



T.C.

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

GLUKOZ TAYİNİNE YÖNELİK YENİ BİR BİYOSENSÖR TASARIMI

Kezban KARTLAŞMIŞ

**TIBBİ BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Levent KAYRIN

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi TYL-
2015-3899 No'lu proje ile desteklenmiştir.**

ADANA - 2017

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

GLUKOZ TAYİNİNE YÖNELİK YENİ BİR BİYOSENSÖR TASARIMI

Kezban KARTLAŞMIŞ

**TIBBİ BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Levent KAYRIN**

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi TYL-
2015-3899 No'lu proje ile desteklenmiştir.**

ADANA - 2017

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 24/01/2017

Kezban Kartlaşmış

Kayıtlı olunan Program : Tezli Yüksek Lisans
Tezin Konusu : Glukoz Tayinine Yönelik Yeni Bir Biyosensör Tasarımı

Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☐ Doktora: ☐

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Levent KAYRIN
Danışmanın İletişim Bilgileri
Telefon :05326849971
E-Posta : lkayrin@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri
Telefon : 05364427774
E-Posta : kzbn.krtlsms@gmail.com
Adresi : Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya
AD

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, eğitimim süresince büyük özveri ve sabırla yardımlarını esirgemeyen, saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Levent KAYRIN'a çok teşekkür ederim.

Ders aşamasında teorik bilgilerini aktaran, pratik alandaki uygulamalarımda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Abdullah Tuli, Prof. Dr. Nurten Dikmen, Prof. Dr. Akif Çürük, Doç. Dr. Tamer İnal, Doç.Dr. Özlem Görüroğlu Öztürk ve Öğretim Görevlisi Ebru Dünder Yenilmez'e teşekkür ederim.

Tezimin istatistiksel hesaplarını yapan Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nazan Alparslan'a teşekkür ederim.

Tez çalışma sürecinde en az benim kadar emeği olan, büyük bir sabırla bana tüm bildiklerini öğreten, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, yol gösteren, sorumluluk vererek gelişmemi sağlayan abim Arş. Gör. Umut KÖKBAŞ'a teşekkürü borç bilirim.

Yüksek lisans öğrenimim sürecinde manevi desteklerinden ötürü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Başak Günaştı ve Arş. Gör. Mustafa Muhlis Alparslan'a çok teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğinden dolayı babam Mithat Kartlaşmış'a ve annem Selma Kartlaşmış'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TYL-2015-3899 No'lu proje ile maddi olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	ix
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Biyosensörlere Genel Bakış.....	3
2.2 Biyosensörlerin Sınıflandırılması	5
2.2.1 Analiz edilecek madde-biyoaktif bileşen ilişkisine göre biyosensörlerin sınıflandırılması	5
2.2.2 Biyoaktif Ölçüm Prensiplerine ve İletici türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması	5
2.2.3 Biyoaktif tabakada kullanılan biyokomponent türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması	5
2.3 Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri	10
2.3.1 Adsorbsiyon.....	11
2.3.2 Tutuklama	11
2.3.3 Çapraz Bağlama	11
2.3.4 Kovalent bağlama	11
2.4 Elektrokimya Esaslı Enzim Biyosensörleri	12
2.4.1 Amperometrik Esaslı Enzim Biyosensörleri.....	12
2.5 Glukoz Oksidaz Enzimi	15
2.5.1 Glukoz oksidaz tepkime mekanizması	16
2.9 Glukoz Tayininde Biyosensör Kullanımı	27

2.12.1 Sığır serum albümini (Bovine serum albumin: BSA).....	30
2.12.2 Jelatin	31
2.12.3 Glutaraldehit	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. Gereçler	33
3.1.1 Cihazlar	33
3.1.2 Kimyasallar:.....	33
3.2 Yöntem	35
3.2.1 Glukoz Tayinine Yönelik İmmobilize Edilmiş Biyosensör Hazırlanması	35
3.2.2 Glukoz Oksidaz Temelli Biyosensörün Ölçüm Prosedürü	36
3.2.3 İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu	37
3.2.4 Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu	39
3.3 Geliştirilen Biyosensörün Karakterizasyonuna Yönelik Çalışmalar	39
4.1 Biyosensörde Çalışma Koşullarının Optimizasyonu	42
4.1.3 Optimum Tarama Hızı Değerinin Belirlenmesi.....	44
4.2 Biyosensörde Biyoaktif Tabakanın Optimizasyonu	48
4.2.1 Sığır Serum Albumin Derişiminin Optimizasyonu	48
4.2.2 Glutaraldehit Derişiminin Optimizasyonu	49
4.2.3 Jelatin Derişiminin Optimizasyonu	50
4.3.3 Biyosensörde Ölçüm Tekrarlanabilirliği	54
KAYNAKLAR	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil:2.1	Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.2.	Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal hiyerarşisinde enzimlerin yeri.....	6
Şekil 2.3.	Bir Enzim Sensörünün Genel Şematik Gösterimi.....	7
Şekil 2.4.	İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.5.	Enzim biyosensörünün genel çalışma ilkesi.....	12
Şekil 2.6	İkizkenar üçgen dalgası şeklinde uygulanan potansiyel.....	13
Şekil 2.7	Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltammogram.....	14
Şekil 2.8	A) Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametri için kullanılan uyarma sinyali, B) Diferansiyel puls voltametrisine ait bir voltammogram.....	15
Şekil 2.9.	Glukoz oksidaz enzim tepkimesinin gösterimi.....	16
Şekil 2.10.	<i>P.amagasakiense</i> kaynaklı Glukoz Oksidaz FAD kısmı ve aktif merkez rezidüleri.....	17
Şekil 2.11.	Heterojen sistemlerde tepkime ve transport süreçleri için basitleştirilmiş şeması.....	28
Şekil 2.12.	BSA'ya ait üç boyutlu yapısı.....	31
Şekil 3.1.	Au elektrotun immobilize edilmeden önce ve sonraki hali.....	36
Şekil 3.2.	Biyosensör düzeneğinin tamamı.....	37
Şekil 4.1.	pH değişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.....	42
Şekil 4.2.	pH değişiminin biyosensör cevabına etkisi.....	43
Şekil 4.3.	Döngüsel voltammogram.....	44
Şekil 4.4.	Biyosensörün tarama hızı ölçümlerini gösteren döngüsel voltamogramları.....	45
Şekil 4.5.	Tampon derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.....	46
Şekil 4.6.	Tampon derişiminin biyosensör cevabına etkisi	46
Şekil 4.7.	Biyosensör için optimum sıcaklık ölçümlerinin yapıldığı Lineer sweep görüntüsü.....	47
Şekil 4.8.	Biyosensör için optimum sıcaklık grafiği.....	47
Şekil 4.9.	BSA derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.....	48
Şekil 4.10	Sığır serum albumin miktarlarındaki değişimin biyosensör cevabına etkisi.....	49
Şekil 4.11.	Glutaraldehit derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren lineer sweep gösterimi.....	49
Şekil 4.12.	Glutaraldehitin yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi.....	50
Şekil 4.13.	Jelatin derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.....	51
Şekil 4.14.	Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi.....	51
Şekil 4.15	5-1000 mg/dL aralığındaki glukoz derişimlerinde doğrusal tayin aralığı.....	52
Şekil 4.16.	5-400 mg/dL aralığındaki glukoz derişimlerinde tayin aralığı.....	53
Şekil 4.17.	Biyosensörün raf ömrü.....	54

Şekil 4.18. BSA-Jelatin/glukoz oksidaz- peroksidaz /glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik için Lineer Sweep gösterimi.....	55
Şekil 4.19. Merkez laboratuvar verileri için ROC eğrisi.....	57
Şekil 4.20. Biyosensör verileri için ROC eğrisi.....	57
Şekil 4.21. Spektrotometrik yöntem verileri için ROC eğrisi.....	58
Şekil 4.22. Spektrofotometre, merkez laboratuvar ve biyosensör sonuçları için ROC eğrilerinin kıyaslanması.....	59
Şekil 5.1. Farklı fosfat tampon derişimlerine bağılı olarak gerçekleşen cevap akımları.....	62
Şekil 5.2. Farklı BSA derişimlerinin biyosensör cevabına etkisi.....	63
Şekil 5.3 Farklı jelatin miktarlarının biyosensör cevabına etkisi.....	64
Şekil 5.4 Farklı glutaraldehit derişimlerinin biyosensör cevabına etkisi.....	65



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1 Biyosensör bileşenlerinin içeriği.....	4
Tablo 2.2.: <i>A.Niger</i> 'den elde edilen glukoz oksidaz enziminin özellikleri.....	18
Tablo 4.3.3. Biyosensörün tekrarlanabilirlik çizelgesi.....	54
Tablo 4.2. Normoglisemik serum örneklerinde biyosensör sonuçlarının diğer yöntemlerle kıyaslanması	56
Tablo 4.3. Hiperglisemik serum örneklerinde biyosensör sonuçlarının diğer yöntemlerle kıyaslanması..	56



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACS:	Akut Koroner Sendrom
AKI:	Akut Böbrek Hasarı
APTES:	Amino propiltrietoksisilan
Au:	Altın
BOS:	Beyin Omurilik Sıvısı
BSA:	Sığır Serum Albumini
CAP:	Amerika Patoloji Uzmanları Derneği
CAT:	Katalaz
FAD:	Flavin Adenin Dinükleotit
FDA:	Yiyecek ve İlaç İdaresi
GOD:	Glukoz Oksidaz
HPLC:	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IUPAC:	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
QCM:	Kuartz Kristal Mikrobals
Km:	Michaelis Menten sabiti
LP:	Laktoperoksidaz
LS:	Linear Sweep Yöntemi
MOPS:	(3-(N-morfolino) propansülfonik asit
PEG:	Polietilen glikol
POD:	Peroksidaz
Pt:	Platin
ROC:	Alıcı İşletim Karakteristiği
SAM:	Kendiliğinden Bağlanabilen Tabaka
S.S:	Standart Sapma
U:	Unit
UV:	Ultraviyole ışınları
V.K:	Varyasyon Katsayısı
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
X:	Ortalama Değer

ÖZET

Glukoz Tayinine Yönelik Yeni Bir Biyosensör Tasarımı

Glukoz tayinine yönelik bu çalışmada glukoz oksidaz enzimi ve peroksidaz enzimi, sığır serum albümini/jelatin ve glutaraldehit ile çapraz bağlanarak Au elektrot yüzeyine sabitlenmiş ve geliştirilen biyosensör ile glukoz ölçümleri 0.9 V'ta amperometrik yöntem ile alınmıştır.

Tasarlanan biyosensörün optimizasyon çalışmalarında öncelikle biyoaktif tabaka için jelatin miktarı, sığır serum albumin miktarı ve glutaraldehit yüzdesi gibi parametreler, çalışma koşullarının optimizasyonunda ise tarama hızı, pH, sıcaklık ve tampon derişimi optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları içinde doğrusal tayin aralığı, raf ömrü, ölçüm tekrarlanabilirliği ve serumda glukoz analizleri yapılmıştır.

Biyoaktif tabakanın optimizasyonunda BSA miktarı, jelatin miktarı ve glutaraldehit yüzdesi sırasıyla 0.030 gr, 0.45 gr ve % 2.5 olarak tespit edilmiştir. Fosfat tamponunun pH: 7.5 ve 50 mM, tarama hızının 0.05 V/s, sıcaklığın ise 35 °C optimum çalışma koşullarını sağladığı belirlenmiştir.

Au/BSA-jelatin/glukoz oksidaz-peroksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör için karakterizasyon çalışmalarında 5-400 mg/dL aralığında glukoz için doğrusal sonuçların alındığı belirlenmiştir. Raf ömrü çalışmalarında 40.günün sonunda yanıtın % 72'ye kadar korunduğu, 80 mg/dL derişimle kullanılarak yapılan tekrarlanabilirlik çalışmalarında (n=13) standart sapma (S.S) = ± 0.1320 ve % varyasyon katsayısı (V.K) = 0.165 olarak bulunmuştur.

Serum örnekleriyle yapılan çalışmalarda; biyosensör, kit ve altın standart olarak kabul ettiğimiz merkez laboratuvar sonuçlarının ROC eğrileri analizi yapılmıştır ve biyosensör sonuçlarının (.90-1.00) ile mükemmel aralıkta olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Au elektrot, Glukoz biyosensörü, Glukoz oksidaz, Peroksidaz

ABSTRACT

A New Designed Biosensor For The Glucose Determination

In this study for the determination of glucose, glucose oxidase enzymes and peroxidase enzymes fixed on the gold electrode by using BSA/gelatin and crosslinking by glutaraldehyde. Measurements were carried out at 0.9 V with amperometric method.

During the optimization studies the amount of gelatin, bovine serum albumin and glutaraldehyde were determined. For the optimization working condition pH, temperature, scanning rate and buffer concentration were carried out. Afterwards, some parameters such as linearity, repeatability of the measurement, shelf life, and serum glucose analyses were carried out.

From the bioactive layer optimization studies; gelatin, bovine serum albumin amount and optimal percentage glutaraldehyde were determined as 0.45 gr, 0.030 gr and %2.5 for the Au/BSA-Gelatin/GOD-POD/ glutaraldehyde modified biosensor. Phosphate buffer of pH 7.5 and 50 mM, scanning rate of 0.05 V/s, temperature 35 °C were determined as a optimum working conditions.

It was determined that linear results are obtained between the ranges of 5-400 mg/dL for glucose concentration. As for shelf life studies, at the end of 40th day of responses has been preserved by 72%, repeatability of the measurement (n=13) standard deviation (S. S) = $\pm 0,1320$ and % coefficient of variation (V. K) = 0.165, respectively.

Studies with using serum samples; biosensor, kit, central laboratory results accepted as gold standard ROC curve analysis reviewed and the biosensor results (.90-1.00) were found with excellent range.

Key Words: Glucose biosensor, Gold electrode, Glucose oxidase, Peroxidase

1.GİRİŞ

Doğada bulunan bütün canlılar, yaşamlarını sürdürebilmek için çevresel değişimleri hızla algılayıp bu değişimlere adaptasyon göstermeye çalışırlar. Örneğin; köpeklerin koku alma duyuları insanlara göre 100.000 kat daha duyarlıdır ve yılan balıkları tonlarca su içerisine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi bile algılar. Canlılarda bulunan çevreyi ‘hızlı şekilde algılama ve adaptasyon geliştirme mekanizmaları’ biyosensörlerin *in vitro* olarak geliştirilmesi ve kullanımı için model oluşturmuştur.¹⁻⁴

Biyosensörler IUPAC tarafından ‘Kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve derişime bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlar’ olarak tanımlanmıştır. Son 20 yılda biyoteknolojide baş döndürücü gelişmelere paralel olarak gelişen **biyosensör teknoloji**’nin hızlı gelişimi IUPAC tarafından oluşturulan ‘*Biyosensörleri Sınıflandırma ve Adlandırma Komisyonu*’ 1996 yılında yayınladığı biyosensör tanımı şimdiden geçerliliğini yitirmiş ve bu tanım biyosensörlerin mevcut durumu göz önüne alındığında yetersiz bir tanım olarak kalmıştır.^{3, 5-7}

Biyosensörlerin tarihi 1962 yılında *L.C. Clark’ın Cincinnati Hastanesi’nde (Ohio, ABD)* ameliyat sırasında kanın O₂ miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlamaktadır. 1988 yılında Clark ve Lyons, glukoz oksidaz enzimini O₂ elektrodu ile birlikte kullanarak kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır. Oluşan bu yeni analitik sistem ile bir yandan enzim özgünlüğünü bir yandan da elektrot tayin duyarlılığını birleştirmiş ve uygulama olanağı bulmuştur.^{8,9}

Bir biyolojik sıvıdaki glukoz ve çözünmüş oksijen elektrot etrafındaki membranı geçerek elektrot yüzeyine ulaştığında glukoz oksitlenerek O₂ harcanır. Ortamdaki glukoz bittiğinde O₂ elektrodu ile başlangıçtaki ve tepkime sonundaki çözünmüş O₂ ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glukozun yükseltgenmesi için harcanan O₂ olup buradan biyolojik sıvıdaki glukoz derişimi hesaplanır.^{10, 11} Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateriyalin de katılmasıyla diğer birçok maddenin tayini mümkün olmuştur.^{2, 12}

Biyosensörler; klinik teşhis, tıbbi uygulamalar, süreç denetleme, biyoreaktörler, gıdalarda kalite kontrol, tarım ve veterinerlikte tanı ve kalite kontrolü, bakteriyel ve viral teşhis kitlerinin hazırlanması, ilaç üretimi, endüstriyel atık su denetimi, madencilik, askeri savunma sanayi gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Biyosensörlerin en yoğun olarak kullanıldıkları alan bugün için tıbbi tanı ve teşhistir. Hiç kuşkusuz biyomedikal sektör biyosensörler için en iyi pazardır. Bu alanda uygulama olanağı bulan ilk biyosensörler, enzim sensörleridir. Ticari olarak üretilen ilk biyosensör ise şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayinini mümkün kılan glukoz oksidaz elektrotudur. Bu alanda gerek vücuttaki glukoz, üre, şeker gibi biyolojik ürünlerin takibi yanı sıra kanserlerin izlenmesi ve mikrobiyal ajanların tespiti amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır.^{1, 13, 14}

Bu tez kapsamında kan glukozunu diğer biyosensör yöntemlerine göre daha ucuz, daha hızlı, daha hassas ve daha doğru ölçmek amacıyla yeni bir modifiye biyosensör tasarlamayı amaçladık.



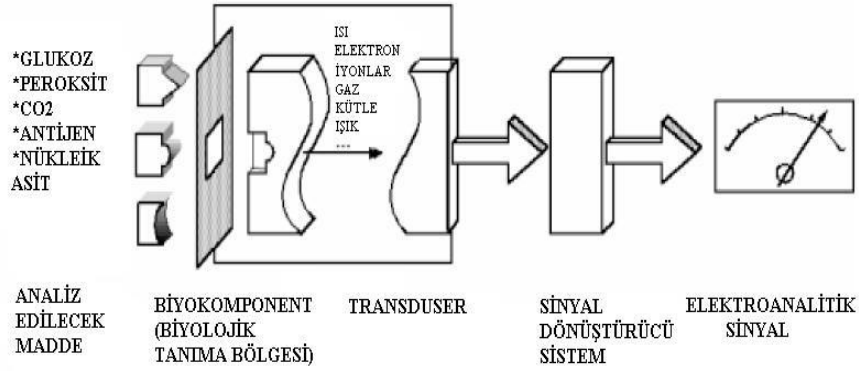
2.GENEL BİLGİLER

2.1. Biyosensörlere Genel Bakış

Biyosensörler fizikokimyasal analiz sistemleri ile biyolojik materyallerin birleştirilmesi ile oluşan analitik sistemlerdir. Biyosensörlerde biyolojik sistemin yüksek özgünlüğü ile fiziksel analiz sisteminin tayin duyarlılığı birleştirilmiştir. Çok sayıda biyoorganik molekül ve bazı inorganik moleküllerin analizinde kullanmak amacı ile pek çok biyosensör geliştirilmiştir. Günümüzde biyosensörler, özellikle sağlık başta olmak üzere; çevresel analizlerde, askeri sahada, gıda, ilaç üretimi ve kimya endüstrilerinde kullanılmaktadır.¹⁵

İlk biyosensör çalışmaları L.C. Clark'ın kandaki oksijen seviyesini O₂ duyarlı amperometrik bir elektrotla ameliyat sırasında izlemesi ve ardından 1962 yılında O₂ duyarlı amperometrik elektrot yüzeyine glukoz oksidaz enzimini immobilize ederek hazırladığı glukoz biyosensörüdür.^{16, 17} Bu gelişmenin ardından pek çok biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensörler IUPAC tarafından 'Kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve derişime bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlar' olarak tanımlanmıştır. Biyosensör teknolojisi o kadar hızlı gelişmektedir ki; IUPAC tarafından oluşturulan Biyosensörleri Sınıflandırma ve Adlandırma Komisyonunun 1996 yılında hazırlayıp yayınladığı bu biyosensör tanımı biyomikroçiplerin gelişimi ile daha şimdiden geçerliliğini yitirmiştir.¹⁸

Biyosensörler temel olarak; analiz edilecek maddenin biyosensör yüzeyindeki biyokomponentle etkileşime girmesi sonucu iletici yüzeyinde analit miktarıyla orantılı bir sinyalin oluşumu ve bu sinyalin ölçüm cihazına iletilmesi ilkesine dayanır. Biyosensörlerde biyokomponent olarak enzimler, mikroorganizmalar, bitkisel ve hayvansal dokular, reseptörler, antikorlar ve nükleik asitler kullanılabilir. Analiz edilecek moleküle uygun olarak bir biyokomponent ve analitin dönüşümü sonucunda oluşan elektrokimyasal, optik ya da gravimetrik sinyali elektriksel sinyale çeviren uygun bir iletici seçilmelidir. İletici ve biyokomponent birbirine uygun fiziksel ya da kimyasal yöntemle bağlanabilir.¹⁹ Şekil 2.1'de bir biyosensör sisteminin birimleri şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil:2.1 Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi

Günümüzde biyosensörler; biyokomponent (ya da biyolojik tanıma bölgesi) ve iletici olarak pek çok farklı maddeyi ve sistemi içermektedir. Bunların en önemli olanları Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1 Biyosensör bileşenlerinin içeriği

Analit	Biyokomponent	Sinyal İletici Sistem
• Metal • Hormonlar • Enzimler • Substrat • Aktivatör-İnhibitör • Antikor-Antijen • Nükleik asit • Mikroorganizma • Virüsler	• Enzimler • Antikor • Hücre • Doku kesitleri • Mikroorganizmalar • Nükleik asitler • Lipidler • Hücre organelleri • Reseptörler	<i>Elektrokimyasal esaslı</i> • Amperometri • Potansiyometri <i>Optik esaslı</i> • Fotometri • Fluorometri • Biyolüminesans <i>Piezoelektrik</i> <i>QCM (kuartz kristal mikrobals)</i> • Mikrokantilever

2.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

2.2.1. Analiz edilecek madde-biyoaktif bileşen ilişkisine göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler, farklı bir bakış açısıyla analizi yapılacak madde-biyoaktif bileşen ilişkisine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilirler:

- a) Biyokatalitik esaslı biyosensörler (mikroorganizma ve enzimlerin kullanıldığı biyosensörler).
- b) Biyoafinite esaslı biyosensörler (antikor-antijen ve reseptör-ligand gibi etkileşimlerin kullanıldığı biyosensörler).

2.2.2. Biyoaktif ölçüm prensiplerine ve iletici türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler ölçüm prensiplerine ve iletici türüne göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır:

- a) Elektrokimyasal esaslı biyosensörler (Amperometri, Potansiyometri)
- b) Optik esaslı biyosensörler (Fotometri, Fluorometri, Biyoluminesans)
- c) Piezoelektrik esaslı biyosensörler (Kuartz kristal mikrobals, Mikrokantileverlar)
- d) Kalorimetri esaslı biyosensörler (Termistörler)

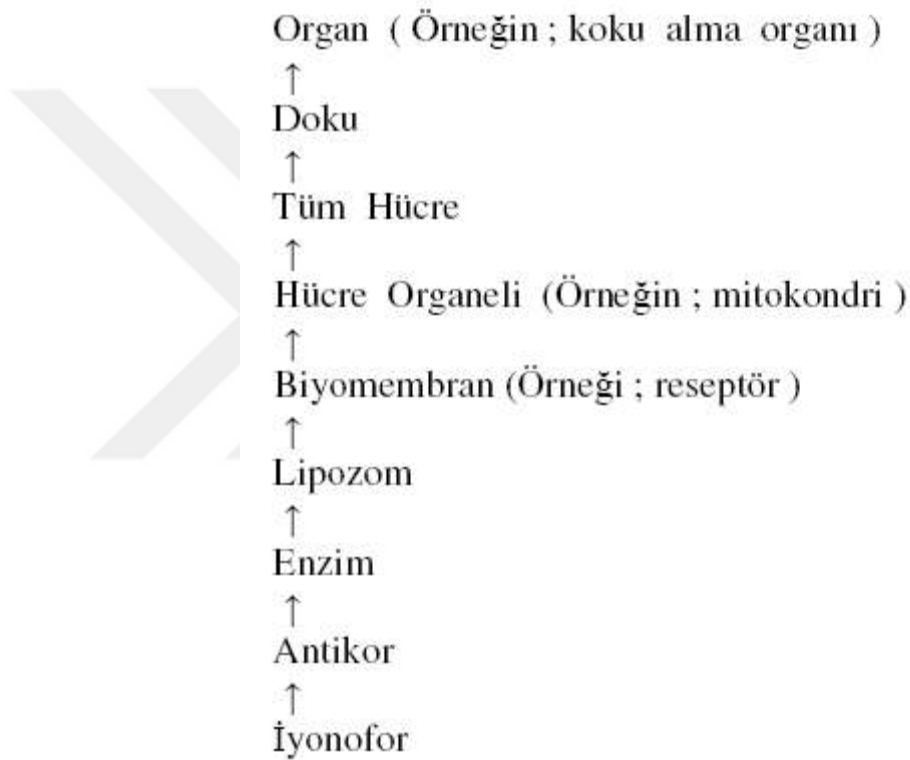
2.2.3. Biyoaktif tabakada kullanılan biyokomponent türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler biyoaktif tabakalarında görev alan biyokomponentin türüne göre:

- 1.Enzim temelli biyosensörler
- 2.Doku temelli biyosensörler
- 3.DNA temelli biyosensörler
- 4.Antikor/Antijen temelli biyosensörler (immünobiyosensörler)
- 5.Mikrobiyal kökenli biyosensörler olmak üzere 5 ana başlık altında sınıflandırılmaktadır.

2.2.3.1. Enzim temelli biyosensörler

Biyosensör teknolojisinin tarihsel geçmişine bakıldığında, bu alandaki ilk çalışmaların amperometrik ve potansiyometrik temelli enzim sensörleriyle başladığı görülmektedir. 1962 de Clark ve Lyons, 1967 de Updike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik glukoz oksidaz enzim elektrodları bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır. ¹⁴ Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyolojik materyallerin artan komplekslik niteliklerine göre sıralanmış hali ve bu hiyerarşideki enzimlerin yeri Şekil 2.2’de gösterilmektedir. ^{20, 21}

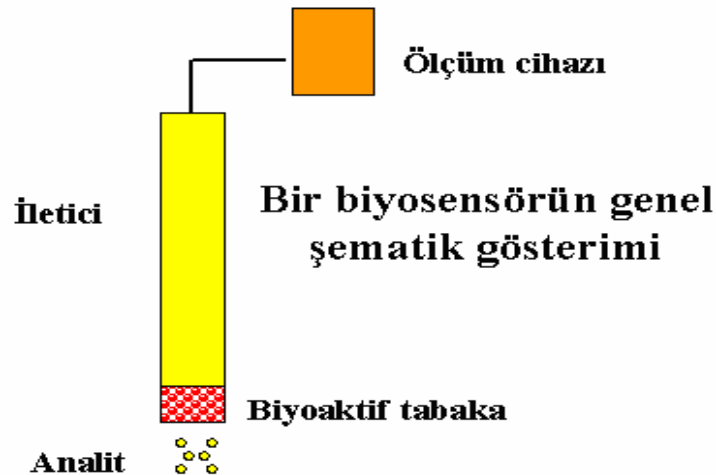


Şekil 2.2. Biyosensör teknolojisinde kullanılan biyoaktif materyal hiyerarşisinde enzimlerin yeri

1960’lı yıllarda biyoloji ve biyokimya bilimlerindeki tarihsel gelişme paralelinde, tüm bu yapılar içinde fonksiyonları nispeten daha ayrıntılı bir biçimde tanımlanan en önemli gruba, enzimler oluşturmaktaydı. Bunun yanı sıra elektrokimya alanındaki gelişmeler, özellikle amperometrik ve potansiyometrik esaslı sensörlerin pratik uygulamalarda rahatlıkla kullanılabileceği zemini oluşturmuştu. Çeşitli maddelerin çok sayıdaki duyarlı ve pratik analizlerine duyulan gereksinimin de artmasıyla ilk enzim elektrodlarıyla ilgili bilimsel çalışmalar başlamış oldu. ²² 1960’lardan bu yana iletim ve

ölçüm teknolojilerindeki gelişmeler elektrokimyasal esasların yanı sıra kolorimetrik, optik ve akustik temelli sistemlerde de çok önemli gelişmelere yol açmıştır. Temel bilimlerdeki ilerlemeler, enzimlerin yanısıra diğer biyolojik materyallerin işlevlerinin de çok daha ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmasına imkan vermiştir.²³ Bu ilerlemelerin doğal bir sonucu olarak farklı biyolojik materyallerin ve iletim sistemlerinin kombinasyonuyla çok çeşitli biyosensörler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Bugünkü sonuca bakıldığında hangi temel iletim sistemi söz konusu olursa olsun pratik ve ticari uygulamalarda enzim elektrodlarının büyük üstünlüğü göze çarpmaktadır.²⁴ Bu sonuçtaki en büyük etmen canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin doğrudan veya dolaylı olarak analizinde kullanılabilecek çok sayıdaki enzimin varlığıdır. Bilinen enzimlerin yanı sıra bilinmeyenlerin potansiyel varlığı, piyasada yüzlerce ticari enzim preparatının bulunabilirliği ve bu sayının her geçen gün yükselmesi enzim sensörlerinin tartışılmaz üstünlüğünün devam edeceğinin bir göstergesidir. Son yıllarda organik faz enzimolojisi konusundaki bulgular, enzimler ile organik fazda oldukça farklı analizlerin yapılabilirliğini ortaya koymuştur. Söz konusu bulgular hem tasarlanabilecek enzim sensörlerinin sayısında artışa hemde uygulama alanlarının yaygınlaşmasına katkı sağlayacak niteliktedir.²⁵

En genel anlamda bakıldığında diğer biyosensörlerde olduğu gibi enzim sensörleri de biyoaktif tabaka, iletilici ve ölçüm sisteminden oluşur (Şekil 2.3) Diğer biyosensörlerden tek farkı biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimlerin yer almasıdır. Buna karşılık diğer biyosensörlerde olduğu gibi biyoaktif tabakanın iç ve dış yüzeylerinde membranlar iletilici ile ölçüm düzeneği arasında sinyal yükselticiler, mikroişlemciler veya ölçüm düzeneğiyle bağlantılı kaydedici veya bilgisayar sistemleri gereksinimlerine göre eklenen unsurlardır.¹⁸



Şekil 2.3. Bir Enzim Sensörünün Genel Şematik Gösterimi.

2.2.3.2. Doku temelli biyosensörler

Hayvansal ve bitkisel bazı dokuların ve organellerin kimi enzimlerce zengin olduğu bilinmektedir. İşte bu enzimlerin izole edilmiş preparatları yerine doğrudan yoğun bulundukları bu doku parçaları da biyokomponent olarak kullanılmaktadırlar. Özellikle uzun ve masraflı enzim saflaştırma zorluğundan kurtardığı için ve hedef analitin çok basamaklı dönüşümünde farklı enzimlerin bir arada kullanılması yerine bu enzimleri içeren dokunun kullanımı ve ilgilenilen enzim ticari olarak bulunmuyorsa doku parçalarının biyokomponent olarak kullanımı avantajlıdır. Dokuların komplekslikleri sebebiyle her yeni tip elektrot için cevap karakterleri farklı olduğundan her biyosensör için optimizasyon gereklidir.

Biyosensörlerin bu türünde enzimler, doğal ortamlarında bulunacaklarından katalitik özgüllük açısından çok avantajlıdır. Ancak substratın enzime ulaşması için aşması gereken difüzyon bariyerinin artmasından dolayı cevap süresi uzar. Bu dezavantajı kısmen de olsa azaltabilmek için dokular homojenize edilerek kullanılır. Bunun yanında dokular pek çok enzimi bünyelerinde içerdiklerinden, analitin istenilen enzim dışındaki diğer enzimlerle dönüştürülmesi ile oluşacak hataları engellemek için diğer enzim sistemlerini inhibe edecek maddeler ve koşullar biyosensör hazırlanırken kullanılmalıdır.¹⁴

2.2.3.3. DNA temelli biyosensörler

Biyokomponent olarak tek zincirli DNA oligomerlerinin kullanıldığı biyosensör sistemleridir. DNA yapısının ortaya çıkması, hibridizasyon, amplifikasyon ve rekombinant DNA teknolojilerinin gelişimi DNA sensörlerinin geliştirilmesine öncülük etmiştir. Genellikle DNA sensörleri iletici yüzeyine immobilize haldeki tek zincirli DNA oligomeri (DNA probu) ile belirli bir hastalığı, kalıtsal bir karakteri ya da bir bakteri veya virüsün patojenitesini simgeleyen bir tek zincirli DNA parçasının hibridizasyonu prensibine dayanır.²⁶ Bu hibridizasyonla oluşan çift zincirli DNA sayesinde bir elektrokimyasal ya da optik sinyal oluşur ve optik, piezoelektrik, elektrokimyasal bir iletici ile sinyal okunabilir hale getirilir. Kullanılan DNA problemleri genellikle 20-30 bazlık kısa tek zincirli DNA'lardır.²⁷⁻²⁹

2.2.3.4. Antikor/antijen (immüno sensörler) temelli biyosensörler

Biyokomponent olarak antikorların kullanıldığı biyosensörler antikor temelli biyosensörler ya da **immünosensörler** olarak adlandırılırlar.⁴ Vücuda giren yabancı organizmalara (virüs, bakteri ve protozoa) veya onların protein ürünlerine karşı bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen protein yapılı maddelere **antikor** denir. Antikorlar ve antijenler arasında özgül etkileşim olduğundan immünosensörler ile son derece özgül ve duyarlı analizler yapılabilir. Antikorlar uygun ileticiler ile eşleştirilerek hormon, ilaç, virüs, bakteri ve çevresel kirletici olan diğer moleküllerin, pestisitlerin, biyomedikal maddelerin tayini için immünosensörler geliştirilebilir.

2.2.3.5. Mikrobiyal biyosensörler

Bir mikrobiyal biyosensör, bir iletici ile canlı veya canlı olmayan mikrobiyal hücrelerin immobilize edilerek birleşmesi ile oluşmaktadır. Biyosensörlerin yapımında kullanılan mikroorganizmalar bir takım avantajlara sahiptir. Mikroorganizmalar geniş bir aralıktaki kimyasal bileşikleri metabolize edebilir. Mikroorganizmalar olumsuz şartlara uyma konusunda büyük bir kapasiteye sahiptirler ve yeteneklerini geliştirerek zamanla yeni moleküller oluşturabilir. Mikroorganizmalar aynı zamanda mutasyonla veya rekombinant DNA teknolojisi ile oluşan genetik modifikasyonlar için de ekonomik intrasellüler enzim kaynağıdır.^{30, 31}

Enzim bazlı sensörlerle karşılaştırıldığında hücre kullanmanın ana sınırlandırıcı faktörlerinden biri substrat ve ürünlerin hücre zarından difüzyonunun daha yavaş bir cevap sağlamasıdır. Bu problemin üstesinden gelmenin bir yolu hücre geçirgenliğini arttırmaktır. Hücrelerin geçirgenliği fiziksel (dondurma-çözme), kimyasal (organik çözücüler/deterjanlar) ve enzimatik (lizozim, papain) işlemlerle artırılabilir. Bu konuda en çok kullanılan yöntem toluen, kloroform, etanol ve butanol gibi organik çözücüler ve N-cetyl-N,N,N-trimetil amonyum bromid (CTAB), Na-deoksikolat ve dijitonin gibi deterjanların kullanıldığı kimyasal metotlardır.³² Bu tür kimyasal işlemler hücre membranındaki bazı lipidlerin ayrılmasına neden olarak küçük molekül ağırlıklı substratların ve ürünlerin membrandan difüzyonunu, enzim gibi makromolekülleri hücre içinde tutarak, kolaylaştırır. Geçirgenlik için yapılan işlemler hücrelerin ölümüne neden olsa da intrasellüler enzimlerin ekonomik bir şekilde kullanılmasını sağlar. Bu metod kofaktör rejenerasyonu veya metabolik solunum gerektirmeyen basit biyosensör yapımlarında kullanılır.¹⁶

Saf enzimlerle karşılaştırıldığında hücre bazlı biyosensörlerin düşük özgül aktiviteleri hücre kullanımını sınırlandıran bir diğer faktördür. Bu genel olarak hücredeki diğer enzimlerce katalizlenen ve istenmeyen yan tepkimelerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Özgül olmayan reaksiyonları minimize etmek için birtakım yaklaşımlar araştırılmaktadır. Hücre geçirgenliğinin artırılması, istenmeyen yan tepkimelere neden olan küçük molekül ağırlıklı kofaktörlerin salınımını sağlar. Bunun sonucunda; örneğin laktozu etanol ve CO₂'ye dönüştüren intrasellüler β -galaktozidaz enzimini içeren maya hücresi geçirgenlik işlemine tabi tutulduğunda birçok kofaktörü kaybettiğinden laktozu ancak glukoz ve galaktoza dönüştürebilir.^{33, 34} Cansız hücrelerde, hücre içindeki diğer enzimlerce gerçekleşen yan tepkimeler o enzimin fiziksel (ısıtmayla) ya da kimyasal olarak inaktive edilmesiyle de minimize edilebilir.^{35, 36}

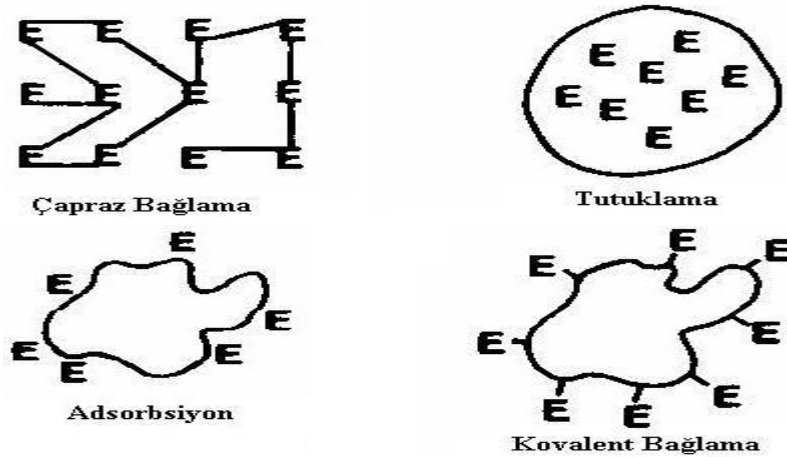
2.3. Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri

Analiz edilmesi hedeflenen örneğe uygun biyokomponent ve iletici seçildikten sonra bu iki eleman birbirine bağlanmalı yani biyokomponent iletici yüzeyine immobilize edilmelidir.^{13, 37}

İmmobilizasyon için kullanılan temel yöntemler şöyledir:

- I. Adsorbsiyon (kovalent olmayan bağlama)
- II. Tutuklama
- III. Çapraz Bağlama
- IV. Kovalent Bağlama

Bu immobilizasyon yöntemleri şematik olarak Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi.

Biyosensörün ömrü immobilizasyon işlemiyle biyokomponentin iletici yüzeyinde ne kadar süre tutulabildiğine bağlı olduğundan, biyokomponentin uzun süre yüzeyden ayrılması engellenmelidir. Enzimlerin immobilizasyonunda enzimin aktif merkezi immobilizasyon esnasında zarar görmemeli ya da enzim aktivitesinde sterik engel nedeniyle düşüş olmamasına dikkat edilmelidir.³⁸

2.3.1. Adsorbsiyon

İmmobilizasyon için kullanılan en basit yöntemlerden biridir. Biyokomponentin iletici yüzeyine non-kovalent etkileşimler (hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri, elektron geçiş kompleksleri ve Van der Waals kuvvetleri) ile tutturulması prensibine dayanır. Adsorbsiyonda kullanılan başlıca adsorbanlar; selüloz, silika jel, cam, hidroksiapatit, kollajen, kil, polimerik aromatik reçinelerdir.³⁹

2.3.2. Tutuklama

Yüksek molekül kütleli biyomoleküller sentetik veya doğal jel matrislerde, yarı geçirgen membranlarda, misellerde ve mikro kapsüllerde tutuklanarak etkin bir şekilde immobilize edilebilirler.⁴⁰

Jel matrise tutuklamada kullanılan başlıca malzemeler akrilamit polimerleri, jelatin tabakaları, nişasta, kalsiyum aljinat jelleri, silikon lastiği, polivinil klorür, polivinil alkoldür.⁴¹

2.3.3. Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama; küçük moleküllü bir ya da multi-fonksiyonel gruplar içeren kimyasal reaktifler kullanarak biyokomponent ile adsorban arasında çözünmeyen kompleksler oluşturma prensibine dayanır. En çok kullanılan çapraz bağlama ajanlarından biri glutaraldehit. Glutaraldehit dışında heksametilen diizosiyanat, 2-izosiyanato-4-izotiyasiyanato-toluen, 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen, bisdiazobenzidin-2,2- disülfonikası gibi kimyasallarda çapraz bağlamada kullanılabilir.⁴²

2.3.4. Kovalent Bağlama

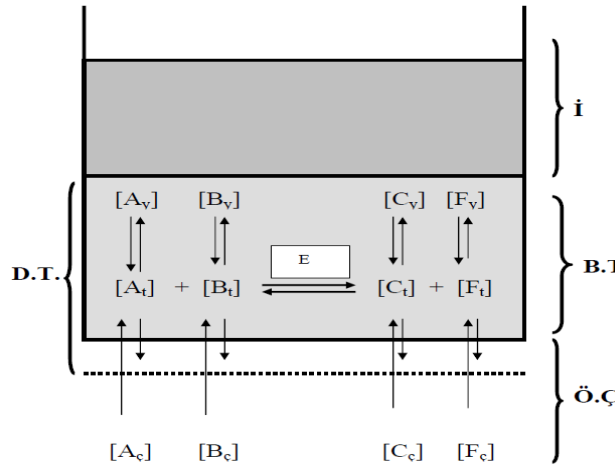
Kovalent bağlamanın gerçekleşmesi için bağlanma yüzeyinde ve/veya biyomolekül üzerinde tiyol (-SH), hidroksil (-OH), amin (-NH₂), karbonil (-C=O), karboksil (-COOH) gibi reaktif grupların olması gerekmektedir. Bu reaktif gruplar olmadığı

takdirde çeşitli manipölasyonlarla (kendiliğinden oluşan tek tabakalar, SAM vb. gibi) reaktif gruplar oluşturulabilir. Biyomolekül, aktive edilmiş iletici yüzeyine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanıp immobilize biyokomponenti içeren tabaka ile iletici yüzeyinde film oluşturulabilir.²⁴

Biyokomponentlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonu pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi değişkenlere karşı direnç sağlar ve biyosensörün ömrünü uzatır ancak biyoaktif tabakada bir miktar aktivite kaybına sebep olabilir.⁴³

2.4. Elektrokimya Esaslı Enzim Biyosensörleri

Enzim temelli biyosensörlerin pek çoğunda elektrokimyasal esaslı ileticiler kullanılır. Bu ileticiler ile amperometri ve/veya potansiyometri ilkelerine göre ölçümler alınabildiğinden genellikle oksidoredüktaz (elektron açığa çıkaran enzimler) sınıfı enzimler kullanılır.⁴⁴ Bir enzim biyosensörü Şekil 2.5’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Enzim biyosensörünün genel çalışma ilkesi (A: Substrat, B: Kosubstrat veya Koenzim, C ve F: Ürünler, ç: Ölçüm çözeltisi içindeki, t: biyoaktif tabakadaki ve y: elektrot yüzeyindeki derişimler. D.T: Difüzyon tabakası, Ö.Ç.: Ölçüm çözeltisi, B.T.: Biyoaktif tabaka, İ: İletici)

Şekilde de görüldüğü üzere A substratı elektrot yüzeyine immobilize olmuş enzim tarafından B koenziminin yardımıyla C ve F'ye dönüştürülür. Bu dönüşüm sonrasında elektrot yüzeyinde madde derişimlerindeki farklanma iletici tarafından sinyal olarak yansıtılır.

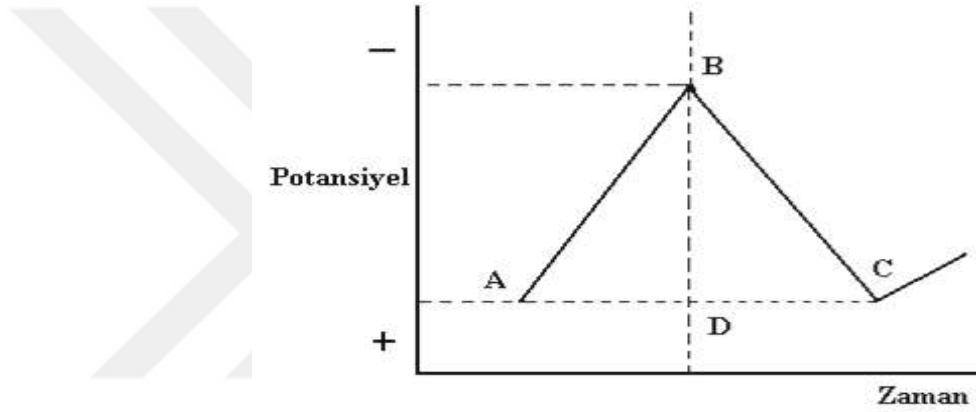
2.4.1. Amperometrik Esaslı Enzim Biyosensörleri

Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas almaktadır. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da

indirgenen elektroaktif türlerin derişiminin bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş görmektedir. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin derişimlerinin belirlenmesinde yararlanılmaktadır. İletici sistem olarak bir amperometrik sensörün kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük fark, ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir.¹⁵

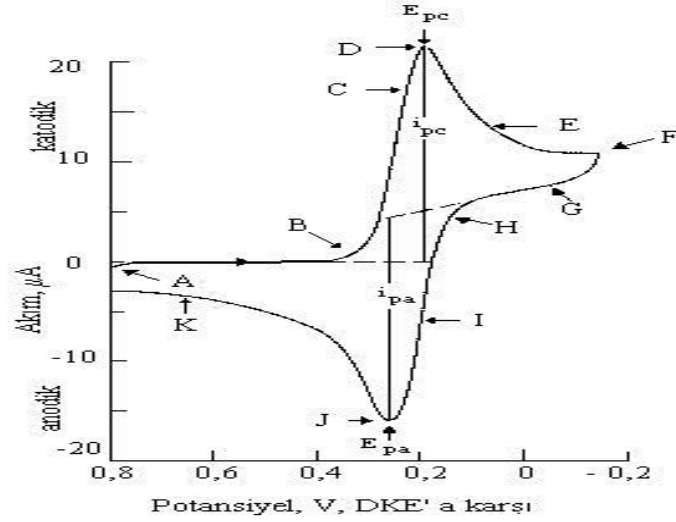
2.4.1.1. Döngüsel voltammetri (Cyclic Voltammetry, CV)

Döngüsel voltammetride (CV), karıştırılmayan bir çözeltide küçük durgun bir elektrodun akım cevabı bir üçgen dalga şekilli potansiyel ile uyarılır (Şekil 2.6)⁴⁵



Şekil 2.6 İkizkenar üçgen dalgası şeklinde uygulanan potansiyel.

Döngüsel voltammetride belli bir potansiyel aralığında doğrusal olarak tarama yapılır, sonra tarama yönü ters çevrilir ve potansiyel orijinal değerine getirilir. Her iki yöndeki tarama hızı aynıdır. Bu uyarma çevrimi birkaç kez tekrarlanır. Ters yöndeki potansiyellere döndürme potansiyelleri denir. Döndürme potansiyellerin aralığı, bir veya daha fazla analitin difüzyon kontrollü bir yükseltgenme veya indirgenmenin meydana geldiği potansiyeldir. Başlangıç taramasının yönü negatif veya pozitif olabilir. Bu da numunenin bileşimine bağlıdır. Daha negatif potansiyeller yönünde bir tarama ileri tarama, zıt yöndeki tarama da ters tarama olarak adlandırılır. Üçgen dalga uygulandığında Şekil 2.7'deki gibi bir voltammogram elde edilir.⁴⁶



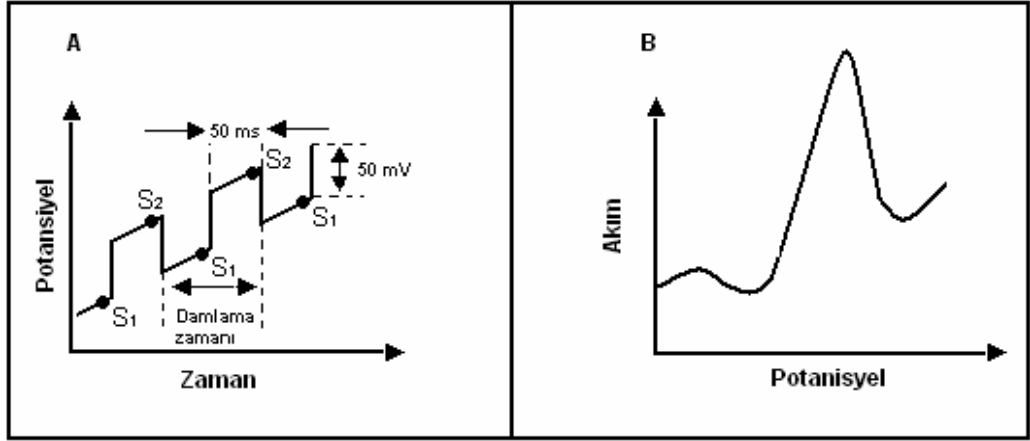
Şekil 2.7 Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltammogram.

Bu eğri şöyle yorumlanır; gittikçe artan bir katodik gerilim uygulandığında eğrinin ABDF dalı elde edilir. İndirgenme sebebiyle bir katodik akım gözlenir (B noktası). B'den D'ye kadarki bölgede indirgenebilen maddenin yüzey derişimi gittikçe küçülürken, akımda hızlı bir artış olur. Pik akımı iki bileşenden meydana gelir. Biri, analitin yüzey derişimini Nernst eşitliği ile verilen denge derişimine eşitlemek için gerekli kapasitif akım artışıdır. İkincisi ise normal difüzyon kontrollü akımdır. Sonra ilk akım, difüzyon tabakası elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça hızla azalır (D noktasından F noktasına). F'de uygulanan katodik gerilim azalmaya başlar. FH bölgesinde indirgenebilen maddenin indirgenmesi devam eder. Ancak indirgenmiş madde derişimi azalmış olduğundan akım da azdır. Potansiyel yeteri kadar pozitif olduğunda indirgenme daha fazla devam etmez, akım sıfıra gider ve sonra da anodik olur. Anodik akım, ileri yöndeki tarama sırasında yüzey yakınlarında biriken indirgenmiş maddenin yeniden yükseltgenmesi sonucu oluşur. Bu anodik akım pik yapar ve sonra biriken indirgenmiş maddenin anodik tepkime yoluyla kullanılmasıyla azalır. ⁴⁷

2.4.1.2. Diferansiyel puls voltametrisi

Diferansiyel puls voltametrisinde uyarma sinyalleri; doğrusal bir tarama esnasında periyodik pulsların oluşturulmasıyla gerçekleştirilir. Bu yöntemle, yarı-dalga potansiyelleri arasında yaklaşık 0,05 V fark olan maddelerin bile pik maksimumları elde edilebilmektedir. Duyarlılık sınırı 10^{-7} – 10^{-8} M'dır. Duyarlılığın yüksek olmasının nedeni; ölçümün, faradayik akımın en yüksek, kapasitif akımın en düşük olduğu anda

yapılmasından kaynaklanır. Potansiyel aniden artırıldığında, elektrot yüzeyi etrafındaki analit tabakasında, analit derişimini yeni potansiyel tarafından belirli bir seviyeye düşürecek akım artışı gerçekleşir. Ancak bu potansiyel için gerekli denge derişimine erişilince, akım difüzyonu karşılayacak seviyeye gelir. Buna difüzyon kontrollü akım denir.⁴⁸



Şekil 2.8 A) Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali, B) Diferansiyel puls voltametrisine ait bir voltamogram

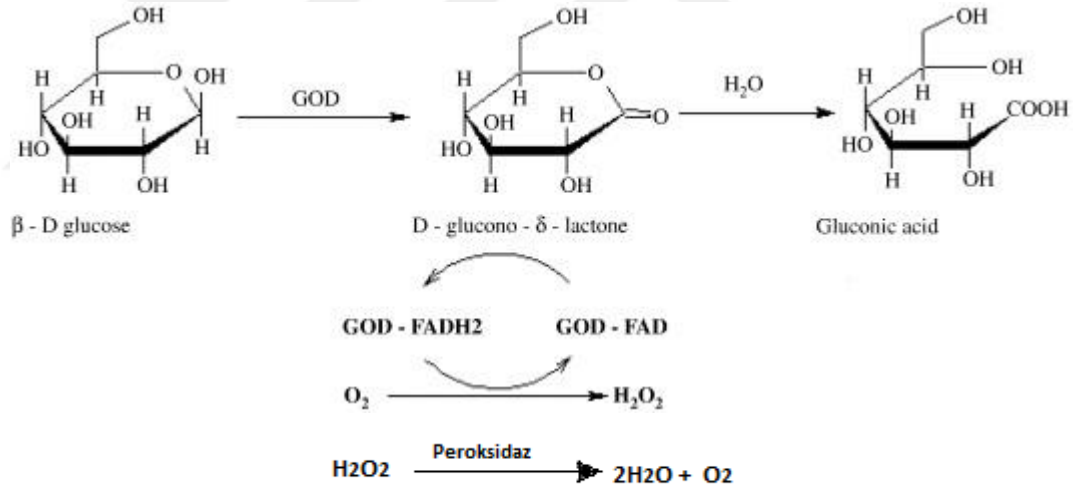
2.5. Glukoz Oksidaz Enzimi

Mantar kökenli bir enzim olan glukoz oksidaz enzimi (GOD) (EC 1.1.3.4), 1950’li yıllardan beri teknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır.⁴⁹ GOD, farklı mantar kaynaklarından saflaştırılır ve özellikle *Aspergillus*,⁵⁰⁻⁵² cinsi mantarlardan elde edilmektedir. GOD, kurutulmuş yumurtadan glukozun çıkarılması, besin maddelerinin renk ve tatlarının geliştirilmesi, raf ömrünün uzatılması, meyve suyu ve konserve içeceklerde oksijenin uzaklaştırılması ve mayonezin ekşimesini önlemeyi de içeren birçok ticari uygulamada kullanılmaktadır. Aynı zamanda katalazlı otomatik glukoz deneme kitlerinde ve özellikle kan, idrar gibi vücut sıvılarında ve endüstriyel sıvılardaki glukozun belirlenmesini sağlayan biyosensörlerde kullanılmaktadır.^{52, 53} GOD; *Salmonella infantis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogens* gibi farklı gıda kaynaklı patojenlere karşı en iyi antagonistik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. GOD diş macununda katkı maddesi olarak ve besinlerin korunmasında da kullanılmaktadır.⁵⁴ Vücuda yerleştirilebilir glukoz sensörleri diyabetli hastalarda uygulanmaktadır.³⁶ Ticari GOD

geniş ölçüde kullanılmasına rağmen biyoteknolojideki uygulamalarda faydalı özelliklerini kullanmak için yeni formülasyonlar geliştirilmektedir.⁵⁰

2.5.1. Glukoz oksidaz tepkime mekanizması

GOD, elektron alıcısı olarak moleküler oksijen kullanan β -D-glukozun, D-glukono-delta lakton ve hidrojen peroksit oksidasyonu ile kataliz eden bir flavoproteindir. Bu reaksiyon yükseltgen ve indirgen adım olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır (Şekil 2.8). İndirgen tepkimede GOD, β -D-glukozun D-glukonolaktone dönüşümünü kataliz eder. Daha sonra GOD'ın flavin adenin dinükleotid (FAD) halkası FADH_2 'ye indirgenir. Yükseltgen tepkimede indirgenmiş FAD, H_2O_2 elde etmek için oksijenle tekrar yükseltgenir. H_2O_2 katalaz enzimi ile su ve oksijen üretmek üzere parçalanır. *A.Niger*'deki laktonaz (EC 3.1.1.17) enziminin glukonodelta laktonun glukonik asite hidrolizini sağlayan enzim olduğunu bulmuştur.⁵⁵

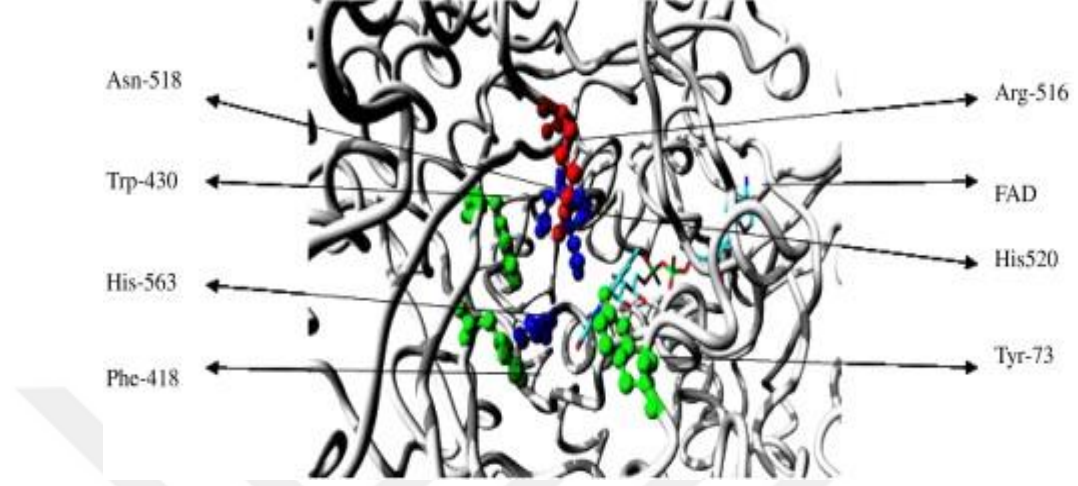


Şekil 2.9. Glukoz oksidaz enzim tepkimesinin gösterimi.

2.5.2. Glukoz oksidazın bileşimi

Asklı mantarlardan elde edilen GOD, birbirine kovalent olarak disülfid bağlarıyla bağlanmış 2 özdeş polipeptit zincirinden oluşan dimerik bir glikoproteindir.¹⁷ Şekilde *P.amagasakiense*'den elde edilen GOD enziminin aktif merkez rezidüsü ve FAD kısmı gösterilmektedir (Şekil 2.10). *P.amagasakiense* kaynaklı Glukoz oksidaz enziminin

FAD kısmı kovalent olarak bağlı değildir.⁵² Bu GOD enziminin yaklaşık %11-13 kadarı mannozdaki zengin karbohidratlar ile glikozillenmiştir.



Şekil 2.10. *P.amagasakiense* kaynaklı Glukoz Oksidaz FAD kısmı ve aktif merkez rezidüleri.

GOD'nin aktif merkez rezidüleri Tyr-73, PHe-418, Trp-430, Arg-516, Asn-518, His-520 ve His-563'ten oluşmaktadır. Arg-516 GOD ile β -D-glukozun etkili bağlanması için en önemli aminoasit iken, Asn-518 daha az bir ölçüde katkıda bulunmaktadır. Aromatik rezidülerden Tyr-73, PHe-418 ve Trp-430 glukoz oksidasyonunun maksimum hızının yanı sıra substratın doğru yönelmesi için de önemlidir. His-520 ve His-563 reaksiyon boyunca glukozun 1-OH grubu ile hidrojen bağı yapmaktadır.⁵⁶

2.5.3. Glukoz oksidazın özellikleri

GOD'nin moleküler ağırlığı yaklaşık 130-175 kDa arasında değişmektedir.⁵⁴ GOD, D-glukozun beta anomeri için yüksek özgüllük gösterirken alfa anomeri için uygun bir substrat olarak görülmemektedir. Substrat olarak D-galaktoz, D-mannoz ve 2-deoksi-D-glukozu kullandığında düşük GOD aktivitesi görülmektedir. GOD inhibitörleri; p-klormeküribenzoat, Ag, Hg, Cu, hidroksilamin, hidrazin, fenilhidrazin, dimedon ve sodyum bisülfattır. *A.Niger* ve *P.amagasakiense* kaynaklı GOD üzerinde yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda moleküler ağırlıkları sırası ile 152 kDa ve 150 kDa olarak saptanmıştır.⁵⁷ Her iki suş tarafından üretilen GOD'da başlıca glukoz, mannoz ve heksozaminde oluşan karbohidratlar benzerdir. *A.niger* kaynaklı GOD *P.amagasakiense*'dekinden daha fazla mannoz ve heksozamin içermektedir fakat

glukoz daha az içerir. *A.niger*'deki karbohidrat içeriği % 16, *P.amagasakiense*' deki ise % 11'dir. *A.niger* GOD'daki aminoasit içeriği tirozin, arjinin ve histidin aminoasitleri bakımından daha zengin iken, *P.amagasakiense* GOD'nda lizin ve fenilalaninden daha zengindir. *A.niger* GOD için optimum pH aralığı: 3.5- 6.5, *P.amagasakiense* için pH : 4.0- 5.5. *A.niger* GOD enzimi daha geniş bir pH aralığına sahiptir. Tablo 2.2'de *A.Niger*'den elde edilen GOD enziminin özellikleri verilmiştir. ⁵⁸

Tablo 2.2.: *A.Niger*'den elde edilen glukoz oksidaz enziminin özellikleri

Özellikler	Değeri
Moleküler ağırlık	150-186 kDa (Swoboda ve Massey 1965; Nakamura ve Fujiki 1968; Tsuge ve ark., 1975)
UV-VIS absorpsiyon (Tsuge et al 1975)	280; 380; 450 (nm) 11.5: 1: 1.03 (oran)
Ekstinksiyon katsayısı ($M^{-1}cm^{-1}$)	270,000 (280 nm'de Solomon ve ark., 1977) 25,180-28,200 (450 nm'de Swoboda ve Massey 1965; Johnson ve ark., 1989) 21,600 (452 nm'de Nakamura ve Fujiki 1968)
Özgül aktivite (pH 5.6, 25-37°C)	80-172 μ mol glukoz/dakika/mg enzim (Swoboda ve Massey 1965; Tsuge ve ark., 1975)
K_m (Michaelis sabiti, glukoz göre)	198-248 mM (pH 5-7, 20-30°C, oksijen; Bao ve ark., 2001) 110-120 mM (pH 5.6, 0-38°C, oksijen; Gibson ve ark., 1964) 50-74 mM (pH 5.5, 15-30°C, oksijen; Nakamura ve Ogura 1968b) 33 mM (pH 5.6, 25°C, oksijen; Swoboda ve Massey 1965) 41.8 mM (pH 6.86, 25°C, benzokinin; Bohmhammel ve ark., 1993b)
Sıcaklık aralığı	20-50°C (Gouda ve ark., 2003)
pH aralığı	4-7 (Keilin and Hartree 1947; Nakamura ve Fujiki 1968; Bao ve ark., 2001)
İnhibitörler	Ag^+ , Hg^{+2} , Cu^{+2} iyonları (μ mol; Nakamura ve Ogura 1968a, Toren ve Burger 1968) Arsenit, p-klormerkürükbenzoat, fenilmerkürükasetat (Nakamura ve Ogura 1968a)
İzoelektrik nokta (pI)	4.2 (Pazur ve Kleppe 1964)

2.5.4. Glukoz Oksidazın karakterizasyonu

2.5.4.1. Substrat özgülüğü

GOD β -D-glukoz için yüksek özgülük ve diğer şekerlerle çok az aktivite gösterir. β -D-glukoz moleküler oksijen varlığında 1. karbondan kendiliğinden glukonik asite hidroliz olan delta-glukono-1,5-lakton'a okside olmaktadır. Bunun yapısal özellikleri ve reaksiyonun bölgesel seçiciliği GOD ve piranoz oksidaz arasındaki ayrımı takip eder ve 2. pozisyonundaki karbon atomundan oksitlenir.⁵⁹

2.5.4.2 Optimum pH ve stabilite

Enzim aktivitesi aktif merkezdeki aminoasitlerin iyonizasyon durumuna bağlı olduğundan, pH doğru konformasyonunu sağlamada önemli rol oynamaktadır. Çoğu protein pH 5-9 arasında dar bir aralıkta aktiftir. *A.niger* ve *P.chrysogenum* glukoz oksidazının optimum pH aralığı 5-7 arasındadır. Bunun aksine *P.funiculosum*⁴³³ ve *P.canescens* glukoz oksidazın optimum pH 6-8.6 arasındadır.⁶⁰

2.5.4.3 Optimum sıcaklık ve stabilite

Enzimler sıcaklık değişimlerine karşı duyarlıdır. Enzimin tepkime oranı ve sıcaklık arasındaki ilişki eksponansiyeldir. Sıcaklığın her 10 derece artışında enzim reaksiyon oranı 2 katına çıkmaktadır. Birçok enzim 40°C ve 70°C sıcaklık arasında denatüre olup aktivitesini kaybedebilir. Enzimin maksimum aktiviteyi gösterdiği sıcaklık enzimin optimum sıcaklığı olarak bilinmektedir. GOD için en düşük optimum sıcaklık 25-30°C ve en yüksek optimum sıcaklık ise 40-60°C'dir.⁶¹

2.5.4.4. Enzim derişimi ile başlangıç hızı değişimi

Michaelis ve Menten enzim katalizinin hızının ve başlangıç hızı substrat derişimi ile hiperbolik olarak değiştiğini belirlemişlerdir. Substrat derişimi ve başlangıç derişimin artması ile V_{max} (maksimum hız-velocity) noktasına ulaşılır. Düşük substrat derişimlerinde, substrat derişiminin bir kısmı başlangıç hızıdır ve birinci derece kinetiği olarak adlandırılır. Yüksek substrat derişimlerinde, başlangıç hızı substrat derişiminden bağımsızdır ve 0. derece kinetik ya da saturasyon olarak adlandırılır. 0.2 U/mL GOD,

GOD boya bağlama deneyleriyle kesin olarak belirlenmiştir. Yüksek GOD aktivitesinde başlangıç hızı kararsız aktiviteye yol açan düşüşle başlamaktadır.⁶⁰

2.5.4.5. Kinetik parametrelerin değişkenliği

Michaelis glukoz oksidazın V_{max} ve K_m değerleri çeşitli araştırmacılar tarafından hesaplanmıştır ve değerlerinde farklılıklar bulmuştur. GOD'nin *T.favus* için K_m değeri 10.9 mM ve *A.niger* için 33 mM. *P.amagasakiense* GOD K_m 5.7 mM ve *P.funiculosum* GOD K_m ise 3.3 mM 'dir. Glikozile ve deglikozile *P.amagasakiense* GOD K_m değerleri ise sırasıyla 3.4 mM ve 2.7 mM 'dır. V_{max} değerleri 450- 1000 U/mg arasındadır.⁶²

2.5.4.6. Depolama stabilitesi

GOD'ın yarı ömrü 37°C'de 30 dakikadır. İmmobilize GOD'nin uygulamadaki en etkili sıcaklık 37°C'dir. PEG, sorbitol, ksilitol, eritritol, gliserol ve etilen glikol içeren polihidrik alkollerin *A.niger* GOD'ı üzerindeki stabilize edici etkisi gösterilmiştir (Ye et al., 1988). Liyofilize GOD preparasyonu 6 ay -20°C'de sabit kalır.⁶³

2.6 Glukoz oksidazın uygulamaları

Birçok endüstriyel ve ticari uygulamada glukoz oksidaz kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak;

- i. Gıda işleme (katkı maddesi olarak)
- ii. Ekmek yapımı
- iii. Süt ve laktoperoksidaz sistemi
- iv. Kuru yumurta tozu
- v. Antioksidan/koruyucu olarak
- vi. Şarapta azaltılmış alkol oranı
- vii. Glukonik asit üretimi
- viii. Oral hijyen
- ix. Glukoz sensörü

2.6.1. Gıda işleme (katkı maddesi olarak): Glukoz oksidaz FDA sınıflandırılması altında genellikle güvenli olarak kabul edilmekte olup gıda endüstrisinde toz veya sıvı formunda katkı maddesi olarak kullanılabilir. Genellikle antioksidan, koruyucu ve stabilize edici özelliği ile sınıflandırılmaktadır. Birçok gıda ürününde glukoz oksidaz kullanılmaktadır. Yiyeceklerde GOD'nin hazırlanması, miselyum hücre duvarında doğal olarak bulunan 2 tipik enzim GOD ve katalazın karışımını içermektedir. Katalazdan GOD'nin ayrılması pahalı ve yiyeceğin hazırlanmasında gerekli değildir. Ayrıca katalaz, GOD tarafından üretilen hidrojen peroksitin yıkılmasına yardımcı olur ve bu yüzden hidrojen peroksitin inhibisyonunu ve deaktivasyonunu azaltır.⁶⁴

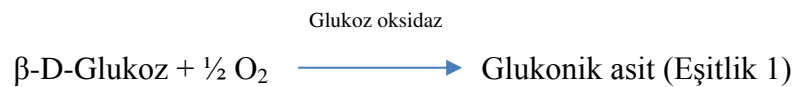
2.6.2 Ekmek yapımı: Olgunlaştırıcı/oksitleyici ajanlar un için katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Amaç gluten miktarını arttırarak ekmeğin kıvamını iyileştirmektir. Bu unda bulunan iki protein olan gliadin ve glutenenin oksidasyonu aracılığıyla gerçekleşmektedir. Gluten formu; gliadin ve glutenen'in su ile teması sonucu oluşur ve bu olgunlaşma mayanın katkısıyla desteklenmektedir. Bu süreçte küçük miktarlarda da olsa olgunlaşma ajanlarına ihtiyaç vardır ve genellikle potasyum bromat ($KBrO_3$) kullanılmaktaydı. Ancak daha sonra bromatın *in vivo* ve *in vitro* DNA hasarına neden olarak kanser gelişim sürecini hızlandırdığından dolayı karsinogenik bir ajan olarak kabul edilmiştir. Sonuç olarak birçok ülke gıdalarda bromat kullanımını yasaklamış ve buna alternatif olarak glukoz oksidaz kullanmaya başlamıştır. GOD, somun hacmi artmış ve kıvamı gelişmiş bir ekmeği üretmede etkili bir oksitleyicidir. GOD oksidasyonu hidrojen peroksitin üretimi ile sonuçlanır ve GOD kullanmadan hazırlanan hamura göre daha elastik ve yapışkan olduğu görülmüştür.⁶⁵

2.6.3 Süt ve laktoperoksidaz sistemi: Glukoz oksidazın en önemli uygulamalarından biri de gıda sektöründe koruyucu olarak görev almasıdır. Laktoperoksidaz (LP) sistemi glukoz oksidaz ile beraber kullanıldığında çok yararlı bir antimikrobiyal ajandır. Laktoperoksidaz sistem, immün sistemin yabancı mikroorganizmalara karşı doğal savunma mekanizmasının bir parçasıdır ve süt, gıyzaşı ve tükürük gibi memeli salgılarında bulunabilir. Bu sistem laktoperoksidaz, tiyosiyanat ve hidrojen peroksit olmak üzere üç bileşenden meydana gelmektedir. LP sistem

aktivasyonu sadece yalnızca tiyosiyanat ve hidrojen peroksit varlığında meydana gelir. Laktoperoksidaz ile kataliz, insanlar için tamamen güvenli ve antimikrobiyal olan aktif ara ürünler üretir. Glukoz oksidaz ve substratı (glukoz) LP sisteminde hidrojen peroksit ihtiyacı duyar ve sistemin sürekli olarak yenilenmesini ve üretilmesini sağlar. ⁶⁴

2.6.4 Kuru yumurta tozu: Maillard (enzimatik olmayan esmerleşme tepkimesi) indirgen şekerler ve aminoasitler ya da proteinlerin amino grubu arasındaki tepkime sonucu oluşur. Kurutulmuş yumurta tozu üretiminde bu tepkime, istenmeyen tat oluşumuna ve esmerleşmeye neden olur. Bu yüzden sıvı yumurtadaki glukoz (~4 g/L) püskürtmeli kurutmadan önce çıkarılır. Glukozun çıkarılması aynı zamanda daha uzun raf ömrüne ve mikrobiyal toleransın artmasına neden olur. Bunun yanı sıra tepkimeye üretilen hidrojen peroksit sıvı yumurtada yaygın olarak bulunan mikroorganizmaların büyümesini engeller ya da öldürür. Püskürtmeli kurutmadan önce glukoz oksidaz ile yumurtadan glukozun çıkarılması FDA (Food and Drug Administration) tarafından izin verilen glukoz çıkarılma yollarından biridir. Maillard tepkimesi ile istenmeyen esmerleşme sadece yumurtaya özgü bir durum değildir. Patates ürünlerinde de aynı sorunla karşılaşmakta ve glukoz oksidaz, glukoz bileşimini azaltarak esmerleşmeyi de azaltmaktadır. ⁶⁵

2.6.5 Antioksidan/koruyucu olarak: Oksijen varlığı, pek çok gıda ürününde sorundur. Mayonez ve salata sosları gibi yüksek yağ oranı içeren besinlerde lipid oksidasyonu, acı tada ve bozulmaya neden olabilir. Şarap ve bira gibi içkilerde de durum benzerdir ve içeceklerdeki oksijenin uzaklaştırılması, tat ve lezzetin korunmasına yardımcı olmaktadır. Konserve ve paketlenmiş yiyeceklerde oksijen bakteriyel büyümeyi teşvik ettiğinden dolayı anaerobik ortam sağlamak için gıda ile kapak arasında kalan bölgedeki oksijen uzaklaştırılmak istenir. Saflaştırma işleminde, oksijen enzimatik olmayan Maillard tepkimesine katkıda bulunabilir bu yüzden uygun kontroller yapılmalıdır. ⁵⁴



Glukoz oksidaz ile katalizlenen genel tepkimede (Eşitlik 1) 2 glukonik asit molekülü üretmek için 2 glukoz molekülü ve 1 oksijen molekülü tüketilmektedir. Bu tepkimede tüketilen GOD, çeşitli yiyeceklerde koruyucu olarak ve aktif oksijen tutucu antioksidan olarak kullanılır. İnsan tüketimi için güvenli olduğu bilinen glukonik asitin WHO (World Health Organization) tarafından kabul edilebilir günlük alım sınırı belirlenmemiştir. Tüketicilerin talebi ile birlikte kimyasal antioksidan ile doğal oksijen tutucu olan GOD'nin yer değiştirmesi GOD'yi yiyeceklerin korunmasında en iyi aday yapmaktadır.

2.6.6. Şarapta azaltılmış alkol oranı: Şeker, fermentasyon ile üretilen alkol yapımındaki en önemli bileşendir çünkü alkol üretmek için *Saccharomyces cerevisiae* tarafından kullanılan primer substrattır. Meyve suyu gibi içeceklerden şarap fermentasyonu için glukoz azaltılabilir ve düşük alkol içeriği ile sonuçlanabilir. Alkol oranı azaltmış şaraplara olan talepten dolayı farklı teknolojilerin kullanımı ile ilgili araştırmalar başlatılmıştır. Bu teknolojilerden biri de glukoz oksidaz kullanarak mevcut glukoz miktarını azaltmak ve bunun sonucunda düşük alkol içeriği elde etmektir.⁶⁶

2.6.7 Glukonik asit üretimi: Glukonik asit ve bunların yan ürünü olan tuzlar genellikle güvenli olarak kabul edilmekte ve tekstil boyama, metal yüzey temizleme, gıda katkı maddeleri, deterjanlar, kozmetik ve ilaç dahil olmak üzere sanayide geniş bir yelpazede kullanılmaktadır. Gıda katkı maddesi olmasının yanı sıra asitliği düzenleyici, renk sabitleyici, antioksidan olarak da kullanılabilir. Endüstriyel olarak fermentasyondan üretilen glukonik asidin yılda 50.000/100.000 ton kadar küresel üretimi yapılmaktadır.⁶⁷

2.6.8 Oral hijyen: Laktoperoksidaz gibi glukoz oksidaz da ağız bakım ürünlerinde antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilir. *Streptococci* gibi birçok mikroorganizma diş çürüklerine neden olmakta ve GOD tarafından üretilen hidrojen peroksit, bakterisid olarak hareket eder. Glukoz oksidaz'ın bu özelliği sayesinde antikorların ağır zinciri ile enzimin füzyonu sonucunda *Streptococci* mutantları öldürülür.

2.6.9 Glukoz sensörü: Son zamanlarda biyosensörlerin dünya piyasası değerlerinin 5 milyar dolar olduğu tahmin edilmekte ve bunların da % 85'i glukoz biyosensörüdür. Glukoz oksidaz, yaygın olarak sağlık ve gıda endüstrisi için amperometrik biyosensör oluşturmak için kullanılmıştır. Bu sistemde, referans elektrod ve çalışma elektrodu arasında sabit elektrik potansiyeli uygulanır ve hedef molekülün derişimi ile orantılı olarak katalitik tepkime gerçekleşir.⁵⁰

2.7. Glukozun Sağlıktaki Önemi

Glukoz, altı karbondan oluşmuş bir monosakkarittir. Başta beyin olmak üzere organizmanın en önemli enerji kaynağı olan glukoz, az veya hiç mitokondrisi olmayan hücrelerin (eritrosit gibi) gereksinim duyduğu enerji kaynağıdır. Ayrıca vücudumuzda kanda ve az miktarda lenf bezlerinde bulunmaktadır. L ve D konformasyona sahip olup, vücudumuz sadece D-glukozu tanır.¹⁷

Kan glukoz düzeyi belirli sınırlar içinde sabit durumdadır. Referans değerleri arasında bulunan glukoz değerine normoglisemi, referans değerlerin altında ise hipoglisemi ve referans değer üstünde ise hiperglisemi olarak değerlendirilir. Kan glukoz seviyesi, glukoz metabolizması ile ilgili bütün metabolik yolların (glikoliz, glikojenoliz, glikojenez, glukoneogenez vb.) birbiriyle uyumlu çalışması ve kontrolü ile ayarlanır. Kan glukoz seviyesinin düzenlenmesinde, karaciğer ve hormonlar çok önemlidir. Kısa süreli açlıklarda, karaciğerdeki glikojenden glikojenoliz sonucu kana glukoz verilirken uzun süreli açlıklarda ise karaciğer tarafından glukoneogenezle kana glukoz verilir.⁶⁸

Son yıllarda kan glukoz seviyesinin yüksek olmasıyla bağlantılı ölüm riski, araştırmacılar tarafından en çok çalışılan konulardan biridir. Hiperglisemi; **Akut koroner sendromu** olan hastalarda (ACS), sıklıkla görülür ve diyabetli olan ve olmayan hastalar için mortalite ve morbidite açısından bağımsız bir belirleyicidir. Akut koroner sendromlu hastalarda hiperglisemik sonuçların takibi, kısa ve uzun vadeli yan etkilerin yok edilmesinde büyük önem taşımaktadır. Yoğun bir metabolik tedavi ile hipergliseminin olumsuz etkileri bu hastalarda önlenabilir. Çok merkezli klinik denemeler sonucunda glukoz kontrolünün sıklığı, hiperglisemisi olan ACS'lu hastalardaki komplikasyon ve mortalite oranlarının azalmasıyla ilişkilidir. Hiperglisemi; hem doğuştan hem de sonradan edinilen **bağımsızlık sistemini** değiştirerek enfeksiyona

duyarlılığını arttırmaktadır. Akut hiperglisemi; enfeksiyona karşı doğuştan oluşan bağışıklık yanıtını değiştirebilir ve kötü sonuçlara yol açabilir.⁶³

Hiperglisemi ile ilişkili **kardiyovasküler komplikasyonların** sıklığı giderek artan küresel bir sağlık problemi haline gelmiştir. Non-oksidatif glukoz yolağındaki mediyatörler, kardiyak endotel hücreleri etkileyerek hiperglisemiyle bağlantılı hasara yol açmaktadır.

Hiperglisemi ve **akut böbrek hasarı** arasındaki ilişki (**AKI**) ameliyat dönemi boyunca daha net gözlenmektedir. Yani hiperglisemi cerrahi bir komplikasyon olarak AKI riskini arttırmaktadır. Yeni girişimsel çalışmalar ve meta analizler, yoğun bir şekilde glukoz derişiminin kontrol altında tutulmasının böbrek hasarına karşı tedaviye yanıtta olumlu sonuç alınmasını sağladığını göstermektedir.

Şeker hastalığı (Diabetes Mellitus), dünya üzerinde 2014 yılı itibariyle 422 milyon kişinin etkilendiği hiperglisemiye bağlı bir hastalıktır. 1980 yılına kıyasla yetişkin nüfusta görülme oranı %4.7'den %8.5'e kadar yükselmiştir. 2012 yılında diyabet nedeniyle ölümler 1.5 milyon kişiye ulaşmıştır. 2.2 milyon kişi ise diyabete bağlı komplikasyonlardan (kardiyovasküler hastalıklar gibi) dolayı ölüm gerçekleştirmiştir. Bu hastalığın komplikasyonları, kanda glukozun düzenli takibi ile büyük oranda azaltılabilmektedir. Bu nedenle milyonlarca diyabet hastası, kandaki glukoz derişimini düzenli olarak ölçmektedir. Bu da glukozu en çok test edilen analit haline getirmektedir.

2.8. Glukoz Oksidaz Enziminin Kan Glukoz Düzeyi Tayinindeki Önemi

Kan glukozunu ölçmek için birçok analitik yöntem kullanılmaktadır. Geçmişte, yalancı olarak artmış değerlerle sonuçlanan göreceli olarak özgül olmayan analizler sıklıkla kullanılmıştır. Şuan sıklıkla kullanılan yöntemlerin hemen hepsi enzimattiktir. Amerikan Patoloji Uzmanları Koleji (CAP) tarafından yürütölen son incelemeler; en sık kullanılan yöntemin hegzokinaz yöntemi olduğunu bunun sebebinin de üretici firmalar tarafından otomatize cihazlara uyarlanması olduğunu bildirmiştir. Glukoz oksidaz yöntemi yaygın olarak en sık kullanılan diğer yöntemdir. Aynı zamanda manuel olarak en sık olarak kullanılan yöntemdir. CAP incelemelerinde sıvı kontrol serumlarının tüm yöntemlerle elde edilen glukoz değerlerinde %5'ten az bir CV (Varyasyon katsayısı) meydana getirdiği görölmüştür. Laboratuvar ölçümlerinde teste göre değışse de genellikle CV'nin üst sınırının %5'i geçmemesi beklenir.⁵²

Glukoz oksidaz ölçümleri serum, plazma ve tam kanda kullanımının uygunluğunun yanı sıra beyin omurilik sıvısı (BOS) glukozu ölçümü içinde uygundur. Fakat idrar, peroksidaz tepkimesini yalancı olarak düşük sonuçlar oluşturarak, etkileyen maddeleri (ürük asit gibi) yüksek derişimde içerir. Bu nedenle glukoz oksidaz enzimi idrar ölçümlerinde kullanılmamalıdır.⁵⁷ Literatürde idrarın ölçümünü etkileyen maddeleri uzaklaştırmak için iyon değıştirici reçine ile ön işlemin uygulandığı yöntemler tanımlanmaktadır.

Bazı cihazlarda, glukoz oksidaz içeren çözeltiye örnek eklendikten sonra oksijen tüketim hızını ölçen polarografik oksijen elektrodu bulunur. Bu ölçüm sadece glukoz oksidaz tepkimesini kullandığından peroksidaz aşamasında elde edilen etkileşimleri elimine eder. Hidrojen peroksitten, oksijen oluşumunu engellemek için, bazı glukoz oksidaz enzimlerinde var olan katalaz yolu ile peroksit uzaklaştırılır. Bu işlem idrar, serum, plazma veya BOS örneklerine direkt olarak uygulanabilir. Bununla beraber, bu yaklaşım kan hücreleri oksijeni kullandığından tam kanda glukoz ölçümü için kullanılamaz.⁵⁰

Çoklu tabakalı slayt kullanan otomatize kuru kimya analiz sistemlerinde glukoz, glukoz oksidaz yöntemi ile ölçülür. 10 mL serum, plazma, idrar veya BOS örnek reaktif içeren tabakanın en üstünde yer alan delikli film üzerine yerleştirilir. Glukoz film tabaka üzerinden difüze olur ve renkli son ürün veya boya oluşturmak için reaktiflerle tepkimeye girer. Bu boyanın yoğunluğu, saydam film içinden reflektans spektrofotometresiyle ölçülür. Düşük örnek miktarı, sıvı olmayan reaktifler, örnek saklamada gelişmiş stabilite bu yöntemin avantajlarındandır.⁶⁹

Kan glukoz düzeyi tayinine yönelik geliştirdiğimiz biyosensör için prensip şu şekildedir: Glukoz, glukoz oksidaz varlığında enzimatik tepkime sonucunda belirlenir. Tepkimede oluşan hidrojen peroksit, peroksidaz katalizörlüğünde kuinoneimin, su ve moleküler oksijen oluşur. Oluşan oksijen miktarı ile glukoz derişimi doğru orantılıdır.



2.9. Glukoz Tayininde Biyosensör Kullanımı

Glukoz tayini, biyokimya ve gıda gibi birçok alanda en önemli analitlerin başında gelmektedir. Bugün için glukoz tayini, titrimetrik ya da kolorimetrik metodlar kullanılarak sağlanmaktadır. Bu metodlar, analizde girişim yapabilecek olan proteinlerin çöktürülmesi gerekliliği ve seçiciliğin düşük olması ile karakterizedir. Bu koşullar altında biyosensörler, zaman alan geleneksel tekniklere ve iş yüküne bir alternatiftir. Bugüne kadar glukoz tayini için; potansiyometrik, amperometrik, optik, kolorimetrik ve viskometrik olmak üzere birçok biyosensör çalışması yapılmıştır.¹⁰ Bu çalışmada amperometrik biyosensör kullanılarak yapılan glukoz tayinindeki biyomateryalleri inceleyelim.

2.10. Glukoz Oksidazın İmmobilizasyonu

Enzim immobilizasyonu temel akademik araştırmalardan birçok farklı endüstriyel uygulamalara kadar geniş bir yelpazede ilgi çekmektedir. Bugüne kadar çok sayıda immobilize enzim bazlı işlemlerin ekonomik olduğu kanıtlanmıştır. Başlıca gıda endüstrisinde serbest enzimle katalizlenen işlemlerin yerini alarak büyük ölçekte kullanılmıştır.

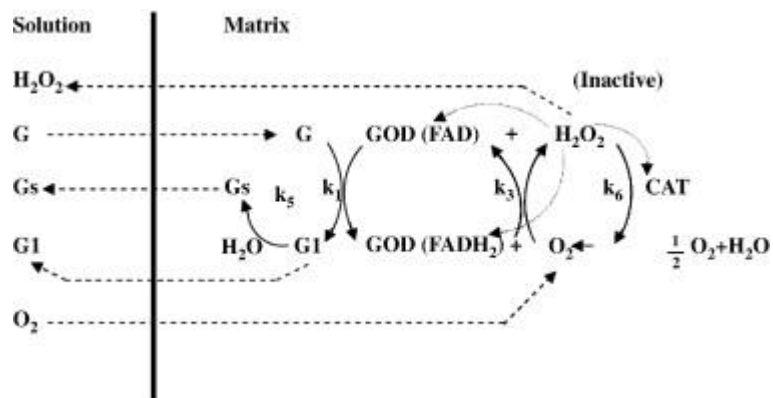
Nikel ekran, gözenekli cam partiküller, katı cam partiküller ve selüloz gibi destek çeşitleri enzimlerin immobilizasyonu için kullanılmaktadır. Nispeten daha geniş yüzey alanına sahip materyallerle oluşan avantajlardan dolayı gözenekli cam ve selüloz en popüler destek olmuştur. Örneğin, APTES (gamaaminopropiltrietoksilan) ile gözenekli cam üzerinde GOD enziminin depolama kararlılığı ve hazırlığı çeşitli araştırmacılar tarafından yapılmış ve GOD immobilizasyonundan önce camın silanizasyonu yapılmıştır. Katı ve gözenekli camların her ikisi üzerinde de immobilize edilen GOD, birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Buna ek olarak, nikel oksit ekran silanize edilebilir ve GOD tiyofosgen yöntemiyle bağlanabilir ancak ekran küçük bir yüzey alanına sahiptir. GOD glutaraldehit gibi bir ajanla çapraz bağlanması zordur ancak polietilenimin gibi yüksek sayıda reaktif amino gruplarına sahip belli proteinlerin varlığında daha kolay çapraz bağ yapmaktadır.⁴⁹

GOD ve CAT (katalaz enzimi) eşzamanlı ko-immobilizasyonu için destek olarak inorganik ve gözenekli magnezyum silikat (florisil) birçok araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Taşıyıcının gözeneklerinde bağlı olan GOD tarafından üretilen glukonik asidin kısmi nötralizasyonu önemli bir rol oynayabilir. Bağlı enzimlerin

mikroçevrelerindeki pH azalması denatürasyonu engelleyebilir ve böylece ko-immobilize olan GOD/CAT oranının stabilitesini arttırabilir.⁴⁹

Katalitik aktivitesi esansiyel olmayan enzimler, fonksiyonel grupları aracılığıyla desteğe kovalent olarak bağlanabilir. Fakat bağlanmanın sonunda enzim aktivitesindeki değişimden ya da aktif merkezin kapanmasından dolayı immobilizasyonun enzim aktivitesini düşürdüğü bilinmektedir. Bağlanan karışıma kompetitif inhibitörün ya da substratın katkısı, aktivite kaybına karşı enzim üzerinde aktif merkezi korumaktadır. Bu substratlar varlığında enzimlerin immobilizasyonu ile ilgili birçok çalışma mevcuttur.⁷⁰

GOD ve CAT aktif bölgelerini korumak için, ko-immobilizasyon GOD'ın substratı olan glukoz varlığında uygulanmıştır. Bağlanma süresince CAT'ın substratı olan hidrojen peroksiti üretmek için GOD glukozu okside etmektedir. Böylece ko-immobilizasyon glukoz ve hidrojen peroksit ve bunların substratları olan glukoz oksidaz ve katalaz varlığında uygulanmıştır. Ko-immobilize GOD için 15 mM glukoz ve CAT için de 20 mM glukoz varlığında maksimum aktivite rapor edilmiştir. Bu substratların varlığında GOD ve CAT'ın ko-immobilizasyonu, bu enzimlerin tekrar kullanılabilirliği ve aktivitesini önemli derecede arttırmaktadır. GOD, katalitik turnover sırasında hidrojen peroksitin artan derişimiyle inaktive edilir. Hidrojen peroksit inaktivasyonu sistemden ayrılan ve hidrojen peroksiti azaltan CAT ile düşürülür. Bu tepkime ile bir miktar oksijen geri kazanılır ve glukoz oksidasyonu için hazır hale getirilir.⁶⁴



Şekil 2.11. Heterojen sistemlerde tepkime ve transport süreçleri için basitleştirilmiş şeması.

Buchholz and Godelmann, indirgenmiş GOD'nin yükseltgenmesi ve hidrojen peroksitin deaktivasyonu gibi deaktivasyonel parametreleri ve tepkime mekanizmalarını

açıklamışlardır (Şekil 2.11). CAT, hidrojen peroksite H_2 ve H_2O 'ya dönüşümüyle hidrojen peroksite deaktivasyonundan GOD'yi önlemede anahtar rol oynar. CAT, GOD/CAT sistemindeki koruyucu etkisine rağmen derişimin destek üzerindeki GOD enziminin aktivitesi üzerine çok az bir etkisi vardır.

CAT enziminin daha iyi bağlanma özelliğinden ve immobilize solüsyonda CAT'ın yüksek derişimlerinden dolayı CAT aktivitesi ko-immobilize sistemde GOD'den önemli ölçüde daha yüksektir. Deneylerde gama-APTES yada glutaraldehidle önceden işlem yapılmaksızın destek üzerine direkt olarak adsorbe edilen GOD ve CAT enzimlerinin sırasıyla glutaraldehit bağlı sistem aktivitesini %10 ve %40'a kadar çıkarttığı görülmüştür.

GOD enziminin optimum bağlanması pH 6'nın üzerindedir Bouin ve ark.. pH 3.0'ın altında immobilize olan GOD tamamen ve geridönüşümsüz şekilde aktivitesini kaybeder. CAT immobilizasyonu üzerinde pH 4.5'ten 8.0'a kadar değişen aralıklarda pH etkisi değerlendirilmiştir. pH arttıkça CAT aktivitesi de artmaktadır. CAT aktivitesi, destek üzerinde GOD aktivitesine çok az etkisi olduğu görülmüştür. CAT derişimi, GOD'nin bağlanmasıyla asla önemli ölçüde girişim vermez.

2.11. Peroksidaz Enziminin Önemi

Schoenbein 1855'te bazı mantar ve hayvan hücre ekstraktlarında hidrojen peroksit solusyonu içerisinde mavi renk oluşumunu gözlemlemiştir. Bu aktivitenin nedeni ekstrakt içerisindeki peroksidaz enzimidir. Peroksidaz yüksek bitkilerde, düşük derişimlerdeki incir öz suyunda ve yaban turpunda bulunur. 1943 yılında yaban turpundan ilk peroksidaz kristalizasyonu yapılmıştır.⁷¹

Çalışmamız yaban turpu peroksidazıdır. Peroksidazının moleküler ağırlığı 40,200 ve her bir molekül bir ferriprotoporfirinIII (protohemin) içerir. Protoheminde, 6 koordinasyon bağından dördü pirol halkasındaki nitrojenler ile demir molekülü arasındadır. Kalan iki koordinasyon bağlarından X ve Y, ortam pH'sine bağlı olarak su molekülüne veya -OH iyonuna bağlanır. Peroksidazda, iki artık koordinasyon bağından (X veya Y) biri amino grubuyla veya su molekülü ile koordine olursa diğeri proteinin karboksil grubunu oluşturur. Peroksidaz enzimi H_2O ve O_2 'yi katalitik reaksiyonla hidrojen peroksit'e dönüştürür.⁷²

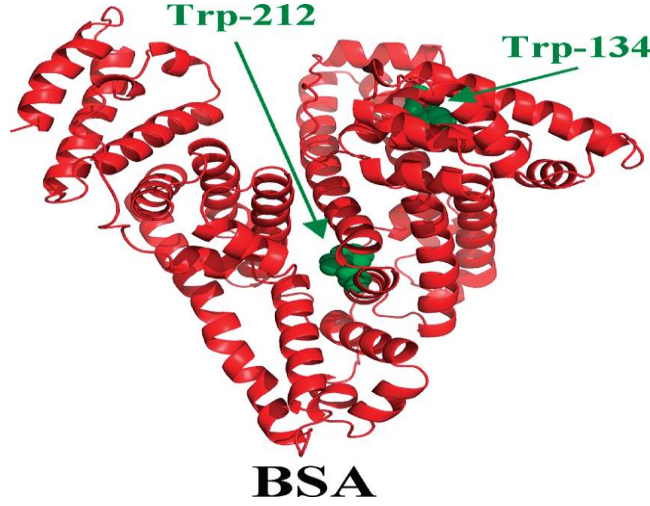
2.12. Biyosensör Hazırlanmasında Kullanılan Biyoaktif Tabaka Bileşenleri

Biyosensör hazırlanmasında en önemli aşamalardan biri de biyoaktif tabakanın uygunluğunun sağlanması ve tayin edilmek istenen analite karşı duyarlı olmasıdır. Bu bölümde biyoaktif tabakada kullanılan; sığır serum albümini, jelatin ve glutaraldehit anlatıldı.⁷³

2.12.1. Sığır serum albümini (Bovine serum albumin: BSA)

Kısaca albümin olarak da adlandırılan serum albümini, insan ve diğer memeli hayvanların kan plazmasındaki en yaygın proteindir. Kanda bulunan proteinlerin % 60'ını oluşturur. Ayrıca, doku sıvılarında, özellikle kas ve deride, az miktarda ter, gözyaşı, mide suları ve safrada da bulunur. Serum albümini dolaşım sisteminin majör çözünür bileşenidir ve birçok fizyolojik işlevi vardır. Sığır serum albumini sığır kanından izole edilen bir kan proteindir. Sığır serum albümini (BSA) insan serum albumini ile yapısal homolojilerinin olması sebebiyle çok yoğun çalışılan bir proteindir. BSA, 17 disülfid bağıyla 9 kısma ayrılmış 3 homoloji bölgesinden (I,II ve III) oluşur (Şekil 2.12). Her bölgede büyük-küçük-büyük triple yapıdadır. BSA proteini 607 amino asitten oluşmuştur. Proteinin N terminal ucunda 18 amino asitten oluşan sinyal peptit dizisi, salgılanma sırasında öncül proteinden çıkarılır. Böylece protein 589 amino asit içerir. Ayrıca olgun BSA proteini olması için bu proteinden 4 amino asit (N terminal uçtan) daha çıkarılır. Sonuç olarak elimizde 585 amino asit içeren bir protein bulunur.⁸

İmmobilizasyon çalışmalarında özellikle tutuklama yöntemlerinde çapraz bağlayıcılarla oluşturulan çapraz bağ sayısını arttırmak için ve enzimle yapılan çapraz bağ sayısını azaltarak enzimin aktivitesinin düşmesinin engellenmesi amacıyla kullanılır.



Şekil 2.12. BSA'ya ait üç boyutlu yapı

2.12.2. 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 özelliği kazanmasında etkilidirler. Jelatin, tamponda çözülüp ısıtıldıktan sonra oda sıcaklığına getirildiğinde jel kıvamını alır. Bu özelliğinden dolayı iyi ve kolay kullanılabilir bir immobilizasyon malzemesidir.¹⁴

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.

2.12.3. Glutaraldehit

Glutaraldehit, özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan bifonksiyonel bir reaktiftir. Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan biyoaktif materyallerin (enzim, hücre, doku, vb.), jelatin, kollajen, kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehid ile çapraz bağlar oluşturmaya esasına dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.³⁰

Yöntem kolay uygulanabilir olması yanında immobilize sistemin termal ve operasyonel aynı zamanda da depo kararlılığını artırması bakımından tercih edilmektedir.

Mikroorganizmalar için toksik etki göstermesine rağmen biyoaktif sisteme kazandırdığı avantajlardan dolayı % 1,0'in altındaki derişimlerde glutaraldehidin kullanılmasıyla hücre immobilizasyonları da gerçekleştirilmektedir.³⁰

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

Çalışmada kullanılan araç-gereç ve kimyasallar aşağıdaki gibidir.

3.1.1 Cihazlar

- Au Çalışma Elektrodu (CHI, A.B.D)
- Palm Sens Biyosensör (Hollanda)
- Platin Tel Yardımcı Elektrot (CHI 115, A.B.D)
- Ag/AgCl Referans Elektrot (CHI 111, A.B.D)
- P1000 ve P20 Otomatik Pipetleri (Gilson, Fransa)
- Termostatlı su banyosu (Nuve, TR)
- Manyetik Karıştırıcı (Tüv Bayern, Almanya)
- pH Metre (Mettler Toledo)
- Hassas Terazî (Mettler AJ100)
- UV-1601 Spektrofotometre (Shimadzu)
- Sonikatör (Resonik 1016, Türkiye)

3.1.2 Kimyasallar:

- Monosodyumhidrojenfosfat NaH_2PO_4 (Merck)
- Disodyumhidrojenfosfat Na_2HPO_4 (Merck)
- Sodyum asetat trihidrat (Merck)
- Asetik asit (Merck)
- Glisin (Sigma)
- Distile/Bidistile su
- Gluteraldehit (Sigma)
- NaOH (Sigma)
- HCl (Sigma)
- Alümina (Sigma)
- Alümina solüsyonları

- % 96 Etanol (Sigma)
- Sığır Serum Albümini (Sigma)
- Jelatin (Sigma)
- Glukoz Oksidaz glukoz tayin kiti (Randox GLUC PAP/GL2623)

3.1.3 Kullanılan çözeltiler

Fosfat tamponu: 0.1 M Fosfat tamponu hazırlanarak (Disodyumhidrojen fosfat ve monosodyumhidrojen fosfat) çözeltinin pH'ı 1,0 M NaOH ve HCl ile 7.0' e ayarlandı. Farklı pH ve derişimlerdeki tampon çözeltileri hazırlamak için de aynı yol izlendi. Tampon çözelti buzdolabında +4 °C'de saklandı.

Asetik asit/asetat tamponu: 0.1 M Asetik asit/Asetat tamponu hazırlanarak (Sodyumasetat trihidrat ve asetik asit) çözeltinin pH'ı 1,0 M NaOH ve HCl ile 5.0'e ayarlandı. Farklı pH ve derişimlerdeki tampon çözeltileri hazırlamak için de aynı yol izlendi. Tampon çözelti buzdolabında +4 °C'de saklandı.

Glisin/NaOH tamponu: 0.1 M Glisin/NaOH ile hazırlanan çözeltinin pH'ı 1,0 M NaOH ve HCl ile 9.0'a ayarlandı. Farklı pH ve derişimlerdeki tampon çözeltileri hazırlamak için de aynı yol izlendi. Tampon çözelti buzdolabında +4 °C'de saklandı.

Deneylerde kullanılan glukoz oksidaz enzim kitindeki (Gluc pap GL2623) reaktiflerin derişimleri;

- *Glukoz reaktifi
- *Fosfat tamponu: 50 mmol/l, pH 7.0
- *MOPS tamponu: 50 mmol/l, pH 7.0
- *Fenol: 11 mmol/l
- *4-aminofenazon: 0.77 mmol/L
- *Glukoz oksidaz: >1.5 kU/L
- *Peroksidaz: >1.5 kU/L

Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında bekletildi. Çözelti uzun süre kullanılmadığı zaman derin dondurucuda saklandı.

Glukoz çözeltisi: 1.000 gr tartılan glukoz pH'ı 7,5 olan 0,1 M fosfat tamponuyla tamamlanarak 1 M derişimde 10 mL stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden belirli bir miktar alınarak ve aynı şekilde 0,1 M fosfat tamponu ile seyreltilerek $1,0 \times 10^{-5}$ M ve $1,0 \times 10^{-7}$ M derişimlerde glukoz çözeltileri hazırlandı. Farklı pH'de glukoz çözeltisi hazırlamak için 0,1 M fosfat tamponu, 1 M NaOH ve HCl ile istenilen pH'ye ayarlandı. Hazırlanan glukoz çözeltisi en fazla 7 gün kullanıldı. Bu süre içinde buzdolabında muhafaza edildi.

Sodyum hidroksit çözeltisi: Katı sodyum hidroksit saf suda çözülerek 0,1 M derişimde çözelti hazırlandı.

Hidroklorik asit çözeltisi: Derişik HCl saf su ile seyreltilerek 1 M derişimde çözelti hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Glukoz Tayinine Yönelik İmmobilize Edilmiş Biyosensör Hazırlanması

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

I. Bir miktar gama alümina solüsyonu kadife yüzey (elektrot yüzeyinin çizilmemesi için) üzerine alınır. Daha sonra Au elektrot alümina üzerine yavaş bir şekilde halkalar çizerek gezdirilir. Böylelikle yüzeydeki tabaka ve/veya başka bir kirlilik mekanik olarak giderilmiş olur.

II. Au elektrot bidistile suyla durulandıktan sonra adsorblanmış partikülleri uzaklaştırmak için on dakika %96 etanol içerisinde sonikatörde bekletilir. Tekrar distile suyla durulandıktan sonra on dakikada distile su içerisinde sonikatörde bekletilir.

III. Au elektrodun yüzeyinin elektrokimyasal olarak temizlenmesi için 0,1 N HCl çözeltisi içerisinde +1,0 ve -1,0 potansiyelleri arasında onbeş tane döngüsel voltammogram alınır.

Glukoz biyosensörünün hazırlanması için kullanılan çalışma elektrodu Au elektrottur. Birinci reaksiyon mekanizmasında oluşan hidrojen peroksit ikinci basamakta reaksiyona girerek harcanır ve çözünmüş oksijen miktarında artma olur. Bu artma, sabit potansiyel fark altında sistemden geçen akım miktarındaki artma ile doğru orantılıdır. Au çalışma elektrodu ile akımdaki bu artma belirlenir.

Biyosensörün biyoaktif tabakasını oluşturmak amacıyla 45 mg jelatin ve 30 mg BSA, 300 μ L pH:7 fosfat tamponu içerisinde çözülüp 45° C' de 20 dk bekletildi. Karışımın 10 μ L'si 30 μ L enzim çözeltisi ile karıştırılarak elde edilen toplam hacim 40 μ L olarak Au çalışma elektrodu üzerine yayıldı.+ 4° C' de 1 saat bekletildi. Daha sonra fiziksel olarak bağlanması amacı ile 1 saat UV ışık ile muamele edildi. Daha sonra % 2.5'lik glutaraldehit çözeltisinde 5 dk çapraz bağlanmanın gerçekleştirilmesi için bekletildi. Son olarak elektrot içerisinde pH:7.5 fosfat tamponu bulunan reaksiyon hücreğine alındı. Bütün deneyler aynı elektrot tipi kullanılarak yapılmıştır.

3.2.2. Glukoz Oksidaz Temelli Biyosensörün Ölçüm Prosedürü

Glukoz oksidaz temelli biyosensörle yapılan ölçümlerde kullanılan elektrot Şekil 3.1'de, düzeneğin tamamı Şekil 3.2'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Au elektrotun immobilize edilmeden önce ve sonraki hali.



Şekil 3.2. Biyosensör düzeneğinin tamamı.

Enzimle immobilize edilen elektrodun hazırlanmasının ardından içerisinde pH 7.5 fosfat tamponu bulunan çalışılmak istenilen sıcaklığa gelmiş reaksiyon hücresine Ag/AgCl referans ve Pt karşıt elektrotlarla beraber yerleştirildi. Elektrotların bağlantılarının kurulması ardından manyetik karıştırıcı sabit bir hızda çalıştırıldı ve substrat ilave edilmeden önce oksijenin indirgenme potansiyel farkı 0,9 Volt'a ayarlanarak potansiyel fark sabitlendi ve tepkime süresi boyunca sabit tutuldu. Belirli bir süre ardından grafikte görülen akım değeri dengeye gelip sabit bir değere ulaştığında 50 μ l substrat eklemesi yapıldı ve reaksiyon başlatıldı. Bir süre sonra sistemdeki oksidasyon-redüksiyon sonucu oluşan O_2 eklenen substrat derişimi ile orantılı olarak akım şiddetinde bir artmaya sebep oldu. Oksijen miktarının artması 0.9 V potansiyelde devreden geçen akım miktarını da arttırdı. Bu durum yeni denge kurulana kadar sürdü. Denge kurulduktan sonra yeni ölçüm için tekrar substrat eklemesi yapılarak ölçümler tekrarlandı. Yapılan tüm denemelerde akım şiddeti farkları alındı ve bu fark ile orantılı olan substrat derişimi tayin edildi.

3.2.3. İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Glukoz oksidaz temelli biyosensör için en iyi cevabın elde edilebileceği immobilizasyon koşullarının tespit edilmesi amaçlandı. Bu amaçla jelatin, sığır serum albumini ve çapraz bağlayıcı glutaraldehit miktarının biyosensör cevabına etkileri

araştırılmıştır. Her bir immobilizasyon parametresinin optimum miktarının tayin edilmesi için, diğer değişkenler sabit tutularak optimizasyonu yapılacak parametre değiştirilip biyosensör hazırlandı ve ölçümler alındı.

3.2.3.1. Jelatin Miktarının Biyosensör Cevabına Etkisi

GOD temelli biyosensörün biyoaktif tabakasındaki jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi amacıyla farklı jelatin miktarları ile elektrot hazırlandı. Hazırlanan her elektrotla yapılan ölçümlerden elde edilen akım farkı ve substrat derişimi arasındaki grafik yardımıyla en uygun jelatin miktarı tespit edildi. Bu amaçla BSA miktarı 0.030 gram ve glutaraldehit yüzdesi %2.5 olacak şekilde sabit tutularak 0.225, 0.45, 0.67, 0.9 ve 1.2 gram miktarlarında jelatin ile biyosensörler hazırlandı. Ölçümler 50 mM derişimde pH 7.5 fosfat tamponunda gerçekleştirildi.

3.2.3.2. Sığır Serum Albumin Miktarının Biyosensör Cevabına Etkisi

En uygun jelatin miktarı belirlendikten sonra, BSA miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi için farklı BSA derişimleri ile elektrot hazırlandı. Hazırlanan elektrotla yapılan ölçümlerden grafikler elde edildi. Bu grafikler yardımıyla en uygun BSA miktarı tespit edildi. Bu amaçla jelatin miktarı 0,45 gram, glutaraldehit yüzdesi %2.5 olacak şekilde sabit tutularak 0.015, 0.030, 0.045, 0.06 ve 0.12 gram miktarlarında BSA kullanıldı. Ölçümler 50 mM derişimde pH 7.5 fosfat tamponunda hazırlanan tepkime hücresinde gerçekleştirildi.

3.2.3.3. Glutaraldehit Yüzdesinin Biyosensör Cevabına Etkisi

En uygun BSA ve jelatin miktarları belirlendikten sonra, glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabına etkisini belirlemek için farklı glutaraldehit yüzdeleri içeren çözeltiler ile elektrot hazırlandı. Hazırlanan elektrotla yapılan ölçümlerin verileri grafiklendirildi ve en uygun glutaraldehit yüzdesi tespit edildi. Bu amaçla jelatin miktarı 0.45 gram ve BSA miktarı 0.030 gram olacak şekilde sabit tutulup %1.5, %2, %2.5, %3 ve %3.5'lik glutaraldehit çözeltileri kullanıldı. Ölçümler 50 mM derişimde pH 7.5 fosfat tamponunda gerçekleştirildi.

3.2.4. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

3.2.4.1. pH Değerinin Belirlenmesi

Biyosensörün optimum pH'ının belirlenmesi için pH 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5'de 50 mM asetik asit/asetat; 7.0, 7.5 ve 8.0 50 mM sodyum fosfat tamponu ve pH 8.5, 9.0 ve 9.5 50 mM glisin/NaOH tamponu kullanılarak en iyi biyosensör yanıtının hangi pH değerlerinde elde edildiği belirlendi. Ölçümler 5.55 mmol/L standart glukoz çözeltisi derişiminde yapıldı. Bu çalışma sonucunda tampon pH'ı ve % biyosensör yanıtı arasında grafik çizilerek optimum pH belirlendi.

3.2.4.2. Tampon Derişiminin Belirlenmesi

Biyosensör ile en iyi yanıtların görüldüğü tampon derişimlerini belirlemek için bir önceki çalışma ile belirlenen optimum pH değerinde, molar derişimi 25 mM, 50 mM, 100 mM ve 150 mM olan fosfat tamponu kullanılarak denemeler gerçekleştirildi. Ölçümler 5.55 mmol/L glukoz derişiminde yapıldı. Bu çalışma sonucunda tampon derişimi ve % biyosensör cevabı arasında grafik çizildi.

3.2.4.3. Sıcaklığın belirlenmesi

Ölçümler 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Sıcaklık 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30°C, 35°C, 40°C, 45 °C, 50 °C ve 55 °C olacak şekilde değiştirilerek sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirildi. Ölçümler 5.55 mmol/L glukoz derişiminde yapıldı. Bu çalışma sonucunda sıcaklık ve % enzim aktivitesi arasında grafik çizildi.

3.3. Geliştirilen Biyosensörün Karakterizasyonuna Yönelik Çalışmalar

Glukoz biyosensöründe kullanılmış olan biyobileşenlerin immobilizasyon parametrelerinin ve çalışma koşullarının optimizasyonu tamamlandıktan sonra biyosensörün karakterizasyon çalışmalarına geçildi.

3.3.1. Tekrarlanabilirlik

Glukoz biyosensörünün ölçüm sonuçlarının güvenilirliği ve tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi için, 50 mM pH 7.5 fosfat tampon içinde gerçekleştirilen denemelerde,

5.55 mmol/L glukoz çözeltisi kullanılarak arka arkaya ara vermeksizin aynı sensörle ölçümler yapıldı. Ölçümlere ilişkin standart sapmalar ve varyasyon katsayıları hesaplandı.

3.3.2. Raf Ömrünün Belirlenmesi

Hazırlanan biyosensörün raf ömrünü belirlemek için 40 gün boyunca değişik zaman aralığında 5.55 mmol/L glukoz derişiminde biyosensörün amperometrik cevap akımı ölçüldü. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen amperometrik cevap akımları saklama süresine karşı grafiğe geçirilerek biyosensörün raf ömrü belirlendi. Biyosensörün raf ömrünü belirlemek amacıyla yapılan deneylerde elektrot +4 °C’de buzdolabında muhafaza edildi.

3.3.3. Glukoz için doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Tasarlanan biyosensörde, glukoz için doğrusal tayin aralığının belirlenmesi amacıyla derişimi 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 125, 200, 250, 350, 400, 500, 1000 mg/dL olacak şekilde hazırlanan glukoz çözeltileri kullanılarak ölçümler alındı. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen amperometrik cevap akımları ve glukoz derişimleri arasındaki grafik yardımıyla biyosensörün doğrusal tayin aralığı belirlendi.

3.3.4. Biyosensörle Serumda Glukoz Analizi

Tasarlanan biyosensör ile tam kan ve serumda glukoz tayini yapılmıştır. Ölçümler 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde alındı. Örneklem için 20 hiperglisemik serum ve 20 normoglisemik serum olmak üzere toplam 40 örnekle gruplar içerisinde tampon değiştirilmeksizin ölçümler alındı.

3.3.5. Kit ile Serumda Glukoz Analizi

Glukoz derişimini belirlemek için Glukoz oksidaz (GLUC-PAP-GL2623) kiti, manuel olarak kullanıldı. Standart (100 mg/dL) ve örnek 10 µl, glukoz oksidaz/peroksidaz reaktifi ise 1000 µl olacak şekilde tüpler hazırlandı. Hazırlanan tüpler 37°C ‘lik etüvde 10 dakika inkübe edildi. 500 nm dalga boyunda, 1 cm’lik

küvetler içerisinde köre karşı optik dansite değerleri okundu ve gerekli hesaplamalar yapıldı.

3.3.6. İstatiksel Analiz

Veriler istatiksel olarak değerlendirilirken IBM-SPSS 20.0 paket programı kullanılmıştır. Tıpta kullanım alanı yaygın olan Receiver Operating Characteric (ROC) ya da ROC eğrisi, tanı testlerinin performanslarının değerlendirilmesi ve karşılaştırılmasında oldukça önemlidir. Bu tez kapsamında ROC analizi; biyosensör yönteminin ayırt etme gücünün belirlenmesi, yöntem etkinliklerinin karşılaştırılması ve oluşturulan prototip sonuçlarının kalitesinin izlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Kit (Gluc-PAP GL2623), merkez laboratuvar ve biyosensör veriler, ROC eğrileri altında kalan alanlar değerlendirilerek analiz edilmiştir.

4.BULGULAR

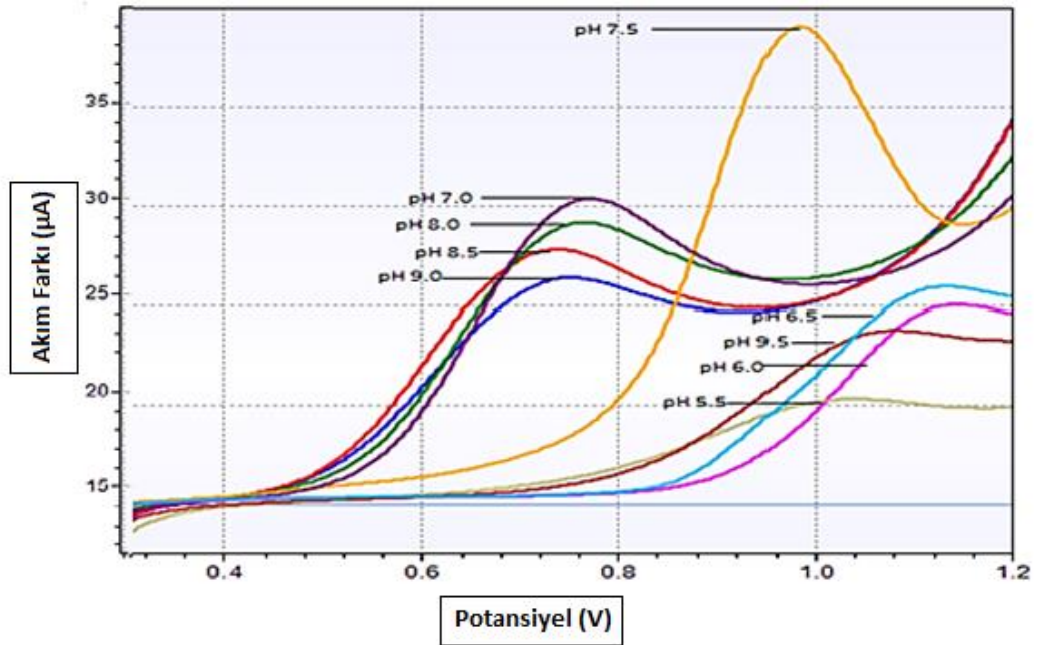
4.1. Biyosensörde Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

Glukoz biyosensörü ölçüm koşulları, daha önceden yapılmış olan GOD çalışmaları göz önüne alınarak gerçekleştirildi.

Optimum değerin belirlenmesinde her deney için 80 mg/dL (5.55 mmol/L) derişime sahip glukoz çözeltisi kullanıldı. Değerler saptandıkça uygun olan o değerler kullanılmaya başlandı.

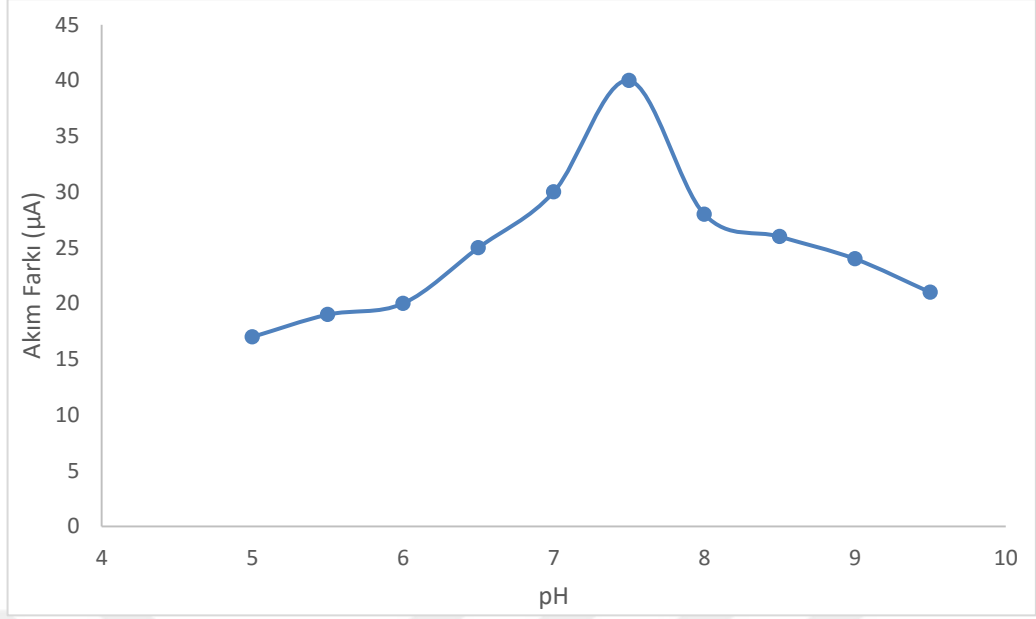
4.1.1. Çalışma Tamponu ve Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Optimum çalışma tamponun ve pH'sinin belirlenmesi için pH 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5 değerlerinde asetik asit/asetat tamponu; pH 7.0, 7.5 ve 8.0 değerlerinde sodyum fosfat tamponu ve pH 8.5, 9.0 ve 9.5 değerlerinde glisin/NaOH tamponu kullanılarak ölçümler gerçekleştirildi ve Lineer Sweep eğrileri elde edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. pH değişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi (Ölçümler %2.5 glutaraldehit, 0.05 V/s tarama hızı ve 35°C sıcaklıkta yapıldı.)

Eğrilere ait maksimum akım farkı değerlerinin pH'ye karşı grafiği Şekil 4.2'de gösterilmektedir.

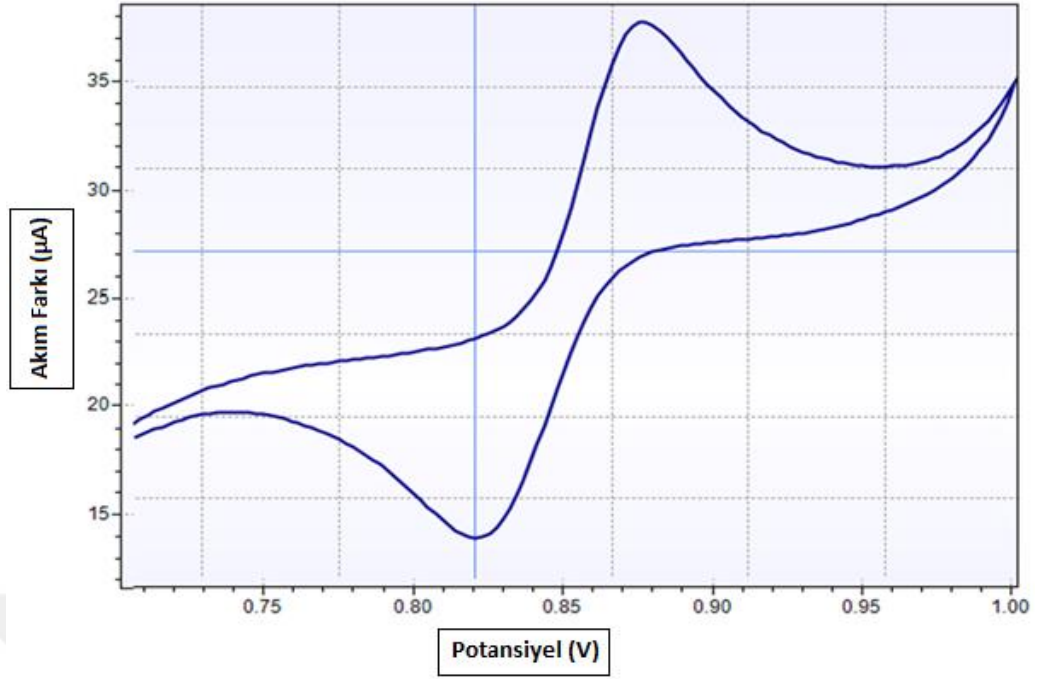


Şekil 4.2. pH değişiminin biyosensör cevabına etkisi

Maksimum ölçüm değeri pH 7.5’de fosfat tamponu ile elde edilmiştir.

4.1.2 Çalışma aralığının belirlenmesi

BSA-jelatin kullanılarak glukoz tayinine yönelik hazırlanan enzimatik biyosensörde, çalışma aralığının belirlenmesi için kutupların bir ucu elektroda diğer ucu ölçüm hücresine daldırılarak sabitlendi ve Şekil 4.3’de görülen döngüsel voltammogram alındı.



Şekil 4.3. Döngüsel voltammogram (Ölçümler pH 7.5 , %2.5 glutaraldehit, 35°C sıcaklıkta, 50 mM Fosfat tamponunda gerçekleştirildi.)

Voltammogram'dan alınan sonuç neticesinde çalışmalar 0.9 V sabit akımda devam edildi ve Linear Sweep ölçüm verileri aşağıdaki gibi seçildi:

E condition: -1,2 V

T condition: 0 V

E deposition: -1,0 V

T deposition: 0 V

t eq: 8 s

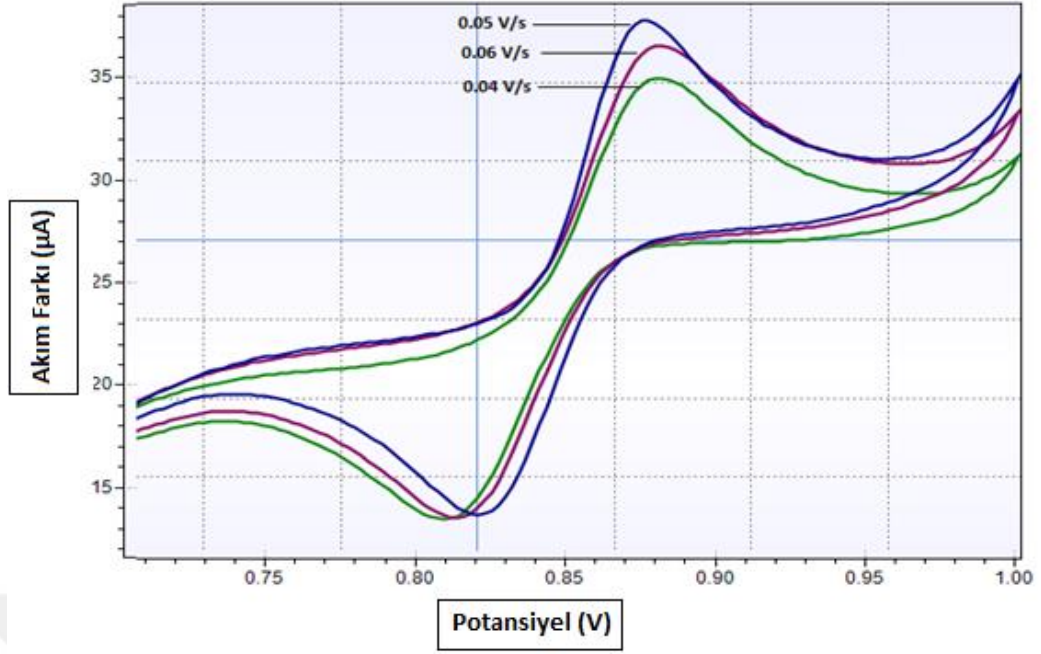
E begin: 0,8 V

E end: 1,2 V

E step: 0,003 V

4.1.3. Optimum Tarama Hızı Değerinin Belirlenmesi

Tarama hızının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.4'de gösterilmiştir.

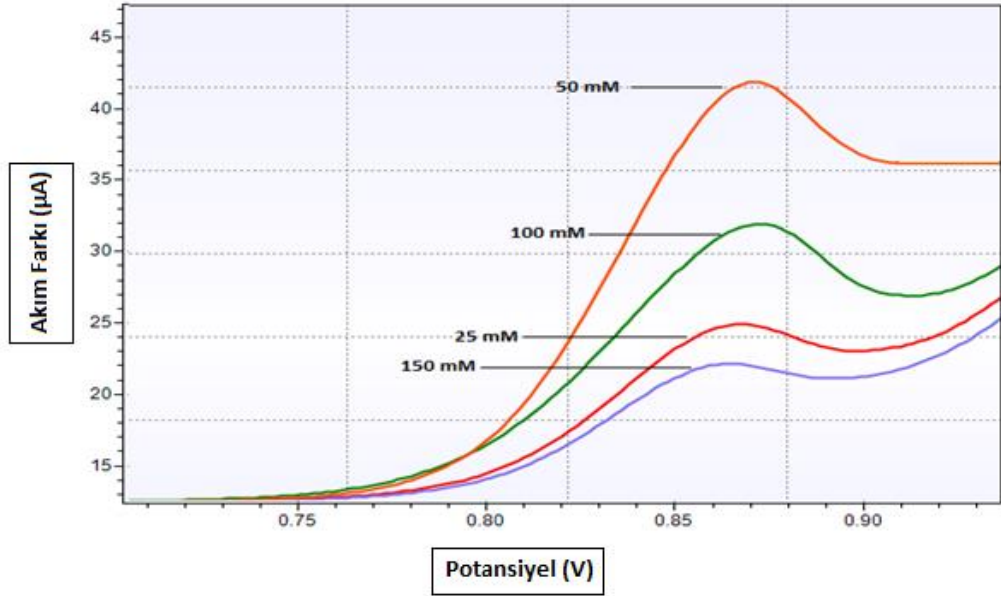


Şekil 4.4. Biyosensörün tarama hızı ölçümlerini gösteren döngüsel voltamogramları (Ölçümler pH 7.5 , %2.5 glutaraldehit, 35°C sıcaklıkta ve 50 mM fosfat tamponunda gerçekleştirildi.)

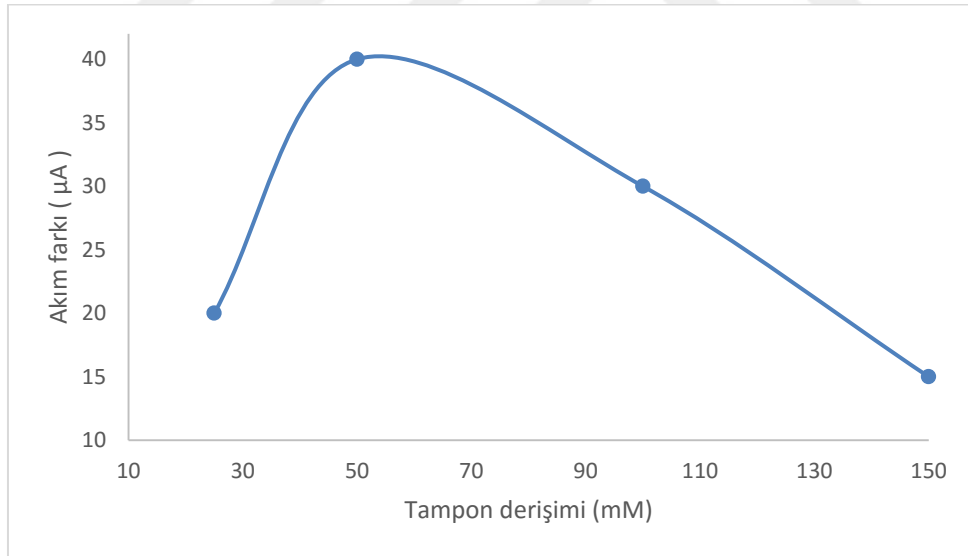
Sonuçta 3 farklı tarama hızı ile yapılan ölçümler içinde yüksek akım ve en yüksek pik oluşturan tarama hızı 0.05 V/s olarak saptanmıştır.

4.1.4. Optimum Tampon Derişiminin Belirlenmesi

pH 7.5’de 25 mM, 50 mM, 75 mM ve 100 mM derişimlerdeki fosfat tamponları kullanılarak tampon derişim optimizasyonu gerçekleştirildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Tampon derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi (Ölçümler pH 7.5 , %2.5 Glutaraldehit, 0.05 V/s tarama hızı, 35°C’da gerçekleştirildi.)

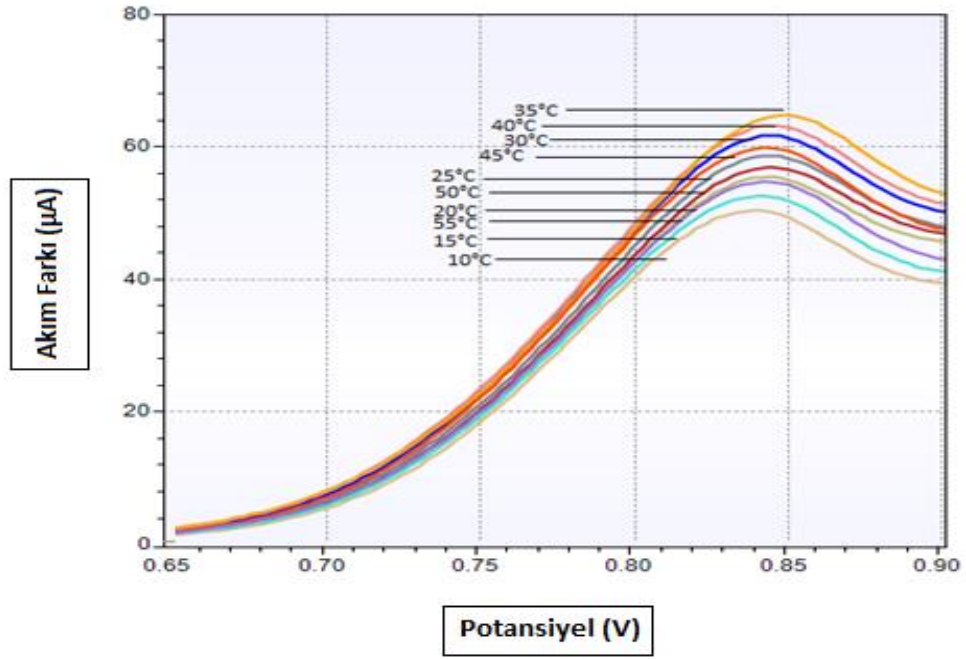


Şekil 4.6. Tampon derişiminin biyosensör cevabına etkisi

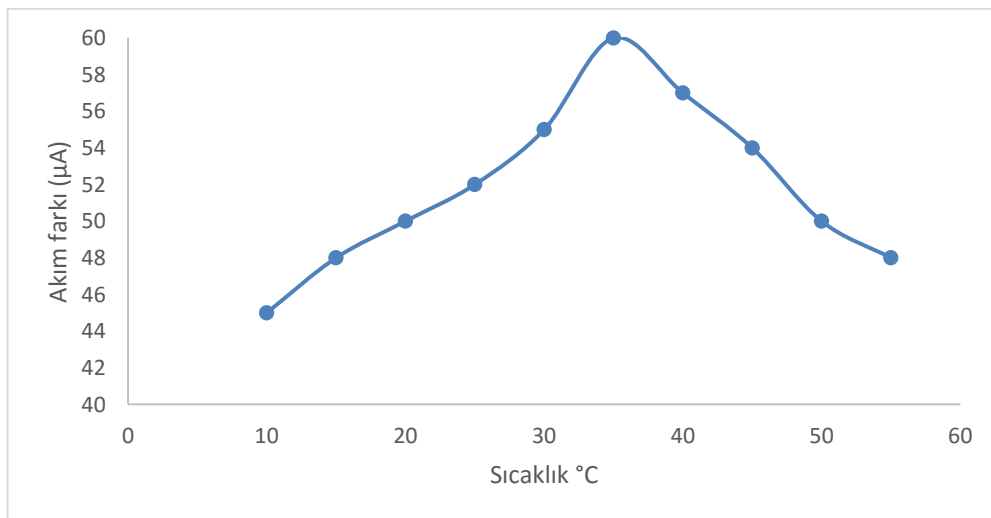
Şekil 4.5’deki eğrilere ait maksimum ölçüm değerleri, tampon derişimine karşı grafiksel olarak gösterildiğinde (Şekil 4.6) maksimum değerin 50 mM fosfat tamponu derişiminde olduğu saptanmıştır.

4.1.5 Optimum sıcaklık değerin belirlenmesi

Ölçümlerde kullanılacak optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik çalışmalarda 10°C – 55°C aralığında biyosensör ile ölçümler alınarak akım farkı değerleri ölçülmüştür. (Şekil 4.7)



Şekil 4.7. Biyosensör için optimum sıcaklık ölçümlerinin yapıldığı Lineer sweep görüntüsü. (Ölçümler pH 7.5, 50 mM fosfat tamponunda, %2.5 Glutaraldehit varlığında 0.05 V/s tarama hızı ile yapılmıştır.)



Şekil 4.8. Biyosensör için optimum sıcaklık grafiği.

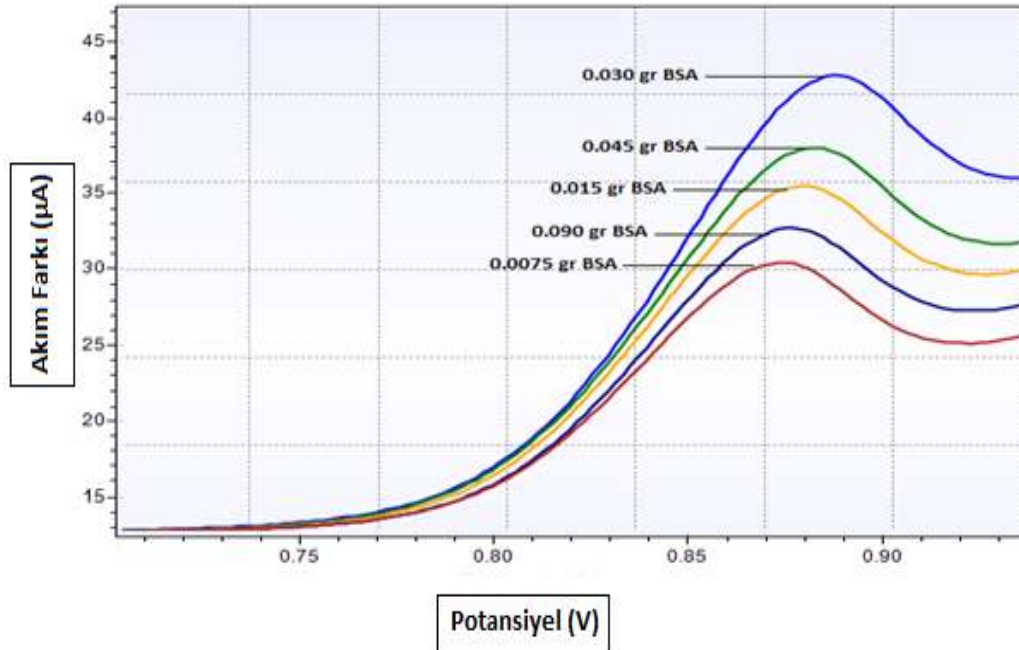
Şekil 4.7'deki eğrilere ait maksimum ölçüm değerleri, sıcaklık değerlerine karşı grafiksel olarak gösterildiğinde (Şekil 4.8) maksimum değerin 35°C olduğu saptanmıştır.

4.2. Biyosensörde Biyoaktif Tabakanın Optimizasyonu

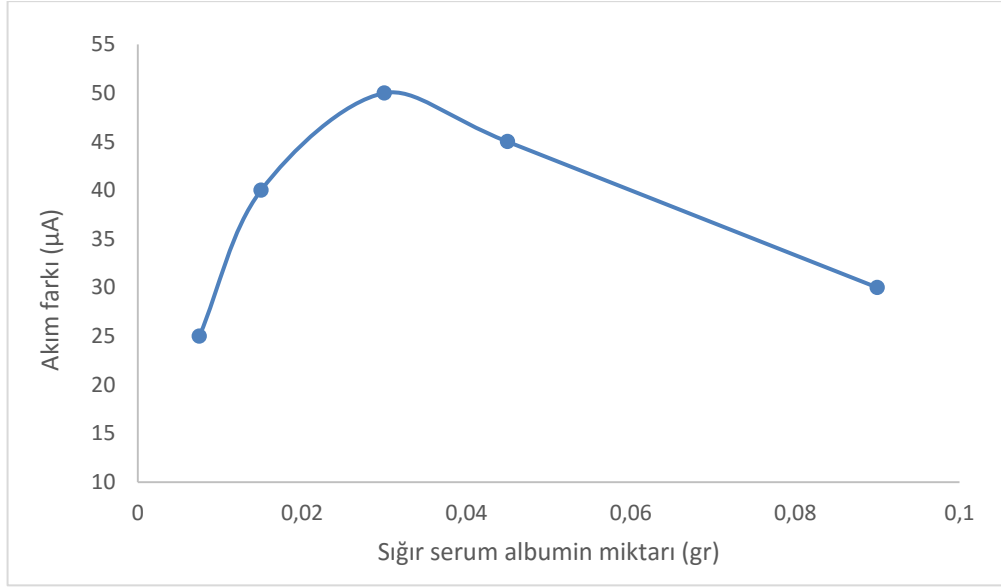
Başlangıç olarak ölçüm koşulları, daha önceden yapılmış olan çalışmalar göz önüne alınarak gerçekleştirildi. Optimizasyon çalışmalarından elde ettiğimiz; pH 7.5, 50 mM fosfat tamponu, 35°C ve 0.05V/s tarama hızı ve her deney için 80 mg/dL derişime sahip glukoz çözeltisi kullanıldı. Biyoaktif tabakayı oluşturan sığır serum albumini, jelatin ve glutaraldehit değerleri saptandıkça uygun olan o değerler kullanılmaya başlandı.

4.2.1. Sığır Serum Albumin Derişiminin Optimizasyonu

Farklı BSA miktarlarına sahip enzim çözeltileri kullanılarak hazırlanan 5 farklı sığır serum albumin-jelatin/glukoz oksidaz-peroksidaz/glutaraldehit modifiye biyosensör ile yapılan denemelerde alınan cevaplar Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. BSA derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi (Ölçümler pH 7.5, 0.05 V/s tarama hızı, 35°C sıcaklık, %2.5 Glutaraldehit ve 50 mM Fosfat tamponunda gerçekleştirildi.)

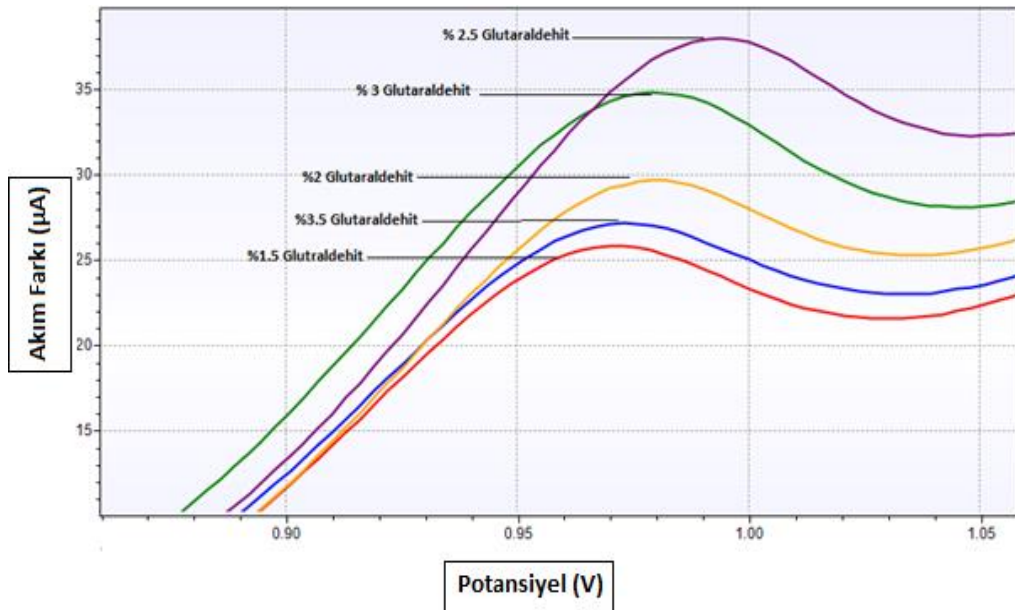


Şekil 4.10 Sığır serum albumin miktarlarındaki değişimin biyosensör cevabına etkisi

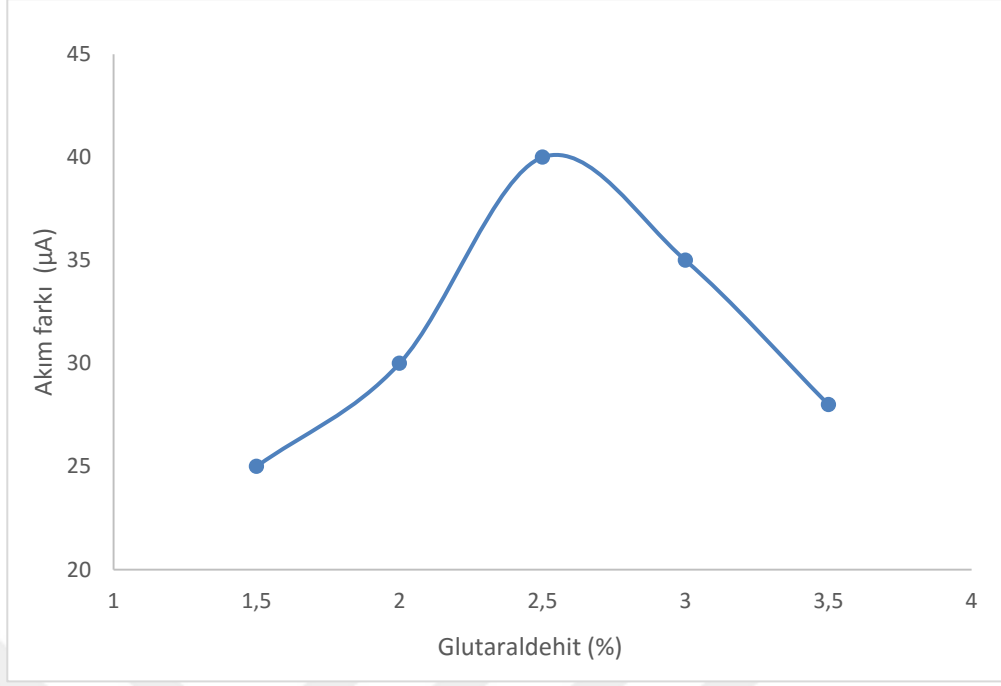
Şekil 4.9'dan elde edilen değerler Şekil 4.10'da yerine konulduğunda yüksek akım farkına sahip sığır serum albumin derişiminin 0.030 gr olduğu saptanmıştır.

4.2.2. Glutaraldehit Derişiminin Optimizasyonu

Glukoz tayinine yönelik hazırlanan enzimatik biyosensörde, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan farklı derişimlerdeki glutaraldehitin biyosensör cevabı üzerine etkileri incelenmiş ve deneysel sonuçlar şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Glutaraldehit derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren lineer sweep gösterimi (Ölçümler pH 7.5, 0.05 V/s tarama hızı, 35°C sıcaklık ve 50 mM Fosfat tamponunda gerçekleştirildi.)

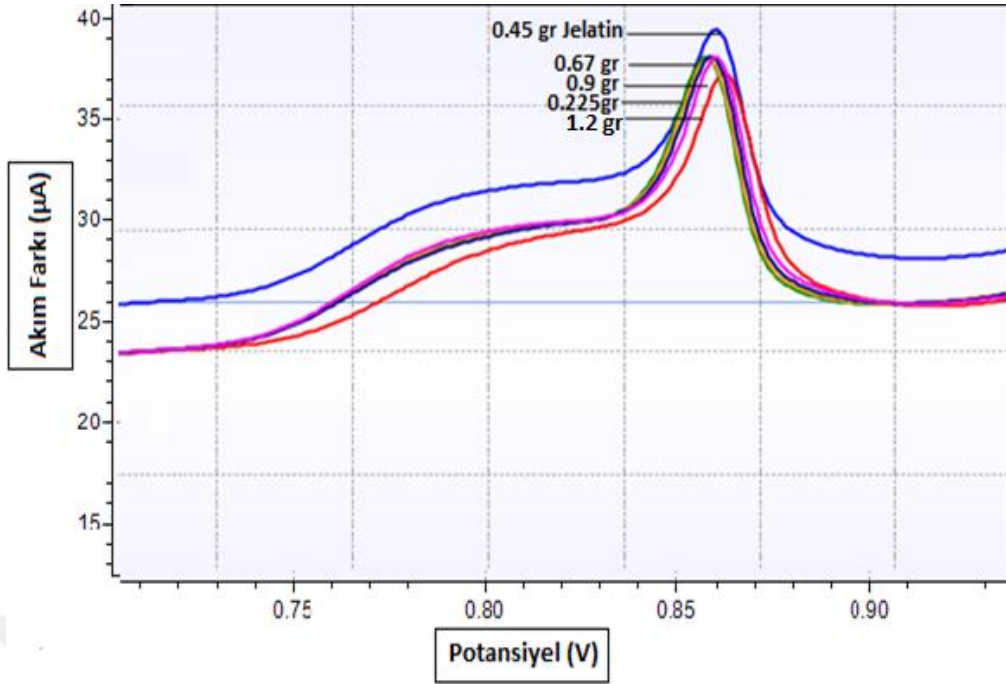


Şekil 4.12. Glutaraldehitin yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi

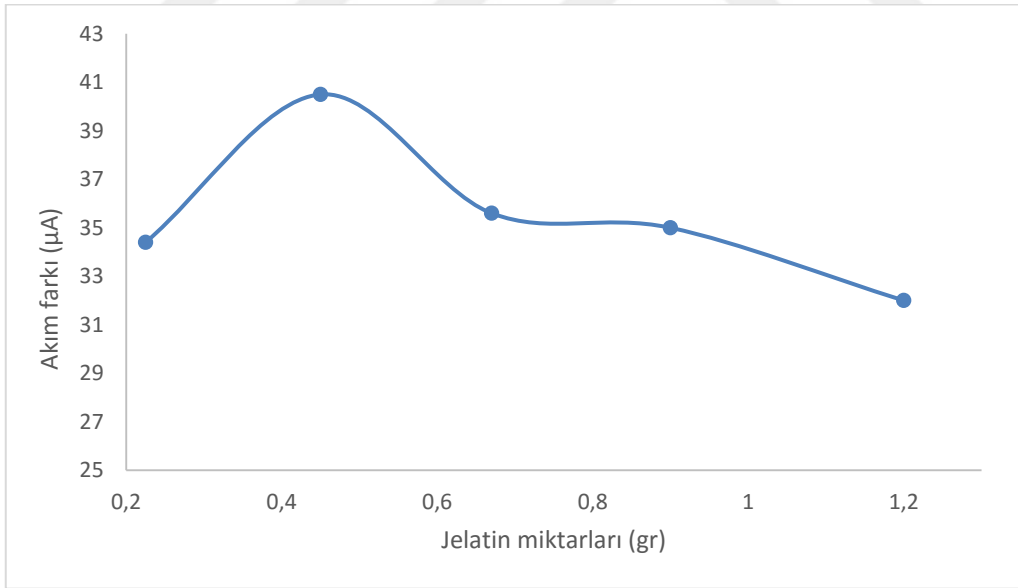
Şekil 4.11’den elde edilen değerler Şekil 4.12’de yerine konulduğunda yüksek akım farkına sahip derişimin % 2.5’lik glutaraldehit olduğu saptanmıştır.

4.2.3. Jelatin Derişiminin Optimizasyonu

Farklı jelatin miktarlarına sahip enzim çözeltileri kullanılarak hazırlanan 5 farklı biyosensör ile yapılan denemelerde alınan cevaplar Şekil 4.13’de verilmiştir.



Şekil 4.13. Jelatin derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi (Ölçümler pH 7.5, 0.05 V/s tarama hızı, 35°C sıcaklık ve 50 mM Fosfat tamponunda gerçekleştirildi.)



Şekil 4.14. Jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi

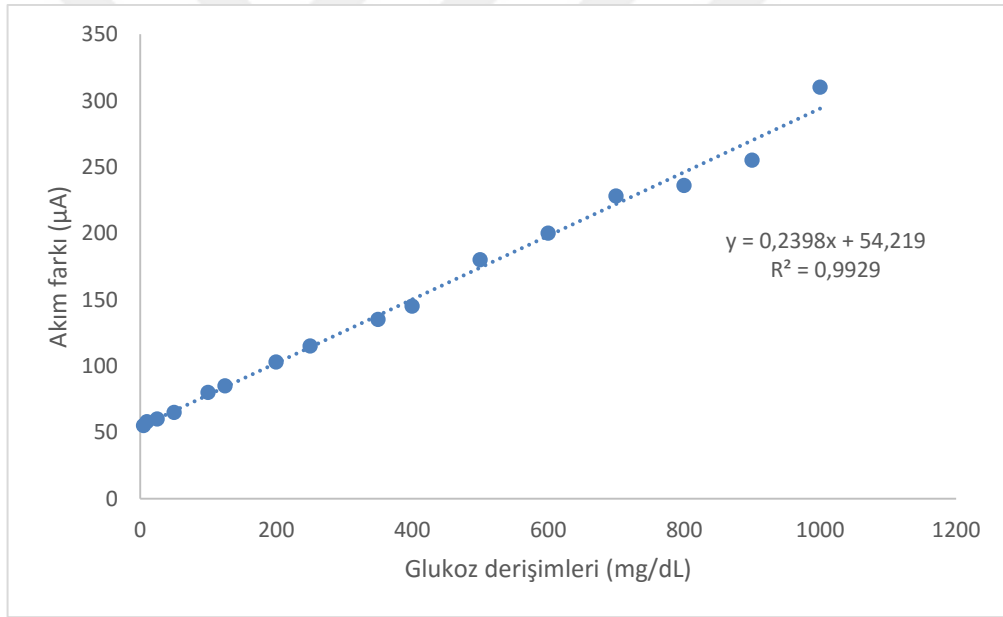
Şekil 4.13'ten elde edilen değerler Şekil 4.14'te yerine konulduğunda yüksek akım farkına sahip jelatin derişiminin 0.45 gr olduğu saptanmıştır.

4.3. Glukoz Ölçümü İçin Hazırlanan Modifiye Biyosensörün Analitik Karakterizasyonu

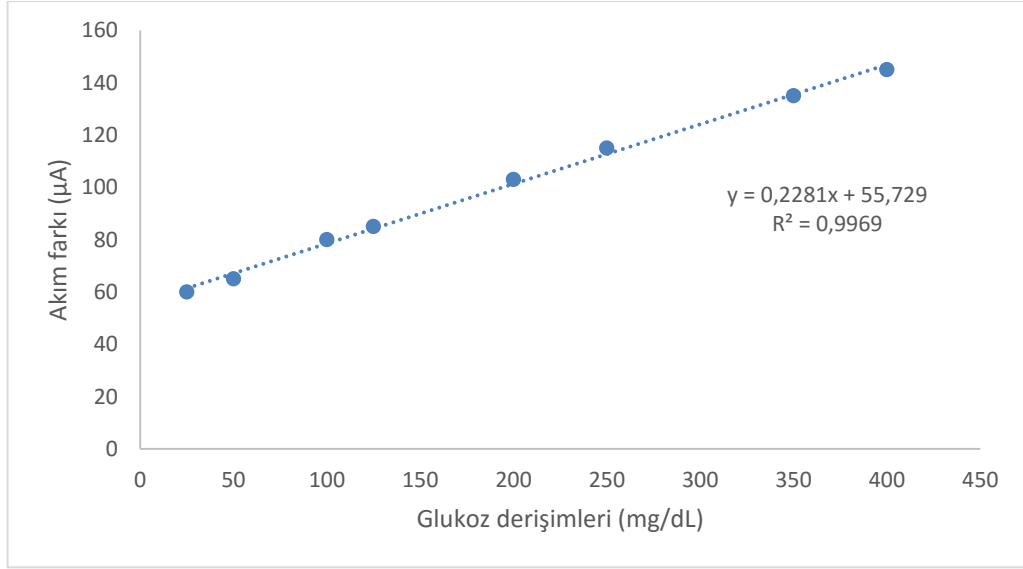
Biyosensör, Au elektrot ucuna 0.030 gr BSA, 0.45 gr jelatin ve %2.5 glutaraldehit'in immobilizasyonu ile hazırlandı. Ölçümler 0.05 V/s tarama hızında, 35°C sıcaklık, pH 7.5 ve 50 mM fosfat tampon içerisinde alındı.

4.3.1. Glukoz tayini için doğrusal aralık

Derişimi 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 125, 200, 250, 350, 400, 500, 1000 mg/dL olacak şekilde hazırlanan glukoz çözeltileri için ölçümler alındı. Sonuçlar Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.15 5-1000 mg/dL aralığındaki glukoz derişimlerinde doğrusal tayin aralığı

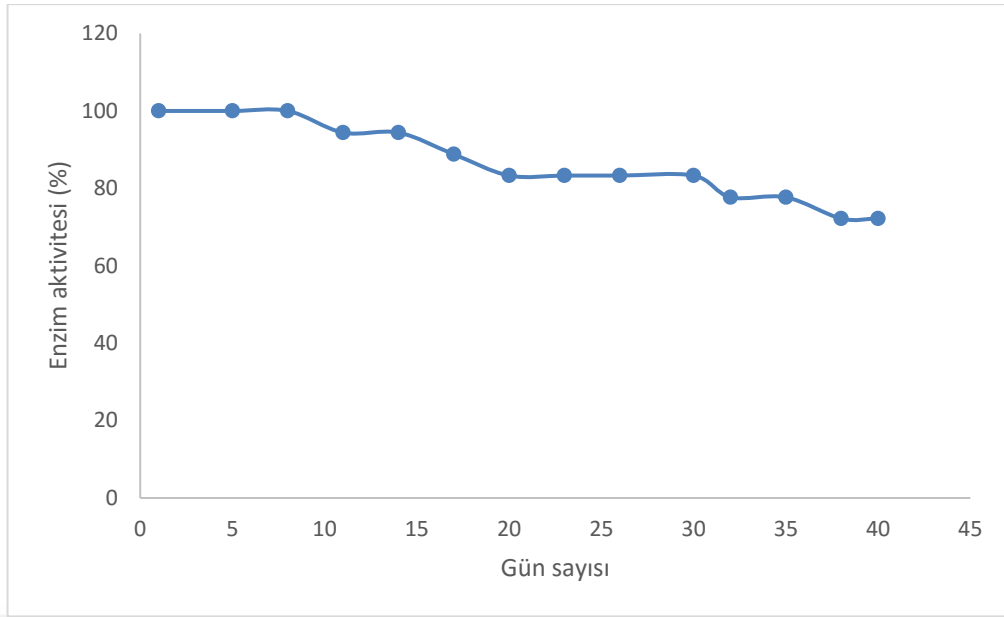


Şekil 4.16. 5-400 mg/dL aralığındaki glukoz derişimlerinde tayin aralığı.

Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’da gösterildiği şekilde ölçümler 5-400 mg/dL glukoz derişim aralığında, glukoz derişimine bağı olarak doğrusal artış göstermiştir (R^2 : 0.9969).

4.3.2. Raf ömrünün belirlenmesi

Hazırlanan biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.2.3.2’de anlatılan işlemler uygulanarak elde edilen değerler grafiğe geçirilmiştir. Biyosensörün raf ömrünü belirlemek amacıyla yapılan deneylerde elektrot +4 °C’ da buzdolabında muhafaza edildi.



Şekil 4.17. Biyosensörün raf ömrü (Ölçümler pH 7.5, 0.05 V/s tarama hızı, 35°C sıcaklık ve 50 mM Fosfat tamponunda gerçekleştirildi.)

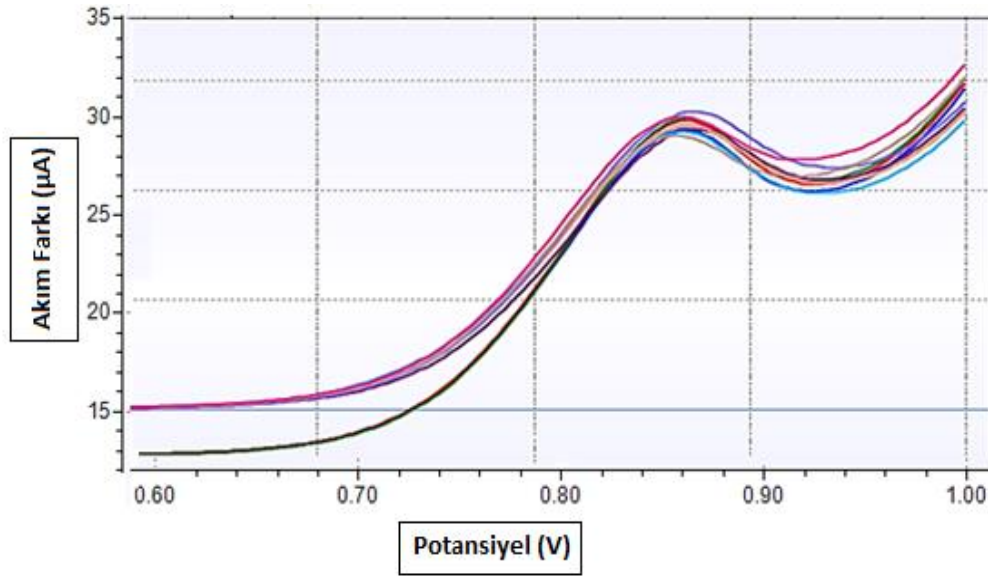
40 gün boyunca yapılan ölçümler sonucunda immobilize enzim aktivitesinin % 72.2 oranında korunduğu saptanmıştır (Şekil 4.17).

4.3.3. Biyosensörde Ölçüm Tekrarlanabilirliği

Bu çalışmada hazırlanan glukoz biyosensörünün ölçüm tekrarlanabilirliği incelendi. Ölçüm hücresi içerisine 80 mg/dL glukoz çözeltisinden 50'şer μ L eklemeler yapılarak ve aynı standart eğri kullanılmak şartı ile ölçümler alındı. 13 kez tekrar edilen ölçümlere ait ortalama değer ($\bar{X}$), standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayısı (% V.K.) Tablo 4.1'de verilmiştir. Çizelgeye ait Lineer Sweep gösterimi Şekil 4.18'de gösterilmektedir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde biyosensör ile alınan yanıtların tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olduğu belirlendi.

Tablo 4.3.3. Biyosensörün tekrarlanabilirlik çizelgesi

Deneme sayısı	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	$\bar{X}$	S.S	V.K (%)
Bulunan glukoz derişimi (mg/dL)	80	80	80	80	80,2	80,3	80	79,9	80	80,1	79,9	79,8	79,9	80,00	0,1320	0.165



Şekil 4.18. BSA-Jelatin/glukoz oksidaz- peroksidaz /glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik için Linear Sweep gösterimi (Ölçümler pH 7.5, 0.05 V/s tarama hızı, 35°C , 50 mM Fosfat tamponunda ve 80 mg/dL glukoz çözeltisi kullanılarak gerçekleştirildi.)

4.3.4 Serumda glukoz analizi

Hazırlanan Au/BSA-jelatin/glukoz oksidaz-peroksidaz /glutaraldehit modifiye glukoz biyosensör ile serumda glukoz tayini yapıldı. Örnek olarak Balcalı Hastanesi merkez laboratuvarında işlemleri bitmiş hiperglisemik ve normoglisemik serumlar kullanıldı. Hiperglisemik serum (n=20), normoglisemik serum (n=20) olmak üzere toplamda n=40 olacak şekilde ölçüm sonuçları standart grafik yardımıyla değerlendirildi. Ölçümler; 0.9 V'ta, 35°C, 50 mM pH 7,5 fosfat tamponunda gerçekleştirildi. Ayrıca aynı örnekler Randox Gluc PAP GL2623 kiti kullanılarak da değerlendirildi ve sonuçlar merkez laboratuvar sonuçlarıyla beraber Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'de verilmiştir.

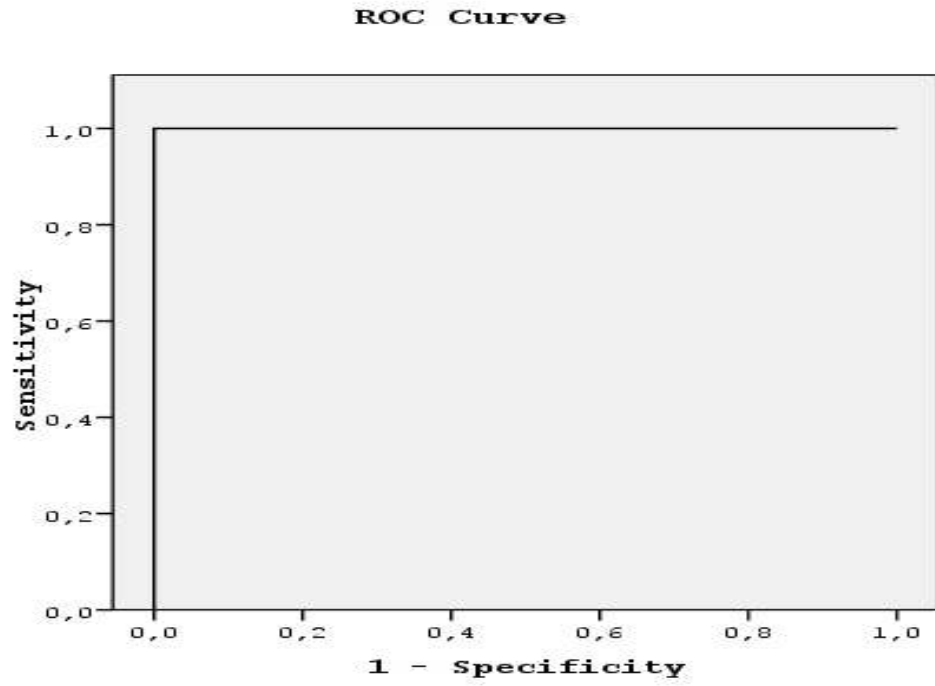
Tablo 4.2. Normoglisemik serum örneklerinde biyosensör sonuçlarının diğer yöntemlerle kıyaslanması

Hasta adı soyadı	Merkez laboratuvar sonuçları mg/dL	GLUC-PAP (GL2623) sonuçları (mg/dL)	Biyosensör sonuçları mg/dL
1-A.D	84	83.5	80.5
2-F.M	92	94	94
3-A.Ş	93	94	92
4-B.C	91	93	95
5-H.Y	91	87	86
6-M.A	87	91	93
7-M.Ü	87	89	88
8-M.G	91	94	96
9-M.D	90	90	93.5
10-N.M	85	83	86
11-E.D	98	101	101.5
12-M.D	82	84	85
13-M.K	96	97	98.5
14-İ.K	92	91.7	96
15-E.G	98	101.5	98
16-A.Ö	101	114	110
17-D.K	102	104	103
18-M.K	79	88	85
19-L.Ö	87	84	84
20-A.E	91	88	90.8

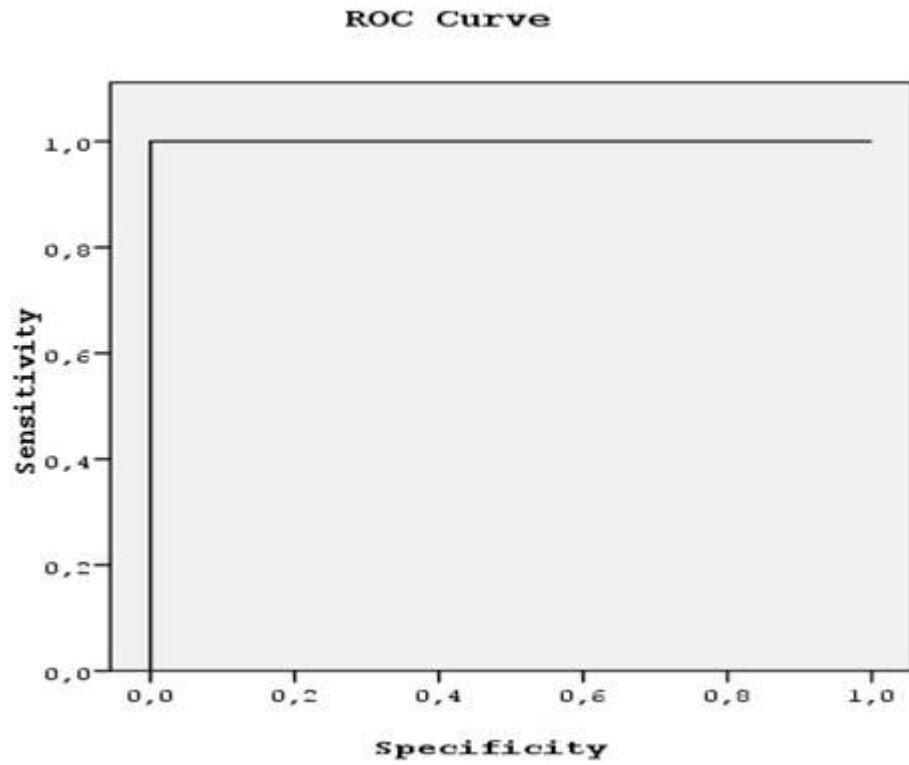
Tablo 4.3. Hiperglisemik serum örneklerinde biyosensör sonuçlarının diğer yöntemlerle kıyaslanması

Hasta adı soyadı	Merkez lab.verileri(mg/dL)	GLUC-PAP (GL2623) sonuçları (mg/dL)	Biyosensör sonuçları (mg/dL)
1-H.A	113	104	123
2-İ.K	131	124	127
3-D.B	246	242	238
4-D.Ş	167	158	162
5-Ü.B	123	118	113
6-F.K	111	105	120
7-A.Ş	185	176	180
8-A.B	161	154	152
9-A.Ö	257	251	256
10-E.D	127	136	134
11-F.Ş	165	167	172
12-N.Ü	109	111	107
13-M.C	132	131	134
14-M.G	137	141	145
15-S.A	289	283	276
16-M.S	149	152	156
17-S.S	117	123	127
18-H.G	121	130	135
19-S.Ö	160	152	150
20-İ.D	108	102	104

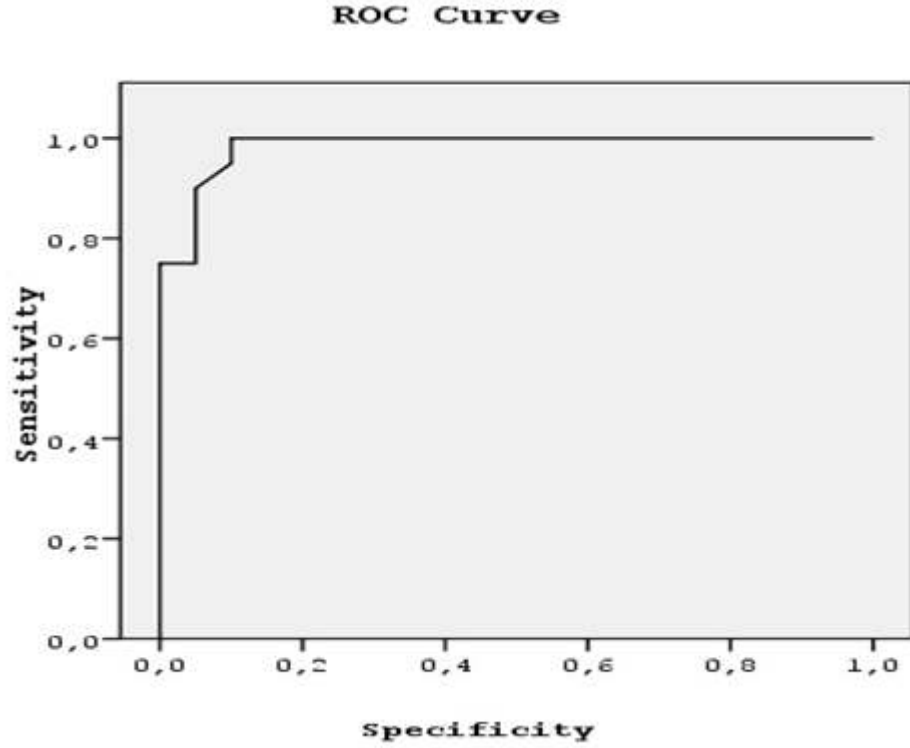
Merkez laboratuvar, Randox Gluc PAP kit ve biyosensör çalışmalarına ait ROC eğrileri Şekil 4.19, Şekil 4.20 ve Şekil 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.19. Merkez laboratuvar verileri için ROC eğrisi (Eğri altında kalan alan 1,000)

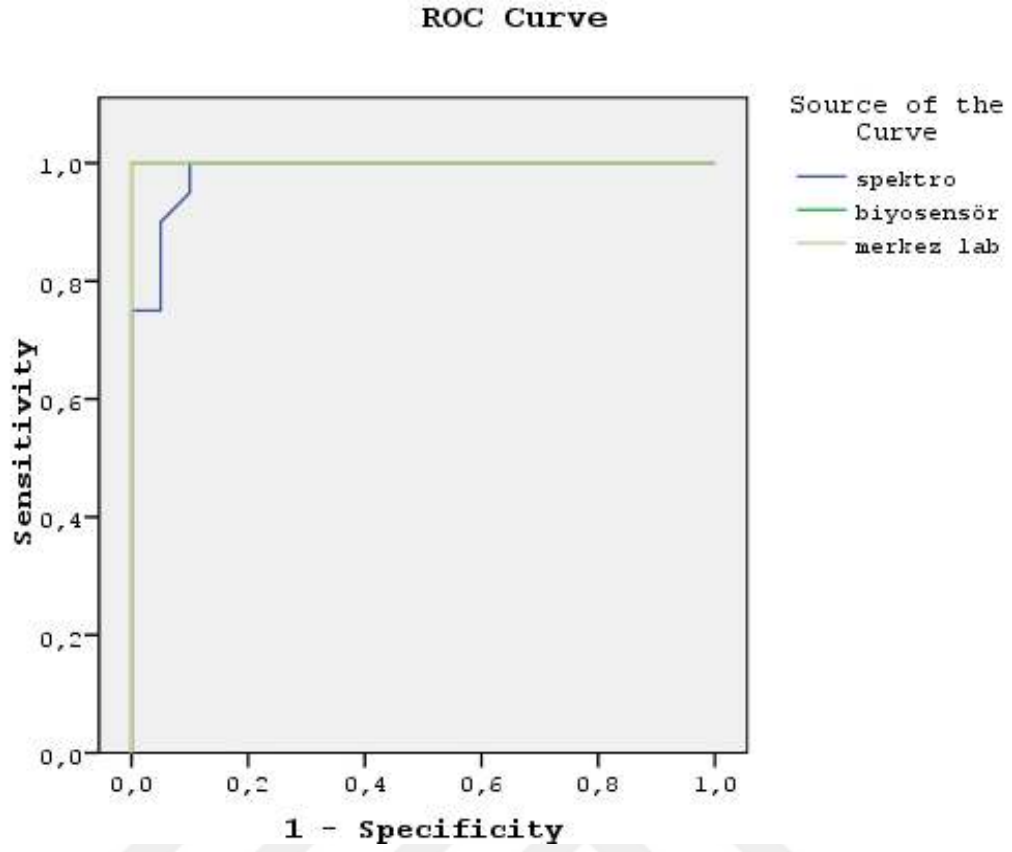


Şekil 4.20. Biyosensör verileri için ROC eğrisi (Eğri altında kalan alan 1,000)



Şekil 4.21. Spektrotometrik yöntem verileri için ROC eğrisi (Eğri altında kalan alan ,984)

Merkez laboratuvar için ROC eğrisi (Şekil 4.19), biyosensör verileri için ROC eğrisi (Şekil 4.20) ve spektrofotometrik verilerin ROC eğrisi (Şekil 4.21) altında kalan alanlara bakıldığında; biyosensör ve merkez laboratuvar verilerinin ‘.90-1.00’ olan mükemmel aralıkta olduğu görülmektedir. Spektrofotometrik yöntemin ROC eğrisi altında kalan alan, biyosensör ve merkez laboratuvar ROC analizi alanlarından daha az olduğu gözlenmektedir. Bu 3 yöntem için çizilen ROC eğrileri birbirleriyle kıyaslandığında (Şekil 4.22) altın standart yönteme uygunluk açısından tasarladığımız biyosensörün daha uyumlu olduğu görülmektedir.



Şekil 4.22. Spektrofotometre, merkez laboratuvar ve biyosensör sonuçları için ROC eğrilerinin kıyaslanması

5. TARTIŞMA

Fizikokimyasal dönüştürücüler veya dönüştürücü mikrosistemler ile biyolojik yapıları birleştiren analitik cihazlar olan biyosensörlerin; “biyo” kısmı özgül olduğu hedef analiti tanır ve “sensör” kısmına sinyal (elektriksel, optik vb. gibi) olarak iletilir. Biyosensörler genel olarak biyoreseptör denilen, hedef molekülün yakalandığı biyolojik bağlanma bölgesi ve bu bağlanma sonucu oluşan değişimi ileten iletici (transducer) ve sinyal dönüştürücü kısımlardan oluşur. Biyosensörler basitlikleri, yüksek duyarlılıkları ve gerçek zamanlı analizlere uygulanabilirlikleri nedeniyle sağlıkta, çevresel analizlerde, askeri sahada, gıda, ilaç üretimi ve kimya endüstrileri olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır. Biyoreseptör olarak enzim, antikor, organel gibi birçok biyomolekül kullanılabilir. Bu tez kapsamında biyomolekül olarak Glukoz oksidaz (GOD) ve Peroksidaz (POD) enzimi kullanılmıştır. Bu tür biyosensörlerin temelindeki ilke birçok kimyasal tepkimenin iyon ya da elektronları üretmesi ya da tüketmesidir. Enzimler kimyasal tepkimelere katıldıklarında proton, elektron, ışık ve ısı gibi birçok ölçülebilir tepkime ürünü oluşturdıklarından, biyoreseptör olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Enzim temelli biyosensörlerin çoğunda elektrokimyasal esaslı ileticiler kullanılır. Bu ileticiler ile amperometri ilkesine göre ölçüm alınabildiğinden özellikle amperometride oksidoredüktaz sınıfı enzimler yaygın olarak kullanılır. Glukoz derişimini saptamak için genel olarak elektrokimyasal biyosensörler kullanılır. Bu durumda çözeltinin elektriksel özelliklerinde değişimler meydana gelir ve bu değişimler ölçülerek parametre olarak kullanılır.

Glukoz izlemi, sanayi ve biyosensör araştırmalarındaki en karmaşık konulardan biridir. Son zamanlarda ticari, tek kullanımlık ve taşınabilir glukoz biyosensörleri birçok araştırmacı tarafından geliştirilmiş ve dünya pazarına sunulmuştur. Glukoz, diyabet gibi bazı hastalıkların tanısının yanı sıra gıda endüstrisinde de tayini yapılan analitlerden biridir. Glukoz tayini, HPLC ve gaz-sıvı kromatografisi gibi cihazlarla yapılmasına rağmen glukoz biyosensörleri daha ucuz, hızlı ve kolay tayin imkanı sunar. Özellikle diyabetli hastaların kan şekeri seviyesinin hızlı ve güvenilir bir şekilde ölçülmesi için glukoz biyosensörlerinden faydalanılır. Dünya üzerinde 1980 yılında diyabet olan insan sayısı 108 milyon iken 2014’te 422 milyona çıkmıştır. 2012’de diyabetli 1.5 milyon insanın doğrudan ölümüne dolaylı olarak da 2.2 milyon hastanın kan glukoz düzeyindeki artış sebebiyle öldüğü rapor edilmiştir. Bu nedenle glukoz derişiminin daha

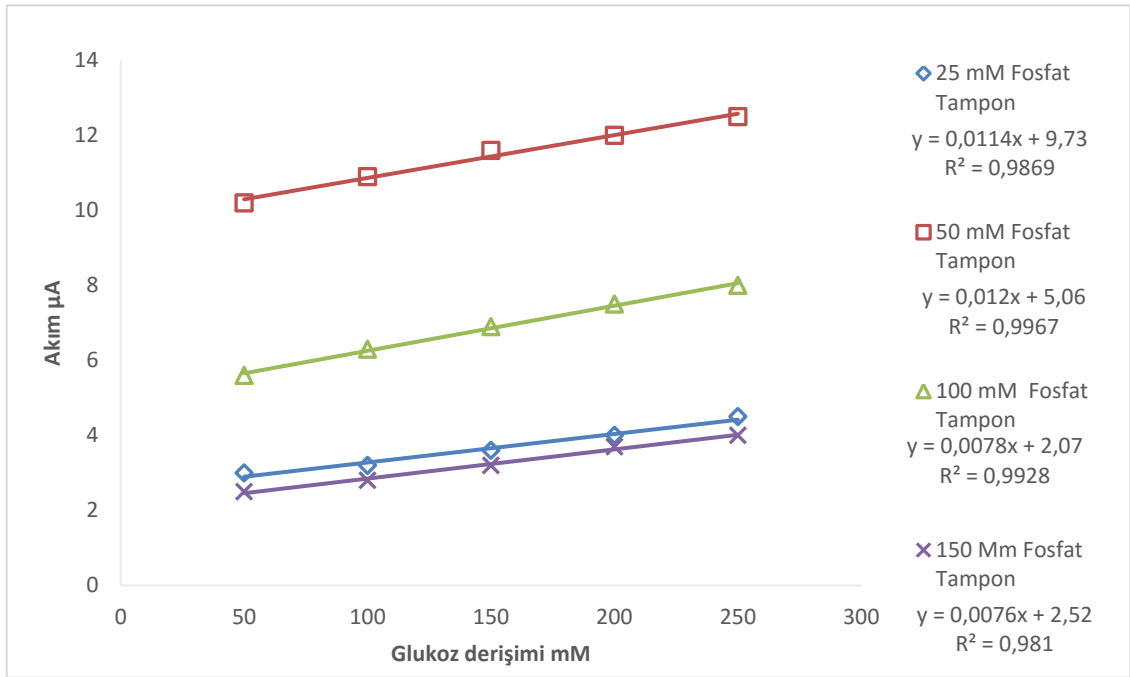
kısa sürede, daha az maliyetle daha doğru ölçüm yapan sistemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Bu tez kapsamında kan glukoz derişimlerinin daha hızlı ve daha ucuz ölçümüne olanak sağlayan Au/BSA-jelatin/GOD modifiye biyosensör geliştirildi. Bu biyosensörün çalışma koşulları ve biyoaktif tabakanın optimizasyonu ve karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Çalışma koşullarının optimizasyonunda öncelikle tarama hızı ile çalışma aralığı belirlenerek optimum pH, sıcaklık ve tampon derişimleri bulundu.

Deney koşulları protein yapısındaki enzimlerin katalitik aktiviteleri için çok önemlidir. Enzimlerin katalitik aktivitelerini etkileyen en önemli koşullardan birisi ortamın pH değeridir. Bundan dolayı immobilizasyon sonrasında pH, aktivite ilişkisindeki değişimler, enzim proteinin yapı-fonksiyon ilişkisini anlamak ve biyosensörün optimum çalışma koşullarını belirlemek açısından önemlidir. Optimum pH değerini belirlemek için deney ortamının pH'sı; asetik asit tamponu ile pH 5, 5.5, 6, 6.5, sodyum fosfat tamponu ile pH 7, 7.5, 8.0 ve glisin-NaOH tamponu ile pH 8.5, 9, 9.5 olacak şekilde değiştirilerek ölçümler alındı. Yapılan ölçümler sonucunda maksimum ölçüm değeri pH 7.5'de fosfat tamponu ile gözlenmiştir. Diğer taraftan glukoz oksidaz enziminin optimum pH değerinin Wilson ve Walker, Voet ve Voet'e göre pH 5-9 arasında, Kalisz ve ark. ve Eriksson ve ark.'a göre pH 5-7.5 arasında ve Sukhacheva'a göre pH 6-8.6 arasında olduğu bildirilmektedir. Bizim bulduğumuz pH 7.5 değerinin tüm bu çalışmalarda bulunan değerler aralığında olması biyosensör çalışmaları sırasında enzimin optimum pH değerinde çalıştığının ve pH değerine bağlı herhangi bir aktivite kaybı göstermediğinin kanıtıdır.

Optimum sıcaklığın belirlemesine yönelik yapılan çalışmalarda deney ortamı 10°C - 55°C arasında 5'er derece arttırılarak ölçümler alındı. Yapılan çalışmalar sonucunda sıcaklık ve enzim aktivitesi arasındaki grafikten optimum sıcaklık 35°C olarak bulunmuştur (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Literatüre bakıldığında farklı kaynaklardan elde edilen glukoz oksidaz enzimi için 25-35°C aralığında (Sukhacheva ve ark.,2004) bildirilmiştir.

Optimum tampon derişimini belirlemek için ölçümler pH 7.5'de derişimi 25 mM, 50 mM, 100 mM ve 150 mM olmak üzere 4 farklı fosfat tamponunda çalışıldı (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



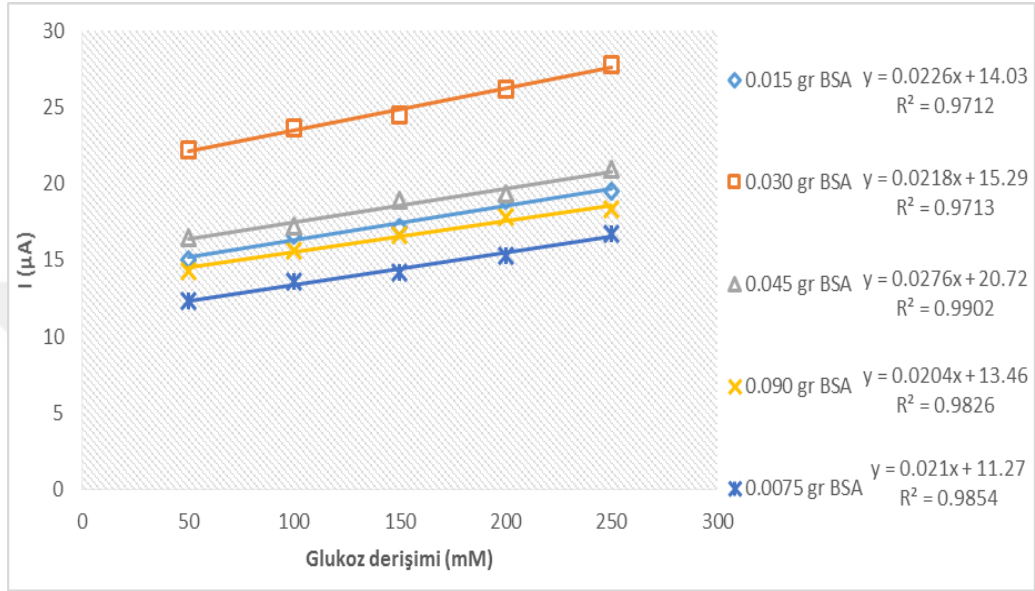
Şekil 5.1. Farklı fosfat tampon derişimlerine bağı olarak gerçekleşen cevap akımları

Yapılan deneyler sonucunda pH 7.5’de ve fosfat tamponu kullanılarak yapılan ölçümlerde maksimum değere ulaşıldığı ve iyon şiddetinin enzim aktivitesi üzerinde minimum etkili olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar literatür ile uyumludur. Diğer taraftan bu yöntemin değişik glukoz derişimlerini belirlemek amacıyla yapıldığı göz önüne alındığında normoglisemik bir örneğin (80 mg/dL) altında ve üstünde yapılan ölçümlerde glukoz derişiminden kaynaklanan bir etkinin gözlenmediği ve tüm derişimler için doğrusal bir sonuç grafiği elde edildiği gösterilmiştir ($R^2 : 0.9967$) (Şekil 5.1).

Pek çok endüstriyel, analitik ve klinik proseslerde enzimler, substrat çözeltisi ile karıştırılırlar ve ürüne dönüşüm gerçekleştirildikten sonra ekonomik olarak geri kazanılamazlar. Enzimlerin sadece bir kere kullanılmaları, pahalı olmaları nedeni ile büyük masraflara neden olmaktadır. Bu nedenle immobilize edilerek defalarca kullanılmaları ekonomik olarak daha makul olmaktadır. İmmobilizasyon buna bağı olarak biyoaktif tabaka; biyosensörlerin kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. Biyosensörün biyoaktif tabakasının optimizasyonunu değerlendirmek amacıyla sığır serum albümini, jelatin ve glutaraldehit kullanılarak herbirinin derişim farklarının enzim aktivitesine etkileri araştırıldı.

Tasarladığımız biyosensördeki biyoaktif tabakada sığır serum albümini; hem çapraz bağlayıcılarla (glutaraldehit) yapılan çapraz bağ sayısını arttırmak hem de enzimle

yapılan çapraz bağ sayısını azaltarak enzimin aktivitesinin düşmesinin engellenmesi amacıyla kullanıldı. BSA'nın optimizasyonunda 5 farklı derişim kullanılarak elektrot hazırlandı. En iyi biyosensör cevabı 0.030 gram BSA miktarında elde edildi (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10)



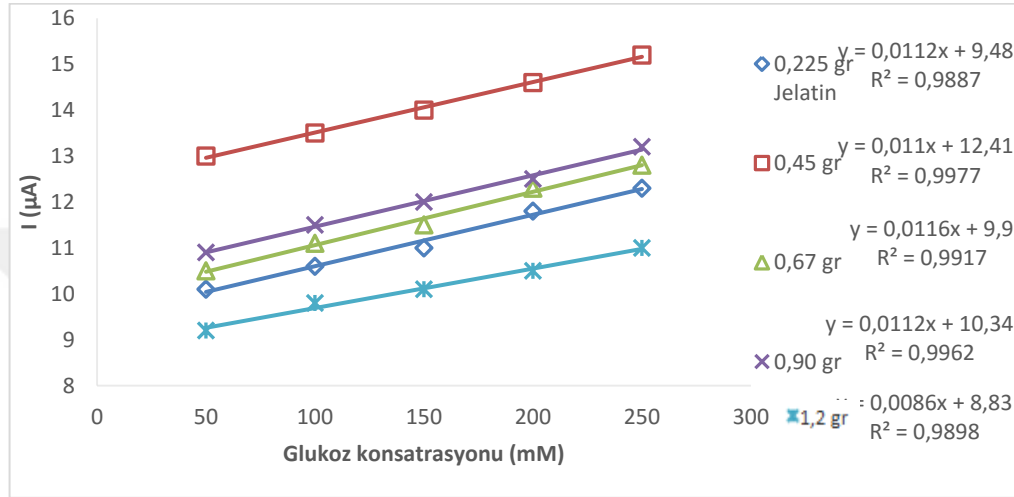
Şekil 5.2. Farklı BSA derişimlerinin biyosensör cevabına etkisi

Şekil 5.2'de görüldüğü üzere BSA miktarındaki artış çapraz bağ sayısını arttırdığından dolayı optimum miktardan fazla olan BSA (0.09 gr ve 0.045 gr), biyosensör cevabında azalmaya neden olmuştur. Optimum miktardan az olan BSA (0.0075 ve 0.015 gr), biyoaktif tabakadaki toplam çapraz bağ sayısını azaltmasına rağmen aynı zamanda enzim-jelatin, enzim-enzim, enzim-BSA arasındaki çapraz bağ sayısının da artmasına neden olur. Bu durumda enzimlerin aktif merkezlerinden oluşabilecek olası bağlanmaların da sayısı artar. Bu nedenle BSA miktarındaki azalma biyosensör cevabının da düşmesine sebebiyet verebilir.

Değişik glukoz derişimleri kullanılarak yapılan ölçümlerde ise glukoz miktarının değişik BSA derişimlerinden etkilenmediği ve BSA derişimi her ne olursa olsun glukoz ölçümünün doğrusal sonuç verdiği gözlenmiştir (Şekil 5.2). Sonuç olarak BSA'nın enzimin aktif bölgesi üzerine herhangi bir etkisi olmadığı söylenebilir.

İmmobilizasyonda kullanılan jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi incelendi. Jelatin eğer biyomalzeme olarak kullanılacak ise çapraz bağlı olmak

zorundadır. Son zamanlarda jelatin filminin çapraz bağları fiziksel olarak termal ısı ve ultraviyole ışınlar yardımıyla oluşturulmakta, kimyasal olarak ise formaldehit, glutaraldehit gibi çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak elde edilmektedir. Biyosensör çalışmalarında ise termal ve mekanik kararlılığının artırılması amacıyla immobilizasyonda genellikle çapraz bağlayıcı glutaraldehit ile birlikte kullanılır.¹⁴

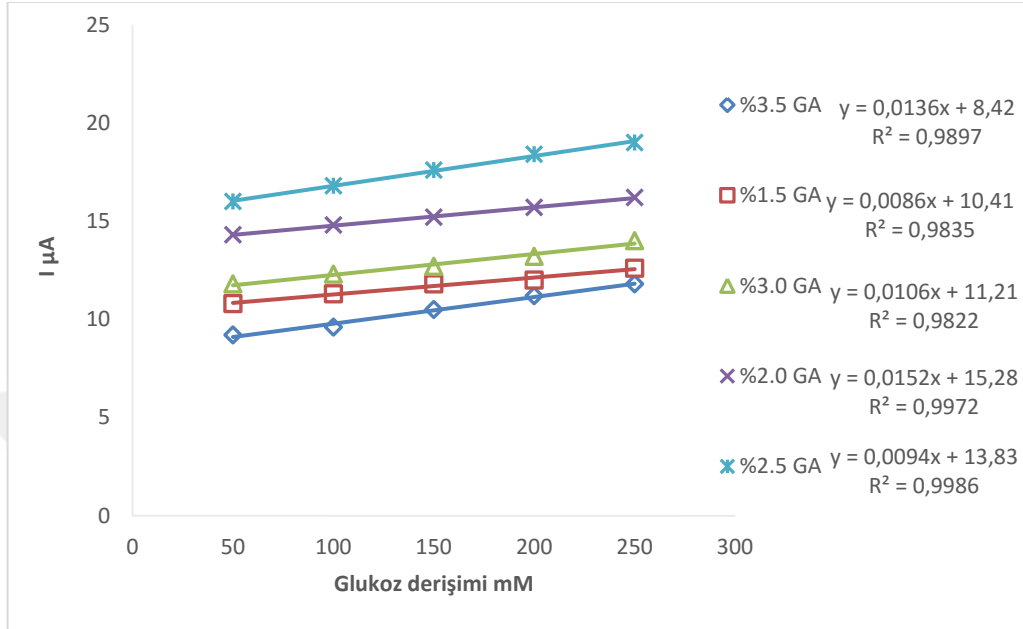


Şekil 5.3 Farklı jelatin miktarlarının biyosensör cevabına etkisi

Jelatin miktarı 1.2 gr 'a yükseltildiğinde biyosensör cevabı olarak en düşük değerler elde edilmiştir (Şekil 5.3). Bu sonuca göre; membran kalınlaşması gerçekleşmekte ve oksijen ile substratın biyoaktif tabaka içerisine difüzyonun engellenmektedir. Jelatin miktarındaki artış ile biyosensör cevabının düşmesi bu sebepten dolayı beklenen bir sonuçtur. 0.225, 0.67 gr ve 0.9 gr jelatin kullanılarak hazırlanan biyosensörün yanıtı 0.45gr jelatinle hazırlanan biyosensöre göre düşüktür. 0.45gr jelatin ile hazırlanan biyosensör hem daha kararlı bir biyoaktif tabaka oluşturması hem de glukoz derişim aralığında daha mükemmel doğrusallık göstermesi bakımından tercih edilmiştir ($R^2 : 0.9977$) (Şekil 5.3).

Biyoaktif tabakanın çapraz bağlayıcı ajanı olarak kullanılan glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi incelendi ve farklı glutaraldehit miktarları ile biyosensör hazırlandı (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). Grafiklerden görüldüğü üzere farklı derişimlerde glutaraldehit çözeltisi ile hazırlanan biyosensörlerde substrat için doğrusallığı yüksek grafikler elde edilmiştir. Burada tercihi belirleyen faktör akım

farklarının yüksekliğidir. Bu açıdan incelendiğinde substrat için en yüksek akım farkı % 2.5'lik glutaraldehit derişimi ile hazırlanan biyosensörden alınmıştır.



Şekil 5.4 Farklı glutaraldehit derişimlerinin biyosensör cevabına etkisi

Glutaraldehit yüzdesinin yüksek olması durumunda, düşük olduğu duruma göre biyoaktif tabakanın daha dar gözenekli olması beklenir. Bu nedenle yüksek glutaraldehit miktarlarında biyosensör cevabının düşük olması beklenen bir sonuçtur. Düşük glutaraldehit yüzdesi kullanılarak hazırlanan biyosensörde enzim-jelatin, enzim-enzim, jelatin-jelatin, jelatin-BSA, BSA-enzim, BSA-BSA arasındaki çapraz bağ sayısının azalması substratın biyoaktif tabakadan kaçışına olanak sağlayabilir. Ayrıca çapraz bağ sayısının azalması oksijenin tepkime ortamından biyoaktif tabakaya daha kolay difüzyonuna imkan sağlayacağından oksijen derişimiyle orantılı olması gereken devreden geçen akım miktarını etkiler.

Kan glukozunu belirlemeye yönelik tasarlanan modifiye biyosensöre ait karakterizasyon çalışmalarında; doğrusal tayin aralığı, raf ömrünün belirlenmesi, ölçümün tekrarlanabilirlik verileri elde edildikten sonra tam kan ve serumda glukoz tayini yapılarak istatistiksel veriler analiz edildi.

Biyosensörün çeşitli substrat derişimlerinde biyosensör cevaplarını incelemek ve glukoz standart grafiklerini belirlemek amacıyla, farklı glukoz derişimleri kullanılarak biyosensör cevapları belirlendi. 5-1000 mg/dL glukoz derişimi aralığında lineer

sonuçlar elde edildi (R^2 : 0.9929) (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16) Yüksek glukoz derişimlerinde çok belirgin olmasada doğrusallıktan sapmalar gözlenmiştir. Bu durumda glukoz derişim aralığı 5-400 mg/dL aralığında seçildiğinde doğrusal grafiğin daha hassas olduğu (R^2 :0.9969) saptanmış olup serum analizlerinde de glukoz değeri 400 mg/dL üzerinde bulunduğunda serumun seyreltilerek ölçümün tekrarlanması ve çıkan değerin seyreltme faktörü ile düzeltilmesi sonucuna varılmıştır.

Raf ömrünün belirlenmesine yönelik yapan çalışmalarda Au elektrot üzerine sığır serum albümini, jelatin ve glutaraldehitte glukoz oksidaz-peroksidaz enzimi immobilize edildi. 40 gün boyunca yapılan ölçümler sonucunda elektrot üzerine immobilize edilmiş enzim aktivitesi %27.8 azalmıştır. 40.günden sonraki yapılan ölçümlerde standart grafiklerindeki sapmalarından dolayı raf ömrü 40 gün olarak belirlenmiştir.

Ölçümün tekrarlanabilirlik çalışmalarında ise derişimi 80 mg/dL olan glukoz çözeltisi ile artarda ölçüm yapıldı. 13 değeri için ortalama değeri (X_{ort}): 80.00 mg/dL, standart sapma (S.S.): 0.1320 ve varyasyon katsayısı (V.K %): 0.165 olarak hesaplandı. Varyasyon katsayısının %5'in altında olması anlamlı kabul edilmektedir. Elde edilen veriler değeriendirildiğinde biyosensör ile alınan yanıtların tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 4.18)

Tıpta kullanım alanı yaygın olan Receiver Operating Characteric (ROC) ya da ROC eğrisi, tanı testlerinin performanslarının değeriendirilmesi ve karşılaştırılmasında oldukça önemlidir. Bu tez kapsamında ROC analizi; biyosensör yönteminin ayırt etme gücünün belirlenmesi, yöntem etkinliklerinin karşılaştırılması ve oluşturulan prototip sonuçlarının kalitesinin izlenmesi amacıyla kullanılmıştır. ROC eğrisi, tanı koymak amacıyla kullanılan bir değerişkenin değerişim genişliği içinde aldığı tüm değeriğerlerin sırasıyla kesim noktası kabul edilmesiyle hesaplanacak duyarlılık değeriğerlerinin, testin yanlış pozitif oranına (1-özgüllük) karşı noktalanması ile elde edilir. ROC eğrisinin oluşturulacağı koordinat sisteminde, Y ekseninde tanı testinin gerçek pozitif değeri (duyarlılık), X ekseninde ise yanlış pozitif değeri (1-özgüllük) yer alır. Her kesim noktasındaki doğru pozitif ve yanlış pozitive karşılık gelen noktalar birleştirilerek ROC eğrisi çizilir(1-7).

ROC eğrisinin altında kalan alanın büyüklüğü, üzerinde çalışılan tanı testinin ayırma yeteneğinin istatistiksel olarak önemini gösterir. Üzerinde çalışılan tanı testinin hiç ayırma yeteneği olmadığı durumda ROC eğrisi altındaki alanın beklenen değeri 0.50'dir. Mükemmel bir test ise sıfır yanlış pozitif ve sıfır yanlış negatif ile alanın değeri 1.00 olacaktır. Test, bu iki değeriğer arasında bir alana sahip olmalıdır.

Eğri altındaki alanların yorumlanmasında aşağıda verilen derecelendirmeler kullanılabilir.

.90-1.00 = mükemmel

.80-.90 = iyi

.70-.80 = orta

.60-.70 = zayıf

.50-.60 = başarısız

Serumda yapılan glukoz ölçümlerinde ise glukoz oksidaz kitinin spektrofotometrik, biyosensör ve merkez laboratuvar verileri kıyaslanarak değerlendirme yapıldı. ROC analizleri yapıldı. Merkez laboratuvar için ROC eğrisi (Şekil 4.19), biyosensör verileri için ROC eğrisi (Şekil 4.20) ve spektrofotometrik verilerin ROC eğrisi (Şekil 4.21) altında kalan alanlara bakıldığında; biyosensör ve merkez laboratuvar verilerinin '.90-1.00' olan mükemmel aralıkta olduğu görülmektedir. Spektrofotometrik yöntemin ROC eğrisi altında kalan alan, biyosensör ve merkez laboratuvar ROC analizi alanlarından daha az olduğu gözlenmektedir. Bu 3 yöntem için çizilen ROC eğrileri birbirleriyle kıyaslandığında (Şekil 4.22) altın standart yönteme uygunluk açısından tasarladığımız biyosensörün daha uyumlu olduğu görülmektedir.

Bütün bu veriler ışığında biyosensör diğer 2 yönteme göre maliyet, doğruluk, hızlı sonuçlar ve duyarlılık açısından incelendiğinde avantajları;

1. **Maliyet:** Merkez laboratuvar ve spektrofotometrik yöntemin semi mikro çalışmasında örnek başına 1000 µl kit kullanılırken tasarladığımız biyosensör ile 40 gün boyunca enzim aktivitesi korunan ve günlük ölçüm alınan elektrot için sadece 30 µl kit kullanılmaktadır. Bu yöntemin en büyük avantajı maliyeti olarak kabul edebiliriz.
2. **Hızlı Sonuç:** Merkez laboratuvar ve spektrofotometrede kan glukozunun belirlenmesi için gereken süre en az yarım saat iken biyosensör ile alınan cevap süresi 50 saniyedir.
3. **Doğruluk:** Ölçülen veya hesaplanan bir değer gerçeğe veya bu tez için altın standart olan merkez laboratuvar verilerine yakınlığını belirten bir kavramdır. Bilindiği üzere altın standart klinik çalışmalarda sıkça kullanılan güvenilir bir ölçü

kavramı olarak yerleşmiş durumdadır. Diyabet hastalarının kan glukoz düzeylerini izlemek için kullandıkları glukometrelerdeki hata oranı oldukça yüksek iken biyosensör, altın standart olarak kabul ettiğimiz merkez laboratuvar sonuçları ile uyumlu veriler elde edilmektedir.

4. **Duyarlılık:** Aynı büyüklüğün tekrarlamalı ölçüm veya hesaplama sonuçlarının birbirine yakınlığını ifade eden kavramdır. Üretilen biyosensör ile tekrarlamalı ölçümlerde hesaplama sonuçlarının birbirine yakınlığı oldukça yüksektir.



6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Biyosensörler temel olarak; analiz edilecek maddenin biyosensör yüzeyindeki biyokomponentle etkileşime girmesi sonucu iletici yüzeyinde analit miktarıyla orantılı bir sinyalin oluşumu ve bu sinyalin ölçüm cihazına iletilmesi ilkesine dayanır. Biyosensörlerde biyokomponent olarak enzimler, mikroorganizmalar, bitkisel ve hayvansal dokular, reseptörler, antikorlar ve nükleik asitler kullanılabilir. Analiz edilecek moleküle uygun olarak bir biyokomponent ve analitin dönüşümü sonucunda oluşan elektrokimyasal, optik ya da gravimetrik sinyali elektriksel sinyale çeviren uygun bir iletici seçilmelidir. Biyosensör sistemlerinde en büyük sorunlardan biri biyolojik materyali en uygun şekilde immobilize etmeyi başarmaktır. Immobilizasyon adımı biyolojik materyalin yaşam ve kullanım süresini akıbetinde biyosensörün kullanım ve yaşam ömrünü belirler. İdeal bir immobilizasyon sisteminin seçimi ile hazırlanan biyosensör sistemlerinden son yıllarda ticari alanda da geniş çapta yararlanılmaktadır.

Bu çalışmada oluşturulan biyosensör sisteminde Au elektrot yüzeyine glukoz oksidaz ve peroksidaz enziminin immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve glukoz tayini yapılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada biyosensör sistemini oluşturmak için glukoz oksidaz enzimi, sığır serum albümini, jelatin ve glutaraldehit yardımıyla elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir (BSA-jelatin /glukoz oksidaz-peroksidaz /glutaraldehit). Oluşturulan sistemle ölçümler 0.9 V'ta amperometrik metotla yapılmıştır.

Tasarlanan biyosensör için optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışma koşullarının optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde BSA-jelatin/glukoz oksidaz-peroksidaz /glutaraldehit glukoz biyosensörü için çalışma tamponu olarak 35°C, pH 7,5 50 mM fosfat tamponu belirlenmiştir. Biyoaktif tabakanın optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde ise 0.030 gr BSA, 0.45 gr jelatin ve %2.5 glutaraldehit olarak belirlenmiştir. Tasarlanan biyosensör için yapılan karakterizasyon çalışmalarında ise BSA-jelatin /glukoz oksidaz-peroksidaz /glutaraldehit modifiye glukoz oksidaz biyosensörü için doğrusal tayin aralığı 5-400 mg/dL bulunmuştur. Biyosensörün ölçüm tekrarlanabilirliği denemelerinde Au/BSA-jelatin/glukoz oksidaz-peroksidaz /glutaraldehit modifiye glukoz biyosensörü için (n=13) 80 mg/dL glukoz derişiminde standart sapma (S.S) = ± 0.1320 ve % varyasyon katsayısı (V.K) = 0.165 olarak bulunmuştur.

Raf ömrü çalışmalarında 40.günün sonunda yanıtın %72'ye kadar korunduğu, tekrarlanabilirlik çalışmalarında artarda yapılan ölçümler sonucunda değerlerin birbiriyle uyumlu olduğu görülmüştür. Serum örneklerinde yapılan glukoz analizlerinde; biyosensör

ile alınan sonuçlar merkez laboratuvar ve kit ile alınan sonuçlarla oluşan ROC analiziyle incelenmiştir. ROC eğrisi altında kalan alanlara bakılarak biyosensör verilerinin altın standart verilere mükemmel derece yakın olduğunu (.90-1.000) , spektrofotometrik ölçümlerde ise alanda bir miktar azalma olduğu görülmüştür.

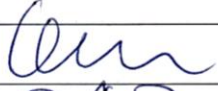
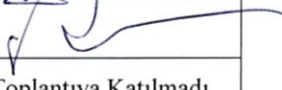
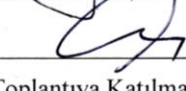
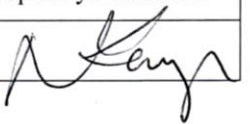
Sonuç olarak bu yüksek lisans tezi kapsamında Au elektrot ile glukoz tayinine yönelik tasarladığımız biyosensörün geliştirilecek glukometreler için iyi bir prototip olduğu, diğer yöntemlere kıyasla maliyet, hızlı sonuç, doğruluk ve duyarlılık bakımından daha avantajlı olduğu ve özgün çalışmayla literatüre önemli katkı sağlayacak veriler elde edilmiştir.



**T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

Toplantı Sayısı		Tarih
59		2 Aralık 2016

KARAR NO 11- Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, Prof. Dr. Levent Kayrın yönetiminde, Kezban Kartlaşmış tarafından yürütülmesi öngörülen, "Glukoz Tayinine Yönelik Yeni Bir Biyosensör Tasarımı" başlıklı yüksek lisans tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN	Doç Dr Selim Kadioğlu Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
ÜYELER	Prof Dr Davut Alptekin Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
	Prof Dr Dinçer Yıldızdaş Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	
	Prof Dr Mehmet Kanadaşı Kardiyoloji Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Gülşah Seydaoğlu Biyostatistik Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gürhan Sakman Genel Cerrahi Anabilim Dalı	
	Doç Dr Suat Gezer Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Av. Zehra Bulut Hukukçu Üye	Toplantıya Katılmadı
	Dr Neşe Kayrın Kurum Dışı Üye	

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, Balcalı 01330 Adana
Telefon: 0322 338 60 60 dahili 3465, Faks: 0322 338 67 22

KAYNAKLAR

1. **Akyilmaz, E. and Dinckaya, E.**,A mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate based alcohol oxidase electrode for alcohol determination in serum. *Talanta*. **2000**, *53*, 505-9.
2. **Arakawa, T.;Kuroki, Y.;Nitta, H.;Chouhan, P.;Toma, K.;Sawada, S.;Takeuchi, S.;Sekita, T.;Akiyoshi, K.;Minakuchi, S., et al.**,Mouthguard biosensor with telemetry system for monitoring of saliva glucose: A novel cavitas sensor. *Biosens Bioelectron*. **2016**, *84*, 106-11.
3. **Arya, S. K.;Datta, M. and Malhotra, B. D.**,Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosens Bioelectron*. **2008**, *23*, 1083-100.
4. **Akyilmaz, E. and Dinckaya, E.**,A novel non-competitive amperometric immunosensor by using thiourea-glutaraldehyde-modified gold electrode for immunoglobulin M detection. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. **2013**, *41*, 389-94.
5. **Ahmadalinezhad, A. and Chen, A.**,High-performance electrochemical biosensor for the detection of total cholesterol. *Biosens Bioelectron*. **2011**, *26*, 4508-13.
6. **Akyilmaz, E. and Dinckaya, E.**,Development of a catalase based biosensor for alcohol determination in beer samples. *Talanta*. **2003**, *61*, 113-8.
7. **Arya, S. K.;Datta, M.;Singh, S. P. and Malhotra, B. D.**,Biosensor for total cholesterol estimation using N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyltrimethoxysilane self-assembled monolayer. *Anal Bioanal Chem*. **2007**, *389*, 2235-42.
8. **Zhang, L.;Cai, Q. Y.;Cai, Z. X.;Fang, Y.;Zheng, C. S.;Wang, L. L.;Lin, S.;Chen, D. X. and Peng, J.**,Interactions of Bovine Serum Albumin with Anti-Cancer Compounds Using a ProteOn XPR36 Array Biosensor and Molecular Docking. *Molecules*. **2016**, *21*.
9. **Zribi, B.;Roy, E.;Pallandre, A.;Chebil, S.;Koubaa, M.;Mejri, N.;Magdinier Gomez, H.;Sola, C.;Korri-Youssoufi, H. and Haghiri-Gosnet, A. M.**,A microfluidic electrochemical biosensor based on multiwall carbon nanotube/ferrocene for genomic DNA detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical isolates. *Biomicrofluidics*. **2016**, *10*, 014115.
10. **Altug, C.;Mengulluoglu, U.;Kurt, E.;Kaya, S. and Dinckaya, E.**,A novel biosensor based on glucose oxidase for activity determination of alpha - amylase. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. **2011**, *39*, 298-303.
11. **Asav, E. and Akyilmaz, E.**,Preparation and optimization of a bienzymic biosensor based on self-assembled monolayer modified gold electrode for alcohol and glucose detection. *Biosens Bioelectron*. **2010**, *25*, 1014-8.
12. **DeSalvo, D. J.;Ly, T. T.;Wadwa, R. P.;Messer, L.;Westfall, E.;Gopisetty, D.;Hanes, S.;von Eyben, R.;Maahs, D. M. and Buckingham, B. A.**,Continuous Glucose Sensor Survival and Accuracy Over 14 Consecutive Days. *Diabetes Care*. **2016**.
13. **Aguila, S. A.;Shimomoto, D.;Ipinza, F.;Bedolla-Valdez, Z. I.;Romo-Herrera, J.;Contreras, O. E.;Farias, M. H. and Alonso-Nunez, G.**,A biosensor based on Coriolopsis gallica laccase immobilized on nitrogen-doped multiwalled carbon nanotubes and graphene oxide for polyphenol detection. *Sci Technol Adv Mater*. **2015**, *16*, 055004.
14. **Akyilmaz, E. and Dinckaya, E.**,A new enzyme electrode based on ascorbate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of l-ascorbic acid. *Talanta*. **1999**, *50*, 87-93.
15. **Dinckaya, E.;Akyilmaz, E.;Akgol, S.;Tatar Onal, S.;Zihnioğlu, F. and Telefoncu, A.**,A Novel Catechol Oxidase Enzyme Electrode for the Specific Determination of Catechol. *Biosci Biotechnol Biochem*. **1998**, *62*, 2098-100.
16. **Zhang, J.;Barajas, J. F.;Burdu, M.;Ruegg, T. L.;Dias, B. and Keasling, J. D.**,Development of a Transcription Factor Based Lactam Biosensor. *ACS Synth Biol*. **2016**.
17. **Ahmad, R.;Tripathy, N.;Park, J. H. and Hahn, Y. B.**,A comprehensive biosensor integrated with a ZnO nanorod FET array for selective detection of glucose, cholesterol and urea. *Chem Commun (Camb)*. **2015**, *51*, 11968-71.
18. **Dinckaya, E.;Akyilmaz, E. and Akgol, S.**,Urate oxidase electrode based on dissolved oxygen probe for urine uric acid determination. *Indian J Biochem Biophys*. **2000**, *37*, 67-70.
19. **Bereza-Malcolm, L.;Aracic, S. and Franks, A. E.**,Development and Application of a Synthetically-Derived Lead Biosensor Construct for Use in Gram-Negative Bacteria. *Sensors (Basel)*. **2016**, *16*.
20. **Arya, S. K.;Solanki, P. R.;Singh, R. P.;Pandey, M. K.;Datta, M. and Malhotra, B. D.**,Application of octadecanethiol self-assembled monolayer to cholesterol biosensor based on surface plasmon resonance technique. *Talanta*. **2006**, *69*, 918-26.
21. **Asav, E.;Yorganci, E. and Akyilmaz, E.**,An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*. **2009**, *78*, 553-6.

22. Navratilova, I.; Aristotelous, T.; Picaud, S.; Chaikuad, A.; Knapp, S.; Filappakopoulos, P. and Hopkins, A. L., Discovery of New Bromodomain Scaffolds by Biosensor Fragment Screening. *ACS Med Chem Lett.* **2016**, 7, 1213-1218.
23. Odaci, D.; Timur, S. and Telefoncu, A., A microbial biosensor based on bacterial cells immobilized on chitosan matrix. *Bioelectrochemistry.* **2009**, 75, 77-82.
24. Sezginurk, M. K. and Dinckaya, E., Direct determination of sulfite in food samples by a biosensor based on plant tissue homogenate. *Talanta.* **2005**, 65, 998-1002.
25. Yang, L.; Tao, Y.; Yue, G.; Li, R.; Qiu, B.; Guo, L.; Lin, Z. and Yang, H. H., Highly Selective and Sensitive Electrochemiluminescence Biosensor for p53 DNA Sequence Based on Nicking Endonuclease Assisted Target Recycling and Hyperbranched Rolling Circle Amplification. *Anal Chem.* **2016**, 88, 5097-103.
26. Ahn, J.; Choi, Y.; Lee, A. R.; Lee, J. H. and Jung, J. H., A duplex DNA-gold nanoparticle probe composed as a colorimetric biosensor for sequence-specific DNA-binding proteins. *Analyst.* **2016**, 141, 2040-5.
27. Bose, D.; Su, Y.; Marcus, A.; Raulet, D. H. and Hammond, M. C., An RNA-Based Fluorescent Biosensor for High-Throughput Analysis of the cGAS-cGAMP-STING Pathway. *Cell Chem Biol.* **2016**, 23, 1539-1549.
28. Cai, W.; Xie, S.; Tang, Y.; Chai, Y.; Yuan, R. and Zhang, J., A label-free electrochemical biosensor for microRNA detection based on catalytic hairpin assembly and in situ formation of molybdophosphate. *Talanta.* **2017**, 163, 65-71.
29. Feng, Q. M.; Zhou, Z.; Li, M. X.; Zhao, W.; Xu, J. J. and Chen, H. Y., DNA tetrahedral scaffolds-based platform for the construction of electrochemiluminescence biosensor. *Biosens Bioelectron.* **2016**, 90, 251-257.
30. Akyilmaz, E. and Dinckaya, E., An amperometric microbial biosensor development based on *Candida tropicalis* yeast cells for sensitive determination of ethanol. *Biosens Bioelectron.* **2005**, 20, 1263-9.
31. Akyilmaz, E.; Erdogan, A.; Ozturk, R. and Yasa, I., Sensitive determination of L-lysine with a new amperometric microbial biosensor based on *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. *Biosens Bioelectron.* **2007**, 22, 1055-60.
32. Asghary, M.; Raoof, J. B.; Rahimnejad, M. and Ojani, R., A novel self-powered and sensitive label-free DNA biosensor in microbial fuel cell. *Biosens Bioelectron.* **2016**, 82, 173-6.
33. Du, Y.; Zhang, W. and Wang, M. L., An On-Chip Disposable Salivary Glucose Sensor for Diabetes Control. *J Diabetes Sci Technol.* **2016**.
34. Hoa le, T. and Hur, S. H., Non-Enzymatic Glucose Sensor Based on 3D Graphene Oxide Hydrogel Crosslinked by Various Diamines. *J Nanosci Nanotechnol.* **2015**, 15, 8697-700.
35. Sanaeifar, N.; Rabiee, M.; Abdolrahim, M.; Tahriri, M.; Vashaei, D. and Tayebi, L., A novel electrochemical biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles-polyvinyl alcohol composite for sensitive detection of glucose. *Anal Biochem.* **2016**, 519, 19-26.
36. Sezginurk, M. K. and Dinckaya, E., A biosensor for the determination of beta-galactosidase activity: a different viewpoint on biosensors. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* **2011**, 39, 281-8.
37. Akyilmaz, E.; Yasa, I. and Dinckaya, E., Whole cell immobilized amperometric biosensor based on *Saccharomyces cerevisiae* for selective determination of vitamin B1 (thiamine). *Anal Biochem.* **2006**, 354, 78-84.
38. Timur, S.; Odaci, D.; Dincer, A.; Zihnioglu, F. and Telefoncu, A., Biosensing approach for glutathione detection using glutathione reductase and sulfhydryl oxidase bienzymatic system. *Talanta.* **2008**, 74, 1492-7.
39. Li, G.; Liao, J. M.; Hu, G. Q.; Ma, N. Z. and Wu, P. J., Study of carbon nanotube modified biosensor for monitoring total cholesterol in blood. *Biosens Bioelectron.* **2005**, 20, 2140-4.
40. Suaifan, G. A.; Alhogail, S. and Zourob, M., Rapid and low-cost biosensor for the detection of *Staphylococcus aureus*. *Biosens Bioelectron.* **2016**, 90, 230-237.
41. Vidal, J. C.; Garcia, E. and Castillo, J. R., Development of a platinized and ferrocene-mediated cholesterol amperometric biosensor based on electropolymerization of polypyrrole in a flow system. *Anal Sci.* **2002**, 18, 537-42.
42. Akyilmaz, E.; Turemis, M. and Yasa, I., Voltammetric determination of epinephrine by White rot fungi (*Phanerochaete chrysosporium* ME446) cells based microbial biosensor. *Biosens Bioelectron.* **2011**, 26, 2590-4.
43. Wang, R.; Zhou, X.; Shi, H. and Luo, Y., T-T mismatch-driven biosensor using triple functional DNA-protein conjugates for facile detection of Hg²⁺. *Biosens Bioelectron.* **2016**, 78, 418-22.
44. La Belle, J. T.; Adams, A.; Lin, C. E.; Engelschall, E.; Pratt, B. and Cook, C. B., Self-monitoring of tear glucose: the development of a tear based glucose sensor as an alternative to self-monitoring of blood glucose. *Chem Commun (Camb).* **2016**, 52, 9197-204.

45. Misra, T.;Baccino-Calace, M.;Meyenhofer, F.;Rodriguez-Crespo, D.;Akarsu, H.;Armenta-Calderon, R.;Gorr, T. A.;Frei, C.;Cantera, R.;Egger, B., et al.,A genetically encoded biosensor for visualizing hypoxia responses in vivo. *Biol Open*. **2016**.
46. Ozturk, G.;Ertas, F. N.;Akyilmaz, E.;Dinckaya, E. and Tural, H.,A novel amperometric biosensor based on artichoke (*Cynara scolymus* L.) tissue homogenate immobilized in gelatin for hydrogen peroxide detection. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. **2004**, 32, 637-45.
47. Yildirimoglu, F.;Arslan, F.;Cete, S. and Yasar, A.,Preparation of a polypyrrole-polyvinylsulphonate composite film biosensor for determination of cholesterol based on entrapment of cholesterol oxidase. *Sensors (Basel)*. **2009**, 9, 6435-45.
48. Odaci, D.;Telefoncu, A. and Timur, S.,Maltose biosensing based on co-immobilization of alpha-glucosidase and pyranose oxidase. *Bioelectrochemistry*. **2010**, 79, 108-13.
49. Cui, C.;Chen, H.;Chen, B. and Tan, T.,Genipin Cross-Linked Glucose Oxidase and Catalase Multi-enzyme for Gluconic Acid Synthesis. *Appl Biochem Biotechnol*. **2016**.
50. Donmez, S.;Arslan, F.;Sari, N.;Hasanoglu Ozkan, E. and Arslan, H.,Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase on a carbon paste electrode modified with microspheres attached L-glycine. *Biotechnol Appl Biochem*. **2016**.
51. Gonzalez-Navarro, F. F.;Stilianova-Stoytcheva, M.;Renteria-Gutierrez, L.;Belanche-Munoz, L. A.;Flores-Rios, B. L. and Ibarra-Esquer, J. E.,Glucose Oxidase Biosensor Modeling and Predictors Optimization by Machine Learning Methods. *Sensors (Basel)*. **2016**, 16.
52. Qi, G.;Wang, Y.;Zhang, B.;Sun, D.;Fu, C.;Xu, W. and Xu, S.,Glucose oxidase probe as a surface-enhanced Raman scattering sensor for glucose. *Anal Bioanal Chem*. **2016**, 408, 7513-20.
53. V, T. K. P. F.;Inguva, S.;Krishnamurthy, S.;Marsili, E.;Mosnier, J. P. and T, S. C.,Mediator-free interaction of glucose oxidase, as model enzyme for immobilization, with Al-doped and undoped ZnO thin films laser-deposited on polycarbonate supports. *Enzyme Microb Technol*. **2017**, 96, 67-74.
54. Nie, H.;Xue, X.;Liu, G.;Guan, G.;Liu, H.;Sun, L.;Zhao, L.;Wang, X. and Chen, Z.,Nitro-oleic acid ameliorates oxygen and glucose deprivation/re-oxygenation triggered oxidative stress in renal tubular cells via activation of Nrf2 and suppression of NADPH oxidase. *Free Radic Res*. **2016**, 50, 1200-1213.
55. Rama, E. C.;Costa-Garcia, A. and Fernandez-Abedul, M. T.,Pin-based electrochemical glucose sensor with multiplexing possibilities. *Biosens Bioelectron*. **2016**.
56. Cao, G. X.;Wu, X. M.;Dong, Y. M.;Li, Z. J. and Wang, G. L.,In Situ Enzymatically Generated Photoswitchable Oxidase Mimetics and Their Application for Colorimetric Detection of Glucose Oxidase. *Molecules*. **2016**, 21.
57. Zhang, Y.;Yang, Y.;Xie, Z.;Zuo, W.;Jiang, H.;Zhao, X.;Sun, Y. and Kong, W.,Decreased Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Expression Attenuates Glucose Oxidase-Induced Damage in Rat Cochlear Marginal Strial Cells. *Mol Neurobiol*. **2016**, 53, 5971-5984.
58. Khan, I.;Qayyum, S.;Ahmed, S.;Niaz, Z.;Fatima, N. and Chi, Z. M.,Molecular cloning and sequence analysis of a PVGOX gene encoding glucose oxidase in *Penicillium viticola* F1 strain and it's expression quantitation. *Gene*. **2016**, 592, 291-302.
59. Zhang, Y.;Tsitkov, S. and Hess, H.,Proximity does not contribute to activity enhancement in the glucose oxidase-horseradish peroxidase cascade. *Nat Commun*. **2016**, 7, 13982.
60. Rayegan, S.;Dehpour, A. R. and Sharifi, A. M.,Studying neuroprotective effect of Atorvastatin as a small molecule drug on high glucose-induced neurotoxicity in undifferentiated PC12 cells: role of NADPH oxidase. *Metab Brain Dis*. **2016**.
61. Sim, H. J.;Kim, J. H.;Kook, S. H.;Lee, S. Y. and Lee, J. C.,Glucose oxidase facilitates osteogenic differentiation and mineralization of embryonic stem cells through the activation of Nrf2 and ERK signal transduction pathways. *Mol Cell Biochem*. **2016**, 419, 157-63.
62. Reynolds, T. M. and Pillay, T. S.,Donald Rumsfeld and point-of-care testing (POCT): the problem of unknown unknowns-venous blood and glucose oxidase-based test strips. *J Clin Pathol*. **2016**, 69, 839-40.
63. Wang, X.;Xiong, Y. L.;Sato, H. and Kumazawa, Y.,Controlled Cross-Linking with Glucose Oxidase for the Enhancement of Gelling Potential of Pork Myofibrillar Protein. *J Agric Food Chem*. **2016**, 64, 9523-9531.
64. Vuong, T. V.;Foumani, M.;MacCormick, B.;Kwan, R. and Master, E. R.,Direct comparison of gluco-oligosaccharide oxidase variants and glucose oxidase: substrate range and H₂O₂ stability. *Sci Rep*. **2016**, 6, 37356.
65. Martinkova, P.;Opatrilova, R.;Kruzliak, P.;Styriak, I. and Pohanka, M.,Erratum to: Colorimetric Glucose Assay Based on Magnetic Particles Having Pseudo-peroxidase Activity and Immobilized Glucose Oxidase. *Mol Biotechnol*. **2016**, 58, 604.
66. Teke, M.;Sezginturk, M. K. and Dinckaya, E.,Sulfite determination by a biosensor based on bay leaf tissue homogenate: very simple and economical method. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. **2009**, 37, 138-42.

67. **Du, X.;Durgan, C. J.;Matthews, D. J.;Motley, J. R.;Tan, X.;Pholsena, K.;Arnadottir, L.;Castle, J. R.;Jacobs, P. G.;Cargill, R. S., et al.**,Fabrication of a Flexible Amperometric Glucose Sensor Using Additive Processes. *ECS J Solid State Sci Technol.* **2015**, *4*, P3069-P3074.
68. **Cheng, H.;Xu, L.;Zhang, H.;Yu, A. and Lai, G.**,Enzymatically catalytic signal tracing by a glucose oxidase and ferrocene dually functionalized nanoporous gold nanoprobe for ultrasensitive electrochemical measurement of a tumor biomarker. *Analyst.* **2016**, *141*, 4381-7.
69. **Kirgoz, U. A.;Tural, H.;Timur, S.;Pazarlioglu, N.;Telefoncu, A. and Pilloton, R.**,Laccase biosensors based on mercury thin film electrode. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* **2005**, *33*, 447-56.
70. **Rocker, J.;Schmitt, M.;Pasch, L.;Ebert, K. and Grossmann, M.**,The use of glucose oxidase and catalase for the enzymatic reduction of the potential ethanol content in wine. *Food Chem.* **2016**, *210*, 660-70.
71. **Teke, M.;Sezginturk, M. K.;Dinckaya, E. and Telefoncu, A.**,Two biosensors for phenolic compounds based on mushroom (*Agaricus bisporus*) homogenate: comparison in terms of some important parameters of the biosensors. *Prep Biochem Biotechnol.* **2008**, *38*, 51-60.
72. **Topcu, S.;Sezginturk, M. K. and Dinckaya, E.**,Evaluation of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. *Biosens Bioelectron.* **2004**, *20*, 592-7.
73. **Ballesta-Claver, J.;Ametis-Cabello, J.;Morales-Sanfrutos, J.;Megia-Fernandez, A.;Valencia-Miron, M. C.;Santoyo-Gonzalez, F. and Capitan-Vallvey, L. F.**,Electrochemiluminescent disposable cholesterol biosensor based on avidin-biotin assembling with the electroformed luminescent conducting polymer poly(luminol-biotinylated pyrrole). *Anal Chim Acta.* **2012**, *754*, 91-8.
74. **Kökbaşı, U.;Tuli, A.;Kayrın, L.**, Biosensors And Their Medical Applications, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. **2013**, 499-513.

ÖZGEÇMİŞ

Kezban Kartlaşmış 1990 yılında Adana’da doğdu. 2008’de Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde başladığı lisans öğrenimini 2012 yılında tamamladı. 2014 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.

