
General Ferhat ilkokulu	İlkokulu	1995-1999
Mesir İlköğretim okulu	İlköğretim	1999-2001
Manisa Yabancı Dil Ağırlıklı	Lise	2002-2006
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	Lisans, Kimya	2007-2011
Ege Üniversitesi	Yüksek Lisans, Biyokimya	2011-2014
Ege Üniversitesi	Yüksek Lisans, Eczacılık	2012- Halen devam ediyor

Görev aldığı Projeler

BAP - 2013 FEN 028 Galaktoz oksidaz - Miyogloblin hibrid sistemine dayalı mediyatör esaslı yeni bir biyosensör tasarımı (2013-2015), İzmir.

BAP- 2014 Hypericum perforatum L., Alpinia officinarum ve Astragalus schottianus Boiss. ekstrelerini içeren jel formülasyonlarının yara iyileşmesi üzerine etkilerinin incelenmesi, İzmir.

Tübitak Proje Araştırma Eğitim Semineri, Çanakkale Boğazı'ndaki Deniz Yosunlarının Anti-bakteriyel Özelliklerinin İncelenmesi, (2011), Çanakkale.