

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

**ZnO NANOROD TEMELLİ GLUKOZ BİYOSENSÖRÜ
HAZIRLANMASI VE KAN SERUMUNDA GLUKOZ TAYİNİNDE
KULLANILMASI**

ÇAĞLA ATAN

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

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. EMİNE KARAKUŞ**

İSTANBUL, 2013

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

**ZnO NANOROD TEMELLİ GLUKOZ BİYONSENSÖRÜ
HAZIRLANMASI VE KAN SERUMUNDA GLUKOZ TAYİNİNDE
KULLANILMASI**

ÇAĞLA ATAN

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

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. EMİNE KARAKUŞ**

İSTANBUL, 2013

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZnO NANOROD TEMELLİ GLUKOZ BİYOSENSÖRÜ
HAZIRLANMASI VE KAN SERUMUNDA GLUKOZ TAYİNİNDE
KULLANILMASI

Çağla ATAN tarafından hazırlanan tez çalışması _____ 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,

Deneysel çalışmalarında bana yardım eden arkadaşım Dilruba ALBAYRAK'a ve laboratuvarında bana destek olan Nilay ALTAŞ KIYMAZ hocama teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan beni bugünlere getiren, maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan sevgili babam Veli ATAN ve annem Aynur ATAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2013

Çağla ATAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	1
1.3 Hipotez	1
BÖLÜM 2	
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
2.3.2. Substrat Konsantrasyonu	6
2.4 Glukoz oksidaz.....	6
2.4.1 Glukoz oksidaz Enziminin Kullanım Alanları.....	8
2.4.2 Glukoz Tayin Yöntemleri.....	8
2.4.2.1 Gıdalarda Şeker Tayini.....	9
2.4.2.2 Kan Glukoz Tayin Yöntemleri.....	11
2.4.2.3 Glukoz Biyosensörü ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	11

BÖLÜM 3

BİYOSENSÖRLER.....	16
3.1 Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu	18
3.1.1 Biyokomponentler	19
3.1.2 Transduserler	20
3.1.3 Biyosensörlerde Analizlenebilecek Unsurlar.....	21
3.1.4 Biyosensörlerde Kullanılan Biyoaktif Yapılar	22
3.1.5 Biyosensörlerde Yararlanılan İletim ve Ölçüm Sistemleri	22
3.1.6 Biyosensör Çeşitleri	23
3.1.6.1 Elektrokimyasal Sensörler	23
3.1.6.2 Potansiyometrik Biyosensörler	23
3.1.6.3 Voltametrik Biyosensörler	24
3.1.6.4 Amperometrik Biyosensörler	24
3.1.6.5 Optik Sensörler.....	24
3.1.6.6 Termal Sensörler	25
3.1.6.7 Kütle Hassas Sensörler.....	25
3.1.7 Biyosensörlerin Uygulama Alanları	25
3.1.7.1 Gıda Sektöründe Biyosensör Kullanımı.....	26
3.1.7.2 Savunma Sektöründe Biyosensör Kullanımı	27
3.1.7.3 Çevresel Ölçümlerde Biyosensör Kullanımı.....	28
3.1.7.4 Tıbbi Alanda Biyosensör Kullanımı	28
3.1.8 Enzim Sensörleri.....	29
3.1.8.1 Enzim Sensörlerinin Sınıflandırılması	32
3.1.9 Enzim Elektrotlarında Performans Faktörleri.....	36
3.1.9.1 Kalibrasyon ve Duyarlılık.....	37
3.1.9.2 Kararlılık.....	37
3.1.9.3 Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı.....	37
3.1.9.4 Cevap Süresi.....	38
3.1.9.5 Seçicilik.....	38
3.1.9.6 Tekrarlanabilirlik.....	39
3.1.9.7 Sıcaklık.....	40
3.1.9.8 Tıbbi Uygulamalarda Kullanılacak Biyosensörler İçin Biyouyumluluk..	40
3.1.10 Enzim İmmobilizasyonu.....	40
3.1.11 İmmobilizasyon Yöntemleri	41
3.1.11.1 Kovalent Bağlama	42
3.1.11.2 Tutuklama.....	45

3.1.11.3	Adsorpsiyon.....	45
3.1.11.4	Çapraz Bağlama.....	46
3.1.12	Kitosan.....	47
3.1.12.1	Kimyasal Yapısı ve Reaksiyonu.....	48
BÖLÜM 4		
NANOTEKNOLOJİ.....		50
4.1	Nanoyapıların Sentezleme Teknikleri.....	53
4.1.1	Fiziksel Buhar Çöktürme (PVD).....	54
4.1.2	Kimyasal Buhar Çöktürme (CVD).....	54
4.1.3	Sol- gel Yöntemi.....	55
4.2	Çinko Oksit'in Özellikleri.....	55
4.3	Çinko Oksit Nanorod Sentez Mekanizması.....	57
4.4	ZnO Nanorodların Sentez Metotları.....	58
4.4.1	Elektrokaplama Metodu.....	58
4.4.2	Buhar-Sıvı-Katı (VLS) Metodu.....	58
4.4.3	Kimyasal Banyo Kaplama (CBD) Metodu.....	58
4.4.4	Metal-Organik Kimyasal Buhar Kaplama (MOCVD).....	58
4.4.5	Sol-gel Metodu.....	59
4.4.6	Mikrodalga ısıtma metodu.....	59
4.4.7	Hidrotermal Sentez Metodu.....	59
4.5	Glukoz Biyosensörlerinde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış.....	61
4.5.1	Glukoz Oksidaz.....	61
4.5.2	Kitosan.....	61
4.5.3	Çinko Oksit Nanorod.....	62
BÖLÜM 5		
MATERYAL VE METOD.....		63
5.1	Kullanılan Cihazlar	63
5.2	Kullanılan Numuneler	63
5.2.1	Serum Numunesi.....	63
5.3	Kullanılan Enzimler	63
5.4	Kullanılan Kimyasal Maddeler	64
5.5	Kullanılan Çözeltiler	64
5.5.1	0.1M Fosfat tamponu çözeltisi (pH 6.5, 7.2 ve 7.4)	64
5.5.2	Glukoz oksidaz (GOD) Enzim Çözeltisi	64
5.5.3	Kitosan Çözeltisi.....	64

5.5.4	ZnO Nanorod/Kitosan Çözeltisi	65
5.5.5	GOD/Kitosan çözeltisi	65
5.5.6	Glukoz Çözeltileri	65
5.5.7	Serumda Glutamin Tayini İçin (Standart Katma Yönteminde) Kullanılan Çözeltiler	67
5.6	Glukoz Biyosensörleri.....	67
5.6.1	Glukoz Biyosensörlerinin Hazırlanması.....	67
5.6.1.1	Hidrotermal Yöntemle Çinko Oksit Nanorod Hazırlanışı.....	67
5.6.1.2	Biyosensör G'nin Hazırlanması	68
5.6.1.3	Biyosensör GK'nın Hazırlanması.....	69
5.6.2	Glukoz Biyosensörlerinin Çalışma Aralıklarının ve Eğimlerinin Belirlenmesi.....	70
5.6.3	Glukoz Biyosensörlerinin Performansına Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi.....	71
BÖLÜM 6		
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA		72
6.1	Glukoz Biyosensörünün Kalibrasyon Grafiği	72
6.2	Tampon Konsantrasyonunun Etkisi	74
6.3	pH'ın etkisi.....	75
6.4	Sıcaklığın Etkisi	77
6.5	Girişim Etkisi	78
6.6	Karıştırma hızının etkisi	79
6.7	Cevap Süresi.....	79
6.8	Raf Ömrü ve Tekrarlanabilirlik.....	79
6.9	Enzim Kinetik Parmetrelerinin (Km ve Vmax değerleri) Belirlenmesi.....	80
6.10	Gerçek Numunelerde Glukoz Tayini	82
6.10.1	Serumda Glutamin Tayini.....	82
BÖLÜM 7		
SONUÇ.....		84
KAYNAKLAR		86
ÖZGEÇMİŞ		93

SİMGE LİSTESİ

dak.	Dakika
dL	Desilitre
g	Gram
L	Litre
Log	Logaritma
V _{max}	Maksimum hız
mM	Milimolar
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
μm	Mikrometre
mg	Miligram
mV	Milivolt
K _m	Michaelis Menten sabiti
ΔmV	Milivolttaki değişim
M	Molar
nA	Nanoamper
nm	Nanometre
Rpm	Rounds per minute
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
U	Unite
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
BOD	Biyokimyasal oksijen sistemi
MWNT	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
GOD	Glukoz oksidaz
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FTIR	Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi
HMT	Hekzametilen tetramin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
ISE	İyon seçici elektrot
CS	Kitosan
NW	Nanotel
CV	Siklik Voltametri
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
IUBMB	Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
Y.T.Ü	Yıldız Teknik Üniversitesi
XRD	X-ışınları Difraksiyon Cihazı

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Glukozun glukoz oksidaz enzimiyle reaksiyonu	6
Şekil 2.2 Glukoz oksidazın aktif merkezindeki amino asit kalıntıları ve FAD'ın pozisyonu	7
Şekil 3.1 Doğal ve en mükemmel biyosensörük sistemler	16
Şekil 3.2 Biyosensörün yapısı.....	18
Şekil 3.3 Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması	19
Şekil 3.4 Bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi (A : Analizlenecek madde, B : immobilize enzim tabakası, C : iletici ve D : Ölçüm sistemi).....	30
Şekil 3.5 Bir biyosensör sisteminde bulunan bileşenler	30
Şekil 3.6 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)	31
Şekil 3. 7 Potansiyometrik ölçüm sisteminin sematik olarak gösterimi	33
Şekil 3. 8 Enzim molekülünün glutaraldehid ile çapraz bağlanması	44
Şekil 3. 9 Enzim molekülünün jel içinde veya polimer matrikste tutuklanması	45
Şekil 3. 10 Enzim molekülünün elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu.....	46
Şekil 3. 11 Enzim molekülünün film veya tabakaya çapraz bağlanması.....	46
Şekil 3.12 Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formüller.....	47
Şekil 3.13 Kitosan'ın Kimyasal Yapısı	48
Şekil 4.1 Nanoteknolojinin kullanıldığı boyut aralığı	50
Şekil 4.2 Nanopartikül ve nanorodlarda elektron transferi	53
Şekil 4.3 Hekzagonal ZnO yapısı	56
Şekil 4.4 Si yüzey üzerinde VS metodu ile ZnO nanorodların büyüme mekanizmasının şematik gösterimi.....	57
Şekil 4.5 Kitosanın kimyasal yapısı.....	61
Şekil 5.1 Nanorodların SEM görüntüsü.....	68
Şekil 5.2 Biyosensör G'nin hazırlanma şeması	69
Şekil 5.3 Biyosensör GK'nın hazırlanma şeması	70
Şekil 6.1 Biyosensör G'nin kalibrasyon grafiği	72
Şekil 6.2 Biyosensör GK'nın kalibrasyon grafiği	73
Şekil 6.3 Glukoz biyosensörlerinin eğiminin tampon konsantrasyonu ile değişimi.....	74
Şekil 6.4 Glukoz biyosensörlerinin eğiminin pH ile değişimi.....	76
Şekil 6.5 Glukoz biyosensörlerinin eğiminin sıcaklık ile değişimi	77

Şekil 6.6 Biyosensör GK'nın glukoz oksidaz için Lineweaver-Burk grafiği.....	81
Şekil 6.7 Biyosensör G'nin glukoz oksidaz için Lineweaver-Burk grafiği.....	81
Şekil 6.8 Biyosensör GK ile standart katma yönetimi kullanılarak 10^{-3} M glukoz çözeltilisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği.....	83

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Biyosensörde tayin edilebilen maddeler	21
Çizelge 3.2 Biyosensörlerde kullanılabilen biyoaktif bileşenler	22
Çizelge 3.3 Biyosensörlerde kullanılan ölçüm sistemleri.....	23
Çizelge 3.4 Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz olanakları.....	26
Çizelge 3.5 Enzim sensörlerinin sınıflandırılması	32
Çizelge 3.6. Enzim immobilizasyonunda kullanılan maddelerde (taşıyıcı) bulunan reaktif gruplar ve reaksiyona girdikleri amino asitlerin fonksiyonel grupları	43
Çizelge 3.7. Enzimlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonunda bağ oluşumuna katılan aminoasitlerin reaktif grupları	44
Çizelge 4.1 ZnO'in fiziksel özellikleri	56
Çizelge 5.1 Glukoz oksidaz enziminin numarassı, kaynağı ve temin edildiği firma.....	64
Çizelge 5.2 Glukoz kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması	66
Çizelge 5.3 Glukoz çözeltilerinin hazırlanması	67
Çizelge 6.1 25,0±1,0°C'da hazırlanan glukoz biyosensörlerinin eğimi ve çalışma aralıkları.....	73
Çizelge 6.2 25,0±1,0°C'da kitosan kullanılarak hazırlanmış glukoz biyosensörünün cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi.....	74
Çizelge 6.3 25,0±1,0°C'da Glukoz biyosensörlerinin cevabına pH'nın etkisi	75
Çizelge 6.4 Glukoz biyosensörlerinin cevabına sıcaklığın etkisi	77
Çizelge 6.5 Biyosensörlerin L-askorbik asit ve ürik asite karşı verdiği cevaplar.....	78
Çizelge 6.6 Serumda glukoz tayini için glukoz biyosensörü ve Biyokimya Laboratuvarından elde edilen sonuçlar	83

ZnO NANOROD TEMELLİ GLUKOZ BİYOSENSÖRÜ HAZIRLANMASI VE KAN SERUMUNDA GLUKOZ TAYİNİNDE KULLANILMASI

Çağla ATAN

Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emine KARAKUŞ

Son yıllarda nanoboyutlarda üretilen malzemelerin gösterdikleri olağanüstü özellikler, maliyeti düşük, kolay üretilen ve analitik özellikleri gelişmiş nanoteknolojiye dayalı biyosensörler üzerine yapılan çalışmaları arttırmıştır.

Glukoz metabolik reaksiyonlarda ara ürün olarak kullanılan ve hücrelerin enerji kaynağı olan bir monosakkarittir. Ayrıca fotosentezin ana ürünlerinden biridir ve hücresel solunum glukozla başlar. Glukoz tayini, kan glukoz değerlerine bağlı olarak oluşan hastalıkların teşhisi için büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada gümüş tel üzerine çinko oksit nanorod kaplanarak elektrot hazırlanmıştır. Çinko oksit nanorod kaplanan elektrot yüzeyine; glukoz oksidaz enzimi immobilize edilerek glukoz biyosensörü hazırlandı ve Biyosensör G olarak adlandırıldı. Ayrıca, ZnO nanorod kaplı elektrot yüzeyine glukoz oksidaz enzimi kitosan kullanılarak immobilizasyonu ile da glukoz biyosensörü hazırlandı ve Biyosensör GK olarak adlandırıldı. Biyosensörlerin 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. Biyosensör GK olarak adlandırdığımız glukoz biyosensörü kullanılarak standart katma yöntemi ile kan serumunda glukoz tayini gerçekleştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyosensör, glukoz, glukoz oksidaz, çinko oksit nanorod, potansiyometrik, kitosan, glukoz biyosensörü

ABSTRACT

PREPARATION OF GLUCOSE BIOSENSOR BASED ZnO NANOROD AND USE DETERMINATION OF GLUCOSE IN BLOOD SERUM

Çağla ATAN

Department of Chemistry
MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

In recent years, the extraordinary properties showing of materials produced in nanosize are increased the studies on biosensors low-costed, easy produced and advanced analitical characteristics.

Glucose is a monosaccharide which is used as an intermediate product in metabolic reactions and energy source in cells. Also, it is one of the main products of photosynthesis and cellular respiration begins with glucose. Determination of glucose has great importance for diagnosis of diseases which occur related to glucose level in blood.

In this study, electrode was prepared with coating zinc oxide nanorod on silver wire. Zinc oxide nanorod coated electrode surface; glucose biosensor was prepared to immobilization of glucose oxidase enzyme and it was called Biosensor G. Also, glucose biosensor prepared with using chitosan to immobilization of glucose oxidase enzyme on zinc oxide coated electrode surface and it was called Biosensor GK. 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). Determination of glucose in blood serum was realized by the standart addition method with glucose biosensor called Biosensor GK.

Key words: Biosensor, glucose, glucose oxidase, zinc oxide nanorod, chitosan potentiometric, glucose biosensor

**YILDIZ TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Son yıllarda güvenilir glukoz biyosensörleri üretmek için elektrokimyasal, kemilüminesans ve diğer yöntemler uygulanmaktadır. Bunlar arasında elektrokimyasal esaslı glukoz biyosensörleri, hazırlanma maliyetinin düşük, seçiciliğinin yüksek ve uygulanabilirliğinin basit olması nedeniyle yaygın olarak çalışılmaktadır [1]. Bunlardan amperometrik esaslı glukoz biyosensörlerine literatürde daha fazla rastlanmış olmasına rağmen potansiyometrik esaslı glukoz biyosensörleri sayısı oldukça az olması nedeniyle tez çalışmamızın özgün olduğu ortaya çıkmaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada, kan serumunda glukoz tayini için kullanılmak üzere, ZnO nanorod temelli ve glukoz oksidaz enziminin elektrostatik olarak immobilize edilmesi ile potansiyometrik esaslı iki farklı glukoz biyosensörü 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 glukoz biyosensörü ile kan serumunda glukoz tayini yapılarak elde edilen sonuçlar standart yöntem ile karşılaştırılması da amacımızdır.

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 glukoz oksidaz enziminin elektrot yüzeyine immobilizasyonu sağlanmıştır. Böylece Biyosensör G hazırlanmış ve bu yöntem kitosan kullanımı ile geliştirilerek analitik özellikleri daha iyi olan Biyosensör GK geliştirilmiştir. Biyosensör GK ile kan serumunda, bozucu türlerin önemli bir girişim etkisi olmaksızın glukoz tayini yapılabilineceği ispat edilmiştir.

BÖLÜM 2

ENZİMLER

Enzimler en basit tanımla, katalitik aktivite gösteren genellikle proteinlerden oluşan ve katalizör gibi çalışan yüksek molekül ağırlıklı (15.000 – birkaç milyon dalton) yapılardır. Özgül oldukları kimyasal reaksiyonları katalizler ve reaksiyon hızlarını artırır. Genellikle bütün biyokimyasal tepkimeler enzimler tarafından katalizlenir. Bu reaksiyonlar, tüm canlı organizmaların metabolizmasının temelini oluştururken antik çağlardan bu yana özellikle gıda üretiminde (şarap, peynir, bira, ekmek vb.) yaygın olarak kullanılır [2].

Enzimler birer proteindir ve bu nedenle de amino asit denilen temel yapı taşlarından oluşmuşlardır. Amino asitler bir tane karbon atomuna (C) bağlanmış bir amino grubu (NH_2), bir hidrojen (-H), bir karboksil grubu ($-\text{COOH}$) ve bir de değişken yan gruptan (-R) oluşurlar. Yirmi amino asitin hepsi de bu temel yapıya sahiptir. Onları farklı yapan tek şey, taşıdıkları yan grupların büyüklük, şekil, elektrik yükü, suya duyulan ilgi ve aktiflik açısından farklı olmalarıdır. İşte enzimi oluşturan bu amino asitler birbirleriyle etkileşerek, zincirin kıvrılıp bükülmesine ve sonuçta da üç boyutlu bir yapı kazanmasına neden olurlar. Yapıdaki bazı amino asitlerin taşıdıkları yan gruplar, enzimin üç boyutlu yapısında bir bölgede toplanarak "aktif bölge" denilen bir alan oluştururlar. İşte enzimlerin tepkimeleri kataliz etme ve çok seçici olmalarının sırrı bu bölgedir. Bölgenin oluşturduğu boşluğun şekli o kadar özeldir ki, sadece o enzimin kataliz edeceği tepkimeye girecek madde, başka bir deyişle enzimin substratı, bu boşluğa girebilir. Bir kez enzimin içine girdikten sonra, substratla enzimin bu aktif bölgesinde bulunan kimyasal gruplar arasında kimyasal etkileşimler meydana gelir. Sonuçta substrat, "geçiş

durumu yapısı" denen ve normalde çok kararsız olan bir yapıya dönüşür. Daha sonra bu yapı ya ürünü oluşturacak, yada substrata geri dönecektir [3]. Enzimler pH ve sıcaklığın optimum koşulları altındaki sıvı çözeltilerde işlev görür ve enzimlerin büyük çoğunluğu yalnız tek bir substrata karşı aktivite gösterir ve bu substratı dönüşüme uğratır (substrat spesifikliğı). Enzimler ortamdaki maddelerden yalnız biri ile reaksiyon vermekle kalmaz teorik olarak oluşabilecek ürünlerden de sadece birinin oluşumunu katalizlerler (Etki spesifikliğı) [4].

2.1 Enzimlerin Yapısı

Enzimlerin protein kısmına “apoenzim” denir. Enzimlerin bazıları basit proteinlerdir. Bunların katalitik etki gösteren kısmı doğrudan doğruya proteinin polipeptid zinciridir. Bir çok enzimin katalitik etki gösterebilmesi için proteinden başka metal iyonuna, bazılarının protein olmayan bir organik bileşiğı, bazılarının ise her ikisine de ihtiyacı vardır. Bu iyon veya bileşiğı genel olarak “kofaktör” adı verilir. Organik bileşik, enzimin protein kısmı ile kovalent bağla bağlı ve ayrılmıyorsa “prostetik grup” çok sıkı birleşmemiş ve ayrılabiliyorsa “koenzim” adını alır. Koenzimi ile birlesik halde bulunan apoenzim-koenzim bütününe “haloenzim” adı verilir. Yani haloenzim, koenzim veya kofaktörü ile birlikte katalitik olarak aktif durumdadır. Protein yapıları farklı, fakat katalizledikleri kimyasal reaksiyon aynı olan enzimlere “izoenzim” veya “izozim” adı verilmektedir. Örneğın pirüvik asidin laktik aside dönüşümünü katalizleyen laktat dehidrogenaz (LDH) enziminin 5 tane izoenzimi vardır. Enzimin özgül olarak etki ettiğı maddeye veya madde karışımına bu “enzimin substratı” denir. Reaksiyon sonunda meydana gelen maddeye ise “ürün” adı verilir [5].

2.2 Enzimlerin Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliğı (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. Sistematik 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. Sistemik ismin oluşturulmasında “substrat grupliyaz” şeklinde bir düzenleme yapılır.
5. İzomerazlar: İzomerazlar bir molekül içindeki geometrik yada yapısal yeniden düzenlenmeyi katalizlerler. Sistemik ismin oluşturulmasında “substrat grupizomeraz” şeklinde bir düzenleme yapılır [5].
6. Ligazlar: Ligazlar ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının koparılması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

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 artırır. Sıcaklığın etkisiyle oluşan denatürasyon, saflaştırılmış enzim çözeltilerini saflaştırılmamış enzim çözeltilerine kıyasla daha fazla etkilemektedir [4].

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 [4].

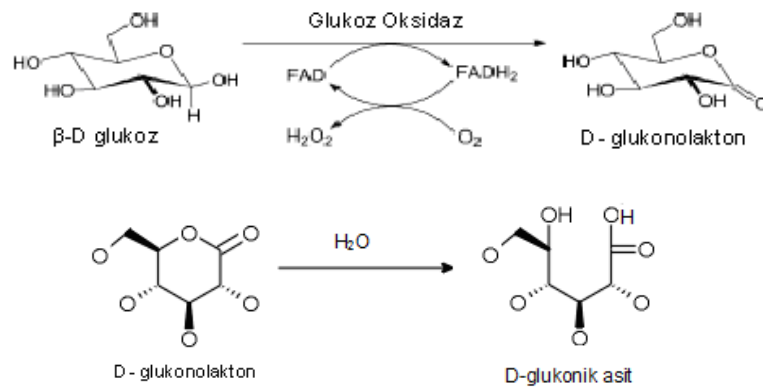
2.3.3 Substrat Konsantrasyonu

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 [4].

2.4 Glukoz oksidaz

Glukoz oksidaz (GOD) enziminin aktivitesi ilk defa 1904 yılında Maksimow tarafından *Aspergillus Niger*'de saptanmıştır. Enzimin oksidatif etkisi olduğunu belirleyen Müller (1928), saflaştırılan enzimin sahip olduğu sarı rengin, bünyesindeki prostetik gruptan (flavin adenin dinükleotid, FAD) kaynaklandığını öne sürmüştür. Keilin ve Hartree (1948) oksidasyonun FAD tarafından gerçekleştirildiğini; enzimin açığa çıkardığı H_2O_2 ile antimikrobiyal aktivite gösterip antibiyotik olarak davrandığını belirlemişlerdir [6]. Oksidoredüktaz enzim sınıfının bir üyesidir. Oksidoredüktazlar yükseltgenme indirgenme reaksiyonlarını katalizlerler. Glukoz oksidaz'ın sistematik adı β -D-Glukoz:Oksijen 1-Oksido redüktaz, EC 1.1.3.4' tür [5].

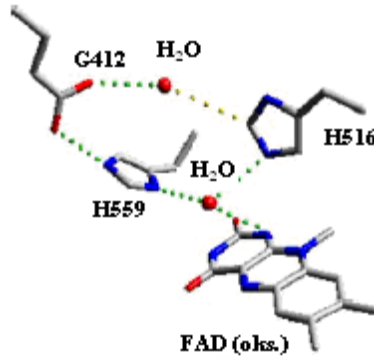
GOD' nin glukozu glukonik aside oksitlediği reaksiyon aşağıdaki şekilde görülmektedir. Reaksiyon flavoenzimin önce indirgendiği ve sonra da yükseltgenmesinin meydana geldiği iki basamak üzerinden yürür. İndirgenme yarı basamağında glukoz 2 proton ve elektronu enzime aktarır glukonolaktone dönüşür. Yükseltgenme yarı basamağında ise enzim moleküler oksijen ile yükseltgenir ve hidrojen peroksit oluşur [6].



Şekil 2.1 Glukozun glukoz oksidaz enzimiyle reaksiyonu [5].

Şekil 2.1' de verilen tepkime glukoz oksidaz enziminin bünyesinde bulunan FAD grubu üzerinden yürümektedir. FAD'nin indirgenme özelliği riboflavin molekülünün indirgenmesi esasına dayanır. FAD elektron akseptörü olarak davranarak glukozu yükseltger; ardından moleküler oksijeni indirgeyerek hidrojen perokside dönüştürür ve kendisi tekrar oksitlenmiş formuna dönüşür [6].

Glukoz oksidaz iki özdeş alt birimden oluşan dimerik bir proteindir. Her monomer 583 amino asit kalıntısından oluşan tek polipeptid zincirine sahiptir. Monomerler tuz köprüleri ve hidrojen bağlarıyla birleşirler. Monomerler kendi içlerinde katlanarak iki bölge oluştururlar. Bölgenin birine substrat (β -D-Glukoz) bağlanırken diğer bölgeye güçlü bir yükseltgeyici ajan olarak flavinadenindinükleotid kofaktörü sıkıca bağlıdır. Her monomer bir mol demir içerir. Katalitik reaksiyonun merkezi FAD'ın izoalloksazin halkasının N5 pozisyonudur. Bu reaksiyon merkezini örtecek kadar yakında yalnız üç amino asit yan zinciri vardır. Glutamik asit yan zinciri Glu412 ve iki Histidin kalıntısının yan zincirleri His516 ve His559 bulunur. Glukoz oksidaz, genelde ağırlığının yaklaşık % 16' sını oluşturan ve büyük oranda mannoz içeren bir karbohidrat birimi ile birlikte bulunan, bir glukoproteindir. Karbohidrat N yada O-glikozit olarak proteine bağlanır [5]. (Şekil 2.2)



Şekil 2.2 Glukoz oksidazın aktif merkezindeki amino asit kalıntıları ve FAD'ın pozisyonu [5].

2.4.1 Glukoz oksidaz Enziminin Kullanım Alanları

Teşhis amaçlı kullanımı, glukoz oksidaz; kan, serum veya plazmadaki glukozun tayini için kullanılan kalorimetrik teşhis kitlerinin bir parçası olarak, ticari düzeyde geniş olarak kullanılmaktadır. GOD, diyabet hastalarının kan şekerinin klinik analizinde kullanılan bir enzimdir. Klinik enzimlerin teşhis amaçlı kit olarak kullanımında, enzim immobilizasyonu da ayrıca araştırılan bir konudur. Bu yönde oluşturulan çalışmalar, enzimlerin kullanıldığı analizlerin güvenilir, daha basit ve ekonomik yapılabilmesini amaçlamaktadır. Glukoz oksidazın kullanıldığı sensörlerde, yüksek seçicilik, hızlı yanıt, çok iyi kararlılık gibi sonuçlar elde edilmiş ve diyabet hastalarının kan glukozu tayininde iyi performans görülmüştür [2].

Tedavi amaçlı kullanımı, klinikte, glukoz oksidaz enziminin sadece teşhis amaçlı değil, tedavi amaçlı kullanımı ile ilgili çalışmalar da devam etmektedir. Kontrollü ilaç salınımı uygulamaları çerçevesinde; glukozoksidaz enziminin şeker hastalığının tedavisinde, metabolizmada glukoz konsantrasyonundaki değişimine bağlı olarak, vücuda yerleştirilen insülinin salınımını kontrol edebilecek bir kit olarak kullanımı ile ilgili literatürde yer alan çalışmalar vardır. Bu yapılan çalışmalarda glukozoksidaz enziminin genellikle katalitik olmayan bir taşıyıcıya immobilizasyonu yöntemleri kullanılmıştır ve diyabet hastalarının tedavisinde etkili sonuçlar alınmıştır. Fakat kullanılan katalitik olmayan bu kütle enzimin aktivitesinde ve kararlılığında düşüslere sebep olabilmektedir. Bu sorunların giderilmesi yönünde araştırmalar ilerlemektedir [2].

2.4.2 Glukoz Tayin Yöntemleri

Karbohidratlar, biyosferde en bol bulunan organik bileşiklerdir ve metabolik sistemlerin birçoğunda önemli rol oynarlar. Bu yüzden onların analizleri yaşam, gıda, tarım ve medikal bilimlerde büyük öneme sahiptir. Fizyolojik sıvılarda karbohidrat analizi, belirli hastalıkların tanısı ve ilaçların etkilerinin belirlenmesinde önemlidir. Örneğin, kan glukoz konsantrasyonunun bilinmesi, diyabet hastalığının izlenmesinde gereklidir ve rutin olarak yapılan analizdir. Glukoz hayvan ve bitkilerin başlıca bileşenlerinden biridir. Glukozun nicel tayini biyokimya, klinik kimya, gıda ürünleri ve fermantasyonda çok önemli yere sahiptir. Refraktif indeks, UV ve kolorimetri gibi geleneksel karbohidrat tayin yöntemlerinin seçimliliği yoktur ve duyarlılık düşüktür. Kromatografik metotlar ya da kapiler elektroforezde kullanılan dedektöre bağlı olarak

kompleks matrislerde tayinler zor olabilmektedir, çünkü çok fazla sinyal algılanır ya da bazı analitler için tayin limitleri uygun değildir ve analitlerin türevlendirilmesine ihtiyaç duyulur. Ancak, uygun doku, mikroorganizma ya da enzimlerin biyobileşen olarak kullanıldığı biyosensör sistemleri ile bu tip sınırlamalar ortadan kaldırılabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde dünyada biyosensör teknolojisine olan ilgi açıktır ki ülkemizde de bu konuda çalışmalar hızla artmaktadır [7].

2.4.2.1 Gıdalarda Şeker Tayini

Karbonhidratlar, bitkiler tarafından sentezlenen temel besin öğelerinden biridir. Sebze ve meyveler ile bunlardan üretilmiş gıdalar daima karbonhidrat içerir. Bunlar; başlıca glikoz, fruktoz ve sakkaroz olmak üzere üç tip karbonhidrat içerir. Bu karbonhidratlardan glukoz, galaktoz ve fruktoz monosakkarit; sakkaroz, laktoz ve maltoz ise disakkarittir. Şeker tayini, genellikle tüm sebze ve meyveler ile bunlardan üretilmiş çeşitli gıdalara uygulanır.

Gıdalarda şeker tayinleri, aşağıdaki nedenlerden dolayı yapılmaktadır:

- Gıdaların bileşiminde bulunan toplam şeker ve invert şeker miktarını tespit etmek
- Prosese (üretimin işlemlerine) yön vermek
- İçeriklerinde sahip oldukları enerji miktarını bulabilmek
- Standarda uygun olup olmadığını saptamak

Şeker tayininde karbonhidratların indirgen özelliğinden yararlanıldığı için buna dayalı metotlarda indirgen şekerlerin toplu tayin edilebildiği, ayrı ayrı miktarlarının belirlenemeyeceği açıktır (glukoz ve fruktozun ayrı ayrı değil, “invert şeker” adı altında beraber saptanması gibi). Sakkaroz miktarı, önce sakkaroz invert şekere dönüştürülmekte, sonra oluşan invert şekerin indirgen özelliğinden yararlanılarak tayin edilmektedir (toplam şeker tayini). Ancak şekerlerin her birinin tayini için başta enzimatik yöntemler olmak üzere diğer yöntemler de kullanılır.

Şeker tayininde genel olarak üç yöntem kullanılır. Bunlar:

- Volumetrik yöntem

- Gravimetrik yöntem
- Enstürümantal yöntemlerdir.

Bu yöntemlerden en çok volumetrik yöntem kullanılır. Volumetrik yöntemde üç temel yöntem kullanılmaktadır. Bunlar:

- Lane- Eynon metodu
- Luff Schoorl metodu
- Bertrand metodudur.

Bertrand Yöntemi

Standart koşullarda çöktürülen Cu_2O , asitli demir(III)sülfat çözeltisi ile yükseltgenerek çözündürülür, indirgenen demir(III)sülfattan oluşan demir(II)sülfat permanganatla titre edilerek bakır miktarı hesaplanır. Daha sonra hazırlanmış olan standart çizelgelerden şeker miktarı hesaplanır [8].

Luff-Schoorl Yöntemi

Luff-Schoorl yönteminde bakır sülfat içeren alkali çözelti (luff çözeltisi), indirgen şekerlerle kaynatıldıktan sonra potasyum iyodür ve asit ilave edilmektedir. Çözelti soğutulduktan sonra indirgenmeyen bakıra eş değer olan serbest iyot, nişasta indikatörlüğünde sodyum tiyosülfat ile titre edilerek invert şeker miktarı tablolardan yararlanılarak belirlenmektedir [8].

Lane-Eynon Yöntemi

Bu yöntemde invert şekerin fehling çözeltisinde bulunan bakır(II)oksidi, suda çözünmeyen bakır(I) okside indirgemesi reaksiyonu ilkesine dayanır. Bakır oksit suda çözünmediğinden tayinde, bakırın suda çözünen kompleks tuzu (senyet tuzu) kullanılır. Ortamın bazikliği NaOH sağlar. Çözünebilir bakır tartarat iyonu bu çözeltide mavidir. Bakırın indirgenmesi ile oluşan bakır iyonları, tartaratla kompleks iyon oluşturmadığından bakır(I)oksit hâlinde ayrılıp çöker.

İndikatör olarak kullanılan metilen mavisi bazik ortamda mavi, şeker olduğunda ise renksizdir. Bu nedenle titrasyonun bitiş noktasında renksiz hâle gelir ve ortam bakır kırmızısı olur.

Bunlardan Lane-Eynon metodu, pratik ve kolay olması açısından en yaygın olarak kullanılandır [8].

2.4.2.2 Kan Glukoz Tayin Yöntemleri

Kan glukoz ölçümlerinin başlıca iki amacı vardır. Bunlar ya hiperglisemiye yada hipoglisemiye tespit etmektir [9].

Modifiye Somogyi-Nelson Metodu

Glukoz tayini yapılacak olan kan, plazma, yada serum örneği, içersinde glukozun yanı sıra indirgeyici özelliği bulunan proteinleri çöktürmek ve ortamdan uzaklaştırmak için deproteinize edilir. Bu amaçla çinko hidroksit kullanılır. Daha sonra numune alkali bakır solüsyonu ile ısıtılır. Cuprik (Cu^{+2}) bakır iyonları glukozu okside eder ve Cuprous (Cu^{+1}) iyonları oluşur. Bu esnada oluşan bu bakır miktarına eşit miktarda arsenomolibdat indirgenir. Renk değişimi kolorimetrik olarak ölçülür ve glukoz kantitasyonu yapılır [9].

Glukoz oksidaz (Fermco Test) Metodu

Serum, plazma, serebrospinal sıvıda bulunan glukoz moleküler oksijen tarafından Glukonic asid ve H_2O_2 'ye okside edilir. Bu reaksiyonu glukoz oksidaz enzimi katalizler. H_2O_2 kromojen peroksidaz enziminin etkisi ile renkli bir bileşiğe oksitlenir. Bu bileşik H_2SO_4 etkisi ile kalıcı kırmızı renk verir. Ölçüm kolorimetrik olarak yapılır [9].

2.4.2.3 Glukoz Biyosensörü ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Usman Ali ve arkadaşları 2010 yılında çinko oksit nanorodlar üzerine glukoz oksidaz enzimini immobilize ederek potansiyometrik glukoz biyosensörü geliştirmiştir. 250-300 nm yarıçapında ve yaklaşık olarak 1,2 μm uzunluğundaki nanorodlar 250 μm yarıçapındaki gümüş tel üzerinde büyütülmüştür. Glukoz oksidaz (GOD) iyi sıralanmış çinko oksit nanorodlar üzerine elektrostatik olarak immobilize edilmiştir. Glukoz biyosensörünün duyarlılığı, seçiciliği, stabilitesi ve tekrar üretilebilirliği incelenmiştir.

Sensör 0,5- 1000 μM geniş logaritmik konsantrasyon aralığında potansiyometrik cevaba sahiptir ve hücre içi glukoz tayini için uygundur. Membran kullanılan sensörün ölçüm aralığı 0,5 μM ' dan 10 mM' a artmış ve sensörün cevap süresinin 1 saniyeden 4 saniyeye arttığı gözlenmiştir. Diğer taraftan membran kullanılan sensörün sürekliliğinde dikkat çekici bir artış olmuştur. Sensör cevabı ürik asit ve askorbik asit gibi girişim yapan maddelerin normal konsantrasyonlarında etkilenmemiştir [10].

Luo ve arkadaşları 2004 yılında glukozun kantitatif tayini için amperometrik biyosensör geliştirmiştir. Biyosensör, biyokompozit ile homojen hale getirilip kolayca hazırlanabilmektedir. Biyokompozit enzimin uygun koşullarında direk ve basit elektrokimyasal biriktirme metodu ile kitosan hidrojel, glukoz oksidaz ve altın nanopartiküllerine uygulanarak oluşmaktadır. Oluşan biyokompozit, olağandışı koşullarda da enzim aktivitesinin korunmasını sağlamaktadır ve altın nanopartiküllerin kullanılması da biyokompozitin iyi bir enzim afinite göstermesini sağlamıştır. Biyosensör, hızlı cevap verebilmekte ve 2,7 μM dedeksiyon limitiyle 5-2,4 μM lineer konsantrasyon aralığında glukoz tayini yapabilmektedir. Altın nanopartiküller ile kombinasyon afiniteyi arttırmış ve tek basamakta manuel olmayan yöntemin seçilmesi beklenen biyokompozit özellikler sayesinde glukozun hassas tayini sağlanmıştır [11].

Yang ve arkadaşları 2010 yılında sitrik asit kullanarak sertleştirme yöntemiyle çinko oksit nanorod sentezlemiştir. Kitosan destekli çapraz bağlama tekniği ile pH 7.4 tamponunda glukoz oksidazın çinko oksit yüzeyine immobilize olması sağlanmıştır. Bir boyutlu çinko oksit nanorodlar yüksek yüzey-hacim oranı ile etkili geniş yüzey alanı glukoz oksidazın immobilizasyonu için uygun ortam sağlar. Biyosensörün cevap süresi 2 saniyeden azdır. Biyosensör 25.7 $\mu\text{A cm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$ değeri ile yüksek seçiciliğe, 0,01 mM düşük tayin limitine ve 0.01–0.25 mM ve 0.3–0.7 mM aralıklarında iki lineer cevap aralığına sahiptir. Michaelis–Menten sabiti 1.95 mM' dır. Sonuçlar, çinko oksit nanorodların biyosensör uygulamalarında kullanım alanına sahip olduğunu göstermiştir [12].

Du ve arkadaşları 2007 yılında direk ve basit elektrokimyasal biriktirme metodu ile kitosan- altın nanopartikül filmini üretmiştir ve bu filmin glukoz biyosensöründe uygulamasını incelemişlerdir. HAuCl_4 çözeltisi, kitosan ve kitosan ile stabilize edilmiş ve kitosanın elektrobiriktirilmesi ile camı karbon elektrot yüzeyinde biriktirilen elektrokimyasal olarak indirgenmiş altın nanopartikül karışımından oluşmaktadır. Sonuçta oluşan film üzerine glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu sağlanmıştır. Elektrot yüzeyi siklik voltametri ve AFM ile karakterize edilmiştir. Kitosan etikisi ve biriktirme süresi ile karışımdaki HAuCl_4 konsantrasyonu ve biyosensör üzerinde uygulanan voltaj etkisi incelenmiştir. Glukoz biyosensörün lineer aralığı 5.0×10^{-5} - 1.30×10^{-3} M' dir. Michaelis–Menten sabiti 3.5 mM ve dedeksiyon limiti 13 μM ' dir [13].

Wang ve arkadaşları 2013 yılında gümüş nanotel (AgNWs) ve kitosan-glukoz oksidaz film kullanarak amperometrik glukoz biyosensörü geliştirmiştir. Üretim prosesi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve biyosensörün elektrokimyasal davranışları siklik voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile karakterize edilmiştir. Optimum koşullarda biyosensör 10 μM ile 0.8 mM lineer konsantrasyon aralıklarında 2.83 μM dedeksiyon limiti ile glukoz tayini yapabilmektedir. Geliştirilen biyosensör yüksek duyarlılık, düşük dedeksiyon limiti, hızlı cevap ve iyi stabilite göstermektedir [14].

Kang ve arkadaşları 2009 yılında glukoz oksidaz (GOD)-grafen-kitosan nanokompozitin elektrokimyası üzerine çalışmıştır. Biyosensörde immobilize edilmiş enzimin biyoaktivitesi korunur, yüzey üzerine hapsedilir, geri dönüşümlü iki proton ve elektron transfer reaksiyonu, iyi stabilite, aktivite ve hızlı heterojen elektron transfer oranına sahiptir. GOD- grafen- kitosan nanokompozit filmin duyarlı glukoz tayini için kullanılabilirliği incelenmiştir. Biyosensör 0.08 mM ile 12 mM aralığında 0.02 mM dedeksiyon limitiyle lineer tayin aralığına sahiptir. Biyosensör performansı geniş yüzey-hacim oranı, yüksek grafen iletkenliği, enzim adsorpsiyonunu arttıran redoks enzimleri ve elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferini sağlayan iyi biyoyumluluğa sahip kitosana bağlıdır [15].

Luo ve arkadaşları 2010 yılında camsı karbon elektrot üzerine chitosan/ NiFe_2O_4 nanopartikülleri ile glukoz oksidaz enzimini immobilize ederek yeni bir glukoz biyosensörü üretmişlerdir. X-ışınları difraksiyon cihazı (XRD), taramalı elektron mikroskobu (SEM), UV-Vis spektroskopisi, Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile elektrot özelliklerini belirlemişlerdir. Camsı karbon elektrot yüzeyine modifiye edilmiş CHIT/ NiFe_2O_4 NPs/GOx biyosensör, siklik voltametri çalışmalarında kullanılan yapay redoks aracı olan ferrosen karboksilik asit kullanılarak glukozun oksidasyonu ile iyi bir elektrokimyasal cevap vermiştir. Glukoz oksidaz konsantrasyonu, çalışma potansiyeli ve elektrolit destekli pH parametrelerini incelemişlerdir. Elektrot 1×10^{-4} – 2.0×10^{-2} M aralığında cevap vermektedir. Biyosensör 0.6V potansiyel uygulandığında 4 saniyeden az cevap süresi ile iyi bir performans göstermektedir [16].

Liu ve arkadaşları 2005 yılında karbon nanotüp/kitosan kompozitine glukoz oksidaz enziminin tutunmasını sağlayarak elektrot ile glukoz oksidaz arasında direk elektron transfer reaksiyonunu gerçekleştirmiştir. Glukoz oksidazın elektron transfer reaksiyon oranı 7.73 s^{-1} değerine artmıştır. Glukoz biyosensörü $0.52 \mu\text{A mM}^{-1}$ yüksek duyarlılık ve iyi bir stabilite göstermiştir [17].

Lu ve arkadaşları nanogözenekli polikarbonat membran kullanılarak elektropüskürtme yöntemiyle 250 nm yarıçapında ve 10 μm uzunluğunda altın nanoteller sentezlemişlerdir. Nanoteller kitosan çözeltisi içine dağıtılmış ve camsı karbon elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Altın nanotel modifiye edilmiş elektrotun elektrokimyasal davranışı ve onun hidrojen peroksit üzerine uygulamasını araştırmışlardır. Elektrot yüksek duyarlılık ve hızlı cevap süresi ile düşük hidrojen peroksit dedeksiyonuna sahiptir. Glukoz biyosensörü üretmek için nanoteller üzerine glukoz oksidaz enziminin adsorpsiyonunu sağlamışlardır. Glukoz dedeksiyonu -0.2 V potansiyel altında fosfat tamponunda gerçekleşmiştir. Glukoz biyosensörü 8 saniyeden kısa cevap süresi ve 10^{-5} – 2×10^{-2} M lineer konsantrasyon aralığına sahiptir [18].

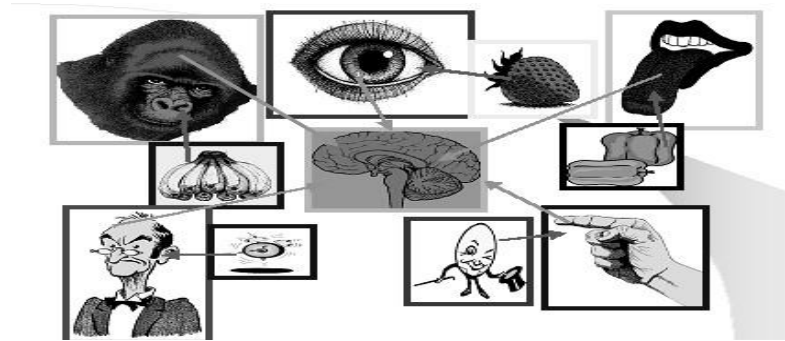
Gomathi ve arkadaşları 2011 yılında kitosan ve nanotel çok duvarlı karbon nanotüpü faz ayırma metodu ile graft etmişlerdir. MWNT-CS-NW/GOD biyosensörü MWNT-CS-NW yüzeyine glukoz oksidaz immobilize ederek oluşturulmuştur. Glukozun elektrokimyasal tanımlanması için siklik voltametri ve amperometri yöntemleri kullanılmıştır. Biyosensör +0.34V potansiyel ile yüksek duyarlılık ve 1–10mM konsantrasyon aralığında 3 saniye cevap süresine sahiptir. Girişim etkisi göstermemektedir [19].

BÖLÜM 3

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 [20].

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 biyosensörük sistemler olarak düşündürüldükleri için biyosensör çalışmalarına güzel örnekler oluşturmaktadırlar. (Şekil 3.1)



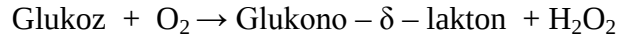
Şekil 3.1 Doğal ve en mükemmel biyosensörük sistemler

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 [21].

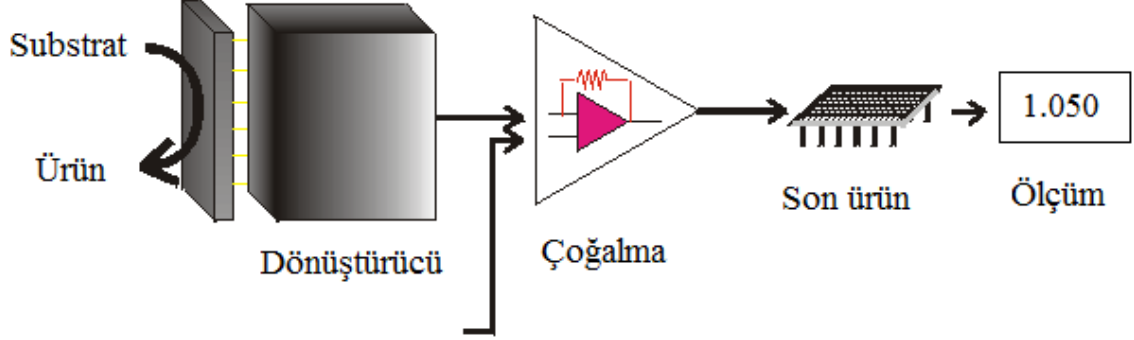
Elektrokimyasal sensörler (elektrokimyasal algılayıcı sistemler) Analitik Kimya’da oldukça yaygın kullanımı olan cihazlardır. Bu cihazlara IUPAC tarafından getirilen tanım şu şekildedir: “Kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve konsantrasyona bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlara elektrokimyasal sensörler “denir. Bu sensörler, yapılarına enzim, hücre, doku, antikor, DNA, vb. biyolojik maddelerin eklenmesiyle BİYOSENSÖR 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 [22].

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 glukozoksidad (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 O₂ harcanır. Ortamdaki glukoz bittiğinde O₂ tüketimi durur. O₂ elektrodu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözünmüş O₂ ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glukozun oksidasyonu için harcanan O₂ olup buradan biyolojik sıvıdaki glukoz miktarı hesaplanır. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalinde katılmasıyla diğer birçok maddenin tayini

mümkündür. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine BİYOSENSÖRLER adı verilir [23]. Şekil 3.2’de biyosensörün en genel yapısı görülmektedir.

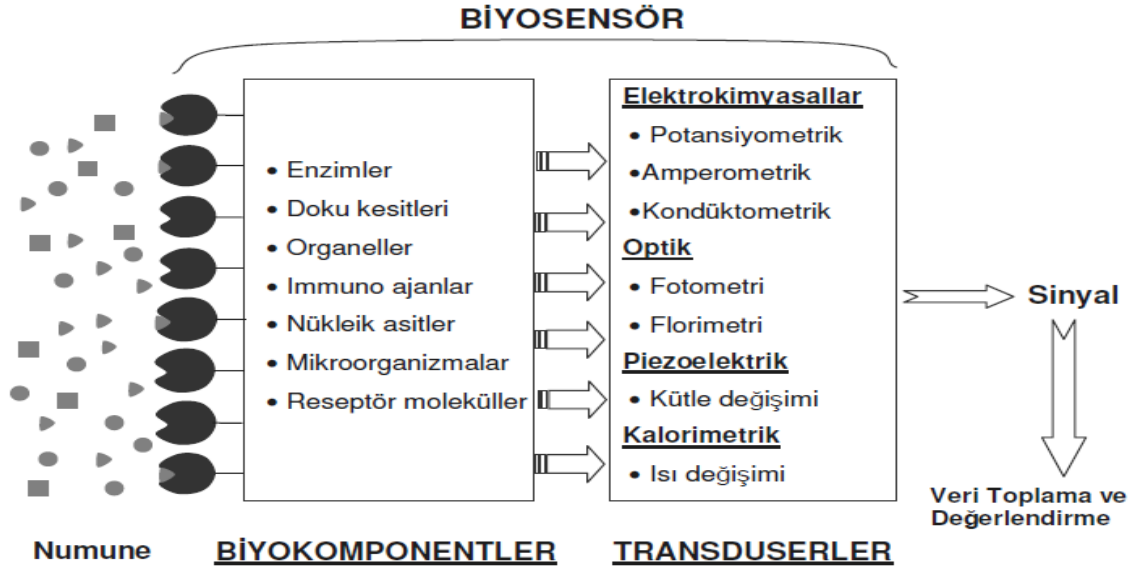


Şekil 3.2 Biyosensörün yapısı [20].

Biyosensörlerin yüksek spesifikklik 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 [23].

3.1 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 yada yükseltgenmesi, ışıık emisyonu, absorbsiyon yada reflektans, ısı emisyonu, kütle değişimi ve bunun gibi değişimlerden kaynaklanır. Sinyal; transduser yardımıyla akım, potansiyel, sıcaklık değişimi, ışıık absorbsiyonu, 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 3.3’de biyosensörlerin genel çalışma mekanizması görülmektedir [21].



Şekil 3.3 Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması

3.1.1 Biyokomponentler

Biyosensörlerin yapısında yer alan biyokomponentler (biyokimyasal bileşenler) çoğu kez biyoreseptör (biyolojik algılayıcı) olarak da adlandırılırlar. Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikolarlar, nükleik asitler ve biyolojik membranlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler sensörlerde biyokomponent (biyoreseptör) olarak kullanılırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılanlar; enzimler ve antikordlardır. Biyoreseptörler analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratırlar ve bu dönüşüme eşlik eden değişimler transduser tarafından algılanır.

Teorik olarak reseptör ve transduserlerin birçok değişik şekilde birleştirilmesi mümkün olmasına rağmen bu bileşimler bir elektrik sinyali oluşturamazlarsa biyosensör fonksiyon göstermez [21].

Biyoreseptör; bir analitin tanınmasında biyosensörün biyolojik hassasiyete sahip kısmıdır. Biyosensörün hassasiyeti ve seçiciliğinde etkilidir. Bu reseptörler tek bir partiküler substratı bağlayacak ve diğer substratlara bağlanmayacak özellikte olmalıdır; temel olarak biyoreseptörler 3 grup (biyokatalitik, biyoaffinite ve hibrit reseptörleri) altında toplanırlar.

Biyokatalitik reseptörler, analiti belirlenmeyen formdan belirlenebilir forma dönüştürerek transduserle kaydedilebilir ve belirlenebilir kılar [24]. Biyokatalitik tanıma elementleri enzim (mono veya multi enzim) içeren sistemler, hücreler (mikroorganizmalar, örn; bakteriler, mantarlar, ökaryotik hücreler, mayalar), hücre organelleri ve bitki hayvan doku parçalarından oluşur [25]. Enzimler biyosensörlerde kullanılan ilk biyokomponentlerdir. Antibadiler, nükleik asitler, lektinler, boyalar, hücre membran reseptörleri ve diğer spesifik bağlayıcı ajanlar gibi biyolojik komponentler biyoaffinite reseptörlerine örnektir. Hormonlar, ilaçlar, virüsler, tümör antijenleri, bakteri antijenleri ve diğer birçok protein gibi maddelerin belirlenmesi ve ölçümü, immunolojik teknikler vasıtasıyla düşük konsantrasyonlar da bile başarılabilmektedir. Affinite bazlı biyosensörler; belirli bir ligantı termodinamik olarak stabil kompleks formuna dönüştüren seçici etkileşimler oluştururlar. Hibrit reseptörlerde biyosensör uygulamalarında nükleik asit kullanımı rapor edilmiştir. Bu sensörlerin kullanım alanları DNA’da meydana gelen zararları kimyasal olarak belirleme ve DNA’nın türe özgü diziliminin hibridizasyonu ile mikroorganizmaların belirlenmesidir [24]. Yüksek spesifikliklerinden dolayı enzimler en yaygın kullanılan biyoreseptörlerdir.

3.1.2 Transduserler

Biyolojik ve biyokimyasal sinyalleri veya cevabı belirlenebilir sinyale dönüştürebilen sistemlere transduser denir. Transduserler, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal reaksiyonun özelliğine göre transduserler kullanılır. Elektrotlar amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde kullanılır. Burada amaç; O_2 elektrodunda çözünmüş O_2 ’yi, pH elektrodunda H^+ iyonunu ölçmektir. Bir substrat için komponentin aktivitesi; O_2 tüketimiyle, H_2O_2 oluşumuyla, NADH konsantrasyonundaki değişimle, floresans, absorpsiyon, pH değişimiyle, kondüktivite, sıcaklık yada kütledeki değişimle izlenebilmektedir. Optik sensörlerde hedef; ışık, piezoelektrik sensörlerde ise kristalin salınım rezonansının kütle yüklenimi sebebiyle değişmesidir. Bunların dışında transistörler ve termistörler de transduser olarak kullanılmaktadır.

Transduserler temelde dört grup altında toplanırlar;

1-Elektrokimyasal transduserler

– Amperometrik

- Potansiyometrik
- Kondüktometrik

2-Optik transduserler

3-Akustik transduserler

4-Termal transduserler

3.1.3 Biyosensörlerde Analizlenebilecek Unsurlar

Analizlenecek madde ve yapılar genel olarak analit olarak adlandırılırlar. Biyosensörlerde tayin edilebilen maddeler örnekleriyle birlikte Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Biyosensörde tayin edilebilen maddeler [3]

Analizi Yapılan Maddeler	Örnekler
Amino Asitler	Alanin, arginin, asporjin, aspartik asit, sistin, glutamin, glutamik asit, glutation, histidin, levsin, lisin, 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

3.1.4 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, antikorlar, 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 [26]. (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2 Biyosensörlerde kullanılabilen biyoaktif bileşenler

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

3.1.5 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 [26]. (Çizelge 3.3)

Çizelge 3.3 Biyosensörlerde kullanılan ölçüm sistemleri

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

Bu başlık altında en yaygın olarak potansiyometrik, amperometrik, voltametrik ve alan etkili biyosensörlere rastlanmaktadır [27].

3.1.6 Biyosensör Çeşitleri

3.1.6.1 Elektrokimyasal Sensörler

Bu başlık altında en yaygın olarak potansiyometrik, amperometrik, voltametrik ve alan etkili biyosensörlere rastlanmaktadır [27].

3.1.6.2 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 [27].

3.1.6.3 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 (1-2 μ l) 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 [27].

3.1.6.4 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 eşi 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 [27].

3.1.6.5 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

faaydalanılır. Bu sensörlerde en önemli etken fiber boyunca ışık iletiminin etkinliğidir. İkinci sınıf, fiberin kendi özelliklerindeki (intrinsek) değişimleri kapsar ve arka alan (evanescent) biyosensörler ve yüzey plazmon rezonans biyosensörler olarak iki gruba ayrılır [27].

3.1.6.6 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^{-5} M) olanak tanır [27].

3.1.6.7 Kütle Hassas Sensörler

Çevirici olarak piezoelektrik kristallerin kullanıldığı kütle hassas biyosensörler, rezonans frekanstaki değişime dayanarak santimetrekarede nanogram seviyesinde kütle değişimini ölçebilen ve bu yüzden de antikor-antijen etkileşimlerinde sıkça kullanılan biyosensörlerdir. Kütle hassas biyosensörlerin çalışma prensibi piezoelektrik etkiye dayanır [27].

3.1.7 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
- ilaç 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 3.4’te gösterilmektedir [21].

Çizelge 3.4 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

3.1.7.1 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. İmmunoassay 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.

3.1.7.2 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 konsantrasyonuyla orantılı inhibisyonu izlenir ve sonuca ulaşılır. Hidrojen siyanür ve siyanojen 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.

3.1.7.3 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 genellikle 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.

3.1.7.4 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

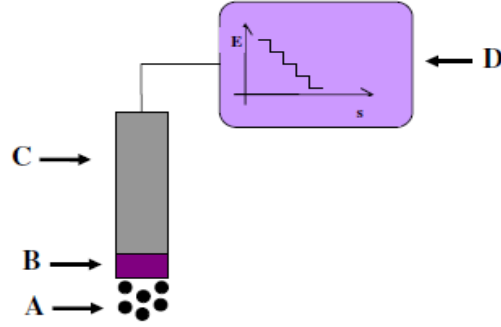
Enzim ve elektrot yüzeyi arasında elektrodların gidiş gelişini sağlayan elektron transfer mediatörlerin kullanılmasıyla enzimatik redoks işlevini elektrotla birleştiren yaklaşım en başarılı enzim elektrotlardır. Mediatörler, oksijenden daha kolay redüklenebilen bileşiklerdir. Bunlar oksijenden bağımsız 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.

3.1.8 Enzim Sensörleri

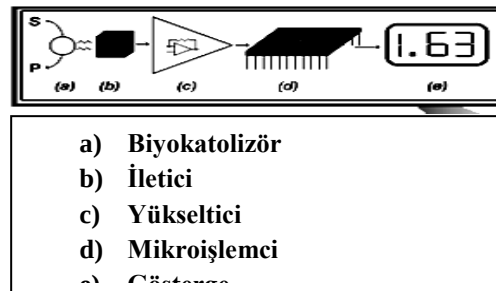
En genel anlamda bakıldığında bir enzim sensörü; iletici, ince bir enzim tabakası ve ölçüm kombinasyonundan oluşmaktadır. Diğer biyosensörlerden tek fark biyoaktif tabakada biyomolekül olarak enzimler bulunmaktır. Şekil 3.4'te bir enzim sensörünün genel şematik gösterimi verilmektedir.



Şekil 3.4 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 [6].

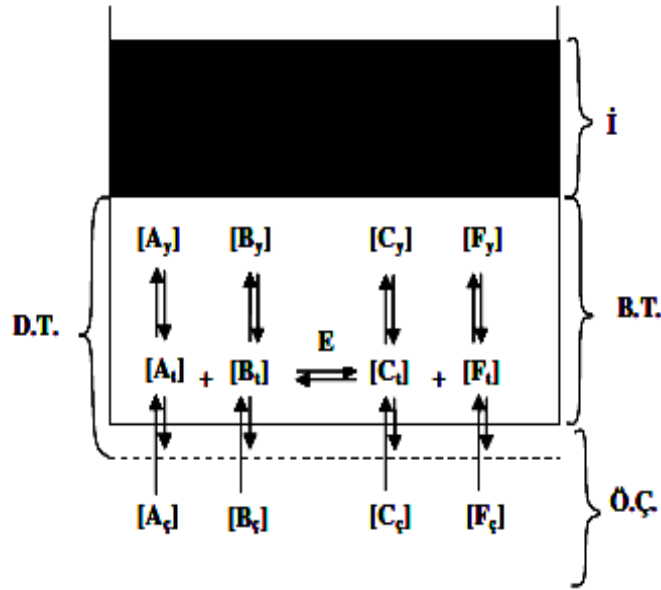
Şekil 3.5'te görüldüğü gibi sistemin özelliğine bağlı olarak yükseltici, mikroişlemci, dijital görüntüleyici gibi kısımlar sistem içinde yer alabilirler.



Şekil 3.5 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 3.6’ da biyoaktif tabakada gerçekleşen olaylar açısından bir enzim sensörünün genel çalışma ilkesi özetlenmiştir [28]



Şekil 3.6 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 3.6’ 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 yanı sıra 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.

3.1.8.1 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 [28].

Çizelge 3.5 Enzim sensörlerinin sınıflandırılması

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
- Biyoluminesans esaslı optik enzim sensörleri

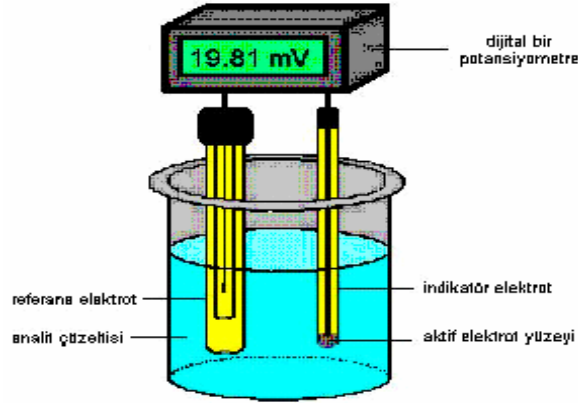
3.Piezoelektrik esaslı enzim sensörleri

4.Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri

Potansiyometrik Esaslı Enzim Sensörleri

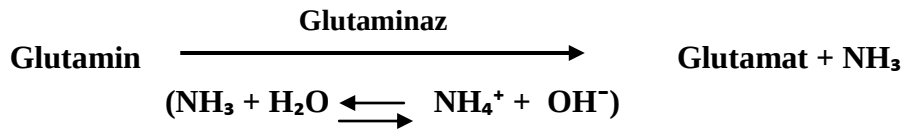
Akımın çok az geçtiği veya hiç geçmediği sistemlerde, indikatör elektrodun referans elektroda karşı gösterdiği, konsantrasyon değişimine bağlı olarak değişen potansiyelin ölçüldüğü tayin yöntemine **potansiyometri** denir. Çalışma elektrodu, çözeltideki türlerden bazılarına seçimlilik gösteren ve iç 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 3.7’de potansiyometrik bir ölçüm sistemi şematik olarak görülmektedir.

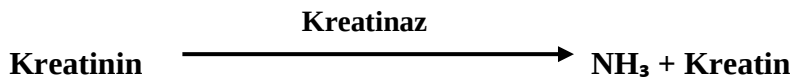
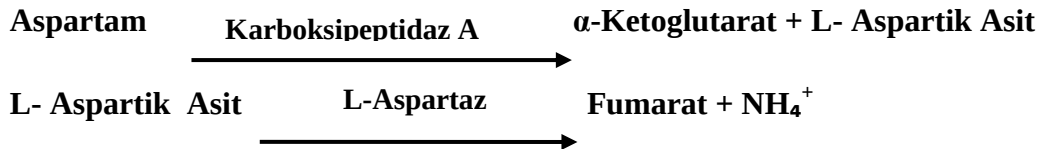


Şekil 3.7 Potansiyometrik ölçüm sisteminin şematik olarak gösterimi

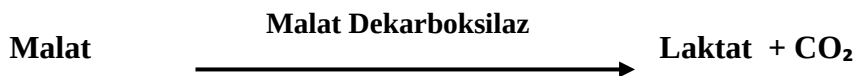
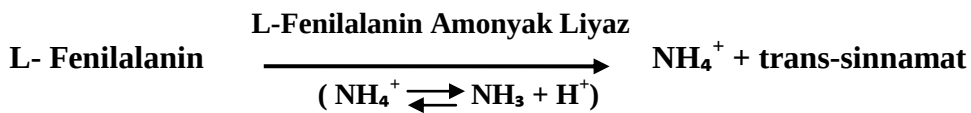
İçte ve dışta bulunan çözeltilerde analizi yapılacak türün derişimi açısından bir fark varsa membranın iç yüzeyi ve dış yüzeyi arasında bir gerilim farkı oluşur. Bu gerilim farkının değeri analizi yapılan türe ve derişimine bağılı olduğu gibi, membranın cinsine ve çözeltide bulunan öteki bileşenlerin tür ve miktarlarına da bağılıdır. 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 [26].



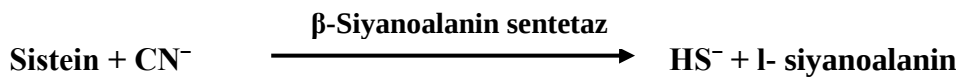
Amonyum Duyar Sensör



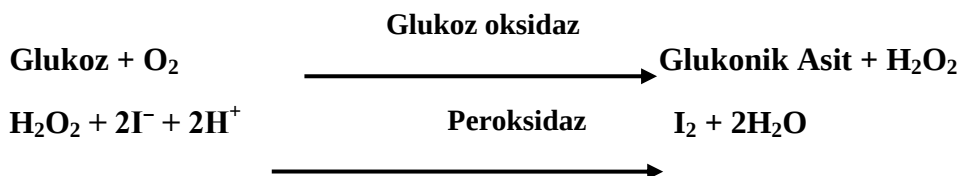
Amonyok Duyar Sensör



Karbondioksit Sensörü

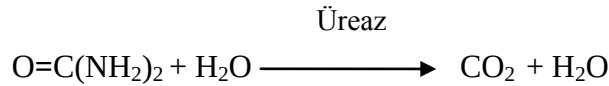


Siyanür Sensörü



İyon Duyar Elektrot

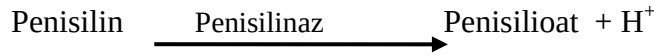
pH Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotları: Proton konsantrasyonundaki değişmeyi belirlemek amacıyla tasarlanan bu tür enzim elektrotlarında temel sensör olarak en yaygın bir şekilde klasik cam elektrotları kullanılır [29]. Bunların yanısıra antimon elektrotunda olduğu gibi H^+ iyonlarına duyar bazı metalik elektrotlarında kullanılması mümkündür. Temel ilke proton konsantrasyonundaki küçük farkların belirlenmesidir. Potansiyometrik enzim sensörlerine verilebilecek en klasik örnek üre tayinine yönelik sensördür.



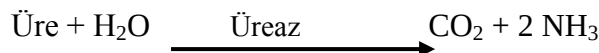
pH Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotlarının Bazı Uygulamaları

pH duyar potansiyometrik enzim elektrotlarına ilişkin seçilmiş örnekler aşağıda verilmiştir. Bu tür enzim sensörlerinde temel iletici olarak genelde cam pH duyar elektrotlar kullanılır.

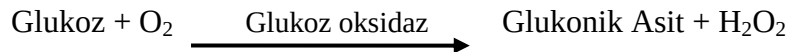
1) Penisilin Tayini [29]



2) Üre Tayini [29]



3) Glukoz Tayini [30], [31]



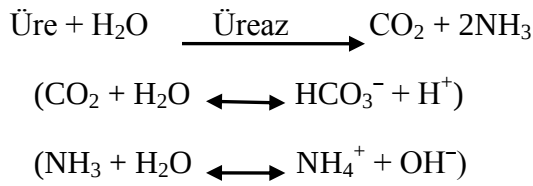
Amonyum Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotları: Amonyum iyonlarına duyar temel sensör ile enzimin birleştirilmesiyle hazırlanan bu elektrotlar genelde H^+ , K^+ ve Na^+ gibi tek yüklü katyonlara da duyarlık gösterdikleri için ölçüm ortamlarında benzer

maddelerin bulunması durumunda girişim problemleri ortaya çıkmaktadır. Girişim etkilerini azaltmak için değişik yöntemler kullanılmaktadır [21].

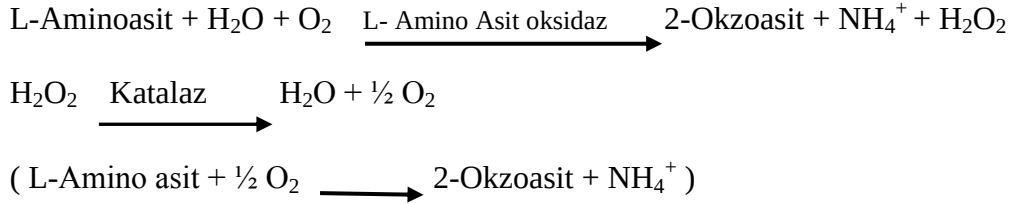
Amonyum Duyar Potansiyometrik Enzim Elektrotlarının Bazı Uygulamaları

Amonyum duyar potansiyometrik enzim elektrotlarına ilişkin seçilmiş örnekler aşağıda verilmiştir. Bu tür enzim sensörlerinde temel iletici olarak NH_4^+ duyar elektrotlar kullanılır.

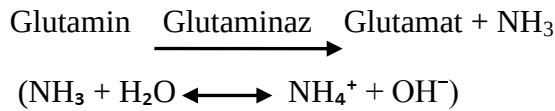
1) Üre Tayini



2) L-Amino Asit Tayini



3) Glutamin Tayini



3.1.9 Enzim Elektrotlarında Performans Faktörleri

Hazırlanan biyosensörün hedeflenen amaçlar çerçevesinde kullanılır olup olmadığına, ancak performans faktörlerinin ayrıntılı bir şekilde belirlenmesinden sonra karar verilebilir [32].

3.1.9.1 Kalibrasyon ve Duyarlılık

Duyarlılık derişimdeki bir birim değişiklik için biyosensör sinyalinin zamanla değişimi 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 grafiği çizilerek kolayca belirlenebilmektedir. Zamanla bir biyosensörün duyarlılığındaki değişimin belirlenmesi için genellikle hergün kalibrasyonunun yapılması gerekmektedir [32].

3.1.9.2 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 [32].

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 olabileceğı, kofaktör veya aracı içeren sistemlerde bunların kaybının aktivite düşüşüne yol açacağı unutulmamalıdır.

3.1.9.3 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 değiştirebileceğı görülür [32].

3.1.9.4 Cevap Süresi

Cevap zamanı biyosensörün analizlenecek maddenin bulunduğu ortama temas ettiğı andan sinyalin kararlı hale geldiğı ana kadar geçen süredir. Çok sayıda numunenin söz konusu olduğı analizlerde en kısa sürede elde edilen sonuç büyük önem taşıdığından biyosensörün cevap süresinin kısa olması istenir [32].

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;

1. Etkili karıştırma (veya akış hızının artırılması),
2. Membran yüzeyinden kirliliklerin uzaklaştırılması veya çok küçük membran yüzeyli mikro-elektrotlar kullanılması,
3. Ölçüm sırasında çözelti konsantrasyonunun seyreltikten derişige doğru olması.

Nötral taşıyıcı membranlarda, aktif maddeye (ligand veya kompleks) çözeltideki iyonun tutunma hızı, cevap zamanını etkileyen en önemli faktördür. Bunun dışında;

- | | |
|---------------------------------|---|
| 1. İyon ekstraksiyon kapasitesi | 2. Difüzyona karşı direnç |
| 3. Membran kalınlığı | 4. Membrandaki çözücünün polaritesi de cevap zamanını etkileyen faktörlerdir. |

3.1.9.5 Seçicilik

İdeal bir biyosensörün sadece hedef analitin derişimindeki değişikliklere cevap vermesi ve diğler türlerin varlığından etkilenmemesi gerekir [32]. Enzimatik reaksiyonun substrat ve ürünleri ile girişim yapan maddelerin bulunması durumunda sensör sinyali etkilenecek 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 iyonla 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 [33].

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

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 iyonla 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.

3.1.9.6 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 [32].

3.1.9.7 Sıcaklık

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

3.1.9.8 Tıbbi Uygulamalarda Kullanılacak Biyosensörler İçin Biyouyumluluk

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

3.1.10 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 ortamdaki 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 [21].

3.1.11 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. İmmobilizasyon yöntemine göre biyosensörün ortalama ömürleri aşağıda verilmiştir [21].

Adsorpsiyon: 1gün,

Membranda tutuklama: 1 hafta,

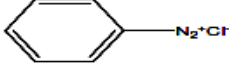
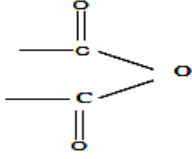
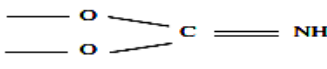
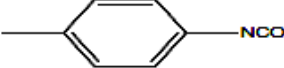
Fiziksel tutuklama: 3-4 hafta,

Kovalent bağlama: 4-14 ay.

3.1.11.1 Kovalent Bağlama

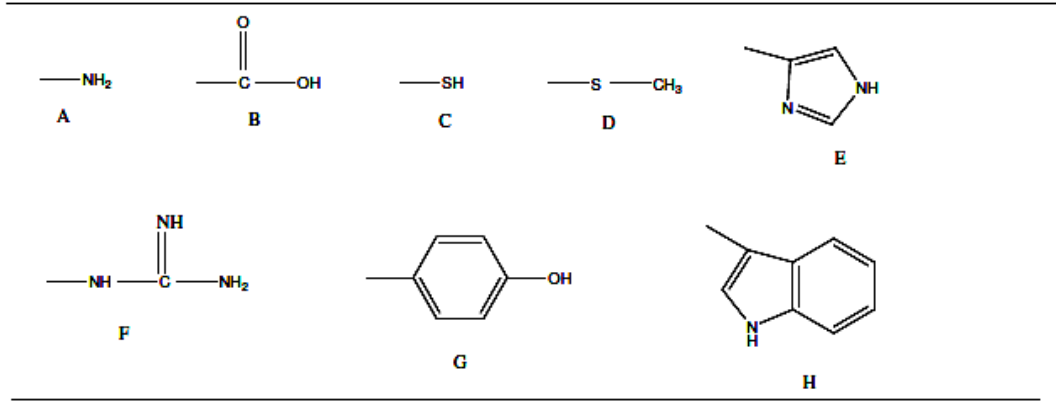
Enzimler doğrudan transdusere veya önceden uygun bir film veya tabaka ile kaplanmış transdusere kovalent olarak bağlanabilirler. Enzimler aktive edilmiş transduser yüzeylerine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanarak immobilize edilen enzim preparatı transduser yüzeyinde bir film veya tabaka oluşturularak da biyosensör hazırlanabilir. Enzimlerin kovalent bağlanmasında kullanılacak taşıyıcıların içermesi gereken reaktif gruplar ve bunların enzimdeki hangi aminoasitlerle etkileşime girdikleri Çizelge 3.6’ da verilmiştir.

Çizelge 3.6 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 CH₂CON₃ Açıl azid	— NH₂ (Lys, N-Terminal) — NH₂ (Lys, N-Terminal) — 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)

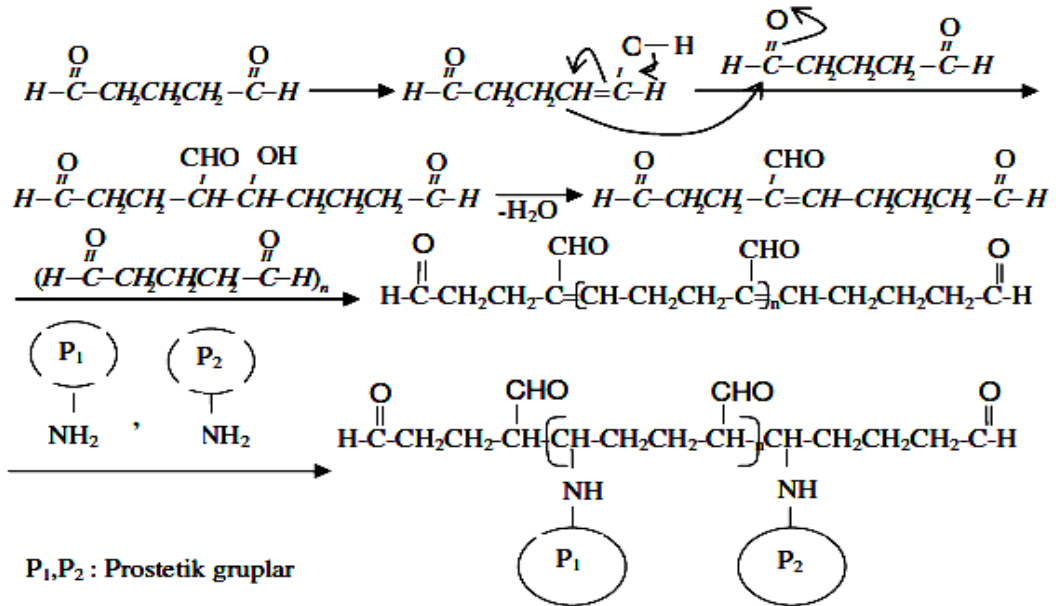
Enzimlerin kovalent bağlanması dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için esansiyel olan aminoasitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların bağlanma sırasında sterik olarak rahatsız edilmemesidir. Çizelge 3.7’de görüldüğü gibi kovalent bağlanma enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir.

Çizelge 3.7 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.

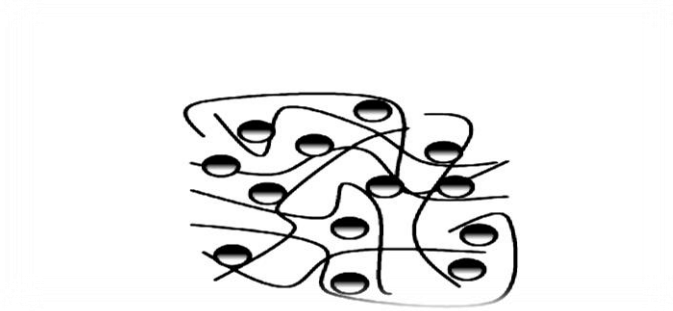
Enzim immobilizasyonu çok yumuşak koşullarda (oda sıcaklığı, nötral pH vb.) yapılmalıdır [34]. Enzim molekülünün glutaraldehid ile çapraz bağlanma reaksiyonu Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3. 8 Enzim molekülünün glutaraldehid ile çapraz bağlanması

3.1.11.2 Tutuklama

Enzimler makromoleküler yapılı proteinler olup polimer jel matrikslerde Şekil 3.9'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 [35].



Şekil 3. 9 Enzim molekülünün jel içinde veya polimer matrikste tutuklanması

Guilbault ve arkadaşlarının hazırladığı üreaz elektrotunda ise üreaz süspansiyonu elektrot yüzeyinde diyaliz membranı tarafından sarılarak tutuklanmıştır [28], [29], [36], [37]. Çözeltide enzim aktivitesi hızla düştüğünden fiziksel tutuklama yerine kimyasal kovalent bağlama tercih edilir. Tutuklama için en yaygın kullanılan film veya matriksler nisasta, poliakrilamid, silikon lastiği, polivinil klorür ve polivinil alkoldür.

3.1.11.3 Adsorpsiyon

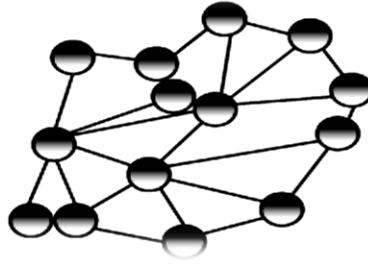
İmmobilizasyonda kullanılan en eski ve en basit yöntemlerdendir. Örneğin, glukoz oksidaz adsorplanmış polietilen membranı ilk olarak 1962 yılında glukoz biyosensörü için önerilmiştir [38]. Genelde, enzim veya biyoreseptör çözeltisine yüzeyi membran veya film ile kaplanmış transduser daldırılır ve belirli 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 [28]. Şekil 3.10'da enzim molekülünün elektrot yüzeyine adsorpsiyonu görülmektedir.



Şekil 3.10 Enzim molekülünün elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu

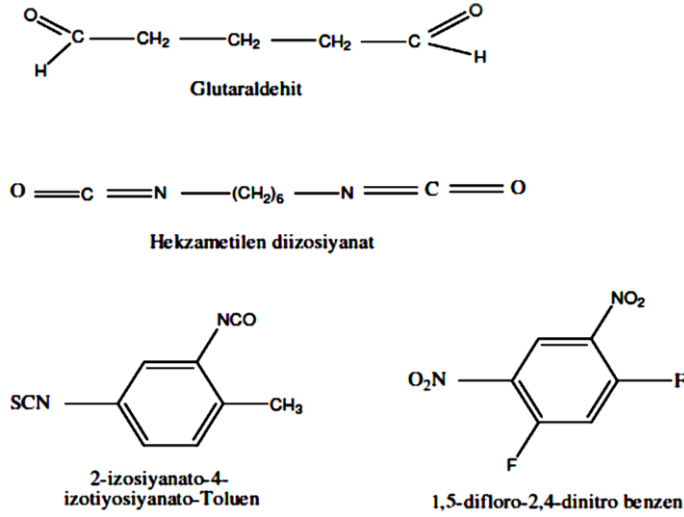
3.1.11.4 Çapraz Bağlama

Bu yöntem biyosensör hazırlanmasında daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin birleştirilmesi şeklinde uygulanır. Şekil 3.11’da enzim molekülünün film veya tabakaya çapraz bağlanması görülmektedir.



Şekil 3.11 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 3.12’de verilmiştir. Glutaraldehit en sık kullanılan bifonksiyonel reaktiftir. Ortamdaki konsantrasyonu %2-5 (w/w) olmalıdır [39].



Şekil 3. 12 Bazı bifonksiyonel reaktiflerin kimyasal formülleri

3.1.12 Kitosan

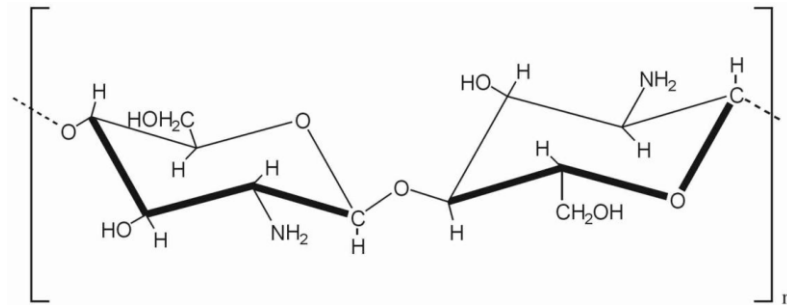
Kitosan, yengeç ve karides gibi kabuklu deniz ürünlerinin dış iskeletlerinde, kelebeklerin kanatlarında, mantarların hücre duvarlarında vb. bulunan doğal bir polisakkarit olan kitinden kısmi deasetilasyon yoluyla elde edilen, reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip; kimyasal yapı olarak seluloza benzeyen 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 [4].

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, antibakteriyal, ve hemostatik etki göstermesi vb. seklinde sıralanabilmektedir [40]. 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), kanbasıncının 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 [4]. Kitosanın pozitif iyonik yüke sahip olması bahsedilen bu özellikleri göstermesinde büyük önem taşır. Kitosan kimyasal yapısı, ucuz ve biyouyumlu olması sebebiyle biyosensör uygulamalarında enzim immobilizasyonu için kullanılmaktadır [18].

3.1.12.1 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 [4]. Kitosanın kimyasal yapısı Şekil 3.13'te verilmiştir.

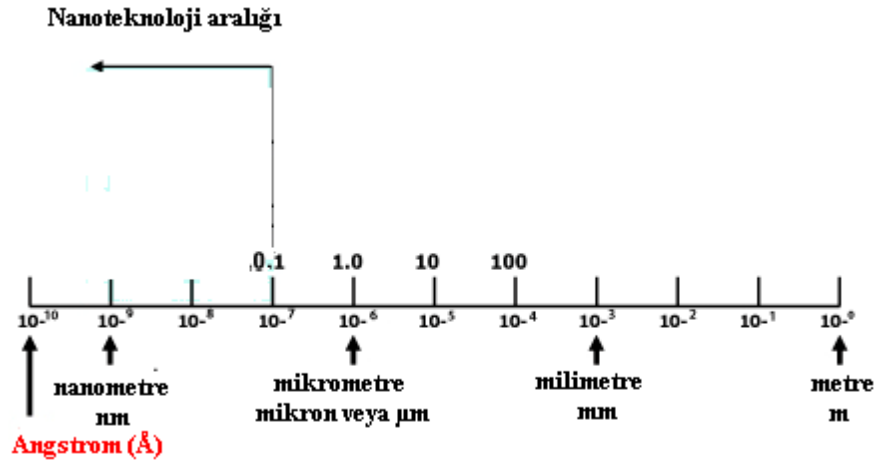


Şekil 3.13 Kitosanın Kimyasal Yapısı

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 [40].

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]. Nanoteknolojinin kullandığı boyut aralığı Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1 Nanoteknolojinin kullanıldığı boyut aralığı [43].

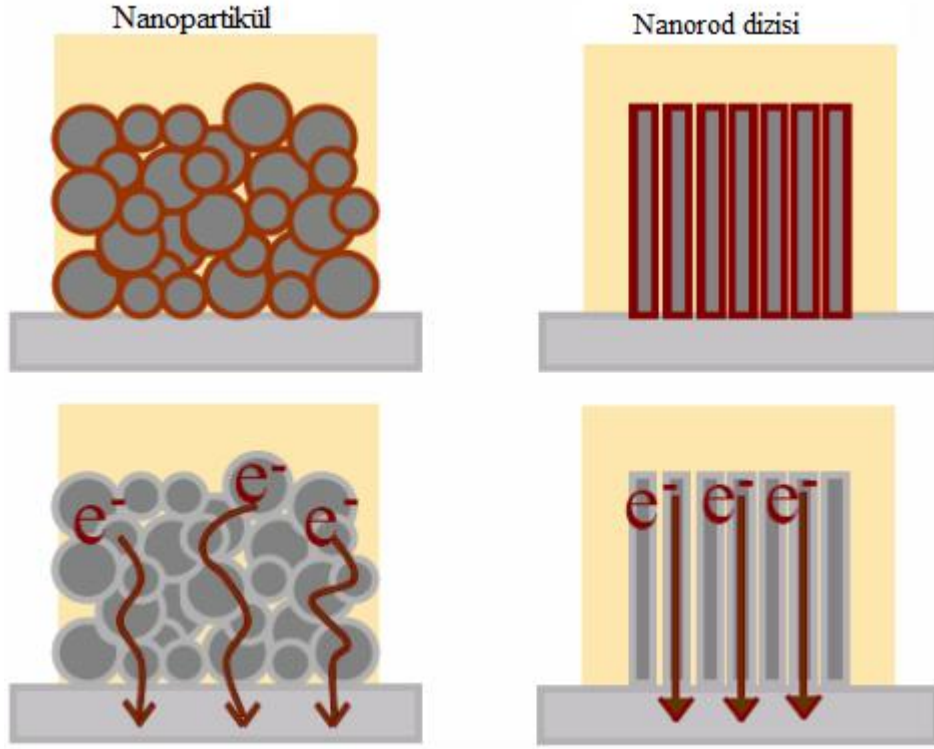
Malzemenin büyüklüğü nanometre ölçütlerine inildiği zaman, kuvantum davranışları bilinen klasik davranışların yerini almakta ve fiziksel özellikleri kesikli bir değişim göstermeye başlamaktadır. Kimyasal ve fiziksel özellikler, yapının büyüklüğüne ve atom yapısının ayrıntılarına, dışardan sisteme bağlanan 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 anlaşılacağı gibi nanoteknolojinin biyosensör teknolojisi ile birleşmesi, makro boyutta üretilen sensörlerin minyatürleşmesini sağlar. Kullanılan nanomateryaller 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 nanomateryaller 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 nanomateryal olarak sınıflandırılabilir. Bunlar nanodünyasında en iyi bilinen şekillerdir. Yarıiletkenler, nanoküreler ve C_{60} bu gruptadır. Çubuklar, poligon şeklindeki silindirler ve teller 1-boyutlu nanomateryallerin örnekleridir. 2- boyutlu nanomateryallere ise İnce filmler gibi çoğunlukla optik kaplamalarda, korozyon korunmasında ve yarı iletken ince film cihazlarda kullanılan nanomateryaller örnek verilebilir [47]. 1D nanomateryal olan ZnO nanorodlar sahip olduğu olağanüstü materyal özellikleri ve elektronik, optik, fotonik performansı sayesinde geniş kullanım alanına sahiptir [46].



Şekil 4.2 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].

4.1 Nanoyapıların Sentezleme Teknikleri

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].

4.1.1 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].

4.1.2 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 hücresine 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].

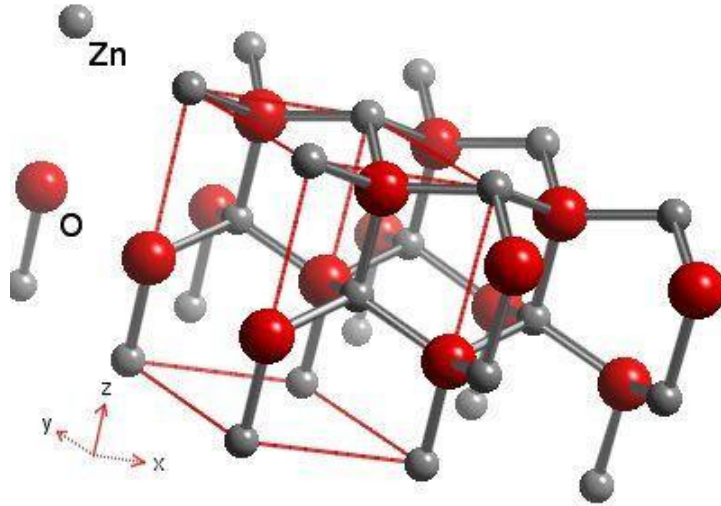
CVD ve PVD yöntemleri yüksek sıcaklık ve düşük basınçlarda çalışmayı gerektiren, kullanılan cihazlar nedeniyle maliyeti oldukça yüksek ve az miktarda malzemenin elde edilebildiği yöntemlerdir. Ayrıca CVD yönteminde başlangıç maddeleri çoğu zaman tehlikeli ve zehirlidir. Değişik morfolojilerde nanoyapılar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

4.1.3 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].

4.2 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- 2μ 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. Hekzagonal kristal yapıdaki ZnO'nun şematik görünümü Şekil 4.3'de verilmektedir [43]. Elektronik, optik ve fotonik özelliklerinden dolayı ZnO nanorodların, UV-lazer, LED, güneş pilleri, nanogeneratörler, gaz sensörleri, fotodedektörler, ve fotokatalist olarak kullanımı ilgi çekmektedir [46].



Şekil 4.3 Hekzagonal ZnO yapısı [43].

Vurtzit yapı a ve c olan iki örgü parametreleri ile hekzagonal birim hücreye sahiptir ($c/a = 8/3 = 1.633$) [49]. ZnO'in fiziksel özellikleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

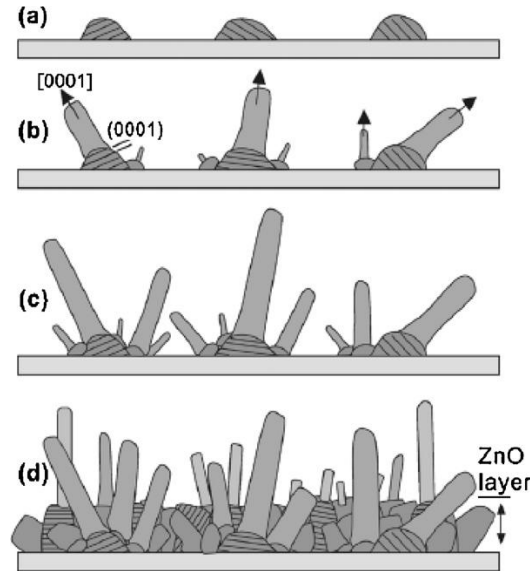
Çizelge 4.1 ZnO'in fiziksel özellikleri [45]

ZnO'in fiziksel özellikleri	
Örgü Yapısı	Hekzagonal Wurtzit
Örgü Sabiti	$a=3.24\text{\AA}$, $c=5.13\text{\AA}$ $c/a=1.60$
Molekül ağırlığı	$\text{Zn}=65.38$, $\text{O}=16$, $\text{ZnO}=81.38$
Yoğunluğu	5.66gr/cm^3
Erime noktası	$1975\text{ }^\circ\text{C}$
Yasak enerji aralığı	3.436 eV (0 K°), 3.20 eV (300 K°)
Eksiton bağlanma enerjisi	60 meV
Örgü enerjisi	965Kcal/mol

4.3 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 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4 Si yüzey üzerinde VS metodu ile ZnO nanorodların büyüme mekanizmasının şematik gösterimi [51].

4.4 ZnO Nanorodların Sentez Metotları

4.4.1 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].

4.4.2 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 damlacağında gaz fazındaki reaktantların çözülmesiyle başlamaktadır. VLS prosesi yaygın bir şekilde ZnO nanorodlar ve nanoteller hazırlanmasında kullanılmaktadır [47].

4.4.3 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].

4.4.4 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 büyütmek için kullandı [53]. Bu bulgudan sonra MOCVD yöntemine dayalı benzer çalışmalar değişik gruplar tarafından yapılmaktadır [47].

4.4.5 Sol-gel Metodu

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

4.4.6 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].

4.4.7 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 katkılандırılmadan fotokatalitik görünür ışık sergileyebilmektedir. Hidrotermal metotla yüzey üzerinde ZnO nanorod büyümesi aşağıdaki basamakları takip eder.

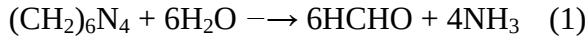
A. ZnO nanopartikülleri ince tabaka yüzey üzerinde çekirdeklenir. Çekirdek tabakası, azalan termodinamik bariyerden dolayı nanorodların büyümesinin çekirdeklenmesini destekler.

B. Alkali reaktifler (NaOH ya da HMT gibi) ve Zn^{2+} tuzunun ($Zn(NO_3)_2$, $ZnCl_2$, gibi) sulu çözeltisi öncül olarak kullanılır.

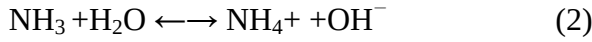
C. ZnO çekirdeklenen yüzey belirli bir sıcaklık ve zamanda büyüme çözeltisinde tutulur.

D. Son olarak oluşan yüzey yıkanır ve kurutulur.

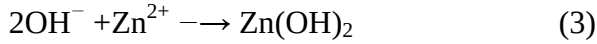
HMT ve $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ öncül olarak seçildiğinde, kimyasal reaksiyon aşağıdaki eşitliklerle özetlenebilir. Bozulma reaksiyonu:



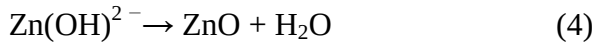
Hidrotermal besleme reaksiyonu:



Aşırı doygunluk reaksiyonu:



ZnO nanorod büyüme reaksiyonu:



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].

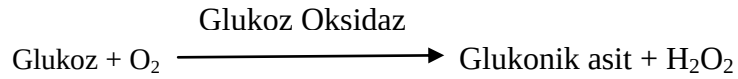
ZnO nanorodların hidrotermal sentezinde HMT dışında ortama hidroksil iyonu sağlayan NaOH, KOH, veya Na_2CO_3 gibi reaktifler de mevcuttur. ZnO nanorodların sentezinde alkali reaktif olarak NaOH, KOH, ya da Na_2CO_3 seçilirse reaksiyon sıcaklığı artar ($>100^\circ\text{C}$) ve teflon-kaplı pas tutmayan 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 bir çok 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].

4.5 Glukoz Tayininde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış

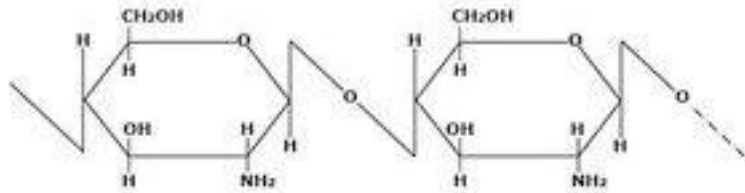
4.5.1 Glukoz Oksidaz

Glukoz oksidaz enzimi glukozun moleküler oksijen ile yükseltgenip glukono- δ -lakton (glukono-1,5-lakton) ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) olduğu reaksiyonu katalizler. Lakton sulu ortamda herhangi bir enzime ihtiyaç duymaksızın hidroliz olarak glukonik aside dönüşür [6].



4.5.2 Kitosan

Kitosan, kitinden kısmi deasetilasyon yoluyla elde edilen, reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip; kimyasal yapı olarak seluloza benzeyen doğal bir biyopolimerdir. Tez çalışmamızda kitosan, glukoz oksidaz enziminin elektrot yüzeyine daha iyi immobilizasyonunu sağlamak ve elektrot yüzeyinden enzim kaybını önlemek için kullanılmıştır. Kitosanın kimyasal yapısı Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5 Kitosanın kimyasal yapısı [54]

4.5.3 Çinko Oksit Nanorod

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

BÖLÜM 5

MATERYAL VE METOD

5.1 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.

5.2 Kullanılan Numuneler

5.2.1 Serum Numunesi

Yıldız Teknik Üniversitesi Sağlık Merkezi'nden temin edilmiştir.

5.3 Kullanılan Enzimler

Çalışmada kullanılan glukoz oksidaz enziminin numarası, elde edildiği kaynak ve temin edildiği firma Çizelge 5.1'de verildi.

Çizelge 5.1. Glukoz oksidaz enziminin numarası, kaynağı ve temin edildiği firma

Enzimin Adı	Numarası	Kaynağı	Firması
Glukoz oksidaz 21200 Units/g	E.C. 1.1.3.4	Aspergillus niger	Sigma

5.4 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.

5.5 Kullanılan Çözeltiler

5.5.1 0.1M Fosfat Tamponu Çözeltisi (pH 6.5, 7.2 ve 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 tamamalanarak 0.1 M'lık stok çözeltisi hazırlandı. 1.4196 g Na_2HPO_4 tartılarak bir miktar suda çözüldükten sonra, daha önce hazırlanan 0.1M'lık monobazik sodyum fosfat çözeltisi ile karıştırılarak çözeltinin pH'sı 6.5, 7.2 ve 7.4 olarak ayarlandıktan sonra çözelti hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Tampon çözeltiler kullanılmadıkları zaman buzdolabında saklandı.

5.5.2 Glukoz oksidaz (GOD) Enzim Çözeltisi

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

5.5.3 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 0.1M NaOH çözeltisiyle 7.4' e ayarlandı. Hazırlanan çözelti kullanılmadığı zaman $+4^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

5.5.4 ZnO Nanorod/Kitosan Çözeltisi

2 mg ZnO nanorod, 1 mL kitosan çözeltisine (5.5.3'te belirtildiği şekilde hazırlanan) eklenerek vortekslenerek karıştırıldı. Hazırlanan çözelti kullanılmadığı zaman +4°C'de saklandı.

5.5.5 GOD/Kitosan Çözeltisi

1 mL kitosan çözeltisine (5.5.3'te belirtildiği şekilde hazırlanan) 0.4 mL GOD enzim çözeltisi (5.5.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan) eklenerek hazırlandı. Hazırlanan çözelti kullanılmadığı zaman -20°C'de saklandı.

5.5.6 Glukoz Çözeltileri

4.9542 g glukoz 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 glukoz çözeltileri hazırlandı.

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

Çizelge 5.2 Glukoz kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Hazırlanan Glukoz Çözeltileri (M)	İlave edilen stok glukoz 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.						

5.5.7 Standart Katma Yöntemi ile Serumda Glukoz Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler

Standart katma yöntemiyle, çinko oksit nanorod ve kitosan kullanılarak hazırlanmış olduğumuz glukoz biyosensörü ile insan serum örneğinde glukozun tayini için kullanılan çözeltilerin hazırlanması Çizelge 5.3’de verildi.

Çizelge 5.3 Glukoz çözeltilerinin hazırlanması

	Çözelti No				
	1	2	3	4	5
İlave edilen 10^{-3} M glukoz çözeltisi (mL)	0	0.1	0.2	0.4	0.6
0.1 M Fosfat tamponu (pH 6.5) (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Serum (μ L)	200	200	200	200	200
	Saf su ilave edilerek çözeltiler belirlenen optimum pH’a ayarlanarak çözelti hacmi 25.0 mL’ye tamamlandı.				

5.6 Glukoz Biyosensörleri

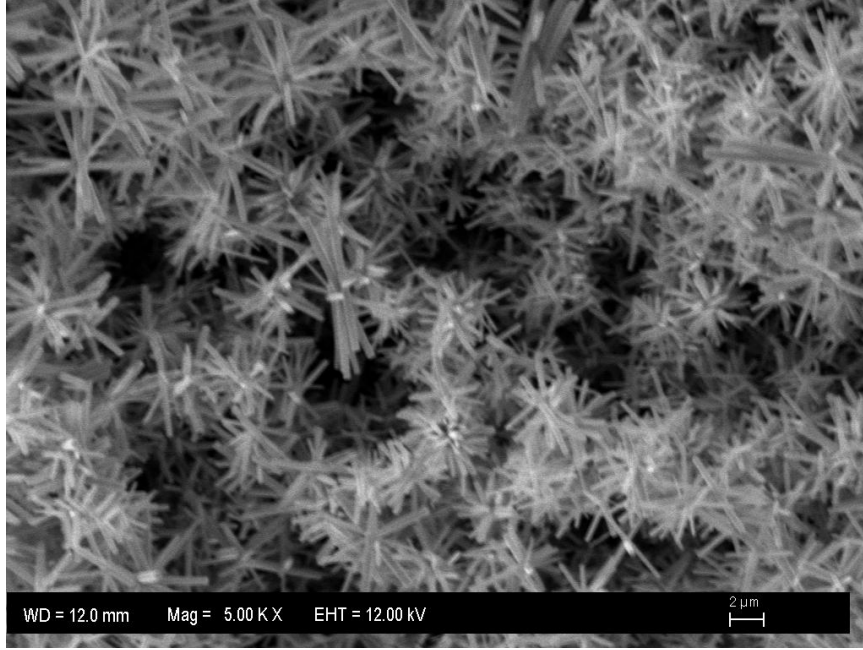
5.6.1 Glukoz Biyosensörlerinin Hazırlanması

Gümüş tel kullanılarak hazırlanmış çinko oksit nanorodlara glukoz oksidaz enzimini immobilize ederek (Biyosensör G) ve glukoz oksidaz enziminin nanorod yüzeyine daha iyi immobilize olmasını sağlamak için kitosan kullanılarak (Biyosensör GK) iki çeşit glukoz biyosensörü hazırlanmıştır. Her iki biyosensör hazırlanmadan önce ilk olarak çinko oksit nanorod hazırlanmıştır.

5.6.1.1 Hidrotermal Yöntemle Çinko Oksit Nanorod Hazırlanışı

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.

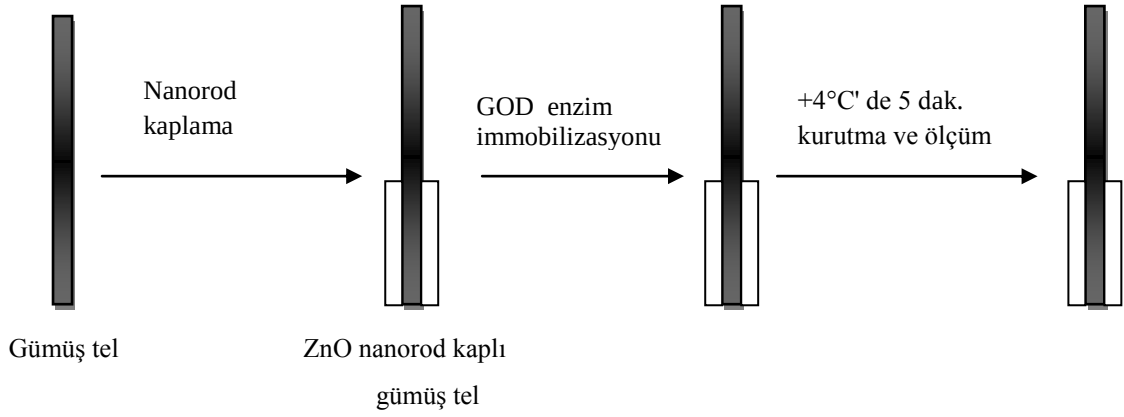
Gümüş tel aseton, etanol ve saf suda yıkandıktan sonra 25'er mL hacimlerde 0.025M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ve 0.025M heksametilen tetraminin (HMT) karıştırılıp hazırlanmasından oluşan 95°C'deki çözeltiye daldırıldı ve çözeltinin buharlaşması için yaklaşık 2-4 saat bekletildi. Gümüş tel yüzeyinde beyaz renkli tabakanın görülmesi, ZnO nanorodların oluştuğunu göstermektedir. Kaplanan tel saf su ile yıkandı ve oda sıcaklığında 5 dak. bekletilerek kuruması sağlandı. Oluşan nanorodların SEM görüntüsü alınarak kaplamanın en iyi şekilde gerçekleştiğinden emin olundu (Şekil5.1).



Şekil5.1 Nanorodların SEM görüntüsü.

5.6.1.2 Biyosensör G'nin Hazırlanması

ZnO nanorod kaplanmış gümüş tel, 0.1M fosfat tamponunda (pH 7.4) 5 dak. bekletilerek nanorod üzerinde hidrofilik yüzeylerin oluşması sağlandı. Daha sonra nanorod kaplı gümüş tel, 10mg/mL glukoz oksidaz enzimi (pH 7.4) çözeltisine daldırılarak 1 saat bekletildikten sonra enzimin nanorod yüzeyine elektrostatik olarak immobilize olması sağlandı. Enzim immobilize olmuş glukoz biyosensörü (Biyosensör G) +4°C'de 5 dakika bekletilerek kurutuldu. Biyosensör G'nin hazırlanması şematik olarak Şekil5.2'de görülmektedir.



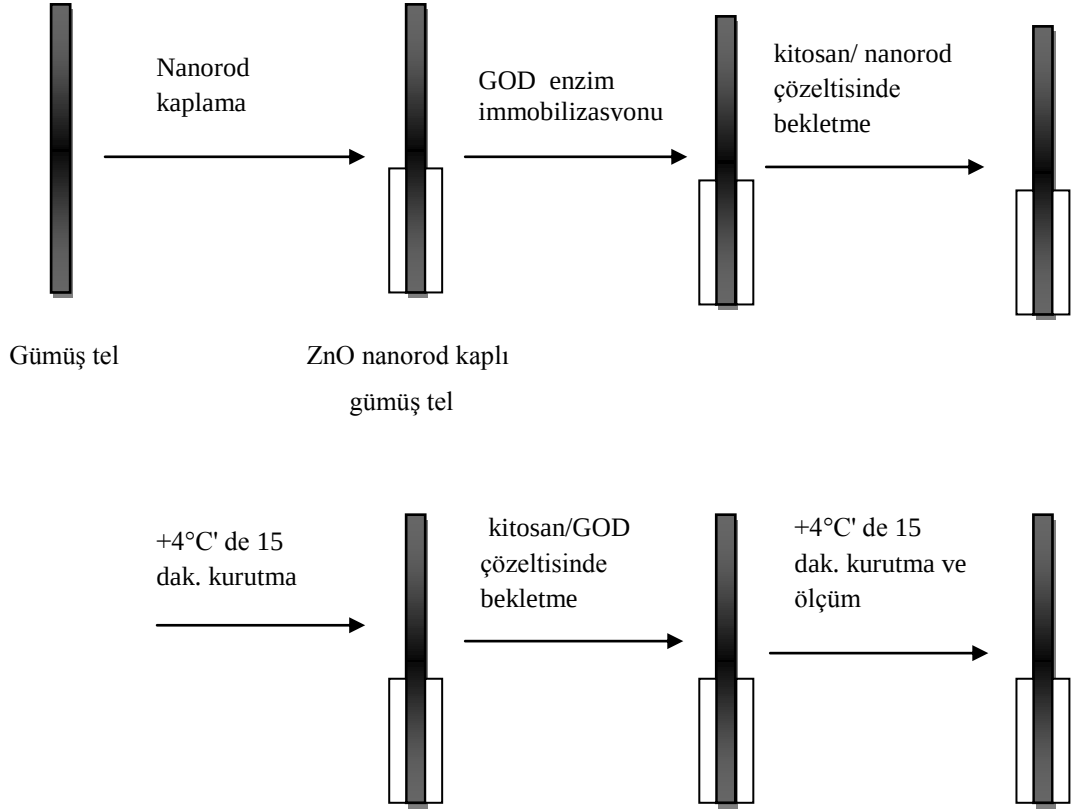
Şekil 5.2 Biyosensör G'nin hazırlanma şeması

5.6.1.3 Biyosensör GK'nın Hazırlanması

Biyosensör GK'nın hazırlanması için, bölüm 5.6.1.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan ZnO nanorod kaplı gümüş tel kullanılmıştır. Ayrıca ZnO nanorodların aynı şartlarda yüzeyden bağımsız olarak üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 25'er mL hacimlerde 0.025M $Zn(NO_3)_2$ ve 0.025M hekzametilen tetraminin (HMT) karıştırılıp hazırlanmasından oluşan 95°C'deki çözelti tamamen buharlaştırılarak beherin dibinde kaplanmış beyaz renkli ZnO nanorod tabakası kazınarak alınmıştır.

Bölüm 5.6.1.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan ZnO nanorod kaplı gümüş tel, 0.1M fosfat tamponunda (pH 7.4) 5 dakika bekletilerek nanorod üzerinde hidrofilik yüzeylerin oluşması sağlandı. Daha sonra nanorod kaplı gümüş tel, 10mg/mL glukoz oksidaz enzimi (pH 7.4) çözeltisine daldırılarak 30 dak. bekletildikten sonra enzimin nanorod yüzeyine elektrostatik olarak immobilize olması sağlandı. Daha sonra elektrot, 1 mL kitosan çözeltisi içinde 2 mg ZnO nanorodun karıştırılmasıyla elde edilen çözeltide (Bölüm 5.5.4) 15 dak. bekletilerek ZnO nanorod partiküllerinin elektrot yüzeyine tekrar tutunması ve yüzeyin kitosan tabakasıyla kaplanması gerçekleştirildi. Böylece, hazırlanmış olduğumuz biyosensör GK'nın iletkenliğinin daha da artması ve GOD enzimin yüzeye daha iyi immobilize olması sağlanmış oldu. Hazırlanan biyosensör GK, +4°C'de 15 dakika bekletilerek kurutuldu. Kuruyan biyosensör GK, 15 dak. süresince 0.4mL GOD (10 mg/mL) / 1 mL kitosan içeren çözeltide (Bölüm 5.5.5)

bekletildi. Son olarak kuruması için +4°C'de 15 dakika bekletildi. Biyosensör GK' nın hazırlanışı Şekil 5.3'de şematik olarak görülmektedir.



Şekil 5.3 Biyosensör GK'nın hazırlanma şeması

5.6.2 Glukoz Biyosensörlerinin Çalışma Aralıklarının ve Eğimlerinin Belirlenmesi

İki farklı işlemle hazırlanan glukoz biyosensörlerinin 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 /GOD/ZnO nanorod kaplı gümüş tel / Ag;AgCl

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

Elektrokimyasal hücredeki glukoz çözeltilerinin konsantrasyonu 1.0×10^{-1} - $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ arasında değiştirildi. Glukoz çözeltilerinin pH'ları fosfat tamponu ile optimum pH'a ayarlandı ve hazırlanan elektrotlar için ayrı ayrı hücre potansiyelleri kaydedildi. Her bir

elektrot için $\log[\text{glukoz}]$ 'a karşı potansiyel değerleri (mV) grafiğe geğirildi ve biyosensörlerin çalışma aralığı ve eğimleri belirlendi.

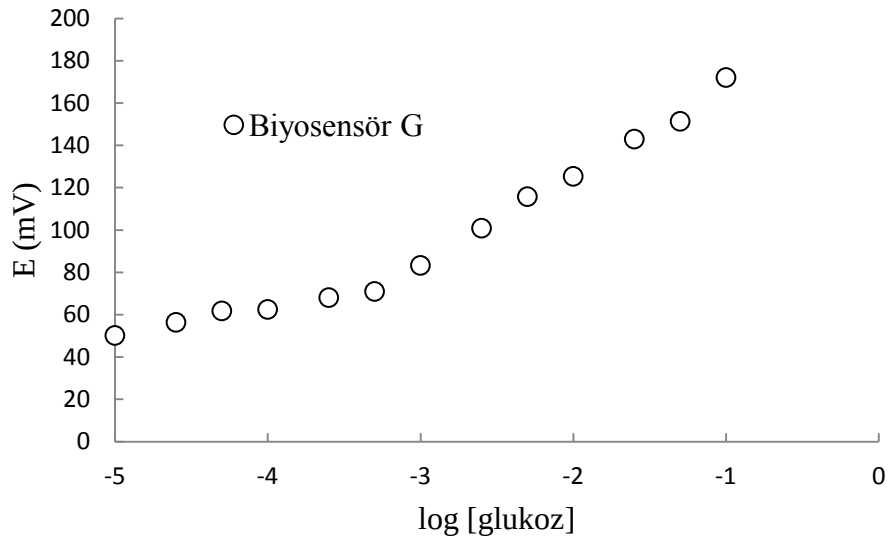
5.6.3 Glukoz Biyosensörlerinin Performansına Etki Eden Faktörlerin Belirlenmesi

Hazırlanan glukoz biyosensörlerinin (Biyosensör G ve Biyosensör GK) cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun, pH'nın, sıcaklığın, karıştırma hızının etkisi, tekrarlanabilirliği, cevap süresi, girişim etkisi belirlenerek raf ömrü tayin edildi.

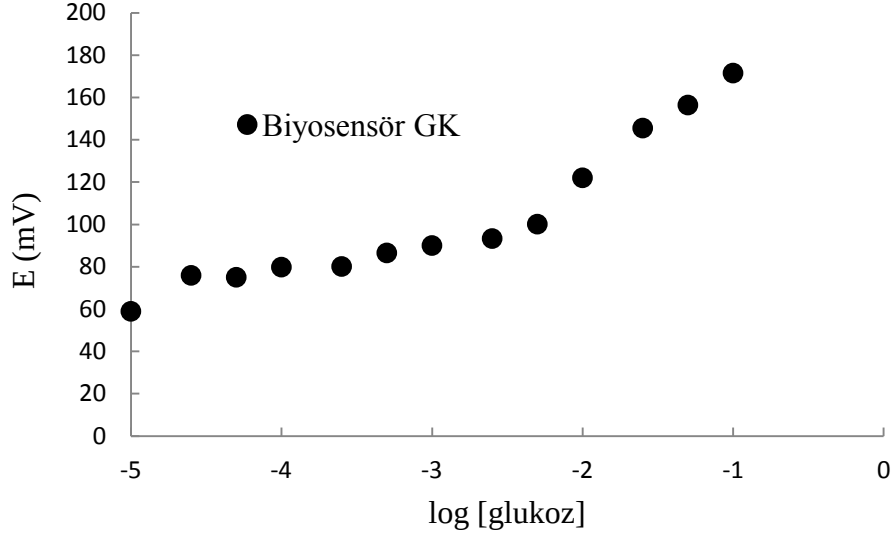
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

6.1 Glukoz Biyosensörünün Kalibrasyon Grafiği

Glukoz biyosensörlerin her biri için kalibrasyon grafiği Şekil 6.1 ve Şekil 6.2'de görüldüğü gibi glukoz çözeltilerinde çizildi. Biyosensörler için kalibrasyon grafiğinden çalışma aralıkları ve eğimleri belirlendi (Çizelge 6.1).



Şekil 6.1 Biyosensör G'nin kalibrasyon grafiği



Şekil 6.2 Biyosensör GK'nın kalibrasyon grafiği

Çizelge 6.1 25,0±1,0°C'da hazırlanan glukoz biyosensörlerinin eğimi ve çalışma aralıkları

Biyosensör adı	Eğim, (mV/p[glukoz])	Çalışma aralığı (M)
Biyosensör G	42.40	1.0×10^{-1} - 1.0×10^{-3}
Biyosensör GK	44.62	1.0×10^{-1} - 1.0×10^{-3}

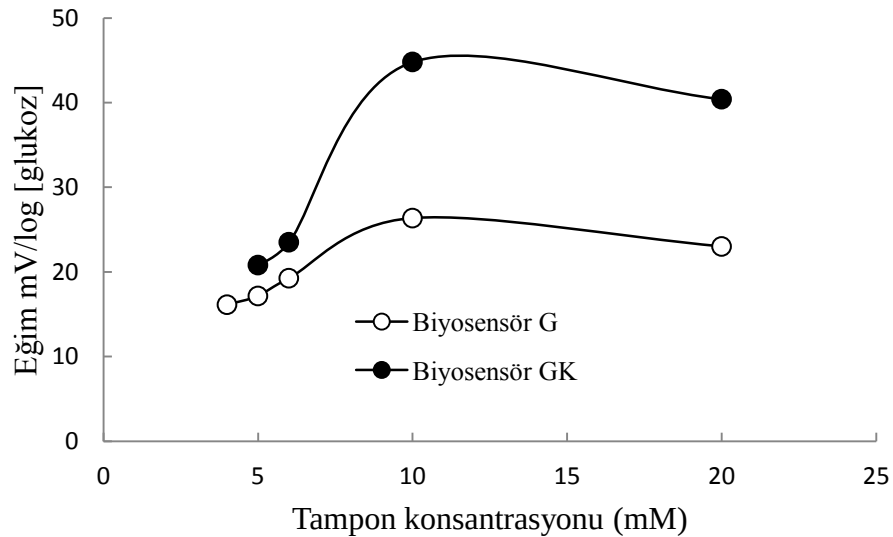
Wu ve arkadaşları (2007) platin elektot üzerine kitosan, altın nanopartikül ve glukoz oksidaz enziminden oluşan çoklu tabaka filmlerini modifiye ederek geliştirdikleri amperometrik glukoz biyosensörünün çalışma aralığını 5×10^{-4} M- 1.6×10^{-2} M olarak tespit etmişlerdir [55]. Çiftçi ve arkadaşları (2013) potansiyometrik glukoz tayini için elektrokimyasal yöntemle geliştirdikleri poly (3-aminophenyl boronic acid-co-3-octylthiophene) (PAPBAOT) organik elektrotun çalışma aralığını 5×10^{-3} M- 5×10^{-2} M olarak belirlemişlerdir [56]. Yang ve arkadaşları (2010) çinko oksit nanorod kullanarak geliştirdikleri amperometrik glukoz biyosensörünün 0.01-0.25 mM ile 0.3-0.7 mM olmak üzere iki aralıkta cevap verdiğini ancak 0.3-0.7 mM aralığında sensör duyarlılığının daha iyi olduğunu belirtmişlerdir [12]. Bizim geliştirdiğimiz ve Biyosensör G ve Biyosensör GK olarak adlandırdığımız her iki potansiyometrik glukoz biyosensörlerinin çalışma aralığı 1.0×10^{-1} - 1.0×10^{-3} M olarak bulundu. Literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında sensörlerin geniş bir aralıkta cevap verdiği görülmektedir.

6.2 Tampon Konsantrasyonunun Etkisi

Glukoz biyosensörlerinin performansına tampon konsantrasyonunun etkisini incelemek için 5 farklı konsantrasyonda (4, 5, 6, 10 ve 20 mM) fosfat tamponu kullanılarak hazırlanan glukoz çözeltilerinde (pH 7.4) biyosensörle potansiyel ölçümleri yapılarak kalibrasyon grafikleri çizildi ve tampon konsantrasyonuna karşı eğim değerleri grafiği de Şekil 6.3'te verildi. Her iki biyosensör için elde edilen eğim değerleri Çizelge 6.2'de verildi.

Çizelge 6.2 25,0±1,0°C'da kitosan kullanılarak hazırlanmış glukoz biyosensörünün cevabına tampon konsantrasyonunun etkisi

Tampon Konsantrasyonu (mM)	Eğim, (mV/p[glukoz])	
	Biyosensör G	Biyosensör GK
4	16.12	Cevap yok
5	17.15	20.8
6	19.25	23.5
10	26.35	44.8
20	23	40.4



Şekil 6.3 Glukoz biyosensörlerinin eğiminin tampon konsantrasyonu ile değişimi

Çizelge 6.2 ve Şekil 6.3'ten de görüleceği gibi, glukoz biyosensörü için en yüksek eğimin elde edildiği optimum tampon konsantrasyonunun 10mM olduğu bulundu. Biyosensör GK'nın 5mM' ın altındaki konsantrasyonlarda çalışmadığı görülmüştür.

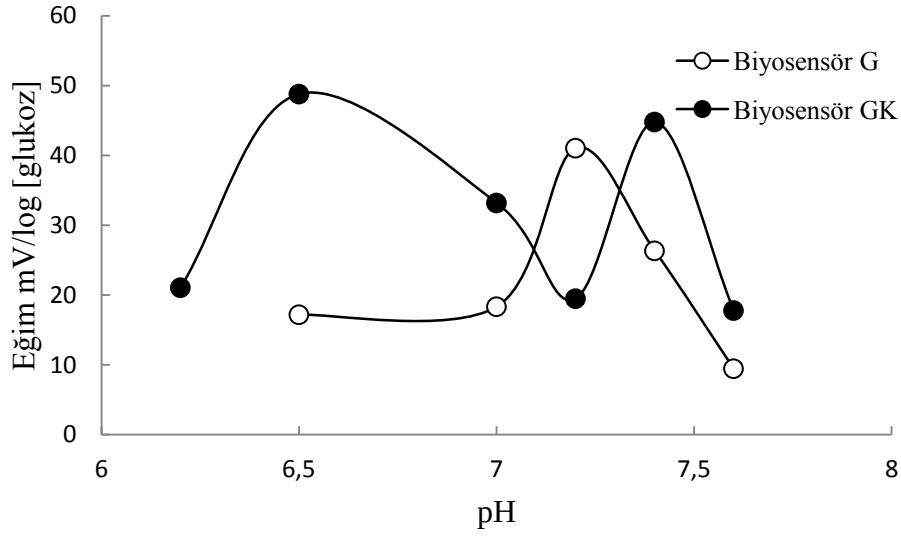
Wang ve arkadaşları (2013) hazırladıkları gümüş nanorod esaslı amperometrik glukoz biyosensörü ile bütün ölçümleri 0.02 M fosfat tamponunda yapmışlardır [14]. Ngeontae ve arkadaşları (2009) gümüş nanopartikül kullanarak geliştirdikleri potansiyometrik glukoz biyosensörünün bütün ölçümlerini ortamdaki gümüş iyonlarının çökmesini önlemek için 10 mM magnezyum asetat tamponunda yapmışlardır [57]. Bu tez çalışmasında ise ölçümler için fosfat tamponu kullanılmış, optimum tampon konsantrasyonu 10 mM olarak belirlenmiştir. Tampon konsantrasyonu artması, hazırlamış olduğumuz her iki biyosensör eğiminde düşüşe yol açmıştır (Şekil 6.3 ve Çizelge 6.2).

6.3 pH'ın Etkisi

Glukoz biyosensörlerinin performansına pH'nın etkisini incelemek için 7 farklı pH'da (6.2; 6.5; 7.0; 7.2; 7.4; 7.6 ve 7.8) ve optimum tampon konsantrasyonunda glukoz çözeltileri hazırlandıktan sonra kalibrasyon grafikleri çizilerek eğimleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 6.3 ve 6.4'te toplu halde verildi.

Çizelge 6.3 25,0±1,0°C'da Glukoz biyosensörlerinin cevabına pH'nın etkisi

pH	Eğim (mV/p[glukoz])	
	Biyosensör G	Biyosensör GK
6.2		21.07
6.5	17.20	48.8
7.0	18.35	33.2
7.2	41.05	19.5
7.4	26.35	44.8
7.6	9.47	17.8



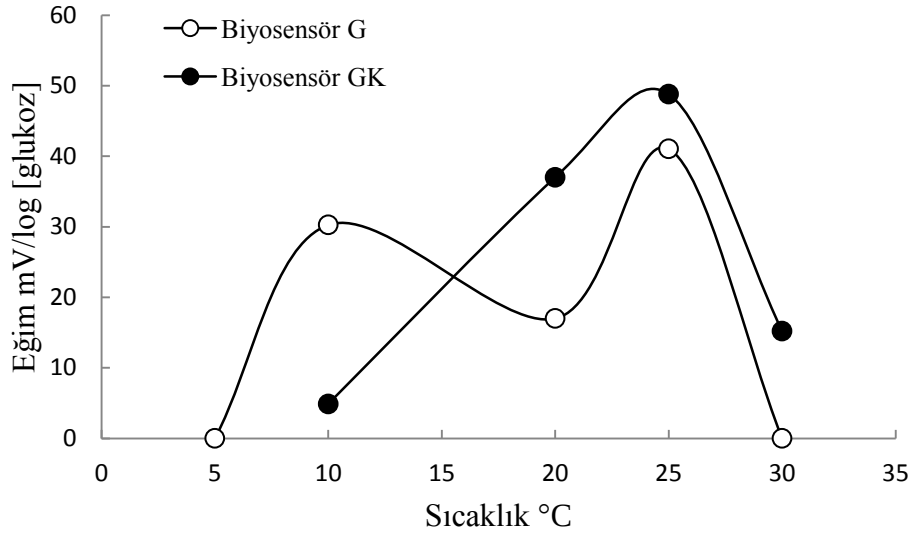
Şekil 6.4 Glukoz biyosensörlerinin eğiminin pH ile değişimi

Çizelge 6.3 ve Şekil 6.4'te görüldüğü gibi, Biyosensör G'nin eğiminin pH 7.2' de maksimum değere ulaştığı bunun altında ve üstündeki pH değerlerinde azalış gösterdiği görülmektedir. Biyosensör G'nin optimum pH'sı 7.2 olarak belirlenmiştir. Biyosensör GK'nın eğimi ise pH 6.5' ta maksimum değere ulaşmıştır. pH 6.5'tan sonra biyosensörün eğim değerinde hızlı bir düşüş görülmektedir. Biyosensör GK'nın aktivitesinde pH 7.4'te bir miktar artma olduğu tespit edildi. Ancak bu değer biyosensörün optimum pH değerinden küçük olduğu için biyosensörün optimum pH'sı 6.5 olarak kabul edilmiş, tez çalışması bu pH'da gerçekleştirilmiştir.

Literatürde glukoz biyosensörleri ile yapılan çalışmalarda genellikle nötral pH'larda ölçüm alınmıştır [10], [58], [59]. Yapılan iki çalışmada ise glukoz oksidaz enziminin pH 9.0'da maksimum çalışma performansı gösterdiği belirlenmiş ancak enzim denaturasyonunu önlemek ve elektrotun ortamda oluşan reaksiyon ürünlerini iyi algılaması için nötral pH'da ölçümlerin alınması tercih edilmiştir [11], [16]. Bizim geliştirdiğimiz Biyosensör G ve Biyosensör GK'nın optimum pH' sı sırasıyla 7.2 ve 6.5 olarak belirlenmiştir.

6.4 Sıcaklığın Etkisi

Glukoz biyosensörlerinin performansına sıcaklığın etkisini incelemek için, 5 farklı sıcaklıkta (5, 10, 20, 25 ve 30°C), biyosensörlerin optimum tampon konsantrasyonlarında ve optimum pH'larında hazırlanan glukoz çözeltileri ile ayrı ayrı potansiyel ölçümleri yapılarak kalibrasyon grafikleri çizildi (Şekil6.5). Elde edilen eğim değerleri Çizelge 6.4'te verildi.



Şekil 6.5 Glukoz biyosensörlerinin eğiminin sıcaklık ile değişimi

Çizelge 6.4 Glukoz biyosensörlerinin cevabına sıcaklığın etkisi

Sıcaklık(°C)	Eğim, (mV/p[glukoz])	
	Biyosensör G	Biyosensör GK
5	0	Çalışılmadı
10	30.27	4.87
20	17.0	37
25	41.05	48.8
30	0	15.2

Çizelge 6.4 ve Şekil 6.5'ten görüldüğü gibi, Biyosensör G, 10°C'nin altındaki ve 25°C'nin üzerindeki sıcaklık değerinde cevap vermemiştir. Biyosensör GK'nın ise

maksimum performans gösterdiği sıcaklık değeri 25°C olarak bulunmuştur. Grafikten de görüldüğü gibi her iki biyosensör için optimum çalışma sıcaklığı 25°C'dir.

Literatürde glukoz biyosensörleri ile yapılan çalışmalar genellikle 20-25°C sıcaklıklarda çalışılmıştır [10], [13]. Kong ve arkadaşları (2009) da glukoz enziminin optimum sıcaklığını 50°C olarak belirlemiş, ancak çözelti buharlaşmasını önlemek için oda sıcaklığında ölçümleri almışlardır [1].

6.5 Girişim Etkisi

Glukoz biyosensörlerine L- askorbik asit ve ürik asitin girişim etkisinin belirlenmesi amacıyla glukoz, ürik asitin ve L-askorbik asitin 10^{-1} M stok çözeltileri hazırlanmıştır. Glukoz konsantrasyonu sabit tutulup ürik asit ve askorbik asit için gerekli seyreltmeler yapılarak 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} M çözeltileri hazırlanmıştır. Glukoz çözeltisinin 10^{-2} M'da sabit tutulduğu, ürik asit ve askorbik asitin 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} M çözelti konsantrasyonlarında ölçüm alınmıştır. Ürik asit ve askorbik asit derişimleri değiştirilerek alınan ölçümler, ortamda girişim etkisi gösteren madde olmadan alınan ölçümlerle kıyaslanmıştır.

Sonuçlara göre Biyosensör GK, askorbik asitin tüm derişimlerinde, ürik asitin ise 10^{-5} M derişiminde girişim etkisi göstermediği belirlenmiştir. Biyosensör G ise ürik asit ve askorbik asitin tüm derişimlerinde girişim etkisi göstermiştir (Çizelge 6.5)

Çizelge 6.5 Biyosensörlerin L-askorbik aist ve ürik asite karşı verdiği cevaplar

Girişimci madde	Girişimci madde konsantrasyonu, M	Biyosensör G'nin cevabı, mV	Biyosensör GK'nın cevabı, mV
L-askorbik asit	0	2.4	101.3
	10^{-5}	66.7	81.3
	10^{-4}	45.4	60.2
	10^{-3}	0	0
Ürik asit	0	0.6	70.9
	10^{-5}	62.1	72.1
	10^{-4}	71.8	87.4
	10^{-3}	78.8	84.3

6.6 Karıştırma Hızının Etkisi

Glukoz 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 kıyaslanığında karıştırma hızının artmasının biyosensörün potansiyeline herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü.

6.7 Cevap Süresi

Biyosensör için cevap zamanı oldukça önemlidir, ideal bir biyosensör kısa sürede sonuç verebilmelidir. Glukoz biyosensörlerinin cevap süresini bulabilmek için optimum şartlarda hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki glukoz çözeltilerine glukoz 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 [60]. Glukoz biyosensörlerinin cevap zamanı, yaklaşık 1-4 dakika arasındadır, 1 dakikadan daha kısa sürede sonuç verdiği de gözlenmiştir. Bu sonuç, hazırlamış olduğumuz glukoz biyosensörlerinin her ikisinin de cevap zamanının oldukça kısa olduğunu göstermektedir.

6.8 Raf Ömrü ve Tekrarlanabilirlik

Glukoz biyosensörlerinin raf ömrünü belirlemek amacıyla, Biyosensör G ve Biyosensör GK +4°C'de depolanmış, haftada iki gün glukoz çözeltilerinde mV ölçümleri alınarak eğim değerleri belirlenmiştir. On günün sonunda her iki biyosensörün cevap vermediği görülmüştür. Hazırladığımız her iki biyosensörün analitik cevaplarının iyi olmasına, gerçek numunede doğruya yakın sonuç vermesine rağmen uzun süre depolanamayacağı ortaya çıkmıştır.

Glukoz biyosensörlerinin tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla aynı gün içinde aynı biyosensör ile hazırlanan 3 seri glukoz kalibrasyon çözeltilerinde mV okumaları yapıldı ve her ölçüm için kalibrasyon grafiği çizilerek eğimleri belirlendi. Bu işlem her iki

biyosensör için tekrarlandı. Sayısal olarak en büyük eğim değeri %100 olarak kabul edilerek diğer eğim değerleri de ona göre hesaplandı ve her iki biyosensörde de alınan ikinci ölçümlerde %80'e varan azalış görüldü.

Biyosensörlerin raf ömrünün ve tekrarlanabilirliğinin düşük olması, bu yöntemin fleksible bir yüzey üzerine uygulandığında tek kullanımlık glukoz tayini yapabilecek biyosensör haline getirilebilir.. Aynı anda birden fazla gümüş tel, çinko oksit nanorod kaplanabilir. Teller kaplanmış bir şekilde bulunduğunda biyosensörün hazırlanması Biyosensör GK için 1.5 saat, Biyosensör G için ise 1.05 saat sürmektedir. Biyosensörlerle çalışma yaptıktan sonra, nanorod kaplı elektrotlar zımparalanıp tekrar biyosensör hazırlanmasında kullanılabilmesi, biyosensör hazırlama yönteminin maliyetini oldukça düşürmektedir. Geliştirmiş olduğumuz biyosensörlerin raf ömrü ve tekrarlanabilirliği düşük olmasına rağmen, biyosensör hazırlamasının kolay, pratik ve maliyetinin düşük olması ona üstün avantajlar sağlamaktadır.

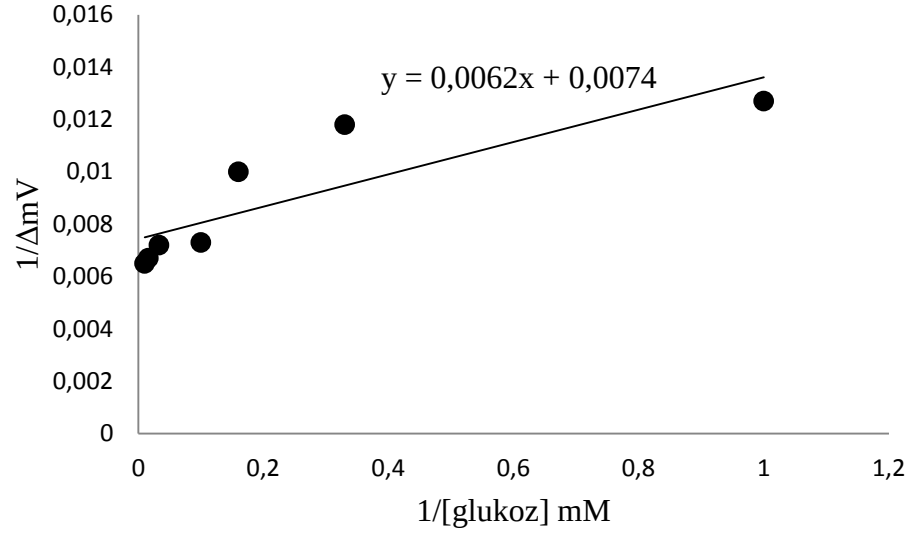
6.9 Enzim Kinetik Parametrelerinin (Km ve Vmax değerleri) Belirlenmesi

Reaksiyonların hızları, mekanizmaları ve hızı etki eden faktörlerin neler olduğunu inceleyen fizikokimya alt dalına kimyasal kinetik denir [61]. 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.

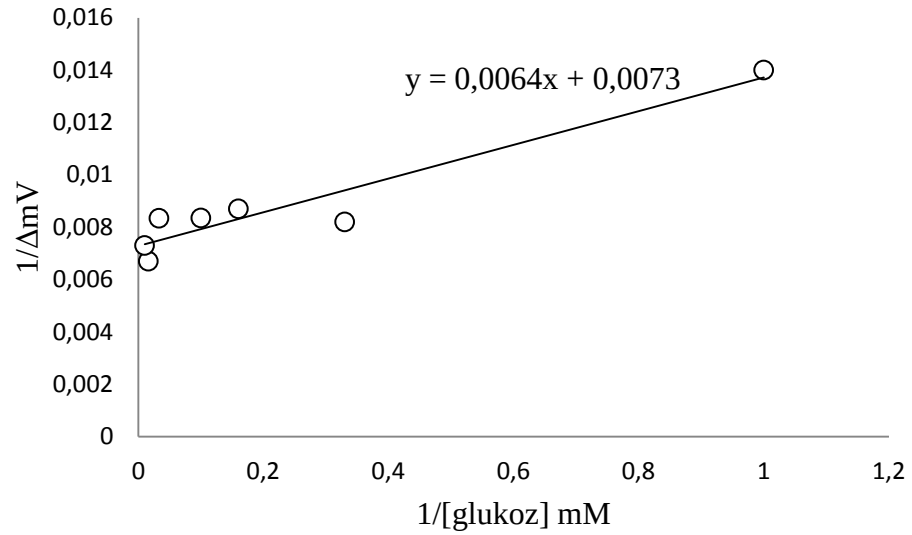
Maksimum hız, Vmax, enzimatik katalizin ulaşabileceği en yüksek hız değeridir. Enzim bölgeleri substrat ile tam doygunluğa geçince maksimum hız (Vmax) ulaşır. Michaelis-Menten sabiti, Km, en yüksek hız değerinin yarısına ulaşmak için gerekli substrat miktarıdır, enzime ve substrata özgüdür, enzimin substrata olan ilgisini yansıtır. Km'si düşük olan bir enzim, substratına yüksek ilgi (affinite) gösterir [62].

Hazırlamış olduğumuz glukoz biyosensörlerinde immobilize olmuş glukoz oksidaz enziminin Km sabitini bulmak amacıyla glukoz konsantrasyonuna karşı potansiyel değişimi verilerinden yararlanılarak Lineweaver-Burk grafiği ($1/[glukoz] - 1/\Delta mV$ grafiği) çizilmiş ve bu grafikten enzimin Km ve Vmax değeri her iki biyosensör kullanılarak belirlenmiştir. İlgili verilerden yararlanılarak Şekil 6.6 ve Şekil 6.7'de verilen $1/[glukoz] - 1/\Delta mV$ grafiği çizilerek elde edilen Lineweaver-Burk grafiğinden,

Biyosensör GK için glukoz oksidaz enziminin K_m değeri 0.84 mM, V_{max} değeri ise 135.1 mV/dakika olarak bulunmuştur. Biyosensör G'nin ise K_m değeri 0.88 mM, V_{max} değeri ise 136.9 mV/dakika olarak bulunmuştur.



Şekil 6.6 Biyosensör GK'nın glukoz oksidaz için Lineweaver-Burk grafiği



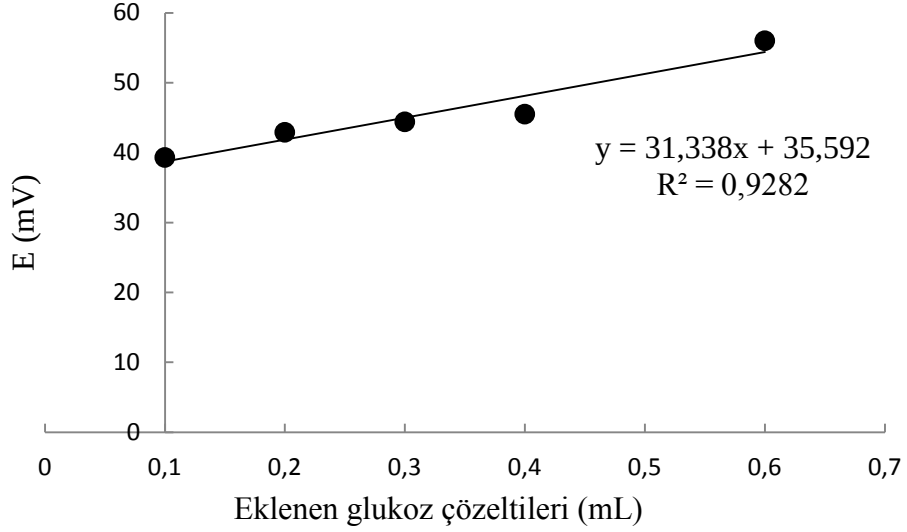
Şekil 6.7 Biyosensör G'nin glukoz oksidaz için Lineweaver-Burk grafiği

Yang ve arkadaşları (2010) ZnO nanorod kullanılarak hazırladıkları amperometrik glukoz biyosensöründe glukoz oksidaz enziminin Km değerini 1.95 mM, Wu ve arkadaşları (2007) platin elektrota kitosan, altın nanopartikül ve glukoz oksidaz enzimini çoklu tabakalar şeklinde modifiye ederek geliştirdikleri glukoz biyosensöründe glukoz oksidaz enziminin Km değerini 10.5 mM, Du ve arkadaşları (2007) ise kitosan ve altın nanopartikül kullanarak hazırladıkları glukoz biyosensöründe glukoz oksidaz enziminin Km değerini 3.5 mM olarak tespit etmişlerdir [22], [23], [32]. Bizim geliştirdiğimiz Biyosensör GK ve Biyosensör G ile yapılan ölçümlerde Km değerleri sırasıyla 0.84 mM ve 0.88 mM olarak belirlenmiştir.

6.10 Gerçek Numunelerde Glukoz Tayini

6.10.1 Serumda Glukoz Tayini

Kan serumu örneği Yıldız Teknik Üniversitesi Sağlık Merkezi'nden temin edildi. Serumda glukoz tayini, laboratuvar koşullarında hazırlamış olduğumuz potansiyometrik Biyosensör GK olarak adlandırdığımız, glukoz oksidaz enzimi, çinko oksit nanorod ve kitosan kullanılarak hazırlanan glukoz biyosensörü ile standart katma yöntemi kullanılarak yapıldı ve standart katma yönteminde elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 6.8'de verildi. Biyosensörümüz ile yaptığımız ölçümler sonucu bulduğumuz glukoz değeri, aynı zamanda Yıldız Teknik Üniversitesi Sağlık Merkezi Biyokimya Laboratuvar'ında yapılan glukoz tayini ölçümü değeriyle mukayese edildi.



Şekil 6.8 Biyosensör GK ile standart katma yönetimi kullanılarak 10^{-3} M glukoz çözeltisi ilave edilmesi ile yapılan mV ölçümleri sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği

Çizelge 6.6 Serumda glukoz tayini için glukoz biyosensörü ve Y.T.Ü. Biyokimya Laboratuvarından elde edilen sonuçlar

Serumda Glukoz miktarı (mg / dL)	
Biyokimya Laboratuvarı	Biyosensör GK
102	112.5

Çizelge 6.6'da, insan serumu örneğinde Yıldız Teknik Üniversitesi Sağlık Merkezi Biyokimya Laboratuvarı tarafından yapılan tayin sonucundaki glukoz miktarı ile hazırladığımız biyosensör ile bulduğumuz sonuç görülmektedir. Sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu açıkça görülmektedir.

Biyosensör G ile de aynı çalışma yapılmış, ancak kan serumunda bulunan maddelerin biyosensör cevabına önemli oranda girişim yaptığı görülmüştür.

BÖLÜM 7

SONUÇ

Bu çalışmada, kanda glukoz tayininde kullanabilmek için, ZnO nanorod kaplanmış gümüş tel üzerine glukoz oksidaz enziminin elektrostatik olarak tutunmasını sağlayarak (Biyosensör G), ve ayrıca kitosan kullanarak GOD enziminin daha iyi immobilize olması sağlanarak (Biyosensör GK) potansiyometrik esaslı iki glukoz biyosensörü tasarlanmış ve optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Biyosensörlerin analitik özellikleri belirlenmiş, her iki biyosensörün çalışma aralığı 10^{-1} - 10^{-3} M, optimum tampon konsantrasyonu 10mM ve optimum sıcaklığı 25°C olarak bulunmuştur. Optimum pH değeri Biyosensör G için 7.2, Biyosensör GK için 6.5 olarak belirlenmiştir. Hazırladığımız biyosensörlerin tekrarlanabilirliğinin ve raf ömrünün oldukça kısa olduğu, ancak elektrotların kullanıldıktan sonra tekrar biyosensör yapımında kullanılabileceği ve kısa sürede tekrar ölçüm alınabileceği görülmüştür. Her iki biyosensörün cevap süresinin 1 dakikadan daha az olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, Biyosensör GK ile serumda glukoz tayini yapılarak, elde edilen sonuçlar Y.T.Ü. Sağlık Merkezi'nden alınan sonuçlarla mukayese edilmiş ve sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Glukoz biyosensörleri hazırlanmasıyla ilgili literatür detaylı olarak taranmış, bunların büyük çoğunluğunun amperometrik esaslı olduğu görülmüştür. Potansiyometrik esaslı glukoz biyosensörlerinin sayısı çok azdır. Tez çalışmasında hazırlamış olduğumuz glukoz biyosensörlerinin ZnO nanorod oluşturularak ve buna ilaveten kitosan kullanılarak hazırlanması (Biyosensör G ve Biyosensör GK) literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır. Çalışmamızda hazırladığımız biyosensörlerin biyoanalitik karakterizasyonları başarı ile yapılmış, girişim etkisi yapabilecek maddelerin biyosensör

cevabına etkisi incelenmiştir. Hazırlanan Biyosensör G ve Biyosensör GK ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış ve Biyosensör GK'nın analitik özelliklerinin daha iyi olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

- [1] 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.
- [2] 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, Muğla.
- [3] Yavuz, A, G., (2005). Polivinil Ferrosen Modifiye Elektrodunu Temel Alan Glukoz Biyosensörünün Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- [4] Çolak, U., (2011). İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin Kitosan Üzerine İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- [5] İçli, N., (2008). İmmobilize Glukoz oksidaz Enziminin Özellikleri ve Enzim Aktivliğinin Artırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [6] Ustabaş, S., (2010). Glukoz Tayini için Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [7] Özdemir, Ç., (2010). Farklı Nanomalzemeler ile Glukoz Biyosensörlerinin Hazırlanması ve Uygulama Potansiyellerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

- [8] Gıda Teknolojisi Gıdalarda Şeker Tayini, hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/.../GidalardaSekerTayini.pdf, 19 Nisan 2013.
- [9] Kan Glukoz Tayin Yöntemleri, biyologlar.com/index.php?...1850%3Akan-glukoz..., 19 Nisan 2013.
- [10] Usman Ali, S. M., Nur, O., Willander, M. and Danielsson, B., (2010). “A Fast and Sensitive Potentiometric Glucose Microsensor Based on Glucose oxidase Coated ZnO Nanowires Grown on a Thin Silver Wire”, *Sensors and Actuators B*, 145: 869–874.
- [11] Luo, X., Xu, J., Du, Y. and Chen, H., (2004). “A Glucose Biosensor Based on Chitosan–glucose Oxidase–gold Nanoparticles Biocomposite Formed by One-step Electrodeposition”, *Analytical Biochemistry*, 334: 284–289.
- [12] Yang, Z., Ye, Z., Zhao, B., Zong, X. and Wang, P., (2010). “A Rapid Response Time and Highly Sensitive Amperometric Glucose Biosensor Based on ZnO Nanorod Via Citric Acid-assisted Annealing Route”, *Physica E.*, 42:1830–1833.
- [13] Du, Y., Luo, X. and Chen, H., (2007). “A Simple Method to Fabricate a Chitosan–gold Nanoparticles Film and Its Application in Glucose Biosensor”, *Bioelectrochemistry*, 70: 342–347.
- [14] Wang, L., Gao, X., Jin, L., Wu, Q., Chen, Z. and Lin, X., (2013). “Amperometric Glucose Biosensor Based on Silver Nanowires and Glucose oxidase”, *Sensors and Actuators B*, 176: 9– 14.
- [15] Kang, X., Wang, J., Wu, H., Aksay, I.A., Liu, J., and Lin, Y. (2009). “Glucose oxidase–graphene–chitosan Modified Electrode for Direct Electrochemistry and Glucose Sensing”, *Biosensors and Bioelectronics*, 25: 901–905.
- [16] Luo, L., Li, Q., Xu, Y., Ding, Y., Wang, X., Deng, D. and Xu, Y., (2010), “Amperometric Glucose Biosensor Based on NiFe₂O₄ Nanoparticles and Chitosan”, *Sensors and Actuators B*, 145: 293–298.
- [17] Liu, Y., Wang, M., Zhao, F., Xu, Z. and Dong, S., (2005). “The Direct Electron Transfer of Glucose oxidase and Glucose Biosensor Based on Carbon Nanotubes/chitosan Matrix”, *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 984–988.

- [18] 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.
- [19] Gomathi, P., Kim, M. K., Park, J. J., Ragupathy, D., Rajendran, A., Lee., S. C., Kim, J. C., Lee, S. H. and Ghim, H. D., (2011). “Multiwalled Carbon Nanotubes Grafted Chitosan Nanobiocomposite:A Prosperous Functional Nanomaterials for Glucose Biosensor Application”, *Sensors and Actuators B*, 155:897–902.
- [20] Bulut, Y., “ Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış” 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS’11), 16-18 May 2011, Elazig, Turkey.
- [21] Turna, Ö., (2006). “Aminoasit Biyosensörlerinin Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- [22] Fen Bölümü Yarışma Projesi,
<http://www.egelisesi.k12.tr/Basarilarimiz/Projeler/Proje%202008-2009/Proje33.pdf>, 5 Mart 2011.
- [23] Telefoncu, A., (1999). *Biyosensörler* (Telefoncu A., Ed.), s.1, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir.
- [24] Mehrvar, M., Bis, C., Scharer, J. M., Moo-Young, M. ve Luong, J. H., (2000). “Fiber-optic biosensors-Trends and advances”, *Analytical Science*, 16:677-692.
- [25] 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.
- [26] Biyosensörler, <http://www.scribd.com/doc/9380782/Biyosensorler-2>, 3 Mart 2011.
- [27] Biyosensör ve Medikal Uygulamaları,
http://makinecim.com/bilgi_8078_BIYOSENSOR-ve-MEDIKAL-UYGULAMALARI, 4 Mart 2011.
- [28] Telefoncu, A., (1997). *Enzimoloji* (Telefoncu, A., Ed.), 380s., Ege Üniversitesi, İzmir.
- [29] 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, 373: 9-13.

- [30] Tran-Minh, C. (1993). Biosensors, Chapman and Hall, London.
- [31] Eggins, B.R. (1996). Biosensor: an Introduction, John Wiley and Sons Ltd. and B. G. Teubner, West Sussex.
- [32] Telefoncu, A., (1999). Biyosensörler (Telefoncu A., Ed.) s.81-142 Ege Üniversitesi, İzmir.
- [33] 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.
- [34] Guilbault, G. G., and Kauffman, J. M. (1987). “Enzyme-based Electrodes as Analytical Tools”, Biotechnol. Appl. Biochem., 9:95-113.
- [35] Updike, S. J., Hicks, G. P., (1967). “The Enzyme Electrode”, Nature, 214: 986-988.
- [36] 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.
- [37] Guilbault, G. G., and Kauffman, J. M. (1987). “Enzyme-based Electrodes as Analytical Tools”, Biotechnol. Appl. Biochem., 9:95-113.
- [38] Clark, L. C., Lyons, C., (1962). “Electrode System for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery.” Ann. NY Acad. Sci., 102:29-45.
- [39] Telefoncu, A.(1997). Biyosensörler (Telefoncu, A., Ed.) s. 193-248, Ege Üniversitesi, İzmir.
- [40] Demir, A., ve Seventekin, N., (2009). “Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları” Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi, 3(2):92–103.
- [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] Arıg, E., (2010). Nanoyapıda çinko oksit partiküllerinin üretimi ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [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 2012:1–22.
- [47] Coğal, 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, Çukurova.
- [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] Wagner, R.S., Ellies, W.C., (1969). “Vapor-liquid-solid mechanism of single crystal growth”, *Applied Physics Letters*, 4:89.
- [53] Park, W.I., Kim, D.H., Jung, S.W., Yi, G.C., (2002). “Metalorganic vapor-phase epitaxial growth of vertically well-aligned ZnO nanorods”, *Appl. Phys. Lett.* 80:4232.
- [54] Kitosan,
http://www.sciencelearn.org.nz/var/sciencelearn/storage/images/media/images/nanoscience-images/chitosan/763226-2-eng-NZ/Chitosan_gallery_large.jpg,
 22.05.2013.
- [55] Wu, B., Hou, S., Yin, F., Li, J., Zhao, Z., Huang, J. and Chen, Q., (2007). “Amperometric Glucose Biosensor Based on Layer-by-layer Assembly of Multilayer Films Composed of Chitosan, Gold Nanoparticles and Glucose oxidase Modified Pt Electrode”, *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 838–844.
- [56] Çiftçi, H., Tamer, U., Teker, Ş. M. and Pekmez, Ö. N., (2013). “An Enzyme Free Potentiometric Detection of Glucose Based on a Conducting Polymer poly (3-aminophenyl boronic acid-co-3-octylthiophene)”, *Electrochimica Acta*, 90: 358–365.
- [57] Ngeontae, W., Janrungroatsakul, W., Maneewattanapinyo, P., Ekgasit, S., Aeungmaitrepirom, W. and Tuntulani, T., (2009). “Novel Potentiometric Approach in Glucose Biosensor Using Silver Nanoparticles as Redox Marker”, *Sensors and Actuators B*, 137:320–326.
- [58] Yang, L., Ren, X., Tang, F., Zhang. and Zhang, L. (2009). “A Practical Glucose Biosensor Based on Fe₃O₄ Nanoparticles and Chitosan/nafion Composite Film”, *Biosensors and Bioelectronics*, 25: 889–895.
- [59] Chen, P., Hsieh, B., Chen, L.C. R., Wang, T., Hsiao, H. and Cheng, T., (2006). “Characterization of Natural Chitosan Membranes From the Carapace of the Soldier Crab *Mictyris brevidactylus* and Its Application to Immobilize Glucose oxidase in Amperometric Flow-injection Biosensing System”, *Bioelectrochemistry*, 68: 72 – 80.
- [60] Çubuk, O., (2001). Yeni Tip Potansiyometrik Üre Biyosensörlerin Hazırlanması ve Biyolojik Numunelere Uygulanması, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

- [61] Kimyasal kinetik ve enzimler, <http://www.scribd.com/doc/8419276/Kimyasal-Kinetik-ve-Enzimler>, 4 Mayıs 2011.
- [62] Enzim Kinetiği, <http://www.ctf.istanbul.edu.tr/anabilimdallari/pdf/160/EnzimlerEnzimKinetiği>, <http://www.ctf.istanbul.edu.tr/anabilimdallari/pdf/160/Enzimler.pdf>, 3 Mayıs 2011.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Çağla ATAN
Doğum Tarihi ve Yeri :29.04.1989
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :cagla.atan@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyokimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2013
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2011
Lise	Fen-Matematik	Şişli Yunus Emre Lisesi (YDA)	2007