

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ZnO NANOROD TEMELLİ PENİSİLİN BİYOSENSÖRÜ
HAZIRLANMASI**

ÇİSEM TURAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. EMİNE KARAKUŞ**

İSTANBUL, 2015

**T.CYILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ZnO NANOROD TEMELLİ PENİSİLİN BİYOSENSÖRÜ
HAZIRLANMASI**

Çisem Turan tarafından hazırlanan tez çalışması 23.11.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Emine KARAKUŞ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Emine KARAKUŞ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr Mesut KARAHAN
Üsküdar Üniversitesi

ÖNSÖZ

Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı Biyokimya Anabilim Dalındaki yüksek lisans eğitimim süresince bilgisi ve deneyimleriyle bana yardım eden ve yönlendiren, zamanını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Emine KARAKUŞ'a;

Tezimin hazırlanmasında laboratuvar olanaklarını kullanabilme fırsatını bana sunan Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı hocalarıma,

Deneyisel çalışmalarımda bana yardım eden arkadaşım Dilruba ALBAYRAK'a ve Çağla ATAN'a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan beni bugünlere getiren, maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan sevgili babam Osman TURAN'a ve annemc Süheyla TURAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kasım, 2015

Çisem TURAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	1
1.3 Hipotez.....	2
BÖLÜM 2	3
ENZİMLER	3
2.1 Enzimlerin Yapısı	4
2.2 Enzimlerin Sınıflandırılması.....	4
2.3 Enzimlerin Aktivitesine Etki Eden Faktörler.....	5
2.3.1 Sıcaklık	5
2.3.2 pH.....	5
2.3.3 Substrat Konsantrasyonu	5
2.4 Penisilinaz.....	6
BÖLÜM 3	7
ANTİBİYOTİKLER.....	7
3.1 Beta Laktam Antibiyotikler	7
3.1.1 Penisilinler	8

3.1.2 Sefalosporinler	12
3.2 Antibiyotik Tayinin Önemi	14
BÖLÜM 4	15
BİYOSENSÖRLER	15
4.1 Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu	17
4.1.1 Biyokomponentler	18
4.1.2 Transduserler (Dönüştürücüler)	19
4.1.3 Biyosensörlerde Analizlenebilecek Unsurlar	19
4.1.4 Biyosensörlerde Kullanılan Biyoaktif Yapılar	20
4.1.5 Biyosensörlerde Yararlanılan İletim ve Ölçüm Sistemleri	21
4.1.6 Biyosensör Çeşitleri	21
4.1.6.1 Elektrokimyasal Sensörler	22
4.1.6.2 Potansiyometrik Biyosensörler	22
4.1.6.3 Voltametrik Biyosensörler	22
4.1.6.4 Amperometrik Biyosensörler	22
4.1.6.5 Optik Sensörler	23
4.1.6.6 Termal Sensörler	23
4.1.6.7 Kütle Hassas Sensörler	24
4.1.7 Biyosensörlerin Uygulama Alanları	24
4.1.7.1 Gıda Sektöründe Biyosensör Kullanımı	25
4.1.7.2 Savunma Sektöründe Biyosensör Kullanımı	26
4.1.7.3 Çevresel Ölçümlerde Biyosensör Kullanımı	27
4.1.7.4 Tıbbi Alanda Biyosensör Kullanımı	27
4.1.8 Enzim Sensörleri	28
4.1.8.1 Enzim Sensörlerinin Sınıflandırılması	31
4.1.9 Enzim Elektrotlarında Performans Faktörleri	36
4.1.9.1 Kalibrasyon ve Duyarlılık	37
4.1.9.2 Kararlılık	37
4.1.9.3 Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı	38
4.1.9.4 Cevap Süresi	38
4.1.9.5 Seçicilik	39
4.1.9.6 Tekrarlanabilirlik	40
4.1.9.7 Sıcaklık	40
4.1.9.8 Tıbbi Uygulamalarda Kullanılacak Biyosensörler	40
4.1.10 Enzim İmmobilizasyonu	40
4.1.11 İmmobilizasyon Yöntemleri	41
4.1.11.1 Kovlent Bağlama	42
4.1.11.2 Tutuklama	44
4.1.11.3 Adsorpsiyon	45
4.1.11.4 Çarpaz Bağlama	45
4.1.12 Kitosan	47
BÖLÜM 5	49
NANOTEKNOLOJİ	49
5.1 Nanoyapıların Sentezlenme Yöntemleri	52
5.1.1 Fiziksel Buhar Çöktürme (PVD)	53
5.1.2 Kimyasal Buhar Çöktürme (CVD)	53

5.1.3 Sol- gel Yöntemi	54
5.2 Çinko Oksit'in Özellikleri	54
5.3 Çinko Oksit Nanorod Sentez Mekanizması.....	56
5.4 ZnO Nanorodların Sentez Metotları	57
5.4.1 Elektrokaplama Metodu	57
5.4.2 Buhar-Sıvı-Katı (VLS) Metodu	57
5.4.3 Kimyasal Banyo Kaplama (CBD) Metodu	57
5.4.4 Metal-Organik Kimyasal Buhar Kaplama (MOCVD).....	57
5.4.5 Sol-gel Metodu	58
5.4.6 Mikrodalga Isıtma Metodu	58
5.4.7 Hidrotermal Sentez Metodu	58
5.5 Penisilin Tayininde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış	60
5.5.1 Penisilinaz	60
5.5.2 Kitosan	60
5.5.3 Çinko Oksit Nanorod	60
BÖLÜM 6	61
MATERYAL VE METOD.....	61
6.1 Kullanılan Cihazlar	61
6.2 Kullanılan Numuneler.....	61
6.2.1 Gerçek Numune	61
6.3 Kullanılan Enzimler	61
6.4 Kullanılan Kimyasal Maddeler	62
6.5 Kullanılan Çözeltiler	62
6.5.1 0.1M Fosfat Tamponu Çözeltisi (pH 7.4).....	62
6.5.2 Penisilinaz Enzim Çözeltisi	62
6.5.3 Kitosan Çözeltisi.....	62
6.5.4 ZnO Nanorod/Kitosan Çözeltisi	63
6.5.5 Penisilinaz /Kitosan Çözeltisi	63
6.5.6 Penisilin Çözeltileri.....	63
6.5.7 Standart Katma Yöntemi ile Gerçek Numunede Penisilin Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	64
6.6 Penisilin Biyosensörleri	65
6.6.1 Penisilin Biyosensörlerinin Hazırlanması.....	65
6.6.2 Penisilin Biyosensörlerinin Çalışma Aralıklarının ve Eğimlerinin Belirlenmesi.....	68
6.6.3 Penisilin Biyosensörlerinin Performansına Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi.....	68
6.6.4 Penisilin Biyosensörlerinin Tekrarlanabilirliği.....	68
BÖLÜM 7	70
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	70
7.1 Penisilin Biyosensörünün Kalibrasyon Grafiği	71
7.2 Tampon Konsantrasyonunun Etkisi.....	72
7.3 pH'ın Etkisi.....	73
7.4 Sıcaklığın Etkisi	74
7.5 Girişim Etkisi	76
7.6 Karıştırma Hızının Etkisi	78

7.7 Cevap Süresi	78
7.8 Raf Ömrü ve Tekrarlanabilirlik	78
7.9 Enzim Kinetik Parmetrelerinin (Km ve Vmax değerleri) Belirlenmesi	80
7.10 Gerçek Numunelerde Pensilin Tayini	81
7.10.1 Ticari Farmasötik Formulasyonda Penisilin Tayini	81
BÖLÜM 8	83
SONUÇ	83
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	88

SİMGE LİSTESİ

%	Yüzde
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
⁰ C	Santigrat derece
cm	Santimetre
dL	Desilitre
g	Gram
Km	Michaelis Menten sabiti
L	Litre
Log	Logaritma
M	Molar
mg	Miligram
mM	Milimolar
mV	Milivolt
nA	Nanoamper
Rpm	Rounds per minute
s	Standart Sapma
U	Unite
Vmax	Maksimum hız
ΔmV	Milivolttaki değişim

KISALTMA LİSTESİ

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
BOD	Biyokimyasal Oksijen Sistemi
CS	Kitosan
CV	Siklik Voltametri
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
FIA	Flow Injection Analysis
GOD	Glukoz Oksidaz
HMT	Hekzametilen Tetramin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ISE	İyon Seçici Elektrot
ISFET	Ion Sensitive Field Effect Transistors
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MWNT	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
NW	Nanotel
PBP	Penisilin Bağlayıcı Proteinler
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Y.T.Ü	Yıldız Teknik Üniversitesi

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Penisilinazı aktif bölgesinden penisiline karşı direnç oluşturma.....	6
Şekil 3.1	Penisilin formülü.....	9
Şekil 4.1	Doğal ve en mükemmel biyosensorik sistemler.....	15
Şekil 4.2	Biyosensörün yapısı.....	17
Şekil 4.3	Biyosensörün genel çalışma mekanizması.....	18
Şekil 4.4	Bir enzimin sensörünün genel şematik gösterimi.....	29
Şekil 4.5	Bir biyosensör sisteminde bulunan bileşikler.....	30
Şekil 4.6	Enzim sensörünün genel çalışma ilkesi.....	30
Şekil 4.7	Potansiyometrik ölçüm sisteminin şematik olarak gösterimi.....	30
Şekil 4.8	Enzim molekülünün jel içinde veya polimer matrikste tutuklanması.....	44
Şekil 4.9	Enzim molekülünün elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu.....	45
Şekil 4.10	Enzim molekülünün film veya tabakaya çarpaz bağlanması.....	46
Şekil 4.11	Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri.....	46
Şekil 4.12	Kitosanın kimyasal yapısı.....	48
Şekil 5.1	Nanoteknolojinin kullanıldığı boyut aralığı.....	49
Şekil 5.2	Nanopartikül ve nanorodlarda elektron transferi.....	52
Şekil 5.3	Hekzagonal ZnO yapısı.....	55
Şekil 5.4	Si yüzey üzerinde VS metodu ile ZnO nanorodların mekanizması.....	56
Şekil 5.5	Kitosanın kimyasal yapısı.....	60
Şekil 6.1	Nanorodların SEM görüntüsü.....	66
Şekil 6.2	Biyosensör P'nin hazırlama şeması.....	67
Şekil 7.1	ZnO nanorod ve kitosan temelli, penisilinaz enzimi.....	70
Şekil 7.2	Biyosensör P'nin kalibrasyon grafiği.....	71
Şekil 7.3	Biyosensör P'nin eğiminin tampon konsantrasyonu ile değişimi.....	72
Şekil 7.4	Penisilin biyosensörünün eğiminin pH ile değişimi.....	74
Şekil 7.5	Penisilin biyosensörünün eğiminin sıcaklık ile değişimi.....	75
Şekil 7.6	Penisilin biyosensörünün raf ömrü grafiği.....	79
Şekil 7.7	Biyosensör P'nin penisilinaz için Lineweaver-Burk grafiği.....	81

ÇİZELGE

Sayfa

Çizelge 4.1	Biyosensörde tayin edilebilen maddeler.....	20
Çizelge 4.2	Biyosensörlerde kullanılabilen biyoaktif bileşenler	21
Çizelge 4.3	Biyosensörlerde kullanılan ölçüm sistemleri.....	21
Çizelge 4.4	Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz olanakları.....	25
Çizelge 4.5	Enzim sensörlerinin sınıflandırılması.....	32
Çizelge 4.6	Enzim immobilizasyonunda kullanılan maddelerde (taşıyıcı) bulunan reaktif gruplar ve reaksiyona girdikleri amino asitlerin fonksiyonel grupları	43
Çizelge 4.7	Enzimlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonunda bağ oluşumuna katılan aminoasitlerin reaktif grupları	44
Çizelge 5.1	ZnO'nin fiziksel özellikleri	55
Çizelge 6.1	Tez çalışmasında kullanılan penisilinaz enzimi hakkında bilgi	62
Çizelge 6.2	Penisilin kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması	64
Çizelge 6.3	Penisilin çözeltilerinin hazırlanması.....	65
Çizelge 7.1	25,0±1,0°C kitosan kullanılarak hazırlanmış biyosensörünün cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi	72
Çizelge 7.2	25,0±1,0°C'da Penisilin biyosensörünün cevabına pH'nın etkisi	73
Çizelge 7.3	Penisilin biyosensörünün cevabına sıcaklığın etkisi	75
Çizelge 7.4	Penisilin biyosensörünün bazı türlerin girişim oranları.....	77
Çizelge 7.5	Serumda penisilin tayini için penisilin ile elde edilen sonuçlar	82

ÖZET

ZnO NANOROD TEMELLİ PENİSİLİN BİYOSENSÖRÜ HAZIRLANMASI

Çisem TURAN

Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emine KARAKUŞ

Penisilin, “pensilin notatum” adlı mantarın ürettiği, bakteri öldürücü bir maddedir. Hastalık yapan bakterilerin hücre duvarını bozarak hastalığı önler. Nefrit, menenjit, prostat ve kemik iltihabı gibi çok sayıda hastalığı tedavi eder.

Tez çalışmasında, sentezlemiş olduğumuz yüzey bağımlı ve yüzey bağımsız ZnO nanorodlar ve kitosan kullanılması ile penisilinaz enziminin nanorod yüzeyine immobilizasyonu yapılarak potansiyometrik esaslı penisilin biyosensörü hazırlanmıştır.

Elde edilen biyosensörün optimum çalışma koşullarını belirlemek amacı ile tampon konsantrasyonu, tampon pH’sı ve ortam sıcaklığının elektrot cevabı üzerine etkileri incelenmiş, enzim elektrodunun raf ömrü, tekrarlanabilirliği, tayin aralığı belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, hazırlanan penisilin biyosensörü ile Alfoxil adlı ticari farmasötik formülasyonda penisilin tayini standart katma yöntemi ile yapılarak elde edilen sonuç referans değeri karşılaştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: Biyosensör, penisilin, penisilinaz, çinko oksit nanorod, potansiyometrik, kitosan, penisilin biyosensörü

ABSTRACT

PREPARATION OF PENICILLIN BIOSENSOR BASED ZnO NANOROD

Çisem TURAN

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

Penicillin is a group of antibiotics derived from *Penicillium* fungi. *Penicillium* antibiotics were among the first drugs to be effective against many previously serious diseases such as bacterial infections. It disrupts cells wall of this bacteria and prevents diseases such as nephritis, meningitis, prostate, osteitis.

In thesis study, potentiometric-based penicillin biosensor was prepared by immobilizing penicillinase on our synthesized surface dependent and surface independent ZnO nanorods surfaces and chitosan.

To determine the optimum working conditions of the biosensor; examined the effect of buffer concentration, buffer pH, and media temperature on the electrode response and determined shelf life, repeatability and interval of determination (designated range). Additionally, the penisilin assay in Alfoxil was also carried out with our prepared penisilin biosensör. The obtained results was compared refecence value.

Key words: Biosensor, penisilin, penicillinace, zinc oxide nanorod, chitosan, potentiometric, penicillin biosensor

YILDIZ TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

İnsan vücudunda antibiyotik ve diğer ilaç bileşenlerinin belirlenmesi ve izlenmesi insan sağlığı, analitik ve klinik kimya, veterinerlik, ilaç ve gıda sanayisi için büyük önem taşımaktadır. Penisilin konsantrasyonunu bilmek, insan vücudunda meydana gelen biyokimyasal ve fizyolojik reaksiyonlar bakımından önemlidir. Penisilin gibi antibiyotikleri belirlemek için mikrobiyotik, kromatografik, spektrofotometrik, florimetrik, elektrokimyasal gibi farklı teknikler vardır. Bunlar arasında elektrokimyasal esaslı penisilin biyosensörleri, hazırlanma maliyetinin düşük, seçiciliğinin yüksek ve uygulanabilirliğinin basit olması nedeniyle yaygın olarak çalışılmaktadır [1]. Bunlardan amperometrik esaslı penisilin biyosensörlerine literatürde daha fazla rastlanmış olmasına rağmen potansiyometrik esaslı penisilin biyosensörleri sayısı oldukça az olması nedeniyle tez çalışmamızın özgün olduğu ortaya çıkmaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada, ZnO nanorod temelli ve penisilinaz enzimin elektrostatik olarak immobilize edilmesi ile biyosensör hazırlanması amaçlanmıştır. Biyosensörlerin optimum çalışma koşullarını belirlemek amacı ile tampon konsantrasyonu, tampon pH'sı, enzim miktarı ve ortam sıcaklığının elektrot cevabı üzerine etkileri incelenerek, enzim elektrodun raf ömrü, tekrarlanabilirliği, duyarlılığı, tayin aralığı ve tayin sınırı belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, hazırlanan penisilin biyosensörü ile ticari olarak satılan penisilin içeren ilaç ile standart yöntem karşılaştırılması da amaç edilmiştir.

1.3 Hipotez

Tez çalışmamızda, elektriksel, optik, fiziksel ve fotokatalist özelliğinden dolayı bilim dünyasının ilgi odağı olan, biyoyumluluğu ve toksik olmaması nedeniyle de biyoteknolojik araştırmalarda tercih edilen ZnO nanorod kullanılarak hem elektriksel sinyalin daha iyi iletilmesi hem de penisilinaz enziminin elektrot yüzeyine immobilizasyonu sağlanmıştır. Ayrıca, yapılan bu yöntem kitosan ile geliştirilerek analitik özellikleri daha iyi olan bir penisilin biyosensörü geliştirilmiştir. Üretilen biyosensörün gerçek numude bozucu türlerin girişim etkisi olmaksızın uygulanabilirliğini gösterilmiştir.

BÖLÜM 2

ENZİMLER

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmada %100 ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç tutulduğunda bütün enzimler protein yapısındadır. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu temsil eder [2].

Enzimler protein yapısında oldukları için proteinlerin tüm özelliklerine sahiptirler. Enzimler büyük moleküllü olup kolodyum zarlarından geçemezler, ısı ile kolaylıkla denatüre olurlar ve ortamın asit veya alkali oluşuna karşı duyarlıdırlar. 0°C ile yaklaşık 40°C arasında sıcaklık yükselmesi, enzimin etki hızını artırır. Ancak bu sıcaklıkların üzerinde denatürasyon görülür [2,3].

Genel olarak enzimlerin özellikleri şu şekilde sıralanabilir;

1. Enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadır.
2. Aynı tür reaksiyonlar enzimler tarafından defalarca gerçekleştirilebilir.
3. Bir enzim daima bir çeşit veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizler.
4. Katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürürler.
5. Enzimler gerçekleşecek reaksiyonun çabuk dengeye ulaşmasını sağlarlar.
6. Enzimler canlı ortamda olduğu gibi cansız ortamda da görev yaparlar [4].

Canlıları oluşturan biyomoleküller kinetik yönden oldukça kararlıdırlar ve kendiliklerinden kolayca reaksiyon vermezler. Bu yüzden bir hücrede oluşabilecek olan tüm kimyasal tepkimeler enzimler aracılığıyla gerçekleştirilmektedir yani kendiliğinden

reaksiyonlar meydana gelmez. Enzimler protein yapısında olduğu ve DNA tarafından şifrelendiği için, bir hücredeki tüm olaylar DNA sayesinde düzenlenip, kontrol edilmektedir [2].

2.1 Enzimlerin Yapısı

Enzimler protein yapılı biyolojik katalizörlerdir. Enzimin protein yapısının yanında enzime aktiflik kazandıran gruplar vardır. Enzimin protein kısmına apoenzim, protein olmayan parçasına kofaktör denir. Apoenzim ve kofaktörün oluşturduğu aktif yapıya da haloenzim denir. Kofaktör arasında metal iyonları ve organik yapıda olan koenzimler yer alır. Sıklıkla karşılaşılan metal iyonları Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , koenzimler ise NAD^+ , FAD dır. Enzimler sadece bir substrata veya aynı fonksiyonlu grubu olan substrat serisine karşı etkindir. Enzim reaksiyonlarında yan ürünler meydana gelmez. Enzim molekülü büyük olmasına karşın, substrat enzim molekülünün her yerine değil aktif merkez denilen özel bir yerine bağlanır ve biyokimyasal reaksiyonlar burada meydana gelir. Aktif merkezde substratın birleşme yüzeyine uygun amino asit dizileri bulunmaktadır ve aktif merkez substratı bağlayarak bir enzim - substrat kompleksi meydana getirir, ardından oluşan kompleks ürüne dönüştükten sonra enzim üründen ayrılır [6].

2.2 Enzimlerin Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB), enzimleri katalizledikleri reaksiyon tipine göre altı ana sınıfa ayırır. Bu sınıflarda yer alan her enzim, EC olarak kısaltılmış ve dört rakamdan oluşan kod numarası ile karakterize edilmiştir. Enzimlerin altı ana sınıfı kısaca şöyledir;

1. Oksidoredüktazlar: Redoks reaksiyonlarını katalizlerler. Sistemik ismin oluşturulmasında “donör: akseptör oksidoredüktaz” şeklinde bir düzenleme yapılır.
2. Transferazlar: Metil, açıl, amino, glikozil yada fosfat gibi spesifik bir grubun bir maddeden diğerine transferini katalizleyen enzimlerdir. Sistemik ismin oluşturulmasında “donör: akseptör gruptransferaz” şeklinde bir düzenleme yapılır.
3. Hidrolazlar: C-O, C-N, C-C gibi bağların hidrolitik yıkımını katalizler. Sistemik ismin oluşturulmasında “substrat gruphidrolaz” şeklinde bir düzenleme yapılır.

4. Liyazlar: C-C, C-O, C-N gibi bağların eliminasyon yoluyla yıkımını katalizler. Sistematik ismin oluşturulmasında “substrat grupliyaz” şeklinde bir düzenleme yapılır.
5. İzomerazlar: İzomerazlar bir molekül içindeki geometrik yada yapısal yeniden düzenlenmeyi katalizlerler. Sistematik ismin oluşturulmasında “substrat grupizomeraz” şeklinde bir düzenleme yapılır [6].

2.3 Enzimlerin Aktivitesine Etki Eden Faktörler

2.3.1 Sıcaklık

Sıcaklık artışı bütün kimyasal reaksiyonlarda olduğu gibi enzim kataliz reaksiyonlarında artırıcı etki yapmaktadır. Ancak protein yapısındaki enzimlerin sıcaklık artışı denatürasyon olasılığında arttırır. Sıcaklığın etkisiyle oluşan denatürasyon, saflaştırılmış enzim çözeltilerini saflaştırılmamış enzim çözeltilerine kıyasla daha fazla etkilemektedir [7].

2.3.2 pH

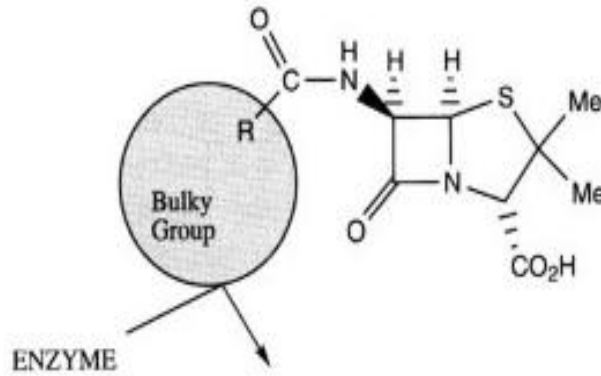
Enzimler pH değişimlerine duyarlıdır ve kendi optimum pH aralıklarında en büyük aktivite değerini gösterirler. pH etkisi enzimlerin yapılarındaki amino asitlerin ve substratların yapılarındaki iyonik kısımların değişmesinden kaynaklanır. Yüklerdeki bu değişiklikler substratın bağlanmasını ve reaksiyonun gerçekleşme oranını değiştirir. Farklı substratlarda enzim reaksiyonlarının optimum pH“ sı farklılık gösterebilir [7].

2.3.3 Substrat Konsantrasyonu

Bir enzimin aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonun etkisini inceleyen deneysel çalışmaların sonuçları tutarlılık gösterir. Düşük substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı azalırken, yüksek substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı artar. Yüksek substrat konsantrasyonlarında reaksiyon hızı belli bir süre sonra sabitlenmeye başlar ve sonunda aşağı yukarı sabit olur [7].

2.4 Penisilinaz

Penisilinaz enzimi, penisilin penisiloata hidrolizini katalizleyen, beta-laktamaz grubu bir enzimdir. Aktivitesi ilk defa 1940 yılında Abraham ve Chain tarafından gram negatif E.coli'den saptanmıştır. Moleküler ağırlığı yaklaşık 50 kilo Dalton'dur. Penisilinazlar beta-laktam grubu antibiyotikleri hidroliz eden ve bu antibiyotiklere direnç gelişimine neden olan enzimdir (Şekil 2.1) [8].



Şekil 2.1 Penisilinazın aktif bölgesinden penisiline karşı direnç oluşturma

Şekil 2.1'de penisilinler, penisilinazlara karşı sterik engel oluşturur. Sterik engel; hacimce büyük olan radikal grupların kiyasal tepkime hızına denir. Penisilinazlar bu engele karşı direnç oluştururlar.

Penisilinazlar, diğer beta-laktamaz grubu enzimler gibi bazı yaşamsal öneme sahiptirler. Beta-laktamazların en önemli özelliği mevcut antibiyotiklere direnç oluşturmalarından çok, mutasyonel değişiklikler ile her yeni beta-laktam antibiyotiğe karşı da direnç geliştirebilmeleri ve süratle yayılabilmeleridir [9].

ANTİBİYOTİKLER

Mantar ve diğer mikroorganizmalar tarafından üretilen mikroorganizmaların veya başka canlıların gelişmesini durduran ve öldüren doğal ya da kimyevi maddelere ‘antibiyotik’ denir.

Antibiyotikler tıpta kullanılan tüm ilaçlar içinde çok önemli bir yer tutar. Kullanıma girmelerinden günümüze kadar geçen sürede bu ilaçlar önemli gelişme göstermiş, aynı zamanda sırasında ve sonrasında ortaya çıkan sorunlar gündeme gelmiştir. Bu sorunların başında ise antibiyotiklere karşı gelişen bakteriyel direnç yer almaktadır.

Antibiyotikleri çeşitli kriterlere göre sınıflandırmak mümkündür. Antibiyotikler, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine, etki mekanizmalarına, kimyasal yapılarına ve farmokinetik özelliklerine göre olmak üzere çeşitli şekillerde sınıflandırılırlar [10].

3.1 Beta Laktam Antibiyotikler

Molekülünün antibakteriyel etkisinden sorumlu çekirdek kısmında b-laktam halkası içeren antibiyotiklere b-laktam antibiyotikler veya kısaca b-laktamlar denir. b-laktam halkası biri azot, üçü karbon olan 4 üyeli doymuş bir halkadır. b-laktam antibiyotiklerin beş grubu şunlardır:

1. Penisilinler
2. Sefalosporinler
3. Karbapenemler
4. Monobaktamlar
5. b-laktamaz inhibitörleri (klavamlar) [11].

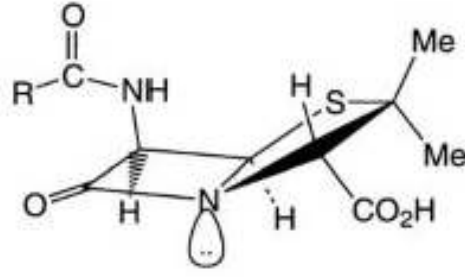
3.1.1 Penisilinler

1929 yılında Fleming bir petri kutusunda *Penicillium* kolonisinin çevresindeki *Staphylococcus aureus* kolonilerinin üremesinin durduğunu gözlemiş ve bu etkiyi penisilin adını verdiği maddenin yaptığını bildirmiştir. Elde edilen penisilin özellikle gram pozitif koklara etkili olduğu görülmüştür. Ancak kültür filtratındaki penisilin miktarı az ve dayanıksız olduğundan elde edilip tedavide kullanılmamıştır. 1940'da kChain ve arkadaşları penisilin dayanıklı aktif şeklini bol miktarda elde ederek tedavide kullanma yolunu açmışlardır. Penisilin kimyasal yapısında tiazolidin halkasına bağlı bir beta-laktam halkası bulunur. Beta laktam halka yapısının beta-laktamaz enzimi gibi etkilerle değişmesi sonucu penisilin biyolojik aktivitesi yok olur. Penisilin kimyasal yapısındaki yan zincirlerde değişimler olduğunda beta-laktamaza duyarlılığı, antibakteriyel spektrumu ve farmokolojik etkisinde farklar gösterdiği anlaşılmıştır.

Benzil ve veya diğer doğal penisilinlere birçok organizma türünden elde edilen amidafen etkisi ile 6-aminopenisilanik asit elde edilir. Başka yan zincirler ilavesi birçok yarı sentetik penisilin elde edilmiştir.

Penisilin tedavide kullanılmaya başlandığı 1940 yılından sonraki yirmi yılda bazı değişiklik yapıyla yeni penisilin bileşikler, sonraki yirmi yılı kapsayan 1960-1980 arasında ise birçok yeni penisilin elde edilmiştir. Ayrıca kimyasal yapısına penisiline benzerlik gösteren başka antibiyotikler de bulunmuştur.

Penisilinlerin kimyasal yapısında beta-laktam halkasına bağlı 5 üyeli bir tiazolidin halkasından oluşan 6-amino penisilanik asit çekirdeği bulunur [11].



Şekil 3.1 Penisilin Formülü

3.1.1.1 Penisilinlerin Sınıflandırılması

Penisilinleri gram pozitif ve gram bakterilere etkileri, gram pozitif ve gram negatif bakterilerinin meydana getirdiği beta-laktamazlara dayanıklılığı gözününe alınarak gruplamak mümkündür.

Her gruptan ağızdan veya parenteral yoldan kullanılan maddeler, kimyasal yapıları yakın (analog) maddeler, esterleri, kompleksleri gösterilmiştir. Bu maddelerin antibakteriyel spektrumları ana maddeye benzemektedir. Penisilinler dört gruba ayrılırlar:

1. Standart Penisilinler: Pensilin G, Penisilin V
2. Beta laktamaz oluşturan stafiloklara etkili olanlar: Metisilin, nafsilin, kloksasilin, flukloksasilin, oksasilin, dikloksasilin
3. Gram negatiflere etkili ve beta laktamazlarla harap olanlar: Aminopenisilinler, karboksipenisilinler, asilüredopenisilinler, amidinopenisilinler
4. Gram negatiflere etkili ve ve Gram negatif beta-laktamazlara dirençli olanlar: Temosilin [11].

3.1.1.2 Penisilin Biyosensörü ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Usman Ali ve arkadaşları 2011 yılında çinko oksit nanorodlar üzerine penisilinaz enzimini immobilize ederek potansiyometrik penisilin biyosensörü geliştirmiştir. Bu çalışmada; çinko oksit, düşük sıcaklıkta suda kimyasal büyüme yöntemi kullanılarak altın kaplı cam yüzey üzerinde büyütülmüştür. Penisilinaz iyi sıralanmış çinko oksit nanorodlar üzerine elektrostatik olarak immobilize edilmiştir. ZnO nanorodlar, N-5 azido 2 nitrobenziloksaksimad ile penisilinaz enzimi kullanılarak hareketsizleştirildi. Penisilin

biyosensörünün duyarlılığı, seçiciliği, stabilitesi ve tekrar üretilebilirliği incelenmiştir. Sensör 100 μM 'dan 10 mM'dan geniş logaritmik konsantrasyon aralığında potansiyometrik cevaba sahiptir. Bu araştırma sırasında yüksek duyarlılık yaklaşık olarak 121 mV/decade ölçüldü. Sensör cevabı Na^{+1} , K^{+1} , D-glukoz, L-glukoz, ürik asit, askorbik asit, üre, sakkaroz, laktoz, glisin, penisiloik asit, sefalosporin gibi girişim yapan maddelerin normal konsantrasyonlarında etkilenmemiştir [1].

Thust ve arkadaşları elektrolit/ yalıtkan/ yarı-iletken duyarlı olan Al /p-Si / SiO_2 / Si_3N_4 katman üzerinde penisiline duyarlı potansiyometrik biyosensör penisilinaz enzimi tarafından hareketsizleştirildi. İmmobilizasyon, heterofonksiyonel çarpaz bağlayıcı ile iki farklı aşamada yapıldı. İlk basamakta çarpaz bağlı molekülün amin fonksiyonel grubu Si_3N_4 yüzeyine doğrudan bağlandı. İkinci ise, çarpaz bağlı molekülün ikinci reaktif grupta enzime bağlandı. Bu prosedür, enzimin stabilitesini en az 250 gün devam etmesini sağlar. Duyarlılık, yaklaşık 60 mV ölçülmüştür [12].

Gonçalves ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmada, Penisilin G, altın elektrot ve tek tabakalı sistein kullanarak penisilinaz ile immobilize edildi. Ayrıca, başarılı şekilde, Michaelis-Menten enzim sabiti ile ölçüldü ve en alt sınır 4,5 nM'lik elde edildi [13].

Liu ve arkadaşları 1998 yılında, H^{+} iyonuna duyarlı olan transistör (H^{+} -ISFET) ve penisilin G asilaz geliştirildi. Penisilin G'nin farklı konsantrasyonlarda sensör cevap süresi 30 saniyedir. pH 7.0 ve 20 mM fosfat tampon ile doğrusal bir grafik elde edildi. Kalibrasyon eğrisinin aralığı 0.5 ile 8 mM oldu. 20 kere tekrarlanan yapılan deneylerde üç numune için varyasyon katsayıları %5'in altında idi. Sensörün stabilitesi 6 ay aşan bir süreyi buldu. 40 tane miktarı az ve çok olan penisilin konsantrasyonu, korelasyon testi için seçildi. Değerler HPLC yöntemi ile karşılaştırıldı. Korelasyon katsayısı (r) 0.9944, regresyon eşitliği $y = 1.034X - 2083.7$ olarak ölçüldü. Bu çalışmada, farklı ölçüm metodları karşılaştırıldı [14].

Leszczynska ve arkadaşları 1998 yılında, Penisilin G biyosensörü oluşturmak için pH-zar elektrot ile tridodesilamin kullanıldı. Tridodesilamin bir hidrojen iyon seçici iyonofor olarak kullanıldı. Elektrot enzimatik zar yüzeyine doğrudan penisilinazın kovalent bağlanmasıyla modifiye edildi. Biyosensörün yüksek hassasiyet ve tepki süresinin kısa olduğu FIA ile analiz edildi. FIA akıcı enjeksiyon analizidir. Datalar, her saat 30 örnekten alındı. FIA yöntemi, penisilin G tayini için başarı oldu. İnorganik, organik ve biyoorganik bileşikler ile hazırlanan çözeltini girişim etkisi olmadığı gözlemlendi. Biyosensör kullanımının en önemli avantajı; uzun ömürlü olması ve uzun sürede istikrar göstermesidir. Bu nedenle fermentasyon biyoproseslerinin yaklaşık iki ay içerisinde aynı biyosensör aracılığıyla kontrol edilebilecektir. Yüksek duyarlılık ve seçicilikten dolayı, gerçek biyoteknolojik örnekleri penisilin belirlenmesi için gösterilen method, resmi farmakolojik kaynaklarından önerilen yöntemlerle elde edilen veriler karşılaştırılabilir analitik sonuçlar verir [15].

Eppelsheim ve arkadaşları 1994 yılında, üreaz ve penisilinaz biyosensörleri farklı dönüştürücüler ile karşılaştırıldı. Örnek olarak; pH cam elektrotlar, makroskobik iyon seçici elektrotlar, kalın-ince dönüştürücülerdir. Bu sensörler için katı fazdaki dönüştürücülerin kullanımı, klasik referans elektrot olmaksızın potansiyel ölçümlerin olması son derece önemlidir. Bu çalışmalar gösteriyor ki; klasik referans elektrot olmadan ince film tabakalı sensörler onların farklı mod oluşturduklarını gösterdi. Bu durumun anlamı tek seçici elektrodun potansiyel değişiminden kaynaklanmadığı, analit konsantrasyonundan dolayı olduğu belirlendi. Bu ölçüm seçici olmayan bir elektrot referans ile değişmesinden değildir. Enzim sensörleri makroskobik dönüştürücüler ve klasik referans elektrotlar gösteriyor ki ince tabakalı sensörlerle karşılaştırıldığında aynı temel karakteristik özellikler gösterdi. Sensörlerin uzun vadeli stabilitesi yeterlidir. Üreaz ve penisilinaz kalın film sensörler oda sıcaklığında iki haftalık süre zarfında %50 ve % 75 olarak ilk yanıtı verildi [16].

Hassen ve arkadaşları 2007 yılında yaptıklarında çalışmada, penisilin biyosensörü ile çalışmışlardır. *Staphylococcus aureus* hastane enfeksiyonlarının en önde gelen nedenlerinden biridir ve penisiline karşı dirençli olduğu gözlenmektedir. B-laktamaz, penisilini hidroliz eder. Çalışma örnekleri hastalardan toplanmıştır. Bakterilerinin hızlı

yayılışı klinik olarak önemlidir. Fiziksel ve elektrokimyasal teknikler bu çalışmaya katkı sağlamışlardır. Bu makalede, halkalı voltametri ve impedans spektroskopisi teknikleri kullanılmıştır. Penisilin G, sülfür grubuyla birlikte altın elektrot ile immobilize edildi. Elektrottaki Penisilin G'nin dağılımını ve moleküler yapısını incelemek için mikroskop ve spektroskopisi kullanıldı. Biri dirençli ve biri duyarlı olmak üzere iki tane S.aureus türü bakteri, kuvars kristal mikrobalsan teknik ile gözlemlendi [17].

Wu ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları çalışmada penisilin biyosensörü, hematein, iyonik sıvılar ve penisilinaz kullanmışlardır. Penisilinaz, penisilini penisilinoik asite hidroliz eder, H^+ iyonu açığa çıkar. Hematein amperometrik olarak pH endükatörü olarak kullanılır. Penisilin, 1.25×10^{-13} ve 7.5×10^{-3} çalışma aralıklarında en iyi performans göstermiştir. Bu bilgilere ek olarak, hazırlanan biyosensör iyi özgünlük, yüksek duyarlılık, kabul edilebilir stabiliteye sahip olduğu gözlemlendi [18].

3.1.2 Sefalosporinler

Sefalosporinler, Cephalosporicum acremonium adı verilen mantardan elde edilmiştir. Yapısal ve işlevsel olarak penisilinlere çok benzemektedirler, bakterisid etkilidirler. Hücre duvarı sentezinde rolü olan PBP(penisilin bağlayıcı proteinler)'leri inhibe ederek otolitik enzimleri de aktive ederler. Sefalosporinler, bazı bakteriler tarafından üretilen beta-laktamaz enzimlerinin inaktive edici etkilerine karşı daha dayanıklıdır. Sefalosporinler birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü kuşak olarak isimlendirilir [19].

3.1.2.1 Birinci Kuşak Sefalosporinler

Bu gruptaki ilaçlardan cerrahide profilaksi için ilk tercih edilen sefazolindir. İntramüsküler ve intravenöz yoldan uygulanması sonrasında hastalar tarafından iyi tolere edilebilir. Yarılanma ömrünün uzun olması nedeniyle 8 saatte bir uygulanır ve tedavi maaliyetini düşürür. Sık kullanılmasının bir nedenide enjeksiyonun uygulandığı bölgede daha az ağrı oluşturur.

Bir başka birinci kuşak sefalosporin olan sefradin ise hem ağız yolu ile hem de parenteral olarak kullanılabilir.

Sefadroksil en uzun etkisi bulunan, oral olarak kullanılan sefalosporindir. Antibakteriyel spektrumunu diğerlerine göre nispeten azdır [19].

3.1.2.2 İkinci Kuşak Sefalosporinler

Birinci kuşağa göre daha uzun yarılanma süresine sahiptirler. Bundan dolayı dozaj intervalleri daha uzundur ve birçok yönden ekonomik avantaj sağlarlar. Mikst infeksiyonlarında, cerrahide profilaktik olarak ve obstetrik/jinekolojide sefoksitin yararlı bir ilaçtır. Ancak bazı gram negatif bakterilere sefotetan'dan daha az etkilidir [19].

3.1.2.3 Üçüncü Kuşak Sefalosporinler

B-laktamazlara daha dayanıklı olan bu ilaçlar Psödomas'lara ve diğer Gram negatif mikroorganizmalara daha etkili oldukları tespit edilmiştir. Bu grupta bulunan sefalosporinlerin bazıları B-laktamazları indüklerler ve multipl B-laktam rezistansı oluştururlar.

Hepsinin uygulanma şekli parenteraldır. Sefoperazon, seftazidim ve sefsulodin Psödomas'lara karşı etkilidirler. Sefotoksim, seftizoksim, seftriakson, moksalaktam, sefpirom, sefmenoksim gibi sefalosporinlerde bu gruba girmektedirler [19].

3.2 Antibiyotik Tayinin Önemi

Antibiyotikler günümüzde en sık kullanılan ilaçlardan biridir. Bu yüzden tüketimi bu kadar yüksek olan ilacın tayini çok önemli bir yer tutar. Bizim çalışmamızda da antibiyotiğin en çok kullanılan çeşidi olan pensilin kullanıldı. Aşağıda bugüne kadar yapılan çalışmaların sonuçlarına göre antibiyotik kullanımının önemi sayısal değerlerde de desteklenmiştir.

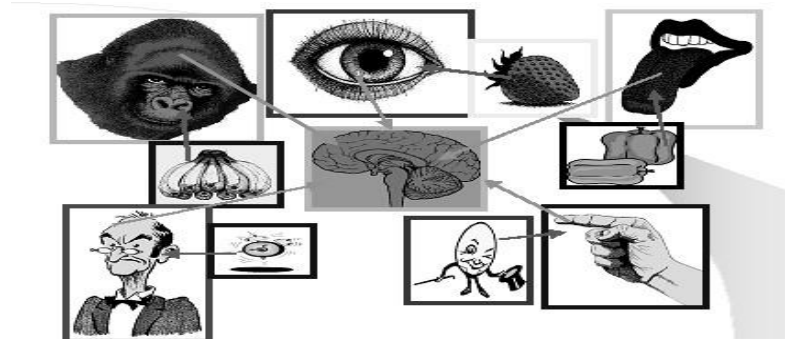
1. Antibiyotikler ABD’de kalp ilaçlarından sonra en sık kullanılan ilaçlardır.
2. Hastahane de yatan hastaların %25 ile % 40 arası antibiyotik kullanmaktadır.
3. Tüm ilaç tüketiminin %25’i antibiyotiklere aittir.
4. Yıllık yedi milyar dolar kazanç elde edilir [20].

BÖLÜM 4

BIYOSENSÖRLER

Biyosensörler, analiz edilecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu madde ile etkileşimi sonucu ortaya çıkardığı sinyalin, ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bu etkileşim ürünlerinin bir ölçüm sistemi ile ölçülmesi olarak tanımlanabilir. Daha genel bir ifade ile, bir biyosensör; biyolojik bir ajanla birleştirilmiş olan fiziko-kimyasal detektördür ve bu yapı istenilen ürünün analizi amacıyla kullanılmaktadır [21].

Son yıllarda bilim ve teknolojiadaki hızlı gelişmeler biyosensör kavram ve tanımlarında da önemli genişlemelere yol açmıştır. Canlı yaşamın önemli unsurlarından olan görme, işitme, koklama, tad alma, dokunma gibi algılama mekanizmaları doğal ve en mükemmel biyosensörik sistemler olarak düşündürüldükleri için biyosensör çalışmalarına güzel örnekler oluşturmaktadırlar.



Şekil 4.1 Doğal ve en mükemmel biyosensörik sistemler

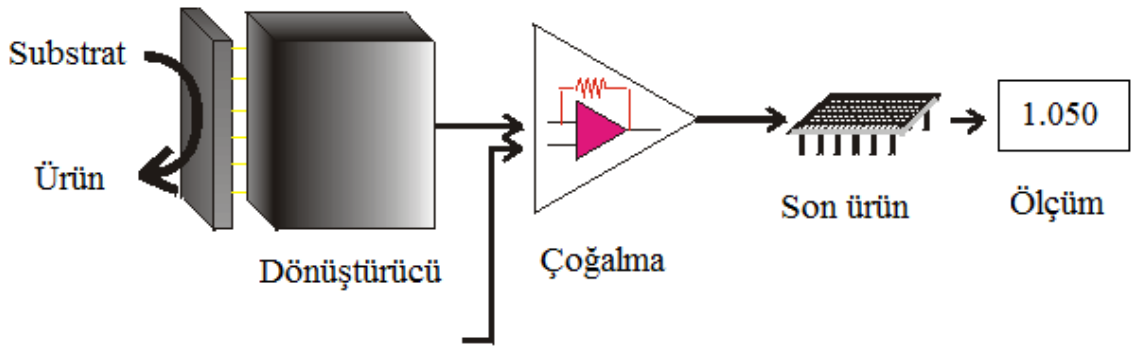
Günümüzde görme, işitme gibi yeteneklerini kaybetmiş kişilerin bu yeteneklerini tekrar yerine koyacak yapay sistemler üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Tıp alanındaki bilim adamlarıyla da ortak çalışmayı gerektiren bu araştırmalar da biyosensör alanına dahil edilebilirler. Bununla birlikte, bugün biyosensörlerden bahsedilince ilk akla gelen daha genel ve yaygın kullanım imkanı bulmuş, analiz amacına yönelik biyoanalitik sistemler olmaktadır [22].

Elektrokimyasal sensörler (elektrokimyasal algılayıcı sistemler) Analitik Kimya’da oldukça yaygın kullanımı olan cihazlardır. Bu cihazlara IUPAC tarafından getirilen tanım şu şekildedir: “Kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve konsantrasyona bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlara elektrokimyasal sensörler “denir. Bu sensörler, yapılarına enzim, hücre, doku, antikor, DNA, vb. biyolojik maddelerin eklenmesiyle biyosensör adını almışlardır. Nitel ve nicel analiz yapabilen biyosensörler, “biyo” (biyolojik kökenli) ve “sensör” (algılayıcı) kelimelerinden oluşmaktadır. Diğer bir tanım ise; “Biri biyokimyasal, diğeri ise elektrokimyasal özellikte, birbirini içine geçmiş iki çeviriciden oluşan algılayıcı cihaz” olabilir. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek onu tanımadır. Bu tanıma olayının sonucunda bir biyokimyasal ürün de oluşabilmektedir. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise; bu tanıma olayını okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmekle görevlidir [23].

Biyosensörlerin tarihi 50li yılların ortalarında L.C. Clark’ın Cincinnati hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O₂ miktarını bir elektrot ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında clark ve lyons glukozoksidaz (GOD) enzimini O₂ elektrodu ile konbine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başardılar. Böylece yeni bir analitik sistem oluştu. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifikliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrod) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur.



Bir biyolojik sıvıdaki glukoz ve çözünmüş oksijen elektrod etrafındaki membranı geçerek elektrod yüzeyine ulaştığında glukoz oksitlenerek glukonik aside dönüşür ve bu sırada O_2 harcanır. Ortamdaki glukoz bittiğinde O_2 tüketimi durur. O_2 elektrodu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözünmüş O_2 ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glukozun oksidasyonu için harcanan O_2 olup buradan biyolojik sıvıdaki glukoz miktarı hesaplanır. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalin de katılmasıyla diğer birçok maddenin tayini mümkündür. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine biyosensörler adı verilir [4]. Şekil 4.2’de biyosensörün en genel yapısı görülmektedir.



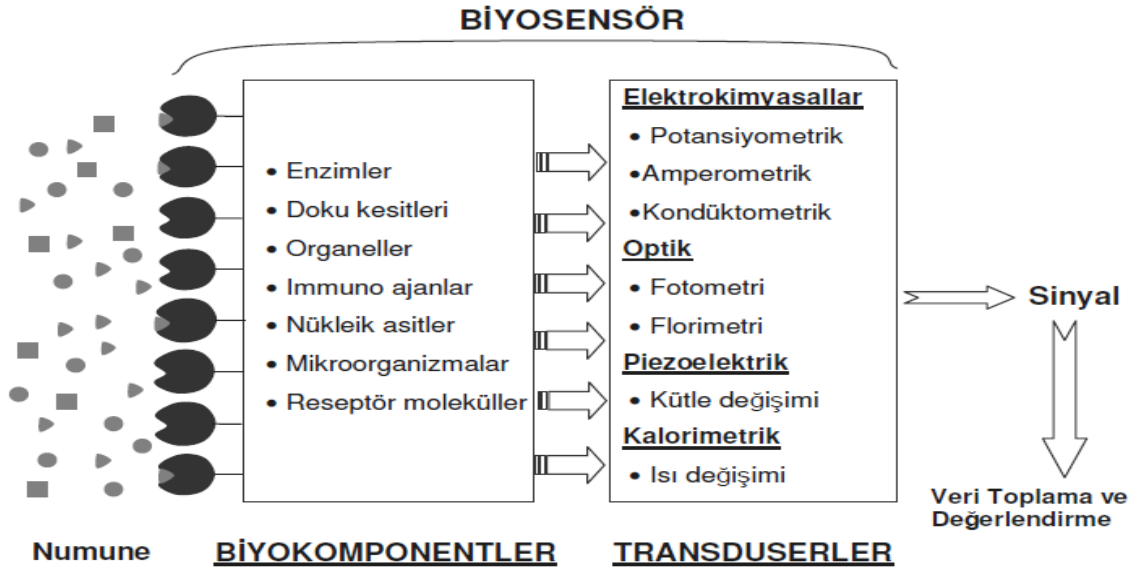
Şekil 4.2 Biyosensörün yapısı [21].

Biyosensörlerin yüksek spesifiklik yanında; renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir konsantrasyon aralığında doğrudan ölçüme olanak sağlamak gibi üstünlükleri vardır. Fakat reseptör olarak adlandırılan biyokomponentlerin pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenmesi biyosensörün kullanım ömrünü azalttığından bir dezavantajdır [24].

4.1 Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu

Bir biyosensör, biyolojik algılayıcı elementin seçiciliği ile hedef analitin konsantrasyonuyla orantılı olarak sinyal üreten transduserin (çevirici) kombinesinden oluşan bir cihazdır. Bu sinyal; proton konsantrasyonundaki değişimden, amonyak ve oksijen gibi gazların salınması ya da yükseltgenmesi, ışık emisyonu, absorpsiyon ya da reflektans, ısı emisyonu, kütle değişimi ve bunun gibi değişimlerden kaynaklanır. Sinyal, transduser yardımıyla akım, potansiyel, sıcaklık değişimi, ışığın absorpsiyonu, ya da elektrokimyasal, termal, optik olarak ya da piezoelektrik anlamda kütle artışıyla ölçülebilir forma dönüştürülür. Sinyal ayrıca ileriki analizler için güçlendirilebilir,

işlenebilir ya da depolanabilir. Prensipde herhangi bir reseptör; herhangi bir transduserle birleştirilip işleyen bir biyosensör üretilebilir. Biyosensörlerde, biyoaktif bileşenin tayin edilecek madde ile etkileştiğinde oluşan sinyalin iletim ve ölçümünde, genel olarak, elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ve kalorimetrik esaslı sistemler kullanılır. Şekil 4.3’de biyosensörlerin genel çalışma mekanizması görülmektedir [22].



Şekil 4.3 Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması

4.1.1 Biyokomponentler

Biyosensörlerin yapısında görev alan biyobilişenler (biyokomponentler) çoğu kez biyoreseptör olarak da adlandırılır. Biyobilişenler içinde en yaygın kullanılabilecek enzimler ve antikorlardır.

Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar ve nükleik asitler ve biyolojik membranlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler, sensörlerde biyobilişen (biyoreseptör) olarak kullanılırlar. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratarlar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler dönüştürücü tarafından algılanırlar. Yüksek spesifiklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan reseptörlerdir. Uygun bir enzimin bulunmaması veya enzimin kararsız olması ve birden çok sayıda maddenin tayini durumlarında hücre sistemleri ve tercihen mikroorganizmalar kullanılır.

Mikroorganizmalar değişik reseptör davranışları gösterirler ve biyolojik oksijen gereksinimi (BOİ) toksisite ve mutajenite testlerinde başarı ile kullanılmaktadırlar [22].

4.1.2 Transduserler (Dönüştürücüler)

Biyolojik ve biyokimyasal sinyalleri veya cevabı belirlenebilir sinyale dönüştürebilen sistemlere dönüştürücü denir. Bir substrat için analiz edilecek maddenin aktivesi O₂ tüketimiyle, H₂O₂ oluşumuyla, NADH konsantrasyonundaki değişimle, floresans, absorpsiyon, pH değişimiyle, iletkenlik, sıcaklık ya da kütledeki değişimle izlenebilmektedir.

Transduserler temelde dört grup altında toplanırlar;

1. Elektrokimyasal transduserler
 - Amperometrik
 - Potansiyometrik
 - Kondüktometrik
2. Optik transduserler
3. Kütle değişimini temel alan transduserler
4. Isı değişimi temel alan transduserler

4.1.3 Biyosensörlerde Analizlenebilecek Unsurlar

Analizlenecek madde ve yapılar genel olarak analit olarak adlandırılırlar. Biyosensörlerde tayin edilebilen maddeler örnekleriyle birlikte Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Biyosensörde tayin edilebilen maddeler [3]

Analizi Yapılan Maddeler	Örnekler
Amino asitler	Alanin, arginin, asporjin, aspartik asit, sistin, glutamin, glutamik asit, glutation, histidin, levsin, lizin, metionin, fenilalenin, sarkosin, serin, tayrosin, teitofan, valin
Gazlar	NH ₃ , H ₂ , CH ₄ , SO ₂ , NO
Kofaktörler	AMPT, ATP, NAD(P)H
Amidler ve aminler	Aminopirin, anilin, aromatik aminler, asetil kolin, kreatin, kreatinin, guanidin, guanosin, penisilin, spermin, ürik asit, üre, zantin
Karboksilik asitler	Asetik asit, formik asit, glukonik asit, izositrik asit, askorbik asit, laktik asit, malik asit, okzalik asit, pruvik asit, süksinik asit
Kompleks maddeler	Antibiotikler, mutojenler, vitaminler
İnorganik iyonlar	F ⁻ , NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₃ ⁻² , SO ₃ ⁻² , SO ₄ ⁻² , Hg ⁺² , Zn ⁺²

4.1.4 Biyosensörlerde Kullanılan Biyoaktif Yapılar

Biyosensörlerde kullanılan ve analizlenecek madde ile spesifik bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bileşenler, komplekslik hiyerarşisine göre basitten karmaşığa doğru bir sıralama yapıldığında, iyonoforlar, antikörler, enzimler, nükleik asitler, lipozomlar, biyomembranlar (örneğin; membran reseptörleri), hücre organelleri (örneğin; mitokondri), tüm hücreler, doku kesitleri ve homojenatları ve organlar (örneğin; koku alma organı) olarak sınıflandırılabilirler [27]. (Çizelge 4.2)

Çizelge 4.2 Biyosensörlerde kullanılabilen biyoaktif bileşenler

Biyoaktif Tabaka Bileşenleri		
Organlar (Örneğin; koku alma organı)		Doku Kesitleri Tüm Hücreler
	Hücre Organalleri (Örneğin; mitokondri)	
Biyomembranlar (Örneğin; resptör)		Lipozomlar Nükleik Asitler
	Enzimler	
Antikorlar		İyonoforlar

4.1.5 Biyosensörlerde Yararlanılan İletim ve Ölçüm Sistemleri

Biyosensörlerde, biyoaktif bileşenin tayin edilecek madde ile etkileştiğinde oluşan sinyalin iletim ve ölçümünde, genel olarak, elektrokimyasal, optik, kalorimetrik ve piezoelektrik esaslı sistemler kullanılır [27].

Çizelge 4.3 Biyosensörlerde kullanılan ölçüm sistemleri

İletim ve Ölçüm Sistemleri	
<u>Elektrokimyasal Esaslı</u> Amperometri Esaslı (Elektrotlar) Potansiyometri Esaslı (Elektrotlar) Yarı İletken Esaslı (Transistörler)	<u>Kalorimetri Esaslı</u> (Termistörler)
<u>Optik Esaslı</u> Fotometri Esaslı (Optik Lifler) Fluorometri Esaslı (Optik Lifler) Biyoluminesans Esaslı (Optik Lifler)	<u>Piezoelektrik Esaslı</u> (Piezoelektrik Kristaller)

4.1.6 Biyosensör Çeşitleri

4.1.6.1 Elektrokimyasal Sensörler

Bu başlık altında en yaygın olarak potansiyometrik, amperometrik, voltametrik ve alan etkili biyosensörlere rastlanmaktadır [28].

4.1.6.2 Potansiyometrik Biyosensörler

Potansiyometri, bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas almaktadır ve belirlenen elektrot potansiyeli doğrudan analit derişimini tanımlamaktadır. Potansiyometrik sensörlerin düşük hassasiyet, spesifik olmayan etkileşimlere ait ve aletsel sinyal alınması gibi büyük problemleri vardır. Özellikle sinyal/gürültü oranı analitik problemlere sebep olabilmektedir [28].

4.1.6.3 Voltametrik Biyosensörler

Mikrobiyolojik reaksiyonlar, genellikle iletkenlik ve kapasitansta artma, empedansta azalmaya sebep olmaktadır. Buna dayanarak rezistans, kapasitans, iletkenlik ya da empedanstaki değişimin ölçümünü esas alan sensörler bu grupta yer almaktadır. Klinik örneklerdeki bakteri tespitinde, spesifik patojen tespitinde, endüstriyel mikrobiyal proses kontrolünde bu sensörlerden faydalanılmaktadır. Modern elektroanalitik sistemler oldukça düşük tespit limitlerine sahip olup (10^{-9}) küçük hacimde örneklerin kullanılmasına (1-2µl) olanak tanımaktadır. Bununla birlikte elektrot sistemi ölçüm ortamından sürekli alınan sinyalin (online) takibine izin verir. Elektrokimyasal analiz için gereken malzeme, diğer analitik metotlarla karşılaştırıldığında çok daha ucuz ve basittir. Ayrıca elektrokimyasal sensörler optik esaslı sensörlere göre de bulanık ortamda çalışabilme, karşılaştırılabilir enstrümental duyarlılık, minyatürleşmeye uygunluk gibi avantajlara sahiptir [28].

4.1.6.4 Amperometrik Biyosensörler

Genel anlamda amperometri, bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü esasına dayanır. Amperometrik biyosensörlerde akım şiddeti, çalışma elektrotunda yükseltgenen veya indirgenen elektroaktif türlerin derişiminin bir fonksiyonudur. Referans elektrot olarak

görev yapan ikinci bir elektrot vasıtasıyla akım şiddetinden analiz edilecek türlerin derişimlerinin belirlenmesinde yararlanılır. Elektrokimyasal reaksiyonlarda çoğu analitlerin redoks eşı olarak hareket edememesinden dolayı direkt olarak analiz edilebilecek az miktarda uygulama vardır. Bu yüzden algılayıcı elektrot üzerinde analitin elektrokimyasal reaksiyonu için elektrokimyasal aktif etiketler (direkt veya enzimatik reaksiyon sonucu ürün olarak) gereklidir. Oksijen ve H₂O₂ elektrotlar en popüler olanlarıdır [28].

4.1.6.5 Optik Sensörler

Optik çeviricilerin kullanıldığı durumda iki genel sınıf vardır. Birincisinde, ışığın iletimindeki değişimin ölçülmesi, ikincisinde ise floresansın ölçülmesi söz konusudur. Işığın iletimindeki değişimin ölçülmesine dayalı, optik esaslı sensörlerde, ölçüm sistemi, madde derişimine bağlı olarak absorbans veya luminesansta değişim gösteren bir boya içerir veya CO₂, O₂ veya pH değişimi gibi bir fizikokimyasal özellikten faydalanılır. Bu sensörlerde en önemli etken fiber boyunca ışık iletiminin etkinliğidir. İkinci sınıf, fiberin kendi özelliklerindeki (intrensek) değişimleri kapsar ve arka alan (evanescent) biyosensörler ve yüzey plazmon rezonans biyosensörler olarak iki gruba ayrılır [28].

4.1.6.6 Termal Sensörler

Temel prensipleri; bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanılarak substrat derişiminin belirlenmesine dayanır. Bütün biyolojik reaksiyonlar ekzotermiktir. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır. Sıcaklık değişimleri termal olarak yalıtılmış ortamdaki termistörler veya termofiller aracılığıyla izlenir. Kullanılan termistörler çok küçük sıcaklık değişimlerine bile duyarlıdır. Dolayısıyla çok düşük miktardaki substrat derişiminin ölçümüne (10⁻⁵M) olanak tanır [28].

4.1.6.7 Kütle Duyarlı Sensörler

Çevirici olarak piezoelektrik kristallerin kullanıldığı kütle hassas biyosensörler, rezonans frekanstaki değişime dayanarak santimetre-karede nanogram seviyesinde kütle değişimini ölçebilen ve bu yüzden de antikor-antijen etkileşimlerinde sıkça kullanılan

biyosensörlerdir. Kütle hassas biyosensörlerin çalışma prensibi piezoelektrik etkiye dayanır [28].

4.1.7 Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Biyosensörler tıp, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle otomasyon, kalite kontrolü, durum tespit ve enerji saklanması çok önemli rol oynarlar. Bugüne kadar 180’den fazla farklı madde için biyosensör hazırlanmış olup bunlardan ancak 25 kadarı ticari olarak üretilmektedir. Biyosensörler için mümkün uygulama alanları şunlardır:

- Klinik diyagnostik, biyomedikal sektör
- Proses kontrolü:
 - Biyoreaktör kontrol ve analitiği
 - Gıda üretim ve analizi
- Tarla tarımı, bağ - bahçe tarımı ve veterinerlik
- Bakteriyal ve viral diyagnostik
- İlaç analizi
- Endüstriyel atık su kontrolü
- Çevre koruma ve kirlilik kontrolü
- Maden işletmelerinde toksik gaz analizleri
- Askeri uygulamalar

Biyosensörler; gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler, bazı organik bileşikler yanında enzimler, virüsler ve mikroorganizmaların tayininde kullanılırlar. Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları Çizelge 4.4’te gösterilmektedir [22].

Çizelge 4.4 Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz olanakları

Biyosensör grubu	Kapsadığı analiz alanı
Enzim Sensörleri	Küçük moleküllü organik ve anorganik maddeler (ilaçlar, gıda maddeleri, vitaminler, antibiyotikler, pestisitler
Mikrobiyal Sensörler	Enzim sensörlerinin kullanıldığı alanlar, biyolojik O ₂ gereksinimi, toksisite, mutajenite.
DNA-Sensörleri	Virüsler, patojen mikroorganizmalar
İmmünoensörler	Virüsler, patojen mikroorganizmalar, ksenobiyotikler

4.1.7.1 Gıda Sektöründe Biyosensör Kullanımı

Gıdalara yönelik kantitatif analizler başlıca kalite ve güvenlik konularına açıklık getirmeyi hedef alır. Renk, aroma, vitamin ve kimyasal miktarlarının yanında zararlı mikroorganizmaların, toksinlerin, alerjenlerin gıdaya etkisine dikkat edilmelidir. Biyosensörler, gıda analizlerinde besinin doğal bileşenlerinin, ortama karışan maddelerin izin verilen sınırlar içinde olup olmadığının belirlenmesinde büyük önem taşır. Gıda analizlerinde doğal örneklerin, hammadelerin, işlem basamaklarının, mamül ürünlerinin, taşıma adımlarında doğal bileşenlerin bozumu, mikrobiyal kontaminasyon ve bunu önlemek için kullanılan katkı maddelerinin tayini önemlidir. Bunların tayinlerinde HPLC ve gaz kromatografisi duyarlı analiz imkanı sağlamasına rağmen bunlar çok masraflı yöntemlerdir. İmmünoassay teknikleri ise zaman alıcı olmaları, ölçüm sistemiyle doğrudan bağlantılı olmamaları ve laboratuvar ortamı gereksinimlerinden dolayı gıda sektöründe kullanışlı değildirler. Bu olumsuzlukların yanında, biyosensör teknolojisi, gıda analizlerinde büyük alternatifler sağlamaktadır. Ancak gıda sektörü için, ticari olarak pazarlanabilir biyosensörlerin sayısı çok azdır. Bunlar, glukoz, L-laktat, galaktoz ve alkol tayinine yönelik biyosensörlerdir.

Şekerlerin meyve ve sebzelerde, süt ve bal gibi ürünlerde, kola, şarap, meyve sularında üretim ve fermentasyon işlemlerini tayinleri önemlidir. Bu işlemlerin, duyarlı, pratik, ekonomik ve kısa sürede gerçekleşmesi için çeşitli biyosensörler geliştirilmiştir. Bu biyosensörlerin büyük kısmı, hidrojen peroksit veya oksijen duyarlı amperometrik sensörleri esas alan enzim elektrotlarıdır.

Pestisit atıklarının belirlenmesinde özellikle organofosfat pestisitlerinin inhibitör olarak etki ettiği asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimlerinin immobilizasyonu ile hazırlanan biyosensörlerden yararlanılır.

Gıdalarda tazelik kontrolü, meyvelerde alkol; yağlarda aldehit ve balıklarda histamin tayiniyle yapılır. Gıdalarda alkol tayini, alkollü içeceklerin olgunlaşma işlemlerinin izlenmesi ile önem kazanır. Alkol tayininde daha çok alkol oksidaz immobilize edilmiş amperometrik esaslı enzim sensörleri kullanılır.

4.1.7.2 Savunma Sektöründe Biyosensör Kullanımı

Kimyasal ve biyolojik silahlar, insan yaşamına yanlış yansıyan uygulamalardan biridir. Çok sıkı denetim altında olmalarına rağmen kimyasal ve biyolojik silahların tehlikeleri her zaman sürmektedir. Sentetik kimyasallar, bitki, hayvan ve mikroorganizma kaynaklı toksinler, bakteri ve virüsler biyolojik silahların ana materyalleridir.

Kimyasal silahların toksik kimyasal reaktifleri; organofosfor ve siyanür türevleridir. Organofosfor bileşikleri asetilkolinesteraz inhibisyonu ile etki ederler ve bu yüzden “sinir gazı” olarak adlandırılırlar. Temel sensör olarak bir pH elektrodunun kullanılan sistemlerde asetilkolinesteraz immobilize edilir. Bu biyosensörlerde organofosfor bileşiklerinin konsantrasyonu ile orantılı inhibisyonu izlenir ve sonuca ulaşılır. Hidrojen siyanür ve siyanogen klorür; toksik kimyasalların diğer önemli bir grubunu oluştururlar. Bunlar solunum zincirinde sitokrom oksidazla tepkimeye girerek işlevlerini gerçekleştirirler. Bu ilke temel alınarak, siyanür tayinine yönelik amperometrik esaslı modifiye altın elektrotu geliştirilmiştir.

Biyolojik silahların temelini, canlılarda hastalık ve ölüme yol açabilecek bakteri, virüs ve mantarlar oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar yüzeylerinde önemli düzeyde antijenik determinantlara sahiptir. Bu özellik, mikroorganizma tayinine yönelik biyosensör hazırlanmasında immunojenik ilkeleri ön plana çıkarmaktadır.

4.1.7.3 Çevresel Ölçümlerde Biyosensör Kullanımı

Çevresel ölçümler insan sağlığı ve ekosistemin korunması açısından önemlidir. Hava, su, toprak kirliliği ölçümleri, endüstriyel ve tarımsal atık kontrolü ve arıtma etkinliğinin saptanması gibi alanlarda kullanılırlar.

Biyosensör hazırlanmasında, aktif biyolojik materyalin, kararlılığını koruyarak immobilize edilmesi gerekir. Bu nedenle genellikler jelde tutuklama yöntemi kullanılır. Biyomateryal olarak, uzun yaşam süreleri, ucuz ve kararlı olmaları, pH ve sıcaklık gibi dış etkenleri tolere etme özelliklerinden dolayı mikroorganizmalar; enzimlere ve antikorlara göre daha kullanışlıdır.

Biyokimyasal oksijen istemi (BOD) atık sularda organik kirliliğin ölçüsüdür ve ölçüm genellikle 5 gün sürmektedir. BOD sensörleri genellikle oksijen elektrodu yüzeyinde tutturulmuş immobilize mikroorganizma membranından oluşur. Kirlilik kaynağı emüsyon derecelerinin ve atmosfer kirliliğinin ölçümü için, mikrobiyal esaslı CO₂, NO₂, NH₃, CH₄, SO₂ gibi gaz temelli birçok biyosensör geliştirilmiştir. Sensör üzerine enzim immobilizasyonu ile sürekli bir ölçüm sistemi oluşturabilir ve çevresel numunelerde toksik madde tayini yapılabilir.

4.1.7.4 Tıbbi Alanda Biyosensör Kullanımı

Biyosensörlerin tıbbi analitik sistemlere üstün gelmesinin nedeni, spesifik bir metabolitin veya tedavide kullanılan ilacın miktarının kısa bir sürede tayin edilebilmesidir. Kısa süreli tayin gerektiren bazı hastalıklar;

- Yoğun bakım ünitelerinde ve cerrahi girişimlerde hızlı doz ayarlamak için ilacın kan konsantrasyonunun hızlı tespiti
- Prematüre çocukların bakım ve takibi
- İmplant problemlerinin yerleştirilmesi sırasında, ilacın kanda uzun süreli konsantrasyonunun tayini
- Hemodiyaliz

- Yapay pankreas
- Canlıya transplante edilmeden organların canlılığını korumak ve işlevlerini değerlendirmek üzere organın prezervasyonu

Enzim ve elektrot yüzeyi arasında elektrotların gidiş gelişini sağlayan elektron transfer mediatörlerin kullanılmasıyla enzimatik redoks işlevini elektrotla birleştiren yaklaşım en başarılı enzim elektrotlardır. Mediatörler, oksijenden daha kolay redüklenabilen bileşiklerdir. Bunlar oksijenden bağımsız olarak çalışma imkanı sunarlar ve numune çözeltisinde çözünür halde ve elektrot yüzeyinde immobilize edilerek bulunabilirler.

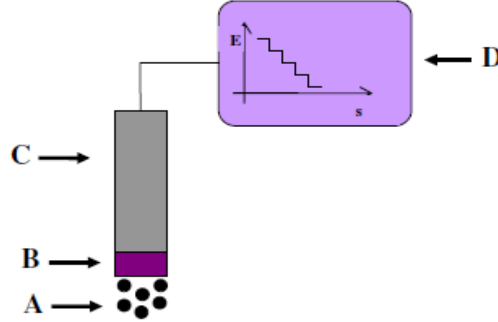
Günümüzde en başarılı mediatörle birlikte kullanılan enzim elektrodu, diyabet teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayinini mümkün kılan amperometrik glukoz biyosensörüdür. Glukoz biyosensöründe, bir biyolojik sıvıdaki glukoz ve çözünmüş oksijen, elektrod etrafındaki membranı geçerek elektrod yüzeyine ulaştığında glukoz oksitlenerek glukonik aside dönüşür ve bu sırada O_2 harcanır. Ortamdaki glukoz bittiğinde O_2 tüketimi durur. O_2 elektrodu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözünmüş O_2 ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glukozun oksidasyonu için harcanan O_2 olup buradan biyolojik sıvıdaki glukoz miktarı hesaplanır.

İnsan vücuduna yerleştirilen biyosensörler sayesinde, biyolojik sıvılar vücut dışına alınmadan ve tüketilmeden analiz edilebilmektedir. In vivo ölçümlerde, beyin veya diğer dokularda sürekli analiz ve izleme yapılabilen, enzimlerin değiştirilebildiği ve bu sayede farklı maddelerin de analizine imkan veren iğne tip mikrodializ biyosensörleri de son yılların ilginç örneklerindendir. İlaçların, vücuttaki düzeylerinin ayarlanması, kötü amaçla kullanımının engellenmesi ve uyuşturucu ile mücadele için biyosensör çalışmaları yapılmaktadır.

4.1.8 Enzim Sensörleri

En genel anlamda bakıldığında bir enzim sensörü, iletici, ince bir enzim tabakası ve ölçüm kombinasyonundan oluşmaktadır. Diğer biyosensörlerden tek fark biyoaktif

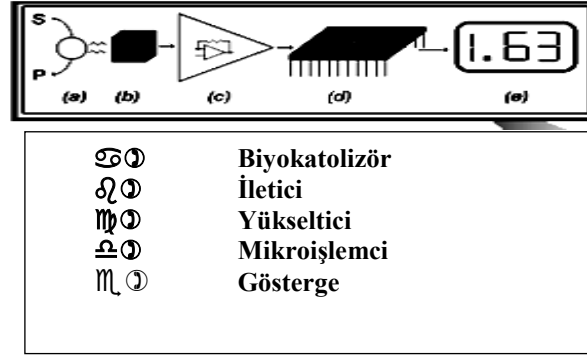
tabakada biyomolekül olarak enzimler bulunmaktadır. Şekil 4.4'te bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi verilmektedir.



Şekil 4.4 Bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi (A : Analizlenecek madde, B : immobilize enzim tabakası, C : iletici ve D : Ölçüm sistemi).

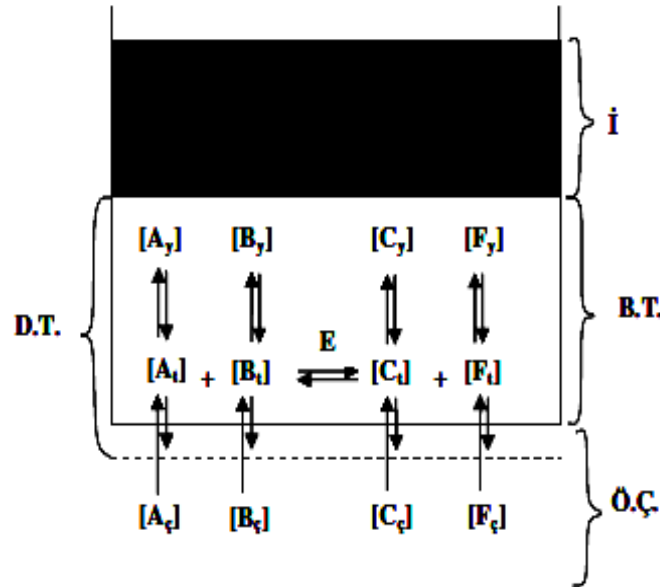
Bir enzim elektrodunda enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği tepkimeye uygun bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir iletici ile birleştirilmektedir. İletim sistemi biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan ürünün miktarındaki artışı tespit edebilecek şekilde seçilmelidir. Biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka iletici ara yüzeyindeki derişimlerin hızlı bir şekilde dengeye ulaşabilmesi için difüzyon engelini en aza indirmek amacıyla biyoaktif tabaka kalınlığının mümkün olduğunca ince olması gerekmektedir. Bunun yanı sıra biyoaktif tabakada sabit bir substrat derişimi sağlayabilmek için ölçme çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması gerekmektedir. İletici sistemin ölçme sistemine gönderdiği sinyal biyoaktif tabaka ile iletici ara yüzeyindeki derişimlerdeki değişikliğe bağlıdır. Ancak söz konusu derişimler denge halinde ölçme çözeltisindeki derişimlerle orantılı olduğu için çoğu zaman kalibrasyon grafiği çizilerek sonuca varılır [29].

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi sistemin özelliğine bağlı olarak yükseltici, mikroişlemci, dijital görüntüleyici gibi kısımlar sistem içinde yer alabilirler.



Şekil 4.5 Bir biyosensör sisteminde bulunan bileşenler.

Bir enzim sensörünün çalışma ilkesi, enzim veya enzimlerin immobilize edilmiş olduğu biyoaktif tabakadaki olayların biraz daha yakından incelenmesiyle daha kolay anlaşılabilir. Şekil 4.6' da biyoaktif tabakada gerçekleşen olaylar açısından bir enzim sensörünün genel çalışma ilkesi özetlenmiştir [29]



Şekil 4.6 Enzim sensörünün genel çalışma ilkesi (A: Substrat, B: Kosubstrat veya Koenzim, C ve F: Ürünler, ç: Ölçüm çözeltisi içindeki, t: Biyoaktif tabakadaki ve y: Elektrot yüzeyindeki konsantrasyonlar; D.T.: Difüzyon tabakası, Ö.Ç.: Ölçüm çözeltisi, B.T.: Biyoaktif tabaka, İ: iletici).

Şekil 4.6'dan da görüldüğü gibi bir enzim elektrodunda enzimi içeren biyoaktif tabaka, enzimin katalizlediği reaksiyona uygun bir iletim ve ölçüm sisteminin uzantısı olan bir iletici ile birleştirilmektedir. İletim sistemi, biyoaktif tabakada gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonucu substrat, kosubstrat (veya koenzim) konsantrasyonundaki azalış ya da ürün konsantrasyonundaki artışı tespit edebilecek şekilde seçilebilir. Konsantrasyonların hızlı bir şekilde dengeye ulaşabilmesi için difüzyonu azaltmak amacıyla biyoaktif tabaka kalınlığının mümkün olduğunca ince olması gerekmektedir. Bunun yanısıra biyoaktif tabakada sabit bir substrat konsantrasyonu sağlayabilmek için ölçüm çözeltisinin yeterli bir şekilde karıştırılması da gerekmektedir. Doğal olarak tayin edilecek türlerin ölçüm çözeltisindeki, biyoaktif tabakadaki ve biyoaktif tabaka-iletici ara yüzeyindeki konsantrasyonları farklı olur. İletici sistemin ölçeceği sinyal biyoaktif tabaka-iletici ara yüzeyindeki konsantrasyonlara ilişkindir.

4.1.8.1 Enzim Sensörlerinin Sınıflandırılması

Enzim sensörlerinin sınıflandırılması genel olarak, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sinyalin belirlenme ilkesine göre yapılmaktadır. Bu çerçevede Çizelge 3.5'te söz konusu sınıflandırma özetlenmektedir [29].

1.Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensörleri

Amperometrik esaslı enzim sensörleri

- Birinci nesil amperometrik enzim elektrodları
- İkinci nesil amperometrik enzim elektrodları
- Üçüncü nesil amperometrik enzim elektrodları

Potansiyometrik enzim sensörleri

- Proton duyar potansiyometrik enzim elektrodları
- Amonyum duyar potansiyometrik enzim elektrodları
- Karbondioksit duyar potansiyometrik enzim elektrodları
- Diğer iyon duyar potansiyometrik enzim elektrodları

Yarı iletkenleri esas alan enzim sensörler

- Enzim alan etki transistörleri (ENFET)

2. Optik esaslı enzim sensörleri

- Absorpsiyon esaslı optik enzim sensörleri
- Flouresans esaslı optik enzim sensörleri
- Biyolüminesans esaslı optik enzim sensörleri

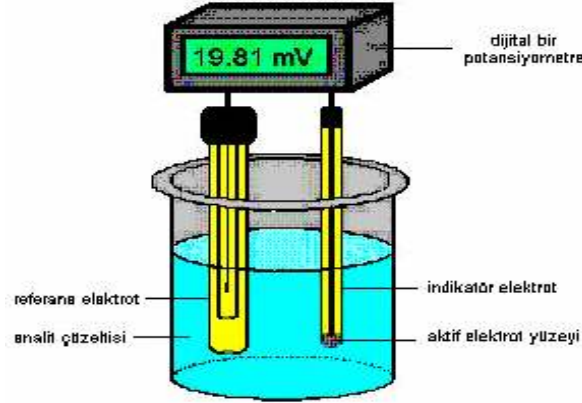
3.Piezoelektrik esaslı enzim sensörleri

4.Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri

Potansiyometrik Esaslı Enzim Sensörleri

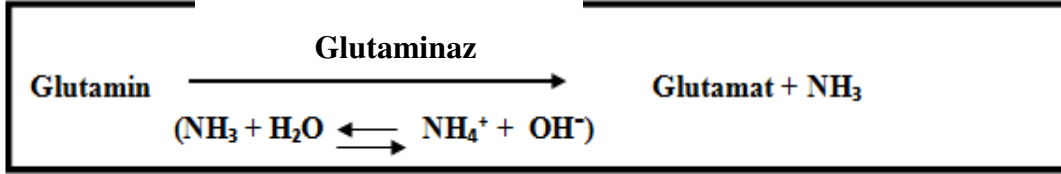
Akımın çok az geçtiği veya hiç geçmediği sistemlerde, indikatör elektrodun referans elektroda karşı gösterdiği, konsantrasyon değişimine bağlı olarak değişen potansiyelin ölçüldüğü tayin yöntemine **potansiyometri** denir. Çalışma elektrodu, çözeltideki türlerden bazılarına seçimlilik gösteren ve iç kısmında bir başka karşılaştırma elektrodu ile nicel analizi yapılacak türün belli derişimdeki çözeltisi bulunan ve bir membran ile analizi yapılacak çözeltiden ayrılmış bir elektrottur. Analizi yapılacak çözeltiye daldırılan bu elektrot ile aynı çözelti ile temasta olan bir karşılaştırma elektrodu

arasında oluşan gerilim değeri ile analizi yapılan tür arasında logaritmik bir ilişki vardır. Bu hücre geriliminin ölçümü sırasında iki elektrot arasında uygun bir devre yardımıyla bir akımın geçmemesi sağlanır. Şekil 4.7’de potansiyometrik bir ölçüm sistemi şematik olarak görülmektedir.

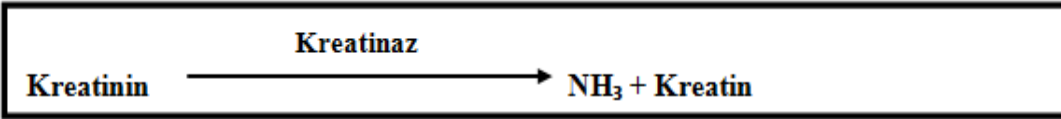
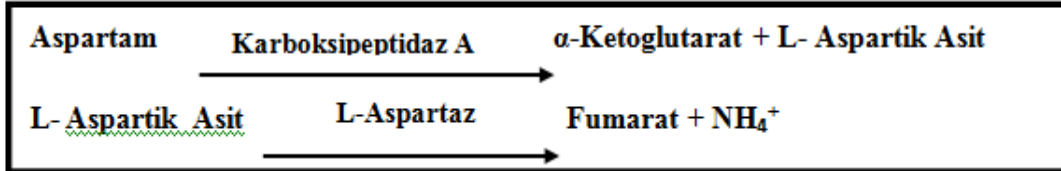


Şekil 4.7 Potansiyometrik ölçüm sisteminin şematik olarak gösterimi

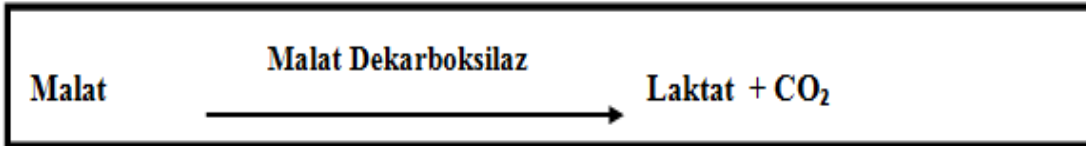
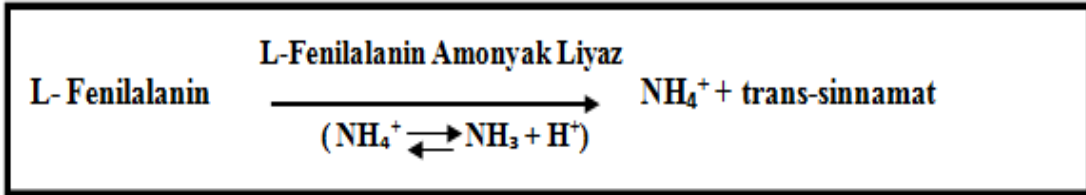
İçte ve dışta bulunan çözeltilerde analizi yapılacak türün derişimi açısından bir fark varsa membranın iç yüzeyi ve dış yüzeyi arasında bir gerilim farkı oluşur. Bu gerilim farkının değeri analizi yapılan türe ve derişimine bağlı olduğu gibi, membranın cinsine ve çözeltide bulunan öteki bileşenlerin tür ve miktarlarına da bağlıdır. İyon seçici elektrotlar olarak adlandırılan bu elektrotların en çok bilineni, H^+ iyonlarına karşı seçimlilik gösteren ve ince bir cam zarın membran olarak kullanıldığı cam elektrottur. Bir iyon seçici elektrotla ölçülen gerilim değeri, elektrodun seçimlilik gösterdiği türe ek olarak çözeltide bulunan diğer türlerden de etkilenir. Potansiyometrik sensörlerin duyarlı, kararlı, dayanıklı olması ve hızlı cevap üretmesi istenir. Potansiyometri esaslı ve biyoaktif bileşen olarak enzimlerin kullanıldığı bazı biyosensörlere ilişkin örnekler aşağıda verilmiştir [27].



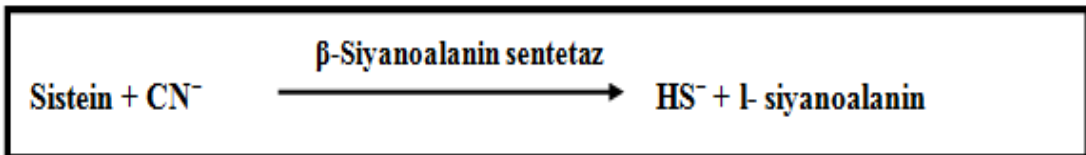
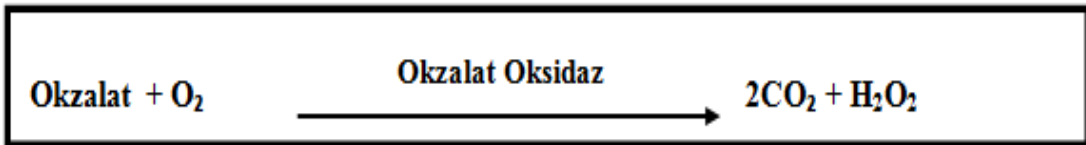
Amonyum Duyar Sensör



Amonyok Duyar Sensör

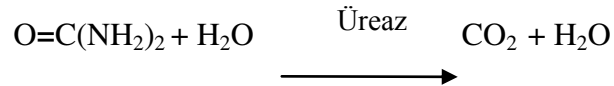


Karbondioksit Sensörü



Siyanür Sensörü

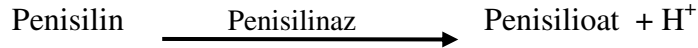
pH Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotları: Proton konsantrasyonundaki değişmeyi belirlemek amacıyla tasarlanan bu tür enzim elektrotlarında temel sensör olarak en yaygın bir şekilde klasik cam elektrotları kullanılır [30]. Bunların yanısıra antimon elektrotunda olduğu gibi H^+ iyonlarına duyar bazı metalik elektrotlarında kullanılması mümkündür. Temel ilke proton konsantrasyonundaki küçük farkların belirlenmesidir. Potansiyometrik enzim sensörlerine verilebilecek en klasik örnek üre tayinine yönelik sensördür.



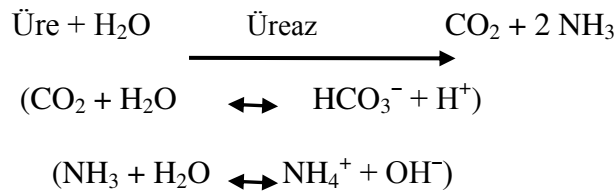
pH Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotlarının Bazı Uygulamaları

pH duyar potansiyometrik enzim elektrotlarına ilişkin seçilmiş örnekler aşağıda verilmiştir. Bu tür enzim sensörlerinde temel iletici olarak genelde cam pH duyar elektrotlar kullanılır. Bu çalışmada pH duyar potansiyometrik enzim elektrodu kullanılmıştır. Penisilinaz, penisilini hidroliz eder, penisilioat ve H^+ iyonu açığa çıkar.

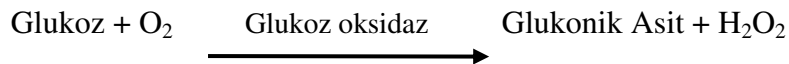
1) Penisilin Tayini [29]



2) Üre Tayini [29]



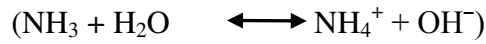
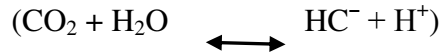
3) Glukoz Tayini [30], [31]



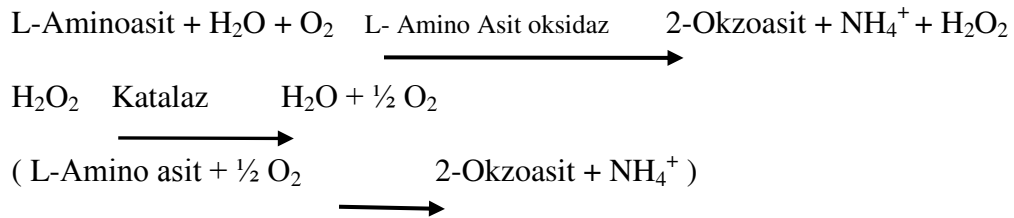
Amonyum Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotları: Amonyum iyonlarına duyar temel sensör ile enzimin birleştirilmesiyle hazırlanan bu elektrotlar genelde H^+ , K^+ ve Na^+ gibi tek yüklü katyonlara da duyarlık gösterdikleri için ölçüm ortamlarında benzer maddelerin bulunması durumunda girişim problemleri ortaya çıkmaktadır. Girişim etkilerini azaltmak için değişik yöntemler kullanılmaktadır [22].

Amonyum Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotlarının Bazı Uygulamaları
Amonyum duyar potansiyometrik enzim elektrotlarına ilişkin seçilmiş örnekler aşağıda verilmiştir. Bu tür enzim sensörlerinde temel iletici olarak NH_4^+ duyar elektrotlar kullanılır.

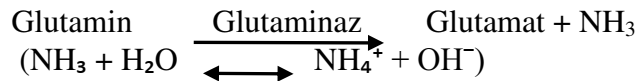
1) Üre Tayini



2) L-Amino Asit Tayini



3) Glutamin Tayini



4.1.9 Enzim Elektrotlarında Performans Faktörleri

Hazırlanan biyosensörün hedeflenen amaçlar çerçevesinde kullanılır olup olmadığına, ancak performans faktörlerinin ayrıntılı bir şekilde belirlenmesinden sonra karar verilebilir [31].

4.1.9.1 Kalibrasyon ve Duyarlılık

Duyarlılık derişimdeki bir birim değışiklik için biyosensör sinyalinin zamanla değışimi olarak tanımlanır. İdeal olarak bir biyosensörün duyarlılığın biyosensör ömrü boyunca sabit kalmalıdır. Biyosensörün duyarlılığı, analizi yapılacak maddenin bir dizi belli konsantrasyondaki çözeltilerini içeren standart çözeltiler ile yapılan ölçümler sonucu kalibrasyon grafiğı çizilerek kolayca belirlenebilmektedir. Zamanla bir biyosensörün duyarlılığındaki değışimin belirlenmesi için genellikle hergün kalibrasyonunun yapılması gerekmektedir [31].

4.1.9.2 Kararlılık

Kararlılık biyosensör ömrünün uzunluğu hakkında bilgi verir. Uzun ömür aynı materyalle çok sayıda analizin yapılabileceğini anlatır. Bu durumda işgücü ve maliyet açısından önemli avantajlar sağlanır. Söz konusu ömür, onların saklama ve çalışma koşulları açısından başlıca iki durumda incelenir. Doğal olarak kullanılmadan ideal koşullarda saklandığındaki ömür ile sürekli çalışma koşullarındaki ömür farklı olacaktır. Biyolojik materyal açısından biyosensörün kararlılığı incelendiğinde enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi gibi parametreler önem taşır. Genellikle fiziksel immobilizasyon yöntemlerinin kullanılması durumunda biyosensör ömrü kimyasal yöntemlere göre daha kısadır [31].

Biyolojik materyal açısından enzim sensörünün kararlılığı incelendiğinde enzimin saflık düzeyi, kaynağı ve immobilizasyon yöntemi gibi parametrelerin önem taşıdığı görülür. Çalışma koşulları açısından bakıldığında, analiz için yeterli koşulları sağlıyorsa nispeten düşük sıcaklıklarda çalışmak biyosensör ömrünü uzatır. Saklama açısından bakıldığında +4 °C de mikrobiyal üremeye izin vermeyecek ortamlarda saklama aynı yönde bir katkı sağlayacaktır. Bütün bunlarla birlikte reaksiyon ürünlerinin bazı durumlarda enzim

inaktivasyonuna neden olabileceği, kofaktör veya aracı içeren sistemlerde bunların kaybının aktivite düşüşüne yol açacağı unutulmamalıdır.

4.1.9.3 Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı

Kalibrasyon grafiğinde substrat derişimi ile sensör cevabı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu derişim aralığına “doğrusal çalışma aralığı” denir. Bu doğrusal grafiğin en alt sınırı; tayin sınırı olarak tanımlanır. Doğrusal tayin aralığının ve tayin sınırının uygunluğu için, analizlenecek maddenin analiz ortamdaki düzeyi ve girişim yapabilecek maddelerin olması oldukça önemlidir. Bunun yanısıra biyosensör cevabını etkileyen parametreler doğrudan sensör kalibrasyonunu da etkiler. Örnek olarak enzim sensörlerinde başlıca pH, sıcaklık ve bozucu türlerin sensör cevabını etkileyerek tayin aralığını değiştirebileceği görülür [31].

4.1.9.4 Cevap Süresi

Cevap zamanı biyosensörün analizlenecek maddenin bulunduğu ortama temas ettiği andan sinyalin kararlı hale geldiği ana kadar geçen süredir. Çok sayıda numunenin söz konusu olduğu analizlerde en kısa sürede elde edilen sonuç büyük önem taşıdığından biyosensörün cevap süresinin kısa olması istenir. Girişim yapan iyonlar, bir Nernst potansiyel farkı oluşması için taşınması gereken iyonların aktif elektrot yüzeyine ulaşmalarını geciktirir ve cevap zamanını etkiler. Cevap zamanı aşağıdaki işlemlerle azaltılabilir;

- Etkili karıştırma (veya akış hızının artırılması),
- Membran yüzeyinden kirliliklerin uzaklaştırılması veya çok küçük membran yüzeyli mikro-elektrotlar kullanılması,
- Ölçüm sırasında çözelti konsantrasyonunun seyreltikten derişige doğru olması.
- Nötral taşıyıcı membranlarda, aktif maddeye (ligand veya kompleks) çözeltideki iyonun tutunma hızı
- İyon ekstraksiyon kapasitesi
- Difüzyona karşı direnç
- Membran kalınlığı
- Membrandaki çözücünün polaritesi de cevap zamanını etkileyen faktörlerdir [31].

4.1.9.5 Seçicilik

İdeal bir biyosensörün sadece hedef analitin derişimindeki değışikliklere cevap vermesi ve diğer türlerin varlığından etkilenmemesi gerekir [32]. Enzimatik reaksiyonun substrat ve ürünleri ile girişim yapan maddelerin bulunması durumunda sensör sinyali etkilenerek hedef analitin derişimi yanlış tayin edilir. Bu problem, girişim veren maddenin bir ön işlemle uzaklaştırılması veya bunlardan etkilenmeyen bir sensör kullanılması ile giderilmesi ile giderilebilir.

Sadece tek bir iyon duyarlı bir elektrot yoktur. X iyonunu ölçmek için kullanılan bir elektrot Y iyonuna da duyarlı olabilir. Diğer iyonların varlığı elektrot performansını önemli ölçüde zayıflatır. Bu iyonların girişimi, elektrot membranının yapısına bağlı olarak çeşitli şekillerde olabilir. Seçicilik ilk kez Nicolsky tarafından hidrojen ve sodyum iyonlarına duyarlılık gösteren cam elektrot için kullanılmış ve aşağıdaki eşitlikle verilmiştir. Pek çok iyon seçici elektrot (ISE) çoğunlukla aşağıdaki eşitliğe uygun davranır [32].

$$E = E^0 + \frac{0,0592}{n} \log \left[a_x + \sum (k_{x,y}^{pot} a_y^{n_x/n_y}) \right]$$

a_x = Ölçülecek iyonun aktivitesi

a_y = Girişim yapan iyonun aktivitesi

n_x, n_y = Her bir türün yükü

$k_{x,y}^{pot}$ = Seçicilik katsayısı

Denklem, bir elektrotun ölçülecek X iyonu ve bütün girişim yapan iyonlara cevabını gösterir. Elektrotun farklı iyonik türlere karşı duyarlılığı seçicilik katsayısı ile belirlenir. Seçicilik katsayısı büyüdükçe elektrotun ölçülecek iyon duyarlılığı azalır.

Seçicilik katsayısı; ayrı çözelti metodu, ana iyonun girişim yapan iyon çözeltisine ilavesi metodu, girişim yapan iyonun ana iyon çözeltisine ilavesi metodu ile hesaplanabilir. Seçicilik katsayısının hesaplanmasında metotlardan herhangi birisi kullanılabilir.

4.1.9.6 Tekrarlanabilirlik

Enzim sensörlerinde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesinde kullanılan enzim aktivitesi, kararlılığı ve saflık düzeyi büyük önem taşır. Ancak karakteristik özellikleri çok iyi bilinen enzim preparatlarının kullanılması surumunda bile sensör hazırlama aşamaları ve çalışma ortam ve koşulları açısından beklenen niteliklerde büyük farklanmalar gözlenebilir. Bu nedenle hazırlanan sensörle tekrarlanabilirlik denemelerinin gerçekleştirilmesi bir zorunluluktur [31].

4.1.9.7 Sıcaklık

Enzim katalizli reaksiyonların hızları sıcaklığa çok duyarlıdır. Enzimin optimum sıvaklığından uzaklaşılması surumunda özellikle termal kararlılığı düşük olan enzimlerin tersinmez denatürasyonuna neden olarak sensör cevabını olumsuz yönde etkiler.

4.1.9.8 Tıbbi Uygulamalarda Kullanılacak Biyosensörler İçin Biyouyumluluk

Hastalık tedavisinde veya biyosensörün insan vücuduna uzun süreli implantasyonlarında önem kazanmaktadır. Biyosensörün bulunduğu biyolojik elementlerin aktivitesini etkilememesi gerekmektedir.

4.1.10 Enzim İmmobilizasyonu

Kelime anlamı olarak immobilizasyon hareketi sınırlandırma demektir. İmmobilize edilmiş enzimlerin de gerçekten hareketleri sınırlandırılmış olmaktadır. Enzimlerin endüstriyel alanda kullanımını artırmak için, özellikle son otuz yılda enzim immobilizasyonu üzerine araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bu alanda yapılan yayınların sayısı da yıldan yıla artmaktadır. Enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak immobilize edilebilirler. Suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyon reaksiyonuna enzim molekülünün monomer olarak katılması ve suda çözünmeyen bir matriks veya mikrokapsüllerde tutuklanmasıyla immobilizasyon gerçekleştirilir. İmmobilize enzimin doğal (serbest) enzime üstünlükleri şu şekildedir; Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz. Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vs.) karşı daha dayanıklıdır. Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir. Sürekli işlemlere uygulanabilir. Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır. Ürünün oluşumu

kontrol altında tutulabilir. Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur. Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.

Enzim immobilizasyonunda doğal veya sentetik organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcının suda çözünmemesi, yapısının gözenekli olması, hidrofilik olması, mekanik kararlılık göstermesi, kimyasal ve termal kararlılık göstermesi, kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcılar enzimle kovalent bağ oluşturabilecek fonksiyonel gruplar taşıması, mikroorganizmalar karşı dirençli olması, zehirli olmaması, ucuz ve yenilenebilir olması gerekmektedir. Gerçek anlamda ilk enzim immobilizasyon denemelerinin sonuçları 1950'li yıllarda birçok çalışma grubu tarafından aynı anda yayınlanmıştır. Daha sonra bu alandaki çalışmalara dünyanın her alanında büyük bir ilgi duyulup enzimler değişik amaçlarla immobilize edilmiştir [22].

4.1.11 İmmobilizasyon Yöntemleri

Yukarıda da bahsedildiği gibi biyosensörler farklı özellikteki iki elemanın (transduser ve biyoreseptör) birleştirilmesiyle oluşurlar. Uygun biyoreseptör ve transduser seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması aşılması gereken en önemli sorundur. Bu bağlama işlemini biyosensörlerin immobilizasyonu olarak tanımlıyoruz. Bağlama işleminde çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen transduser ve biyoreseptöre göre belirlenir. Enzimler hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden proteinlerdir. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata girmişlerdir. Pek çok endüstriyel, analitik ve klinik proseslerde enzimler, substrat çözeltisi ile karıştırılırlar ve ürüne dönüşüm gerçekleştirildikten sonra ekonomik olarak geri kazanılamazlar. Enzimlerin sadece bir kere kullanılmaları, pahalı olmaları nedeni ile büyük masraflara neden olmaktadır. Bu nedenle immobilize edilerek defalarca kullanılmaları ekonomik olarak daha makul olmaktadır. Günümüzde çok sayıda immobilize enzim endüstride kullanılmaktadır. İmmobilizasyon biyosensörlerin kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. Biyosensör immobilizasyonunda baslıca dört yöntem kullanılmaktadır.

- a) **Kovalent Bağlama:** Biyoreseptörün transduser yüzeyine kimyasal bir reaksiyon sonucu bağlanmasıdır.
- b) **Tutuklama:** Biyoreseptörün bir membran veya tabaka (matriks) içerisinde hapsedilmesidir.
- c) **Çapraz Bağlama:** Tutuklama yöntemi ile kimyasal bağlamanın birleştirilmiş şekli olarak uygulanır. Tutuklanmış biyoreseptör glutaraldehid gibi bifonksiyonel reaktiflerle film veya tabakaya kovalent bağlanır.
- d) **Adsorpsiyon:** Biyoreseptörün film veya tabaka ile hidrofobik, hidrofilik ve/veya iyonik etkileşim sonucu assosiyasyonudur. Biyoreseptörlerin kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna göre immobilizasyon yöntemi belirlenir. Enzimler için uygulanan tüm immobilizasyon yöntemleri protein yapısındaki diğer biyoreseptörler için de uygulanabilir. Örneğin; Hayvan ve bitki dokuları membran yapısında olduklarından farklı immobilizasyon yöntemleri uygulamak gerekir. Immobilizasyon yöntemine göre biyosensörün ortalama ömürleri aşağıda verilmiştir [22].

Adsorpsiyon: 1gün,

Membranda tutuklama: 1 hafta,

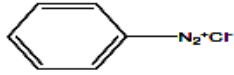
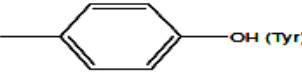
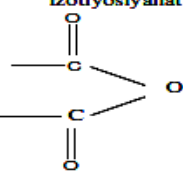
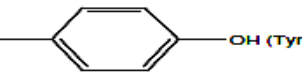
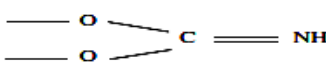
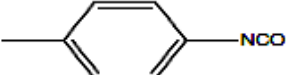
Fiziksel tutuklama: 3-4 hafta,

Kovalent bağlama: 4-14 ay.

4.1.11.1 Kovalent Bağlama

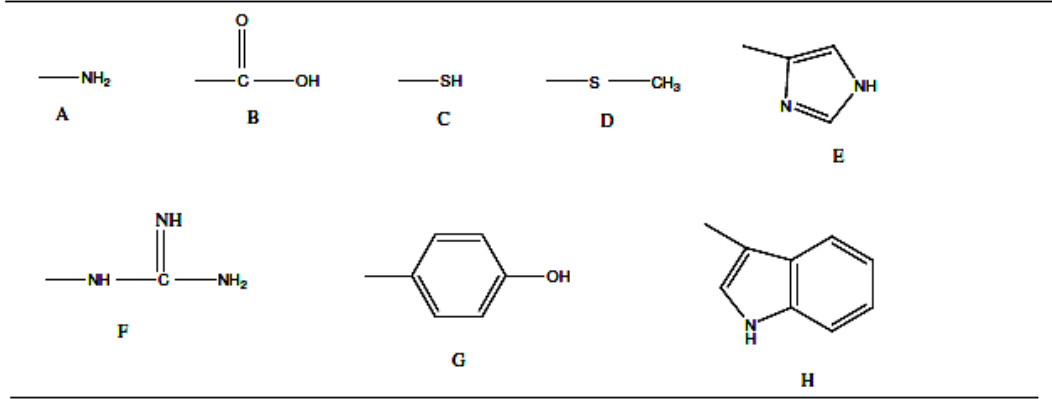
Enzimler doğrudan transdusere veya önceden uygun bir film veya tabaka ile kaplanmış transdusere kovalent olarak bağlanabilirler. Enzimler aktive edilmiş transduser yüzeylerine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanarak immobilize edilen enzim preparatı transduser yüzeyinde bir film veya tabaka oluşturularak da biyosensör hazırlanabilir. Enzimlerin kovalent bağlanmasında kullanılabilecek taşıyıcıların içermesi gereken reaktif gruplar ve bunların enzimdeki hangi aminoasitlerle etkileşime girdikleri Çizelge 4.6' da verilmiştir.

Çizelge 4.6 Enzim immobilizasyonunda kullanılan maddelerde (taşıyıcı) bulunan reaktif gruplar ve reaksiyona girdikleri amino asitlerin fonksiyonel grupları

Taşıyıcının reaktif grubu	Enzimdeki fonksiyonel grup ve ilgili amino asit
 Diazonyum tuzu	— NH₂ (Lys, N-Terminal) — SH(Cys)  — OH (Tyr)
— R — NCS izotiyosiyanat  Asit anhidrit	— NH₂ (Lys, N-Terminal) — NH₂ (Lys, N-Terminal)
CH₂CON₃ Açıl azid	— NH₂ (Lys, N-Terminal) — SH(Cys)  — OH (Tyr)
 imidokarbonat	— NH₂ (Lys, N-Terminal)
 izosiyanat	— NH₂ (Lys, N-Terminal)
— CH₂COCl Açıl klorür	— NH₂ (Lys, N-Terminal)

Enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için esansiyel olan aminoasitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların bağlanma sırasında sterik olarak rahatsız edilmemesidir. Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi kovalent bağlanma enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir.

Çizelge 4.7 Enzimlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonunda bağ oluşumuna katılan aminoasitlerin reaktif grupları

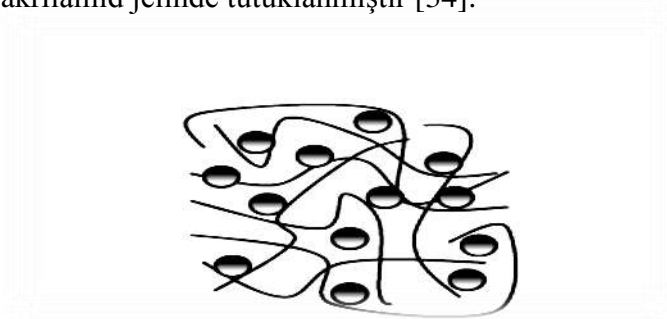


- (A): N-Terminal aminoasitlerin amino grubu ve lizinin μ -amino grubu,
(B): C-Terminal aminoasitlerin ve aspartik ve glutamik asidin serbest karboksil grupları,
(C): Sisteinin sülfhidril grubu,
(D): Metiyoninin tiyoeter grubu,
(E): Histidinin imidazol grubu,
(F): Argininin guanidil grubu,
(G): Tirozinin fenolik grubu,
(H): Triptofanın indolil grubu.

Enzim immobilizasyonu çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) yapılmalıdır [33].

4.1.11.2 Tutuklama

Enzimler makromoleküler yapı proteinler olup polimer jel matrikslerde Şekil 4.8'deki gibi tutuklanabilirler Bu yöntem enzimler yanında organeller, hücreler ve antikorlar için de uygulanabilir. Updike ve Hicks, tarafından hazırlanan, ilk enzim elektrotunda glukoz oksidaz (GOD) poliakrilamid jelinde tutuklanmıştır [34].



Şekil 4.8 Enzim molekülünün jel içinde veya polimer matrikste tutuklanması

Guilbault ve arkadaşlarının hazırladığı üreaz elektrotunda ise üreaz süspansiyonu elektrot yüzeyinde diyaliz membranı tarafından sarılarak tutuklanmıştır [4], [30], [35], [36]. Çözeltide enzim aktivitesi hızla düştüğünden fiziksel tutuklama yerine kimyasal kovalent bağlama tercih edilir. Tutuklama için en yaygın kullanılan film veya matrisler nisasta, poliakrilamid, silikon lastiği, polivinil klorür ve polivinil alkoldür.

4.1.11.3 Adsorpsiyon

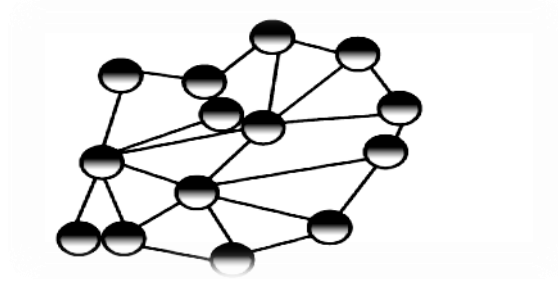
İmmobilizasyonda kullanılan en eski ve en basit yöntemlerdendir. Örneğin, glukoz oksidaz adsorplanmış polietilen membranı ilk olarak 1962 yılında glukoz biyosensörü için önerilmiştir [37]. Genelde, enzim veya biyoreseptör çözeltisine yüzeyi membran veya film ile kaplanmış transduser daldırılır ve belirli bir süre beklenir. Membran veya film, immobilize edilecek reseptöre göre hidrofilik veya hidrofobik karakterde seçilebilir. Enzimler durumunda daha çok hidrofilik membranlar kullanılır. En çok kullanılan adsorbanlar; selüloz asetat membranları, polistiren, polivinil klorür ve silikadır. Sorpsiyon tersinir bir olay olduğundan adsorpsiyon ile immobilizasyon güvenilir bir yöntem değildir ama yine de biyosensörlerde başarılı uygulamaları vardır [4]. Şekil 4.9’da enzim molekülünün elektrot yüzeyine adsorpsiyonu görülmektedir.



Şekil 4.9 Enzim molekülünün elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu

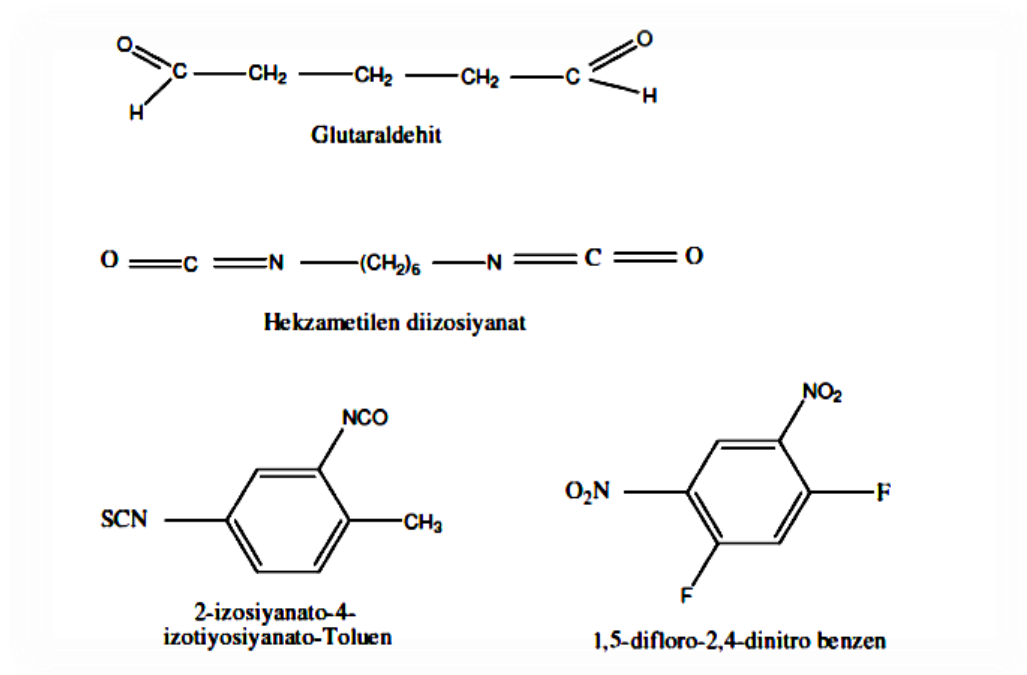
4.1.11.4 Çapraz Bağlama

Bu yöntem biyosensör hazırlanmasında daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin birleştirilmesi şeklinde uygulanır. Şekil 4.10’da enzim molekülünün film veya tabakaya çapraz bağlanması görülmektedir.



Şekil 4.10 Enzim molekülünün film veya tabakaya çapraz bağlanması

Çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehid, hekzametilen diizosiyanat, diflorodinitro benzen, bismaleimido hekzan, disüksinil suberat sık kullanılan reaktiflerdir. Bazı çapraz bağlayıcı reaktiflerin formülleri Şekil 4.11’de verilmiştir. Glutaraldehit en sık kullanılan bifonksiyonel reaktiftir. Ortamdaki konsantrasyonu %2-5 (w/w) olmalıdır [38].



Şekil 4.11 Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri

4.1.12 Kitosan

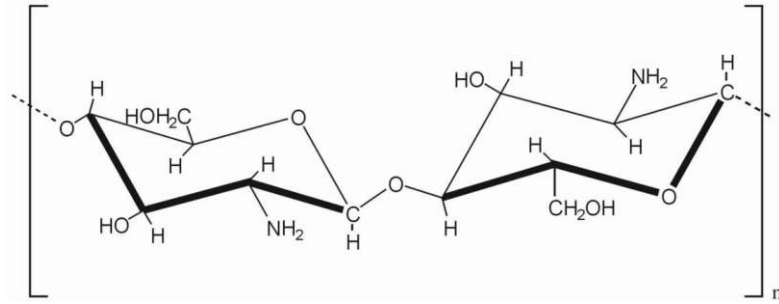
Kitosan, yengeç ve karides gibi kabuklu deniz ürünlerinin dış iskeletlerinde, kelebeklerin kanatlarında, mantarların hücre duvarlarında vb. bulunan doğal bir polisakkarit olan kitinden kısmi deasetilasyon yoluyla elde edilen, reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip; kimyasal yapı olarak seluloza benzeyen ve doğada selulozdan sonra en sık rastlanan biyopolimerdir. Beyaz renkte, kokusuz ve tatsız, yarı şeffaf partikül veya toz halinde bir madde olan kitosan sindirim enzimlerine dayanıklıdır. Buna karşın bazı bakteriler tarafından parçalanır. Suda çözünmez. Sadece asidik çözücülerde (<6.0 pH) çözünür. Çözündürmek için asetik asit, formik asit, laktik asit gibi organik asitler kullanılır. İnorganik asitlerde çözünme sınırlıdır (% 1 hidroklorik asitte çözünür; sülfirik ve fosforik asitte çözünmez). Kitosan solüsyonlarının pH 7.0 ve üzerinde stabilitesi bozulur. Aynı şekilde oda sıcaklığında uzun süre muhafaza kitosan solüsyonlarının stabilitesini olumsuz etkilemektedir [7].

Doğal bir biyopolimer olan kitosan, özellikle son 50 yıldır araştırmacılar için ilginç bir materyal olarak yerini korumaktadır. Kitine göre birçok avantaja da sahip olan kitosan başta gıda, kozmetik, ziraat, tıp, kağıt ve tekstil olmak üzere birçok endüstri dalında kullanım alanı bulmuştur. In-vivo testler, kitosanın insan vücuduna herhangi bir yan etkisi bulunmadığını biyoyumlu olduğunu göstermiştir. Kitosan yara tedavisinde doku sağlanması için oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, medikal yapay deri, cerrahi dikiş iplikleri, yapay kan damarları, kontrollü ilaç salımı, kontakt lens yapımı, yara bandı, sargı bezi, kolesterol kontrolü (yağ bağlayıcı), tümör inhibitörü, antifungal, antibakteriyel, ve hemostatik etki göstermesi vb. şekilde sıralanabilmektedir [39]. Sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilememesi, yüksek viskozitesi, jel oluşturma ve yüksek su bağlama yeteneği vb. nedenlerle bitkisel diyetetik liflere benzerlik göstermektedir ve canlı organizmada benzer etkiler oluşturmaktadır. Bağırsak hareketlerinin ve sindirim faaliyetlerinin düzenlenmesi, bağırsak mikroflorasının (bifidobakterilerin) desteklenmesi, kan kolesterol seviyesinin düzenlenmesi (LDL kolesterolün düşürülmesi, HDL kolesterolün artırılması), kan basıncının düşürülmesi, karaciğer fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi fonksiyonel etkilerinin yanı sıra sindirim yoluyla alındığında ya da emilimini azaltarak (pozitif yüklü bir bileşik olmasından dolayı negatif yüklü olan yağ asitlerine bağlanarak) kilo kaybını desteklemesi oldukça ilgi çekmiştir [7]. Kitosanın pozitif iyonik yüke sahip

olması bahsedilen bu özellikleri göstermesinde büyük önem taşır. Kitosan kimyasal yapısı, ucuz ve biyoyumlu olması sebebiyle biyosensör uygulamalarında enzim immobilizasyonu için kullanılmaktadır [40].

4.1.12.1 Kimyasal Yapısı ve Reaksiyonu

Bir polisakkarit olan kitin kimyasal olarak 2-asetamido-2-deoksi- β -D-glukoz (N-asetil glukozamin)'dan oluşmaktadır. Kitin' in düşük derecede deasetilasyonu yoluyla elde edilen kitosan ise (1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoksi-D-glukoz (glukozamin)olarak bilinmektedir. Kitosan, 3 çeşit reaktif fonksiyonel gruba sahiptir. C-3, C-6 pozisyonunda birer hidroksil ve C-2 pozisyonunda ise bir amino grubu bulunmaktadır [7].



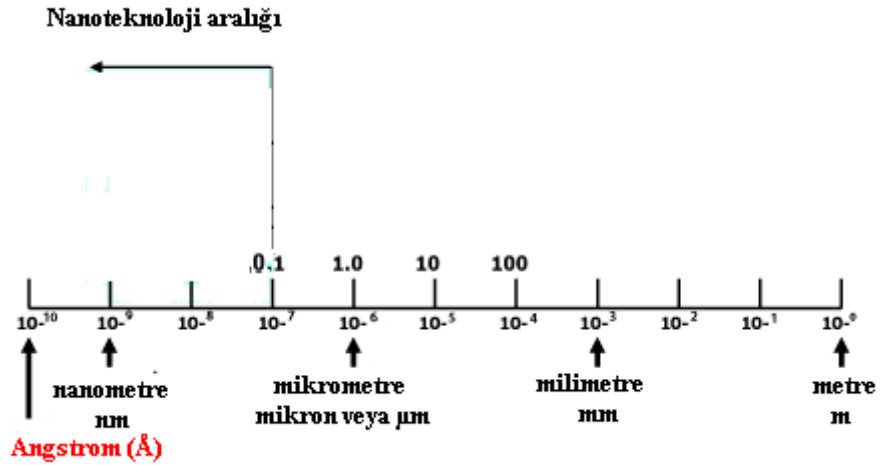
Şekil 4.12 Kitosan'ın Kimyasal Yapısı

Kitosan, her tekrarlayan birimdeki primer (C-6), ve sekonder (C-3) hidroksil grupları ile amin (C-2) grubu olmak üzere toplam üç tane reaktif gruba sahiptir. Bu reaktif gruplar kolayca kimyasal modifikasyona uğrayabilmekte ve kitosanın mekaniksel ve fiziksel özellikleri ile çözünürlüğünü değiştirmektedir [39].

BÖLÜM 5

NANOTEKNOLOJİ

Nano” kelimesi Yunanca *nannos* kelimesinden gelir ve “küçük yaşlı adam veya cüce” demektir. Günümüzde nano, teknik bir ölçü birimi olarak kullanılır ve herhangi bir birimin milyarda biri anlamını taşır. Genellikle ‘metre’ ile birlikte kullanılır: Nanometre, 1 metrenin milyarda biri ölçüsünde bir uzunluğu temsil eder (yaklaşık olarak ard arda dizilmiş 5 ila 10 atom) [41]. İnsan saç telinin çapının yaklaşık 100.000 nanometre olduğu düşünülürse ne kadar küçük bir ölçekten bahsedildiği daha rahat anlaşılır [42] .



Şekil 5.1 Nanoteknolojinin kullanıldığı boyut aralığı [43].

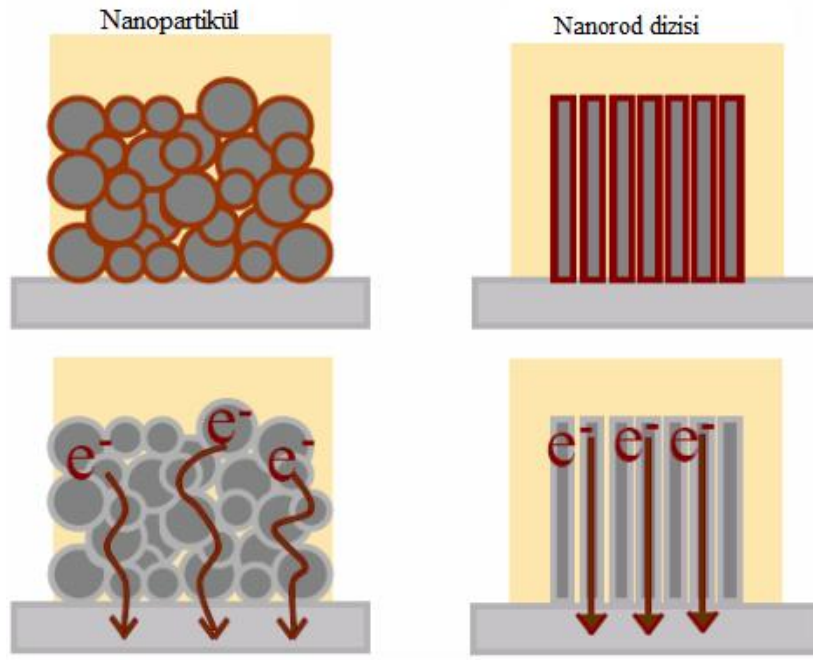
Malzemenin büyüklüğü nanometre ölçütlerine inildiği zaman, kuvantum davranışları bilinen klasik davranışların yerini almakta ve fiziksel özellikleri kesikli bir değişim göstermeye başlamaktadır. Kimyasal ve fiziksel özellikler, yapının büyüklüğüne ve atom yapısının ayrıntılarına, dışardan sisteme bağlanan yabancı bir atomun cinsine ve yerine göre çok farklı ve olağanüstü davranışlar sergilemektedirler. Şöyle ki, mevcut nanoyapıya yabancı bir atomun yapışması, elektronik özellikleri, örneğin elektrik iletkenliği farkedilebilir şekilde değiştirmektedir. Bu yabancı bir atom geçiş elemanı olduğunda yapıştırdığı bir nanoyapıya manyetik özellikler kazandırabilmektedir. Kısaca, bir nanoyapının fiziksel özellikleri, bağ yapısı ve dolayısı ile mukavemeti onun büyüklüğüne ve boyutuna bağlı olarak önemli değişimler gösterebilmektedir. Örneğin, karbon atomlarından oluşan elmas kristali iyi bir yalıtkan olduğu halde, bir boyutlu karbon atom zinciri, altın ve gümüş zincirlerinden bile daha iyi bir iletken olabilmektedir. **Nanobilim**, nanometre ölçütlerinde ortaya çıkan bu yeni davranışları kuvantum kuramı yardımı ile anlamamızı sağlar. **Nanoteknoloji** ise ya yeni nanoyapılar tasarlayıp sentezlemeyi, ya da nanoyapılara yeni olağanüstü özellikler kazandırmayı ve bu özellikleri yeni işlevlerde kullanmayı amaçlar [44].

Peki neden boyutların küçültülmesi için uğraş verilmektedir? Transistörlerde elektrodlar arası mesafeye kanal genişliği denir. Kanal genişliği bir transistörün açma kapama hızını belirlemesi açısından önemlidir. Kanal genişliği ne kadar dar ise transistör o kadar hızlı çalışmaktadır. Buna ek olarak transistör boyutlarının küçülmesiyle birlikte, bir çip içine yerleştirilebilen transistör sayısı da artmaktadır. Hem daralan kanal genişliğiyle hem de artan transistör sayısı ile elektronik aygıtların performansı kat kat artmaktadır. Son 50 yıl içinde araştırmacıların minyatürleştirme çabalarındaki başarısının göstergesi, 50 yıl önce üretilen tek bir transistörle aynı boyutlara sahip bir çip içine şimdilerde 100 milyon transistörün yerleştirilebilmesidir. Dolayısıyla elektronik aygıtların kalbi olan transistörlerin performansındaki artış doğrudan mikroelettronik endüstrisini etkilemektedir. Mikroelettronik endüstrisindeki yukarıdan aşağıya üretim modelindeki bu hızlı ilerleyişin bilimsel ve ekonomik nedenlerden dolayı 2010-2020'ye kadar süreceği tahmin edilmektedir. Bu gibi sınırlamalar şu an mikroelettronik endüstrisinde baskın konumdaki silisyum esaslı elektronik üretime alternatif yeni bir üretim modeli gerektirmektedir. Aşağıdan yukarı (bottom-up) üretim

modeli olarak adlandırılan bu yeni üretim modelinde; doğadan esinlenerek, protein ve diğer makro moleküllerden biyolojik sistemlerin oluşturulması gibi, kimyasal metotlarla elde edilen hassasiyetle kontrol edilip ayarlanabilen kimyasal bileşim, yapı, morfoloji ve büyüklükte nanoboyutlu yapı taşlarının bir araya getirilip, bunlardan fonksiyonel aygıtların üretilmesi hedeflenmektedir. Şu an piyasada bulunan, silisyum esaslı bir ürün olan Pentium 4 işlemcilerde kanal genişliği 180 nm civarında iken, kimyasal metotlarla üretilen karbon nanotüplerden oluşan organik bir transistörde bu mesafe 1-2 nm civarındadır [45].

Transistör teknolojisindeki gelişimden de anlaşılabilir gibi nanoteknolojinin biyosensör teknolojisi ile birleşmesi, makro boyutta üretilen sensörlerin minyatürleşmesini sağlar. Kullanılan nanomateriyaller sayesinde sensörün duyarlılığı, hassasiyeti, ölçüm aralığı, kullanım ömrü ve cevap süresi gibi parametrelerin gelişmesi ve düşük maliyetli sensörlerin üretilmesi sağlanır. Nanoteknolojinin sensör teknolojisi ile birlikte gelişmesi bu açıdan önemlidir. Bu sebeple son yıllarda yapılan biyosensör çalışmalarında nanomateriyaller ve nanoteknolojik yöntemler uygulanmaktadır.

Nanomalzemeler, 0-boyutlu, 1- boyutlu ve 2- boyutlu olmak üzere 3 grupta incelenir [46]. İzotropik küreler, yirmiyüzlüler (icosahedrons) ve küpler 0-boyutlu nanomateriyal olarak sınıflandırılabilir. Bunlar nanodünyasında en iyi bilinen şekillerdir. Yarıiletkenler, nanoküreler ve C_{60} bu gruptadır. Çubuklar, poligon şeklindeki silindirler ve teller 1-boyutlu nanomateriyallerin örnekleridir. 2- boyutlu nanomateriyallere ise İnce filmler gibi çoğunlukla optik kaplamalarda, korozyon korunmasında ve yarı iletken ince film cihazlarda kullanılan nanomateriyaller örnek verilebilir [47]. 1D nanomateriyal olan ZnO nanorodlar sahip olduğu olağanüstü materyal özellikleri ve elektronik, optik, fotonik performansı sayesinde geniş kullanım alanına sahiptir [46].



Şekil 5.2 Nanopartikül ve nanorodlarda elektron transferi [47].

Nanorodlar elektron transferini güçlendirmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Şekil 4.2’den de görüldüğü gibi partikül düzeninde elektron bir partikülden diğerine geçerek karşı tarafa ulaşır. Bu da elektronların daha zor ve uzun bir zamanda transfer edilmesine neden olur. Ancak nanorod düzeninde elektron çok daha rahat bir şekilde transfer edilir. Bunun sonucu olarak ZnO nanorod başta güneş pillerinde olmak üzere benzer uygulama alanlarında gelecek vadeden bir materyaldir. ZnO çok fazla çaba gerektirmeden değişik sentez metotları kullanılarak farklı kristal yapılarında sentezlenebilme özelliğine sahiptir [47].

5.1 Nanoyapıların Sentezlenme Yöntemleri

Farklı boyut ve kalitedeki nanoyapıların elde edilebilmesi için farklı üretim hızı ve maliyete sahip birçok sentez yöntemi bulunmaktadır. Bu yöntemler *yukarıdan-aşağıya* ve *aşağıdan-yukarıya* olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. *Yukarıdan- aşağıya* tekniklerinde nanoyapılar, külçe malzemenin fiziksel ya da kimyasal olarak işlenmesiyle istenilen boyutta elde edilir. *Aşağıdan-yukarıya* büyütme teknikleri, atom ya da moleküllerden başlayarak nanoyapıların sentezlenmesini sağlar. Fiziksel buhar

çöktürme (*Physical Vapor Deposition-PVD*), kimyasal buhar çöktürme (*Chemical Vapor Deposition-CVD*) ve sol-gel bu yöntemlerden en yaygın kullanılanlardır [48].

5.1.1 Fiziksel Buhar Çöktürme (PVD)

PVD yönteminde çöktürülmek istenen malzeme katı fazdan buhar fazına, termal buharlaştırma ya da sıçratma gibi metotlarla dönüştürülür. Buhar, kaynaktan altlık üzerine taşınır ve altlık üzerinde yoğunlaşır. Termal buharlaştırmada kaynak malzeme bir pota içerisine yerleştirilir ve vakum ortamında erime noktasına kadar ısıtılarak buhar haline getirilir. Sıçratma metodunda ise kaynak olarak bir hedef kullanılır. Vakum ortamında yüksek enerjili iyonlar üretilir ve hedefle çarpıştırılır. Uyarım sonucunda atom ya da moleküller hedeften çıkarak altlık üzerinde birikir [48].

5.1.2 Kimyasal Buhar Çöktürme (CVD)

CVD, nanoyapıların sentezlenmesinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Tipik bir *CVD* sürecinde, taşıyıcı asal gazlarla seyreltilen reaktan gazlar ya da başlangıç maddeleri reaksiyon hücreğine girer. Süreç ve çalışma koşullarına bağlı olarak reaktan gazlar arasında yüzeye çarpmadan önce, buhar fazında homojen kimyasal reaksiyonlar gerçekleşir ve daha düşük sıcaklık bölgesinde bulunan altlık üzerinde yoğunlaşma süreci ile bir film şekillenir. Reaksiyon kimyası ve çöktürme şartlarının kontrolüyle çok farklı morfolojilerde yapılar elde edilebilir. İstenen yapının büyütülebilmesi için sıcaklık, basınç, başlangıç konsantrasyonları, akış hızı ve reaktör geometrisi gibi parametrelerin kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu kategori içerisinde Buhar-Sıvı-Katı (*Vapor-Liquid-Solid-VLS*) ve Buhar-Katı (*Vapor-Solid-VS*) yöntemleri geniş bir yere sahiptir. *VLS* mekanizmasında buhar haldeki malzeme asal bir gazla daha düşük sıcaklıktaki altlık üzerine taşınarak çekirdeklenir, çöker ve büyür. Büyütme işlemi için altlık üzerine kaplanmış bir katalizör sayesinde çekirdeklenme damlacıklar halindeki katalizör üzerinde gerçekleşir. Katalizör yüzeyinde adsorbe olmuş malzeme doyuma ulaştığında çökme ve büyüme gerçekleşir. Yapıların boyutları kullanılan katalizörün boyutuna bağlıdır. *VS* yönteminde nanoyapılar katalizör kullanılmadan, direkt olarak buhar fazından daha düşük sıcaklıkta tutulan altlık üzerinde yoğunlaşırlar. Literatürde *VLS* ve *VS* yöntemleriyle büyütülmüş tel, şerit, kemer, tüp gibi değişik morfolojilerde ZnO nanoyapılara sıklıkla rastlanmaktadır [48].

CVD ve PVD yöntemleri yüksek sıcaklık ve düşük basınçlarda çalışmayı gerektiren, kullanılan cihazlar nedeniyle maliyeti oldukça yüksek ve az miktarda malzemenin elde edilebildiği yöntemlerdir. Ayrıca CVD yönteminde başlangıç maddeleri çoğu zaman tehlikeli ve zehirlidir. Değişik morfolojilerde nanoyapılar elde etmek mümkündür, ancak yöntemin çok fazla parametre içermesi nedeniyle çok kontrollü çalışılmalıdır [48].

5.1.3 Sol- gel Yöntemi

Sol-gel yöntemi ise alkoksit bazlı başlangıç maddelerinin hidroliz ve yoğunlaşma reaksiyonlarıyla, klasik yüksek sıcaklık yöntemlerine kıyasla daha saf ve homojen malzemelerin düşük sıcaklıklarda üretimini sağlar [48].

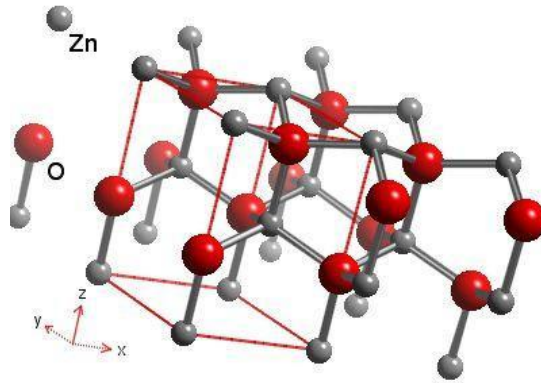
5.2 Çinko Oksit'in Özellikleri

Çinko oksit (ZnO) II-VI grubu yarıiletkenlerin önemli bir üyesidir [47]. Oda sıcaklığında 3,4eV geniş iletim bant aralığına ve 60meV gibi büyük bir bağlanma enerjisine, 0,4- 2 μ optik dalga boyu aralığında yüksek geçirgenliğe sahiptir. 3,4eV daha büyük iletim bant aralığına sahip bileşikler bulunsa da, 60meV gibi bir bağlanma enerjisi değerine sahip olması, optik pompalama için düşük eşik değerine sahip olması, radyasyon direnci ve biyo-uyumluluğu gibi özellikleriyle birçok aygıt yapımı için ideal bir adaydır. Ergime noktası yaklaşık 1975°C, atom ağırlığı 81.408 g/mol, yoğunluğu 5.606 g/cm³ ve ısı kapasitesi 40,3J/mol K'dir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1 ZnO'in fiziksel özellikleri [45]

ZnO'in fiziksel özellikleri	
Örgü Yapısı	Hegzagonal Wurtzit
Örgü Sabiti	$a=3.24\text{\AA}$, $c=5.13\text{\AA}$ $c/a=1.60$
Molekül ağırlığı	Zn=65.38 , O=16 , ZnO=81.38
Yoğunluğu	5.606gr/cm ³
Erime noktası	1975 C°
Yasak enerji aralığı	3.436 eV (0 K°), 3.20 eV (300 K°)
Eksiton bağlanma enerjisi	60 meV
Örgü enerjisi	965Kcal/mol

Hekzagonal kristal yapıdaki ZnO'nun şematik görünümü Şekil 5.3'de verilmektedir [43]. Elektronik, optik ve fotonik özelliklerinden dolayı ZnO nanorodların, UV-lazer, LED, güneş pilleri, nanojeneratörler, gaz sensörleri, fotodedektörler, ve fotokatalist olarak kullanımı ilgi çekmektedir [46].



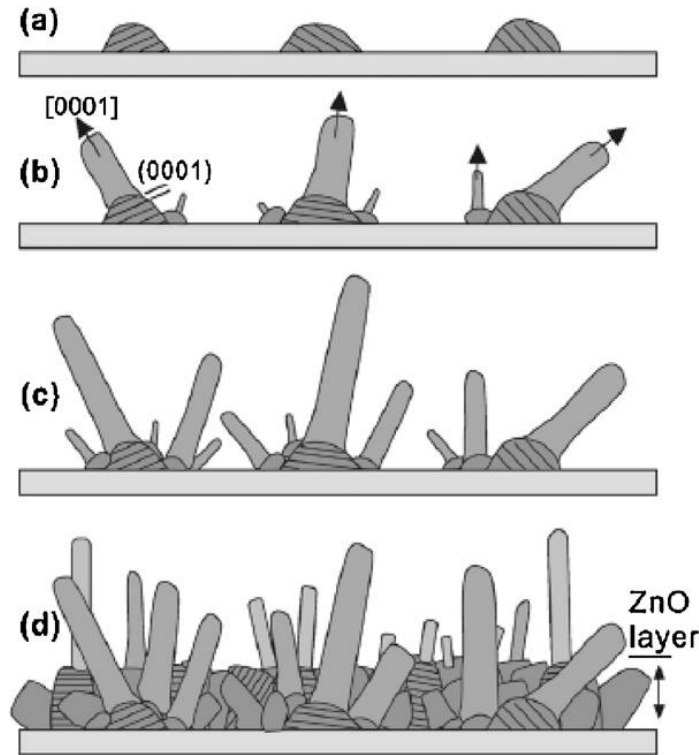
Şekil 5.3 Hekzagonal ZnO yapısı [43].

Wurtzit yapı a ve c olan iki örgü parametreleri ile hekzagonal birim hücreye sahiptir ($c/a = 8/3 = 1.633$) [49].

5.3 Çinko Oksit Nanorod Sentez Mekanizması

ZnO nanorod bir yüzeyden bağımsız ya da bağımlı olarak büyütülebilir ve yüzey üzerinde sıralı dikey büyümesi fotokatalitik uygulamalarda avantaj sağlar. ZnO kristal yapısının anizotropisi nanorod büyümesini desteklemektedir. Nanorodların anizotropik büyümesi $[0\ 0\ 0\ 2]$ yönünde c-eksen boyunca yer alır. Hidrotermal koşullarda büyüme hızları $V(0001) > V(1011) > V(1010)$ şeklinde değişik yönlerde olur [46].

ZnO kristalinin çoğunlukla c-eksen $[0\ 0\ 0\ 2]$ yönelimli büyümesinin sebebi, hegzagonal çubuğun $[0\ 0\ 0\ 1]$ bazal düzleminin polar olmasıdır. Dolayısıyla diğer düzlemlere oranla yüksek yüzey enerjisine sahiptir [50]. ZnO nanorodların silisyum yüzey üzerinde VS metodu ile büyüme mekanizması Şekil 5.4'te verilmiştir.



Şekil 5.4 Si yüzey üzerinde VS metodu ile ZnO nanorodların büyüme mekanizmasının şematik gösterimi [51].

5.4 ZnO Nanorodların Sentez Metotları

5.4.1 Elektrokaplama Metodu

Elektrokaplama ZnO nanoparçacıkların ince filmler halinde elde edilmesinde kullanılan yaygın metodlardan bir tanesidir. Başlangıç maddelerini içeren çözelti içerisinde oksijen çözülmesi ve ardından voltaj uygulanmasıyla ZnO film halinde büyütülmektedir. Bu metotta akım yoğunluğu, kaplama zamanı ve banyo sıcaklığı gibi parametreler değiştirilerek farklı çaplarda ve boyutlarda ZnO yapılar elde edilebilmektedir. Ayrıca band aralığı da elektrokaplama potansiyeline bağlı olarak değişmekte ve potansiyelin artırılmasıyla band aralığı artmaktadır. Bu metod kullanılarak nanogözenekli ZnO, nanokolumnar (kolon biçimli) ZnO, ZnO nanorod filmleri elde edilmektedir [47].

5.4.2 Buhar-Sıvı-Katı (VLS) Metodu

ZnO nanoyapıların sentezinde kullanılan diğer bir yöntem de buhar-sıvı-katı (vapor-liquid-solid, VLS) prosesidir. Bu proses 1960'lı yıllarda mikrometre mertebesinde whiskler üretmek için Wagner ve Ellies tarafından geliştirildi [52]. Tipik bir VLS prosesi bir metal katalizörün nanoboyutlardaki sıvı damlacığında gaz fazındaki reaktantların çözülmesiyle başlamaktadır. VLS prosesi yaygın bir şekilde ZnO nanorodlar ve nanoteller hazırlanmasında kullanılmaktadır [47].

5.4.3 Kimyasal Banyo Kaplama (CBD) Metodu

Kimyasal banyo kaplama (CBD) metodu ile ZnO nanorodlar elde edilmektedir. Diğer film kaplama yöntemleriyle kıyaslandığında, bu yöntem basit, yeniden üretilebilirlik, kirletici olmayan ve ekonomik bir yöntemdir. Ayrıca kompleks ekipmanlar gerektirmeden büyük miktarlarda ince filmler oluşturma özelliğine sahiptir [47].

5.4.4 Metal-Organik Kimyasal Buhar Kaplama (MOCVD)

Bir diğer yöntem de metal-organik kimyasal buhar kaplama (MOCVD) yöntemidir. Bu yöntem yarıiletken ince filmlerin proseslerinde yaygın olarak kullanılmakta ve ayrıca ZnO nanorodlar büyütme için de kullanılmaktadır. ZnO ince film ve kuantum noktaların MOCVD kullanılarak kolaylıkla hazırlanmasına rağmen, ZnO nanorodların bu yöntemle büyütülmesi son zamanlarda daha çok gerçekleştirildi [47]. Yi ve ekibi katalizör kullanmadan MOCVD yöntemini ZnO nanorod ve nanoneedle büyütme için kullandı [53]. Bu bulgudan sonra MOCVD yöntemine dayalı benzer çalışmalar değişik gruplar tarafından yapılmaktadır [47].

5.4.5 Sol-gel Metodu

Tek boyutlu nanoyapılar elde etmek için kullanılan bir yöntem de sol-jel tekniğidir [47].

5.4.6 Mikrodalga Isıtma Metodu

Son yıllarda ZnO nanoyapıların sentezinde mikrodalga ısıtma yöntemi kullanılmaya başlanmaktadır. Bu yöntem kullanılarak ZnO nanotüpler, çiçeğe benzer (flower-like) ve iğneye benzer (needle-like) şeklinde ZnO yapılar, nanorod, ve diğer farklı ZnO kristallerin sentezinde kullanılmaktadır [47].

5.4.7 Hidrotermal Sentez Metodu

Hidrotermal metod toz halinde ZnO nanoyapılar hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan bir metottur. Bu metod ile ZnO nanorodlar, nanopartikül ve nanoyapraklar, ZnO nanoteller ve nanokuşaklar, ZnO çiçek görünümlü (flower) yapılar elde edilmektedir [47].

Hidrotermal metod çoğunlukla 1D nanomateriyallerin sentezinde kullanılmaktadır. Diğer yöntemlerle kıyaslandığında hidrotermal yöntemle oluşturulmuş ZnO nanorodlar oksijen boşluklarından dolayı kristal bozukluklarına sahiptir ve sahip oldukları bu doğal bozukluklar ile geçiş metalleriyle katkılandırılmadan fotokatalitik görünür ışık sergileyebilmektedir. Hidrotermal metotla yüzey üzerinde ZnO nanorod büyümesi aşağıdaki basamakları takip eder.

- I. İnce tabakalı bir yüzey üzerine ZnO nanopartikülleri çekirdeklenir. Çekirdek tabakası, azalan termodinamik bariyer yarattığı için nanorodların büyümesini sağlar.
- II. NaOH ya da HMT gibi alkali reaktifler ve $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ve ZnCl_2 , gibi Zn^{2+} tuzunun sulu çözeltisi öncül olarak kullanılır.
- III. ZnO çekirdeklenen yüzey belli bir sıcaklıkta ve sürede büyüme çözeltisinde tutulur.
- IV. Son olarak oluşan yüzey yıkanır ve kurutulur.

HMT ve $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ öncül olarak seçildiğinde, kimyasal reaksiyon aşağıdaki eşitliklerle özetlenebilir.

1. Bozulma reaksiyonu : $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4 + 6\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 6\text{HCHO} + 4\text{NH}_3$
2. Hidrotermal besleme reaksiyonu: $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \longleftrightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$
3. Aşırı doygunluk reaksiyonu: $2\text{OH}^- + \text{Zn}^{2+} \longrightarrow \text{Zn}(\text{OH})_2$
4. ZnO nanorod büyüme reaksiyonu: $\text{Zn}(\text{OH})_2 \longrightarrow \text{ZnO} + \text{H}_2\text{O}$

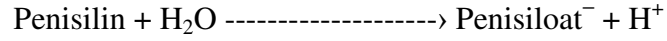
ZnO nanorodların büyüme parametrelerinden biri olan reaktanların aşırı doygunluğu, kontrol edilebilmektedir. Yüksek aşırı doygunluk düzeyleri kristal büyümesini desteklemektedir. Eğer kısa zamanda hidroksil iyonu fazla olursa, çözeltideki çinko iyonları yüksek pH'dan dolayı çökmekte ve ZnO nanorod üretiminde çinko iyonlarının etkisi azalmaktadır. Besleyici maddenin hızlı tüketimi daha fazla nanorod üretimini önlemektedir. Çözeltideki hidroksil iyonu konsantrasyonu bütün nanorod üretimi boyunca düşük aşırı doygunluk sağlanması için kontrol edilmelidir [46].

ZnO nanorodların hidrotermal sentezi sırasında HMT dışında ortama hidroksil iyonu sağlayan NaOH, KOH veya Na_2CO_3 gibi reaktifler mevcuttur. ZnO nanorodların sentezinde alkali reaktif olarak NaOH, KOH, ya da Na_2CO_3 seçilirse reaksiyon sıcaklığı artar ($>100^\circ\text{C}$) ve teflon-kaplı pas tutmayan otoklav içinde basınç oluşturulmasıyla nanorodlar sentezlenir. HMTA, amonyum ya da etilendiamin alkali reaktif olarak seçilirse düşük sıcaklıklarda ($<100^\circ\text{C}$) ve atmosferik koşullarda ZnO nanorodlar sentezlenir. HMTA reaksiyon sırasında birçok görev üstlenmektedir. Birincisi, HMTA termal bozunma ile çöktürme reaksiyonu için hidroksil iyonu sağlamasıdır. İkincisi, HMTA termal bozunma sırasında azalan hidroksil iyonlarına karşı pH tamponu görevi görmesidir. HMTA'nın hidroliz oranı artan pH ile ters bir etki ile azalır. Üçüncüsü, HMTA ZnO nanorodların polar olmayan yüzeylerine tutunarak onları çinko iyonlarını (001) polar yüzeyinden epitaksiyel büyüme için korumasıdır [46].

5.5 Penisilin Tayininde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış

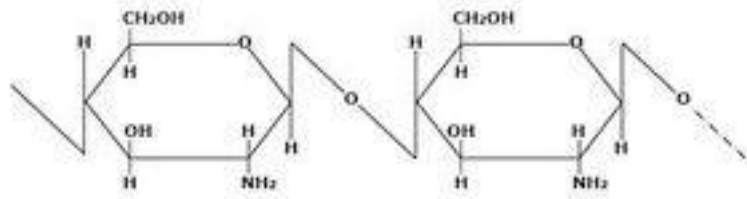
5.5.1 Penisilinaz

Penisilinaz enzimi penisilin indirgenerek penisiloat ve hidrojenin oluşturduğu reaksiyonu katalizler.



5.5.2 Kitosan

Kitosan, kitinden kısmi deasetilasyon yoluyla elde edilen, reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip; kimyasal yapı olarak seluloza benzeyen doğal bir biyopolimerdir. Tez çalışmamızda kitosan, penisilaz enziminin elektrot yüzeyine daha iyi immobilizasyonunu sağlamak ve elektrot yüzeyinden enzim kaybını önlemek için kullanılmıştır.



Şekil 5.5 Kitosanın kimyasal yapısı [52]

5.5.3 Çinko Oksit Nanorod

ZnO nanorodlar, yüksek spesifik yüzey alanı, toksik olmaması, kimyasal stabilitesi, elektrokimyasal aktivitesi, yüksek elektron iletkenliğine sahiptir ve en önemli yarı iletken maddelerden biridir. Ayrıca yaklaşık 9.5'lik yüksek izoelektrik noktası sayesinde proteinlerin ZnO nanorod yüzeyine elektrostatik olarak immobilize olmasını sağlamaktadır [12]. Bu özellikleri sebebiyle biyosensör uygulamalarında geniş kullanım alanına sahiptir.

MATERYAL VE METOD

6.1 Kullanılan Cihazlar

Çözeltilerin potansiyel ölçümleri ORION 4 Star Benchtop pH-iyonmetre ile yapıldı. pH ölçümleri ise; Sartorius PB-11 pH metre kullanıldı. Referans elektrot olarak çift temaslı gümüş-gümüş klorür elektrot kullanıldı (Orion 90-02). Bu elektroda iç dolgu çözeltileri olarak ORION 900002 ve 900003 katalog numaralı çözeltiler dolduruldu. Çözelti ilaveleri için Brand marka mikropipetler kullanıldı. Çalışmalar süresince kullanılan bidestile su PURELAB Classic cihazı kullanılarak temin edildi. Hazırlanan çinko oksit nanorodlar, Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan EVO LS-10 Zeiss markalı Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak görüntülendi.

6.2 Kullanılan Numuneler

6.2.1 Gerçek Numune

Alfoxil 500 mg marka ilaçtan temin edilmiştir.

6.3 Kullanılan Enzimler

Çalışmada kullanılan penisilaz enziminin numarası, elde edildiği kaynak ve temin edildiği firma Çizelge 6.1'de verildi.

Çizelge 6.1 Tez çalışmasında kullanılan penisilinaz enzimi hakkında bilgi

Enzimin Adı	Numarası	Kaynağı	Temin Edilen Firma
Penisilinaz [1150.39 Units/g]	E.C. 3.5.2.6	Bacillus cereus	Sigma

6.4 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan D-(+)- glukoz monohidrat, kitosan, L-askorbik asit, sodyum fosfat dibazik ve sodyum fosfat monobazik Sigma'dan; ürik asit Fluka'dan, nanorod sentezi için kullanılan hekzametilentetramin ve çinko nitrat tetrahidrat Merck'den temin edildi ve saflaştırılmadan kullanıldı.

6.5 Kullanılan Çözeltiler

6.5.1 0.1M Fosfat Tamponu Çözeltisi (pH 7.4)

Monobazik sodyum fosfat (NaH_2PO_4) çözeltisi: 1.1998 g NaH_2PO_4 hassas terazide tartıldıktan sonra suda çözülüp hacmi bidestile su ile 100 mL'ye tamamlanarak 0.1 M'lık stok çözeltisi hazırlandı. 1.4196 g Na_2HPO_4 tartılarak bir miktar suda çözüldükten sonra, daha önce hazırlanan 0.1 M'lık monobazik sodyum fosfat çözeltisi ile karıştırılarak çözeltinin pH'sı 7.4 olarak ayarlandıktan sonra çözelti hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Tampon çözeltiler kullanılmadıkları zaman buzdolabında saklandı.

6.5.2 Penisilinaz Enzim Çözeltisi

10 mg penisilinaz enzimi, 1 mL 0.1 M fosfat tamponunda (pH 7.4) çözülerek hazırlandı. Hazırlanan enzim çözeltisi kullanılmadığı zaman -20°C 'de saklandı.

6.5.3 Kitosan Çözeltisi

50 mg kitosan, 10 mL %1' lik asetik asit çözeltisinde oda sıcaklığında 3 saat karıştırılarak %5'lik kitosan çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltinin pH'sı 0.1 M NaOH çözeltisiyle 7.4' e ayarlandı. Hazırlanan çözelti kullanılmadığı zaman $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

6.5.4 ZnO Nanorod/Kitosan Çözeltisi

2 mg ZnO nanorod, 1 mL kitosan çözeltisine (6.5.3'te belirtildiği şekilde hazırlanan) eklenerek vortekslenerek karıştırıldı. Hazırlanan çözelti kullanılmadığı zaman +4°C'de saklandı.

6.5.5 Penisilinaz /Kitosan Çözeltisi

1 mL kitosan çözeltisine (6.5.3'te belirtildiği şekilde hazırlanan) 0.4 mL penislin enzim çözeltisi (5.5.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan) eklenerek hazırlandı. Hazırlanan çözelti kullanılmadığı zaman -20°C'de saklandı.

6.5.6 Penisilin Çözeltileri

4.9542 g penisilin bidestile suda çözülüp hacmi 25 mL'ye tamamlanarak 1.0 M'lık çözeltisi hazırlandıktan sonra gerekli seyreltmeler yapılarak 1.0×10^{-1} - 1.0×10^{-4} M konsantrasyon aralığında stok penisilin çözeltileri hazırlandı

Penisilin tayini için kalibrasyon çözeltileri: Kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi için kullanılan penisilin çözeltileri Çizelge 5.2'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 6.2 Penisilin kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Hazırlanan Penisilin Çözeltileri (M)	İlave edilen stok penisilin çözelti miktarı (mL)					0.1M Fosfat Tamponu (mL)
	1.0	1.0×10^{-1}	1.0×10^{-2}	1.0×10^{-3}	1.0×10^{-4}	
1.0×10^{-1}	2.5					2.5
5.0×10^{-2}	1.25					2.5
2.5×10^{-2}	0.625					2.5
1.0×10^{-2}		2.5				2.5
5.0×10^{-3}		1.25				2.5
2.5×10^{-3}		0.625				2.5
1.0×10^{-3}			2.5			2.5
5.0×10^{-4}			1.25			2.5
2.5×10^{-4}			0.625			2.5
1.0×10^{-4}				2.5		2.5
5.0×10^{-5}				1.25		2.5
2.5×10^{-5}				0.625		2.5
1.0×10^{-5}					2.5	2.5
Saf su ilave edilerek çözeltiler belirlenen optimum pH'a ayarlanarak çözelti hacmi 25.0 mL'ye tamamlandı.						

6.5.7 Standart Katma Yöntemi ile Gerçek Numunede Penisilin Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Standart katma yöntemiyle, çinko oksit nanorod ve kitosan kullanılarak hazırlanmış olduğumuz penisilin biyosensörü ile gerçek numune örneğinde penisilin tayini için kullanılan çözeltilerin hazırlanması Çizelge 6.3'de verildi.

Çizelge 6.3 Penisilin çözeltilerinin hazırlanması

	Çözelti No				
	1	2	3	4	5
İlave edilen 10^{-3} M penisilin çözeltisi (mL)	0	0.1	0.2	0.4	0.6
0.1 M Fosfat tamponu (pH 7.4) (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Alfoxil	200	200	200	200	200
	Saf su ilave edilerek çözeltiler belirlenen optimum pH'a ayarlanarak çözelti hacmi 25.0 mL'ye tamamlandı.				

6.6 Penisilin Biyosensörleri

6.6.1 Penisilin Biyosensörlerinin Hazırlanması

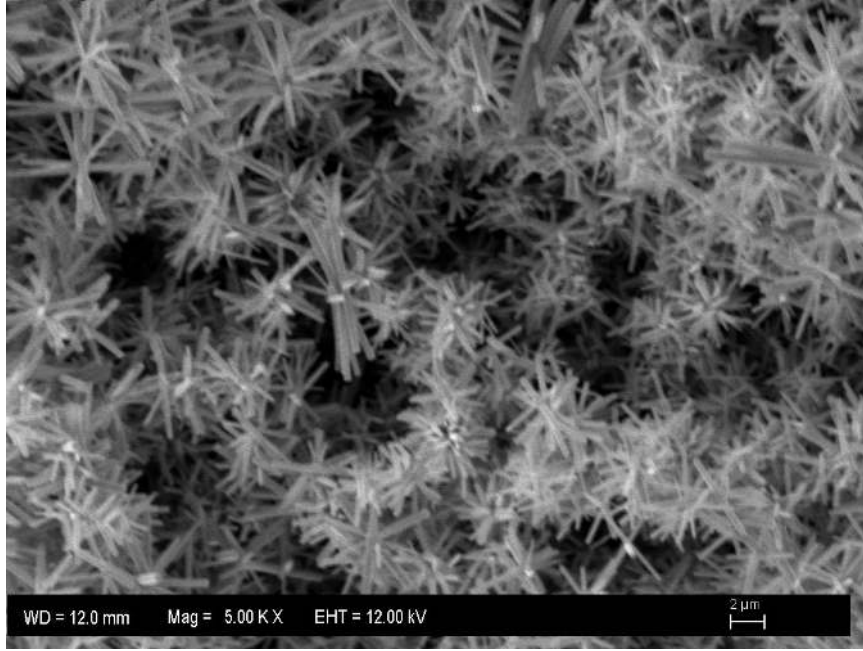
Gümüş tel kullanılarak hazırlanmış çinko oksit nanorodlara penisilinaz enzimini immobilize edildi ve penisilinaz nanorod yüzeyine daha iyi immobilize olmasını sağlamak için kitosan kullanılarak penisilin biyosensörü elde edilmiştir. Biyosensör hazırlanmadan önce ilk olarak çinko oksit nanorod hazırlanmıştır.

6.6.1.1 Hidrotermal Yöntemle Çinko Oksit Nanorod'un Hazırlanması

Çinko oksit nanorodlar bir yüzeye (gümüş, altın tel veya levha, vb.) bağımlı veya yüzeyden bağımsız olarak oluşturulabilir. Tez çalışmamızda her iki yöntemle ZnO nanorod üretimi gerçekleştirilmiştir.

Yüzey bağımlı ZnO nanorod sentezi için; gümüş tel aseton, etanol ve saf suda yıkandıktan sonra 25'er mL hacimlerde 0.025M $Zn(NO_3)_2$ ve 0.025M heksametilen tetraminin (HMT) karıştırılıp hazırlanmasından oluşan 95°C'deki çözeltiye daldırıldı ve çözeltinin buharlaşması için yaklaşık 2-4 saat bekletildi. Gümüş tel yüzeyinde beyaz renkli tabakanın görülmesi, ZnO nanorodların oluştuğunu göstermektedir. Kaplanan tel saf su ile yıkandı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek kuruması sağlandı. Oluşan

nanorodların SEM görüntüsü alınarak kaplamanın en iyi şekilde gerçekleştiğinden emin olundu (Şekil 6.1).



Şekil 6.1 Nanorodların SEM görüntüsü.

Yüzey bağımsız ZnO nanorod sentezi için; 25'er mL hacimlerde 0.025M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ve 0.025M hekzametilen tetraminin (HMT) bir beher içinde karıştırılıp hazırlanmasından oluşan çözelti 95°C 'de 2-4 saat bekletilerek tamamen buharlaştırıldı. Beherin dip kısmında oluşan beyaz renkli tabaka, ZnO nanorodların oluştuğunu göstermektedir.

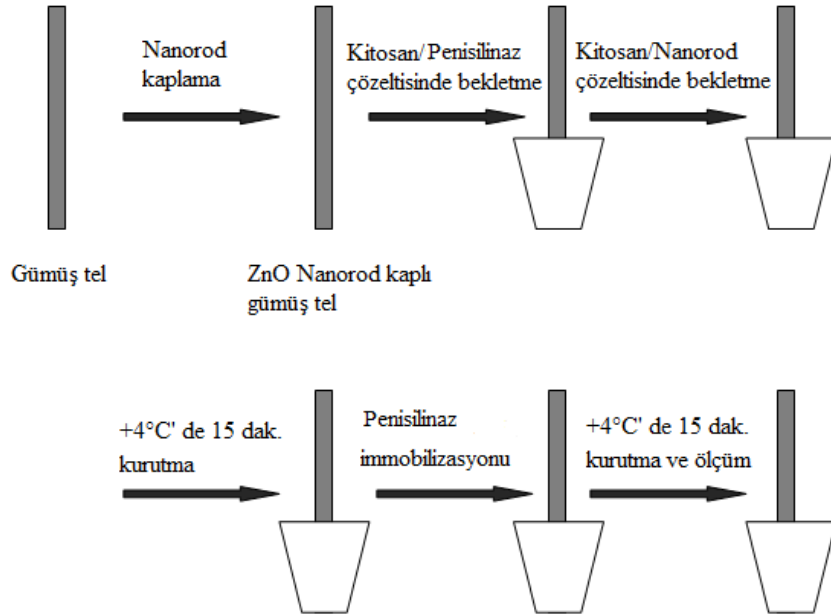
6.6.1.2 Biyosensör P'nin Hazırlanması

Penisilin biyosensörü, hem yüzey bağımlı hem de yüzey bağımsız ZnO nanorod kullanılarak hazırlanmıştır.

1. Yüzey bağımlı ZnO nanorod, 0.1 M fosfat tamponunda (pH 7.4) 5 dakika bekletilerek nanorod üzerinde hidrofilik yüzeylerin oluşması sağlandı.
2. Nanorod, 1 ml kitosan / 0.5 mL penisilinaz enzimi içeren (7.4) çözeltiye daldırılarak 30 dakika bekletildi.

3. Elektrot 1 mL kitosan çözeltisi içinde 2 mg yüzey-bağımsız ZnO nanorodun karıştırılmasıyla elde edilen çözeltide 15 dakika bekletilerek yüzey-bağımsız ZnO nanorod partiküllerinin elektrot yüzeyine tekrar tutunması ve yüzeyinin kitosan ile kaplanması sağlandı. Bu şekilde pensilin biyosensörünün iletkenliğinin daha da artması ve penisilinaz enzimin yüzeye daha iyi immobilize olması gerçekleştirildi.
4. Hazırlanan penisilin biyosensörü, +4°C’de 15 dakika bekletilerek kurutuldu.
5. Kuruyan penisilin biyosensörü 1 saat boyunca 1 mL penisilinaz (pH: 7.4) enzim çözeltisinde bekletildi. Böylece enzimin nanorod yüzeyine elektrostatik olarak immobilize olması sağlandı.
6. Hazırlanan penisilin biyosensörü kuruması için +4°C’de 15 dakika bekletildi. Hazırlanan biyosensör “Biyosensör P” olarak adlandırıldı.

Biyosensör P'nin hazırlanması şematik olarak Şekil 6.2'de görülmektedir.



Şekil 6.2 Biyosensör P'nin hazırlanma şeması

6.6.2 Penisilin Biyosensörlerinin Çalışma Aralıklarının ve Eğimlerinin Belirlenmesi

Hazırlanan penisilin biyosensörünün analitik özelliklerini incelemek amacı ile aşağıda verilen elektrokimyasal hücreler oluşturuldu ve sıcaklık $25.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 'ta ayarlandı.

Referans elektrot /deney çözeltisi /kitosan /penilnaz/ZnO nanorod kaplı gümüş tel / Ag;AgCl

Elektrokimyasal hücredeki penisilin çözeltilerinin konsantrasyonu 1.0×10^{-1} - $1.0 \times 10^{-7}\text{M}$ arasında değiştirildi. Penisilin çözeltilerinin pH'ları fosfat tamponu ile optimum pH'a ayarlandı ve hazırlanan elektrotlar için ayrı ayrı hücre potansiyelleri kaydedildi. Her bir elektrot için $\log[\text{penisilin}]$ 'a karşı potansiyel değerleri (mV) grafiğe geçirildi ve biyosensörlerin çalışma aralığı ve eğimleri belirlendi.

6.6.3 Penisilin Biyosensörlerinin Performansına Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi

Hazırlanan penisilin biyosensörlerinin cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun pH'nın, sıcaklığın, karıştırma hızının etkisi, tekrarlanabilirliği, cevap süresi, girişim etkisi belirlenerek raf ömrü tayin edildi.

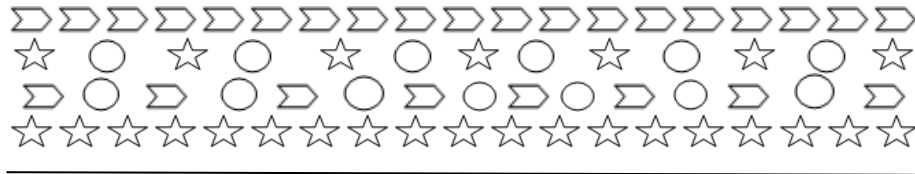
6.6.4 Penisilin Biyosensörlerinin Tekrarlanabilirliği

Tekrarlanabilirlik, biyosensörler için önemli bir parametridir. Enzim preparatının aktivitesi, kararlılığı, saflık düzeyi hazırlanacak enzim sensörü ile tekrarlanabilir sonuçlar alınmasında önemlidir. Ancak biyosensör hazırlama aşamaları ve çalışma ortamı açısından beklenen niteliklerde oldukça büyük farklılıklarla karşılaşmakta mümkündür. Hazırlanan bir biyosensör ile tekrarlanabilirlik denemelerinin en basiti aynı örnekte ardı ardına ölçüm yapılması, elde edilen değerlerden eğimlerin hesaplanarak her bir eğim değerinin yüzdeye çevrilerek grafiğe geçirilmesidir.

Aynı gün içerisinde aynı biyosensör ile hazırlanan penisilin kalibrasyon çözeltileri (10^{-5}M - 10^{-7}M arasında 10 seri) ile 15 dakikada bir defa mV ölçümü yapıp kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve her bir grafiğin eğimi belirlenmiştir. Eğim değerlerinin sayısal olarak en büyüğü 100 kabul edilip diğer eğim değerleri ona göre hesaplanarak grafiğe geçirildi.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında, sentezini gerçekleştirdiğimiz yüzey bağımlı ve yüzey bağımsız ZnO nanorod ve kitosan yüzeyine penisilinaz enziminin immobilize edilmesi ile penisilin biyosensörü hazırlanmıştır. Elde edilen biyosensör “Biyosensör P” olarak adlandırılmıştır. Hazırlanan biyosensörün şematik gösterimi Şekil 7.1’de yer almaktadır.



Şekil 7.1 ZnO nanorod (☆) ve kitosan (○) temelli, penisilinaz enziminin (⋈) immobilizasyonu ile hazırlanan penisilin biyosensörünün şematik gösterimi.

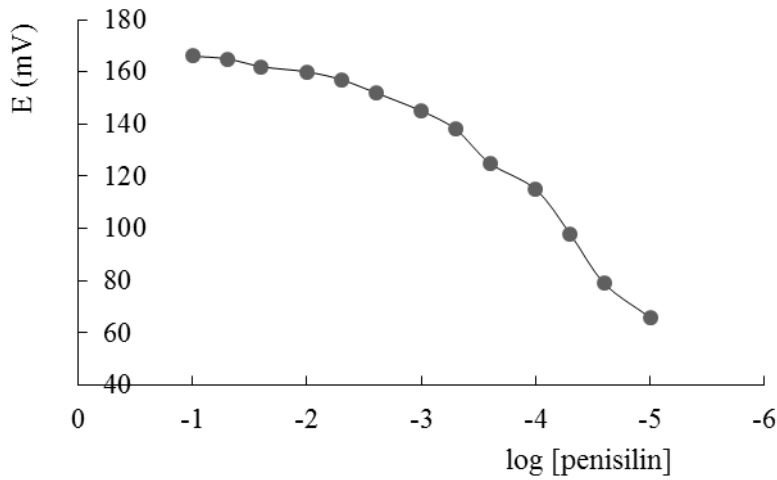
Hazırlanan penisilin biyosensörünün biyokimyasal karakterizasyonu yapıldıktan sonra Alfoksil isimli farmasötik preparatta penisilin miktarı başarı ile tayin edilmiştir.

Penisilinaz enziminin penisiline etkisi sonucu penisiloat ve hidrojen iyonunun oluşması, ortamda bulunan penisilin miktarı ile orantılı olarak elektrot potansiyelinde değişmeye neden olmaktadır.

Biyosensörle yapılan ölçümlerde, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen iyonundan dolayı okunan potansiyel değerlerinin penisilin konsantrasyonuna karşı grafiği çizildikten sonra grafiğin eğim değerleri belirlendi.

7.1 Penisilin Biyosensörünün Kalibrasyon Grafiği

Penisilin biyosensörünün kalibrasyon grafiği Şekil 7.2’de verilmiştir.



Şekil 7.2 Biyosensör P'nin kalibrasyon grafiği

Çizelge 7.2’den penisilin biyosensörünün çalışma aralığı 1.0×10^{-2} - 1.0×10^{-5} M, eğim değeri ise 24.8 mV/p[penisilin] olarak belirlenmiştir.

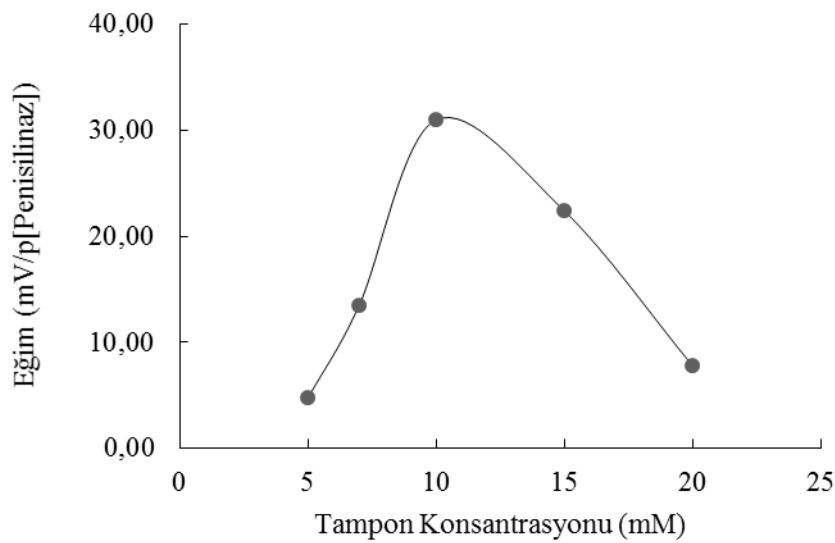
Usman Ali ve arkadaşları, 2011 yılında yaptıkları çalışmada Ag/AgCl referans elektrotlar ile oda sıcaklığında hazırladıkları penisilin tuz konsantrasyonlarında 100 μ M -100 mM aralığında yanıt aldıkları göstermişlerdir [1]. Li ve arkadaşları 2005 yılında, altın nanopartiküler kullanılarak trans seviyesinde elektrokimyasal Penisilin G immunosensör geliştirmek istenmiştir. Penisilin biyosensörü çalışma aralıkları 3.34×10^{-3} M - 1×10^3 M olarak tespit etmişlerdir [53].

7.2 Tampon Konsantrasyonunun Etkisi

Penisilin biyosensörlerinin performansına tampon konsantrasyonunun etkisini incelemek için 5 farklı konsantrasyonda (5, 7, 10, 15 ve 20 mM) fosfat tamponu kullanılarak hazırlanan penisilin çözeltilerinde (pH 7.4) biyosensörle potansiyel ölçümleri yapılarak kalibrasyon grafikleri çizildi ve tampon konsantrasyonuna karşı eğim değerleri Çizelge 7.1’de, grafiği de Şekil 7.3’de verildi.

Çizelge 7.1 25,0±1,0°C’da kitosan kullanılarak hazırlanmış penisilin biyosensörünün cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi

Tampon Konsantrasyonu (mM)	Eğim, (mV/p[penisilin])
	Biyosensör P
5	4.8
7	13.5
10	31.0
15	22.4
20	7.8



Şekil 7.3 Biyosensör P’nin eğiminin tampon konsantrasyonu ile değişimi

Çizelge 7.1 ve Şekil 7.3’den de görüleceği gibi, penisilin biyosensörü için en yüksek eğimin elde edildiği optimum tampon konsantrasyonunun 10 mM olduğu bulundu.

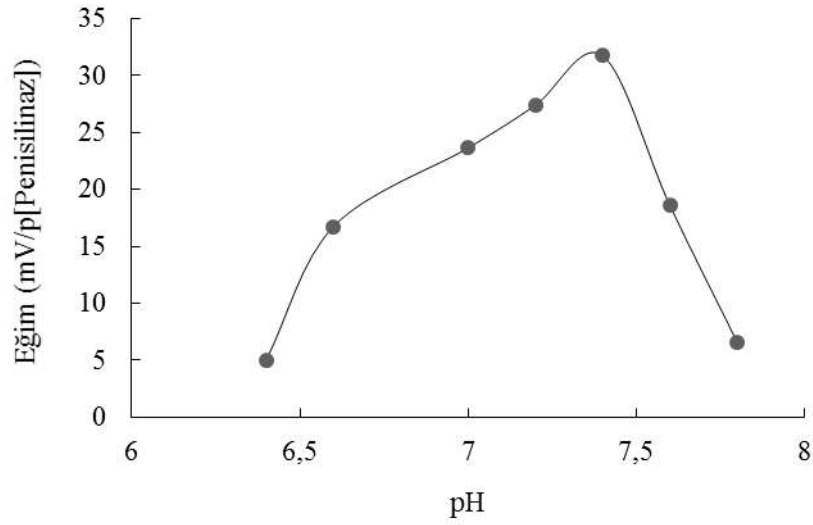
Liang ve arkadaşları (1997) hazırladıkları amperometrik penisilin biyosensörü ile 5, 10, 20 ve 40 mM ölçümleri yapılmış, optimum tampon konsantrasyonu 20 mM fosfat tamponunda belirlenmiştir [14]. Bu tez çalışmasında ise ölçümler için fosfat tamponu kullanılmış, optimum tampon konsantrasyonu 10 mM olarak belirlenmiştir. Tampon konsantrasyonu artması, hazırlamış olduğumuz biyosensör eğiminde düşüşe yol açmıştır (Çizelge 7.1 ve Şekil 7.3).

7.3 pH’ın Etkisi

Penisilin biyosensörünün performansına pH’nın etkisini incelemek için 7 farklı pH’da (6.4; 6.6; 7.0; 7.2; 7.4; 7.6 ve 7.8) ve optimum tampon konsantrasyonunda penisilin çözeltileri hazırlandıktan sonra kalibrasyon grafikleri çizilerek eğimleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 7.2 ve Şekil 7.4’te verildi.

Çizelge 7.2 25,0±1,0°C’da Penisilin biyosensörünün cevabına pH’nın etkisi

pH	Eğim, (mV/p[penisilin])
6.4	5.05
6.6	16.75
7	23.65
7.2	27.4
7.4	31.75
7.6	18.6
7.8	6.6



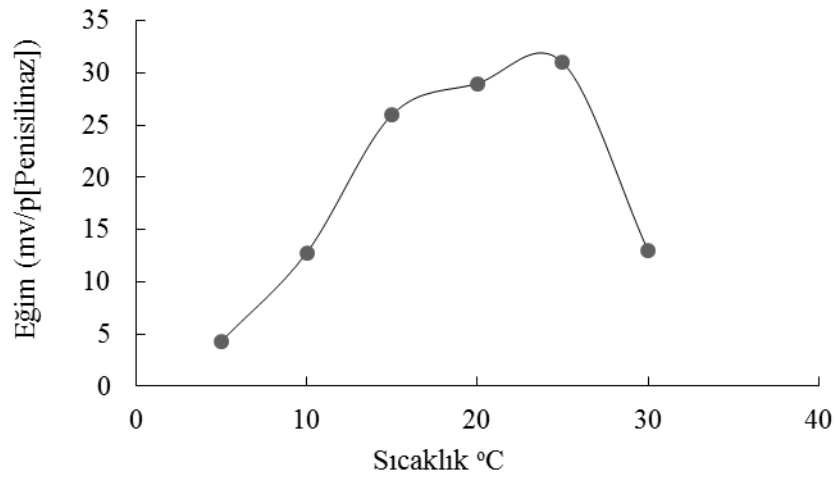
Şekil 7.4 Penisilin biyosensörünün eğiminin pH ile değişimi

Çizelge 7.2 ve Şekil 7.4'te görüldüğü gibi, Biyosensör P'nin eğiminin pH 7.4'de maksimum değere ulaştığı bunun altında ve üstündeki pH değerlerinde azalış gösterdiği görülmektedir. Biyosensör P'nin optimum pH'sı 7.4 olarak belirlenmiştir.

Liang ve arkadaşları 1998'de yaptıkları penisilin biyosensörü çalışmasında, 20 mM olan fosfat tamponunda pH değerleri 6, 7, 8 olmak üzere 3 değerinde ölçüm yapılmış ve optimum pH'nın 7 olduğuna karar verilmiştir [14]. Thust ve arkadaşları 1996 yılında yaptıkları potansiyometrik penisilin biyosensörü çalışmasında 3 ve 10 arasındaki pH değerleri karşılaştırılmıştır. Optimum değer bu çalışmada da 7 olarak tespit edilmiştir. Çalışma bu değerinde devam ettirilmiştir [12]. Bu tezde ise optimum pH'sı 7.4 olarak tespit edildi.

7.4 Sıcaklığın Etkisi

Penisilin biyosensörlerinin performansına sıcaklığın etkisini incelemek için, 5 farklı sıcaklıkta (5, 10, 20, 25 ve 30°C), biyosensörün optimum tampon konsantrasyonunda ve optimum pH'sında hazırlanan penisilin çözeltileri ile ayrı ayrı potansiyel ölçümleri yapılarak kalibrasyon grafikleri çizildi (Şekil 7.5). Elde edilen eğim değerleri Çizelge 7.3'te verildi.



Şekil 7.5 Pensilin biyosensörlerinin eğiminin sıcaklık ile değişimi

Çizelge 7.3 Penisilin biyosensörünün cevabına sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Eğim, (mV/p[penisilin])
5	4.3
10	12.8
15	28
20	24
25	31
30	13

Çizelge 7.3 ve Şekil 7.5'ten görüldüğü gibi, Biyosensör P, 10°C'nin altındaki ve 25°C'nin üzerindeki sıcaklık değerinde cevap vermemiştir. Biyosensör P'nin maksimum performans gösterdiği sıcaklık değeri 25°C olarak bulunmuştur.

Usman Ali ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları penisilin biyosensörü çalışmalarında 20°C ile 80°C arasında maksimum değeri 50°C olarak ölçülmüş, ancak bu değer

biyosensörde oda sıcaklığındaki kadar kararlılık görememişlerdir [1]. Bu nedenle literatürde penisilin biyosensörleri ile yapılan çalışmalar genellikle 20-25°C sıcaklık aralıklarında çalışılmıştır.

7.5 Girişim Etkisi

Hazırlanan ZnO nanorod temelli penisilin biyosensörünün performansına bazı maddelerin girişim etkisi yapıp yapmadığını belirlemek amacıyla, 10^{-6} M penisilin kalibrasyon çözeltisi (pH: 7.4) kullanılarak ortamdaki girişimci maddelerin 3 farklı konsatrasyonda olacak şekilde kalibrasyon çözeltileri (pH: 7.4) hazırlanmıştır. Sadece penisilin içeren ve penisilin ile girişimci madde içeren kalibrasyon çözeltilerinde ayrı ayrı mV ölçümleri yapılmış sonuçlar Çizelge 7.4’de belirtilmiştir.

Çizelge 7.4 Penisilin biyosensörüne bazı türlerin girişim oranları

Girişimci Madde	Konsantrasyon (M)			Girişim Etkisi (%)
Sefalosforin	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	0.0
L-askorbik asit	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	0.0
Ürik asit	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	0.0
Glisin	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	0.0
L-glukoz	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	0.0
D-glukoz	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	0.0
Sukroz	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	0.0
Laktoz	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	0.0
KCl	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	0.0
NaCl	10^{-2}			0.0
	10^{-3}			12.2
	10^{-4}			8.6
	10^{-3}			0.0
Ürik asit	10^{-2}			0.0
	10^{-3}			10.4
	10^{-4}			0.0

Usman Ali ve arkadaşları yapılan penisilin biyosensörü ile çalışmalarında Na^{+1} , K^{+1} , D-glukoz, L-glukoz, askorbik asit, urik asit, urea, sukroz, laktoz, glisin, penisilonik asit ve sepholosporin kullanarak girişim etkisi araştırılmıştır. Bu maddelerin girişim etkisi olamduğu tespit edilmiştir [1].

7.6 Karıştırma Hızının Etkisi

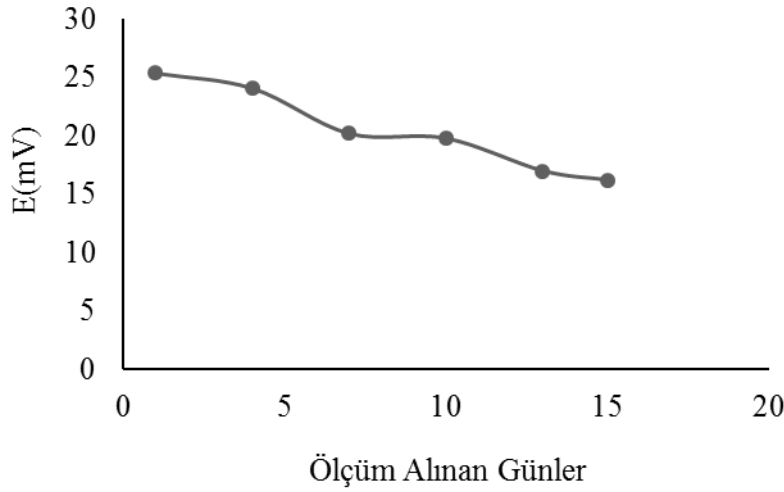
Penisilin biyosensörlerinin cevabına karıştırma hızının etkisini belirlemek amacıyla manyetik karıştırıcının hızı 300, 400 ve 500 rpm olmak üzere üç farklı hıza ayarlanarak glukoz çözeltilerinin potansiyelinin kararlı hale gelmesi için beklendi. Alınan ölçümler kıyaslanğında karıştırma hızının artmasının biyosensörün potansiyeline herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü.

7.7 Cevap Süresi

Biyosensör için cevap zamanı oldukça önemlidir, ideal bir biyosensör kısa sürede sonuç verebilmelidir. Penisilin biyosensörlerinin cevap süresini bulabilmek için optimum şartlarda hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki penisilin çözeltilerine penisilin biyosensörü ve referans elektrot daldırılarak yapılan ölçümlerde potansiyellerinin kararlı hale gelmesi için geçen süre kaydedildi. Cevap zamanı ile belirtilen, biyosensörün analizlenecek maddenin bulunduğu ortama temas ettiği andan itibaren ölçüm düzeneğinden sonucun okunduğu ana kadar geçen süredir. Biyosensörler için cevap zamanı 5 dakikaya kadar olan değerler uygun kabul edilirken, 10 dakika uzun bir süre olarak görülür [54]. Penisilin biyosensörlerinin cevap zamanı, yaklaşık 1-4 dakika arasındadır, 1 dakikadan daha kısa sürede sonuç verdiği de gözlenmiştir. Bu sonuç, hazırlamış olduğumuz penisilin biyosensörünün de cevap zamanının oldukça kısa olduğunu göstermektedir.

7.8 Raf Ömrü ve Tekrarlanabilirlik

Penisilin biyosensörlerinin raf ömrünü belirlemek amacıyla, Biyosensör P +4°C’de depolanmış, haftada iki gün penisilin çözeltilerinde mV ölçümleri alınarak eğim değerleri belirlenmiştir. On beş günün sonunda biyosensörün az da olsa cevap verdiği gözlemlenmiştir. Bu durum biyosensörümüzün uzun süre kullanılabileceğini göstermiştir. Şekil 7.6’de görüldüğü gibi, 15 gün boyunca aralıklı olarak ölçüm alınan Biyosensör P’nin raf ömrü grafiği aşağıda çizilmiştir.



Şekil 7.6 Penisilin biyosensörün raf ömrü grafiği

Usman Ali ve arkadaşları ZnO nanorod kullanılarak yaptıkları penisilin biyosensörü çalışmasında yaklaşık 4 hafta boyunca aralıklı olarak ölçüm almışlardır. Enzim aktivitesinin %90'ı koruduğu tespit edilmiştir [1].

Penisilin biyosensörlerinin tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla aynı gün içinde aynı biyosensör ile hazırlanan 3 seri penisilin kalibrasyon çözeltilerinde mV okumaları yapıldı ve her ölçüm için kalibrasyon grafiği çizilerek eğimleri belirlendi. Sayısal olarak en büyük eğim değeri %100 olarak kabul edilerek diğer eğim değerleri de ona göre hesaplandı ve biyosensörde de alınan ikinci ölçümlerde %70'e varan azalış görüldü.

Bu çalışmada biyosensörün raf ömrünün iyi ve tekrarlanabilirliğinin düşük olduğunu belirledik. Aynı anda birden fazla gümüş tel, çinko oksit nanorod kaplanabilir. Teller kaplanmış bir şekilde bulunduğu biyosensörün hazırlanması Biyosensör P için ise 1.45 saat sürmektedir. Biyosensörlerle çalışma yaptıktan sonra, nanorod kaplı elektrotlar zımparalanıp tekrar biyosensör hazırlanmasında kullanılabilmesi, biyosensör hazırlama yönteminin maliyetini oldukça düşürmektedir. Geliştirmiş olduğumuz biyosensörün tekrarlanabilirliği düşük olmasına rağmen, raf ömrünün iyi olmasının

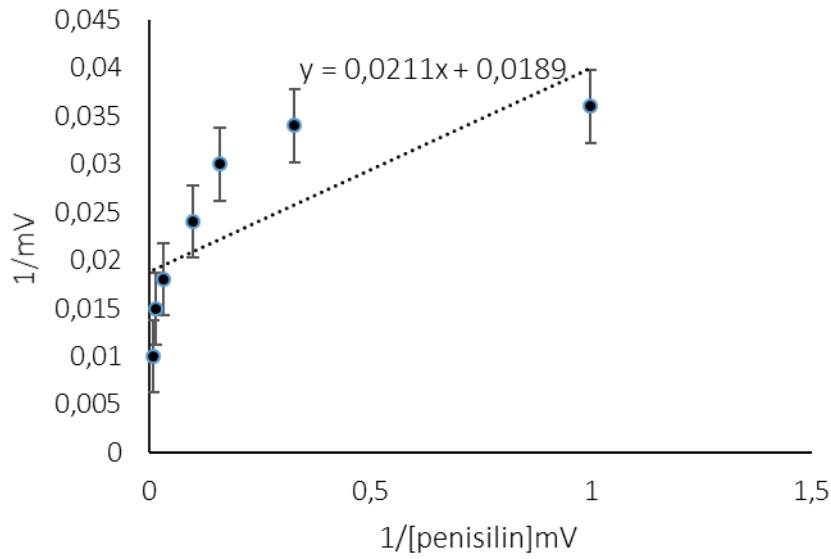
yanında biyosensör hazırlamasının kolay, pratik ve maliyetinin düşük olması ona üstün avantajlar sağlamaktadır.

7.9 Enzim Kinetik Parmetrelerinin (Km ve Vmax değerleri) Belirlenmesi

Reaksiyonların hızları, mekanizmaları ve hıza etki eden faktörlerin neler olduğunu inceleyen fizikokimya alt dalına kimyasal kinetik denir [55]. Biyokimyasal reaksiyonlar için enzimlerin kinetik parametrelerinin (Km ve Vmax değerleri) belirlenmesi, enzimle yapılan çalışmalarda, enzim biyosensörlerinde enzimin çalışması hakkında önemli bilgi sağlaması bakımından çok önemlidir.

Maksimum hız, Vmax, enzimatik katalizin ulaşabileceği en yüksek hız değeridir. Enzim bölgeleri substrat ile tam doygunluğa geçince maksimum hıza (Vmax) ulaşır. Michaelis-Menten sabiti, Km, en yüksek hız değerinin yarısına ulaşmak için gerekli substrat miktarıdır, enzime ve substrata özgüdür, enzimin substrata olan ilgisini yansıtır. Km'si düşük olan bir enzim, substratına yüksek ilgi (affinite) gösterir [56].

Hazırlamış olduğumuz penisilin biyosensöründe immobilize olmuş penisilinaz enziminin Km sabitini bulmak amacıyla penisilin konsantrasyonuna karşı potansiyel değişimi verilerinden yararlanılarak Lineweaver-Burk grafiği ($1/[\text{penisilin}] - 1/\Delta mV$ grafiği) çizilmiş ve bu grafikten enzimin Km ve Vmax değeri belirlenmiştir. İlgili verilerden yararlanılarak Şekil 7.6 ve Şekil 7.7' de verilen $1/[\text{penisilin}] - 1/\Delta mV$ grafiği çizilerek elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinden, Biyosensör P için penisilinaz enziminin Km değeri 0.089 mM, Vmax değeri ise 52.9 mV/dakika olarak bulunmuştur.



Şekil 7.7 Biyosensör P'nin penisilinaz için Lineweaver-Burk grafiği

Gonçalves ve arkadaşları (2013), altın elektrod kullanılarak hazırladıkları amperometrik penisilin biyosensöründe penisilinaz enziminin K_m değerini 0.094 mM olarak bulmuşlardır [13]. Bizim geliştirdiğimiz Biyosensör P ile yaptığımız ölçümlerde bu değer 0.89 mM olarak bulunmuştur.

7.10 Gerçek Numunelerde Penisilin Tayini

7.10.1 Ticari Farmasötik Formulasyonda Penisilin Tayini

Hazırladığımız penisilin biyosensörünün gerçek numunelerde kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldı. Bu amaçla satın alınan Actavis firmasına ait Alfoksil 500 mg tabletlerdeki penisilin miktarı tayini, standart katma yöntemi kullanılarak belirlendi.

Çizelge 7.5 Serumda penisilin tayini için penisilin ile elde edilen sonuçlar

Alfoksil 500 mg tozunda bulunan referans değeri ($\mu\text{g} / 200\mu\text{L}$)	Penisilin Biyosensörü ($\mu\text{g} / 200\mu\text{L}$)
25.1 $\pm$ 1	25.4 $\pm$ 1

Çizelge 7.5’da görüldüğü gibi, Alfoksil 500 mg’daki penisilin miktarı ile hazırladığımız biyosensörün sonuçları birbirine yakındır. Bu durum penisilin tayinin sensörümüzle başarılı şekilde yapıldığını ortaya koymaktadır.

BÖLÜM 8

SONUÇ

Bu çalışmada, yüzey bağımlı ve yüzey bağımsız ZnO nanorodların ve ayrıca kitosan kullanılması ile penisilinaz enziminin immobilizasyonu yapılmak suretiyle potansiyometrik esaslı ölçüm yapacak şekilde tasarlanan penisilin biyosensörü hazırlandıktan sonra biyokimyasal olarak karakterizasyonu ve optimizasyonu yapılmıştır. Elde edilen sensörün penisilin tayininde kullanılıp kullanılamayacağı, penisilini doğru şekilde ölçüp ölçemeyeceği Alfoxil isimli ticari farmasötik preparatta yapılan çalışmalarla belirlenmiş ve “Biyosensör P” olarak adlandırdığımız penisilin biyosensörümüzün doğru ve pratik şekilde penisilin miktarını belirlediği görülmüştür. Biyosensörün çalışma aralığı 10^{-1} - 10^{-3} M, optimum tampon konsantrasyonu 10mM ve optimum sıcaklığı 25°C olarak bulunmuştur. Optimum pH değeri 7.4 olan biyosensörün tekrarlanabilirliğinin yeterli olmamasına rağmen, cevap süresinin kısa, raf ömrünün iyi, hazırlanmasının ucuz ve kolay olması nedeniyle üstün özelliklere sahip olduğu söylenebilir.

Penisilin biyosensörleri hazırlanmasıyla ilgili literatür detaylı olarak taranmış, bunların büyük çoğunluğunun amperometrik esaslı olduğu görülmüştür. Potansiyometrik esaslı penisilin biyosensörlerinin sayısı çok azdır. Tez çalışmasında hazırlamış olduğumuz penisilin biyosensörlerinin ZnO nanorod oluşturularak ve buna ilaveten kitosan kullanılarak hazırlanması (Biyosensör P) literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır. Çalışmamızda hazırladığımız biyosensörün biyoanalitik karakterizasyonları başarı ile yapılmış, girişim etkisi yapabilecek türlerin biyosensör cevabına girişim etkisi olmadığı gözlemlenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Ibupoto, Z. H., (2011). Usman Ali, S. M., Khun, K., Chey, C.O., Nur, O and Willander, M., "ZnO Nanorods Based Enzymatic Biosensor for Selective Determination of Penicillin", Biosensors, 1:153-163.
- [2] Kong, T., Chen, Y., Ye, Y., Zhang, K., Wang, Z., and Wang, X., (2009). "An Amperometric Glucose Biosensor Based on the Immobilization of Glucose oxidase on the ZnO Nanotubes", Sensors and Actuators B, 138: 344–350.
- [3] İspirli, Y., (2008). Taşıyıcısız İmmobilizasyon Yöntemiyle Çapraz Bağlı Glukoz oksidaz (GOD) Enzim Agregatlarının ve Kristallerinin Sentezi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [4] Özaltın, B., (2014). Koyun Beyninde Sorbitol Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı İlaçların Enzim Aktivitesi Üzerinde Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [5] Yavuz, A. G., (2005). Polivinil Ferrosen Modifiye Elektrodunu Temel Alan Glukoz Biyosensörünün Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [6] İçli, N.,(2008). İmmobilize Glukoz oksidaz Enziminin Özellikleri ve Enzim Aktivliğinin Artırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [7] Çolak, U.,(2011). İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin Kitosan Üzerine İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- [8] Wikipedia Özgür Ansiklopedi, Betalactamase, www.en.wikipedia.org/wiki/Beta-lactamase, 20 Ekim 2015.
- [9] Vahapoğlu, H., (1998), www.hastahaneinfeksiyonlaridergisi.org/managete/folder/1998-03/html/1998-2-3-147-149.htm, 20 Ekim 2015.
- [10] Sığırcı, F., (2010). Klebsiella sp. Suşlarında Ceftriaxone ve Imipenem Dirençlilik Frekansının Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [11] Çetin, E.T, (1986). Kükem Dergisi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı, İstanbul.

- [12] Thust, M., Schöning, M.J., Müller-Veggian, M., Kordos, P., Lüth, H., (1996). "A Long-Term Stable Penicillin-Sensitive Potentiometric Biosensor with Enzyme Immobilized by Heterobifunctional Cross-Linking", *Analytica Chimica Acta*, 323:115-121.
- [13] Gonçalves, L. M., Callera W. F. A., Sotomayor, M. D. P. T., Bueno, P. R., (2014). "Penicillinase-Based Amperometric Biosensor for Penicillin G", *Electrochemistry Communications*, 38:131-133.
- [14] Liu, J., Liang L., Li, G., Han, R., Chen, K., (1998). "H⁺ISFET-Based Biosensor for Determination of Penicillin G", *Biosensors and Bioelectronics*, 13:1023-1028.
- [15] Leszczynska, E., Glab, S., Sokol, A., Dziegielewski, K., Rokicka, R., Koncki, R., (1998). "Potentiometric Biosensor for Control of Biotechnological Production of Penicillin G", *Analytica Chimica Acta*, 368:205-210.
- [16] Eppelsheim C., Aubeck, R., Hampp, N., (1995). "Comparison of Potentiometric Enzyme Sensors for Urea and Penicillin-G: Differential Thick-Film Sensors Versus Classical Electrodes", *Journal of Membrane Science*, 100:131-137.
- [17] Hassen, W.M., Abdelghani, A., Vonna, L., Cherif, K., Boussaid, M., Maaref, M.A., (2007). "Electrochemical Properties and Topology of Gold Electrodes with Adsorbed Penicillin G for Biosensor Applications", *Sensors and Actuators B*, 120:621-627.
- [18] Wu, Y., Tang, L., Huang, L., Han, Z., Wang, J., Pan, H., (2014). "A Low Detection Limit Penicillin Biosensor Based on Single Graphene Nanosheets Preadsorbed with Hematein/Ionic Liquids/Penicillinase", *Materials Science and Engineering C*, 39:92-99.
- [19] Baktır, G., Sefalosporinler, www.ekutuphane.teb.org.tr/pdf/eczaciodasiyayinlari/antibiyotikler, 18 Ekim 2015.
- [20] Baltaoğlu, N., Antibiyotikler ve Klinik Kullanımları, 194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/.../antibiyotikler%202011.ppt, 20 Ekim 2015.
- [21] Bulut, Y., "Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış" 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11), 16-18 May 2014, Elazığ, Turkey.
- [22] Turna, Ö., (2006). Aminoasit Biyosensörlerinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- [23] Fen Bölümü Yarışma Projesi, <http://www.egelisesi.k12.tr/Basarilarimiz/Projeler/Proje%202008-2009/Proje33.pdf>, 5 Mart 2011.
- [24] Telefoncu, A., (1999). Biyosensörler (Telefoncu A., Ed.), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir.
- [25] Mehrvar, M., Bıç, C., Scharer, J. M., Moo-Young, M. ve Luong, J. H., (2000). "Fiber-optic biosensors-Trends and advances", *Analytical Science*. 16:677-692.
- [26] Mello, L. D. ve Kubota, L. T., (2002). "Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries", *Food Chemistry*, 77:237-256.

- [27] Biyosensörler, <http://www.scribd.com/doc/9380782/Biyosensorler-2>, 3 Mart 2014.
- [28] Biyosensör ve Medikal Uygulamaları, http://makinecim.com/bilgi_8078_BIYOSENSOR-ve-MEDIKAL-UYGULAMALARI, 4 Mart 2014.
- [29] Ustabaş, S.,(2010). Glukoz Tayini için Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [30] Seki, A., Ikeda S., Kubo, I., and Karube, I., (1998). "Biosensors Based on Light-Addressable Potentiometric Sensors for Urea, Penicilin and Glucose", Anal. Chim. Acta.
- [31] Telefoncu, A., (1999). Biyosensörler (Telefoncu A., Ed.) , Ege Üniversitesi, İzmir.
- [32] Ozturk, S. S., and Palsson, B.O., (1990). "Chemical Decomposition of Glutamine in Cell Culture Media: Effect of Media Type, pH, and Serum Concentration" Biotechnol. Progr., 6(2):121–128.
- [33] Guilbault, G. G., and Kauffman, J. M. (1987). "Enzyme-based Electrodes as Analytical Tools", Biotechnol. Appl. Biochem, 9:95-113.
- [34] Updike, S. J., Hicks, G. P., (1967). "The Enzyme Electrode", Nature, 214: 986-988.
- [35] Fabre B. and Simonet J. , (1998). "Electractive Polymers Containing Crown Ether or Polyether Ligands as Cation-Responsive Materials", Coordination Chemistry reviews, 178-180, 1211-1250.
- [36] Guilbault, G. G., and Kauffman, J. M. (1987). "Enzyme-based Electrodes as Analytical Tools", Biotechnol. Appl. Biochem, 9:95-113.
- [37] Clark, L. C., Lyons, C., (1962). "Electrode System for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. " Ann. NY Acad. Sci., 102:29-45.
- [38] Telefoncu, A.(1997). Biyosensörler (Telefoncu, A., Ed.), Ege Üniversitesi, İzmir.
- [39] Demir, A., ve Seventekin, N., (2009). "Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları" Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi, 3(2):92–103.
- [40] Lu, Y., Yang, M., Qu, F., Shen, G. and Yu, R., (2007). "Enzyme-functionalized Gold Nanowires for the Fabrication of Biosensors ", Bioelectrochemistry, 71: 211–216.
- [41] Nanoteknoloji nedir? www.cocuk.anadolu.edu.tr/veriler/dokumanlar/dok_80.pdf, 31 Mart 2013.
- [42] Çıracı, S., Özbay, E., Gülseren, O., Demir, V. H., Bayındır, M., Oral, A., Seger, T., Aydın, A., ve Dana, A., (2005), Türkiye'de Nanoteknoloji www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/turkiyenano.pdf, 31 Mart 2013.
- [43] Arıç, E., (2010) Nanoyapıda çinko oksit partiküllerinin üretimi ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- [44] Çıracı, S., Süzer, Ş., Erdemir, A., Dağ, Ö., Bengü, E., Bayındır, M., İlday, Ö., Senger, T., Dana, A., Aydın, A., Gemici, Z., Yılgör, İ., Özgür, H., Yeşilyurt, Ö., Durgun, E., Kocabaş, A., Köylü, Ö., ve Gürsen, İ., (2006), Türkiye'de Nanoteknoloji www.biltek.tubitak.gov.tr/bdergi/yeniufuk/icerik/nanoteknoloji.pdf, 31 Mart 2013.
- [45] Dulda, A., (2006). II-VI Grubu Nanoyapıların Sentezlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [46] Zhang, Y., Ram, M. K., Stefanakos, E. K., and Goswami, D. Y. (2012). "Synthesis, Characterization, and Applications of ZnO Nanowires", Journal of Nanomaterials.
- [47] Çoğal, S., (2009). Mikrodalga ve Otoklava Dayalı Farklı Kristal Yapılarında ZnO Nanoparçacıkların Sentezi ve Optik-elektronik Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [48] Aşar, N., (2011). Çinko oksit (ZnO) Nanoyapıların Sentezlenmesi ve Sensör Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [49] Tüzmen, Ş, E., (2007). ZnO ince filmlerinin eldesi ve aygıt üretimi için parametrelerinin optimizasyonu, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [50] Kahraman,S.,(2010). ZnO Yarıiletken Yapıların Üretilmesi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Hatay.
- [51] Arya, S. K., Saha,S., Ramirez-Vick, J. E., Gupta, V., Bhansali, S., and Singh, P.S., (2012). "Recent Advances in ZnO Nanostructures and Thin Films for Biosensor Applications: Review " Analytica Chimica Acta, 737 (2012):1–21.
- [52] Kitosan, http://www.sciencelearn.org.nz/var/sciencelearn/storage/images/media/images/nanoscience-images/chitosan/763226-2-eng-NZ/Chitosan_gallery_large.jpg, 22 Ekim 2015.
- [53] Li H., Xu B., Wang, D., Zhou, Y., Zhang, H., Xia, W., Xu, S., Li, Y., (2015). "Immunosensor for Trace Penicillin G Detection in Milk Based on Supported Bilayer Lipid Membrane Modified with Gold Nanoparticles". Journal of Biotechnology, 203: 97-103.
- [54] Çubuk, O., (2001). Yeni Tip Potansiyometrik Üre Biyosensörlerin Hazırlanması ve Biyolojik Numunelere Uygulanması, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- [55] Kimyasal kinetik ve enzimler, <http://www.scribd.com/doc/8419276/Kimyasal-Kinetik-ve-Enzimler>, 4 Mayıs 2013.
- [56] Enzim Kinetiği, <http://www.ctf.istanbul.edu.tr/anabilimdallari/pdf/160/Enzimler> [EnzimKinetiği,http://www.ctf.istanbul.edu.tr/anabilimdallari/pdf/160/Enzimler.pdf](http://www.ctf.istanbul.edu.tr/anabilimdallari/pdf/160/Enzimler.pdf), 3 Mayıs 2013.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Çisem Turan
Doğum Tarihi ve Yeri :02.05.1988
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :cisem_88_@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyokimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2015
Lisans	Biyoloji	Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2012
Lise	Fen-Matematik	Rıfat Canayakın Lisesi (YDA)	2006