

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**İLETKEN POLİMER / ÇOK DUVARLI KARBON
NANOTÜP MODİFİKASYONUNA DAYALI
MİKROBİYAL TEMELLİ BİYOSENSÖR TASARIMI
VE PARASETAMOL TAYİNİNDE KULLANILMASI**

Ezgi BAYRAM

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 405.05.01

Sunuş Tarihi : 28.05.2015

Bornova-İZMİR

2015

Ezgi BAYRAM tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “İletken polimer / Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Modifikasyonuna Dayalı Mikrobiyal Temelli Biyosensör Tasarımı ve Parasetamol Tayininde Kullanılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş vetarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	:	
Raportör Üye	:	
Üye	:	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “İletken polimer / Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Modifikasyonuna Dayalı Mikrobiyal Temelli Biyosensör Tasarımı ve Parasetamol Tayininde Kullanılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

28/ 05 / 2015

İmzası

Adı-Soyadı

ÖZET**İLETKEN POLİMER / ÇOK DUVARLI KARBON NANOTÜP
MODİFİKASYONUNA DAYALI MİKROBİYAL TEMELLİ
BİYOSENSÖR TASARIMI VE PARASETAMOL TAYİNİNDE
KULLANILMASI**

BAYRAM, Ezgi

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

Mayıs 2015, 59 sayfa

Bu tez çalışmasında biyosensör teknolojisine yeni ve orijinal bir bakış açısı getiren parasetamol tayinine yönelik, polianilin - çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) - *Basillus sp.* - glutaraldehit modifiye mikrobiyal biyosensör geliştirilmesi amaçlandı. Bu biyosensör sisteminde anilin ve MWCNT kullanılarak altın (Au) elektrot yüzeyinde elektropolimerizasyon ile polianilin kompozit yapısı oluşturuldu. Modifiye Au elektrot yüzeyinde MWCNT bulunmasından ileri gelen karboksil grupları, EDC-NHS ile aktifleştirilerek damlatma yöntemiyle *Basillus sp.* yüzeye immobilize edildi. Glutaraldehit (GA) ile çapraz bağlama yapılarak mikroorganizmaların yüzeyden kaçıışı engellenmiş oldu.

Tasarlanan biyosensör sistemiyle parasetamol ölçümleri 0,5 V' ta amperometrik metodla yapılmıştır. Bunun yanısıra differensiyal puls (DP) ve döngüsel voltammogramlar (DV) metodları ile de biyosensör cevabı tayin edilmiş ve bazı optimizasyon çalışmalarında (0 - 0,8) V aralığında DP metodu kullanılmıştır. Parasetamol konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artan akım değerlerinden yola çıkılarak tayinler gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen biyosensörün optimizasyon çalışmalarında öncelikle Au elektrot yüzeyinde oluşturulan biyoaktif tabakanın bileşenlerine yönelik çalışmalar yapıldı. Bu doğrultuda, optimum anilin, MWCNT, EDC-NHS, mikroorganizma ve GA miktarının belirlenmesine yönelik çalışmalar

gerçekleştirildi. Çalışma koşullarının optimize edilmesi için sıcaklık ve pH optimizasyonu çalışmaları yapıldı. Mikrobiyal biyosensörün karakterizasyonuna yönelik yapılan çalışmalarda ise parasetamol doğrusal tayin aralığının belirlenmesi, tekrarlanabilirlik, depo kararlılığı, substrat spesifikliğı, girişim etkisi parametreleri araştırılmış ve ilaç örneklerinde parasetamol tayini yapılmıştır.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda parasetamol tayine yönelik olarak geliştirilen mikrobiyal biyosensör için en uygun optimum anilin, MWCNT, EDC-NHS, mikroorganizma ve GA miktarı sırasıyla; 0,05 M, 1 mg/mL, 1 : 1,5 M, 10 mg/mL ve % 0,5 bulunmuştur. Çalışma koşullarının optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde mikrobiyal biyosensör için çalışma tamponu olarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu ve çalışma sıcaklıklığı 30 °C olarak tespit edilmiştir. Mikrobiyal biyosensörün karakterizasyonuna ilişkin yapılan çalışmalarda 0,5 V amperometrik metot için doğrusal tayin aralığı 25 – 250 µM ve tayin limiti 7,9 µM ve cevap süresi 4,8 s olarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik denemelerinde ise 250 µM parasetamol için (n=7) ortalama değeri 250,65 µM, standart sapma (S.S) ±1,55 µM ve varyasyon katsayısı (V.K) % 0,62 olarak bulunmuştur. Ayrıca geliştirilen mikrobiyal biyosensör ve referans bir metot ile ilaç örneklerinde parasetamol tayini de yapılmıştır.

Anahtar kelimeler : Çok duvarlı karbon nanotüp, mikrobiyal biyosensör, anilin, parasetamol

ABSTRACT**DEVELOPMENT OF MICROBIAL BIOSENSOR BASED ON
CONDUCTIVE POLYMER / MULTIWALLED CARBON
NANOTUBE AND ITS APPLICATION TO PARACETAMOL
DETERMINATION**

BAYRAM, Ezgi

Master of Science Thesis, Biochemistry Department

Thesis advisor : Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

May 2015, 59 pages

In this thesis, development of a multi-walled carbon nanotube (MWCNT) - *Basillus sp.* - glutaraldehyde modified microbial biosensor which brings a new and original perspective to biosensor technology intended for paracetamol determination. Polianiline-MWCNT composite was formed with aniline and MWCNT on a gold electrode (Au) surface in this biosensor system. *Basillus sp.* was immobilized on the electrode surface by dropping after activated of carboxyl groups by EDC-NHS. Microorganism was crosslinked by glutaraldehyde (GA) so that prevented of running away the microorganism from the surface of the biosensor.

Paracetamol measurements were carried out at 0.5 V with amperometric method by developed biosensor system. In addition, detection of the response of the biosensor by using differential pulse (DP) and cyclic voltammetry (CV) methods and DP method was used for some immobilization studies at (0 - 0.8) V potential range. The measurements were carried out with the determination of increasing current values directly proportional with paracetamol concentration using amperometric method.

In the optimization studies of the biosensor firstly bioactive layer components such as optimum aniline concentration, optimum MWCNT amount, optimum EDC-NHS proportion, optimum microorganism amount and optimum glutaraldehyde concentration were carried out. In the optimization of working

conditions; optimum pH and optimum temperature were also investigated. In the characterization studies of the biosensor some parameters such as linearity, reproducibility, storage stability, substrate specificity, interference effect and drug sample analysed were determined.

From the result of the optimization studies, the optimum aniline concentration, optimum MWCNT amount, optimum EDC-NHS proportion, optimum microorganism amount and optimum glutaraldehyde concentration were determined to 0.05 M, 1 mg/mL, 1 : 1.5 M, 10 mg/mL ve 0.5 %, respectively. From the experiments the phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) and 30°C were chosen to be optimum working conditions for the microbial biosensor. It was determined at the characterization studies on the biosensor that linear curves were obtained between the ranges from 25 to 250 μ M paracetamol concentration, detection limit and response time were reached 7.9 μ M and 4.8 s, respectively. At the repeatability experiments (n=7), the average value, standard deviation, (SD) and coefficient of variation (CV %) were calculated to be 250.65 μ M, $\pm$ 1.55, 0.62 % for 250 μ M paracetamol concentration, consecutively. Also, determination of paracetamol were carried out in drug samples by developed biosensor and a reference method.

Keywords: Multiwalled carbon nanotube, microbial biosensor, aniline, paracetamol.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca maddi manevi her anlamda destek veren, yol gösteren, bilimsel anlamda gelişmemi sağlayan saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Erol AKYILMAZ'a, kıymetli görüşlerinden faydalandığım doktora öğrencisi Canan Özyurt'a, araştırma görevlisi Sayın Umut Mengüllüoğlu' na ve bu aşamaya gelmemde önemli katkıları olan tüm HOCALARIMA teşekkürü borç bilirim. Ayrıca lisansüstü eğitimime başlamamdaki en büyük desteğim olan ve bana her zaman inanan ailem başta olmak üzere değerli meslektaşım Gözde Odabaş' a, bütün eğitim hayatım boyunca bana verdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 14-FEN-020 no'lu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxi
1. GİRİŞ	1
1.1 Biyosensörlerin Sınıflandırılması	2
1.1.1 Analizlenecek madde biyoaktif bileşen ilişkisine göre biyosensörlerin sınıflandırılması	2
1.1.2 Biyoaktif tabaka-iletim ve ölçüm sistemi içeriğine göre biyosensörlerin sınıflandırılması	3
1.1.3 Biyoaktif tabakada kullanılan biyokomponent türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması	3
1.2 Enzim Temelli Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri	3
1.3. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler.....	4
1.4. Elektrosentezle Elde Edilen İletken Polimer Filmler.....	6
1.4.1. Polianilin (PANI)	8
1.5. Biyosensörlerde CNT Kullanımı	9
1.5.1. CNT’lerin Çözünürleştirilmesi	9
1.5.2. CNT temelli biyosensörler	10
1.5.3. CNT-Polimer kompozitleri.....	13
1.5.3. CNT ve biyoaktif bileşenlerin birlikte kullanımı.....	14
1.6. Mikrobiyal Biyosensörler.....	16
1.6.1. <i>Bassillus subtilis</i>	18
1.7. Parasetamol.....	18
2. MATERYAL METOT.....	20
2.1 Materyal	20

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.1.1 Cihaz ve diğer ekipmanlar	20
2.1.2 Kimyasallar	20
2.1.3. <i>Basillus sp.</i> kültür ortamı	20
2.2. Yöntem	21
2.2.1 Biyosensörün hazırlanması	21
2.2.2. Biyosensörün çalışma ilkesi.....	24
2.3. Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/ <i>Basillus sp.</i> /GA Mikrobiyal Biyosensörünün Hazırlanmasına Yönelik Yapılan Optimizasyon Çalışmaları.....	24
2.3.1. Anilin miktarının biyosensör cevabına etkisi	25
2.3.2. MWCNT miktarının biyosensör cevabına etkisi.....	25
2.3.3. EDC-NHS miktarının biyosensör cevabına etkisi.....	26
2.3.4. Mikroorganizma miktarının biyosensör cevabına etkisi	26
2.3.5. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabına etkisi	26
2.4. Mikrobiyal Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu	27
2.4.1. Mikrobiyal Biyosensörün Optimum Sıcaklığını Belirlenmesi	27
2.4.2. Mikrobiyal Biyosensörün Optimum pH Değerinin Belirlenmesi	27
2.5. Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/ <i>Basillus sp.</i> /GA Mikrobiyal Biyosensörünün Karakterizasyonuna Yönelik Çalışmalar	28
2.5.1. Mikrobiyal biyosensörün hazırlanma aşamalarında yüzey karakterizasyonun impedans ölçümleri ile belirlenmesi	28
2.5.2. Parasetamol için doğrusal tayin aralığına yönelik çalışmalar	28
2.5.3. Mikrobiyal biyosensörün tekrarlanabilirliğine yönelik çalışmalar	28
2.5.4. Mikrobiyal biyosensörün depolama kararlılığına yönelik çalışmalar	29
2.5.5. Mikrobiyal biyosensörün substrat spesifikliğine yönelik çalışmalar	29
2.5.6. Mikrobiyal biyosensöre girişimcilerin etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalar.....	29
2.5.7. Mikrobiyal biyosensör ile ilaç örneklerinde parasetamol tayinine yönelik çalışmalar.....	29

İÇİNDEKİLER (devam)

	Sayfa
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	30
3.1. Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/ <i>Basillus sp.</i> /GA Mikrobiyal Biyosensörün Biyoaktif Tabakanın Optimizasyonuna İlişkin Bulgular	30
3.1.1 Anilin miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular	34
3.1.2 MWCNT miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular	36
3.1.3. EDC-NHS miktarının mikrobiyal biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular	38
3.1.4. Mikroorganizma miktarının mikrobiyal biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular	39
3.1.5. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular	41
3.2. Mikrobiyal Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular	42
3.2.1. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi	42
3.2.2. Optimum pH değerinin belirlenmesi	43
3.3. Mikrobiyal Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular ..	44
3.3.1. Parasetamol için belirlenen doğrusal tayin aralığı	44
3.3.2. Mikrobiyal biyosensörün tekrarlanabilirlik denemelerine ilişkin bulgular ..	48
3.3.2. Mikrobiyal biyosensörün depolama kararlılığına ilişkin bulgular	48
3.3.3. Mikrobiyal biyosensörün substrat spesifikliğine ilişkin bulgular	49
3.3.4. Mikrobiyal biyosensör cevabına girişimcilerin etkisine ilişkin bulgular	50
3.3.5. Mikrobiyal biyosensör ile ilaç örneklerinde parasetamol tayinine yönelik bulgular	52
4. SONUÇ	53
KAYNAKLAR DİZİNİ	55
ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Biyosensörlerin temel çalışma prensibi.....	2
1.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi.....	4
1.3. Biyomedikal uygulamalarda en yaygın kullanım alanına sahip iletken polimerler polipirol, politiyofen, poli(3,4-ethilendioksitiyofen) ve polianilin.....	7
1.4. Moleküler kablolar olarak görev yapan CNTlerin dikey olarak yönlendirilmesi ile nanoorman yapıları.....	12
1.5. CNT - Polimer modifiye edilmiş kompozit elektrot	14
1.6. Glukoz oksidaz biyosensörünün CNT ile modifikasyonu	15
1.7. Parasetamolün kimyasal yapısı	19
1.8. Parasetamolün enzimatik yolla yükseltgenme tepkimesi.	19
2.1. Hazırlanılan Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/ <i>Basillus sp.</i> /GA mikrobiyal biyosensörünün immobilizasyon aşamaları.....	23
2.2. Parasetamolün yükseltgenme reaksiyonu.	24
2.3. Biyosensörün çalışma ilkesi.....	24
3.1. Mikrobiyal biyosensörün yüzey modifikasyonuna ilişkin DV ölçümleri	30
3.2. Mikrobiyal biyosensörün yüzey modifikasyonuna ilişkin impedans ölçümleri	31
3.3. Mikrobiyal biyosensörün aşağıdan yukarıya doğru 100, 250, 1000 μ M parasetamol bulunan ortamda (-0,25-0,8) V aralığındaki DV cevapları.....	32

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.4. Mikrobiyal biyosensörün aşağıdan yukarıya doğru 100, 250, 1000 μM parasetamol bulunan ortamda (0-0,8) V aralığındaki DP cevapları.	33
3.5. Mikrobiyal biyosensörün 25 μM lık sıralı katım ile belirtilen potansiyeldeki amperometrik akım değerlerinin karşılaştırılması.	34
3.6a. Optimum anilin miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda DP yöntemi ile elde edilen sonuçlar.	35
3.6b. Optimum anilin miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda DP yöntemi ile elde edilen sonuçlardan oluşturulan doğrusal grafikler.	36
3.7a. Optimum MWCNT miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0.5 V' ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlar.	37
3.7b. Optimum MWCNT miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0.5 V' ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlardan oluşturulan doğrusal grafikler.	37
3.8a. Optimum EDC-NHS miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0,5 V' ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlardan oluşturulan doğrusal grafikler.	38
3.8b. Optimum EDC-NHS miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0,5 V' ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlardan oluşturulan doğrusal grafikler.	39
3.9a. Optimum mikroorganizma miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0,5 V' ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlardan oluşturulan doğrusal grafikler.	40

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.9b. Optimum mikroorganizma miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0,5 V' ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlardan oluşturulan doğrusal grafikler.....	40
3.10a. Optimum glutaraldehit miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0,5 V' ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlar	41
3.10b. Optimum glutaraldehit miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0,5 V' ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlardan elde edilen doğrusal grafikler.	42
3.11. Mikrobiyal biyosensör için optimum sıcaklık grafiği. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir.	43
3.12. Mikrobiyal biyosensör için optimum pH grafiği. Ölçümler 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.	44
3.13a. Tayin aralığının belirlenmesi için (-0,25-0,8) V aralığında, 10 mV/s tarama hızında alınan DV ölçümleri.....	45
3.13b. Tayin aralığının belirlenmesi için (-0,25-0,8) V aralığında alınan DV ölçümleri.....	45
3.14a. Tayin aralığının belirlenmesi için (0-0,8) V aralığında alınan DP ölçümleri.	46
3.14b. Tayin aralığının belirlenmesi için 0-0,8 V aralığında alınan DP ölçümleri.	46
3.15a. Tayin aralığının belirlenmesi için 0,5V' ta alınan amperometrik ölçümler her 50 sn' de bir 25 µM parasetamol ilavesi ile elde edilmiştir.	47
3.15b. Tayin aralığının belirlenmesi için 0,5V' ta alınan amperometrik ölçümlere ait kalibrasyon grafiği.	47

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.16. Parasetamol tayinine yönelik geliştirilen mikrobiyal biyosensör için depo kararlılığı denemesine ilişkin bulgular.	48
3.17. Parasetamol tayinine yönelik geliştirilen mikrobiyal biyosensör için substrat spesifikliğinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular.	49
3.18. Parasetamol tayinine yönelik geliştirilen mikrobiyal biyosensör için girişimcilerin etkisinin değerlendirilmesine ilişkin veriler (A) ve bulgular (B)..	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Kimyasal ve elektrokimyasal polimerizasyon	8
1.2. Karbon nanotüplerin çözünürleştirilmesinde yaygın olarak kullanılan bazı yaklaşımlar.	10
3.1. Parasetamol için elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri.	48
3.2. Parasetamolün mikrobiyal biyosensör ve spektrofotometrik tayin ile analizinin karşılaştırılması.	52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
PA	Polianilin
PPO	Polifenol oksidaz
CNT	Karbon nano tüp
MWCNT	Çok duvarlı karbon nano tüp
SWCNT	Tek duvarlı karbon nano tüp
EDC	Etil(dimetilaminopropil) karbodiimide
NHS	N-Hidroksisuksinimid
GA	Glutaraldehit
DV	Döngüsel voltammogram
DP	Differensiyal puls

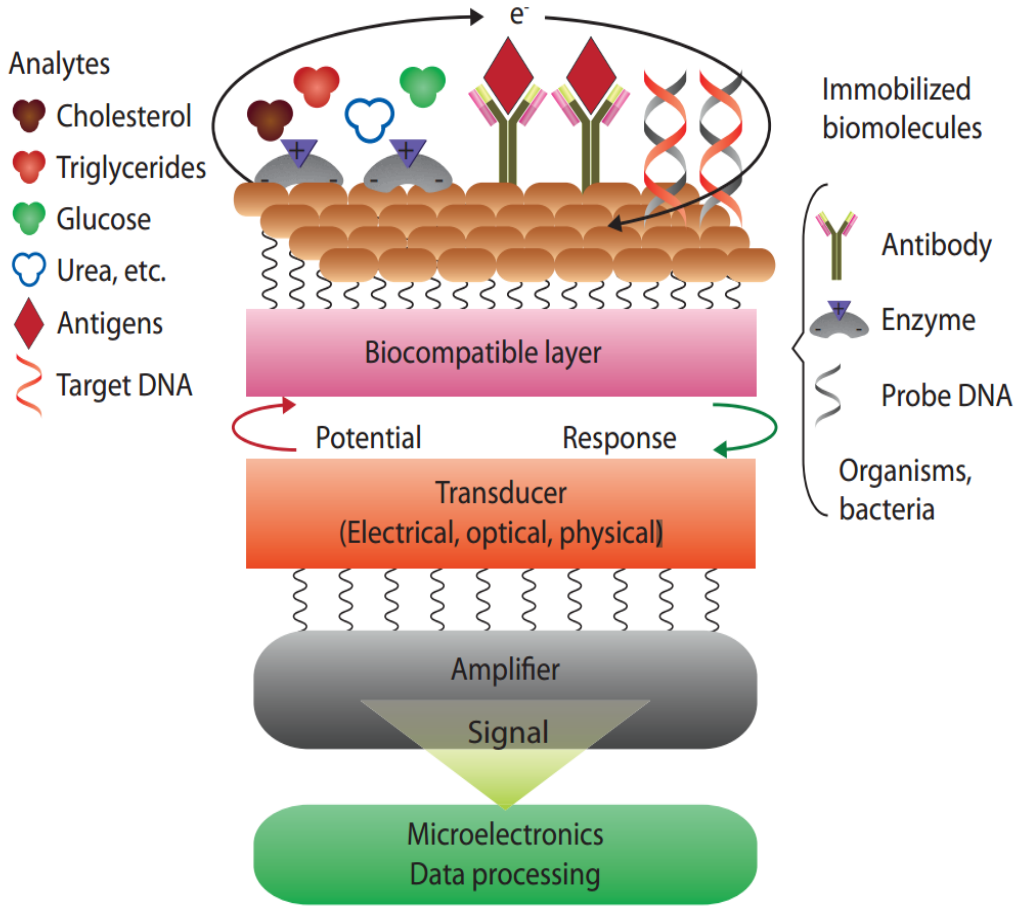
1. GİRİŞ

Biyosensörler biyolojik sistemlerin yüksek spesifikliği ve fiziksel analiz sistemlerinin tayin duyarlılığının birleştirilmesi ile oluşan analitik sistemlerdir. Bir biyosensörün amacı, bir veya bir grup analitin (analiz edilecek madde) miktarı ile orantılı olarak tekrarlanabilir sayısal elektrik sinyali üretmektir. Kullanılan biyolojik aktif materyalin biyokimyasal spesifikliği biyosensörün fonksiyonunu belirler. Sensörlerde, biyoaktif tabakanın spesifikliği, biyosensör sistemlerinin seçimliliğinin yüksek olmasındaki en önemli nedenlerden biridir. Bunun yanı sıra biyolojik ilgisinin olduğu molekül olan analiti direk tanınması biyosensöre önemli bir avantaj sunmaktadır (Karube and Nakanishi, 1994).

Etkili bir biyosensörün hazırlanmasında biyoaktif tabakanın iletici sistem üzerine başarılı bir şekilde immobilize edilmesi önemlidir. Biyosensörlerin, analit tayini için gerekli olan iletici kısmı elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik ve kondüktometrik), optik, termometrik, piezoelektrik ya da manyetik özellikteki gruplardan oluşabilir (Sharma et al., 2003; Velasco-Garcia and Mottram, 2003). Biyo-element analiti tanır ve sensör element biyomoleküldeki değişimi elektrik sinyaline dönüştürür. Biyosensör yüzeyinde oluşan etkileşimler membran tuzaklama, fiziksel adsorpsiyon, matriks tuzaklama ve kovalent bağlanma olmak üzere dört farklı şekilde olabilir (Mohanty and Kougianos, 2006).

Günümüze kadar birçok tipte biyosensör sistemi geliştirilmiş olup klinik, medikal, çevre teknolojileri, endüstriyel proseslerin kontrolü gibi diğer birçok alanda kullanılmaya devam edilmektedir. Geleneksel bir çok metot ön işleme gerek duymaktadır. Biyosensör sistemleri ön işleme gerek kalmaksızın duyarlı ölçümler yapılabilen minyatürize sistemlerdir. Elektronik ya da elektrokimyasal dedeksiyon bu yönleri ile diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır (Balasubramanian and Burghard, 2006).

Biyosensörün temel çalışma prensibi şekil 1.1' de olduğu gibi düşünülebilir. Biyo-element analiti tanır ve sensör element biyomoleküldeki değişimi elektrik sinyaline dönüştürür.



Şekil 1.1. Biyosensörlerin temel çalışma prensibi (Pratima, 2011)

1.1 Biyosensörlerin Sınıflandırılması

1.1.1 Analizlenecek madde biyoaktif bileşen ilişkisine göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler farklı bir bakış açısıyla analizlenecek madde- biyoaktif bileşen ilişkisine göre şu şekilde sınıflandırılabilirler:

- i. Biyokatalitik esaslı biyosensörler (mikroorganizma ve enzimlerin kullanıldığı biyosensörler)
- ii. Biyoafinite esaslı biyosensörler (antikor-antijen ve reseptör-ligand gibi etkileşimlerin kullanıldığı biyosensörlerdir)

1.1.2 Biyoaktif tabaka-iletim ve ölçüm sistemi içeriğine göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler ölçüm prensiplerine ve transduser türüne göre aşağıdaki gibi sınıflandırılabilirler:

- i. Elektrokimyasal esaslı biyosensörler (Amperometri, Potansiyometri)
- ii. Optik esaslı biyosensörler (Fotometri, Fluorometri, Biyoluminesans)
- iii. Piezoelektrik esaslı biyosensörler (Kuartz kristal mikrobals, Mikrokantileverlar)
- iv. Kalorimetri esaslı biyosensörler (termistörler)

1.1.3 Biyoaktif tabakada kullanılan biyokomponent türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması

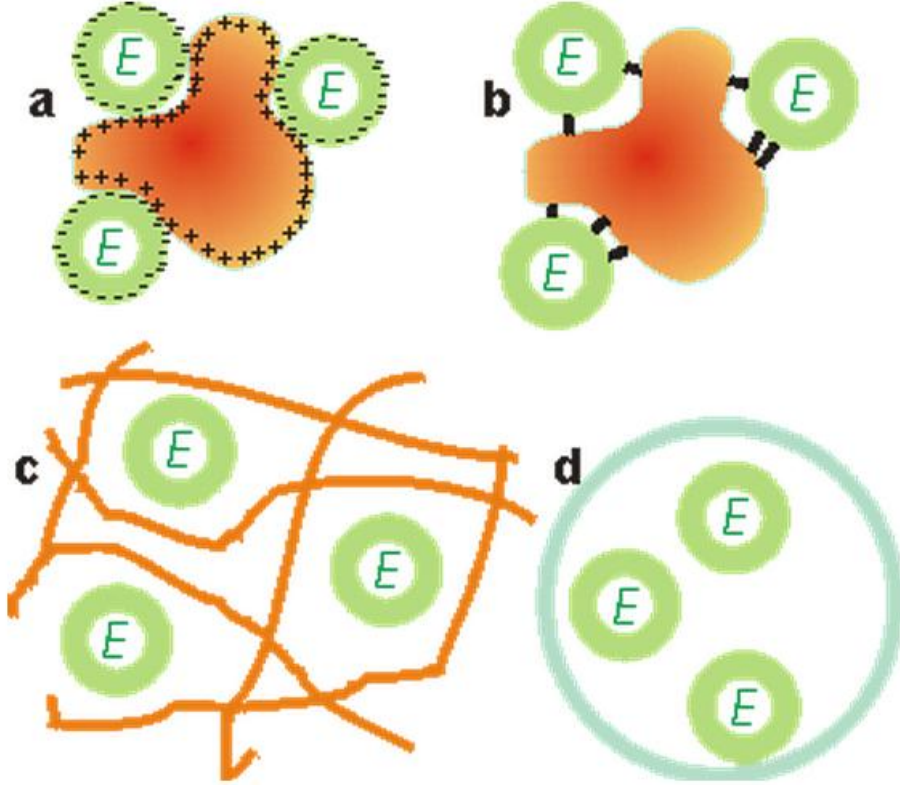
Biyosensörler biyoaktif tabakalarında görev alan biyokomponentin türüne göre:

1. Enzim temelli biyosensörler
2. Hücre temelli biyosensörler
3. DNA temelli biyosensörler
4. Antikor/Antijen temelli biyosensörler (immünobiyosensörler) olarak sınıflandırılırlar.

1.2 Enzim Temelli Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri

Analizlenmesi hedeflenen örneğe uygun biyokomponent ve transduser seçimi yapıldıktan sonra bu iki öge birbirine bağlanmalı yani biyokomponent transduser yüzeyine immobilize edilmelidir. İmmobilizasyon için kullanılan 4 temel yöntem mevcuttur. Bunlar;

1. Adsorpsiyon (kovalent olmayan bağlama)
2. Kovalent Bağlama
3. Tutuklama
4. Çapraz Bağlama



Şekil 1.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi. a-adsorbsiyon, b-kovalent bağlama, c-çapraz bağlama, d-tutuklama (<http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/immetod.html>).

1.3. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler

Seçicilik: İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden birisi seçicilik özelliğidir. Eğer yeterli seçicilik mevcut değilse bu eksikliği giderecek uzun ek işlemler gerekir.

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

Kalibrasyon gereksinimi: İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Fakat bu özellik, teorikte planlandığı gibi, pratikte gerçekleştirilememiştir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler.

Tekrarlanabilirlik: İdeal bir biyosensör için, elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı sonuçların okunması istenir. Pratikte pek mümkün olmayan bu durum göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa biyosensörün uygulamalarının da o denli iyi olduğundan söz edilebilir.

Kararlılık: Elektrot kararlılığının yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Kararlılık, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca; pH, ısı, nem, ortam, O₂ derişimi gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

Yüksek seçicilik: Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı seçici olması, ideal biyosensörlerin özelliklerindendir.

Tayin sınırı: Tasarlanan bir biyosensörün tayin alt sınırının uygulamalardaki beklentiler çerçevesinde belirli bir derişim değerine kadar inebilmesi gerekmektedir. Belirtilen bu sınır, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir.

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

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

Hafıza etkisinin olmaması: Geriye dönme zamanı örneğin amperometrik çalışmalarda ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini

belirler. Yani ilk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlemleniliyorsa ikinci örnek de aynı süre sonra ilave edilebilecektir.

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

Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik: Elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi, özellikle in vivo ölçümler söz konusu olduğunda, biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıksızlığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir.

1.4. Elektrosentezle Elde Edilen İletken Polimer Filmler

İletken polimerler kimyasal ve elektrokimyasal polimerizasyon üzerinden polimerlesirler (Heize, 1990). Yapısındaki π elektronlarının lokalizasyonu ile iletken özellik gösteren bu polimerizasyon yapıları düşük iyonizasyon potansiyeli ve yüksek elektron afinitesi gösterirler (Chen et al., 2012; Olad et al., 2012). Elektrokimyasal polimerizasyon, film morfolojisi ve kalınlığını daha iyi kontrol etme şansı sağladığı için genellikle daha çok tercih edilir. İletken polimerik filmler, elektrolit çözeltisi varlığında bulunan uygun monomerin anodik oksidasyonu (elektropolimerizasyonu) ile elektrot yüzeylerine birikirler. Potansiyodinamik (döngüsel voltammetri), galvonastatik (sabit akımda), potansiyostatik (sabit potansiyelde) gibi farklı elektrokimyasal yöntemler kullanılabilir (Dobhefer and Rajeshuar, 1998).

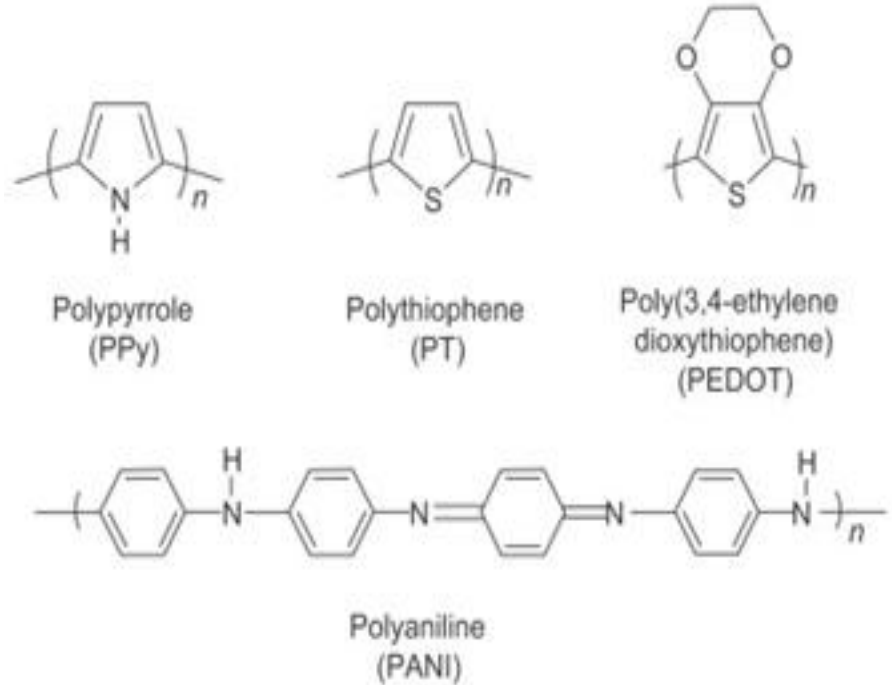
Elektropolimerizasyonda istenilen, anyonik tuz içeren uygun bir çözgüde çözülen monomer, anodik potansiyel uygulamasıyla elektrot yüzeyinde okside olur. Monomerin oksidasyon potansiyelinde, stabil olması ve iyonik-iletken bir ortam sağlanabilmesi için çözgen ve elektrolit seçimi oldukça önemlidir. Anot; platin, altın, camı karbon gibi çeşitli materyellerden yapılabilir. Elektrokimyasal yöntem genellikle potansiyostatik (sabit potansiyelde) ya da galvanostatik (sabit akımda) olarak gerçekleştirilir. Bu teknikleri kantitatif olarak tanımlamak kolaydır. Potansiyodinamik tekniklerden taramalı voltametrik yöntem, polimerizasyon reaksiyonun erken evrelerinde bulunan redoks prosesleri hakkında kalitatif bilgi elde etmek için kullanılır. Ayrıca,

elektropolimerizasyondan sonra, polimer filmin elektrokimyasal davranışını incelemede de tercih edilen bir yöntemdir (Lyons, 1997).

Daldırmalı kaplama, spreycaplama ve elektropolimerizasyon gibi çeşitli kaplama yöntemleri, bir metal yüzeyini kaplamak için elverişlidir.

Elektrosentezle elde edilen polimerik filmlerin birçok avantajı vardır.

- i. Basit ve tekrar üretilebilme
- ii. Entegre, tek tip ve dayanıklı bir film olabilme
- iii. Kaplama kompozisyonu kolaylıkla kontrol edilebilme
- iv. Farklı monomerlerin kopolimerizasyonunu sağlama
- v. Fonksiyonel grupların oluşumu ve yüzey üzerine biyomoleküllerin tutulması.



Şekil 1.3. Biyomedikal uygulamalarda en yaygın kullanım alanına sahip iletken polimerler polipirrol, politiyofen, poli(3,4-etilendioksitiyofen) ve polianilin.

1.4.1. Polianilin (PANI)

Polianilinin oluşum mekanizması anilinin yükseltgenme reaksiyonuna dayanır ve reaksiyonun ilk basamağı anilin moleküllerinin yükseltgenerek radikal katyon oluşmasıdır. İlk basamakta oluşan radikal katyon hızlı bir şekilde dönüşüme uğrayarak para pozisyonundan büyüyen zincir ile polianilini oluşturur (Gaspodnova, 1995). Polianilinin emaraldin tuzunun yüksek iletkenlik göstermesi ve yüksek kararlılığa sahip olması, polimer zincirdeki π -bağı elektrotlarının delokalizasyonundan doğan dört ayrı rezonans formülü ile gösterilmesinden kaynaklanır (Huang et al., 1986).

Anilinin sulu organik asitli ortamlarda gerçekleştirilen elektrokimyasal polimerizasyon ile sentezinde; a- sabit akımlı elektroliz (Galvonostatik), b- sabit potansiyel elektrolizi (Potansiyostatik) ve c- dönüşümlü potansiyel tarama yöntemi (DV) olmak üzere 3 yöntem kullanılır. Başlıca kullanılan sulu organik asitli ortamlar, H_2SO_4 , HCl , HBF_4 , $HClO_4$ ve sulu sülfamik asittir. Polimerizasyon için elektropolimerizasyon haricinde bir diğer yöntem olan kimyasal polimerizasyon elektrot yüzey modifikasyonu açısından bazı dezavantajlara sahip olup iki yöntem arasındaki farklılıklar çizelge 1.1' de belirtilmiştir.

Çizelge 1.1. Kimyasal ve elektrokimyasal polimerizasyon

Polimerizasyon Uygulamaları	Avantaj	Dezavantaj
Kimyasal Polimerizasyon	Geniş yelpazede üretim imkanı	İnce tabaka halinde film sentezi mümkün olmaz.
	Post-kovalent modifikasyon imkanı	Sentez yöntemleri karmaşıktır.
Elektrokimyasal Polimerizasyon	İnce film halinde sentezi mümkün	Elektrot yüzeyinden temizlenmesi için özel prosedürler gerektirir.
	Daha kolay sentezlenebilme	Post kovalent modifikasyonlar daha zordur.
	Eş zamanlı doping imkanı	

1.5. Biyosensörlerde CNT Kullanımı

Karbonnanotüpler (CNT) 1991 yılında Sumio Ijima tarafından fulleren isinden, fulleren hazırlamakta kullanılan karbon-arc metoduna benzer bir yöntemle elde edilmiştir. Bu şekilde karbon nanoskobik düzeyde tübüler oluşumlar şeklinde düzenlenmiştir. Bu materyalleri görüntülemek için yüksek çözünürlükteki transmisyon elektron mikroskobu kullanılmıştır. CNT karbon fiberlerin tamamıyla yeni bir tipidir, 2–50 arasında değişen sayıdaki grafit tabakaların ko-aksiyel oluşumlarıdır. Sumio'nun ilk gözleminde elde ettikleri çok tabakalı nanotüplerdir ve yaklaşık olarak 2 yıl sonra tek duvarlı CNT (SWCNT) elde edilmiştir (Paradise and Goswami, 2007).

CNT' ler nanomateriyallerin en fazla uygulama alanı bulan türüdür. Çelikten 100 kat daha fazla dirence, saf elmadan daha fazla termal iletkenliğe, bakırla aynı elektriksel iletkenliğe ve bakırdan daha yüksek akım taşıma özelliklerine sahip olmaları CNT' lerin ilgi odağı olma sebeplerindendir (Merkoçi et al.,2005; Antiochia and Gorton, 2007).

Tek duvarlı (SWCNT) ve çok duvarlı (MWCNT) olmak üzere iki farklı tip karbon nanotüp mevcuttur. SWCNT' ler karbon atomlarının grafit benzeri atomik bir düzlemde düzenlenmesiyle karakterize edilir. Grafit tabaka yaklaşık 2 nm çapında silindir şeklinde sarılmış durumdadır. MWCNT' ler aralarında 3,4 Å boşluk bulunan birçok grafit silindirlerin iç içe geçmesiyle oluşurlar. MWCNT' lerin dış çapları 1–50 nm aralığında ve iç çapları ise genelde bir kaç nanometre civarındadır (Yao and Shiu, 2007).

1.5.1. CNT'lerin Çözünürleştirilmesi

CNT' ler (biyo)analitik denemelerde uygulanmadan önce ilk olarak çözünür ürünlere dönüştürülmelidir. Homojen CNT dispersiyonlarının hazırlanması, ince film oluşturulmasında ve diğer uygulamalarda büyük öneme sahiptir. CNT' lerin geniş kullanım olanaklarını sınırlayan en önemli etmen bunların çözünürlükleridir (Zhao H. and Ju H., 2006; Balasubramanian and Burghard, 2006). Çeşitli materyaller bu amaçla kullanılabilir. Uçlardan ya da yan duvarlardan fonksiyonelleştirme, sonikasyonla sürfaktantların kullanımı, nanotüplerin polimerlerle sarılmaları ve süperasitlerle protonlanmaları yaygın olarak kullanılan metodlardır. Kullanılan bazı metodlar çizelge 1.2' de özetlenmiştir.

Çizelge 1.2. Karbon nanotüplerin çözünürleştirilmesinde yaygın olarak kullanılan bazı yaklaşımlar.

Çözünürleştirici Ajan	Açıklama	Kaynak
Nafyon	CNT'ün elektrokatalitik özelliklerini korur	Wang et al., 2003
Tetrahidrofur/Li ⁺	Negatif yüklü CNT ile Li ⁺ arasında iletken polielektrolit tuzlar	Penicaud et al., 2005
3-aminopropiltrietoksisilan	3-aminopropiltrietoksisilan ile CNT iletken bir ağ oluşturur	Yao et al., 2000
Daimin uçlu oligomerik poli(etilen glikol), poli(propiyoniletilenimin-coetilenimin) ve poli(vinil alkol)	Polimerin amino ya da hidroksi grupları ile oksitlenmiş CNT'nin karboksil grupları arasında reaksiyon	Fernando et al., 2004
Glukozamin	Glukozaminin amino grupları ile oksitlenmiş CNT'nin karboksil grupları arasında reaksiyon	Pompeo and Resasco, 2002
Poli(propiyoniletilenimin-coetilenimin)	Polimerin imido grupları ve oksitlenmiş CNT'ün karboksil grupları arasında sonikasyonla gerçekleştirilen reaksiyon	Huang et al., 2002

Elektrokimyasal dedeksiyonlar için CNT' ler çeşitli konfigürasyonlarda elektrot sistemlerine entegre edilebilirler. Bunlar başlıca şu şekildedir;

- Bireysel CNT konfigürasyonları,
- Yönlendirilmiş ya da yönlendirilmemiş formdaki CNT' lerle geleneksel elektrotların modifiye edilmesi,
- CNT kompozitleri oluşumu için polimer matrikste entegrasyondur (Merkoçi et al., 2005).

1.5.2. CNT temelli biyosensörler

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda CNT' lerin önemli biyomoleküllerin elektrokimyasal reaktifliğini ve proteinlerin (redoks merkezin iç kısımlarda

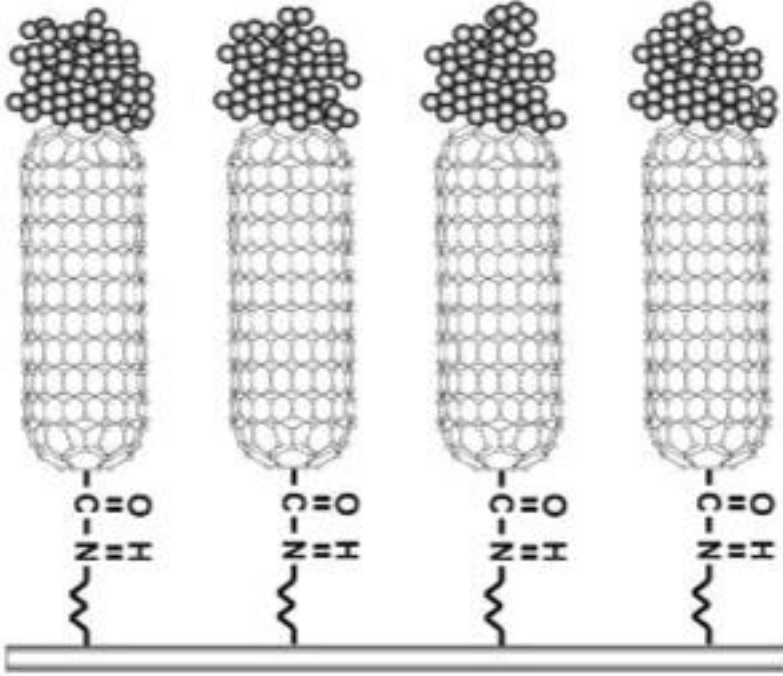
gömülü olduğu glikoproteinlerde) elektron transfer reaksiyonlarını zenginleştirdiği görülmektedir. Elektrokimyasal reaktivlikleri yanında CNT ile modifiye elektrotlar önemli biyomolekülleri (örneğin; nükleik asitler) immobilizasyonu ve yüzey bozunmasının azaltılması (NADH oksidasyon prosesi) açısından kullanışlıdır. Bu özellikler CNT' leri amperometrik enzim elektrotlarından DNA hibridizasyon biyosensörlerine kadar geniş bir aralıkta kullanışlı hale getirmektedir (Wang, 2005).

Genelde amperometrik ya da voltametrik analizler için camısı karbon veya metal elektrotlar (Au, Pt ya da Cu) kullanılmaktadır. Bu elektrotlar düşük duyarlılık ve stabilite, düşük tekrar üretilebilirlik, uzun cevap süresi ve elektron transfer reaksiyonları için yüksek potansiyellerde kullanılmaları gerektiği için dezavantajlıdır (Balasubramanian and Burghard, 2006). Karbon, yüksek elektrot cevapları elde etmek için çeşitli kimyasal ve elektrokimyasal yöntemlerle modifikasyona uygundur. Karbon elektrotları karbon oksidasyonunun yavaş kinetiğinden dolayı özellikle pozitif yönde geniş bir potansiyel aralığında kullanılabilir (Lin et al., 2004). CNT' ler hızlı elektron transferi ve yüzey bozunmasına karşı dayanıklı olmaları nedeniyle daha avantajlıdır (Balasubramanian and Burghard, 2006). Bunun yanında aktivite kaybı olmadan protein immobilizasyonuna olanak sağlamaları, duyarlılığı artırmaları ve minyatürizasyon için uygun olmaları CNT' lerin avantajları arasındadır (Paradise and Goswami, 2007).

Elektrokimyasal tayinler için CNT' ler çeşitli konfigürasyonlarda elektrot sistemlerine entegre edilebilir.

I. Bireysel CNT konfigürasyonları; CNT' ler kendilerine has üstün özellikleri nedeniyle nanoprob olarak kullanılabilmenin yanı sıra yüksek çözünürlükte görüntüleme, nanolitografi, nanoelektrotlar, ilaç taşınımı, sensörler ve alan emisyon sistemleri gibi birçok alanda nanoprob olarak rol oynarlar. Elektrokimyasal nanoelektrot olarak SWCNT kullanımı gerçekleştirilmiştir (Dekker et al., 2000). SWCNT' ler nanolitografi tekniğiyle düzenlenmiş ve sulu çözeltide döngüsel voltammetri işlemi uygulanmıştır (Merkoçi et al., 2005). Aynı zamanda taramalı tünel mikroskobu (STM), atomik güç mikroskobu (AFM), elektrostatik güç mikroskobu gibi mikroskoplarda algılayıcı uçlara CNT bağlanarak, görüntüleme ve elektrokimyasal ölçümler yapılmıştır (Paradise and Goswami, 2007; Lee, 2006).

II. Elektrot yüzeylerinin modifikasyonunda CNT' ler; CNT'ler yönlendirilmiş ya da yönlendirilmemiş şekilde çeşitli elektrotların yüzeylerinin modifikasyonunda kullanılmıştır, camı karbon elektrotlar en fazla kullanılan elektrottur (Deo and Wang, 2004). Yönlendirilmiş olarak CNT ile modifikasyonları elektrodun yüzeyine CNT' lerin bir tabaka şeklinde biriktirilmesi ile gerçekleştirilmiştir (şekil 1.4). Bu şekilde yerleştirilen CNT' ler elektrot yüzeyi ve redoks enzimi arasında elektriksel iletimi sağlayan moleküler kablolar olarak görev yapar. Enzimin prostetik grubu ve elektrot yüzeyi arasında bu şekilde direkt elektron transferi redoks mediyatörlerine gereksinimi azaltır ve reaktif sensör sistemlerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu şekilde hazırlanan CNT ormanlarının spesifik biyosensör uygulamaları mevcuttur.



Şekil 1.4. Moleküler kablolar olarak görev yapan CNT' lerin dikey olarak yönlendirilmesi ile nanoorman yapılar (Wang, 2005).

MWCNT' lerin açık ucu grafit elektrotlara benzeyen hızlı bir elektron transfer hızına sahipken SWCNT' ler çok daha yavaş elektron transfer hızına sahiptir. Bu düşünceleri temel alan Li ve arkadaşları (2004) elektrodun yapısı ve yöneliminin elektrokimyasal özellikleri için kritik bir nokta olduğuna inanmaktadır. Bu nedenle, Si-mikrofabrikasyon tekniği ile uyumlu olan bottom-up yaklaşımını kullanmıştır. CNT oluşturulmasında kullanılan katalitik teknikler ile mikrolitografi ve nanolitografiyi birleştirmiştir. Plazma ile zenginleştirilmiş DVD yöntemini kullanarak orman benzeri dikey bir düzenleme ile yönlendirilmiş MWCNT arraylerini Ni-katalizli film üzerinde hazırlamıştır.

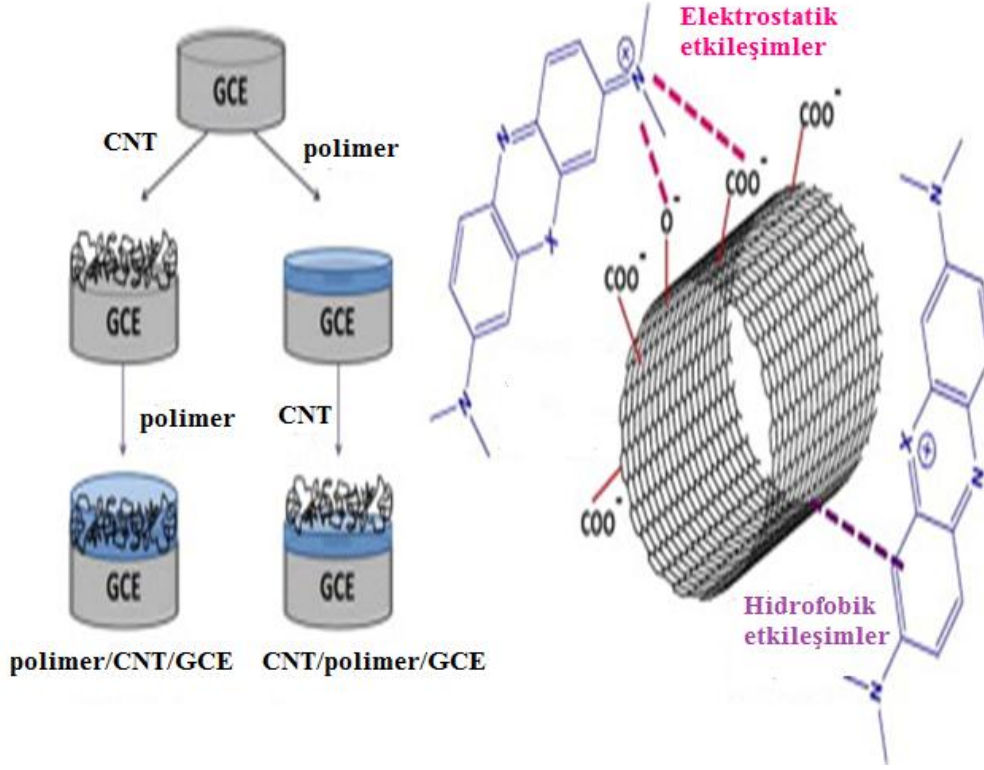
Yönlendirilmiş CNT arraylerinin elektriksel ve elektrokimyasal özellikleri küçük redoks molekülleri için karakterize edilmiştir (döngüsel voltammetri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile), bunların yarı dönüşümlü nanoelektrot özelliği gösterdikleri ve ultra duyarlı bir dedeksiyon temeline dayandıkları bulunmuştur.

CNT ile yönlendirilmemiş elektrot modifikasyonlarına bakıldığında ise, en çok geleneksel camısı karbon elektrotların yüzeylerinin modikasyonu ile karşılaşmaktadır. CNT' lerin ilk kullanımı sülfürik asitte disperse edilen CNT ile camısı karbon elektrotların yüzeyinin modifiye edilmesidir. CNT' lerin asitlerle muamelesi uçta ve yan duvarlarda oksijen içeren çeşitli grupların (özellikle karboksil grupları) oluşumunu sağlar ve böyle su gibi polar çözenlerde çözünürlükleri artar. Ayrıca hedeflenen bir molekülün bağlanmasıyla biyoyumlulukları artırılabilir (Balasubramanian and Burghard, 2006). Karboksil gruplarının varlığının MWCNT' ler arasındaki van der waals etkileşimlerinin bozulmasına neden olduğu savunulmaktadır. MWCNT demetlerinin ayrılmasını kolaylaştırır (Tsai et al., 2006). Ayrıca camısı karbon elektrotların yüzeyleri dimetilformamid, konsantre nitrik asit ve nafyon/su içinde hazırlanmış CNT' lerle modifiye edilmiştir. Yao ve arkadaşları (2006) çalışmalarında camısı karbon elektrotları su içinde dispersiyonu yapılmış CNT ile modifiye ederek elektroaktiviteyi izlemiştir. SWCNT ile modifiye elektrotlarla MWCNT ile modifiye olanlar karşılaştırıldığında; SWCNT ile hazırlananların daha küçük çaplı, MWCNT ile hazırlananların ise elektron transfer özelliklerinin daha iyi olduğu bulunmuştur. Ayrıca aynı çapa ancak farklı uzunluğa sahip MWCNT' ler ile yaptıkları çalışmada CNT' lerin uzunluğunun elektron özelliklerinde etkili olmadığını bulmuşlardır (Yao and Shiu, 2007).

1.5.3. CNT-Polimer kompozitleri

Kompozitler farklı maddelerin istenilen amaca yönelik, belli düzende bir araya getirilmesi ile hazırlanan malzemelerdir. Kompozit malzemeleri hazırlamaktaki temel amaç, değişik maddelerin iyi özelliklerini tek bir madde altında birleştirebilmektir (Jiang, 2011). İletken polimerlerin özelliklerini iyileştirilebilecek ve çeşitli teknolojik alanlarda kullanılabilecek olan iletken kompozitlerin hazırlanmasıyla yüksek elektriksel iletkenliğe sahip, termal olarak kararlı, mekanik özellikleri ve alev dayanımları yüksek kompozitler elde edilebileceği ön görülmektedir (Çetinkaya, 2007). İletken polimerler arasında polianilin düşük maliyeti, kolay sentezlenebilmesi, yüksek iletkenliği, çevresel

kararlılığı ve redoks özellikleri nedeniyle geniş uygulama alanına sahiptir (Kutaniş, 2007). CNT' ler polianilin ve polipirol gibi iletken polimerlerle beraber kullanılarak hazırlanan biyosensörlerde hidrojen peroksit tayinine yönelik başarılı elektrokimyasal biyosensörler hazırlanmış ve biyosensör cevaplarında olumlu bir artış olduğu yayınlanmıştır (Luo et al., 2006; Tsai et al., 2006).



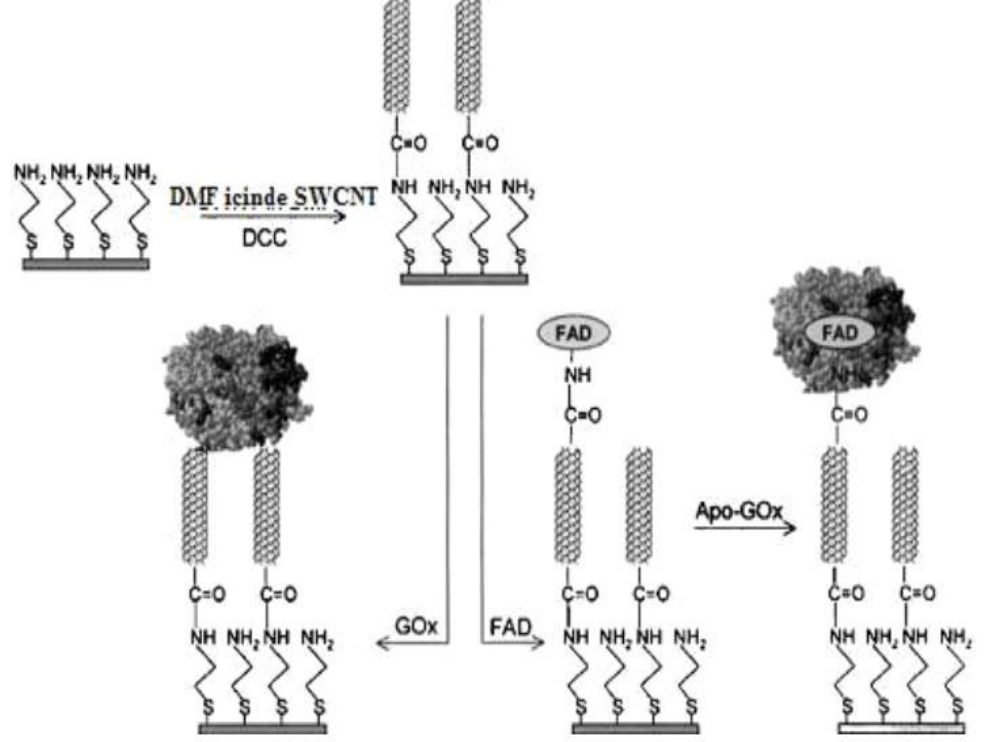
Şekil 1.5. CNT - Polimer modifiye edilmiş kompozit elektrot (Luo et al., 2006).

1.5.3. CNT ve biyoaktif bileşenlerin birlikte kullanımı

Yayınlanan çalışmalara bakıldığında temel olarak söylenen CNT ile modifiye olmayan elektrotlara kıyasla CNT ile modifiye edilmiş elektrotların daha düşük potansiyellerde elektron transfer reaksiyonlarını artırdığı ve sensörlerdeki yüzey bozunmasını minimize ettiği. Bu avantaj CNT temelli biyosensörlere olan ilgiyi artırmıştır (Balasubramanian and Burghard, 2006; Merkoçi et al., 2005).

Glukoz, diyabet hastalığının tanısında ve fermantasyon teknolojisinde önemli bir molekül olduğu için enzim-CNT elektrotları ile tayini en fazla gerçekleştirilen analittir (Wang et al., 2003). Birçok strateji glukoz tayinine yönelik enzimlerin immobilizasyonu için kullanılmaktadır. Glukoz oksidaz

(GOx) CNT üzerinde polipirol vasıtasıyla immobilize edilirken bir diğer çalışmada ise glukoz dehidrogenaz (GDH) kovalent olarak CHIT-CNT filmi ve glutaraldehid (GA) ile immobilize edilmiştir. CHIT-CNT-GA-GDH ile GC elektrotları modifiye edilmiştir, glukoz tayini fizyolojik matrislerde girişim olmadan stabil ve duyarlı bir şekilde tamamlanmıştır.



Şekil 1.6. Glukoz oksidaz biyosensörünün CNT ile modifikasyonu

Biyosensörler ve biyoyakıt hücrelerinin tasarlanmasında redoks enzimlerinin kullanımını sınırlayan en önemli etmenlerden biri elektrot materyali ve redoks proteini arasında direk elektriksel bağlantının bulunmamasıdır. Bu sorunu aşmak için difüzlenebilen elektron materyallerinin kullanımı, proteinlerin redoks reaksiyonlarını kolaylaştıran redoks taşıyıcıların bağlanması ve elektroaktif polimerlerde redoks proteinlerinin immobilizasyonu gibi uygulamalar yapılmıştır. Son yıllarda proteinden kofaktör ekstrakte edilmekte ve elektrot yüzeyine redoks özelliği zenginleştirilerek immobilize edilmektedir, daha sonra apoenzim tekrar kofaktöre bağlanır ve bu şekilde ilgili enzimlerin biyoelektrokatalitik aktivasyonu arttırılmış olur (Willner et al., 2007).

1.6. Mikrobiyal Biyosensörler

Mikrobiyal hücrelerin biyobileşen olarak kullanıldığı mikrobiyal biyosensörler organik madde tayininde sıklıkla kullanılan bir yöntem olup pek çok avantajı mevcuttur.

Mikrobiyal biyosensörlerin kullanılmasının avantajlarını şöyle sıralamak mümkündür:

1. Metabolize edebildikleri geniş bir kimyasal aralığa sahiptirler (D'Souza, 2001),
2. Farklı koşullara adapte olabilir ve zamanla yeni molekülleri degrades edebilme yetenekleri geliştirilebilir (D'Souza, 2001),
3. Hem çözgen inhibisyonlarına enzim elektrotlarından daha az duyarlıdır hem de optimum pH veya sıcaklık değerlerinden farklı koşullara sahip ortamlara karşı toleranslıdır (Karube and Nakanishi, 1994),
4. Dayanıklılık süreleri enzim elektrotlarına kıyasla daha uzundur (Karube and Nakanishi, 1994),
5. Aktif enzim izolasyonuna ihtiyaç duyulmadığından ekonomiktirler (Karube and Nakanishi, 1994),
6. Çoklu kataliz tepkimelerinde özellikle tercih edilirler (D'Souza, 2001).

Aynı zamanda mikrobiyal biyosensörlerin bazı dezavantajları da mevcuttur.

1. Ürün ya da substratın hücre membranından difüzyonu daha zordur, bu nedenle bazıları enzim elektrotlarından daha uzun bir cevap zamanına sahiptirler (D'Souza, 2001; Karube and Nakanishi, 1994), bu problemi aşmanın yollarından bir tanesi hücre membranlarının geçirgen hale getirilmesidir. Hücreler fiziksel (dondurma ve çözme), kimyasal (organik çözgenler/deterjanlar) ve enzimatik (lizozim, papain) yöntemler kullanılarak geçirgen hale getirilebilirler. En çok kullanılan teknikler toluen, kloroform, etanol, bütanol gibi çözgenler ya da N,N,N-trimetilamonyum bromür (CTAB), Na-deoksikolat veya digitonin gibi deterjanlardır. Böylece kimyasal muamele sonucu hücre membranlarından bazı lipidler uzaklaştırılarak porlar oluşturulur, hücre içinde enzim gibi makromoleküller alıkonulurken

substrat ya da ürün gibi küçük moleküller hücre membranından kolayca difüzenirler. Ancak bu uygulamalar hücrelerin canlılığını ortadan kaldırmaktadır (D'Souza, 2001).

2. Kullanıldıktan sonra rejenerasyon için enzim biyosensörlerine kıyasla daha fazla zamana ihtiyaç duyulur (Karube and Nakanishi, 1994).
3. Hücreler birden fazla enzim içerirler bu nedenle seçimlilik düşüktür. Ancak belirli enzimleri eksik olan mutant mikroorganizmalarla mikrobiyal sensörler hazırlanabilir. Bu uygulama real-time analize olanak sağlayarak, endüstriyel prosesler ve çevresel görüntülemeye kontaminantların seviyesi ile akış hızının in situ tayini ve analitlerin hızlı ölçümü için gerekli olan gereksinimi karşılamaktadır. Mikrobiyal biyosensörlerin seçimliliğini artırmak için yapılan başka bir uygulama hücre geçirgenliğinin arttırılmasıdır. Geçirgenlik artınca küçük moleküler kütleyle sahip kofaktörlerin birçoğu hücreden dışarı difüzenir ve istenmeyen yan reaksiyonlar bu şekilde minimize edilmiş olur (D'Souza, 2001). Kültür ortamında analitin karbon kaynağı olarak kullanımı mikroorganizmanın analizi yapılacak analite karşı seçimliliğini arttırmak için kullanılan başka bir yöntemdir (Alpat Ş, 2008).

Bir biyosensörün hazırlanmasındaki en önemli adım biyolojik materyali fizikokimyasal değişimleri ölçmeye yarayan sistem ile başarılı bir şekilde kombine edilebilecek immobilizasyon tekniği belirlemektir. Immobilizasyon tekniği biyomateryal ve iletici sistemin arasındaki bağlantıyı sağlarken aynı zamanda tekrar kullanım için stabilizasyonda yardımcı olur. Biyomateryaller adsorbsiyon, tutuklama, kovalent bağlama, çapraz bağlama ya da tüm bu tekniklerin kombinasyonu ile immobilize edilebilirler (Lei et al., 2006; D'Souza, 2001). Canlı hücre kullanımı söz konusu olduğunda uygulanan tekniklerin ılımlı koşullarda gerçekleştirilmesi gerekir. Örneğin, kovalent bağlama, enzim ve antikorların immobilizasyonu için kullanılan genel bir yöntemken, hücrelerin immobilizasyonu için kullanışlı değildir. Bunun nedeni, kovalent bağlamadaki genel problemlerden bir tanesi reaktif gruplara ve diğer sert reaksiyon koşullarına maruz kalan hücrelerin canlılığını yitirmesidir. Glutaraldehid gibi bifonksiyonel çapraz bağlayıcılar çeşitli materyallere enzimlerin ve mikrobiyal hücrelerin immobilizasyonunda tercih edilen başarılı bir yöntemdir.

Canlı hücreler kullanıldığında tutuklama ve adsorbsiyon teknikleri daha kullanışlıdır. Genel bir uygulama diyaliz membranı gibi membranlar. Kullanarak

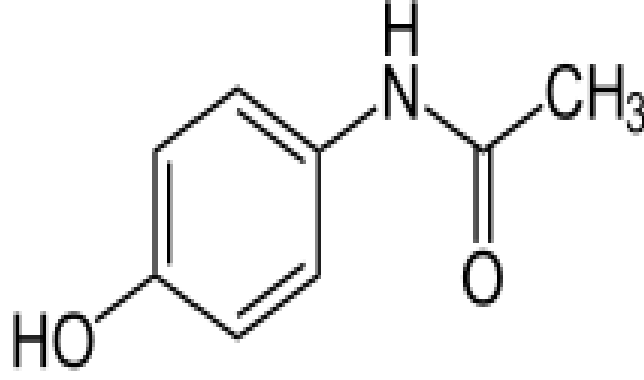
iletici sisteme hücrelerin immobilizasyonudur. Jelatin, albümin gibi protein yapıları materyallerden sıklıkla yararlanılmaktadır. Ayrıca sentetik polimerler, poliakrilamid, poliüretan temelli hidrojel ve polivinil alkol immobilizasyon amacıyla kullanılmışlardır. Sentetik polimerlerin kullanımını sınırlayan en önemli şey, hücrenin canlılığını kaybetme olasılığının bulunmasıdır. Adhezyonla immobilizasyon hücrelerin substrat içeren sıvı fazla direkt etkileşimini sağladığı için avantajlı bir yöntemdir, böylece indirgeme ya da kütle transferi problemleri elimine edilmiş olur (D'Souza, 2001).

1.6.1. *Bassillus subtilis*

Bassillus subtilis toprakta, suda, havada yaygın olarak bulunan ve bitkilerin gelişiminde katkısı bulunan gram pozitif bir bakteri türüdür. Bitkinin kök bölgelerinde yaşamını sürdüren bakteri; Rhizoctonia, Fusarium, Aspergillus, ve diğerleri gibi bitki hastalığına sebep olan mikroorganizmalar ile yarışarak hayatta kalma mücadelesi verirken bitkiyi patajonik mikroorganizmalara karşı korur (EPA 2003). Bunun yanı sıra oksijenli solunum veya geçici oksijenli solunum yapar, 20-30°C de ürerler ve vejetatif şekilleri dayanıksız olup, sporları bazen kaynama derecelerinde birkaç saat dayanabilirler. *Bassillus subtilis* için belirtilen optimum pH 6,5 - 7,5 aralığıdır (Younis M. A., 2010).

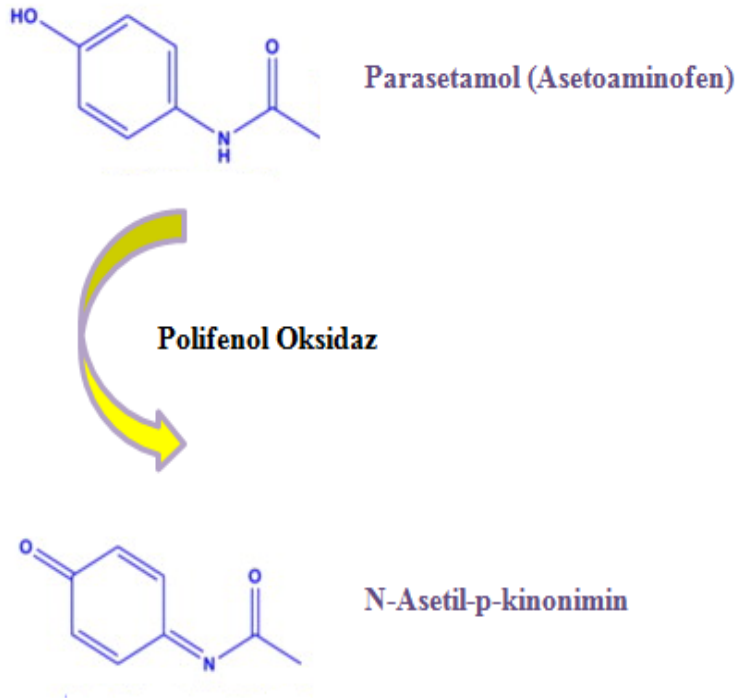
1.7. Parasetamol

Kimyasal adı N-(4-hidroksifenil)etanamid olan parasetamol (asetaminofen) ağrı kesici ve ateş düşürücü ilaçların etken maddesi olarak kullanıldığı gibi azo boya ve fotografik kimyasalların yapımında da önemli bir maddedir (Langford, 2009). Hastane atıkları, imha, kullanıcı atıkları ile kullanım sularına ve atık sulara karışarak düşük konsantrasyonda olmasına rağmen suda yaşayan organizmalara ve sulama sularına karışarak bitkilere zarar verebilmektedir (Huber, 2005). Akut ve kronik hasarlar, dokularda birikme, hücre çoğalmasında inhibisyona neden olma önemli zararlardandır (Escher, 2011). Kullanım sularına katılan klor ile 11 farklı bileşik oluşturabilmekte ve bunlar toksik bileşik olan N-asetil-p-benzokinon imin ve 1,4-benzokinonu da kapsamaktadır (Bedner, 2006).



Şekil 1.7. Parasetamolün kimyasal yapısı

Parasetamol oral yoldan alındığında gastrointestinal sistemde hızla emilir. Alınmasından 30-60 dakika sonra maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşır ve bütün dokulara hızla dağılır. Plazma proteinlerine bağlanması zayıftır. Plazma yarı ömrü 1-4 saat olup İdrarla, parasetamol'ün % 1-3'ü değişmemiş olarak atılırken % 80'i biyolojik olarak glukuronid veya sülfat bileşikleri olarak atılır. Analjezik etkisi yeni nesil analjeziklere göre hafif kalmış olsa da gastrointestinal sistemde yan etkisinin hemen hemen olmaması, güvenilirliği ve de gebelerde kullanılabilmesi Parasetamolün her zaman ön planda kalmasını ve klasik bir analjezik olmasını sağlamaktadır (Aghababian, 2010).



Şekil 1.8. Parasetamolün enzimatik yolla yükseltgenme tepkimesi.

2. MATERYAL METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Cihaz ve diğer ekipmanlar

Denemelerde Palm Sens Ins. (Hollanda) marka potansiyostat; CHI 104 model Altın (Au) çalışma elektrodu, CHI 111 model Ag/AgCl doygun referans elektrodu, BASI MW-1032 model Pt yardımcı elektrodu; Isolab P100 ve P1000 otomatik pipetleri, Lauda (Germany) marka termostat, Yellow line manyetik karıştırıcı, Sonikatör LC 30 kullanıldı.

2.1.2 Kimyasallar

Anilin, MWCNT (>99% saflıkta, 7-15 nm çapında, 0,5-10 µM uzunluğunda), N-Hidroksisüksinimid (NHS), etil(dimetilaminopropil) karbodiimide (EDC), glutaraldehit, parasetamol, sodyum asetat, Potasyum fosfat monobazık, tris, hidroklorik asit, sülfürik asit, nitrik asit, askorbik asit, ürik asit Sigma'dan , gamma alumina (0,1; 0,05 micron) CH Instruments Inc' den temin edilmiştir.

Elektrot hazırlanmasında kullanılan çözeltiler;

- 50 mM fosfat tamponu (pH: 7,0)
- MWCNT aktifleştirilmiş süspanse formda
- 0,05 M Anilin
- 1 M HCl
- 1 M EDC ve 1,5 M NHS
- pH 7,0 50 mM fosfat tamponu içerisinde 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış *Basillus sp.*
- % 0,5 lik Glutaraldehit

2.1.3. *Basillus sp.* kültür ortamı

Bushnell Haas; 0,2 g/L magnezyum sülfat, 0,02 g/L kalsiyum klorit, 1,0 g/L monopotasyum fosfat, 1,0 g/L dipotasyum fosfat, 1,0 g/L amonyum nitrat, 0,05 g/L ferrik klorit içerir. 3,7 g/L olacak şekilde bidistile suda hazırlanır. Hazırlanma sonrası pH: 7,0 ±0,2; 25°C dir.

Test mikroorganizması (*Basillus sp.*) yatık nutrient agarda 30°C’ de 24 saat aktive edildi. Yukarıda verilen Bushnell Haas besiyeri 50 ml’ lik erlende belirtilen miktarda hazırlandı. 121°C’ de 15 dk otoklavda steril edildi. Sterilize edilen ortama C kaynağı olarak membran filtrasyonu ile sterilize edilen parasetamol aseptik koşullarda, 500 mg /mL olacak şekilde ilave edildi. *Basillus sp.* ile beslenmiş besiyerleri 200 rpm’ de 24 saat 30°C’ de inkübe edildi. Süre sonunda besiyeri içeriği 700 g, +4°C’ de 15 dakika santrifüj edildikten sonra, fizyolojik serum ile 2 kez yıkandı. Yıkanan hücreler tekrar santrifüj edilerek liyofizasyon işlemi gerçekleştirildi. Liyofilize edilen hücreler Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/*Basillus sp.*/GA mikrobiyal biyosensörünün hazırlanmasında kullanıldı (Akyılmaz, 2006).

2.2. Yöntem

2.2.1 Biyosensörün hazırlanması

Öncelikle Au elektrot fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal olarak temizlenir. Elektrot temizleme aşamaları şöyledir;

1. 50 mM KOH içerisinde 0,2V - 1,2 V aralığında, 50 mV/s tarama hızında lineer sweep voltammetrisi onbeş döngü uygulanır.
2. Bir miktar bulamaç halindeki Gamma alumina kadife bir yüzey üzerine belli bir miktar damlatılır. Altın elektrot önce 0,1 sonra 0,05 mikronluk gamma alumina bulamacında sekiz çizerek yavaşça gezdirilir. Bu şekilde elektrot yüzeyindeki kirlilikler mekanik olarak temizlenmiş olur. Au elektrot bidistile suyla durulandıktan sonra adsorblanmış partikülleri uzaklaştırmak amacıyla beş dakika etanol (%99) içerisinde sonikatörde bekletilir. Tekrardan bidistile suyla durulandıktan sonra beş dakika da bidistile su içerisinde sonikatörde bekletilir.
3. Au elektrodun yüzeyinin elektrokimyasal olarak temizlenmesi için 0,5 M H₂SO₄ çözeltisi içerisinde -0,3V - 1,5V potansiyelleri arasında, 100 mV/s tarama hızında otuz tane döngüsel voltammogram alınır. Temizleme işlemlerinin ardından elektrot bidistile sudan geçirilerek azot gazı ile kurutulur.

Au elektrot yüzeyinde anilin polimerizasyonunun gerçekleştirilme prosedürü şu şekildedir;

1. Adım : Polimerizasyon

- Polimerizasyon çözeltisinde kullanılacak MWCNT' lerin aktifleştirilmesi; H_2SO_4 : HNO_3 ; 3:1 oranında hazırlanmış asit çözeltisine 1 mg/ml olacak şekilde MWCNT ilave edilir ve karışım 2 saat sonikatörde bekletilir (Wang et al., 2005)
- 1 M' lık HCl çözeltisi içinde 0,05 M' lık anilin çözeltisi hazırlanır.
- 10 ml 0,05 M anilin çözeltisi, 25 ml 1 M KCl çözeltisi ve 1ml aktifleştirilmiş MWCNT temiz ve kuru bir beher içerisinde karıştırılır ve (0 - 1,5) V aralığında, 50 mV/s tarama hızında, oda sıcaklığında ve karanık ortamda döngüsel voltammogram ile 30 döngü alınarak altın elektrot yüzeyinde polimerizasyon gerçekleştirilir (Chawla et al., 2011). Bekleme sonrası, nonspesifik etkileşimlerin giderilmesi amacıyla modifiye elektrot bidistile sudan geçirilir.

2. Adım : EDC-NHS

- EDC-NHS çözeltisi, 1:1 oranında pH: 7,0; 50 mM fosfat tamponunda 100 mg/ml (1:1,5 M) olacak şekilde hazırlanır. Polimerizasyonu gerçekleştirilmiş olan elektrot bu çözelti içerisinde oda sıcaklığında 1 saat bekletilir. Bekleme sonrası, nonspesifik etkileşimlerin giderilmesi amacıyla modifiye elektrot bidistile sudan geçirilir.

3. Adım : *Basillus sp.*

- Liyofilize *Basillus sp.* 10 mg/ml olacak şekilde pH 7,0 50 mM fosfat tamponu içerisinde pipet ile çek bırak yöntemiyle karıştırılarak süspanse hale getirilir.
- Hazırlanan süspanse karışımdan 10 µL modifiye elektrot yüzeyine damlatılır ve +4 °C' de gece boyu kurumaya bırakılır. İmmobilizasyon işlemi sonrasında nonspesifik etkileşimlerin giderilmesi amacıyla modifiye elektrot bidistile sudan geçirilir.

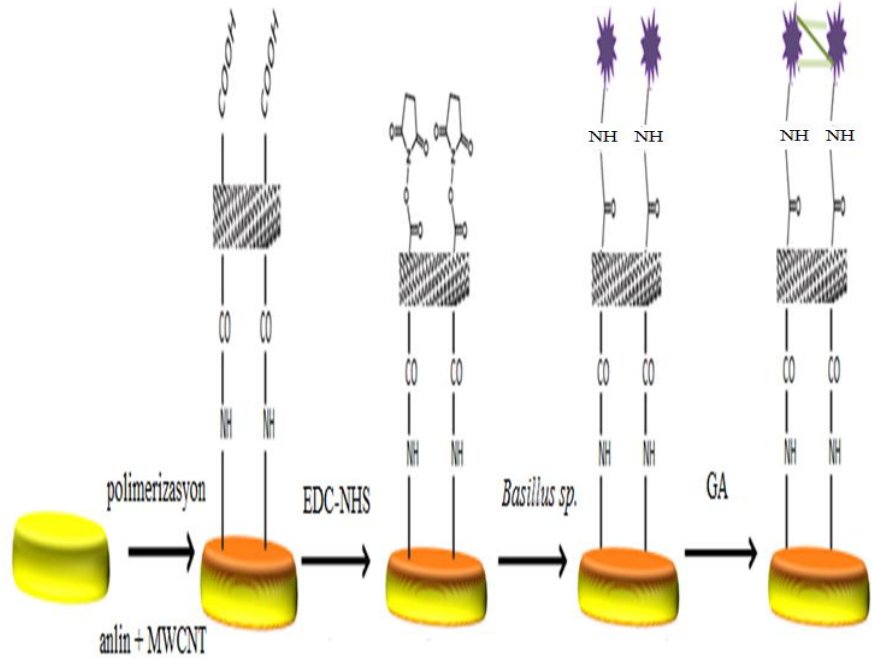
4. Adım : Glutaraldehit ile çapraz bağlama

- pH 7,0 50 mM fosfat tamponu içerisinde hazırlanan %0,5' lik GA içerisinde üç dakika boyunca elektrot daldırıp çıkartılarak işlem gerçekleştirilir. İşlem sonrasında nonspesifik etkileşimlerin giderilmesi amacıyla modifiye elektrot bidistile sudan geçirilir.

5. Adım : Ortam adaptasyonu

- 1 mM parasetamol bulunan çözelti içerisinde hazırlanan mikrobiyal sensör daldırma yöntemi ile otuz dakika bekletilir. Böylece mikroorganizmanın analiz edilecek madde olan parasetamole adapte olması sağlanır.

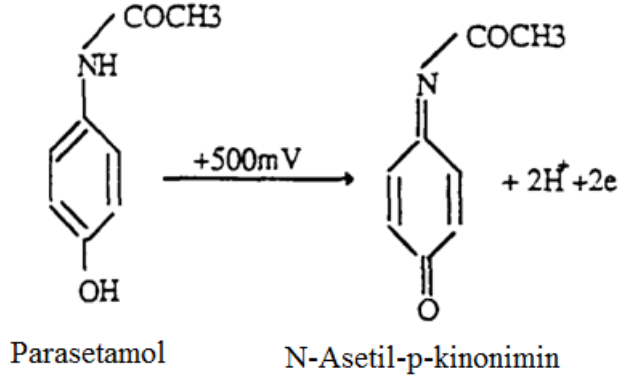
Hazırlanan mikrobiyal biyosensörün hazırlanma aşamalarına ilişkin şema şekil 2.1 de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Hazırlanan Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/*Basillus sp.*/GA mikrobiyal biyosensörünün immobilizasyon aşamaları.

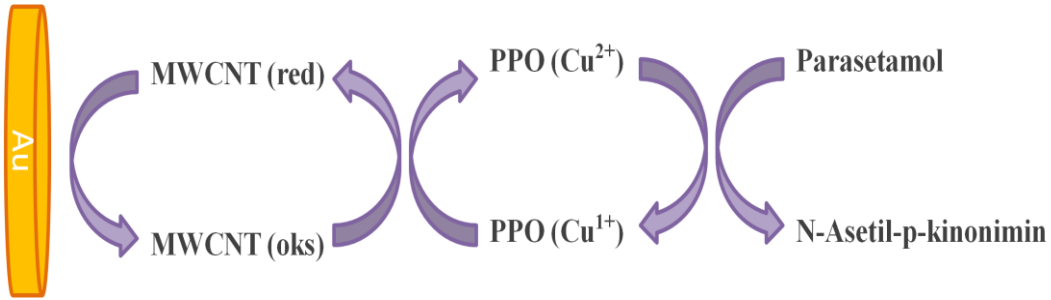
2.2.2. Biyosensörün çalışma ilkesi

Hazırlanan mikrobiyal biyosensörün çalışma ilkesi; parasetamolün +0,5 V potansiyelinde polifenol oksidaz katalizliğinde yükseltgenerek bir kinon formu olan N-Asetil-p-kinonimin' a dönüşümü esasına dayanır.



Şekil 2.2. Parasetamolün yükseltgenme reaksiyonu.

Şekil 2.3.' te tasarlanan biyosensörün çalışma ilkesi şematik olarak gösterilmektedir. Polifenol oksidaz enziminin aktif merkezindeki bakirin (Cu^{2+}) rejenerasyonu MWCNT tarafından sağlanmaktadır.



Şekil 2.3. Biyosensörün çalışma ilkesi.

2.3. Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/*Basillus sp.*/GA Mikrobiyal Biyosensörünün Hazırlanmasına Yönelik Yapılan Optimizasyon Çalışmaları

Parasetamol tayini amacıyla geliştirilen Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/*Basillus sp.*/GA mikrobiyal biyosensörünün hazırlanışı ve uygulamaya geçirilebilmesi için gerekli koşulların optimizasyon ve karakterizasyonuna

yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bölüm 2.2.1 de belirtilen mikrobiyal biyosensörün hazırlanma adımlarına yönelik karakterizasyon çalışmaları kapsamında, sırasıyla; anilin, MWCNT, EDC-NHS, *Basillus sp.* ve glutaraldehit miktarının geliştirilen mikrobiyal biyosensörün cevabına olan etkisi belirlendi. Parasetamol için doğrusal tayin aralığının belirlenmesine yönelik çalışmalar yapıldı. Daha sonra optimum sıcaklık ve pH' ın belirlenmesi amacıyla denemeler yapıldı. Biyosensörün depo kararlılığı ve tekrarlanabilirliğine ait denemelerin ardından denemeler sonrası elde edilen bilgiler ışığında substrat spesifikliğı, girişim etkisi, ilaç üzerinden örnek analizi çalışmaları gerçekleştirildi.

2.3.1. Anilin miktarının biyosensör cevabına etkisi

İletkenlik ve çevresel stabilite özelliklerinin yüksek oluşu polianilinin MWCNT ile kompozit oluşturma alanında en çok tercih edilen iletken polimer olma sebebidir (Chawla S. et al., 2011). Hazırlanılan Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/*Basillus sp.*/GA mikrobiyal biyosensöründe, Au elektrot yüzeyi elektropolimerizasyon yöntemi kullanılarak anilin ile modifiye edilmiş ve bu bölümde değişen anilin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi incelenmiştir. Deneysel çalışmalar pH: 7,0 50 mM fosfat tamponunda ve 30°C sabit sıcaklık altında gerçekleştirildi. Mikroorganizma miktarı 10mg/ml, glutaraldehit miktarı % 0,5, EDC-NHS miktarı 1:1,5 M ve MWCNT miktarı 1 mg/ml sabit tutularak gerçekleştirilen polimerizasyon işlemleri için anilin konsantrasyonu 0,025 M, 0,05 M ve 0,1 M olarak değiştirildi. Denemeler (0 - 0,8) V aralığında DP metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmalar ışığında en uygun anilin miktarı tespit edilerek denemelere devam edilmiştir.

2.3.2. MWCNT miktarının biyosensör cevabına etkisi

Polimerizasyon aşamasında anilin ile birlikte kullanılan MWCNT hazırlamış olduğumuz mikrobiyal biyosensörün iletkenliğı ve enzim aktif merkezinde bulunan Cu^{2+} 'ın rejenerasyonu için kullanılan önemli bir parametredir. Çalışmanın bu bölümünde mikrobiyal biyosensör için kullanılabilecek en uygun MWCNT miktarına 0,5 V'ta amperometrik metot sonuçları doğrultusunda karar verilmiştir. Deneysel çalışmalar pH: 7,0 50 mM fosfat tamponunda ve 30°C sabit sıcaklık altında gerçekleştirildi. Mikroorganizma miktarı 10 mg/ml, glutaraldehit miktarı % 0,5, EDC-NHS miktarı 1:1,5 M ve anilin miktarı 0,05 M sabit tutularak gerçekleştirilen

polimerizasyon işlemleri için MWCNT miktarı 0,5, 1 ve 2 mg/ml olarak değiştirildi.

2.3.3. EDC-NHS miktarının biyosensör cevabına etkisi

Çalışmanın bu aşamasında altın elektrot yüzeyinde oluşturulan polimerizasyon tabakasındaki MWCNT' lere ait serbest karboksil gruplarının N-hidroksi süksinimid esterlerine aktive edilmesi amacıyla kullanılan EDC-NHS için optimum kullanım miktarı belirlenmiştir. Deneysel çalışmalar pH: 7,0 50 mM fosfat tamponunda ve 30°C sabit sıcaklık altında gerçekleştirildi. Mikroorganizma miktarı 10 mg/ml, glutaraldehit miktarı % 0,5, MWCNT miktarı 1 mg/ml ve anilin miktarı 0,05 M sabit tutularak gerçekleştirilen mikrobiyal biyosensörün hazırlanmasında EDC-NHS miktarı 0,5:0,75, 1:1,5 ve 2:3 M olarak değiştirildi. Denemeler 0,5 V'ta amperometrik metot kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmalar ışığında en uygun EDC-NHS miktarı tespit edilerek denemelere devam edilmiştir.

2.3.4. Mikroorganizma miktarının biyosensör cevabına etkisi

Enzim aktivitesinden faydalanmak üzere seçilen mikroorganizma miktarının biyosensör cevabına olan etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmalar pH: 7,0 50 mM fosfat tamponunda ve 30°C sabit sıcaklık altında gerçekleştirildi. EDC-NHS miktarı 1:1,5 M, glutaraldehit miktarı %0,5, MWCNT miktarı 1 mg/ml ve anilin miktarı 0,05 M sabit tutularak gerçekleştirilen mikrobiyal biyosensörün hazırlanmasında mikroorganizma miktarı 5, 10, 15 mg/ml olarak değiştirildi. Denemeler 0,5 V' ta amperometrik metot kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmalardan elde edilen veriler ışığında en uygun mikroorganizma miktarı tespit edilerek denemelere devam edilmiştir.

2.3.5. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabına etkisi

Hazırladığımız mikrobiyal biyosensörün mikroorganizma immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan glutaraldehidin biyosensör cevabına etkisinin incelenmesi üzerine yapılan deneysel çalışmalar pH: 7,0 50 mM fosfat tamponunda ve 30°C sabit sıcaklık altında gerçekleştirildi. EDC-NHS miktarı 1:1,5 M, mikroorganizma miktarı 10 mg/ml, MWCNT miktarı 1 mg/ml ve anilin miktarı 0,05 M sabit tutularak gerçekleştirilen mikrobiyal biyosensörün hazırlanmasında daldırıp çıkartma yöntemi uygulanma

süresi sabit tutularak glutaraldehit miktarı % 0,25, % 0,5 ve % 1 olarak değiştirildi. Denemeler 0,5 V' ta amperometrik metot kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmalardan elde edilen veriler ışığında en uygun glutaraldehit miktarı tespit edilerek denemelere devam edilmiştir.

2.4. Mikrobiyal Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

2.4.1. Mikrobiyal Biyosensörün Optimum Sıcaklığını Belirlenmesi

Geliştirilen biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 20, 25, 30, 35, 40, 45°C'de ölçümler gerçekleştirilerek modifiye mikrobiyal biyosensörle farklı sıcaklık değerlerinde elde edilen cevaplar incelendi. Belirtilen sıcaklık değerleri düşükte yükseğe doğru gidilerek, 0,5 V amperometrik metot ile gerçekleştirildi. Deneysel çalışmalarda pH: 7,0 50 mM fosfat tamponu ve optimum değerleri belirlenen Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/*Basillus sp.*/GA mikrobiyal biyosensörü kullanıldı. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi 100 µM parasetamol derişiminde mikrobiyal (0 - 0,8) V aralığında gerçekleştirilen DP yöntemine biyosensörün vermiş olduğu cevaplar değerlendirilerek yapıldı.

2.4.2. Mikrobiyal Biyosensörün Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Optimum pH değerinin belirlenmesi amacıyla 50 mM pH 5 ve 5,5 asetat; pH 6, 6,5, 7, 7,5 fosfat ve pH 8,0 Tris-HCl tampon sistemleri kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar 30°C sabit sıcaklıkta ve optimum değerleri belirlenen Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/*Basillus sp.*/GA mikrobiyal biyosensörü kullanılarak gerçekleştirildi. Optimum pH değerinin belirlenmesi 100 µM parasetamol derişiminde 0,5 V' ta amperometrik metoda mikrobiyal biyosensörün vermiş olduğu cevaplar değerlendirilerek yapıldı.

2.5. Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/*Basillus sp.*/GA Mikrobiyal Biyosensörünün Karakterizasyonuna Yönelik Çalışmalar

2.5.1. Mikrobiyal biyosensörün hazırlanma aşamalarında yüzey karakterizasyonun impedans ölçümleri ile belirlenmesi

Mikrobiyal biyosensörün hazırlanma aşamalarını takiben;

- I. Au elektrot yüzeyi temizlenmesinden sonra yalın elektrodun yüzey karakterizasyonunun belirlenmesi
- II. Polimerizasyon sonrası yüzey karakterizasyonunun belirlenmesi
- III. Mikroorganizmanın modifiye elektrot yüzeyine immobilizasyonu sonrası yüzey karakterizasyonunun belirlenmesi
- IV. Modifiye mikrobiyal biyosensörün 250 μM parasetamol içeren ortamda biyosensör cevabının karakterizasyonu için dört aşamalı olarak impedans ve DV ölçümleri alındı. Elde edilen veriler ışığında immobilizasyon aşamalarının Au elektrot yüzeyinde meydana getirdiği değişimler izlendi.

2.5.2. Parasetamol için doğrusal tayin aralığına yönelik çalışmalar

Yapılan denemelerde 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 μM parasetamol konsantrasyonları için 0,5 V' ta amperometrik yöntem ile sıralı katım metodu kullanılarak ölçümler alındı. Buna ilaveten 50, 100, 150, 250, 500, 1000 μM parasetamol konsantrasyonları için (-0,25 - 0,8) V aralığında döngüsel voltammogram (DV), 50, 100, 150, 250, 500, 1000 μM parasetamol konsantrasyonları için (0 - 0,8) V aralığında differensiyel puls (DP) yöntemleri kullanılarak doğrusal tayin aralığının belirlenmesi için ölçümler alınmıştır. Çizilen kalibrasyon grafiği yardımıyla mikrobiyal biyosensörün doğrusal tayin aralığı ve tayin limiti belirlendi.

2.5.3. Mikrobiyal biyosensörün tekrarlanabilirliğine yönelik çalışmalar

Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/*Basillus sp.*/GA mikrobiyal biyosensörü ile (0-0,8) V aralığında DP metodu kullanılarak 7 adet ölçüm alındı. Elde edilen

verilerden yararlanılarak ortalama değer, standart sapma (S.S.), varyasyon katsayısı (% V.K.) hesaplandı.

2.5.4. Mikrobiyal biyosensörün depolama kararlılığına yönelik çalışmalar

Mikrobiyal biyosensörün hazırlandığı günden itibaren 2 günde bir olmak üzere 21 gün boyunca 100 μM parasetamol için 0,5 V' ta amperometrik metot ile biyosensör cevabı izlendi. Bu süre zarfında ölçüm alındığı zamanlar dışında biyosensör +4 $^{\circ}\text{C}$ 'de tutuldu. Denemeler 30 $^{\circ}\text{C}$ 'de ve potasyum fosfat tamponunda (pH 7,0; 50mM) gerçekleştirildi.

2.5.5. Mikrobiyal biyosensörün substrat spesifikliğine yönelik çalışmalar

Parasetamol tayini için geliştirilen mikrobiyal biyosensörün substratına olan spesifikliğinin tayin edilmesine ilişkin yapılan ölçümlerde, 25 μM parasetamol, askorbik asit, ürik asit, dopa, epinefrin ve glukoz ile 0,5 V' ta amperometrik ölçüm metodu kullanılarak alınan ölçümlerde elde edilen veriler ışığında biyosensörün parasetamol cevabı diğer reaktiflere verdiği cevap ile kıyaslandı ve % biyosensör cevabı substrat çeşiti olarak grafiğı çizildi.

2.5.6. Mikrobiyal biyosensöre girişimcilerin etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalar

Mikrobiyal biyosensöre ilişkin girişimcilerin etkisi denemesinde 25 μM askorbik asit, ürik asit, dopa, epinefrin ve glukoz reaktifleri 25 μM parasetamol ile birlikte kullanılmıştır. Tek başına parasetamol cevabı % 100 kabul edilerek diğer reaktifler + parasetamol cevapları kıyaslanarak % biyosensör cevabı - girişimci grafiğı çizilmiştir. Denemelerde 0,5 V' ta amperometrik ölçüm metodu kullanılmıştır.

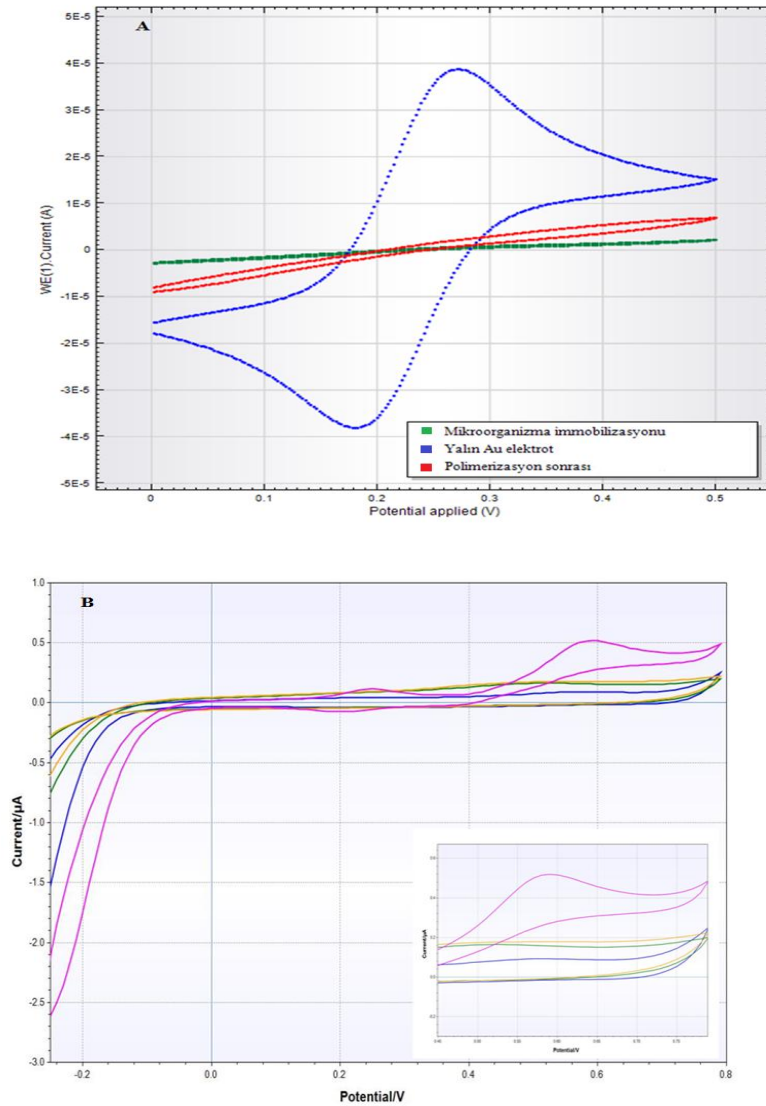
2.5.7. Mikrobiyal biyosensör ile ilaç örneklerinde parasetamol tayinine yönelik çalışmalar

Geliştirilen biyosensör ile Parol, Tamol, Minoset ilaçlarında parasetamol miktar tayini yapılmış ve elde edilen sonuçlar tablet formuna getirilmiş örnekteki spektrofotometrik tayin yöntemi ile kıyaslanmıştır (Martin et al., 1998).

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

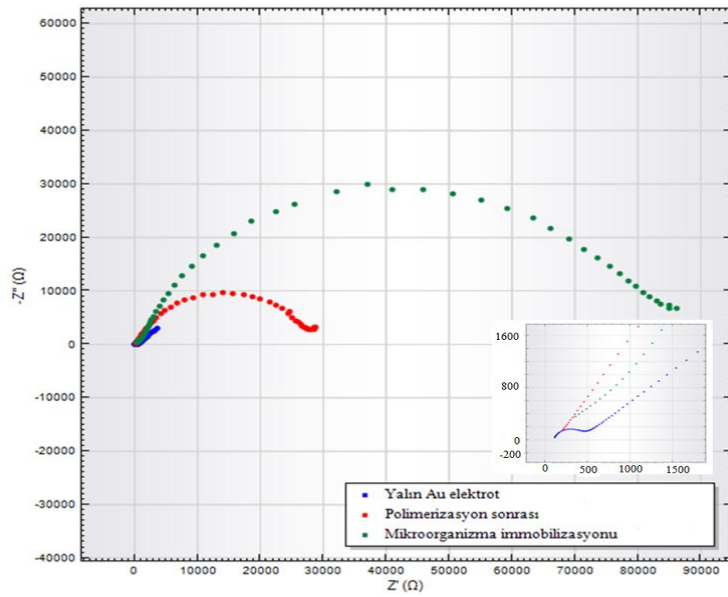
3.1. Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/*Basillus sp.*/GA Mikrobiyal Biyosensörün Biyoaktif Tabakanın Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

Geliştirilen mikrobiyal biyosensörün yüzey modifikasyonuna ilişkin uygulanan işlemlerin karakterizasyonunun belirlenmesi amacıyla impedans ve DV yöntemleri kullanılarak elde edilen veriler şekil 3.1 ve şekil 3.2 de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Mikrobiyal biyosensörün yüzey modifikasyonuna ilişkin DV ölçümleri. A) (0 - 0,5) V aralığında, 50 mV/s tarama hızında alınan DV ölçümleri sırasında 50 mM pH: 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış 5mM ferri-ferro siyanür çözeltisi kullanılmıştır. B) (-0,25 - 0,8) V aralığında, 10 mV/s tarama hızında alınan DV ölçümleri sırasında 50 mM pH: 7,0 fosfat tamponu çözeltisi kullanılmıştır. Mavi: yalın Au elektrot, yeşil: polimerizasyon, sarı: mikroorganizma immobilizasyonu sonrası alınan ölçümler, pembe: 100 µM parasetamol varlığında modifiye mikrobiyal biyosensörün verdiği cevabın DV ölçümü.

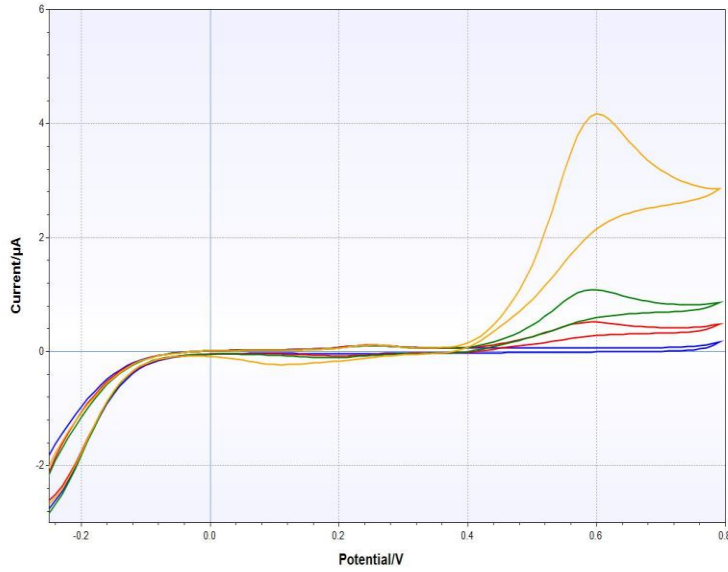
Mikrobiyal biyosensörün hazırlanmasına yönelik geliştirilen prosedür adımlarının yalın Au elektrot, polimerizasyon, mikroorganizma immobilizasyonu sonrası DV ve impedans ölçümleri alınmıştır. Şekil 3.1 A' da, yalın Au elektrot ferri-ferro çözeltisi içerisinde karakteristik DV sonucunu verirken, modifikasyonlar sonrası alınan ölçümlerde değişim gösterdiği gözlenmektedir. Belirlenen aşamalarda alınan ölçümlerin her birinde değişen DV karakterizasyonu prosedür aşamalarının başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin göstergesidir.



Şekil 3.2. Mikrobiyal biyosensörün yüzey modifikasyonuna ilişkin impedans ölçümleri. Ölçümler sırasında 50 mM pH: 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış 5 mM ferri-ferro çözeltisi kullanılmıştır.

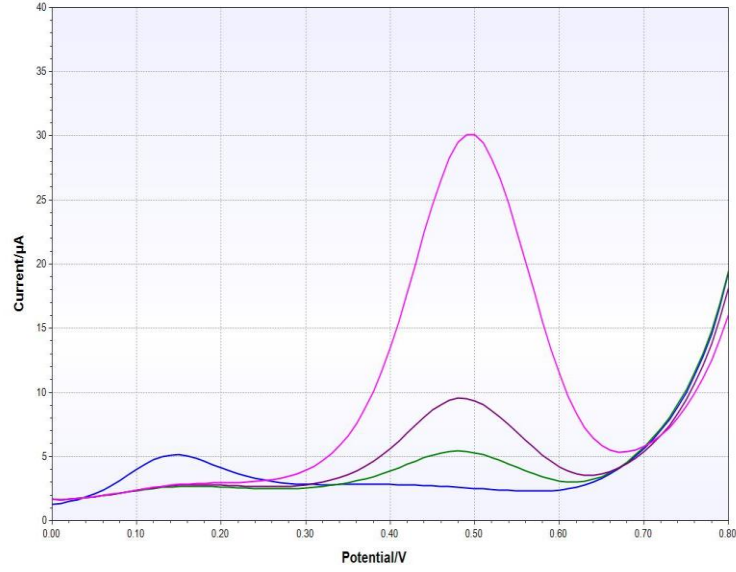
Alınan impedans ölçümlerindeki direnç değişiminin modifikasyon aşamalarında farklanmış olması, elektrot yüzeyinde polimerizasyon oluşumunun ve biyoaktif tabaka immobilizasyonunun gerçekleştiğinin göstergesidir. Sonuçlar faradaik impedans eğrileriyle uyumludur.

Mikrobiyal elektrodun yüzey karakterizasyonuna yönelik yapılan işlemlerin ardından ölçüm yönteminin belirlenebilmesi amacıyla (-0,8 - 0,8) V aralığında substratsız ve substratlı DV ölçümleri alınmıştır. Alınan ölçümler neticesinde (-0,25 - 0,8) V aralığında substrat konstrasyonu orantılı olarak artan anodik pikler baz alınarak hazırladığımız mikrobiyal biyosensörün parasetamole cevap verdiği gözlenmiştir.



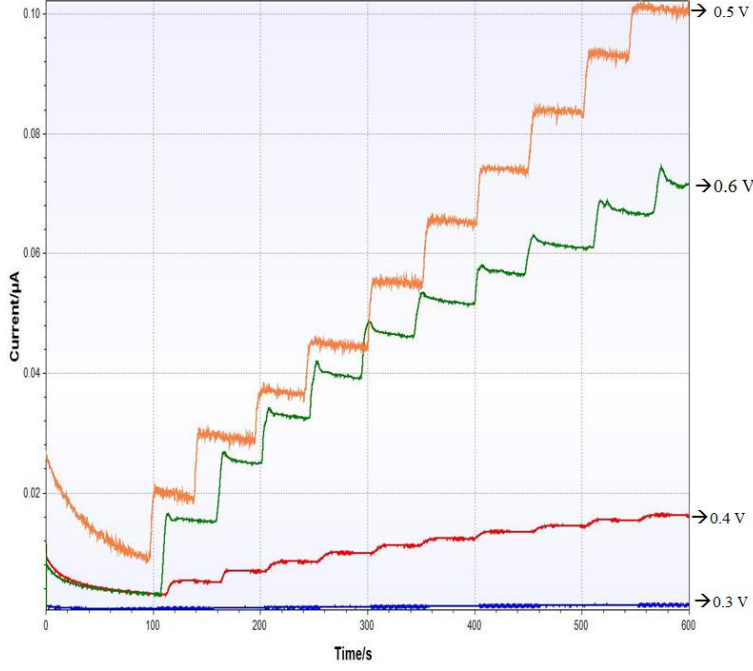
Şekil 3.3. Mikrobiyal biyosensörün aşağıdan yukarıya doğru 100, 250, 1000 μM parasetamol bulunan ortamda (-0,25 - 0,8) V aralığındaki DV cevapları. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

DV ölçümlerinin sonucunda gözlenen anodik pik akımındaki farklanmaya bağlı olarak DP metodu için aralık belirlemesi yapılır. DP ölçümü için potansiyel aralığı, anodik pik akımının olduğu potansiyel değerlerinden yola çıkılarak belirlenir. DV ölçümlerinde 0,6 V'ta gözlenen anodik pik akımı DP ölçümlerinde 0,5 V olarak belirlenmiştir. Yüzeydeki elektron transferinin ölçümü ile belirlenen pik potansiyellerinin, metod değişimi neticesinde ufak değişimler göstermesi normaldir. Şekil 3.4' te DP ölçümleri neticesinde elde edilen pik akımları ve parasetamol konsantrasyonuna bağlı olarak söz konusu pik değerlerinin artışı gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Mikrobiyal biyosensörün aşağıdan yukarıya doğru 100, 250, 1000 μM parasetamol bulunan ortamda (0 - 0,8) V aralığındaki DP cevapları. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

DP ölçümlerinde elde edilen pik potansiyel değerlerinden yola çıkılarak 0,3, 0,4, 0,5 ve 0,6 V potansiyellerinde amperometrik ölçümler alınmıştır, maksimum akım değerinin elde edildiği ve doğrusal aralığın belirlendiği 0,5 V amperometrik ölçüm yönteminde kullanılacak olan potansiyel değeri olarak belirlenmiştir (Şekil 3.5).



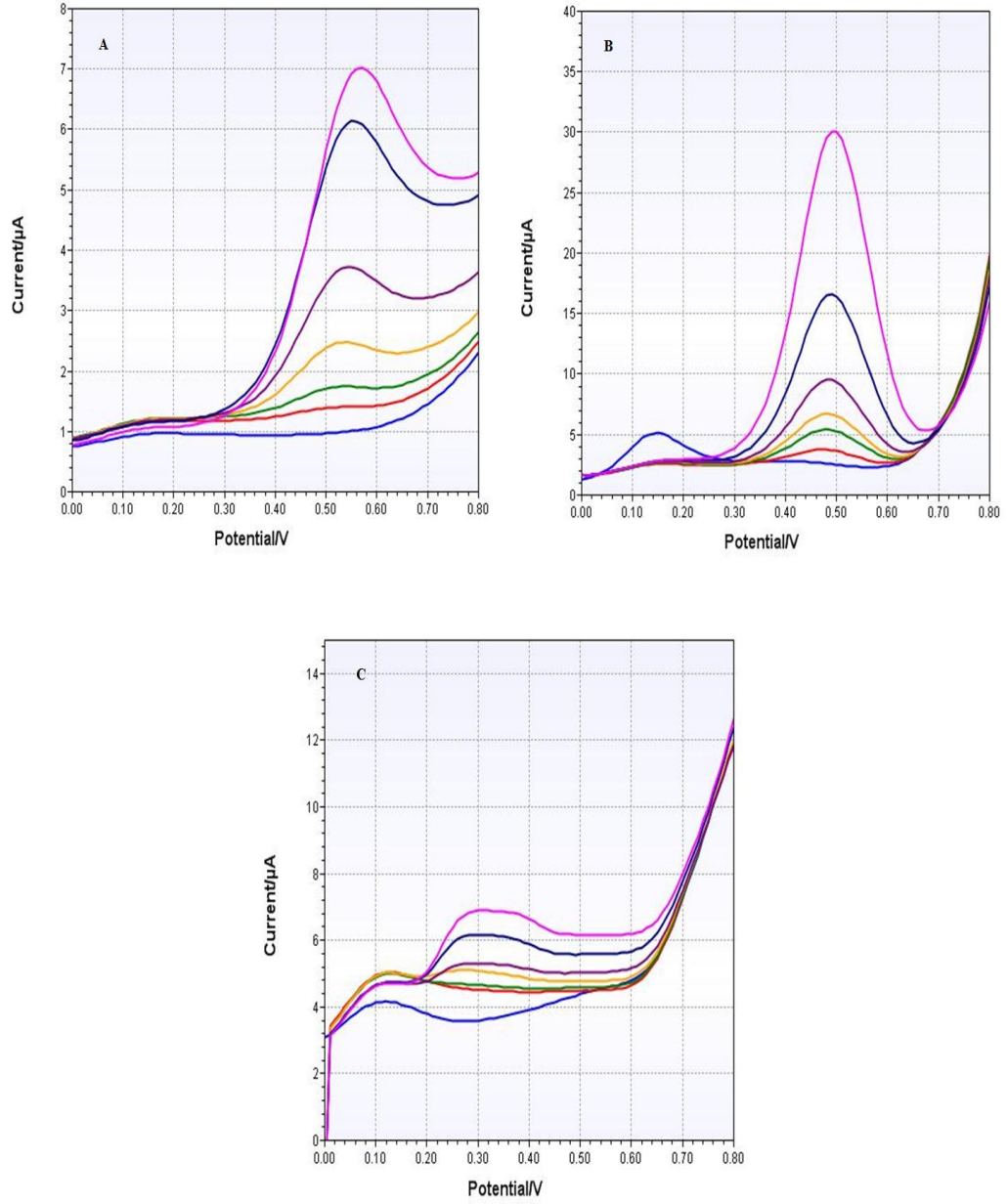
Şekil 3.5. Mikrobiyal biyosensörün 25 μM lık sıralı katım ile belirtilen potansiyeldeki amperometrik akım değerlerinin karşılaştırılması. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

3.1.1 Anilin miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular

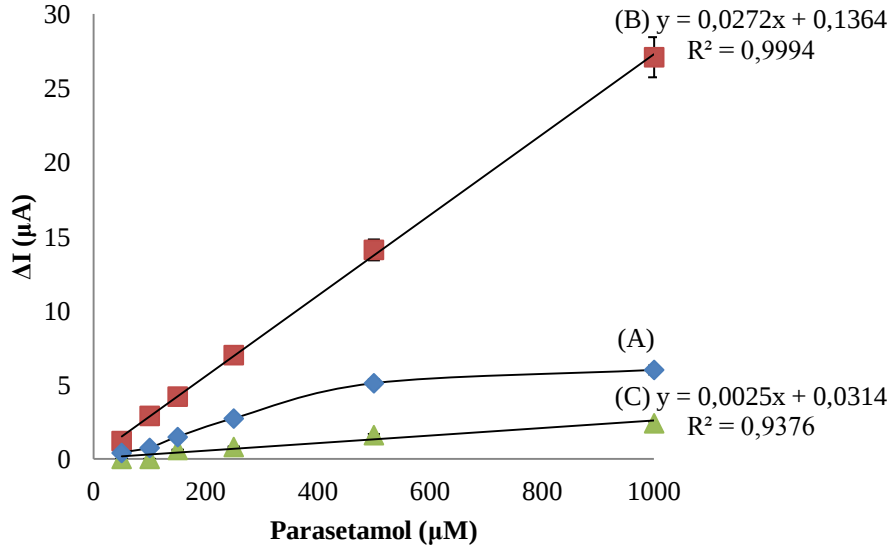
Mikrobiyal biyosensörün hazırlanmasında polimerizasyon malzemesi olarak kullanılan anilin (0 - 1,5) V arasında DV yöntemi kullanılarak Au elektrot yüzeyinde elektrokimyasal yolla polimerize edilmiştir. Çalışmamızda poli anilin tercih sebebi iletken polimer oluşumunda sıklıkla tercih edilen bir yöntem olmasının yanında CNT' ler ile kompozit yapı oluşumuna olan elverişliliğidir. Polianilin yapısındaki amin uçları CNT' lerin yapısında bulunan karboksil uçlarıyla birleşerek rahatlıkla kompozit yapı oluşturabilmektedir. Oluşturduğumuz kompozit yapı iletkenlik ve dayanıklılık açısından geliştirilen mikrobiyal biyosensöre büyük avantaj kazandırmaktadır.

Polimerizasyon tabakasının kalınlığı anilin miktarı ile doğru orantılı olup, difüzyon tabakasının artışına neden olmaktadır. Anilin miktarındaki artış ile kalınlaşan difüzyon tabakası, miktarın azalması ile incelmeye rağmen stabilizasyon ve iletkenliğin maksimum düzeye ulaşabilmesi için söz konusu anilin miktarının optimum değerinin bulunması esastır.

Çalışmanın bu aşamasında en uygun anilin miktarının belirlenmesi amacıyla alınan ölçümlerde DP yöntemi kullanılmıştır. 0,025 M, 0,05 M ve 0,1 M anilin polimerizasyonu sonrası alınan ölçümler şekil 3.6a ve şekil 3.6b' de belirtilmiştir.



Şekil 3.6a. Optimum anilin miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda DP yöntemi ile elde edilen sonuçlar. A) 0,025 M; B) 0,05 M; C) 0,1 M anilin ile hazırlanan mikrobiyal biyosensörlerin aşağıdan yukarıya doğru; 50, 100, 150, 250, 500, 1000 µM parasetamol varlığında DP yöntemi kullanılarak oluşan pik akım değerleri. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

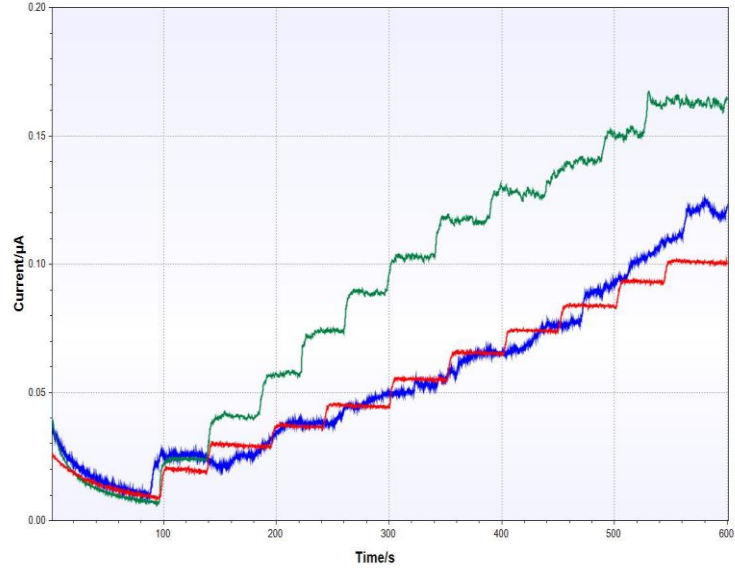


Şekil 3.6b. Optimum anilin miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda DP yöntemi ile elde edilen sonuçlardan oluşturulan doğrusal grafikler. A) 0,025 M; B) 0,05 M; C) 0,1 M anilin, ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

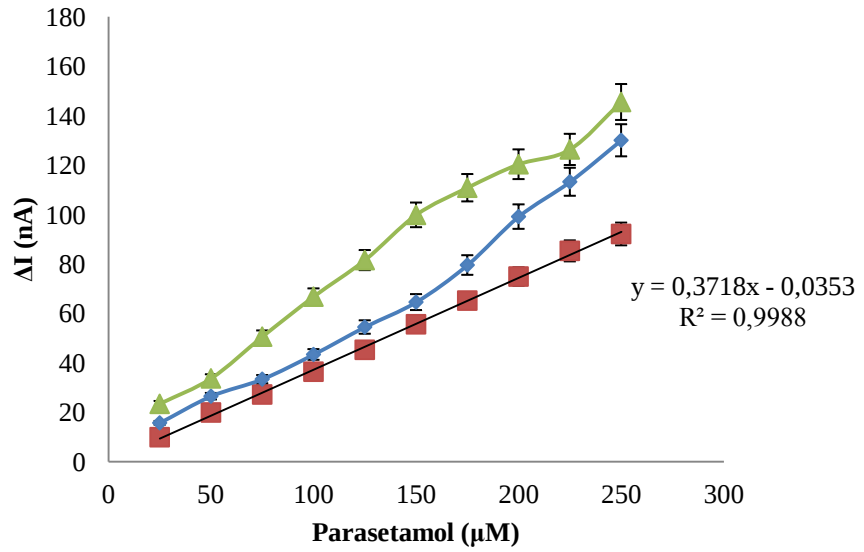
Hem akım farklanmasının yüksekliği hem de elde edilen pik akımlarının parasetamol konsantrasyonuyla gösterdiği doğrusal artışın bir sonucu olarak immobilizasyonda kullanılacak optimum anilin miktarı 0,05 M olarak belirlenmiştir.

3.1.2 MWCNT miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular

Mikrobiyal biyosensörün polimerizasyon aşamasında immobilize edilen MWCNT miktarı PPO aktif bölgesindeki Cu^{2+} ın indirgenmesi ve anilin ile polianilin-MWCNT kompozit yapısının oluşumu için önemli bir unsurdur. Elektrot yüzeyine immobilize edilen tabakanın iletkenlik ve sağlamlığı kadar önemli olan bir diğer öge difüzyon tabakasındaki kalınlığın optimal seviyede olmasıdır. Optimum değerden daha az miktarda MWCNT kullanımı kompozit yapı ve elektron iletkenliği için olumsuz etki gösterirken, daha fazla miktarda MWCNT kullanımı difüzyon bariyerini arttırır. Şekil 8a ve şekil 8b’de optimum MWCNT miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalar gösterilmektedir.



Şekil 3.7a. Optimum MWCNT miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0,5 V' ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlar. Mavi: 0,5, kırmızı: 1, yeşil: 2 mg/ml , ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

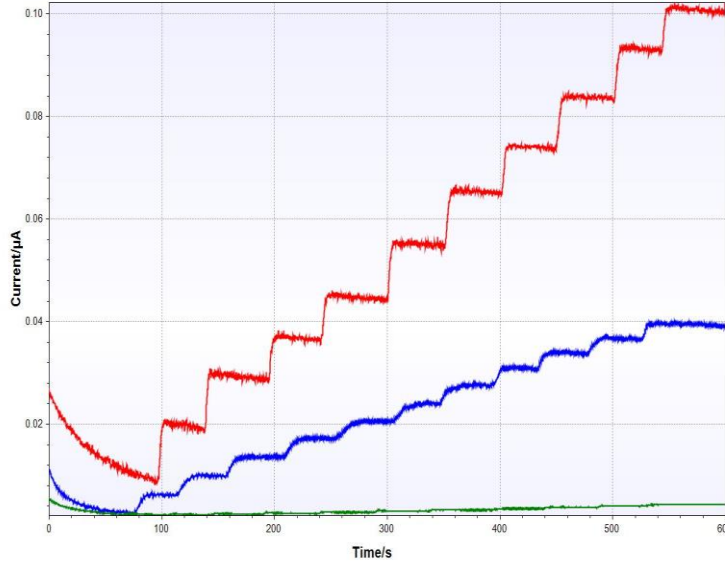


Şekil 3.7b. Optimum MWCNT miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0,5 V' ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlardan oluşturulan doğrusal grafikler. Mavi: 0,5, kırmızı: 1, yeşil: 2 mg/ml , ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

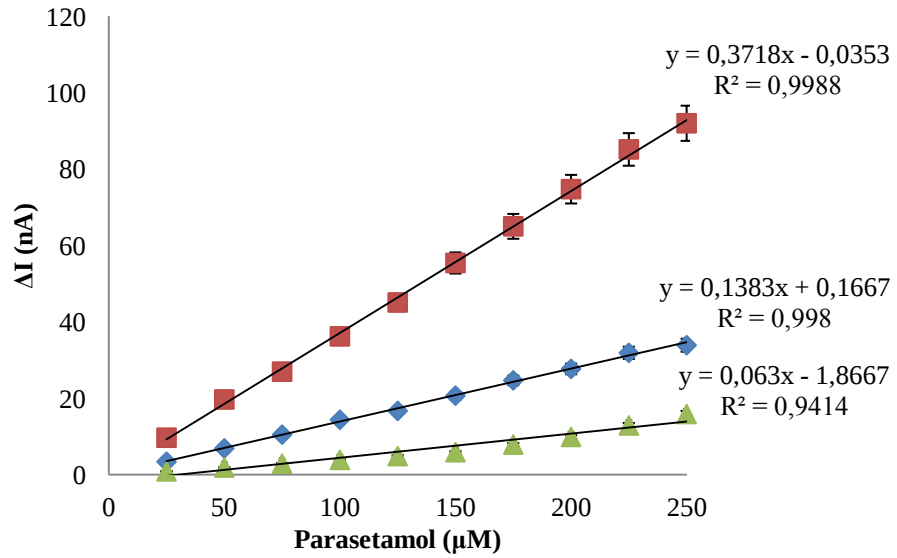
Elde edilen pik akımlarının parasetamol konsantrasyonuyla gösterdiği doğrusal artışın bir sonucu olarak immobilizasyonda kullanılacak optimum MWCNT miktarı 1 mg/ml olarak belirlenmiştir.

3.1.3. EDC-NHS miktarının mikrobiyal biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular

MWCNT' te bulunan karboksil uçlarının amin grupları ile etkin bir şekilde bağlanması amacıyla kullanılan EDC-NHS, aktifleşmenin tam olarak yapılabilmesi için önemli bir parametredir. Mevcut karboksil gruplarının sayısına ve bu guruplara bağlanacak amin gruplarının miktarına bağlı olarak optimum olarak kullanılması gereken EDC-NHS miktarı belirlenmelidir. Şekil 3.9a ve şekil 3.9b' de değiştirilen EDC-NHS miktarına bağlı olarak biyosensörün 0,5 V' ta amperometrik yanıtları ve buna bağlı grafiği gösterilmektedir.



Şekil 3.8a. Optimum EDC-NHS miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0,5 V' ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlardan oluşturulan doğrusal grafikler. Mavi: 0,5 : 0,75, kırmızı: 1 : 1,5, yeşil: 2 : 3 M, ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

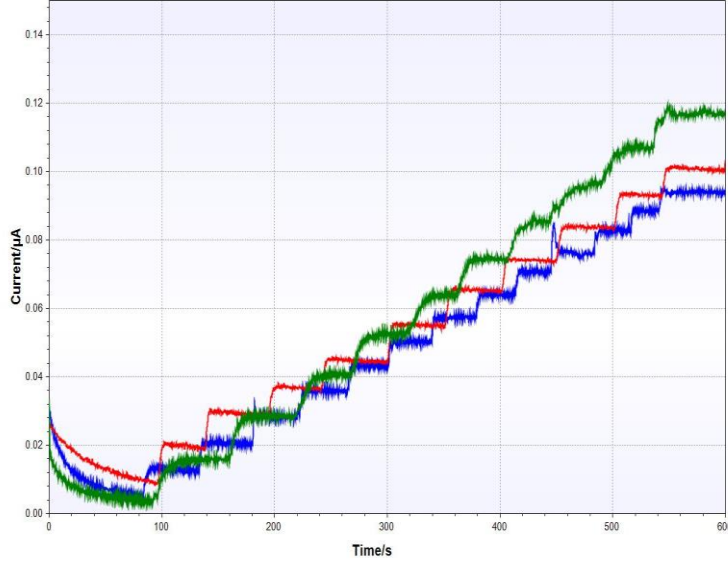


Şekil 3.8b. Optimum EDC-NHS miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0,5 V' ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlardan oluşturulan doğrusal grafikler. Mavi: 0,5 : 0,75, kırmızı: 1 : 1,5, yeşil: 2 : 3 M, ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

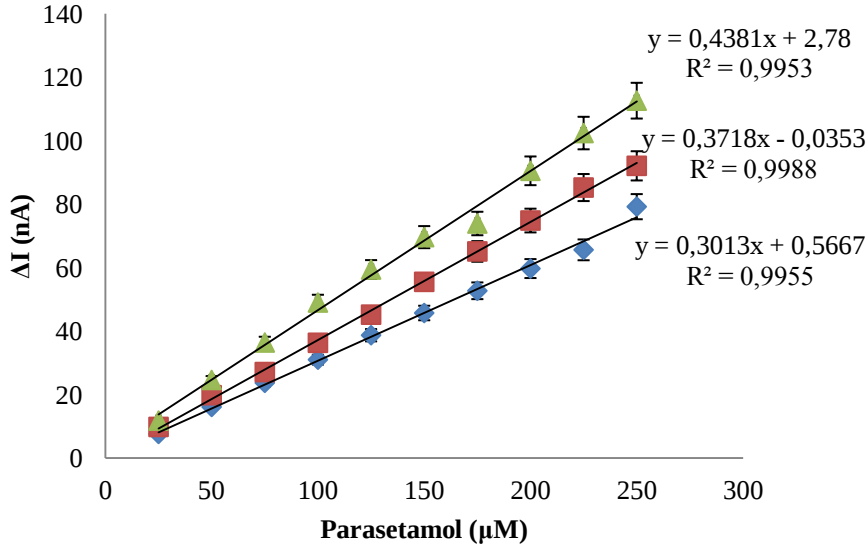
Grafikten de anlaşılacağı gibi 1 : 1,5 M oranında hazırlanılarak kullanılan EDC:NHS ile maksimum akım değerlerine ulaşılmış ve doğrusal bir grafik elde edilmiştir. Bu nedenle elektrot yüzeyine yapılan immobilizasyon aşamaları için optimum EDC:NHS oranı 1:1,5 M olarak belirlenmiştir.

3.1.4. Mikroorganizma miktarının mikrobiyal biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular

Biyokimyasal tepkimenin katalizini gerçekleştiren PPO enzimini barındıran ve bu sayede biyokimyasal tepkimenin katalizini gerçekleştiren *Basillus sp.*'un miktarsal olarak optimizasyonu için 5, 10, 15 mg/mL mikroorganizma içeren preparatlardan 10' ar μL modifiye elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Farklı miktarlarda mikroorganizma içeren elektrotlara ait ölçüm sonuçları şekil 3.10a ve şekil 3.10b' de belirtirmiştir.



Şekil 3.9a. Optimum mikroorganizma miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0,5 V’ ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlardan oluşturulan doğrusal grafikler. Mavi: 5, kırmızı: 10, yeşil: 15 mg/mL mikroorganizma içerir, ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.



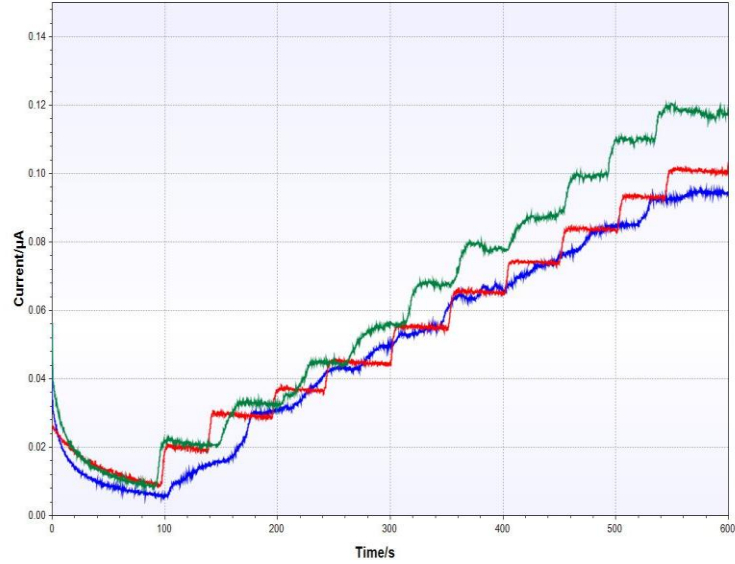
Şekil 3.9b. Optimum mikroorganizma miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0,5 V’ ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlardan oluşturulan doğrusal grafikler. Mavi: 5 , kırmızı: 10, yeşil: 15 mg/mL mikroorganizma içerir, ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Tekrarlanan ölçümler sonucu grafikler değerlendirildiğinde denenen üç mikroorganizma miktarının da kabul edilebilir doğrusallıkta olduğu görülmektedir. Amperometrik ölçüm neticesinde elde edilen veriler ışığında en yüksek akım farklanması 15 mg/mL mikroorganizma kullanımında gözlemlense de

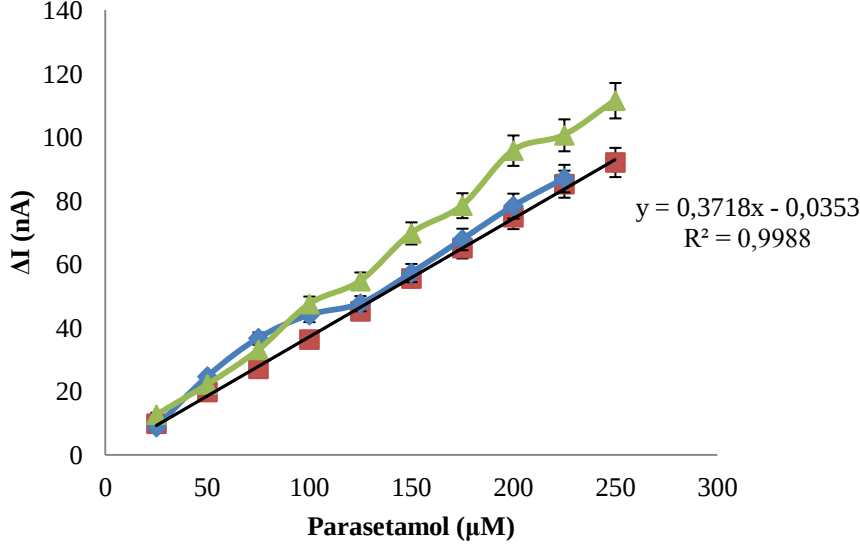
amperometrik ölçümlerde özellikle önem arz eden biyosensör hafızasının 10 mg/mL mikroorganizma miktarıyla çalışıldığında daha düşük olduğu fark edilmektedir. Akım farklanmasındaki yükseliş ve biyosensör hafızası göz önünde bulundurularak, kullanılması gereken optimum mikroorganizma değerinin 10 mg/mL olduğu sonucuna varılmıştır.

3.1.5. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin bulgular

Mikrobiyal biyosensör immobilizasyonun son aşaması olan glutaraldehit ile muamele mikroorganizmaların elektrot yüzeyine çapraz bağlarla tutturulması amacıyla kullanılmaktadır. Glutaraldehit elektrot yüzeyinde oluşturduğu çapraz bağlarla kafes benzeri bir yapı oluşturur ve miktarıyla doğrusal oranda oluşturduğu bu yapı daha küçük moleküllerin geçebileceği darlığa ulaşır. Diğer taraftan toksik özellik gösteren bir molekül olduğundan hücrelerin canlılığının devamı için optimum konsantrasyon miktarının belirlenmesi büyük önem taşır. Farklı miktarlarda glutaraldehit muamelesi yapılan elektrotlara ait ölçüm sonuçları şekil 3.11a ve şekil 3.11b’ de belirtirmiştir.



Şekil 3.10a. Optimum glutaraldehit miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0,5 V' ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlar. Mavi: % 0,25, kırmızı: % 0,5, yeşil: % 1 glutaraldehit içerir, ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.



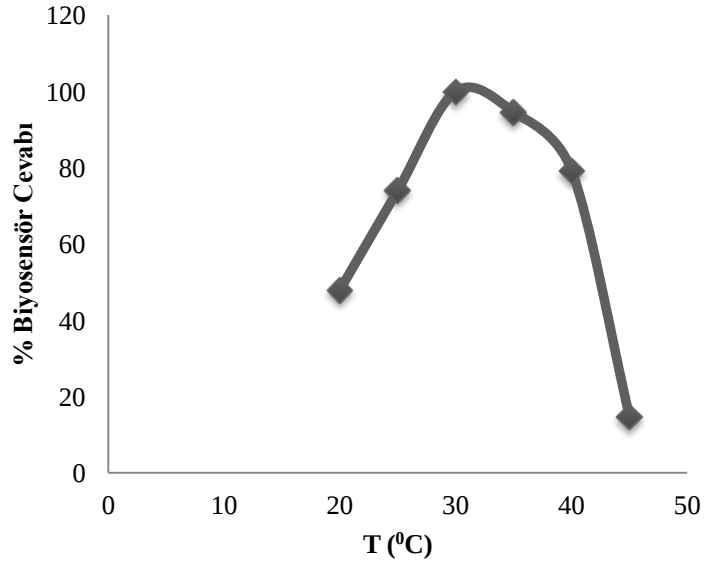
Şekil 3.10b. Optimum glutaraldehit miktarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda 0,5 V' ta amperometrik yöntem ile elde edilen sonuçlardan elde edilen doğrusal grafikler. Mavi: % 0,25, kırmızı: % 0,5, yeşil: % 1 glutaraldehit içerir, ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde doğrusallığın, biyosensör hafızasının ve amperometrik ölçüm tutarlılığının en yüksek değerlerde bulunduğu % 0,5' lik glutaraldehit miktarı biyosensör immobilizasyonu için optimum değer olarak belirlenmiştir.

3.2. Mikrobiyal Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

3.2.1. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

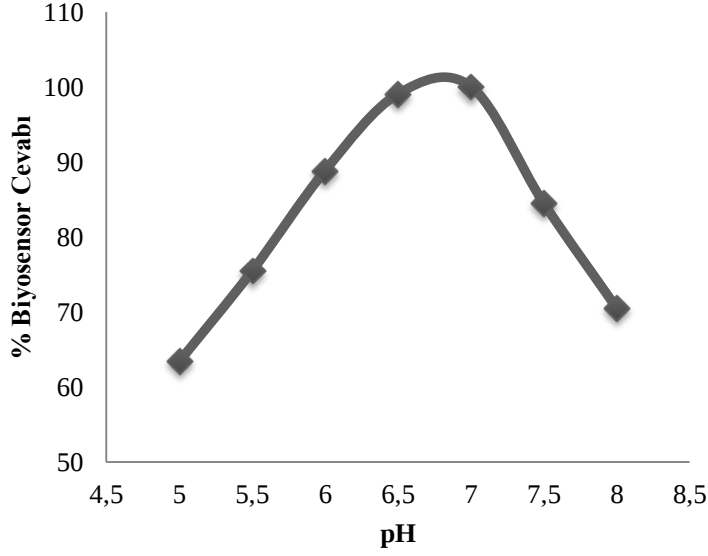
Biyosensör sistemlerinde optimum sıcaklık değeri hem yüzey modifikasyonunun bozulmaması hem de biyoaktif bileşenin aktivite gösterebilmesi açısından önem taşır. Mikrobiyal biyosensörün çalışma koşullarındaki optimum sıcaklık değeri 30°C olarak belirlenmiştir. Bu değer biyoaktif bileşenin optimum değerine yakın olup immobilizasyon tabakasının korunurluğu açısından da elverişlidir. Aynı zamanda 30°C mikroorganizmanın aktivasyonunda da kullanılan sıcaklık değeri olup elde edilen sonuç bu bağlamda da anlamlıdır.



Şekil 3.11. Mikrobiyal biyosensör için optimum sıcaklık grafiği. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Optimum pH değerinin belirlenmesi

Grafikten de görüldüğü gibi mikrobiyal biyosensör için optimum çalışma pH' ı 7,0 olarak bulunmuştur. Bu sonuç mikroorganizma ve enzimin serbest haldeki optimum pH değeriyle uyumlu olduğundan immobilizasyon yönteminin biyoaktif bileşenin optimum pH değerini fazla değiştirmedığının göstergesidir. Geliştirilen biyosensörün geniş bir aralıkta % 50' nin üzerinde aktivite göstermesi biyoaktif tabakada mikroorganizma kullanılmasının bir avantajıdır.

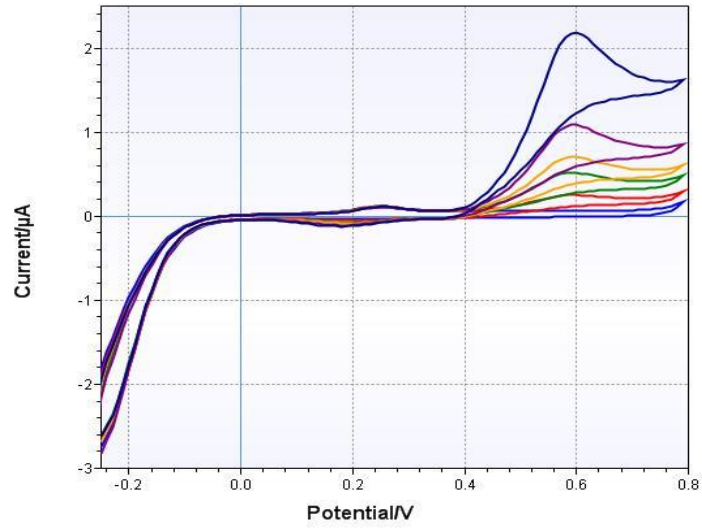


Şekil 3.12. Mikrobiyal biyosensör için optimum pH grafiği. Ölçümler 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

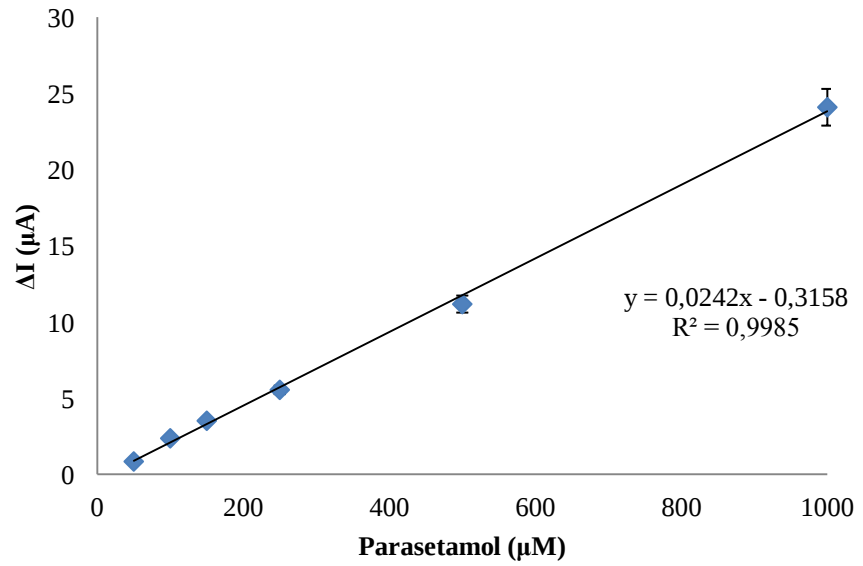
3.3. Mikrobiyal Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular

3.3.1. Parasetamol için belirlenen doğrusal tayin aralığı

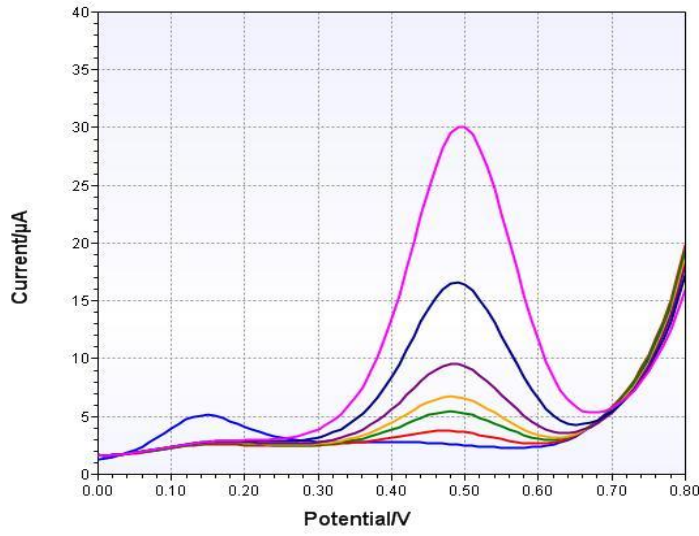
Geliştirilen Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/*Basillus sp.*/GA mikrobiyal biyosensörünün hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonunun ardından, parasetamol için doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir. Bu amaçla alınan DV, DP ve amperometrik ölçüm sonuçları ve kalibrasyon grafikleri sırasıyla şekil 3.13a; 13b, 14a; 14b ve 15a; 15b' de belirtilmektedir.



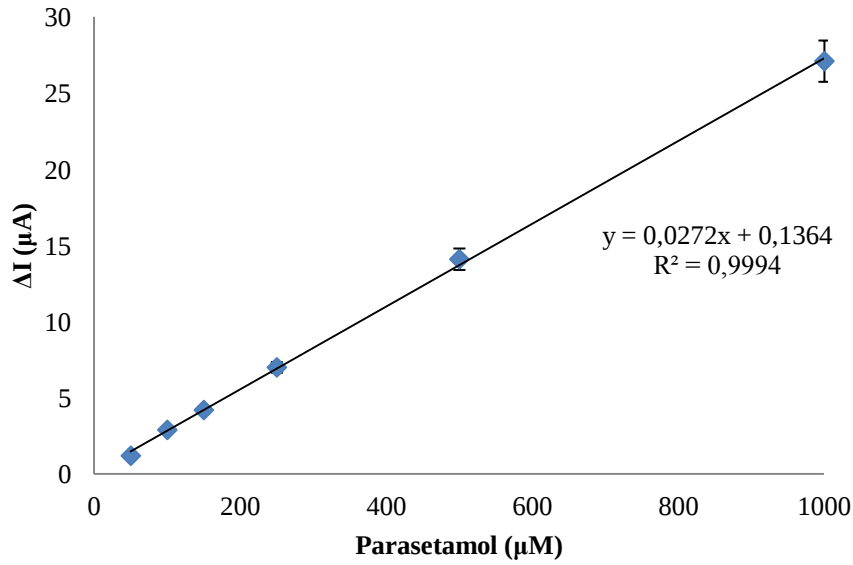
Şekil 3.13a. Tayin aralığının belirlenmesi için (-0,25 - 0,8) V aralığında, 10 mV/s tarama hızında alınan DV ölçümleri. Aşağıdan yukarıya doğru 0; 50; 100; 150; 250; 500; 1000 μM parasetamol varlığında alınan ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.



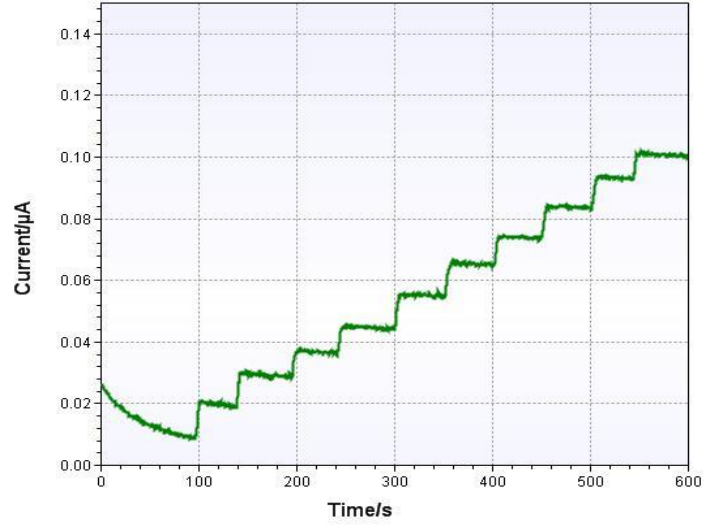
Şekil 3.13b. Tayin aralığının belirlenmesi için (-0,25 - 0,8) V aralığında alınan DV ölçümleri. Aşağıdan yukarıya doğru 0; 50; 100; 150; 250; 500; 1000 μM parasetamol varlığında alınan ölçümlere ait kalibrasyon grafiği. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.



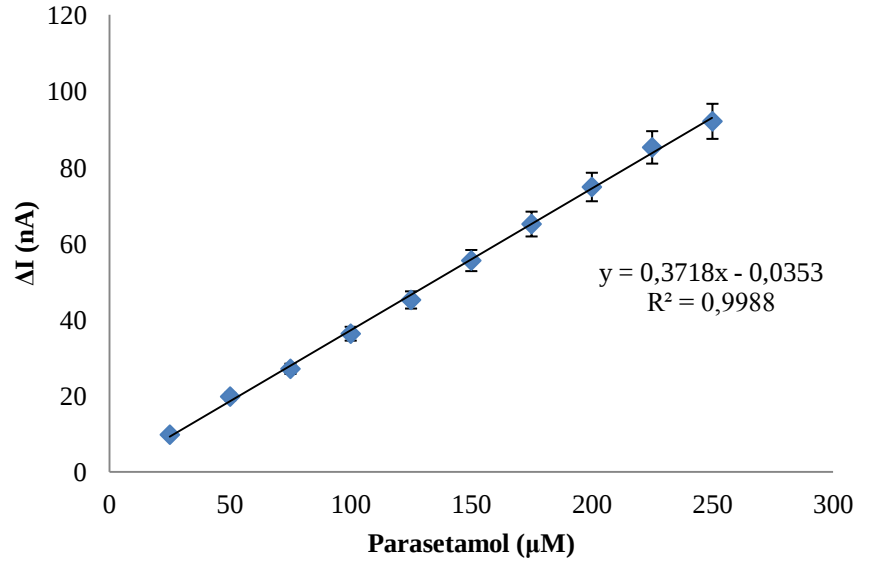
Şekil 3.14a. Tayin aralığının belirlenmesi için (0 - 0,8) V aralığında alınan DP ölçümleri. Aşağıdan yukarıya doğru 0; 50; 100; 150; 250; 500; 1000 µM parasetamol varlığında alınan ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.14b. Tayin aralığının belirlenmesi için (0 - 0,8) V aralığında alınan DP ölçümleri. Aşağıdan yukarıya doğru 0; 50; 100; 150; 250; 500; 1000 µM parasetamol varlığında alınan ölçümlere ait kalibrasyon grafiği. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.15a. Tayin aralığının belirlenmesi için 0,5V' ta alınan amperometrik ölçümler her 50 sn' de bir 25 μ M parasetamol ilavesi ile elde edilmiştir. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.15b. Tayin aralığının belirlenmesi için 0,5 V' ta alınan amperometrik ölçümlere ait kalibrasyon grafiği, her 50 sn' de bir 25 μ M parasetamol ilavesi ile elde edilen ölçüm sonuçlarına göre oluşturulmuştur. Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Mikrobiyal biyosensörün tekrarlanabilirlik denemelerine ilişkin bulgular

Denemeler sonucunda elde edilen bulgular çizelge 3.1’ de gösterilmiştir.

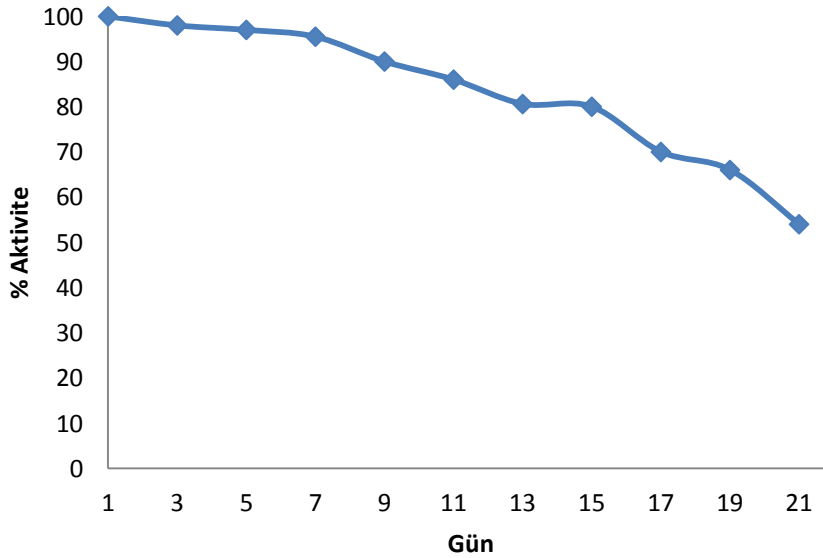
Çizelge 3.1. Parasetamol için elde edilen tekrarlanabilirlik değerleri.

Deneme Sayısı	1	2	3	4	5	6	7	Ortalama Değer	S.S.	% V.K.
Bulunan Parasetamol Derişimi (μM)	250,16	250,16	248,73	249,55	253,22	252,20	250,57	250,65	$\pm 1,55$	0,62

Parasetamol derişimi 250 μM olup, ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30 °C sıcaklıkta (0 - 0,8) V aralığında DP metodu kullanılarak yapılmıştır. Çizelge 3.1’ de görüldüğü gibi geliştirilen biyosensör birbirine yakın ölçüm sonuçları vermiş ve standart sapma kabul edilebilir aralıkta bulunmuştur.

3.3.2. Mikrobiyal biyosensörün depolama kararlılığına ilişkin bulgular

Denemeler sonucunda elde edilen bulgular şekil 3.17’ de gösterilmiştir.

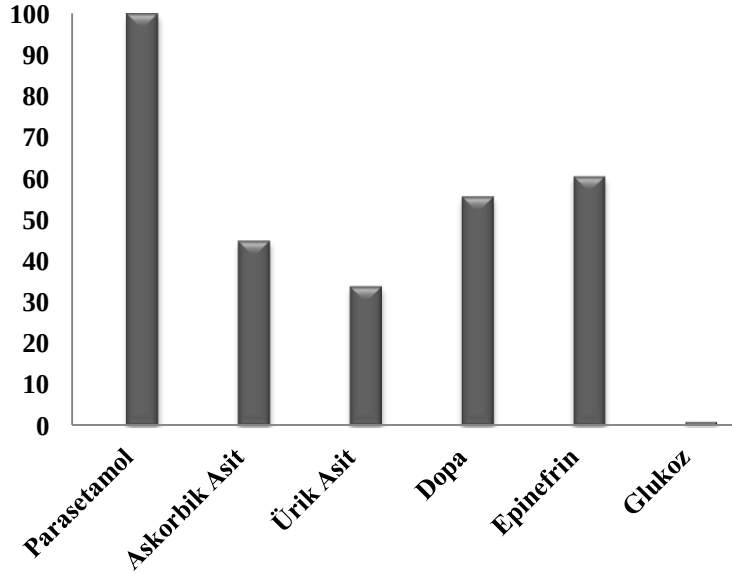


Şekil 3.16. Parasetamol tayinine yönelik geliştirilen mikrobiyal biyosensör için depo kararlılığı denemesine ilişkin bulgular. Kullanılan substratların derişimi 100 μM olup, ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30 °C sıcaklıkta 0,5 V’ta amperometrik ölçümler yoluyla yapılmıştır.

Çalışma süresince 2 günde bir ölçüm alınmış ve % aktivite değeri 50' nin altına düşüne kadar devam edilmiştir. Elektrot kullanılmadığı zamanlar boyunca +4°C' de buzdolabında bekletilmiştir. Grafiğe bakıldığında ilk 7 gün boyunca % 90' nın üzerinde aktivite gözlenmektedir. Bu durum biyoaktif materyal olarak mikroorganizma kullanımının biyosensörü daha dayanıklı kılmasının bir sonucu olduğu gibi polimerizasyon yapısının biyosensöre stabil bir yapı kazandırmasının bir sonucudur. Sonuç olarak kullanılan immobilizasyon yönteminin ve mikroorganizmanın temel yapısının mikrobiyal enzim kararlılığını koruduğunu söylemek mümkündür.

3.3.3. Mikrobiyal biyosensörün substrat spesifikliğine ilişkin bulgular

Polifenoloksidaz grup spesifik bir enzim olduğu için fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyip katalizlemediği bu çalışmada test edilmiştir. Tirozinaz biyosensörü ile fenolik bileşik olan dopa ve epinefrin ve genel girişimcilerden fenolik olmayan glukoz , elektroaktif anyonik bileşikler olan askorbik asit ve ürik asit kullanılarak ölçümler yapılmıştır. İlgili bileşiklere yönelik biyosensör cevabı şekil 3.18' te verilmiştir.

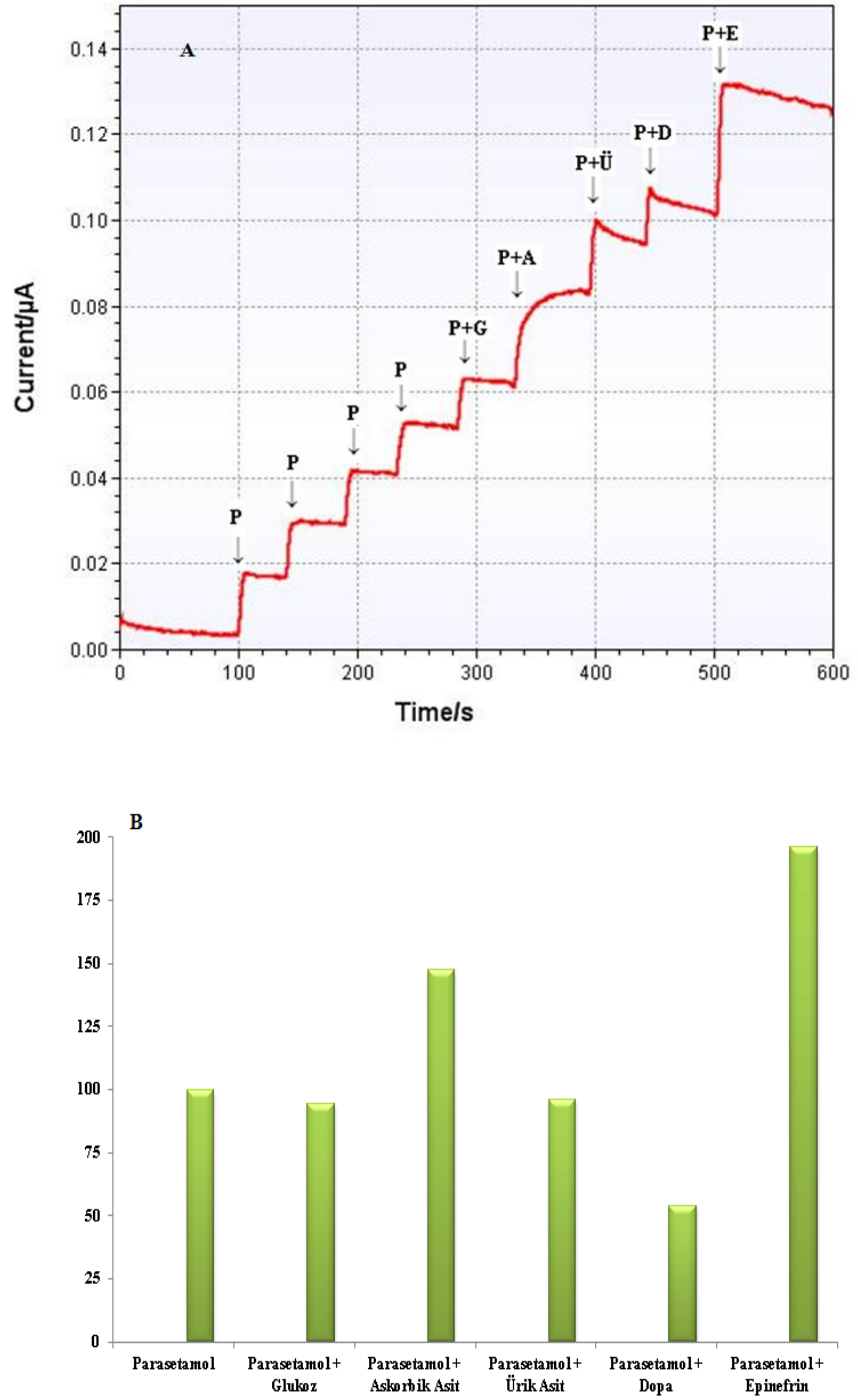


Şekil 3.17. Parasetamol tayinine yönelik geliştirilen mikrobiyal biyosensör için substrat spesifikliğinin değerlendirilmesine ilişkin bulgular. Kullanılan substratların derişimi 25 µM olup, ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30 °C sıcaklıkta 0,5 V'ta amperometrik ölçümler yoluyla yapılmıştır.

Mikroorganizmada bulunan polifenoloksidazın, fenol gruplarına spesifik oluşundan ileri gelen fenolik bileşiklerden dopa ve epinefrine mikrobiyal biyosensörün verdiği cevap olağandır. Mikrobiyal biyosensörün, fenolik bileşik örneklerine verdiği biyosensör cevabının, parasetamole verilen biyosensör cevabıyla kıyaslandığında düşük ve ihmal edilebilir düzeyde olduğu görülmektedir. Mikrobiyal polifenoloksidaz enziminin parasetamole spesifik denilebilecek düzeyde olan ilgisinin ve glukozla verilen cevabın bu denli düşük olmasının sebebi, mikroorganizmanın kültür ortamında karbon kaynağı olarak parasetamolün kullanılmış olmasıdır. Genel girişimciler olarak görülen askorbik asit ve ürik asite mikrobiyal biyosensörün % 50' nin altında yanıt göstermesi geliştirdiğimiz biyosensörün rutin kullanıma dönüştürülebilmesi için önemli bir avantaj olarak değerlendirilmelidir.

3.3.4. Mikrobiyal biyosensör cevabına girişimcilerin etkisine ilişkin bulgular

Mikrobiyal biyosensör cevabına girişimcilerin etkisinin incelenmesine yönelik çalışma, parasetamole ek olarak glukoz, askorbik asit, ürik asit, dopa ve epinefrinin de bulunduğu ortamda ölçümler alınarak yapılmıştır.



Şekil 3.18. Parasetamol tayinine yönelik geliştirilen mikrobiyal biyosensör için girişimcilerin etkisinin değerlendirilmesine ilişkin veriler (A) ve bulgular (B). Ölçümler 25 µM parasetamol ve ilgili substrat kullanılarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 30 °C sıcaklıkta 0,5 V'ta amperometrik ölçümler yoluyla yapılmıştır.

Veriler incelendiğinde geliştirilen mikrobiyal biyosensörün parasetamol ve fenolik bileşikler varlığında daha yüksek oranda cevap verdiği görülmektedir. Söz konusu bileşikler polifenoloksidazın substratıdır ve enzimin bu bileşikleri

yüksetgemesi sonucu açığa çıkan elektronlar akım artışına neden olmaktadır. Askorbik asit ve ürik asitin % 50' nin altında bir akım farklanmasına sebep olduğu gözlenmiştir. Bunlara ilaveten başlıca karbon kaynağı olan glukozun mikrobiyal biyosensörün cevabına hemen hemen hiç etki etmemesi biyoaktif tabakadaki mikroorganizma temelli oluşumun sensör tasarımında başarılı bir şekilde kullanılabilir olduğunun ifadesidir.

3.3.5. Mikrobiyal biyosensör ile ilaç örneklerinde parasetamol tayinine yönelik bulgular

Gelirtirilen mikrobiyal biyosensör ile örnek analizinin gerçekleştirilmesine yönelik yapılan bu çalışmada etken maddesi parasetamol olan ilaçlardan Parol, Tamol ve Minoset kullanılmıştır. Çizelge 3.2' de referans metotta kullanılan spektrofotometrik yöntem ile mikrobiyal biyosensöre ait elde edilen veriler karşılaştırılarak uygulanabilirlik izlenmiştir.

Çizelge 3.2. Parasetamolün mikrobiyal biyosensör ve spektrofotometrik tayin ile analizinin karşılaştırılması.

Örnek	100µM için biyosensör ile bulunan değer	Geri kazanım (%)
Parol	96,08±2,3	96,08
Tamol	98,26±2,5	98,26
Minoset	98,30±2,3	98,30

Bulunan sonuçların gerek referans metodla gerekse örnekte bulunması gereken değerlerle paralel çıkması biyosensörün rutin sistemlerde uygulanabilirliğin yüksek olduğunu göstermektedir.

4. SONUÇ

Biyosensörler, genel olarak analizlenecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyali ölçüm sistemine aktaran iletici bir sistemin kombinasyonu ile oluşturulurlar. Biyoloji, fizik, kimya, biyokimya, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden multidisipliner bir anlayış çerçevesinde yararlanılarak ve biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçimlilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlar, biyosensör sistemi olarak adlandırılır. İlerleyen teknolojiyle birlikte biyosensör sistemlerindeki duyarlılık artmakta ve gün geçtikçe rutin analizlerde biyosensör sistemlerine olan ilgi daha yoğun bir hal almaktadır. Özellikle nanoteknolojinin biyosensör sistemleri içerisinde kullanılmaya başlanmasıyla birlikte hızlı olmasının yanı sıra anında ölçüm imkanının ve mikrosensörlerin söz konusu olduğu biyosensör sistemleri günlük hayatımızın bir parçası olmaya başlamıştır.

Parasetamol olarak bilinen asetoaminofen, en fazla tercih edilen etkili bir ağrı kesicidir. Yüksek dozda alındığında toksik metabolit birikimine sebep olarak, hepatoksisiteye ve nefrotoksisiteye yol açar (Matrin et al., 1998). Bu nedenle, parasetamol miktarının tayin edilmesi ve kontrol altında tutulması sağlık açısından önemlidir.

Bu çalışmada kullanılan immobilizasyon prosedürü özgün olup parasetamol tayinine yönelik olarak geliştiren diğer biyosensör tekniklerine göre; düşük dedeksiyon limiti, geniş doğrusal aralığa sahip olması ve mikrobiyal biyosensör sistemlerine yeni bir bakış açısı getirmesi sebebiyle başarılı bir biyosensör sistemidir.

Geliştirdiğimiz mikrobiyal biyosensörün biyoaktif tabaka immobilizasyonu için anilinin MWCNT ile birlikte polimerizasyonu gerçekleştirilmiş ve EDC-NHS kullanımı sonrası aktifleşen karboksil gruplarına *Basillus sp.* immobilizasyonu yapılmıştır. Parasetamol, *Basillus sp.*' un büyüme ortamında karbon kaynağı olarak kullanılarak mikroorganizmanın analiti dönüşüme uğratabilecek enzimi polifenol oksidazın aktivasyonu sağlanmış ve mikroorganizmanın parasetamole adaptasyonu sağlanmıştır.

Au/Anilin-MWCNT/EDC-NHS/*Basillus sp.*/GA mikrobiyal biyosensörünün çalışma koşullarının optimizasyonuna yönelik yapılan

Çalışmalarda optimum sıcaklık değeri 30°C, optimum pH 7,0 fosfat tamponu olarak belirlenmiştir. Mikrobiyal biyosensörün karakterizasyonuna ilişkin yapılan çalışmalarda 0,5 V amperometrik metod için doğrusal tayin aralığı 25 - 250 µM olarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik denemelerinde ise 250 µM parasetamol için (n=7) ortalama değeri 250,65 µM, standart sapma (S.S) ±1,55 ve varyasyon katsayısı (V.K) % 0,62 olarak bulunmuştur. Yapılan substrat spesifikliği denemelerinde parasetamole olan ilgi diğer substratlara oranla çok daha fazladır. Askorbik asit ve ürik asit literatürlerde (Chu et al., 2007) de belirtildiği gibi elektroaktif girişimciler olduklarından hem substrat spesifikliği hem de girişim etkisi denemelerinde dönüşüme uğratılmasına rağmen geliştirdiğimiz biyosensör sisteminde bunun düşük oranda olduğu gözlenmiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aghababian, R.V.**, 2010, Essentials of emergency medicine jones & bartlett publishers, chapter 137: 814 p.
- Akyılmaz, E., Yasa, İ. ve Dinckaya E.**, 2006, Whole cell immobilized amperometric biosensor based on *Saccharomyces cerevisiae* for selective determination of vitamin B₁ (thiamine), 354: 78-84 ss.
- Alpat, S., Kılınc K.S., Candırıcı, B.H., Yasa, I. ve Telefoncu, A.**, 2008, A novel microbial biosensor based on *Circinella* sp. modified carbon paste electrode and its voltammetric application, 134: 175-181 ss.
- Antiochia, R. and Gorton, L.**, 2007, Development of a carbon nanotube paste electrode osmium polymer-mediated biosensor for determination of glucose in alcoholic beverages, *Biosens. Bioelectron.*, 22: 2611-2617 pp.
- Balasubramanian, K. and Burghard, M.**, 2006, Biosensors based on carbon nanotubes, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385: 452–468 pp.
- Balasubramanian, K., and Burghard, M.**, 2006, biosensors based on carbon nanotubes, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385: 452-468 pp.
- Barsan, M.M., Ghica M.E. and Brett C.M.A.**, 2015, Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: A review, *Analytica Chimica Acta*, (yayımlanmamış).
- Bedner, M. and Maccrehan, W.A.**, 2006, Transformation of acetaminophen by chlorination produces the toxicants 1,4-benzoquinone and Nacetyl-p-benzoquinone imine, *Environ Sci Technol* 40: 516-522 pp.
- Behera, S., Ghanty, S., Ahmad, F., Santra S., and Banerjee, S.**, 2012, UV-Visible Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Paracetamol Tablet Formulation, *J Anal Bioanal Techniques* 3: 6 p.
- Chawla, S., Rawal, R. and Pundir, C.S.**, 2011, Fabrication of polyphenol biosensor based on laccase immobilized on copper nanoparticles/chitosan/multiwalled carbon nanotubes/polyaniline-modified gold electrode, *J Biotechnol.*, 156: 39-45 pp.
- Chen, C.H., Larue, J.C., Nelson, R.D., Kulinsky, L. and Madou, M.J.**, 2012, Electrical conductivity of polymer blends of poly(3,4-ethylenedioxythiophene): poly(styrenesulfonate):N-methyl-2-pyrrolidinone and polyvinyl alcohol, *J. Appl. Polym. Sci.*, 125: 3134-3141 pp.
- Chu, X., Duan, D., Shen, G. and Yu, R.**, 2007, Amperometric glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto covalently immobilized carbon nanotube electrode, *Talanta*, 71: 2040-2047 pp.
- Çetinkaya, S., Karakışla, M., Özer, A. and Saçak, M.**, 2007, Conductive potassium feldspar/polyaniline composites prepared by in situ chemical polymerization, *Synthetic Metals*, 157: 702-707 ss.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- D'Souza, S.F.**, 2001, Microbial biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, 16: 337-353 pp.
- Dekker, C., Yao, Z. and Kane, C. L.**, 2000, High-field electrical transport in single-wall carbon nanotubes, *Phys. Rev. Lett.*, 84: 2941 p.
- Deo, R. P. and Wang, J.**, 2004, Electrochemical Detection of Carbohydrates at Carbon-Nanotube Modified Glassy-Carbon Electrodes, *Electrochem. Commun.*, 6: 284-287 pp.
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency)**, 2003, *Bacillus substilis* TSCA Section 5(h)(4) Exemption: Final Decision Document, <http://www.epa.gov>.
- Escher, B.I., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J. and McArdell, C.S.**, 2011, Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Res* 45: 75-92 pp.
- Fernando, K. A. S., Lin, Y. and Sun, Y. P.**, 2004, High aqueous solubility of functionalized single-walled carbon nanotubes, *Langmuir*, 20: 4777-4778 pp.
- Gospodinova, N., Mokreva, P. and Terlemezyan,** 1995 Oxidative polymerization of aniline: a new area in cationic polymerization, *Polymer* Volume 36: 3585-3587 pp.
- Huang, W., Humphrey B.D. and MacDiarmid A.G.**, 1986, Polyanilin, a novel conducting polymer. Morphology and chemistry of its oxidation and reduction in aqueous electrolytes *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 82*: 2385-2400 pp.
- Huang, W., Lin, Y., Taylor, S., Gaillard, J., Rao, A.M. and Sun, Y. P.**, 2002, Sonication Assisted Functionalization and Solubilization of Carbon Nanotubes, *Nano Lett.*, 2: 231-234 pp.
- Huber, M.M., Göbel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler, D., Mcardell, C.S., Ried, A., Siegrist, H., Ternes, T.A. and Gunten, U.V.**, 2005, Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: a pilot study, *Environ Sci Technol* 39: 4290-4299 pp.
- Jiang, Q., Xie D.Y., Fu G.G., Huang B., Zhao X.F. and Zhao Y.**, 2011, Effects of the CNT on the Preparation and Electrochemical Performances of the CNT / PANI Hollow Sphere Composite, *Materials Science Forum*, 687: 61-64 pp.
- Karube, I. and Nakanishi, K.**, 1994, Microbial biosensors for process and environmental control, *IEEE Eng. Med. Biol.*, 13: 364-374 pp.
- Kutanis, S., Karakışla, M., Akbulut U. and Saçak, M.**, 2007, The conductive polyaniline/poly(ethylene terephthalate) composite fabrics, *Composites: Part A*, 38: 609-614 ss.
- Langford, K.H. and Thomas, K.V.**, 2009, Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works, *Environ Int* 25: 766-770 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lee, E.**, 2006, An Integrated System of Microcantilever Arrays with Carbon Nanotube Tips or Imaging, Sensing, and 3D Nanomanipulation, Design and Control, Sens. Actuat. A, 134: 286-295 pp.
- Li, Q., Zhang, J., Yan, H., He, M. and Liu, Z.**, 2004, Thionine-Mediated Chemistry of Carbon Nanotubes, Carbon, 42: 287-291 pp.
- Lin, Y., Yantasee, W., Lu, F., Wang, J., Musameh, M., Tu, Y. and Ren, Z.**, 2004, Biosensors based on carbon nanotubes, Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, 1. Cilt: 425 p.
- Luo, X., Killard, A. J., Morrin, A. and Smyth, M. R.**, 2006, Enhancement of a conducting polymer-based biosensor using carbon nanotube-doped polyaniline, Anal. Chim. Acta, 575: 39-44 pp.
- Merkoçi, A., Pumera, M., Llopis, X., Perez, B., del Vale, M. and Alegret S.**, 2005, New Materials for Electrochemical Sensing VI: Carbon Nanotubes, TRAC Trend Anal. Chem., 24: 826-838 pp.
- Muis A.**, 2006, Biomass production and formulation of bacillus subtilis for biological control, indonesian journal of agricultural science 7: 51-56 pp.
- Nathalie, K.G., Gomez, N. and Schmidt C.E.**, 2007, Conducting polymers in biomedical engineering, Progress in Polymer Science, 32: 876-921 pp.
- Olad, F. and Ilghami, R.**, 2012, Surfactant-assisted synthesis of polyaniline nanofibres without shaking and stirring: effect of conditions on morphology and conductivity, Chemical Papers, 66: 757-764 pp.
- Paradise, M. and Goswami, T.**, 2007, Carbon Nanotubes-Production and Industrial Applications, Mater. Design, 28: 1477-1489 pp.
- Paradise, M. and Goswami, T.**, 2007, Carbon Nanotubes-Production and Industrial Applications, Mater. Design, 28, 1477-1489 pp.
- Penicaud, A., Poulin, P., Dere, A., Anglaret, E. and Petit, P.**, 2005, Spontaneous dissolution of a single-wall carbon nanotube salt, J. Am. Chem. Soc., 127: 8-9 pp.
- Pompeo, F. and Resasco, D. E.**, 2002, Water solubilization of singlewalled carbon nanotubes by functionalization with glucosamine, Nano Lett., 2: 369-373 pp.
- Solanki, P.R., Kaushik, A., Agrawal V.V. and Malhotra B.D.**, 2011, Nanostructured metal oxide-based biosensors, NPG Asia Mater., 3: 17-24 pp.
- Topal, C. O.**, 2007, From Synthesis to Self-Assembly Course, Fundamentals of Nanotechnology accessed in March 2011.
- Tsai, Y., Li, S. C. and Liao, S. W.**, 2006, Electrodeposition of Polypyrrole Multiwalled Carbon Nanotube – Glucose Oxidase Nanobiocomposite Film for the Detection of Glucose, Biosens. Bioelectron., 22: 495-500 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, J.**, 2005, Carbon Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review, *Electroanal.*, 17, 7-14 pp.
- Wang, J., Musameh, M. and Lin, Y.**, 2003, Solubilization of carbon nanotubes by nafion toward the preparation of amperometric biosensors, *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 2408–2409 pp.
- Wang, Y., Iqbal, Z. and Malhotra, S.V.**, 2005, Electrochemical nitration of single-wall carbon nanotubes, *Chemical Physics Letters*, 402: 96-101 pp.
- Willner, I., Willner B. and Katz E.**, 2007, Biomolecule-Nanoparticle Hybrid System for Bioelectronic Applications, *Bioelectrochem.*, 70: 2-11 pp.
- Yao, D. S., Cao, H., Wen, S., Liu, D. L., Bai, Y. and Zheng, W. J.**, 2006, A Novel Biosensor for Sterigmatocystin Constructed by Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWNT) Modified with Aflatoxin – Detoxifizyme (ADTZ), *Bioelectrochem.*, 68: 126-133 pp.
- Yao, Y. and Shiu, K. K.**, 2007, Electron Transfer Properties of Different Carbon Nanotube Materials and Their Use in Glucose Biosensors, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387: 303-309 pp.
- Yao, Z., Kane, C. L. and Dekker, C.**, 2000, High-Field Electrical Transport in Single-Wall Carbon Nanotubes, *Phys. Rev. Lett.*, 84: 2941-2944 pp.
- Yao, Z., Kane, C. L., Dekker, C.**, 2000, High-field electrical transport in single-wall carbon nanotubes, *Phys. Rev. Lett.*, 84: 2941-2944 pp.
- Younis, M. A., Hezayen, F. F., Nour-Eldein, M., and Shabeb, M. S.**, 2010, Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses, *American Eurasian Journal of Agricultural Environmental Science*, 7: 31-37 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı SOYADI: Ezgi BAYRAM

Doğum tarihi, yeri: 07.06.1989 – Gaziantep

Medeni hali: Bekar

Uyruğu: T.C

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

Tel: 05336146369

E-mail: byrmezgi@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Yüksek lisans (2012-2015): Ege Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı

Lisans (2007-2012): Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü

Lise (2003-2007): Ayvalık Anadolu Lisesi

Görev Aldığı Projeler

Tubitak 1001 Programı -Nanoteknolojik İmmobilizasyon Yöntemlerine Dayalı Yeni Mikrobiyal Biyosensör Sistemleri Geliştirilmesi Ve Katekolaminlerin Tayinine Adaptasyonu- proje bursiyeri (2013-2015).

Bilimsel Makaleler

Bayram, E. and Akyılmaz, E., 2013, A new pyruvate oxidase biosensor based on 3-mercaptopropionic acid/6-aminocaproic acid modified gold electrode, Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, Early Online: 1-5