

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**GLUKOZ TAYİNİNE YÖNELİK OLARAK
KALEM GRAFİT ELEKTROT-GLUKOZ OKSİDAZ
TEMELLİ YENİ BİR BİYOSENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ**

DUYGU GÖÇER

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Erhan DİNÇKAYA

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 405.05.01

Sunuş Tarihi : 04.06.2015

**Bornova – İZMİR
2015**

Duygu GÖÇER tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*Glukoz Tayinine Yönelik Olarak Kalem Grafit Elektrot-Glukoz Oksidaz Temelli Yeni Bir Biyosensör Geliştirilmesi*” 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 04/06/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

: Prof.Dr.Erhan DİNÇKAYA

Raportör Üye

: Prof.Dr.Erol AKYILMAZ

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 “*Glukoz Tayinine Yönelik Olarak Kalem Grafit Elektrot-Glukoz Oksidaz Temelli Yeni Bir Biyosensör Geliştirilmesi*” 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.

04 / 06 / 2015

Duygu GÖÇER

ÖZET**GLUKOZ TAYİNİNE YÖNELİK OLARAK
KALEM GRAFİT ELEKTROT-GLUKOZ OKSİDAZ
TEMELLİ YENİ BİR BİYSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ****GÖÇER, Duygu**

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA

Haziran 2015, 54 sayfa

Bu tezde glukoz oksidaz enziminin kalem grafit elektrot yüzeyine çeşitli immobilizasyon yöntemleri kullanılarak biyosensörler tasarlanmıştır. Glukoz oksidaz enzimi kullanılarak glukoz tayinine yönelik biyosensörler oluşturulmuştur. İlk olarak glukoz oksidaz enzimi jelatin ve glutaraldehit ile çapraz bağlanarak kalem grafit elektrot yüzeyine sabitlenmiştir.(PGE/Glukoz oksidaz-jelatin/glutaraldehit).İkinci olarak farklı bir biyosensör tasarlanmıştır. Bu amaçla glukoz oksidaz enzimi nafyon ve glutaraldehit ile kalem grafit elektrot yüzeyine sabitlenerek bir biyosensör hazırlanmıştır. Geliştirilen biyosensörler ile glukoz ölçümleri -0.7 V'ta amperometrik yöntem ile yapılmıştır.

Hazırlanan biyosensörlerin optimizasyon çalışmalarında öncelikle optimum enzim miktarı, jelatin miktarı, nafyon yüzdesi ve glutaraldehitte bekleme süresi gibi parametreler çalışılmıştır. Çalışma koşullarının optimizasyonunda pH ve sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra karakterizasyon çalışmaları içinde doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik, girişim etkisi ve örnek analizi gibi bazı parametreler belirlenmiştir.

Optimizasyon çalışmalarından PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör için enzim miktarı, jelatin miktarı ve glutaraldehitte bekletme süresi sırasıyla 1,14U/mL, 20 mg ve 3 dakika olarak tespit edilmiştir. Fosfat tamponu (50 mM, pH: 7,5) ve 30°C sıcaklığın optimum çalışma koşullarını sağladığı belirlenmiştir. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör için karakterizasyon çalışmalarında 50 µM - 1000 µM aralığında glukoz için doğrusal sonuçların alındığı belirlenmiştir.

PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör için glukoz oksidaz miktarı, nafyon yüzdesi ve glutaraldehitte bekletme süresi sırasıyla 1,14 U/mL, %1,5 ve 5 dakika olarak belirlenmiştir. Fosfat tamponu (50 mM, pH: 7,5) ve 30°C sıcaklığın optimum çalışma koşullarını sağladığı belirlenmiştir. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör için karakterizasyon çalışmalarında 50 μ M - 1000 μ M aralığında glukoz için doğrusal sonuçların alındığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler : Kalem grafit elektrot, nafyon, enzim, glukoz oksidaz, glukoz, biyosensör

ABSTRACT**DEVELOPMENT OF A NEW PENCIL GRAPHITE ELECTRODE-
GLUCOSE OXIDASE BASED BIOSENSOR FOR DETERMINATION OF
GLUCOSE**

GÖÇER, Duygu

MSC Thesis, Biochemistry Department

Supervisor : Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA

June 2015, 54 pages

In this thesis, biosensors will be created using a variety of methods to pencil graphite electrode surface immobilization of glucose oxidase enzyme is intended. Biosensors for detection of glucose using glucose oxidase enzymes are generated. Firstly, glucose oxidase was crosslinked with gelatin and glutaraldehyde and fixed on the pencil graphite electrode surface. (PGE/Glucose oxidase-gelatin/glutaraldehyde). Secondly, a different biosensor was designed. For this aim, biosensor was prepared by using nafion. Glucose oxidase enzyme was fixed on pencil graphite electrode surface with nafion and glutaraldehyde. (PGE/Glucose oxidase /nafion/ glutaraldehyde). Glucose measurements were carried out at -0.7 V with amperometric method by developed biosensor systems.

In optimization studies for designed biosensor, firstly, the optimal amount of enzyme, gelatin, optimal percentage nafion and optimum glutaraldehyde duration time were carried out. Optimization of working conditions; optimum pH and optimum temperature also investigated. Afterwards, in the characterization studies some parameters such as linearity, repeatability, reproducibility, interference effects of some compounds and sample analyses were determined.

From the optimization studies, amount of enzyme, gelatine amount and glutaraldehyde duration time were determined as 1.14U/mL, 20 mg and 3 minutes for the PGE/gelatine-glucose oxidase/glutaraldehyde modified biosensor.

In optimum condition, buffer system is 50 mM, pH: 7.5 phosphate buffer and optimum temperature is 30°C. It was determined at the characterization studies on

the PGE/gelatine-catalase/glutaraldehyde biosensor that linear results are obtained between the ranges of 50 μM to 1000 μM glucose concentration.

Amount of enzyme, nafion rate and glutaraldehyde duration time were determined as 1.14U/ml, 1.5% and 5 minute for the PGE/nafion/glucose oxidase/glutaraldehyde modified biosensor. Phosphate buffer (50 mM; pH 7.5) and 30°C were established as providing the optimum working conditions. It was determined at the characterization studies on the PGE/nafion/glucose oxidase/glutaraldehyde biosensor that linear results are obtained between the ranges of 50 μM to 1000 μM glucose concentration.

Key words : Pencil graphite electrode, nafion, glucose oxidase, enzyme, glucose, biosensor

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca maddi manevi her anlamda desteğini esirgemeyen, yol gösteren sorumluluk vererek gelişmemi sağlayan saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA'ya, kıymetli görüşlerinden faydalandığım Sayın Araş. Gör. Dr. Çağrı ALTUĞ'a ve Arş. Gör. Umut MENGÜLLÜOĞLU'na teşekkürü borç bilirim. Ayrıca lisansüstü eğitimime başlamamdaki en büyük desteğim olan ve bana her zaman inanan ailem başta olmak üzere Derya DUMAN'a, Melike KAPUSUZ'a, Elçin AD'a, Zeynep ÇELİK'e, Efe Deniz ÖZTÜRK'e, Ümmü Gül GÜLEÇ'e ve nihayetinde Didem GÖÇER'e bütün eğitim hayatım boyunca bana verdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2014 FEN 017 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

Bu çalışma TÜBİTAK 2210-C kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1.GİRİŞ	1
1.1.Biyosensörler.....	1
1.2. Biyoreseptör Moleküller	2
1.3. Başlıca Biyosensör Çeşitleri.....	3
1.3.1. Elektrokimya esaslı biyosensörler.....	3
1.3.2. Yarı iletken temelli biyosensörler	4
1.3.3. Optik temelli biyosensörler	4
1.3.4. Piezoelektrik temelli biyosensörler	4
1.3.5. Kalorimetri temelli biyosensörler.....	5
1.4. Bu Tez Kapsamında Kullanılan Biyoaktif Tabaka Bileşenleri	5
1.4.1. Glukoz oksidaz	5
1.4.2. Jelatin	5
1.4.4. Glutaraldehit.....	6
1.4.5. Nafyon.....	7
1.5. Kalem Grafit Elektrot ile Önceki Çalışmalar	8
2.MATERYAL ve METOT	10
2.1. Materyal	10
2.1.1. Cihaz ve diğer ekipmanlar.....	10
2.1.2. Kimyasallar	10
2.2. Metot	11
2.2.1. Geliştirilen biyosensörlerin çalışma ilkesi	11
2.2.2.PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün hazırlanması	11
2.2.3. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin optimizasyon çalışmaları.....	13

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

2.2.4. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin karakterizasyon çalışmaları	15
2.2.5. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün hazırlanması ve çalışmaları	16
2.2.6. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin optimizasyon çalışmaları	17
2.2.7. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin karakterizasyon çalışmaları	20
3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	22
3.1. PGE/Jelatin-Glukoz Oksidaz/Glutaraldehit Modifiye Biyosensörün Optimizasyonuna İlişkin Bulgular	22
3.1.1. Tabakalandırma sayısının biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	22
3.1.2. Glutaraldehitte bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi ...	23
3.1.3. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi	24
3.1.4. Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi	26
3.1.5. Tampon türünün biyosensör cevabı üzerine etkisi	26
3.1.6. Tampon konsantrasyonunun optimizasyonu	27
3.1.7. Tampon pH'sının optimizasyonu	29
3.1.8. Optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	30
3.2. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin karakterizasyon çalışmaları	32
3.2.1. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün doğrusal tayin aralığı	32
3.2.2. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün tekrar üretilebilirliğine ilişkin bulgular	33
3.2.3. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile alınan yanıtların tekrarlanabilirliğine ilişkin bulgular	33
3.2.4. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörüne girişimci etkisi	34
3.2.5. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile sentetik serumda glukoz analizi.....	35
3.3. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin optimizasyon çalışmaları	35

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

3.3.1. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	35
3.3.2. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit biyosensörünün optimum biyoaktif tabakalandırma işlem sayısının belirlenmesi	36
3.3.3. Nafyon yüzdesinin optimizasyonu	37
3.3.4. Nafyonda bekletme süresinin optimizasyonu	38
3.3.5. Glutaraldehyde bekletme süresinin optimizasyonu	39
3.3.6. Enzimde bekletme süresinin optimizasyonu	40
3.3.7. Tampon türünün belirlenmesi	41
3.3.8. Tampon konsantrasyonunun optimizasyonu	42
3.3.9. Tampon pH'sının optimizasyonu	44
3.3.10. Optimum sıcaklığın belirlenmesi	45
3.4.1.PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin karakterizasyon çalışmaları	46
4. GENEL DEĞERLENDİRME.....	49
KAYNAKLAR DİZİNİ	51
ÖZGEÇMİŞ	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

1.1 Biyosensörlerin temel çalışma prensipleri (Mohanty and Kougianos, 2005.).....	1
1.2. Glutaraldehitin Haworth gösterimi	7
1.3. Nafyonun formülü	7
2. 1 Çalışma düzeneği	12
2. 2 Biyoaktif tabaka.....	12
2.3.PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye elektrotta ait immobilizasyon şeması.....	17
3. 1. Biyoaktif tabakalandırma işlem sayısının biyosensör cevabına etkisi. 22	
3. 2 Glutaraldehitte bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi. ...	24
3. 3 PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin enzim miktarı optimizasyonu	25
3. 4 Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi	26
3. 5 Tampon türünün biyosensör cevabına etkisi	27
3. 6 Tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	28
3. 7 Biyosensör cevabına pH'nın etkisi.	29
3. 8 a) Biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisi.(600 µM glukoz için)	
b) Biyosensörün doğrusal tayin aralığına sıcaklığın etkisi.	31
3. 9 PGE/Jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit biyosensörüne ait doğrusal tayin aralığı grafiği.	32
3. 10 PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirliği.	33
3.11 PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöründe girişim etkisi.	34
3. 12 Glukoz oksidaz miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.	36
3. 13 Biyoaktif tabakalandırma işlem sayısının biyosensör cevabına etkisi.	37
3. 14 Nafyon yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	38
3. 15 Nafyonda bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.	39
3. 16 Glutaraldehitte bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi. .	40
3. 17 Enzimde bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.	41
3. 18 Tampon türünün biyosensör cevabı üzerine etkisi.(600 µM glukoz standartı için ölçümler alınmıştır.).....	42
3. 19 Tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	43
3. 20 Biyosensör cevabına pH'nın etkisi.	44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

3.21a)Biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisi.	
b)30 ve 35 °C deki doğrusal tayin aralıklarının karşılaştırılması.....	45
3. 22 PGE/nafyon-glukoz oksidaz/glutaraldehit biyosensörüne ait doğrusal tayin aralığı grafiği	46
3. 23 PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirliği.	48

ÇİZELGELER DİZİNİ**Sayfa**

1 PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik bulguları.....	34
2 PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörle sentetik serumda glukoz analiziS.....	35
3 PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörünün tekrarlanabilirliği	47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

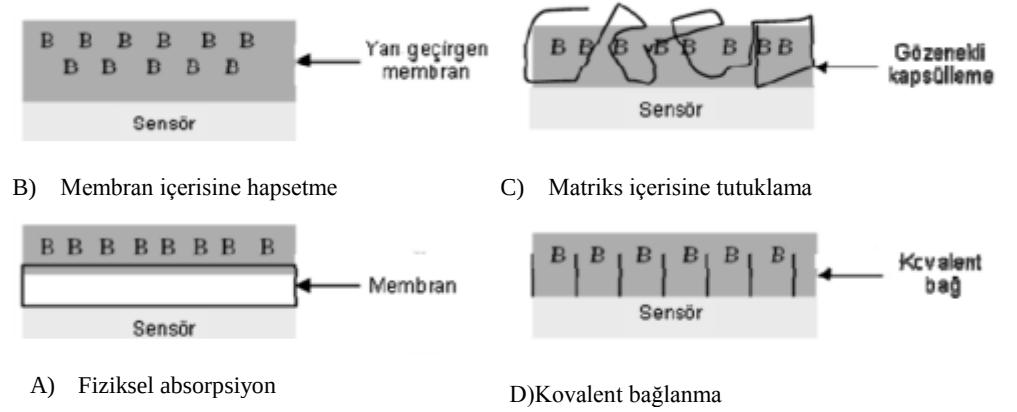
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
GOX	Glukoz oksidaz
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
U	Unit
PGE	Kalem Grafit Elektrot
HEPES	N-[2-hidroksietil]piperazin-N-[2-etansülfik asit]

1.GİRİŞ

1.1.Biyosensörler

Biyosensörler fizikokimyasal dönüştürücüler veya dönüştürücü mikrosistemler ile bunlarla yakın ilişkideki biyolojik yapıları birleştiren analitik cihazlardır. Spesifik “bio” kısım spesifik olduğu analiti tanır ve “sensör” kısmına sinyal (elektriksel, optik vb. gibi) olarak iletilir.(Mohanty and Kougianos, n.d.) Biyosensörler basitlikleri, yüksek duyarlılıkları ve gerçek zamanlı analizlere uygulanabilirlikleri nedeniyle çok farklı ve geniş alanlarda kullanılmaktadır. Biyosensörler; sıklıkla biyolojik analizler için kullanılan bir çeşit özel sensörlerdir ve " International Union of Pure and Applied Chemistry " (IUPAC) tarafından, " kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar " olarak tanımlanmaktadır (Rasooly, 2005).

Biyosensörün temel çalışma prensibi Şekil 1.1.'de olduğu şekilde düşünülebilir. Biyomolekül analiti tanır ve sensör element analitteki değişimi elektrik sinyaline dönüştürür. Biyosensör yüzeyinde oluşan etkileşimler membran içerisinde tutuklama, fiziksel adsorpsiyon, matriks tuzaklama ve kovalent bağlanma olmak üzere dört farklı şekilde olabilir (Mohanty and Kougianos, n.d.).



Şekil 1.1 . Biyosensörlerin temel çalışma prensipleri (Mohanty and Kougianos, 2005.)

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

kullanılabilmektedir. Biyoreseptör ve dönüştürücünün tipi biyosensörün sınıfını belirlemektedir.

1.2. Biyoreseptör Moleküller

Biyoreseptör moleküller olarak, antikor, enzim, protein, nükleik asitler gibi biyolojik moleküller ya da canlı biyolojik sistemler olan hücre, doku ve mikroorganizmalar kullanılabilir. Biyoreseptör olarak kullanılacak moleküllerin en önemli özelliği tespit edilmesi istenen hedef moleküle karşı yüksek afinite ve seçicilik göstermeleridir(Rasooly, 2005). Biyomolekül olarak en çok enzimin tercih edilmesi hedef moleküle karşı oldukça özgül olmasındandır. Enzimler kimyasal tepkimelere katıldıklarında proton, elektron, ışık ve ısı gibi birçok ölçülebilir reaksiyon ürünü meydana getirdiklerinden, biyoreseptör olarak sıklıkla kullanılan biyomoleküllerdir (Chambers et al., 2008). Özellikle birden fazla alt üniteye sahip olan allosterik enzimler, doğaları gereği biyoreseptör olarak yüksek potansiyele sahiptirler. Bu tip enzimlerin substratlarına olan ilgileri, aktif bölgeleri dışına bağlanacak efektör (modülatör) moleküller tarafından değiştirilebilir (O'Connell and Guilbault, 2001).

Biyokomponent olarak antikorların kullanıldığı biyosensörler antikor temelli biyosensörler ya da immünosensörler olarak adlandırılırlar. Antikorlar ve antijenler arasında spesifik etkileşim olduğundan immünosensörler ile son derece spesifik ve duyarlı analizler yapılabilir. Antikorlar uygun transduserler ile eşleştirilerek hormon, ilaç, virüs, bakteri ve çevresel kirletici olan diğer moleküllerin, pestisitlerin, biyomedikal maddelerin tayini için immünosensörler geliştirilebilir (Proske et al., 2005). Antikorlar ile tasarlanmış biyosensörlerin en önemli avantajı immunojen olmalarıdır. Bunun en önemli faydası, hedef molekülün saptama öncesinde saflaştırılmasına ihtiyaç duyulmamasıdır (Chambers et al., 2008).

Biyoreseptör olarak kullanılan birçok biyolojik molekülün çıkış noktası mikroorganizmalardır. Mikroorganizmaların kendileri de biyoreseptör olarak kullanılabilirler. Mikroorganizmalar geniş bir aralıktaki kimyasal bileşikleri metabolize edebilir. Mikroorganizmalar olumsuz şartlara uyma konusunda büyük bir kapasiteye sahiptirler ve yeteneklerini geliştirerek zamanla yeni moleküller oluşturabilirler. Çoğunlukla inorganik veya organik toksik kimyasal maddelerin tespitinde kullanılırlar ve diğer biyoreseptör moleküllere göre daha çok çeşitlilikte kimyasal yapı saptayabilirler. Genetik modifikasyonlara uyumlu olmaları, farklı pH

ve farklı sıcaklıklarda işlev görebilmeleri mikroorganizmaları ideal biyoreseptörlerden yapmaktadır (D'Souza, 2001).

1.3. Başlıca Biyosensör Çeşitleri

1.3.1. Elektrokimya esaslı biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler genel olarak hibrit DNA'lar, DNA bağlı ilaçlar, glukoz derişimi vb. saptamalar için kullanılır. Bu tür biyosensörlerin temelindeki ilke birçok kimyasal tepkimenin iyon ya da elektronları üretmesi ya da tüketmesidir. Bu durumda çözeltinin elektriksel özelliklerinde değişimler meydana gelir ve bu değişimler ölçülerek parametre olarak kullanılır. Enzim temelli biyosensörlerin pek çoğunda elektrokimyasal esaslı ileticiler kullanılır. Bu ileticiler ile amperometri ve/veya potansiyometri ilkelerine göre ölçümler alınabildiğinden özellikle amperometride oksidoredüktaz sınıfı enzimler yaygın olarak kullanılır.

1.3.1.1. Amperometrik biyosensörler

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

1.3.1.2. Potansiyometrik biyosensörler

Potansiyometri bilindiği gibi en genel anlamda bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlar. Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörler pH ya da tek değerlikli iyonlara duyarlı

cam elektrotlar, anyon ya da katyonlara duyarlı iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz algılayan elektrotlardır.

1.3.2. Yarı iletken temelli biyosensörler

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

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

1.3.3. Optik temelli biyosensörler

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

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

1.3.4. Piezoelektrik temelli biyosensörler

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

1.3.5. Kalorimetri temelli biyosensörler

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

1.4. Bu Tez Kapsamında Kullanılan Biyoaktif Tabaka Bileşenleri

1.4.1. Glukoz oksidaz

Glukoz oksidaz immobilize enzim biyosensörlerinin hazırlanmasında oldukça tercih edilen bir enzimdir. Glukoz oksidaz oksijen varlığında glukozu glukonalakton ve hidrojen peroksit'e çevirir. Enzimatik olarak üretilen hidrojen peroksitin elektrokimyasal tayiniyle glukoz miktarına ulaşılabilir. (Cui et al., 2013; C. Wu et al., 2015)

Glukoza spesifikliğı geniş pH ve sıcaklık aralığındaki yüksek aktivitesi nedeniyle biyosensör çalışmalarında tercih sebebidir. Fabrikasyon ve depolama süreci boyunca bu ekstrem koşullara dayanıklılığı ve gösterdiği yüksek aktivite enzimi öne çıkarmaktadır. (Wang et al., 2013)

1.4.2. Jelatin

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

ısıtıldıktan sonra oda sıcaklığına getirildiğinde jel kıvamını alır. Bu özelliğinden dolayı iyi ve kolay kullanılabilir bir immobilizasyon malzemesidir.

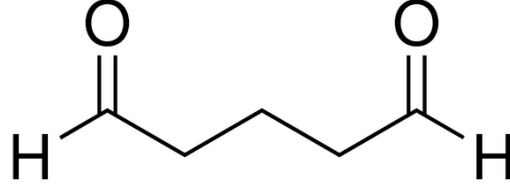
Jelatin eğer biyomalzeme olarak kullanılmak isteniyorsa çapraz bağlı olması şarttır. Son zamanlarda jelatin filminin çapraz bağları fiziksel olarak termal ısı ve ultraviyole ışınlar yardımıyla oluşturulmakta, kimyasal olarak ise formaldehit, glutaraldehit, suda çözünen karbodiimid, diepoksi bileşenleri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

1.4.4. Glutaraldehit

Glutaraldehit tıpta özellikle sisteskop ,bronkoskop, endoskop gibi lensli aletlerin sterilizasyonunda sıkça kullanılan renksiz, sıvı bir dezenfektan ve sterilizasyon kimyasalıdır. Aynı zamanda elektron mikroskoplarında sabitleyici olarak da kullanılmaktadır (Toxicity, 2000).

Glutaraldehit özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan homo bifonksiyonel bir kimyasaldır. Homo bifonksiyonel maddeler, proteindeki lizin kalıntısının amino grupları gibi primer aminlerle seçici olarak etkileşime girerler. Suda ve benzen, alkol gibi susuz ortamlarda kararlı ve çözünebilir olması nedeniyle kullanımları çok yaygındır (Kapoor, 1996)

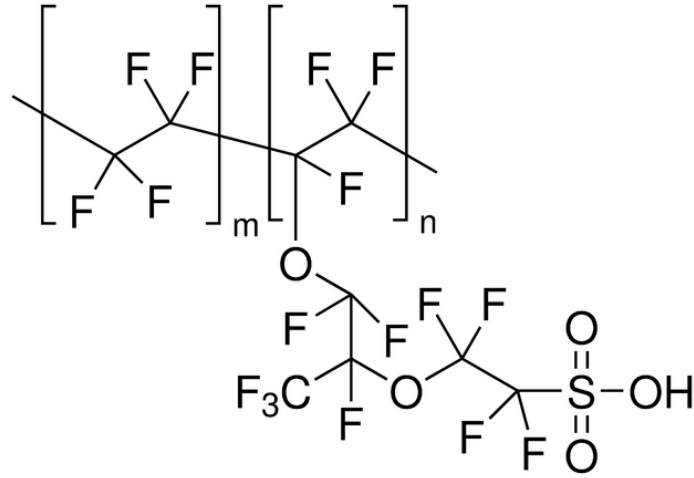
Glutaraldehit, içerdiği iki aktif aldehit grubu ile biyosensör geliştirilmesinde kullanılan enzim, mikroorganizma ve doku kesitleri gibi biyolojik bileşenlerin, kitosan, kolajen, jelatin ve karragenan gibi biyolojik matriks moleküllerinin polimerleri üzerindeki $-NH_2$ gibi gruplarla H_2O çıkararak birleşir ve iki polimer zincirini birbirine çapraz bağlar. Bu esasa dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça sık kullanılmaktadır (Sezgintürk and Dinçkaya, 2005). Yöntem kolay uygulanabilir olup genellikle sistemin termal, işlem ve depo kararlılıklarını da arttırmaktadır.



Şekil 1.2. Glutaraldehitin Haworth gösterimi

1.4.5. Nafyon

Nafyon sülfonatlı perflorlanmış anyonik bir polielektrolittir. Son yıllarda redoks polimer modifiyeli elektrotların kullanımının yaygınlaşması, kolay hazırlanabilme, iyi elektriksel iletkenlik ve birçok redoks çifti için yüksek partitasyon katsayısına sahip olmasından dolayı nafyon önem kazanmıştır. Nafyon filmler genellikle elektrot modifikasyonunda ve biyosensör hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (Chae et al., 2008; Y. Wu et al., 2015)(“Employing film as,” 1995)



Şekil 1.3. Nafyonun formülü

1.5. Kalem Grafit Elektrot ile Önceki Çalışmalar

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

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

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

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

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

Doğan, Topal ve Özkan (2011), kalem grafit elektrot kullanarak çift sarmallı DNA ile anti kanser ilaç olan fulvestrantın etkileşimini diferansiyel puls voltametri yöntemi kullanarak incelemişlerdir. Guaninin oksidasyon sinyallerinin

yoğunluğundaki azalma temelli etkileşim mekanizması fulvestrant'ın hassas belirlenmesi için bir gösterge olarak kullanılmıştır.

2.MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Cihaz ve diğer ekipmanlar

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

- Lauda RE 120 soğutmalı sirkülatör
- IKA-KIMO 2 manyetik karıştırıcı
- Denver Instrument analitik terazi
- Hanna Instruments HI 221 pHmetre
- Micro 0,5 mekanik kalem
- Magnum 0,5 grafit uç

2.1.2. Kimyasallar

Deneysel çalışmalar için temin edilen kimyasallar:

- Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Sigma-Aldrich)
- Glutaraldehit (Sigma)
- Jelatin (Sigma)
- Nafyon (%5'lik) (Sigma)
- Glukoz ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (Sigma)
- Glukoz Oksidaz (Sigma)
- Sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma-Aldrich)
- Sodyum klorür(NaCl) (Sigma-Aldrich)
- Magnezyum klorür(MgCl_2) (Sigma)
- Potasyum klorür(KCl) (Sigma)
- Üre ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) (Sigma)
- Tris ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) (Sigma)
- Tribütirin (Sigma)

- Ürik asit (C₅H₄N₄O₃) (Sigma)
- Askorbik asit (C₆H₈O₆) (Sigma)

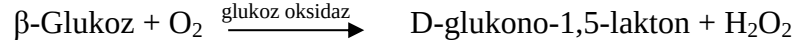
Deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltiler:

- 50 mM, 75 mM ve 100 mM potasyum fosfat tamponları (pH: 6,5-7,0-7,5-8,0)
- Glukoz oksidaz (22,500 U/mL)
- 10 mM glukoz çözeltisi
- %2,5'luk glutaraldehit
- %1-%1,5-%2'lik nafyon (50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde)

2.2. Metot

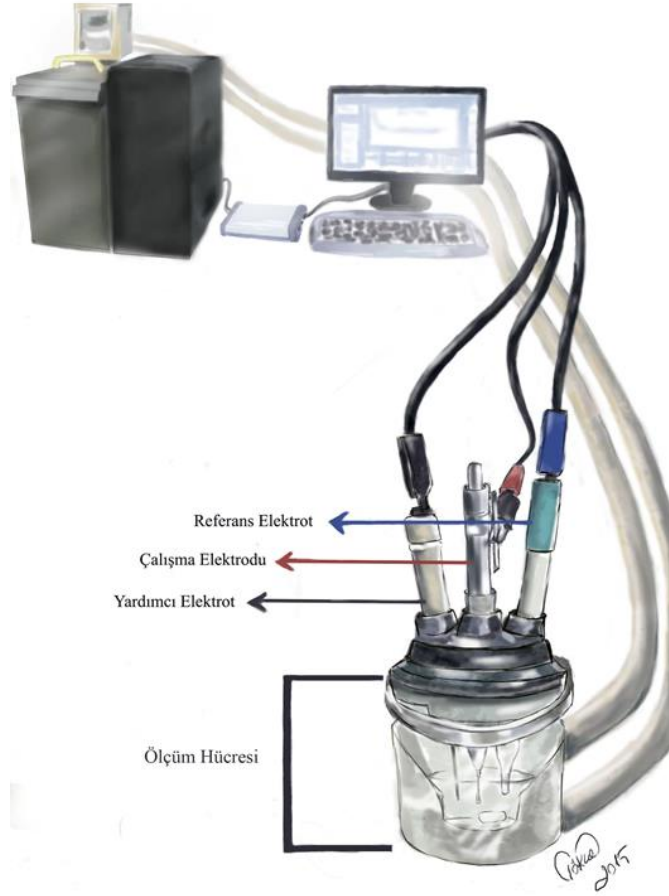
2.2.1. Geliştirilen biyosensörlerin çalışma ilkesi

Hazırlanan biyosensörün çalışma ilkesi; glukoz oksidaz tarafından katalizlenen aşağıdaki reaksiyon uyarınca tüketilen oksijenin izlenmesini esas alır. Bu kapsamda gerçekleştirilen amperometrik ölçümler -0,7 V'da yapılmıştır.

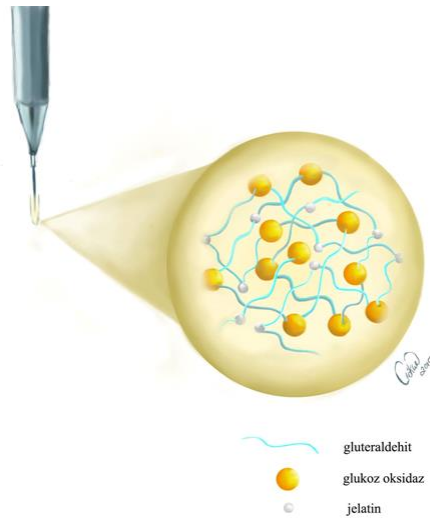


2.2.2. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün hazırlanması

Kalem grafit elektrot (PGE) grafit kısmı 1,5 cm dışarıda kalacak şekilde elektrota yerleştirilir. PGE, 1 ml saf su içerisinde 1 mg 22,500 U/mL aktiviteye sahip glukoz oksidaz çözöldü ve 200 µL olacak şekilde porsiyonlandı. 25 mg jelatin içeren 38°C'de hazırlanmış enzim çözeltisine daldırılıp çıkartıldı. Daha sonra 3 dakika % 2,5'lük glutaraldehite daldırıldı. Enzim ve glutaraldehit çözeltisine daldırma işlemi 5 kez tekrar edildi. Hazırlanan modifiye biyosensör kullanılmadığı zamanlarda + 4°C'de saklandı. Şekil 2.1 'de tasarlanan modifiye biyosensörün şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2. 1 Çalışma düzeneği



Şekil 2. 2 PGE/jelatin–glukoz oksidaz /gluteraldehit biyosensörü biyoaktif tabakası

2.2.3. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin optimizasyon çalışmaları

Bu kısımda PGE /jelatin-glukoz oksidaz/ glutaraldehit modifiye biyosensörlerin hazırlanmasına ilişkin parametreler; daldırma sayısı, glutaraldehitte bekletme süresi, enzim miktarı, jelatin miktarı, pH optimizasyon çalışmaları ve hazırlanan biyosensör ile örneklerde glukoz tayinine yönelik metodlara ilişkin bilgiler sunulmuştur.

2.2.3.1. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit biyoaktif tabakalandırma işlem sayısının optimizasyonu

Ölçümler 30°C' de pH 7,5 50 mM fosfat tamponu içerisinde alındı. PGE modifiye biyosensör hazırlanırken öncelikle jelatin içeren enzim çözeltisine daldırıldı, daha sonra glutaraldehitte bekletildi. Bu tabakalandırma işlemi 2 kez, 3 kez ve 5 kez tekrar edilerek işlem sayısının optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.3.2. Glutaraldehitte bekletme süresinin optimizasyonu

Ölçümler 30°C' de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 1,14 U/mL, jelatin miktarı 25 mg olarak sabit tutularak %2,5'luk glutaraldehitte bekletme süresi 3 dakika, 5 dakika ve 7 dakika olarak değiştirilerek glutaraldehitte bekletme süresi optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.3.3. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Ölçümler 30°C' de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Jelatin miktarı 25 mg, % 2,5'luk glutaraldehitte bekletme süresi 3 dakika olarak sabit tutularak enzim miktarı 0,57 U/mL, 0,855 U/mL, 1,14 U/mL, 1,71 U/mL olarak değiştirilerek enzim miktarı optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.3.4. Optimum jelatin miktarının belirlenmesi

Ölçümler 30°C' de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 0,855 U/mL, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika, pH 7,0 ve tampon

konsantrasyonu 100 mM sabit tutularak jelatin miktarı 10 mg, 20 mg ve 30 mg olarak değiştirilerek jelatin miktarı optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.3.5. En uygun tampon türünün belirlenmesi

Ölçümler 30°C' de fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 0,855 U/mL, jelatin miktarı 25 mg, glutaraldehitte bekletme süresi 3 dakika ve pH 7,5 olarak sabit tutularak Tris-HCl, HEPES, KH_2PO_4 ve NaH_2PO_4 tamponlarında denenmiştir.

2.2.3.6. Optimum tampon konsantrasyonunun belirlenmesi

Ölçümler 30°C' de fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 0,855 U/mL, jelatin miktarı 25 mg, glutaraldehitte bekletme süresi 3 dakika ve pH 7,5 olarak sabit tutularak fosfat tamponu konsantrasyonu 25 mM, 50 mM, 75 mM ve 100 mM, olarak değiştirilerek tampon konsantrasyonu optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.3.7. Optimum pH'nın belirlenmesi

Ölçümler 30°C' de 50 mM fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 0,855 U/mL, jelatin miktarı 25 mg, glutaraldehitte bekletme süresi 3 dakika olarak sabit tutularak pH 6; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 olarak değiştirilerek pH optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.3.8. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Ölçümler 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 0,855 U/mL, jelatin miktarı 25 mg, glutaraldehitte bekletme süresi 3 dakika olarak sabit tutularak sıcaklık 30°C, 35°C ve 40°C olarak değiştirilerek sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirildi.

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

2.2.4.1. Glukoz için doğrusal tayin aralığı

Biyosensör 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde 0,855 U/mL enzim 25 mg jelatin içeren enzim çözeltisine daldırıldıktan sonra 3 dakika % 2,5'luk glutaraldehit çözeltisinde bekletilerek hazırlandı. Ölçümler 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde 30°C 'de alındı.

Yapılan denemelerde 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000 μ M glukoz konsantrasyonları için ölçümler alındı.

2.2.4.2. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirliği

Aynı yöntemle PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye dört ayrı biyosensör hazırlandı ve 400 μ M glukoz konsantrasyonuna verdiği cevaplar kıyaslandı. Biyosensörler 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde 0,855 U/mL enzim 25 mg jelatin içeren enzim çözeltisine daldırıldıktan sonra 3 dakika % 2,5'luk glutaraldehit çözeltisinde bekletilerek hazırlandı. Ölçümler 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde 30°C 'de alındı.

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

PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile -0,7 V'ta 400 μ M glukoz için 10 tane ölçüm alındı. Elde edilen verilerden faydalanarak ortalama değer ($\bar{x}$), standart sapma (S.S.), varyasyon katsayısı (%V.K.) hesaplandı.

2.2.4.4. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör yanıtına girişimci etkisi

Ölçümler 30°C' de fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 0,855 U/mL, jelatin miktarı 25 mg, glutaraldehitte bekletme süresi 3 dakika ve pH 7,5 50 mM fosfat tamponu içerisinde hazırlanan biyosensör kullanıldı. Girişimci etkisini

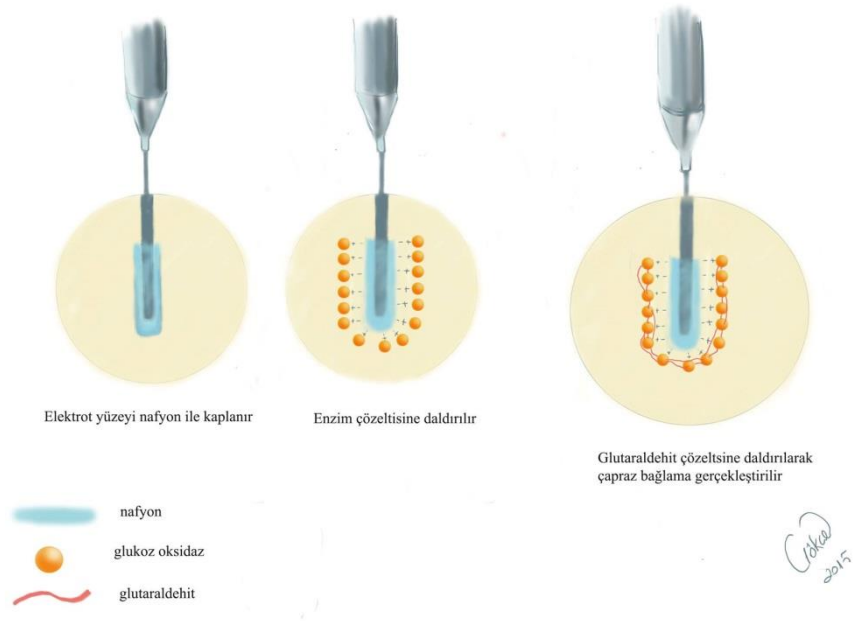
anlamak için substrat olarak kullanılan glukozun yanında askorbik asit,ürük asit ve tribütirin de ortama eklendi.

2.2.4.5. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile sentetik serumda glukoz analizi

Geliştirilen biyosensörle sentetik serum içerisinde glukoz tayini yapılmıştır. Biyosensör 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde 0,855 U/mL enzim 25 mg jelatin içeren enzim çözeltisine daldırıldıktan sonra 3 dakika % 2,5'luk glutaraldehit çözeltisinde bekletilerek hazırlandı. Ölçümler 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde 30°C 'de alındı.

2.2.5. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün hazırlanması ve çalışmaları

Kalem grafit elektrodun (PGE) grafit kısmı 1,5 cm dışarıda kalacak şekilde kalem elektroda yerleştirilir. PGE, 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış nafyon çözeltisine (% 1) 15 dakika daldırılarak bekletildi. PGE/nafyon modifiye elektrot 0,855 U/mL'lik enzim çözeltisi içerisinde 5 dakika daldırıldı. Ardından 5 dakika % 2,5'lük glutaraldehit çözeltisine daldırıldı. İşlemler beşer kez tekrar edildi. Hazırlanan modifiye elektrot kullanılmadığı zamanlarda +4 °C' de saklandı.



Şekil 2. 3 PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye elektrota ait immobilizasyon şeması

2.2.6. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin optimizasyon çalışmaları

Bu kısımda PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörlerin hazırlanmasına ilişkin parametreler; enzim miktarı, tabakalandırma sayısı, nafyon yüzdesi, nafyonda, glutaraldehitte ve enzimde bekletme süresi ile pH optimizasyon çalışmaları ve hazırlanan biyosensörün sentetik serumda glukoz tayinine yönelik metodlara ilişkin yapılan çalışmalara ait bilgiler sunuldu.

2.2.6.1. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Ölçümler 30°C’de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Nafyon yüzdesi %1, nafyonda bekletme süresi 15 dakika, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika olarak sabit tutularak enzim miktarı 0,57 U/mL, 1,14 U/mL, 2,28 U/mL olarak değiştirilerek enzim miktarı optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.6.2. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit biyosensörünün optimum biyoaktif tabakalandırma işlem sayısının belirlenmesi

Ölçümler 30°C’de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. PGE elektrot hazırlanırken öncelikle % 1’lik nafyon çözeltisine 15 dakika daldırıldı. Daha sonra 1,14 U/mL enzim çözeltisinde 5 dakika bekletildi. Ardından % 2,5’luk glutaraldehit çözeltisine 5 dakika daldırıldı. Bu işlem basamakları 3 kez ve 5 kez tekrar edilerek işlem basamağı optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.6.3. Optimum nafyon yüzdesinin belirlenmesi

Ölçümler 30°C’ de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alınmıştır. Enzim miktarı 1,14 U/mL, nafyonda bekletme süresi 15 dakika, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika ve pH 7,5 ve tampon konsantrasyonu 50 mM olarak sabit tutularak nafyon yüzdesi % 0,5, % 1,0, % 1,5, %2 ve % 2,5’ luk olacak şekilde değiştirilerek nafyon yüzdesi optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.6.4. Nafyonda bekletme süresinin optimizasyonu

Ölçümler 30°C’ de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alınmıştır. Enzim miktarı 1,14 U/mL, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika, nafyon yüzdesi %1 ve pH 7,5 tampon konsantrasyonu 50 mM olarak sabit tutularak nafyonda bekletme süresi 10 dakika, 15 dakika ve 20 dakika olacak şekilde değiştirilerek nafyonda bekletme süresi optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.6.5. Glutaraldehitte bekletme süresinin optimizasyonu

Ölçümler 30°C’ de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alınmıştır. Enzim miktarı 1,14 U/mL, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika, nafyon yüzdesi %1,nafyonda bekletme süresi 15 dakika ve pH 7,5 tampon konsantrasyonu 50 mM olarak sabit tutularak glutaraldehitte bekletme süresi 2 dakika, 5 dakika ve 7 dakika olacak şekilde değiştirilerek glutaraldehitte bekletme süresi optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.6.6. Enzimde bekletme süresinin optimizasyonu

Ölçümler 30°C’ de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alınmıştır. Enzim miktarı 1,14 U/mL, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika, nasyon yüzdesi %1, nasyonda bekletme süresi 15 dakika, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika ve pH 7,5 tampon konsantrasyonu 50 mM olarak sabit tutularak enzimde bekletme süresi 3 dakika, 5 dakika ve 7 dakika olacak şekilde değiştirilerek enzimde bekletme süresi optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.6.7. En uygun tampon türünün belirlenmesi

Enzim miktarı 1,14 U/mL, nasyon yüzdesi %1, nasyonda bekletme süresi 15 dakika, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika ve enzimde bekletme süresi 5 dakika olacak şekilde sabit tutularak 50 mM konsantrasyonda pH 7,5’luk HEPES, Tris-HCl, potasyum fosfat ve sodyum fosfat tamponlarında ölçümler alınmıştır.

2.2.6.8. Optimum tampon konsantrasyonunun belirlenmesi

Ölçümler 30°C’ de fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 1,14 U/mL, nasyon yüzdesi % 1, nasyonda bekletme süresi 15 dakika, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika ve pH 7,5 olarak sabit tutularak fosfat tamponu konsantrasyonu 25 mM, 50 mM, 75 mM olarak değiştirilerek tampon konsantrasyonu optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.6.9. Optimum tampon pH’sının belirlenmesi

Ölçümler 30°C’ de fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 1,14 U/mL, enzim bekletme süresi 5 dakika, nasyon yüzdesi % 1, nasyonda bekletme süresi 15 dakika, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika ve 50 mM fosfat tamponu pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 olarak değiştirilerek tampon pH’sının optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.6.10. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Ölçümler 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 1,14 U/mL, nafyonda bekletme süresi 15 dakika, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika, pH 7,5 ve tampon konsantrasyonu 50 mM fosfat tamponu olarak sabit tutularak sıcaklık 30°C, 35°C ve 40°C olacak şekilde değiştirilerek sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.2.7.PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin karakterizasyon çalışmaları

2.2.7.1. Glukoz için doğrusal tayin aralığı

Biyosensör, PGE sırasıyla % 1'lik nafyon çözeltisinde 15 dakika, 1,14 U/mL enzim çözeltisinde 5 dakika, % 2,5'luk glutaraldehit çözeltisinde 5 dakika bekletilerek hazırlandı. Ölçümler 30°C'de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Yapılan denemelerde 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000 μ M glukoz derişimleri için ölçümler alındı.

2.2.7.2. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile alınan yanıtların tekrarlanabilirliği

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

2.2.7.3. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirliği

Aynı yöntemle PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye üç ayrı biyosensör hazırlandı ve 600 μ M glukoz derişimine verdiği cevaplar kıyaslandı. Ölçümler 30°C'de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı.

2.2.7.4. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile sentetik serumda glukoz analizi

Tasarlanan biyosensör ile sentetik serumda glukoz tayini yapılmıştır. Ölçümler 30°C’de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı.

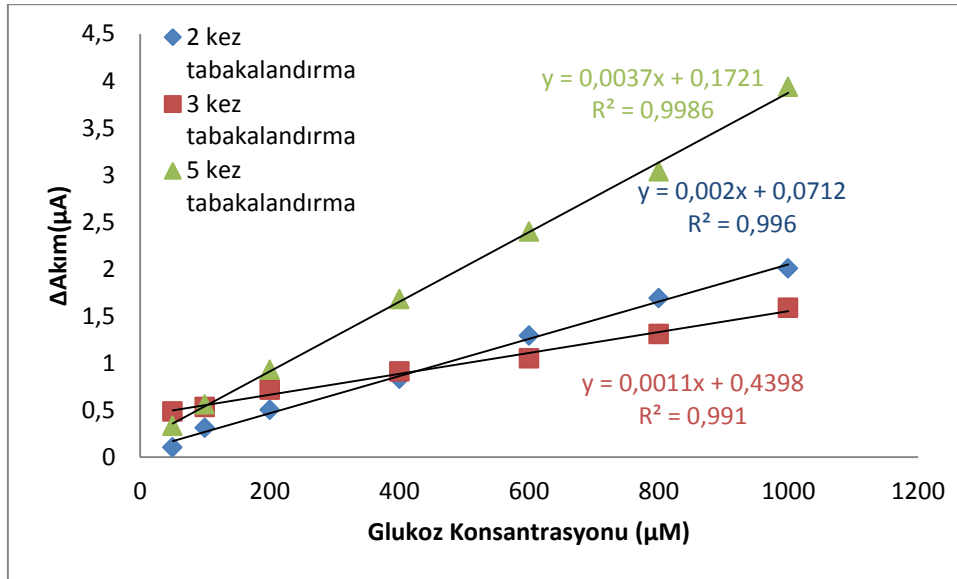
3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

3.1. PGE/Jelatin-Glukoz Oksidaz/Glutaraldehit Modifiye Biyosensörün Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

3.1.1. Tabakalandırma sayısının biyosensör cevabı üzerine etkisi

PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör 1,14 U/mL glukoz oksidaz enzimi çözeltisiyle 20 mg jelatin kullanılarak ve % 2,5 'luk glutaraldehitte 5 dakika bekletilerek hazırlandı. Ölçümler 30°C' de 50 mM, pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı.

PGE elektrot hazırlanırken öncelikle jelatin içeren enzim çözeltisine daldırıldı ve daha sonra glutaraldehitte bekletildi. Bu işlem basamakları 2 kez, 3 kez ve 5 kez tekrar edilerek biyoaktif tabakalandırma işleminin optimizasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen bulgular Şekil 3.1 'de verilmiştir.



Şekil 3. 1. Biyoaktif tabakalandırma işlem sayısının biyosensör cevabına etkisi.(Ölçümler - 0,7 V'ta kromamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,5; 50 mM fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

Grafikten de görüldüğü gibi 5 kez biyoaktif tabakalandırma işlemi en yüksek cevabı vermiştir ve optimum biyoaktif tabakalandırma işlem basamağı 5 kez olarak seçilmiştir.

İki ve üç kez tabakalandırmayla oluşan membran gerek enzim aktivitesi azlığı gerekse reaksiyon sonucu tükenen ve belirlenen tür olan oksijenin dışa difüzyonuna engel olmayacak ölçüde geçirgen olduğu için düşük biyosensör cevabı sergilemiştir.

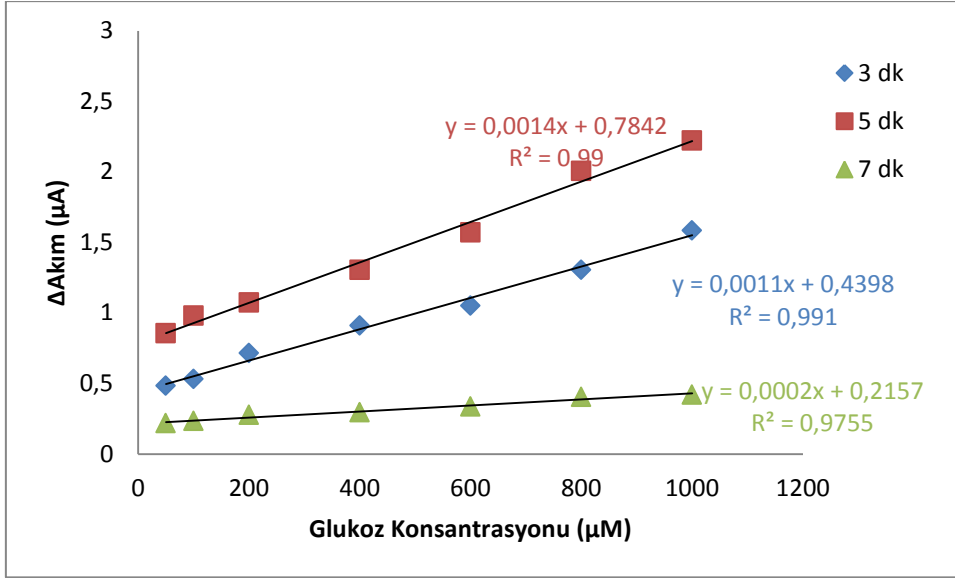
Beş kez tabakalandırmanın üzerine çıkıldığında difüzyon engeli nedeniyle biyosensörden cevap alınamamıştır.

3.1.2. Glutaraldehitte bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi

PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör 1,14 U/mL glukoz oksidaz enzimi çözeltisiyle 20 mg jelatin kullanılarak ve % 2,5'luk glutaraldehitte değişen dakikalarda bekletilerek hazırlandı. Biyoaktif tabakalandırma işlemi 5 kez yapıldı. Ölçümler 30°C' de 50 mM, pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı.

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

Optimum glutaraldehitte bekletme süresini belirlemek için 3 dakika, 5 dakika ve 7 dakika da bekletilerek hazırlanmış üç farklı PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile yapılan denemelerde alınan cevaplara ilişkin grafik Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3. 2 Glutaraldehitte bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.(Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,5; 50 mM fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

Şekil 3.2'den görüldüğü üzere 5 dakika glutaraldehitte bekletilerek hazırlanan PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör diğer modifiye biyosensörlere nazaran daha yüksek cevap vermiştir. Fakat optimum glutaraldehitte bekletme süresi 3 dakika olarak seçilmiştir.

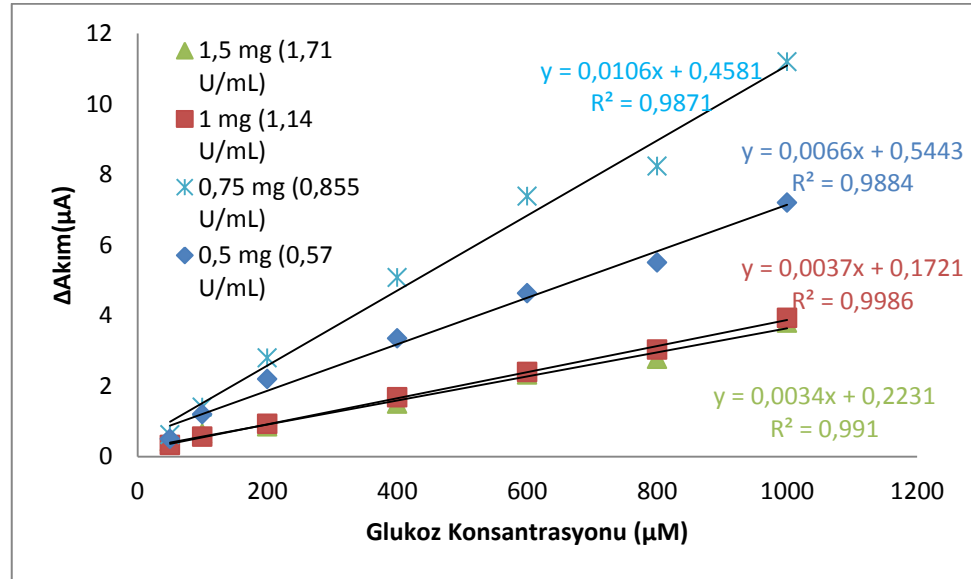
3 dakika bekletme süresinde daha düşük cevap alınması daha az çapraz bağ oluşumu ve meydana gelen membranın daha gözenekli bir yapıya sahip olması nedeniyle ölçülen tür olan oksijenin dışa difüzyonunun kolaylaşması olarak yorumlanabilir. Fakat 5 dakika bekletme süresi tabakalandırma sayısı da düşünülünce oldukça uzun bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyosensör avantajları göz önüne alındığında daha kısa bir süre olan 3 dakika bekletme süresi seçilmiştir.

7 dakikada ise daha düşük bir biyosensör cevabı alınması daha fazla çapraz bağ oluşumu nedeniyle daha az gözenekli bir yapının daha büyük bir substrat difüzyon engeli yaratması şeklinde yorumlanabilir.

3.1.3. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Ölçümler 30°C' de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Jelatin miktarı 20 mg, %2,5'luk glutaraldehitte bekletme süresi 3 dakika olarak sabit tutularak glukoz oksidaz miktarı 0,5 mg (0,57 U/mL), 0,75 mg (0,855 U/mL), 1mg

(1,14 U/mL), 1,5 mg (1.71 U/mL) olarak değiştirilerek enzim miktarı optimizasyonu gerçekleştirildi ve kullanılan glukoz oksidaz enziminin miktarının biyosensör cevabı üzerine olan etkisi belirlendi.(Şekil 3.3)

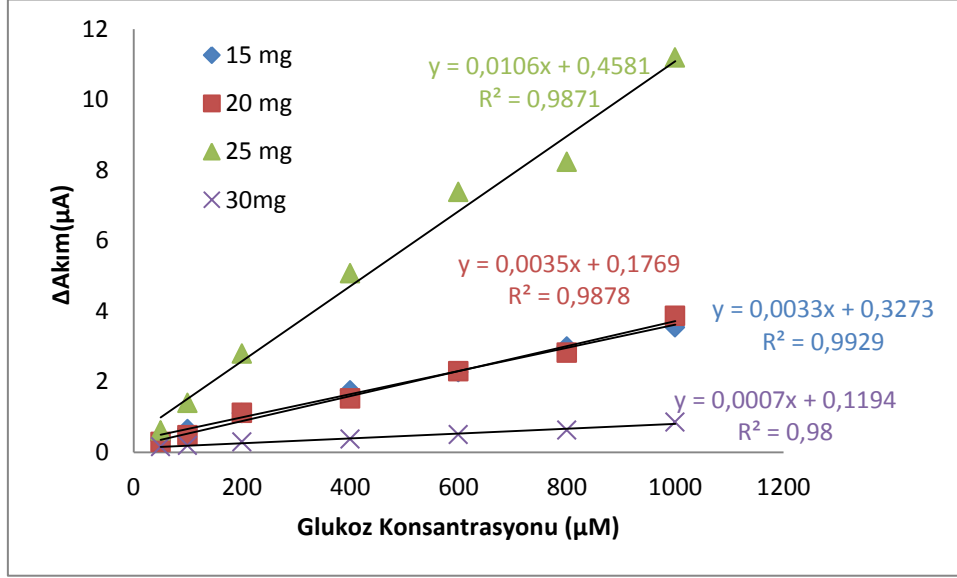


Şekil 3. 3 PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin enzim miktarı optimizasyonu (Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,5 fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

Farklı enzim miktarlarıyla hazırlanan PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörlerden 0,855 U/mL (0,75 mg) aktiviteye sahip enzim kullanılarak hazırlanan biyosensörün cevabı diğerlerine göre belirgin şekilde yüksektir. Bu değer daha üzerindeki enzim miktarlarında biyosensör yanıtının düşmesi protein miktarının artmasıyla birlikte çapraz bağ yüzdesinin ve difüzyon engellinin artması olarak yorumlanabilir. Ayrıca enzim miktarının artmasıyla birlikte tabakadaki protein miktarının çapraz bağ oranında artışa yol açarak teorik olarak yükselen glukoz oksidaz aktivitesinin gerçekte düşmesine de yol açabilir. Söz konusu değerden daha düşük enzim miktarlarına indikçe ise enzim aktivitesinin düşmesinin yanı sıra biyoaktif tabakadaki protein miktarının azalması da gerçekleşir. Bu durum çapraz bağ sayısı oranının düşmesine ve daha gözenekli bir membran oluşumuna yol açar. Sonuçta enzimatik reaksiyon sonucu biyoaktif tabakada oksijenin dış ortamdan difüzyonun kolaylaşması ve PGE yüzeyinde indirgenen oksijen miktarının azalması biyosensör yanıtının düşmesine neden olarak yorumlanabilir.

3.1.4. Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Optimum jelatin miktarını belirlemek için 200 µl jelatinli enzim çözeltisi 15 mg, 20 mg, 25 mg ve 30 mg jelatin içerecek şekilde hazırlandı. Farklı jelatin miktarlarına sahip bu enzim çözeltileri kullanılarak hazırlanan 4 farklı PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile yapılan denemelerde alınan cevapların kıyaslandığı grafik Şekil 3.4' de verilmiştir.



Şekil 3. 4 Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi (Ölçümler -0,7 V'ta kromamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,5;50 mM fosfat tamponu ; 30°C'de gerçekleştirildi.)

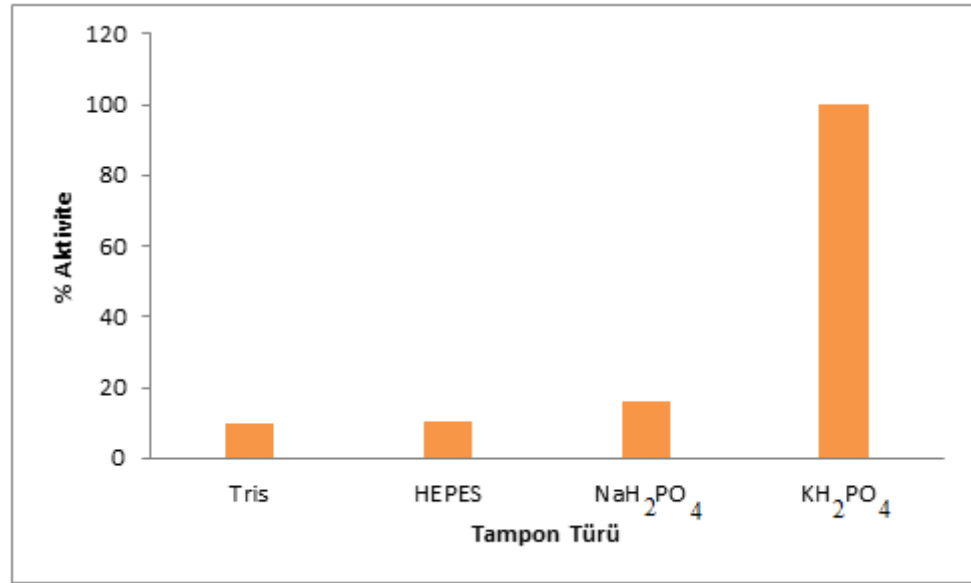
Şekil 3.4'den görüldüğü gibi 25 mg jelatin miktarı optimum olarak belirlendi. Jelatin miktarı 30 mg 'a yükseltildiğinde biyosensör cevabı olarak en düşük değerler elde edilmiştir. Bu sonuç başlıca membran kalınlaşmasının yol açtığı difüzyon engellidir. 15 ve 20 mg jelatin kullanılarak hazırlanan biyosensörün yanıtı 25 mg jelatinle hazırlanan biyosensöre göre oldukça düşüktür.

25 mg jelatin ile hazırlanan biyosensör hem daha kararlı bir biyoaktif tabaka oluşturması hem de glukoz konsantrasyon aralığında daha mükemmel doğrusallık göstermesi bakımından tercih edilmiştir.

3.1.5. Tampon türünün biyosensör cevabı üzerine etkisi

En iyi tampon türünü belirlemek için; enzim miktarı 0,855 U/mL, jelatin miktarı 25 mg, glutaraldehitte bekletme süresi 3 dakika ve pH 7,5 olarak sabit

tutularak hazırlanmış 4 biyosensörle Tris-HCl, HEPES, KH_2PO_4 ve NaH_2PO_4 tamponlarında ölçüm alınmıştır.

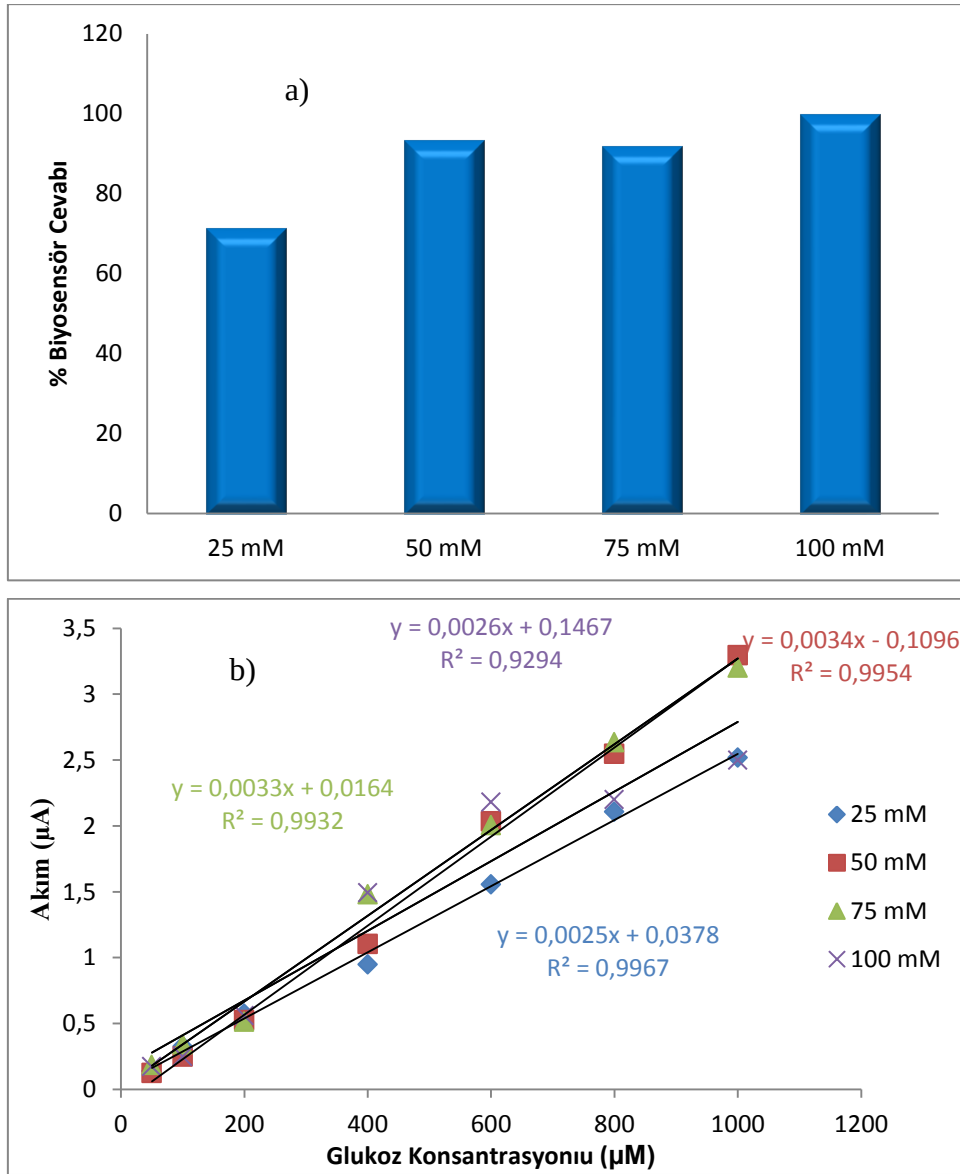


Şekil 3. 5 Tampon türünün biyosensör cevabına etkisi (Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,5; 50 mM fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

Tris ve HEPES tamponlarında biyosensörden alınan cevaplar düşük bulunmuştur. Fakat NaH_2PO_4 tamponu ile KH_2PO_4 tamponları arasında elde edilen biyosensör cevapları arasındaki fark daha net gözlenmektedir. Bunun nedeni iyonların farklı olmasıdır. Potasyum ve sodyum iyonlarının enzimin aktif merkezinde oluşturduğu etkiden dolayı elde edilen biyosensör cevabında farklanma gözlenmiştir.

3.1.6. Tampon konsantrasyonunun optimizasyonu

Enzim miktarı 0,855 U/mL, jelatin miktarı 25 mg, %2,5 'luk glutaraldehitte bekletme süresi 3 dakika ve pH 7,5 olarak sabit tutularak fosfat tamponu konsantrasyonu 25 mM, 50 mM, 75 mM ve 100 mM, olarak değiştirilerek tampon konsantrasyonu optimizasyonu gerçekleştirildi. İlgili grafik Şekil 3.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 3. 6 Tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi. (Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,5 fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.) a) 400 µM da alınan ölçümlerin % biyosensör cevapları b) Farklı konsantrasyonlardaki doğrusal grafikler

Elde edilen grafik sonuçlarına bakıldığında tampon konsantrasyonunun değiştirilmesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi gözlenmektedir. Tampon konsantrasyonu 50 mM ve 75 mM olduğunda alınan biyosensör cevapları birbirine oldukça yakındır.

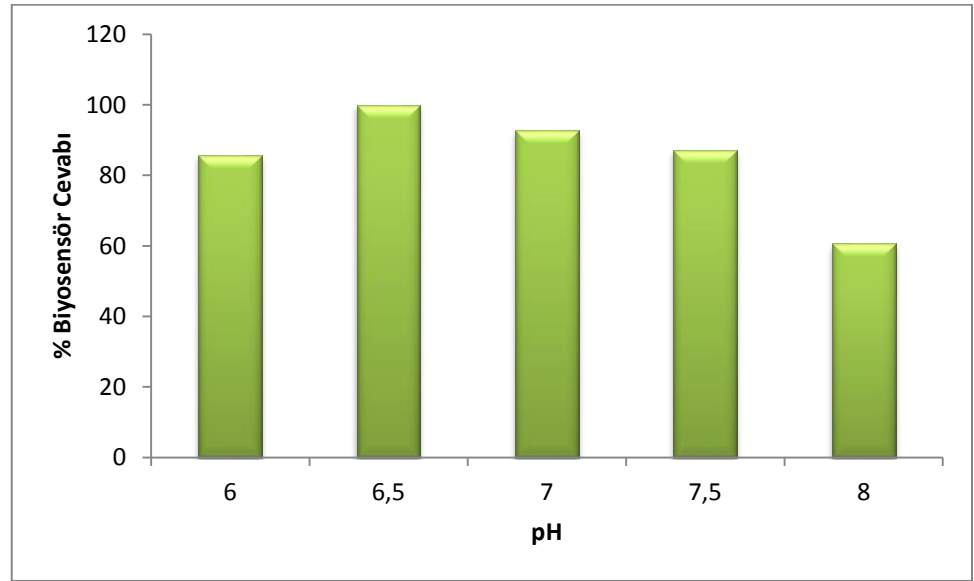
100 mM lık tampon konsantrasyonunda biraz daha yüksek cevaplar elde edilmiştir. Fakat bu konsantrasyondaki tamponla çizilen doğrusal grafikde sapmalar gözleendiği için ve iyon şiddetinin enzim aktivitesi üzerindeki olumsuz etkisini minimuma indirmek için 50 mM lık tampon konsantrasyonu 75 mM ile

kıyaslandığında tercih sebebidir. Çalışma tampon konsantrasyonu olarak 50 mM fosfat tamponu seçilmiştir.

3.1.7. Tampon pH'sının optimizasyonu

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

PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör 0,855 U/mL glukoz oksidaz enzimi çözeltisiyle 25 mg jelatin kullanılarak ve %2,5'luk glutaraldehitte 3 dakika bekletilerek hazırlandı. Ölçümler 30°C' de 50 mM fosfat tamponu içerisinde alınmıştır. Enzim miktarı, jelatin miktarı, glutaraldehitte bekletme süresi sabit tutularak pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 olarak değiştirilerek ölçümler alındı ve optimum pH 7,5 olarak belirlendi. İlgili grafik Şekil 3.7'de verilmiştir.



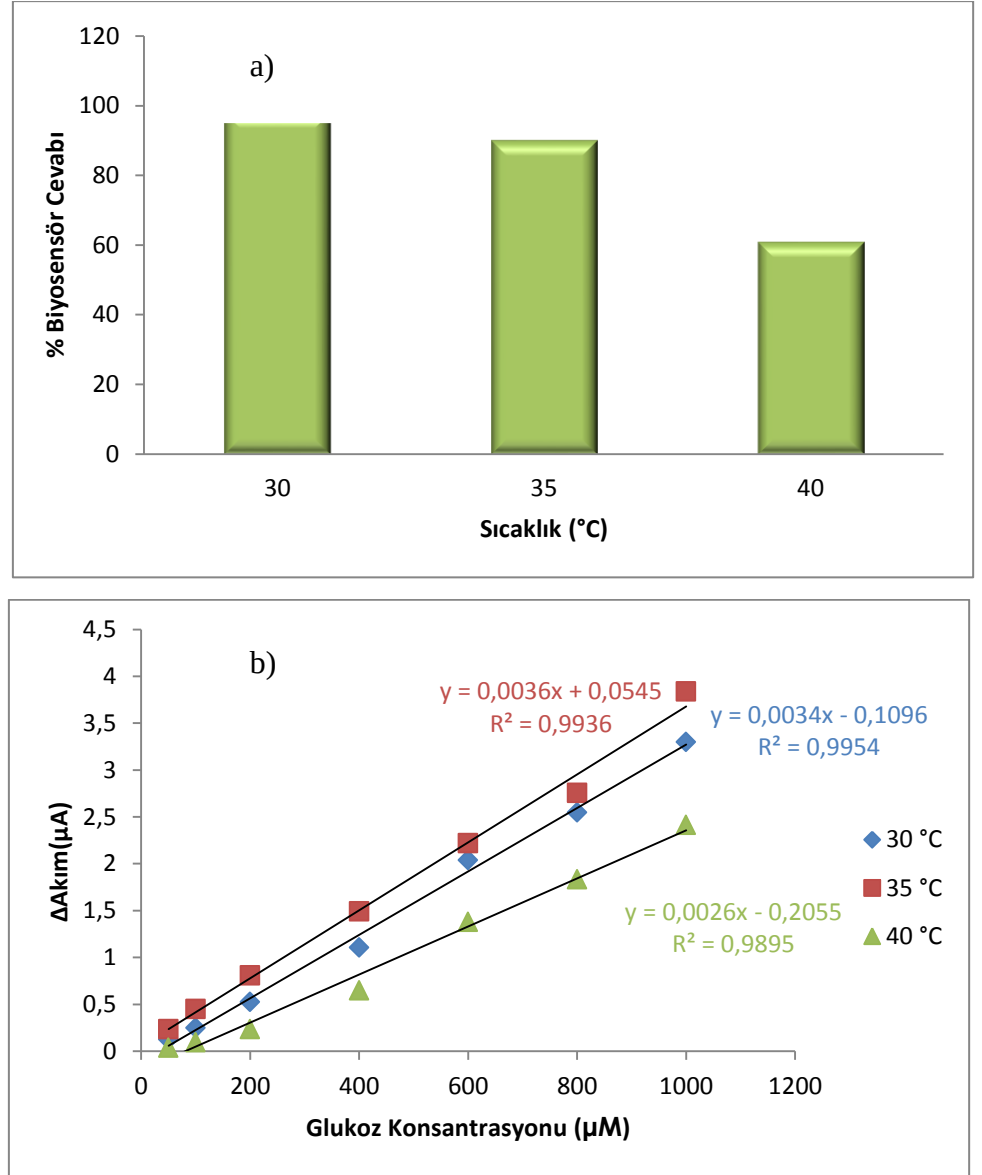
Şekil 3. 7 Biyosensör cevabına pH'nın etkisi. (Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

pH 6,5 'da en yüksek aktivite gözlenmesine rağmen pH 7,5 seçilmiştir. Çünkü biyosensörün dayanıklılığı ve kararlılığı açısından bu pH daha uygun bulunmuştur. pH 6,5 ve pH 7,5 arasındaki rölatif aktivite farkı oldukça azdır.

3.1.8. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Ölçümler 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 1,14 U/mL, nasyonda bekletme süresi 15 dakika, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika, pH 7,5 ve tampon konsantrasyonu 50 mM fosfat tamponu olarak sabit tutularak sıcaklık 30°C, 35°C ve 40°C olacak şekilde değiştirilerek sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirildi.

PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör 0,855 U/mL glukoz oksidaz enzimi çözeltisiyle 25 mg jelatin kullanılarak ve % 2,5'luk glutaraldehitte 3 dakika bekletilerek hazırlandı. Biyoaktif tabakalandırma işlemi 5 kez yapıldı. Ölçümler değişen sıcaklıklarda 50 mM, pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Elde edilen bulgular Şekil 3.8'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 8 a) Biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisi.(600 μM glukoz için)

b) Biyosensörün doğrusal tayin aralığına sıcaklığın etkisi.

(Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,5; 50 mM fosfat tamponunda gerçekleştirildi.)

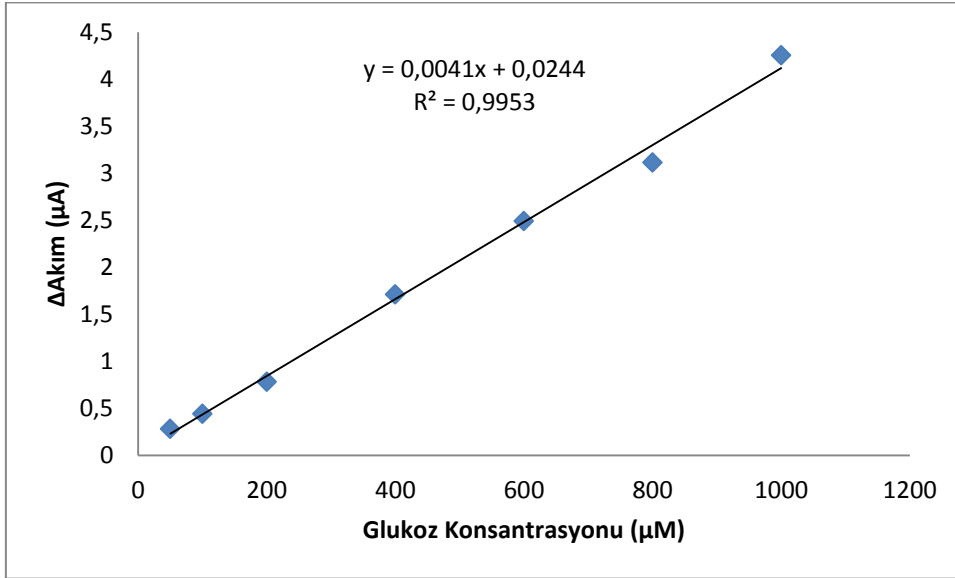
Glukoz tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik çalışmalarda 30–40 °C'de düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile ölçümler alınarak akım farkı değerleri ölçülmüştür. Yapılan denemeler sonucunda sıcaklık ve biyosensör cevabı arasında oluşturulan grafikten optimum sıcaklık 35 °C'olarak bulunmuştur. 30°C ile 35°C'lerde çizilen doğrusal grafiklerde önemli bir fark görülmemekle birlikte 30°C'de çizilen grafiğin R^2 değeri 35°C'dekinden daha iyi

bulunduğu ve kararlılık açısından daha düşük sıcaklık olması nedeniyle çalışma sıcaklığı olarak 30 °C ile devam edilmesine karar verilmiştir.

3.2. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin karakterizasyon çalışmaları

3.2.1. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün doğrusal tayin aralığı

Geliştirilen PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit biyosensörlerinin hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrasında, karakterizasyonu amacıyla glukoz için ölçüm aralığı belirlendi. Şekil 10'da 50 µM - 1000 µM arası amperometrik ölçümler ile elde edilmiş doğrusal tayin aralığı verilmiştir.

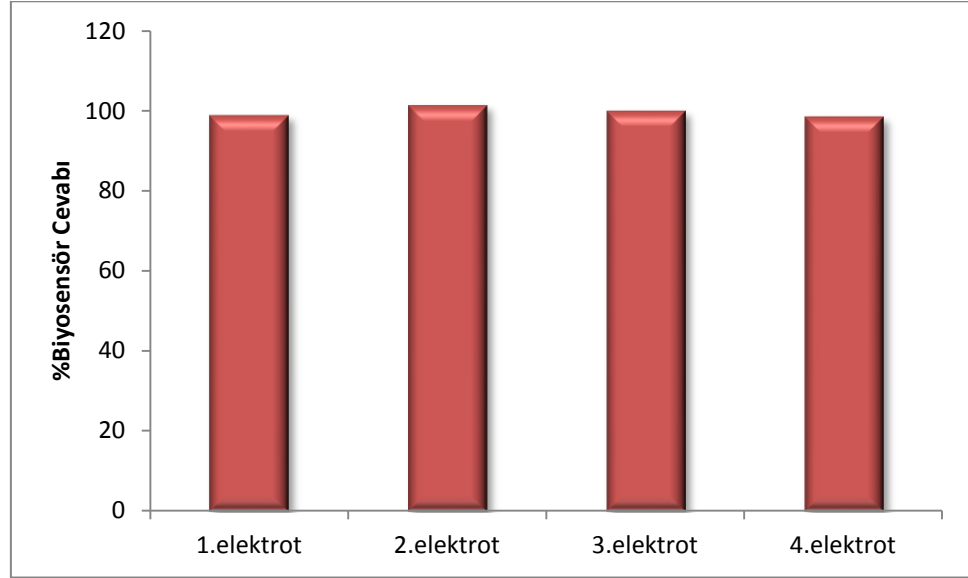


Şekil 3. 9 PGE/Jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit biyosensörüne ait doğrusal tayin aralığı grafiği. (Ölçümler -0,7 V'ta krontamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,5 fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

25 µM – 1250 µM glukoz konsantrasyon aralığında 25; 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000; 1250 µM glukoz konsantrasyonları için yapılan ölçümlerde doğrusal tayin aralığının 50 µM – 1000 µM glukoz konsantrasyon aralığında olduğu belirlenmiştir. Daha yüksek glukoz konsantrasyonları kullanıldığında doğrusallıktan sapmalar gözlenmiştir.

3.2.2. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün tekrar üretilebilirliğine ilişkin bulgular

Bu kısımda yapılan çalışmalara ilişkin olarak aynı yöntemle PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye dört ayrı elektrot hazırlanmış ve 400 μ M glukoz derişimine verdiği cevaplar kıyaslandı. Bulgular Şekil 3.10'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 10 PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirliği. (Ölçümler -0,7 V'ta krontamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,5; 50 mM fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

Şekil 3.10'da görüleceği üzere aynı yöntemle tekrar hazırlanan biyosensörlerin cevapları arasındaki fark %1 - 2 arasında değişmektedir. Bu sonuç çok iyi bir netice olarak değerlendirildi.

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

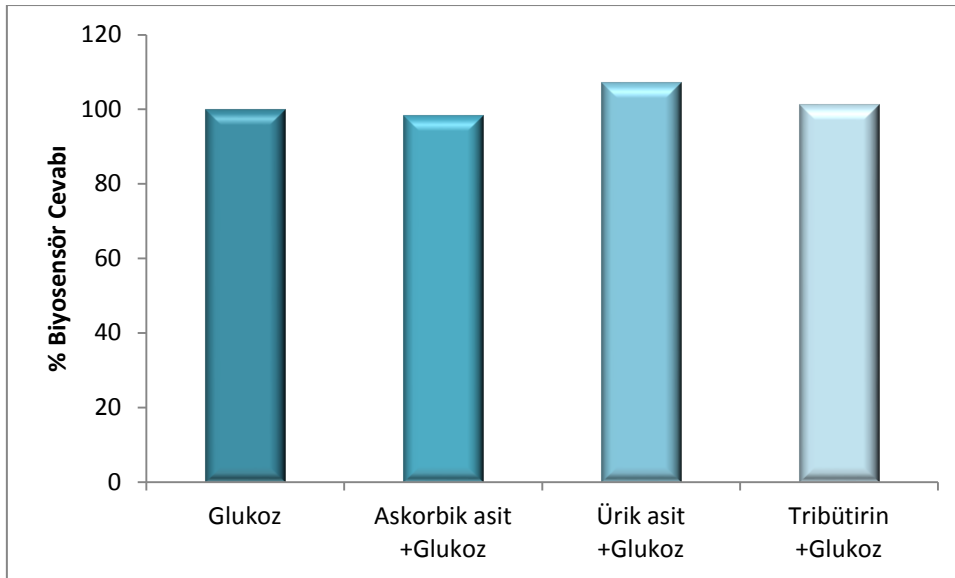
Bu çalışmada hazırlanan glukoz biyosensörünün tekrarlanabilirliği incelendi. Ölçüm hücresi içerisinde 400 μ M glukoz olacak şekilde eklemeler yapılarak -0,7V'ta krontamperometri yöntemle ölçümler alındı. 10 kez tekrar edilen ölçümler için çizilen standart grafik yardımıyla örnek derişimleri saptandı. Ortalama değer ($\bar{x}$), standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayısı (% V.K.) Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelge 1'den görüldüğü gibi sonuçlar kabul edilebilir sınırlar içindedir.

Çizelge 1 PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik bulguları

Aritmetik Ortalama (μM)	Standart Sapma (S.S.)	Varyasyon Katsayısı (%)
402,3 (μM)	$\pm 0,129(\mu\text{M})$	0,167

3.2.4. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörüne girişimci etkisi

Enzim miktarı 1,14 U/mL, jelatin miktarı 25 mg, glutaraldehitte bekletme süresi 3 dakika ve pH 7,5 50 mM fosfat tamponu içerisinde hazırlanan biyosensör kullanılarak girişimci etkisi belirlendi. Bunu anlamak için substrat olarak kullanılan glukozun yanında askorbik asit, ürik asit ve tribütirin de ortama eklenerek ölçüm alındı.



Şekil 3.11 PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöründe girişim etkisi.

(Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,5; 50 mM fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

Girişimci etkisi incelendiğinde askorbik asitin aktivitede düşüşe yol açtığı gözlenirken; ürik asit ve tribütirinin aktivite de artışa sebep olduğu gözlenmiştir.

Ortama eklenen askorbik asidin glukoz oksidaz enziminin aktif merkezindeki aminoasitlerin 3 boyutlu yapısında değişikliğe neden olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle enzimin aktivitesinde %1,5'luk bir düşüş gözlenmektedir. Aynı şekilde

ortama eklenen ürik asit ve tribütirinde ise sırasıyla %7,2 ve %1,2 oranında alınan biyosensör cevabında artış gözlenmektedir. Fakat bu değerler ihmal edilebilir düzeylerdedir. Dolayısıyla biyosensör cevabı üzerinde girişimci etkisi göstermedikleri söylenebilir.

3.2.5. PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile sentetik serumda glukoz analizi

Hazırlanan PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye glukoz biyosensör ile hazırlanan sentetik serumda glukoz tayini yapıldı.

Ölçüm hücreinde 150 μ M olacak şekilde yapay serumdan ekleme yapılır. n=5 olacak şekilde ölçüm sonuçları standart grafiği yardımıyla değerlendirilir. Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,5 fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi. Bulgular Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2 PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörle sentetik serumda glukoz analizi

Yapay serum örneğindeki glukoz (μ M)	Biyosensör ile bulunan sonuç (μ M)	% Geri Kazanım
150	150,7	%100,47

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde biyosensör ile alınan yanıtların tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir.

3.3. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin optimizasyon çalışmaları

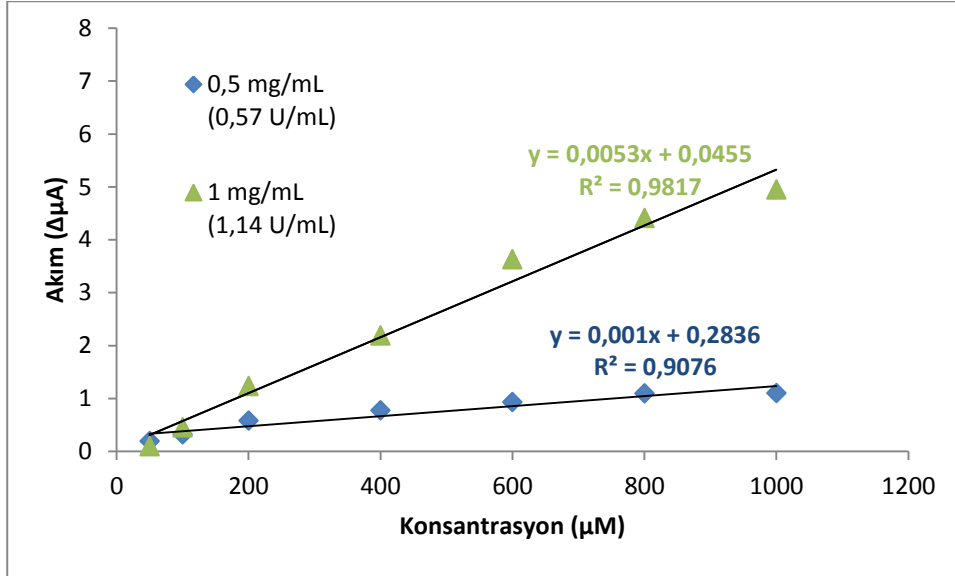
3.3.1. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

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

Ölçümler 30°C'de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alınmıştır. Nafyon yüzdesi, nafyonda bekletme süresi, glutaraldehitte bekletme süresi sabit

tutularak enzim miktarı 0,57 U/mL, 1,14 U/mL, 2,28 U/mL olarak değiştirilerek enzim miktarı optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine olan etkisi Şekil 3.12’de verilmiştir.



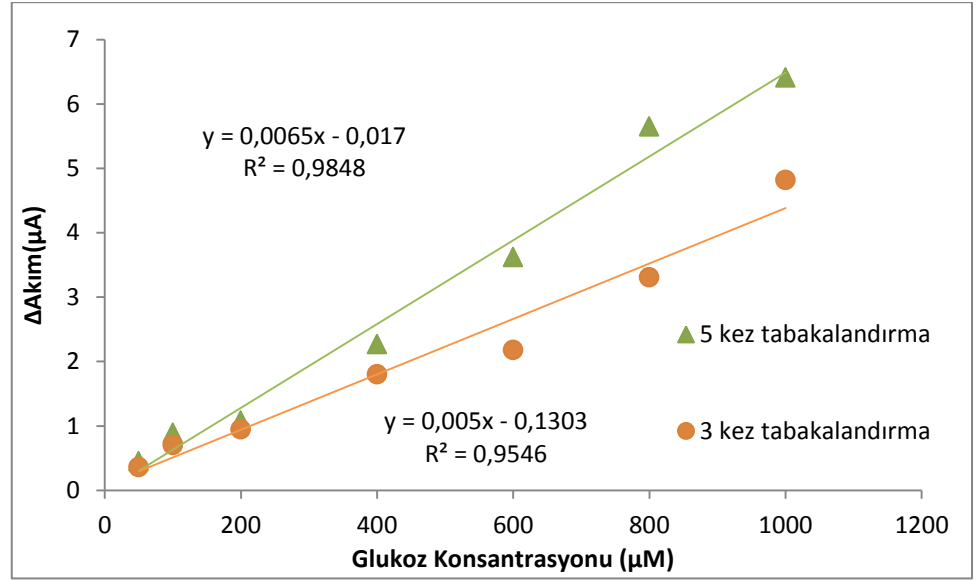
Şekil 3. 12 Glukoz oksidaz miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi. (Ölçümler -0,7 V’ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,5 fosfat tamponu; 30°C’de gerçekleştirildi.)

Farklı enzim miktarlarıyla hazırlanan PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörlerden 1,14 U/mL glukoz oksidaz kullanılarak hazırlanan biyosensörün cevabı 0,57 U/mL glukoz oksidaz kullanılarak hazırlanan biyosensöre göre belirgin şekilde yüksektir. 0,57 U/ ml enzim aktivitesinde aktivite düşüşüne bağlı olarak biyosensör cevabı düşmüştür. 0,57 U/ ml aktiviteye sahip enzim çözeltisinde bulunan protein miktarındaki düşüş nedeniyle nafyon-enzim-glutaraldehit çapraz bağında da azalma meydana gelmektedir. Bu nedenle alınan biyosensör cevaplarında da düşüş gözlenmektedir.

3.3.2. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit biyosensörünün optimum biyoaktif tabakalandırma işlem sayısının belirlenmesi

PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit biyosensörü hazırlanırken öncelikle % 1’lik nafyon çözeltisine 15 dakika daldırıldı. Daha sonra 1,14 U/mL enzim çözeltisinde 5 dakika bekletildi. Ardından % 2,5’luk glutaraldehit çözeltisine 5 dakika daldırıldı. Bu işlem basamakları 3 kez ve 5 kez tekrar edilerek işlem

basamağı optimizasyonu gerçekleştirildi. Ölçümler 30°C’ de 50 mM, pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Elde edilen bulgular Şekil 3.13 ’de verilmiştir.



Şekil 3. 13 Biyoaktif tabakalandırma işlem sayısının biyosensör cevabına etkisi. (Ölçümler - 0,7 V’ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,5; 50 mM fosfat tamponu; 30°C’de gerçekleştirildi.)

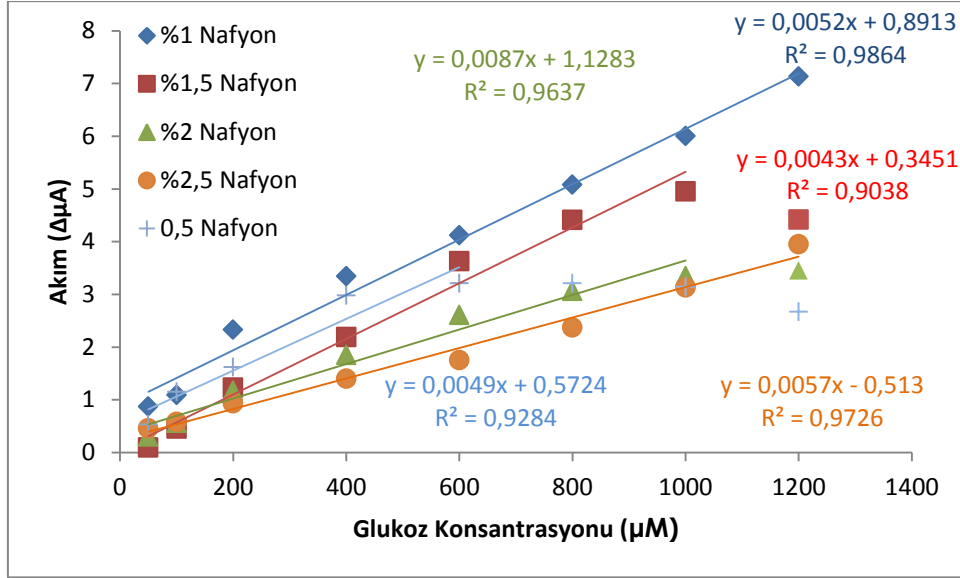
Grafikten de görüldüğü gibi 5 kez biyoaktif tabakalandırma işlemiyle daha yüksek biyosensör cevabı elde edilmiştir ve optimum biyoaktif tabakalandırma işlem basamağı 5 kez olarak seçilmiştir.

Üç kez tabakalandırmayla oluşan membran enzim aktivitesi azlığı sonucu düşük biyosensör cevabı sergilemiştir.

Beş kez tabakalandırmanın üzerine çıkıldığında difüzyon engeli nedeniyle biyosensörden cevap alınamamıştır.

3.3.3. Nafyon yüzdesinin optimizasyonu

Ölçümler 30°C’ de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alınmıştır. Enzim miktarı 1,14 U/mL, nafyonda bekletme süresi 15 dakika, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika ve pH 7,5 ve tampon konsantrasyonu 50 mM olarak sabit tutularak nafyon yüzdesi %0,5, % 1, % 1,5, %2 ve % 2,5’ luk olacak şekilde değiştirilerek nafyon yüzdesi optimizasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Şekil 3.14 de gösterilmektedir.



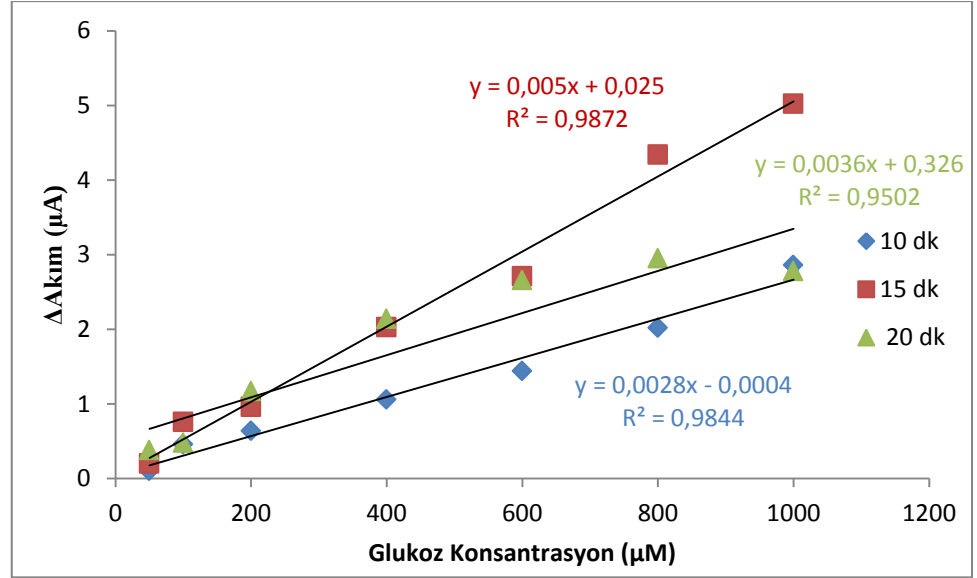
Şekil 3. 14 Nafyon yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi. (Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,5 fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

Şekil 3.14'den görüldüğü gibi %1'lik nafyon ile beş kez nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit tabakalandırma işlemi tekrar edilerek hazırlanmış biyosensör cevabı diğerlerine göre daha yüksektir. Optimum nafyon yüzdesi %1 olarak belirlenmiştir.

Nafyon yüzdesi arttıkça nafyonun yapısında bulunan negatif yüklerden dolayı enzimin immobilizasyonunda sterik engellemeler karşımıza çıkmaktadır. %1'den daha düşük nafyon yüzdesi kullanıldığında ise negatif yüklerin azlığı nedeniyle yeterli miktarda enzim, elektrot yüzeyine immobilize olamamaktadır. Bu nedenle alınan biyosensör cevaplarındaki düşüşe bağlı olarak grafiğe geçilememektedir.

3.3.4. Nafyonda bekletme süresinin optimizasyonu

Ölçümler 30°C' de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alınmıştır. Enzim miktarı 1,14 U/mL, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika, nafyon yüzdesi %1 ve pH 7,5 tampon konsantrasyonu 50 mM olarak sabit tutularak nafyonda bekletme süresi 10 dakika, 15 dakika ve 20 dakika olacak şekilde değiştirilerek nafyonda bekletme süresi optimizasyonu gerçekleştirildi.

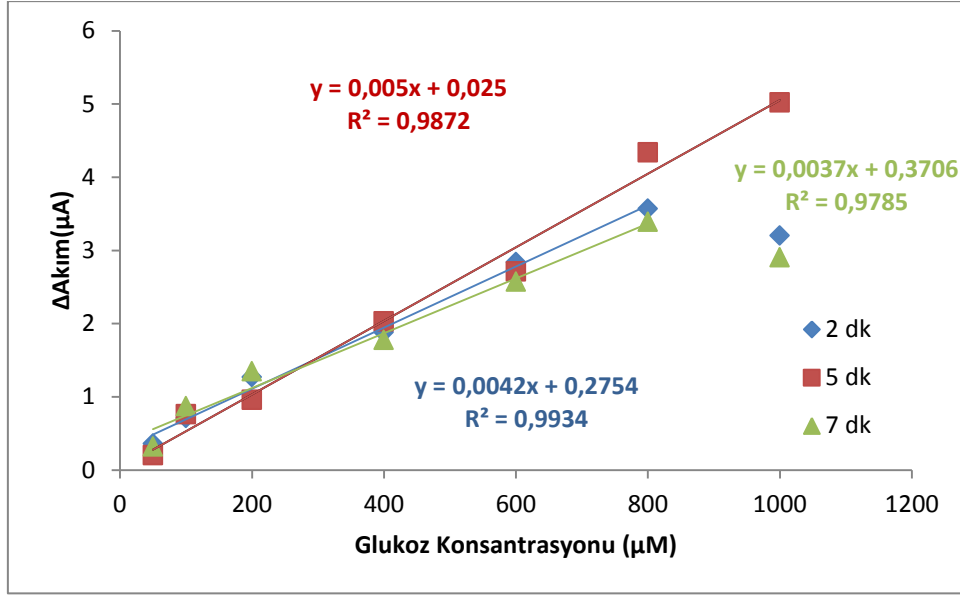


Şekil 3. 15 Nafyonda bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi. (Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,5 fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

%1'lik nafyon içerisinde bekletme süresi arttıkça biyosensörden alınan cevaplarda azalmalar gözlenmektedir. Ayrıca elde edilen cevaplarla çizilen grafiklerde doğrusallıktan sapmalar gözlenmektedir. Bunun nedeni nafyona daha uzun süre maruz kalındığında oluşan enzim-nafyon bağının enzim aktivitesinde düşüşe neden olmasıdır. Dolayısıyla elde edilen grafiğin eğimi ve R^2 'si göz önünde tutularak 15 dakika nafyonda bekletme seçilerek çalışmalara devam edilmiştir.

3.3.5. Glutaraldehitte bekletme süresinin optimizasyonu

Enzim miktarı 1,14 U/mL, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika, nafyon yüzdesi %1, nafyonda bekletme süresi 15 dakika ve pH 7,5 tampon konsantrasyonu 50 mM olarak sabit tutularak glutaraldehitte bekletme süresi 2 dakika, 5 dakika ve 7 dakika olacak şekilde değiştirilerek glutaraldehitte bekletme süresi optimizasyonu gerçekleştirildi. Ölçümler 30°C' de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alınmıştır.

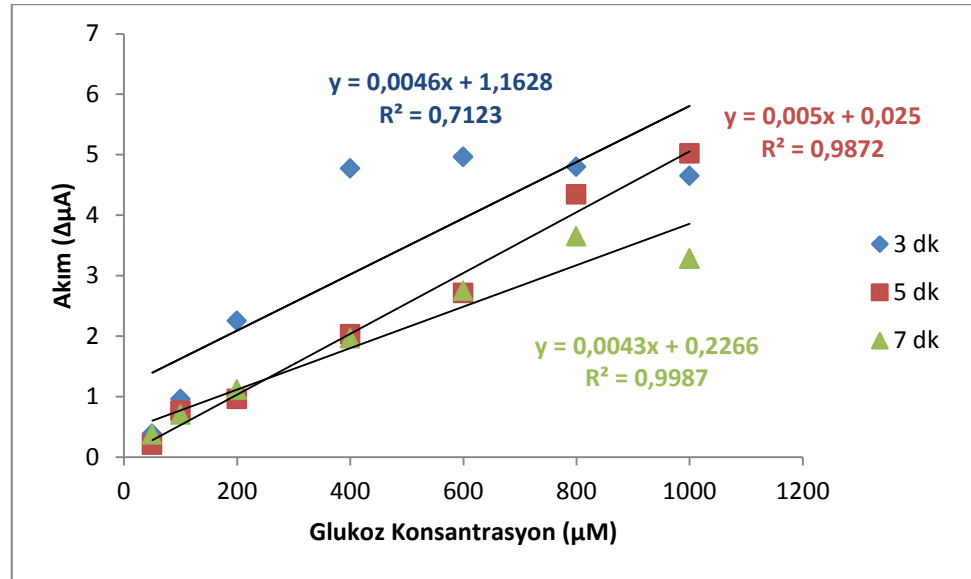


Şekil 3. 16 Glutaraldehitte bekleme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi. (Ölçümler - 0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,5 fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

Şekil 3.16'dan görüleceği üzere en yüksek biyosensör cevabı 5 dakika bekleme sonrasında elde edilmiştir. 7 dakika beklemede daha fazla çapraz bağ ve substrat için daha fazla difüzyon engeli oluşturmuştur. Bu durumda biyosensör cevabında düşme ile sonuçlanmıştır. 2 dakika beklemede ise daha gözenekli ve ince bir membran oluştuğu için aşılabilen difüzyon engeli ortadan kalkmıştır. Fakat daha gözenekli yapı nedeniyle daha hızlı bir difüzyon gerçekleşmektedir ve bu da substratın kaçmasına neden olmaktadır. Bu nedenlerden ötürü glutaraldehitte bekleme süresi 5 dakika olarak belirlenmiştir.

3.3.6. Enzimde bekleme süresinin optimizasyonu

Ölçümler 30°C' de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alınmıştır. Enzim miktarı 1,14 U/mL, glutaraldehitte bekleme süresi 5 dakika, nafyon yüzdesi %1, nafyonda bekleme süresi 15 dakika, glutaraldehitte bekleme süresi 5 dakika ve pH 7,5 tampon konsantrasyonu 50 mM olarak sabit tutularak enzimde bekleme süresi 3 dakika, 5 dakika ve 7 dakika olacak şekilde değiştirilerek enzimde bekleme süresi optimizasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Şekil 3.17'de gösterilmiştir.

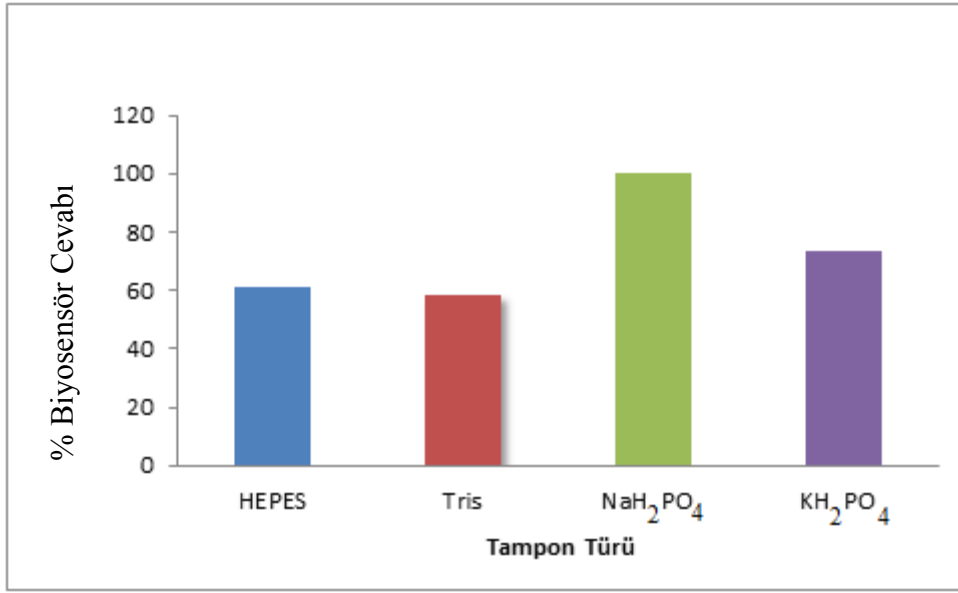


Şekil 3. 17 Enzimde bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisi. (Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,5 fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

Elde edilen grafiğe bakıldığında 3 dakika enzimde bekletme sonucu enzim yeterli miktarda yüzeye tutunamadığı için biyosensör cevaplarının çok fazla saptığı görülmektedir. 7 dakika enzim çözeltisinde bekletme yapılarak alınan ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde ise; daha fazla enzimin yüzeye tutunması sonucu sterik engellemelerin alınan biyosensör cevabında düşüşe neden olduğu görülmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı 5 dakika bekletme süresi seçilmiştir.

3.3.7. Tampon türünün belirlenmesi

Enzim miktarı 1,14 U/mL, nafyon yüzdesi %1, nafyonda bekletme süresi 15 dakika, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika ve enzimde bekletme süresi 5 dakika olacak şekilde sabit tutularak 50 mM konsantrasyonda pH 7,5'luk HEPES, Tris-HCl, potasyum fosfat ve sodyum fosfat tamponlarında ölçümler alınmıştır.



Şekil 3. 18 Tampon türünün biyosensör cevabı üzerine etkisi. (600 μ M glukoz standartı için ölçümler alınmıştır.) (Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,5 fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

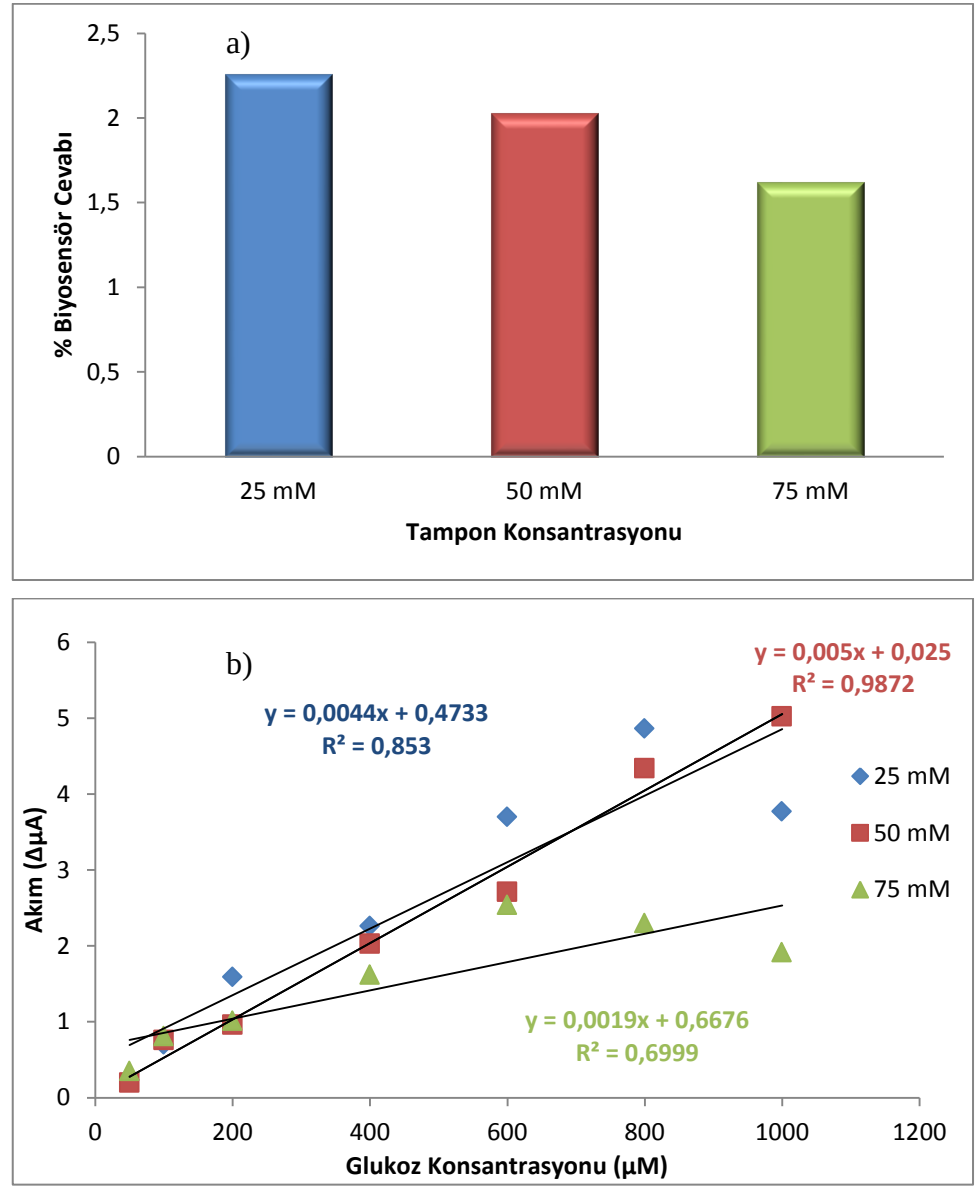
NaH₂PO₄ tamponu kullanıldığında alınan biyosensör cevapları daha yüksek çıkmıştır.

KH₂PO₄, Tris ve HEPES tamponları kullanıldığında ise alınan biyosensör cevapları NaH₂PO₄ tamponu ile elde edilen cevaplara nazaran daha düşük çıkmıştır. Fakat elde edilen cevaplar yüzde aktivite olarak ele alındığında KH₂PO₄ tamponu HEPES ve Tris tamponlarından daha yüksek biyosensör cevabı sağlamıştır. NaH₂PO₄ ve KH₂PO₄ tamponlarının her ikisi de fosfat türevi tamponlar olmasına rağmen elde edilen biyosensör cevaplarında farklılık gözlenmektedir. Bunun sebebi Na ve K iyonlarının yapılarının farklı olması olarak yorumlanabilir. Fakat aradaki farkın çok fazla olmaması ve KH₂PO₄'ün daha ucuz olması ve bizim tayin sonuçlarımız için olumsuzluk teşkil etmemesi nedeniyle KH₂PO₄ çalışma tamponu olarak seçilmiştir.

3.3.8. Tampon konsantrasyonunun optimizasyonu

Ölçümler 30°C'de fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 1,14 U/mL, nasyon yüzdesi % 1, nasyonda bekletme süresi 15 dakika, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika ve pH 7,5 olarak sabit tutularak fosfat tamponu konsantrasyonu 25 mM, 50 mM, 75 mM olarak değiştirilerek tampon

konsantrasyonu optimizasyonu gerçekleştirildi. İlgili grafik Şekil 3.19.'da verilmiştir.



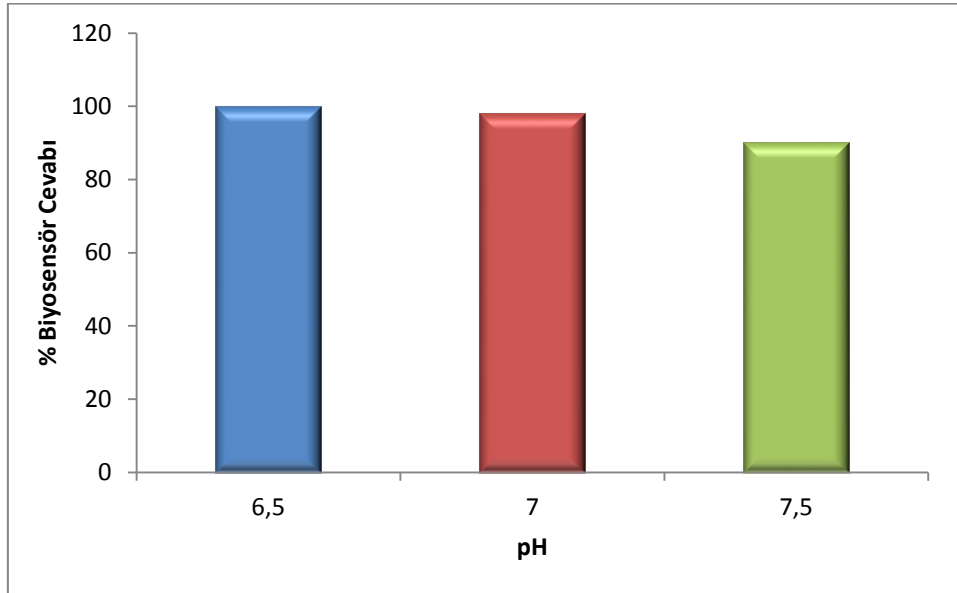
Şekil 3. 19 Tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi. (Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,5 fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.) a)400 μM glukoz konsantrasyonu ile farklı tampon konsantrasyonlarında elde edilen %biyosensör cevapları b)Farklı tampon konsantrasyonlarındaki lineer grafikler

Çeşitli tampon konsantrasyonları denenerek nispeten daha yüksek biyosensör cevaplarının alındığı tampon konsantrasyonunun 25 mM'lık tampon konsantrasyonu olduğu belirlenmiştir. Ancak enzimin bu konsantrasyonda çizilen

doğrusal grafiğinde yüksek konsantrasyonlarda sapmalar gözlenmektedir. Dolayısıyla çok az daha düşük biyosensör yanıtlarının alındığı ancak doğrusal tayin aralığı daha geniş olan bir konsantrasyon olan 50 mM'lık tampon konsantrasyonu seçilmiştir.

3.3.9. Tampon pH'sının optimizasyonu

Tampon pH'nın optimizasyonu için enzim miktarı 1,14 U/mL enzim bekletme süresi 5 dakika, nafyon yüzdesi % 1, nafyonda bekletme süresi 15 dakika, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika olarak sabit tutularak ve 50 mM fosfat tamponu pH 6,5, 7, 7,5 olarak değiştirilerek tampon pH'sının optimizasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Şekil 3.20 'de gösterilmiştir.

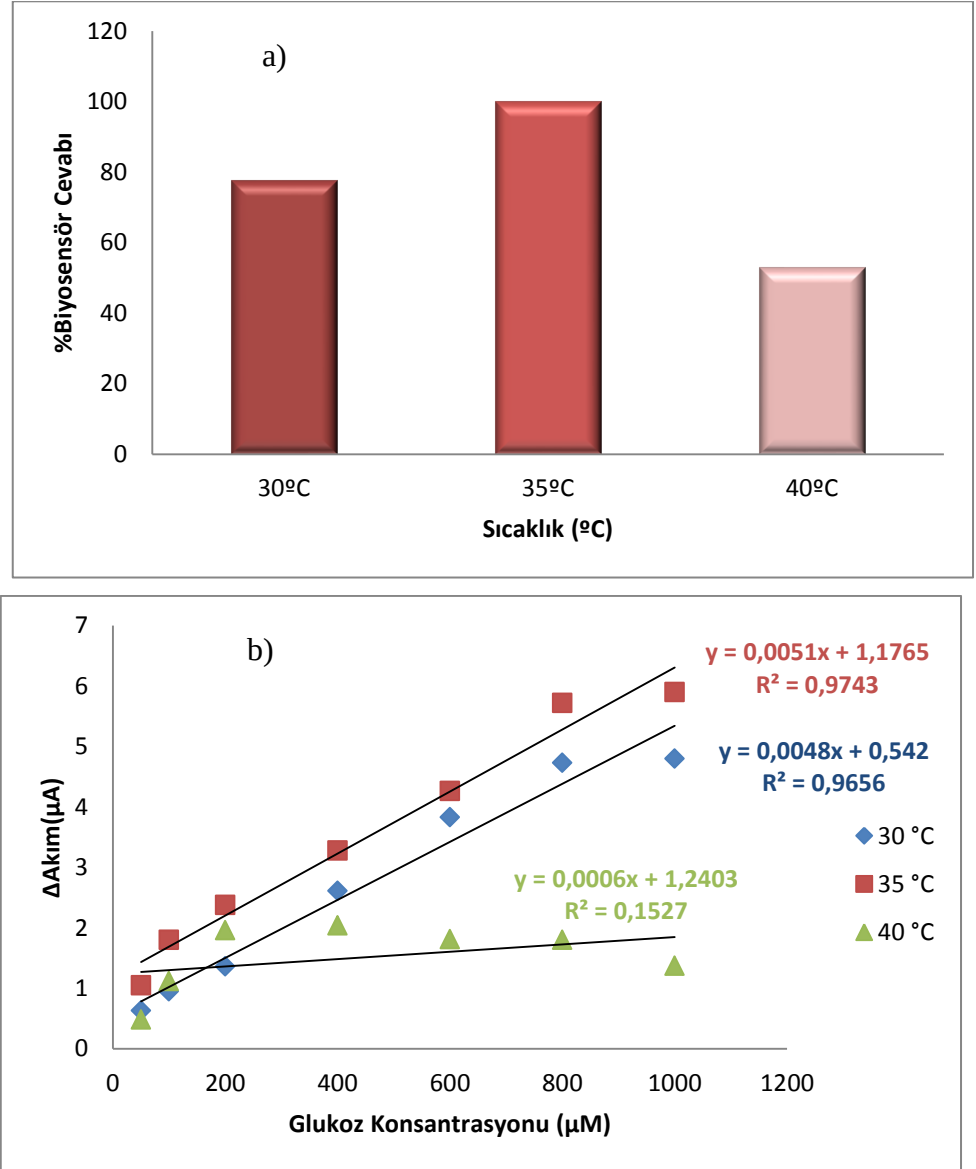


Şekil 3. 20 Biyosensör cevabına pH'nın etkisi. (Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

Grafikten anlaşıldığı üzere optimum pH değeri pH 6,5 olarak bulunmuştur. Ancak pH 6,5; 7 ve 7,5 için elde edilen biyosensör yanıtları birbirlerine oldukça yakındır. Bu nedenle daha önce yapılmış olan biyosensör çalışmaları ile biyosensörün kararlılığı ve dayanıklılığı göz önünde bulundurularak çalışma pH'sı olarak pH 7,5 seçilmiştir.

3.3.10. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Ölçümler 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Enzim miktarı 1,14 U/mL, nasyonda bekletme süresi 15 dakika, glutaraldehitte bekletme süresi 5 dakika, pH 7,5 ve tampon konsantrasyonu 50 mM fosfat tamponu olarak sabit tutularak sıcaklık 30°C, 35°C ve 40°C olacak şekilde değiştirilerek sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirildi. İlgili grafik Şekil 3.21’de verilmiştir.



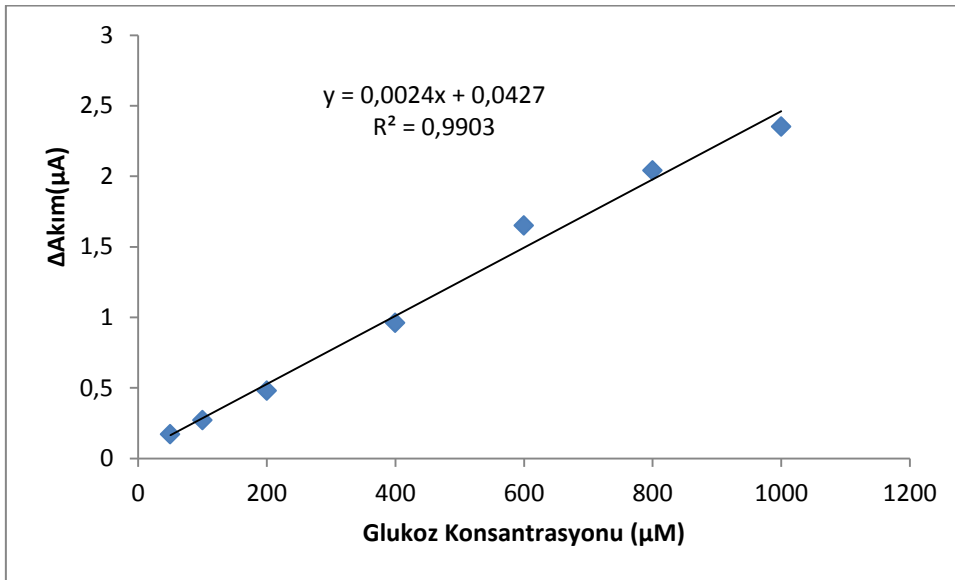
Şekil 3. 21 a) Biyosensör cevabı üzerine sıcaklığın etkisi. **b)** 30 ve 35 °C deki doğrusal tayin aralıklarının karşılaştırılması (Ölçümler -0,7 V’ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,5; 50 mM fosfat tamponunda gerçekleştirildi.) a) 30,35 ve 40 °C lerde alınan % biyosensör cevapları b) 30,35 ve 40 °C lerde çizilen doğrusal grafikler

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde glukoz oksidaz enziminin sıcaklık profiline uygun sonuçlarla karşılaşmıştır. Ancak 40°C 'ye enzimin uzun süre maruz kalması enzimin aktivitesinde düşüşe neden olmaktadır. Bu nedenle daha düşük sıcaklık değerleri olan 30°C ve 35°C lerde ölçümler alınmıştır. Çizilen lineer grafikler incelendiğinde biyosensör cevapları arasındaki farkların birbirine çok yakın olduğu görülmüştür. Daha düşük bir sıcaklıkta çalışmanın daha güvenilir olacağı ve biyosensör ömrünün uzayacağı düşünüldüğü için 30°C çalışma sıcaklığı olarak belirlenmiştir.

3.4.1.PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin karakterizasyon çalışmaları

3.4.1.1. Glukoz için doğrusal tayin aralığı

Biyosensör, PGE sırasıyla % 1'lik nafyon çözeltisinde 15 dakika, 1,14 U/mLenzim çözeltisinde 5 dakika, % 2,5'luk glutaraldehit çözeltisinde 5 dakika bekletilerek hazırlandı. Ölçümler 30°C'de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Yapılan denemelerde 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000 μ M glukoz derişimleri için ölçümler alındı. 50 μ M – 1000 μ M glukoz konsantrasyon aralığında lineer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3. 22 PGE/nafyon-glukoz oksidaz/glutaraldehit biyosensörüne ait doğrusal tayin aralığı grafiği

(Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak 50 mM; pH 7,5 fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

3.4.1.2. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile alınan yanıtların tekrarlanabilirliği

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

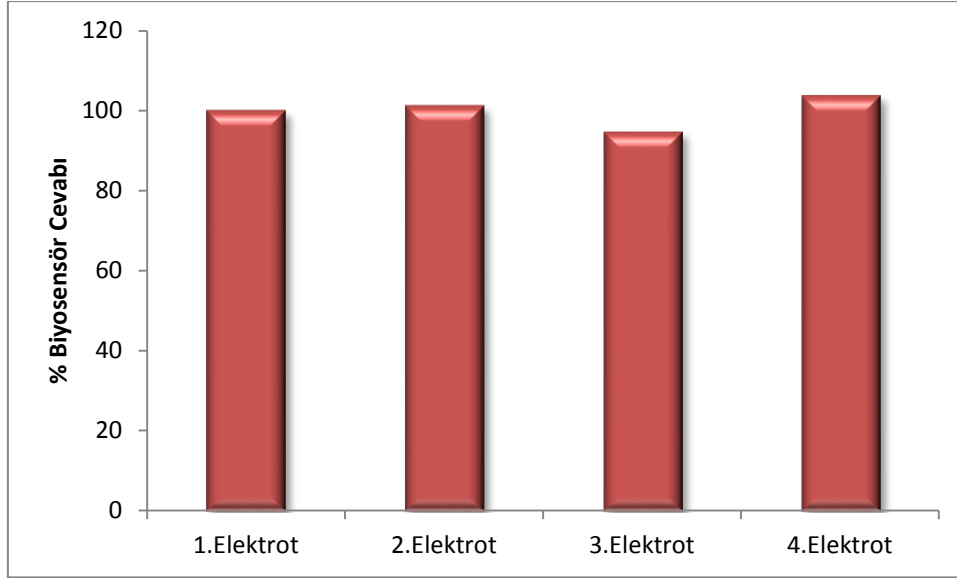
Çizelge 3 PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörünün tekrarlanabilirliği

Aritmetik Ortalama (μM)	Standart Sapma (S.S.) (μM)	Varyasyon Katsayısı (%)
603,148	$\pm 0,192$	0,037

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde biyosensör ile alınan yanıtların tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir.

3.4.1.3. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirliği

Aynı yöntemle PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye üç ayrı biyosensör hazırlandı ve 600 μ M glukoz konsantrasyonuna verdiği cevaplar kıyaslandı. Ölçümler 30°C'de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı.



Şekil 3. 23 PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörün yeniden üretilebilirliği. (Ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometri yöntemi kullanılarak pH 7,5; 50 mM fosfat tamponu; 30°C'de gerçekleştirildi.)

Şekil 3.23'den görüleceği üzere aynı yöntemle tekrar hazırlanan biyosensörlerin cevapları arasındaki fark %1-2 arasında değişmektedir. Bu sonuç çok iyi bir netice olarak belirlenmiştir.

3.4.1.4. PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile sentetik serumda glukoz analizi

Tasarlanan biyosensör ile sentetik serumda glukoz tayini yapılmıştır. Ölçümler 30°C'de 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı.

Çizelge 3.2. PGE/nafyon-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensörle sentetik serumda glukoz analiz bulguları

Yapay serum örneğine katılan glukoz (μM)	Biyosensör ile bulunan sonuç (μM)	% Geri Kazanım
400	400,542	100,136

Elde edilen veriler incelendiğinde 400 μM olan glukoz konsantrasyonu biyosensör tarafından da 400,542 μM olarak bulunmuştur. Bu değer biyosensörün serum içindeki glukoz tayini için çok doğru sonuç verdiğini ifade etmektedir.

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Kalem grafit elektrot (PGE) sıklıkla elektrokimyasal sensör olarak ve DNA etkileşimlerine dayalı biyosensörlerle kullanılmaktadır. Bu çalışmada kalem grafit elektrotla glukoz oksidaz enzimi kullanılarak biyosensör hazırlanmıştır. Kalem grafit elektrotla tasarlanan biyosensör çalışmalarına yeni ve orjinal bir bakış açısı getirilmiştir. Bu çalışma kapsamında glukoz oksidaz enzimi kullanılarak iki farklı biyosensör sistemi tasarlanmıştır.

Oluşturulan biyosensör sistemlerinde kalem grafit elektrot (PGE) yüzeyine glukoz oksidaz enzimi immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve glukoz tayini yapılmıştır. Gerçekleştirilen ilk çalışmada biyosensör sistemini oluşturmak için glukoz oksidaz enzimi jelatin ve glutaraldehit yardımıyla kalem grafit elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir (PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit). Geliştirilen bir diğer biyosensör sisteminde ise kalem grafit elektrot yüzeyine glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu nafyon ve glutaraldehit yardımıyla gerçekleştirilmiştir (PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit). Oluşturulan biyosensör sistemleriyle ölçümler -0,7 V'ta kronoamperometrik metotla yapılmıştır.

Tasarlanan her bir biyosensör için optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışma koşullarının optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde PGE/jelatin-glukoz oksidaz/Glutaraldehit glukoz biyosensörü için çalışma tamponu olarak 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu ve çalışma sıcaklığı olarak 30°C, PGE/nafyon/glujoz oksidaz/glutaraldehit modifiye glukoz biyosensörü için 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu ve çalışma sıcaklığı olarak 30°C belirlenmiştir. Tasarlanan biyosensörler için yapılan karakterizasyon çalışmalarında ise hem PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye glukoz oksidaz biyosensörü için hem de PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye glukoz biyosensörü için doğrusal tayin aralığı 50 µM – 1000 µM olarak belirlenmiştir.

Tasarlanan her bir biyosensör için tekrarlanabilirlik denemelerinde PGE/jelatin-glukoz oksidaz/glutaraldehit modifiye glukoz biyosensörü için (n=10) 400 µM glukoz konsantrasyonunda standart sapma (S.S) = $\pm 0,129$ ve % varyasyon katsayısı (V.K) = 0,167; PGE/nafyon/glukoz oksidaz/glutaraldehit glukoz biyosensörü için (n=10) 600 µM glukoz konsantrasyonunda standart sapma (S.S) =

$\pm 0,191$ ve % varyasyon katsayısı (V.K) = 0,036 olarak bulunmuştur. Ayrıca tasarlanan biyosensörlerle yapay serum örneklerinde glukoz tayini yapılmış gerikazanımlar oldukça yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak bu yüksek lisans tezi kapsamında kalem grafit elektrotların genelde enzim temelli biyosensörler hazırlanmasında özelde ise glukoz tayini için glukoz oksidaz temelli biyosensörler hazırlanmasında bir ilk gerçekleştirilerek özgün bir çalışmayla literatüre önemli bir katkı sağlayacak veriler elde edilmiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Akyılmaz, E. ve Dinçkaya, E.,2000, A mushroom (Agaricus bisporus) tissue homogenate based alcohol oxidase electrode for alcohol determination in serum, Talanta,53,505-509pp.

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.

Arshak K., Mohamed Z, Souna E. and Anthony T.,2008,Principles of bacterial detection:biosensors, recognition receptorsand microsystems, Springer Science and Business Media, New York.

Bartlett, P.N.,1990,Biosensors,(Cass, A.E.G. ed.),Oxford University Press, Oxford, 42pp.

Bergmeyer, J. and Grabl M.,1983,Methods of Enzymatic Analysis,Germany, 190-302pp.

Chae, K., Choi, M., Ajayi, F. and Park, W., 2008. Energy & Fuels 22, 169–176.

Chambers, J.P., Arulanandam, B.P., Matta, L.L., Weis, A.and Valdes, J.J., 2008. Curr. Issues Mol. Biol. 10, 1–12.

Cui, G., Yang, X., Wang, X., Zhang, Z., Yue, X., Shi, H.and Shen, X., 2013. Neuropsychiatr. Dis. Treat. 10, 39–46.

Dilgin, Y., Kızılkaya, B., Erteka, B., Işık, F.and Dilgin, G.D.,2012, Electrocatalytic oxidation of sulphide using a pencil graphite electrode modified with hematoxylin, Sensors and Actuators B 171– 172, 223– 229pp

Dinçkaya, E., 1999, Enzim Sensörleri, Biyosensörler (Ed.Azmi Telefoncu), Ege Ün.Yayınları, 81-142sp.

Dogan-Topal, B. ve Ozkan, S.A., 2011, Electrochemical determination of anticancer drug fulvestrant at dsDNA modified pencil graphite electrode , Electrochimica Acta, 56, 4433–4438pp.

D’Souza, S.F., 2001. Biosens. Bioelectron. 16, 337–353.

Ensafi, A. A., Heydari-Bafrooei,E. and Amini, M., 2012, DNA-functionalized biosensor for riboflavin based electrochemical interaction on pretreated pencil graphite electrode, Biosensors and Bioelectronics, 31, 376–381pp.

Espesito, E., Cortesi, R.and Nastrazzi, C., 1995, Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties, Biomaterials, 20, 2009-2020pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devamı)

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.

Gao W., Song J.and Wu N., 2005, Voltammetric behavior and square-wave voltammetric determination of trepibutone at a pencil graphite electrode, Journal of Electroanalytical Chemistry,576, 1–7pp.

Halliwel, B. and Gutteridge, J.M., 1990, Methods Enzymology, 186:185p.

Higashi, T., Kavamata, F., Sakamoto, T., 1974,Studies on rat liver Catalase.VII. double-labeling of catalase by ¹⁴C-leucine and ³H-d- aminolevulinic acid, J Biochem, Tokyo, 76: 703-708pp.

HSDB., Hazardous Substances Data Bank, 1996, National Library of Medicine,Bethesda, Md (Tomes cd-rom Version), Denver, CO: Micromedex, Inc.

Karabulut A.B., Özerol E., Temel İ., Gözükar E.M.ve Akyol Ö., 2002, Yaş ve sigara içiminin eritrosit katalaz aktivitesi ve bazı hematolojik parametreler üzerine etkisi, İnönü Univ Tıp Fak. Dergisi,9 (2),85-88sp.

Kapoor, M., 1996. Cell. Mol. Microb. Biol. Div. ... 1–6.

Masters C. and Holmes R., 1977, Peroxisome: New aspects of cell physiology and biochemistry, Physiol Rew, 57, 866-882pp.

McCreery R.L., 1991, Carbon electrodes: structural effects on electron transfer kinetics, in: A.J. Bard (Ed.), Electroanalytical Chemistry, vol. 18, Marcel Dekker, New York.

Mirmoghtadaie,L., Ensafi, A.A., Kadivar,M. and Norouzi, P., 2013, Highly selective electrochemical biosensor for the determination of folic acid based on DNA modified-pencil graphite electrode using response surface methodology, Materials Science and Engineering: C, 1753–1758pp.

Mohanty, S.P.and Kougianos, E., n.d. 1–12.

Newman, J.D., Tigwell, L.J., Warner, P.J.and Turner, A.P.F., 2001, Biosensors: boldly going into the new millennium, Sensor Review, 21, 268 – 271pp.

O’Connell, P.J.and Guilbault, G.G., 2001. Anal. Lett. 34, 1063–1078.

Odacı, D., Timur, S.ve Telefoncu, A., 2004, Immobilized jarusalem artichoke (Helianthus tuberosus) tissue electrode for phenol detection, Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 32, 2, 315-323pp.

Özcan, A.ve Şahin, Y., 2011, A novel approach for the determination of paracetamol based on the reduction of N-acetyl-p-benzoquinoneimine formed on

KAYNAKLAR DİZİNİ(devamı)

the electrochemically treated pencil graphite electrode, *Analytica Chimica Acta*, 685, 9–14pp.

Proske, D., Blank, M., Buhmann, R. and Resch, A., 2005. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 367–374.

Rasooly, A., 2005. *Methods* 37, 1–3.

Rice M.E., Z. Galus, R.N. and Adams, J., 1983, *Electroanal. Chem.* 143, 89pp.

Robertson, D.E., 2004, *Catalases*, U.S.P. No: 20040005655.

Rose, P.J., Mark, H.F., Bikales, N.M., Overberger, C.G., Menges, G. and Kroscwitz, J.I., 1987, *Encyclopedia of polymer science and enngineering*, vol.7, Wiley Interscience, New-York, 89pp.

Sezgintürk, M.K. ve Dinçkaya, E., 2005. *Talanta* 65, 998–1002.

Sezgintürk, M.K., Göktuğ, T., and Dinçkaya, E., 2005. *Food Technol. Biotechnol.* 43, 329–334.

Toxicity, N., 2000. 131–136.

Wang, L., Gao, X., Jin, L., Wu, Q., Chen and Z., Lin, X., 2013. *Sensors Actuators, B Chem.* 176, 9–14.

Wu, C., Sun, H., Li, Y., Liu, X., Du, X., Wang, X., and Xu, P., 2015. *Biosens. Bioelectron.* 66, 350–355.

Wu, Y., Quan, X. and Si, X., 2015. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 99, 39–44. 1995. 40, 1845–1849.

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Duygu GÖÇER

Doğum tarihi, yeri : 24.06.1990- Osmaniye

Medeni hali : Bekâr

Uyruğu : T.C

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

Tel : 0 554 891 97 40

e-mail: duygugocer1@hotmail.com

Eğitim Durumu:

OKUL	DERECE	YIL
Emirbeyazıt İlköğretim Okulu	İlköğretim	1997-2004
Muğla Anadolu Lisesi	Lise	2004-2008
Ege Üniversitesi	Lisans, Biyokimya	2009-2013
Ege Üniversitesi	Yüksek Lisans, Biyokimya	2013-Halen devam ediyor

Görev aldığı Projeler

BAP - 2014 FEN 017- Glukoz Tayinine Yönelik Olarak Kalem Grafit Elektrot-Glukoz Oksidaz Temelli Yeni Bir Biyosensör Geliştirilmesi (2013-2015)

TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı