E. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EGE ÜNİVERSİTESİ

DOKTORA TEZİ

KARBOHİDRAT ANALİZİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ, KARAKTERİZASYON VE UYGULAMALARI

Dilek ODACI

Tez Danışmanları: Doç. Dr. Suna TİMUR

Prof. Dr. Azmi TELEFONCU

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 405.05.01
Sunuş Tarihi: 28.01.2010

Bornova-İZMİR
2010

Dilek ODACI tarafından Doktora tezi olarak sunulan "**Karbohidrat Analizine Yönelik Biyosensör Sistemlerinin Geliştirilmesi, Karakterizasyon ve Uygulamaları**" başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve ..... tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:		**İmza**
Jüri Başkanı	**: .....**	**.....**
Raportör Üye	**: .....**	**.....**
Üye	**: .....**	**.....**
Üye	**: .....**	**.....**
Üye	**: .....**	**.....**

ÖZET

KARBOHİDRAT ANALİZİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ, KARAKTERİZASYONU VE UYGULAMALARI

ODACI, Dilek

Doktora Tezi, Biyokimya Bölümü
Danışmanlar: Doç. Dr. Suna TİMUR
Prof. Dr. Azmi TELEFONCU
28/01/2010, 237 sayfa

Karbohidratların analitik tayini; gıda ve içecek endüstrisinde bileşen olmaları ve biyoproses, ilaç gibi bilim alanlarındaki hayati önemlerinden dolayı, ilgi çekici çalışmalardır. Sıvı kromatografisi ile birleştirilen kalorimetri, refraktif indeks ve UV gibi geleneksel metotlar daha düşük duyarlılık ve seçimlilik, ayrıca sınırlı dinamik bir aralığa sahiptirler. Ancak amperometrik biyosensörlerin kullanılmasıyla hızlı, duyarlı ve seçimli karbohidrat tayini gerçekleştirilebilir.

Karbon nanotüpler (CNTler) karbon materyallerinin yeni bir tipidir ve grafit tabakaların karbon silindirleri şeklinde katlanması olarak düşünülebilir. Yüksek elektriksel iletkenliklerinden dolayı elektrot materyali olarak kullanılırlar. Birçok CNT-sensör araştırmaları elektroaktif türlerle elektron transfer reaksiyonlarının artırılmasına odaklanmıştır. Elektroaktif türler ve elektrotlar arasındaki elektron transferini kolaylaştırmaları kimyasal biyosensörler ve biyosensörlerin fabrikasyonunda kullanımları için oldukça umut vericidir.

Bu tezde, glukoz, maltoz, sellobioz ve laktoz gibi karbohidratların tayini amacıyla enzimatik ve mikrobiyal biyosensörler geliştirilerek karakterize edildi. Bu kapsam içerisinde, ilk olarak karbon nanotüp modifiye karbon pasta elektrotları temel alan piranoz oksidaz biyosensörleri (CNT/CPE/PyOx) hazırlanarak glukozun substrat olarak kullanımıyla karakterize edildi. Ölçümler +900 mV'da kronoamperometrik olarak (enzimatik reaksiyon sırasında H_2O_2 oluşumu) gerçekleştirildi. CNT/CPE/PyOx yanında CNT modifiye olmayan elektrotlarda hazırlanarak (CPE/PyOx) ve CNT eklenmesinin elektrokimyasal biyosensör sisteminin etkinliğine olası etkisi incelendi. Sonuçlar her iki sistemin kıyaslanmasıyla verildi. Analitik karakterizayon dışında, optimizasyon çalışamaları ve stabilite testleri yapıldı. Son olarak hazırlanan sistemin şaraplarda glukoz analizi amacıyla kullanılabilirliği test edildi.

Diğer Yandan, yeni bienzimatik biyosensörler farklı hidrolaz sınıfı enzimler (α-glukozidaz: AG, β-glukozidaz: BG and β-galaktozidaz: β-gal) ve piranoz oksidazın (PyOx) beraber immobilizasyonuyla dizayn edildi. İmmobilizasyon kitosan(CHIT), karbon nanotüp (CNT) ve enzim karışımının glutaraldehid vasıtasıyla çapraz bağlanmasıyla gerçekleştirildi. -700 mV'da biyoaktif tabakada enzimatik reaksiyonlar sonucu tükenmekte olan oksijenin indirgenmesini izlenmesiyle ölçümler gerçekleştirildi. Biyomolekül, CHIT, glutaraldehid ve CNT miktarı gibi yapısal bileşenler ve pH, sıcaklık ve uygulama potansiyeli gibi çalışma koşulları optimize dildi. Daha sonra AG/PyOx, BG/PyOx ve β-gal/PyOx kullanılarak sırasıyla maltoz, sellobioz ve laktoz tayini için analitik karakterizasyonlar yapıldı. Tüm sonuçlar CNT ile modifiye edilmiş ve edilmemiş sisetmin kıyaslanması olarak verildi. Son olarak örnek uygulama amacıyla farklı örneklerde maltoz (birada), sellobioz (fermentasyon ortamında) ve laktozun (sütte) analizi yapıldı. Sonuç olarak doğal örneklerin kompleks yapısının sonuçlara girişim yapmadığı belirlendi. Aynı zamanda sonuçlar referans yöntemlerle kıyaslandı.

Pseudomonas fluorescens (*Pseudomonas putida* DSM 6521), *P. putida* DSM 50026 ve *Gluconobacter oxydans* DSM 2343 hücrelerinin biyolojik materyal olarak kullanıldığı mikrobiyal biyosensörler kitosan matriks vasıtasıyla oluşturuldu. Substrat varlığında metabolik aktivitenin ölçümünü temel alınarak oksijen tüketimi -700 mV'da izlendi. Hücre miktarı ve ölçüm koşullarının optimizasyonu yanında susbstrat spesifikliği, pH, sıcaklık ve çalışma potansiyeli çalışmaları yapıldı. Tüm sonuçlar CNT ile modifiye edilmiş ve edilmemiş sistemin kıyaslanması olarak verildi.

Son olarak CNT/CPE/PyOx ve CPE/PyOx biyosensörlerinin HPLC ile kombinasyonu sonucu kolon sonrası dedektör olarak kullanılabilirliği test edildi.

Anahtar sözcükler: Karbohidrat tayini, piranoz oksidaz, karbon nanotüpler, enzimatik biyosensörler, mikrobiyal biyosensörler

ABSTRACT

DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS OF BIOSENSORS FOR THE DETERMINATION OF CARBOHDRATES

ODACI, Dilek

Doctorate thesis, in Biochemistry Department
Supervisors: Assoc. Prof. Suna TİMUR
Prof. Azmi TELEFONCU
28/01/2010, 237 pages

The analytical determination of carbohydrates is of particular interest because of their importance as constituents in food and beverages, and the vital role they play in medicine, and bioprocesses. Traditional sugar detection methods such as refractive index, UV, and calorimetry in conjunction with liquid chromatography exhibit low sensitivity, lack of selectivity, and a limited dynamic range of operation. However, fast, sensitive, and selective detection of sugars can be realised by the use of amperometric biosensors.

Carbon nanotubes (CNTs) are a new type of carbon materials and can be considered as the result of folding graphene layers in to carbon cylinders. CNTs are utilized as an electrode material because of the high electrical conductivity. Most CNT-sensing research has focused on the ability of surface-confined CNT to promote electron transfer reactions with electroactive species. The facility of electron transfer between the electroactive species and the electrode offers great promise for fabricating chemical sensors or biosensors.

In this thesis, two different biosensors were developed for the determination of some carbohydrates such as glucose, maltose, cellobiose and lactose. Fistly, enzymatic biosensors were parepared. Then microbial biosensors were developed and characterized. Pyranose oxidase (PyOx) biosensor based on carbon nanotube (CNT)-modified carbon paste electrode (CNT/CPE/PyOx) was developed and characterized using glucose as a substrate. Measurument was followed by a potentiostat at +900 mV (H_2O_2 production during enzymatic reaction). As well as CNT/CPE/PyOx, unmodified carbon paste electrodes (CPE/PyOx) were also prepared to examine the effect of CNT addition to the efficiency of the biosensing system and results were given as a comparison of two systems. Apart from analytical characterization, optimization studies and stability

tests were carried out. Finally, proposed systems were applied to glucose analysis in wine samples.

New bienzymatic systems were designed by co-immobilization of hydolases (α-glucosidase: AG, β-glucosidase: BG and β-galactosidase: β-gal) and pyranose oxidase (PyOx) for disaccaride analysis. The immobilization was carried out by cross-linking enzyme mixture, chitosan (CHIT) and carbon nanotube (CNT) via glutaraldehyde. Since high potential values as the working potential cause the interference of electroactive species, oxygen reduction at -700 mV was followed during our experiments. The structure of biosensor including enzyme, CHIT, glutaraldehyde and CNT amount together with operational conditions like pH, temperature and applied potential were optimized. Then analytical characterizations were performed using AG/PyOx, BG/PyOx and β-gal/PyOx for the determination of maltose, cellobiose and lactose, respectively. All other data were also given as comparison of two systems one with CNT-modified and CNT-free. Finally, for the sample application, maltose (in beer), cellobiose (in fermentation broth) and lactose (in milk) were analyzed in real samples. As a result, it has been found that; complex matrix of natural samples had no influence on the biosensing response. Also the results were in good agreement with those obtained by reference methods.

Bacterial cells were entrapped together with chitosan matrix onto the surface of graphite electrode to form microbial biosensors. Three types of bacterial sensors were constructed by using *Pseudomonas fluorescens* (*Pseudomonas putida* DSM 6521), *P. putida* DSM 50026 and *Gluconobacter oxydans* DSM 2343 cells as the biological components. The measurements were based on the respiratory activity of the cells estimated by the oxygen consumption at -700 mV (versus the Ag|AgCl reference electrode) due to the metabolic activity in the presence of substrates. The systems were calibrated and dependence of signal amplitude on the measuring conditions and cell amount was studied as well as the substrate specificity, pH, temperature and working potential. All data were also given as comparis on of two systems one with CNT-modified and CNT-free.

Finally, use of CNT/CPE/PyOx and CPE/PyOx biosensors combined with HPLC were tested as a post-column detector.

Keywords: Carbohydrate detection, pyranose oxidase, carbon nanotubes, enzymatic biosensors, microbial biosensors

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca maddi manevi her anlamda desteğini esirgemeyen, üretme ve sorun çözme becerisini kazandıran saygı değer hocam Sayın Doç. Dr. Suna TİMUR'a, kıymetli görüşlerinden yaralandığım Sayın Prof. Dr. Azmi TELEFONCU'ya, tezminin biçimlendirilmesi ve yayınlanması aşamalarında bilgileri ile yol gösteren Sayın Prof. Dr. Nil ERTAŞ'a ve Sayın Doç. Dr. Erol AKYILMAZ'a, deneysel kısımlardaki yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU'na ve bu aşamaya gelmemde önemli katkıları olan tüm HOCALARIMA teşekkürü borç bilirim. Ayrıca lisansüstü eğitimime başlamamdaki en büyük desteğim olan ve bana her zaman inanan ANNEM başta olmak üzere, bütün eğitim hayatım boyunca bana verdikleri destek göstermiş oldukları sabır ve fedakârlıklar için AİLEM'e, nişanlım Serhat DEMİRKOL'a ve hep yanımda olan DOSTLARIMA minnettarım.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2006 FEN 002 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

		Sayfa
ÖZET ……...		**III**
ABSTRACT ……		**V**
TEŞEKKÜR ……...		**VII**
ŞEKİLLER DİZİNİ ……...		**XVI**
ÇİZELGELER VE TABLOLAR DİZİNİ ……..		**XXI**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ……		**XXXIII**
1.	GİRİŞ ……	1
1.1	Biyosensörler ……	1
1.1.1	Amperometrik enzim sensörleri ……	2
1.1.2	Mikrobiyal biyosensörler …….....	4
1.1.3	Immünosensörler ……...	10
1.1.4	DNA sensörleri …….	11
1.1.5	Doku temelli biyosensörler ……...	12
1.2	Nanomateryaller ve Biyosensörlerde Kullanım Olanakları…..	12
1.2.1	Karbon nanotüpler …….	14
1.2.2	Altın nanopartiküller …….....	29
1.2.3	Fullerenler …….	34
1.2.4	Kuantum noktalar ……..	36
1.2.5	Dendrimerler …….	42
1.3	Karbohidrat Tayini ve Önemi ……...	45
1.4	Piranoz Oksidazlar ……	48
1.5	Glikozidik Bağları Parçalayan Hidrolazlar ……	52
1.6	*Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas fluorescens* ……..	54
1.7	*Gluconobacter oxydans* …….	56
1.8	Kolon Sonrası Dedektör Olarak Biyosensörler ……	61
2.	MATERYAL VE METOD ……...	63

İÇİNDEKİLER (Devam)

		Sayfa
2.1	Materyal ……	63
2.2	Cihaz ve Sistemler ……	63
2.3	Metod ……	64
2.4	Biyolojik Materyalin Eldesi ……..	64
2.4.1	*Pseudomonas putida* hücreleri için kültivasyon koşulları ……	65
2.4.2	*Pseudomonas fluorescens* hücreleri için kültivasyon koşulları	65
2.4.3	*Gluconobacter oxydans* hücreleri için kültivasyon koşulları …	66
2.5	Biyosensörlerin Hazırlanması ……...	67
2.5.1	CHIT-CNT çözeltisinin hazırlanması ……...	67
2.5.2	PyOx temel alan enzim sensörlerinin hazırlanması ……..	68
2.5.3	Bazı hidrolaz enzimleri ve PyOx temelli çiftli enzim sensörlerinin hazırlanması …….	68
2.5.4	Mikrobiyal biyosensörlerin hazırlanması ……..	69
2.6	Biyosensörlerin Çalışma İlkesi …….	69
2.6.1	PyOx temelli biyosensörlerin çalışma ilkesi …….	69
2.6.2	Hidrolaz/PyOx çiftli enzim sistemlerini temel alan biyosensörlerin çalışma ilkesi ……	70
2.6.3	Mikrobiyal biyosensörlerin çalışma ilkesi ……	71
2.7	3,5-Dinitrosalisilik Asit (DNS) Yöntemi ile Karbohidrat Tayini ……	71
2.8	PyOx Biyosensörüne Yönelik Çalışmalar …….	72
2.8.1	Enzim miktarının biyosensör cevabına etkisi ……...	72
2.8.2	CNT miktarının biyosensör cevabına etkisi ……..	73
2.8.3	Optimum pH'nın belirlenmesi ……..	73
2.8.4	Optimum sıcaklığın belirlenmesi ……..	73
2.8.5	Çalışma potansiyelinin biyosensör cevabına etkisi ……...	74
2.8.6	PyOx temelli biyosensörlerin karakterizasyonu ……...	74
2.8.7	Farklı karbohidratlar için doğrusal tayin aralıklarının belirlenmesi ……...	75

IÇINDEKILER (Devam)

		Sayfa
2.8.8	Örneklerde glukoz analizi …….	75
2.9	AG/PyOx Temelli Biyosensör Sistemine Yönelik Çalışmalar .	75
2.9.1	Enzim miktarlarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ……...	75
2.9.2	CHIT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ...	76
2.9.3	Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ……...	76
2.9.4	CNT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi …	77
2.9.5	Optimum pH'ın belirlenmesi ……	77
2.9.6	Optimum sıcaklığın belirlenmesi ……..	78
2.9.7	Çalışma potansiyelinin belirlenmesi …….	78
2.9.8	AG/PyOx temelli biyosensörlerin karakterizasyonu …….	78
2.9.9	Farklı karbohidratlar için doğrusal tayin aralıklarının belirlenmesi ……...	79
2.9.10	Örneklerde maltoz analizi ……..	79
2.10	BG/PyOx Temelli Biyosensör Sistemine Yönelik Çalışmalar .	79
2.10.1	Enzim miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ..	79
2.10.2	CHIT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ...	80
2.10.3	Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ……...	80
2.10.4	CNT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi …	81
2.10.5	Optimum pH'nın belirlenmesi ……..	81
2.10.6	Optimum sıcaklığın belirlenmesi ……..	81
2.10.7	Çalışma potansiyelinin belirlenmesi …….	81
2.10.8	BG/PyOX temelli biyosensörlerin karakterizasyonu ……	82
2.10.9	Farklı karbohidratlar için doğrusal tayin aralıklarının belirlenmesi ……...	82
2.10.10	Örneklerde sellobioz analizi ……..	83
2.11	β-Gal/PyOx Temelli Biyosensör Sistemine Yönelik Çalışmalar ……	83

İÇİNDEKİLER (Devam)

		Sayfa
2.11.1	Enzim miktarlarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ……...	83
2.11.2	CHIT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ...	84
2.11.3	Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ……...	84
2.11.4	CNT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi …	85
2.11.5	Optimum pH'nın belirlenmesi ……..	85
2.11.6	Optimum sıcaklığın belirlenmesi ……..	85
2.11.7	Çalışma potansiyelinin belirlenmesi …….	85
2.11.8	β-Gal/PyOx temelli biyosensörlerin karakterizasyonu ……..	86
2.11.9	Farklı karbohidratlar için doğrusal tayin aralıklarının belirlenmesi ……...	86
2.11.10	Örneklerde laktoz analizi ……..	86
2.12	*P. putida* Temelli Biyosensör Sistemine Yönelik Çalışmalar ...	87
2.12.1	Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ..	87
2.12.2	CHIT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ...	88
2.12.3	Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ……...	88
2.12.4	CNT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi …	88
2.12.5	Optimum pH'nın belirlenmesi ……..	89
2.12.6	Optimum sıcaklığın belirlenmesi ……..	89
2.12.7	Çalışma potansiyelinin belirlenmesi …….	89
2.12.8	*P. putida* temelli biyosensörlerinin analitik karakterizasyonu ..	89
2.12.9	Farklı karbohidratlar için doğrusal tayin aralıklarının belirlenmesi ……...	90
2.13	*P. fluorescens* temelli biyosensör sistemine yönelik çalışmalar	90
2.13.1	Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ..	91
2.13.2	CHIT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ...	91
2.13.3	Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ……...	92

IÇINDEKILER (Devam)

		Sayfa
2.13.4	CNT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi …	92
2.13.5	Optimum pH'ın belirlenmesi …….	92
2.13.6	Optimum sıcaklığın belirlenmesi ……..	93
2.13.7	Çalışma potansiyelinin belirlenmesi …….	93
2.13.8	*P. fluorescens* temelli biyosensörlerin karakterizasyonu …….	93
2.13.9	Farklı karbohidratlar için doğrusal tayin aralıklarının belirlenmesi ……...	94
2.14	*G. oxydans* Temelli Biyosensör Sistemine Yönelik Çalışmalar	94
2.14.1	Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ..	94
2.14.2	CHIT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ...	95
2.14.3	Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi ……...	95
2.14.4	CNT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi …	95
2.14.5	Optimum pH'nın belirlenmesi ……..	96
2.14.6	Optimum sıcaklığın belirlenmesi ……..	96
2.14.7	Çalışma potansiyelinin belirlenmesi …….	96
2.14.8	*G. oxydans* temelli biyosensörlerin karakterizasyonu ……..	96
2.14.9	Farklı bileşikler için doğrusal tayin aralıklarının belirlenmesi .	97
2.15	CHIT-CNT ile Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu için Yapılan Çalışmalar	97
2.16	HPLC Sonrası Dedektör Olarak Kullanım ……	98
2.16.1	HPLC ile ayırım ve ölçüm koşulları ……..	98
2.16.2	Örnek uygulama …….	98
3.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA …….	100
3.1	PyOx Temel Alan Enzim Sensörlerine İlişkin Bulgular ……....	100
3.1.1	Optimizasyon çalışmaları ……..	100
3.1.2	Analitik karakterizasyon ……...	105

İÇİNDEKİLER (Devam)

		Sayfa
3.1.3	Substrat spesifikliği ……...	108
3.1.4	Örnek uygulama ……	109
3.2	AG/PyOx Enzim Sensörüne İlişkin Bulgular ……...	111
3.2.1	Optimizasyon çalışmaları ……..	111
3.2.2	Analitik karakterizasyon ……...	118
3.2.3	Substrat spesifikliği ……...	119
3.2.4	Örnek uygulama ……	120
3.3	BG/PyOx Enzim Sensörüne İlişkin Bulgular ……	122
3.3.1	Optimizasyon çalışmaları ……..	122
3.3.2	Analitik karakterizasyon ……...	128
3.3.3	Substrat spesifikliği ……...	129
3.3.4	Örnek Uygulama ……...	130
3.4	β-Gal/PyOx Enzim Sensörüne İlişkin Bulgular ……	132
3.4.1	Optimizasyon çalışmaları ……..	132
3.4.2	Analitik karakterizasyon ……...	137
3.4.3	Substrat spesifikliği ……...	139
3.4.4	Örnek uygulama ……	140
3.5	*P.putida* Hücrelerini Temel Alan Mikrobiyal Biyosensörlere Yönelik Çalışmalar ……...	142
3.5.1	Hücre sayımı ve büyüme eğrisine ilişkin veriler ……..	142
3.5.2	*P. putida* hücrelerini temel alan biyosensörlerin optimizasyonuna ilişkin veriler …….	143
3.5.3	Analitik karakterizasyon ……...	149
3.5.4	Substrat spesifikliği ……..	150
3.6	*P. fluorescens* Hücrelerini Temel Alan Mikrobiyal Biyosensörlere Yönelik Çalışmalar ……..	152
3.6.1	Hücre sayımı ve büyüme eğrisine ilişkin veriler …….....	152
3.6.2	*P. fluorescens* hücrelerini temel alan biyosensörlerin optimizasyonuna ilişkin veriler …….....	154

IÇINDEKILER (Devam)

		Sayfa
3.6.3	Analitik karakterizasyon ……...	159
3.6.4	Substrat spesifikliği ……...	161
3.7	*G. oxydans* Hücrelerini Temel Alan Mikrobiyal Biyosensörlere Yönelik Çalışmalar ……..	162
3.7.1	Hücre sayımı ve büyüme eğrisine ilişkin veriler ……..	163
3.7.2	*G. oxydans* hücrelerini temel alan biyosensörlerin optimizasyonuna ilişkin veriler …….	165
3.7.3	Analitik karakterizasyon ……...	169
3.7.4	Substrat spesifikliği ……...	171
3.8	CHIT-CNT ile Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu ile İlgili Çalışmalar …….....	172
3.9	HPLC Sonrası Dedektör Olarak Kullanıma İlişkin Sonuçlar ...	174
3.9.1	Örnek uygulama ……	176
4.	GENEL DEĞERLENDİRME ……...	178
KAYNAKLAR DİZİNİ ……...		182
ÖZGEÇMİŞ …….		220

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 1.1.	Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi ……...	2
Şekil 1.2.	Biyoyakıt hücrelerinin şematik gösterimi ……	4
Şekil 1.3.	Mikrobiyal biyosensörlerde ölçüm prensipleri ……	9
Şekil 1.4.	Biyolojik sistemlerle aynı boyutlardaki nanomateryaller	13
Şekil 1.5.	Tek duvarlı (SWCNT) ve çok duvarlı (MWCNT) karbon nanotüplerin gösterimi …….	15
Şekil 1.6.	Arc metodunun prosesinin şematik gösterimi ……..	16
Şekil 1.7.	Lazerle buharlaştırma metodunun şematik gösterimi …..	17
Şekil 1.8.	CVD prosesinin şematik gösterimi ……..	18
Şekil 1.9.	CNT çözünürleştirmeye ilişkin alternatifler …….	19
Şekil 1.10.	CNTlerin biyosensörlerde uygulanma formları ……...	22
Şekil 1.11.	Moleküler kablolar olarak görev yapan CNTlerin dikey olarak yönlendirilmesi ile "nanoorman" yapılar ……..	23
Şekil 1.12.	Glukoz oksidaz biyosensörünün CNT ile modifikasyonu	28
Şekil 1.13.	AuNP temelli DNA sensörlerinin sınıflandırılması …….	33
Şekil 1.14.	Karbonun allotroplarının yapıları …….	34
Şekil 1.15.	Polimerik C60 türevlerinin farklı tipleri ……...	35
Şekil 1.16.	Kuantum noktaların büyüklüğü ve diğer bazı yapılarla kıyaslanmaları ……..	36
Şekil 1.17.	QD yapısı …….	37
Şekil 1.18.	CdO'nun başlatıcı olarak kullanımını temel alan luminesans QD sentezi ve yüzey modifikasyonunun şematik gösterimi …….	39
Şekil 1.19.	Streptavidin ile modifiye polimerle kaplanmış QD ……..	40
Şekil 1.20.	DNAnın çoklu dedeksiyonu için şematik gösterim ……..	41
Şekil 1.21.	Ticari olarak bulunabilen dendrimerler ……	43
Şekil 1.22.	Çeşitli şekillerde dizayn edilen dendrimerler ……...	44
Şekil 1.23.	Dendrimer sentezi …….	45

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

		Sayfa
Şekil 1.24.	Piranoz oksidazların reaksiyon mekanizması ……..	48
Şekil 1.25.	Proteobacterial grupların filogenetik ilişkileri ……..	54
Şekil 1.26.	*Pseudomonas* hücrelerinin görünümü ……..	55
Şekil 1.27.	*G. oxydans* hücrelerinin görünümü ……..	57
Şekil 1.28.	*Gluconobacter* türlerinde şeker ve alkol okside eden enzim sistemleri ……...	58
Şekil 1.29.	*G. oxydans* ile glukozun oksidasyonu için metabolik yollar ……	60
Şekil 2.1.	Farklı konsantrasyonlarda CNT içeren CHIT-CNT çözeltileri ……..	67
Şekil 2.2.	CHIT (a) ve CHIT-CNT (b) kullanılarak hazırlanan çiftli enzim sistemini temel alan biyosensörler ……	68
Şekil 2.3.	Substrat ilavesinin ardından gerçekleşen enzimatik reaksiyonla akım değişimi ……	70
Şekil 2.4.	PyOx biyosensörlerinin HPLC ile kombinasyonunda kullanılan akış hücresinin şematik gösterimi ……...	99
Şekil 3.1.	Enzim miktarının biyosensör cevabına etkisi ……..	101
Şekil 3.2.	CNT miktarının biyosensör cevabına etkisi …….	102
Şekil 3.3.	Biyosensör cevabına pH'ın etkisi ……	103
Şekil 3.4.	Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisi ……..	104
Şekil 3.5.	CPE/PyOx ve CNT/CPE/PyOx biyosensörlerine ilişkin hidrodinamik voltammogram ……...	105
Şekil 3.6.	CPE/PyOx ve CNT/CPE/PyOx biyosensörlerine ilişkin döngüsel voltammetrik ölçümler …….	105
Şekil 3.7.	Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği ……	106
Şekil 3.8.	Çalışma tamponu değiştirilmeden glukoz standart çözeltilerinin eklenmesiyle elde edilen zamana bağımlı akım değerleri ……..	106
Şekil 3.9.	CPE/PyOx biyosensörleri ile glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği ……...	107
Şekil 3.10.	DNS yöntemi ile oluşturulan glukoz standart grafiği …..	110
Şekil 3.11.	AG miktarının AG/PyOx biyosensör cevabına etkisi …..	112

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

		Sayfa
Şekil 3.12.	PyOx miktarının AG/PyOx biyosensör cevabına etkisi ...	112
Şekil 3.13.	CHIT miktarının AG/PyOx biyosensör cevabına etkisi ..	113
Şekil 3.14.	Glutaraldehid miktarının AG/PyOx biyosensör cevabına etkisi …….	114
Şekil 3.15.	CNT miktarının AG/PyOx biyosensör cevabına etkisi …	115
Şekil 3.16.	Biyosensör cevabına pH'ın etkisi ……	116
Şekil 3.17.	Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisi ……..	117
Şekil 3.18.	Biyosensör cevabına potansiyelin etkisi ……..	117
Şekil 3.19.	Maltoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı ……	118
Şekil 3.20.	DNS yöntemi ile elde edilen maltoz standart grafiği …..	121
Şekil 3.21.	BG miktarının BG/PyOx biyosensör cevabına etkisi …..	123
Şekil 3.22.	PyOx miktarının BG/PyOx biyosensör cevabına etkisi ...	123
Şekil 3.23.	CHIT yüzdesinin BG/PyOx biyosensör cevabına etkisi ..	124
Şekil 3.24.	Glutaraldehid yüzdesinin BG/PyOx biyosensör cevabına etkisi …….	125
Şekil 3.25.	CNT miktarının BG/PyOx biyosensör cevabına etkisi …	125
Şekil 3.26.	Biyosensör cevabına pH'ın etkisi ……	126
Şekil 3.27.	Sıcaklığın BG/PyOx biyosensör cevabına etkisi …….	127
Şekil 3.28.	Çalışma potansiyelinin BG/PyOx biyosensör cevabına etkisi …….	127
Şekil 3.29.	Sellobioz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı …….	128
Şekil 3.30.	HPLC ile oluşturulan sellobioz için kalibrasyon grafiği ..	131
Şekil 3.31.	*G. oxydans* ile sellobiozun zaman bağlı azalmasının BG/PyOx ve CNT/BG/PyOx biyosensörleri ile izlenmesi ……..	131
Şekil 3.32.	β-Gal miktarının β-gal/PyOx biyosensör cevabına etkisi	133
Şekil 3.33.	PyOx miktarının β-gal/PyOx biyosensör cevabına etkisi	133
Şekil 3.34.	CHIT miktarının β-gal/PyOx biyosensör cevabına etkisi	134
Şekil 3.35.	Glutaraldehid miktarının β-gal/PyOx biyosensör cevabına etkisi ……	135

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

		Sayfa
Şekil 3.36.	CNT miktarının β-gal /PyOx biyosensör cevabına etkisi	135
Şekil 3.37.	Biyosensör cevabına pH'ın etkisi ……	136
Şekil 3.38.	Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisi ……..	136
Şekil 3.39.	Biyosensör cevabına potansiyelin etkisi ……..	137
Şekil 3.40.	Laktoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı …….	138
Şekil 3.41.	DNS yöntemi ile elde edilen laktoz standart grafiği ……	141
Şekil 3.42.	*P. putida* hücrelerinin büyümesine ilişkin veriler ……	143
Şekil 3.43.	CHIT (A) ve CHIT-CNT (B) ile modifiye grafit elektrotlar yüzeyine immobilize edilen *P. putida* hücrelerinin SEM görüntüleri ……..	143
Şekil 3.44.	Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisi ……...	144
Şekil 3.45.	CHIT yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi ……...	145
Şekil 3.46.	Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi …..	146
Şekil 3.47.	CNT miktarının biyosensör cevabına etkisi …….	146
Şekil 3.48.	Biyosensör cevabına pH'ın etkisi ……	147
Şekil 3.49.	Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisi ……..	148
Şekil 3.50.	Biyosensör cevabına potansiyelin etkisi ……..	148
Şekil 3.51	Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı ……	149
Şekil 3.52.	*P. fluorescens* hücrelerinin büyümesine ilişkin veriler ...	153
Şekil 3.53.	CHIT (A) ve CHIT-CNT (B) ile modifiye grafit elektrotlar yüzeyine immobilize edilen *P. fluorescens* hücrelerinin SEM görüntüleri ……..	153
Şekil 3.54.	Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisi ……...	154
Şekil 3.55.	CHIT yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi ……...	155
Şekil 3.56.	Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi …..	156
Şekil 3.57.	CNT miktarının biyosensör cevabına etkisi …….	157
Şekil 3.58.	Biyosensör cevabına pH'ın etkisi ……	157
Şekil 3.59.	Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisi ……..	158
Şekil 3.60.	Biyosensör cevabına potansiyelin etkisi …….....	159

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

		Sayfa
Şekil 3.61.	Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı ……	159
Şekil 3.62.	*G. oxydans* hücrelerinin büyümesine ilişkin veriler …….	164
Şekil 3.63.	CHIT (A) ve CHIT-CNT (B) ile modifiye grafit elektrotlar yüzeyine immobilize edilen *G.oxydans* hücrelerinin SEM görüntüleri ……..	164
Şekil 3.64.	Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisi ……...	165
Şekil 3.65.	CHIT yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi ……...	166
Şekil 3.66.	Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi …..	166
Şekil 3.67.	CNT miktarının biyosensör cevabına etkisi …….	167
Şekil 3.68.	Biyosensör cevabına pH'ın etkisi ……	168
Şekil 3.69.	Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisi ……..	168
Şekil 3.70.	Biyosensör cevabına potansiyelin etkisi ……..	169
Şekil 3.71.	Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı ……	169
Şekil 3.72.	Farklı tarama hızlarında CHIT (A) ve CHIT-CNT (B) ile modifiye edilen elektrotların döngüsel voltammogramları ……	173
Şekil 3.73.	CHIT (A) ve CHIT-CNT (B) için tarama hızı ile anodik ve katodik pik akımları arasındaki ilişki ……..	173
Şekil 3.74.	CHIT (A) ve CHIT-CNT (B) ile modifiye edilen elektrotların döngüsel voltammogramları ……	174
Şekil 3.75.	Karbohidratların RID ile analizine yönelik kromatogram ……	175
Şekil 3.76.	PyOx biyosensörlerinin kolon sonrası dedektör olarak kullanımına ilişkin kromatogram …….	176

ÇIZELGELER VE TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Amperometrik biyosensörlerde kullanılan çeşitli enzimler …… 3

Tablo 1.2. Karbon nanotüplerin çözünürleştirilmesi için bazı yaklaşımlar ……... 20

Tablo 2.1. *P. putida* hücreleri için büyüme ortamı kompozisyonları. 65

Tablo 2.2. *P. fluorescens* hücreleri için büyüme ortamı kompozisyonları ……... 66

Tablo 2.3. *G. oxydans* hücreleri için ön kültür ve büyüme ortamı kompozisyonları ……... 67

Tablo 2.4. DNS yöntemi ile şeker tayini ……... 72

Tablo 3.1. PyOx ile hazırlanan enzim biyosensörlerinin kıyaslanması ……. 107

Tablo 3.2. PyOx temelli biyosensörler ile karbohidrat analizi …….. 108

Tablo 3.3. Farklı karbohidratların varlığının glukoz cevabına etkisi. 109

Tablo 3.4. PyOx biyosensörleri ve DNS yöntemi kullanılarak iki farklı şarapta glukoz analizi ……. 110

Tablo 3.5. Standart katma yöntemi ile şaraplarda glukoz analizi ….. 110

Tablo 3.6. AG/PyOx biyosensörleri ile karbohidrat analizi …….. 119

Table 3.7. Diğer karbohidratların varlığında maltoz için alınan biyosensör cevabı ……. 120

Table 3.8. Bira örneklerinde maltoz tayini …… 121

Tablo 3.9. Standart katma yöntemi ile maltoz tayini …… 122

Tablo 3.10. BG/PyOx ve CNT/BG/PyOx ile diğer karbohidratların tayini ……. 129

Tablo 3.11. Farklı karbohidratların varlığının sellobioz cevabına etkisi. 130

Tablo 3.12. Literatürdeki farklı laktoz biyosensörlerinin kıyaslanması ……. 139

Tablo 3.13. β-Gal/PyOx ve CNT/β-Gal/PyOx ile diğer karbohidratların tayini …….. 139

Tablo 3.14. Farklı karbohidratların varlığının laktoz cevabına etkisi. 140

Tablo 3.15. DNS ile kıyaslamalı olarak sütte laktoz tayinine yönelik sonuçlar …… 141

ÇİZELGELER VE TABLOLAR DİZİNİ (Devam)

		Sayfa
Tablo 3.16.	Standart katma yöntemi ile sütte laktoz tayini …….	141
Tablo 3.17.	Glukoz tayinine yönelik amperometrik *P. putida* biyosensörlerinin kıyaslanması ……	150
Tablo 3.18.	CHIT/*P. putida* ve CHIT-CNT/*P. putida* ile diğer karbohidratların tayini ……..	151
Tablo 3.19.	Farklı karbohidratların varlığının glukoz için biyosensör cevabına etkisi ……..	151
Tablo 3.20.	Glukoz tayinine yönelik amperometrik *P. fluorescens* biyosensörlerinin kıyaslanması ……	160
Tablo 3.21.	CHIT/*P. fluorescens* ve CHIT-CNT/*P. fluorescens* ile diğer karbohidratların tayini……..	161
Tablo 3.22.	Glukoz için elde edilen biyosensör cevabına farklı karbohidratların varlığının etkisi ……..	162
Tablo 3.23.	*G. oxydans* biyosensörlerinin kıyaslanması …….	170
Tablo 3.24.	CHIT/*G. oxydans* ve CHIT-CNT/*G. oxydans* ile diğer bileşiklerin tayini ……..	171
Tablo 3.25.	Diğer bileşiklerin varlığında glukoz tayini ……..	172
Tablo 3.26.	HPLC-RID kullanılarak analizlenen karbohidratlar ……	175
Tablo 3.27.	PyOx biyosensörlerinin dedektör olarak kullanımıyla analizlenen karbohidratlar ……	176
Tablo 3.28.	PyOx ve RI dedektör ile örneklerde glukoz analizi …….	177
Tablo 3.29.	Enzim elektrotlarının sonuçların genel gösterimi ……	180
Tablo 3.30.	Mikrobiyal biyosensörlerin sonuçların genel gösterimi ...	181

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AChE	Asetilkolin esteraz
AFM	Atomik güç mikroskobu
AFP	Alfa feto protein
AG	α-Glukozidazlar
AG/PyOx	α-glukozidaz/piranoz oksidaz biyosensörleri
ALP	Alkalen fosfataz
AOT	Sodyum diostil sülfosüksinat
APTES	3-aminopropiletoksisilan
AuNP	Altın nanopartiküller
BG	β-Glukozidazlar
BG/PyOx	β-glukozidaz/piranoz oksidaz biyosensörleri
BOD	Biyolojik oksijen ihtiyacı
CE	Kapiler elektroforez
CEA	Karsinoembriyojenik antijen
Cel	Sellobioz
CHIT	Kitosan
CHIT-CNT	Kitosan-karbon nanotüp çözeltisi
CHIT-CNT/*G. oxydans*	Karbon nanotüp ile modifiye *Gluconobacter oxydans* biyosensörleri
CHIT-CNT/*P. fluorescens*	Karbon nanotüp ile modifiye *Pseudomonas fluorescens* biyosensörleri
CHIT-CNT/*P. putida*	Karbon nanotüp ile modifiye *Pseudomonas putida* biyosensörleri
CHIT/*G. oxydans*	*Gluconobacter oxydans* biyosensörleri
CHIT/*P. fluorescens*	*Pseudomonas fluorescens* biyosensörleri
CHIT/*P. putida*	*Pseudomonas putida* biyosensörleri
CNT	Karbon nanotüpler
CNT/AG/PyOx	Karbon nanotüp ile modifiye α-glukozidaz/piranoz oksidaz biyosensörleri

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

CNT/BG/PyOx	Karbon nanotüp ile modifiye β-glukozidaz/piranoz oksidaz biyosensörleri
CNT/CPE/PyOx	Piranoz oksidaz ve karbon nanotüp ile modifiye karbon pasta elektrotlar ile hazırlanan biyosensörler
CNTEC	Karbon nanotüpler epoksi kompozit
CNT/β-Gal/PyOx	Karbon nanotüp ile modifiye β-galaktozidaz/piranoz oksidaz biyosensörleri
CNTPE	Karbon nanotüp pasta elektrot
CPE	Karbon pasta elektrot
CPE/PyOx	Piranoz oksidaz ve karbon pasta elektrotlar ile hazırlanan biyosensörler
CTAB	N,N,N-trimetilamonyum bromür
CTE	Clark-tip elektrot
CV	Döngüsel voltammogram
CVD	Kimyasal buhar biriktirilmesi
2,4-D	2,4-Klorofenoksiasetik asit
2-DCPIP	Dikolorofenolindofenol
DDAB	Didodesildimetilamonyum bromür
DGE	Diglisidil eter
DHA	Dihidroksiaseton
DM	Diyaliz membranı
DNS	3,5-Dinitrosalisilik asit
ECL	Elektrokimyasal lüminesans
EtOH	Etanol
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FMN	Flavin mononükleotid
Fru	Fruktoz
Gal	Galaktoz
β-Gal	β-Galaktozidaz
β-Gal/PyOx	β-galaktozidaz/piranoz oksidaz biyosensörleri

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

GC	Camımsı karbon
GDH	Glukoz dehidrogenaz
GDE	Altın disk elektrot
GE	Grafit elektrot
GEC	Grafit epoksi kompozit
Glc	Glukoz
GlcNAc	N-Asetilglukozamin
GOH	Gliserol
GOx	Glukoz oksidaz
hCG	İnsan koriyonik gonadotropin hormonu
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
HRP	Peroksidaz
IgG	İmmünoglobulin G
Lac	Laktoz
LOD	Dedeksiyon limiti
Mal	Maltoz
Man	Mannoz
MSM	Mineral tuz ortamı
MWCNT	Çok duvarlı karbon nanotüpler
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
OP	Osmiyum polimeri
PAD	Puls amperometrik dedektör
PAMAM	Poli(amidoamin) dendrimeri
PC	Fosfatidilkolin
PDO	1,3-propandiol
PEG	Poli(etilen glikol)
PEG-PE	Poli(etilenglikol) fosfatidiletanolamin
PLA	Polilaktik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

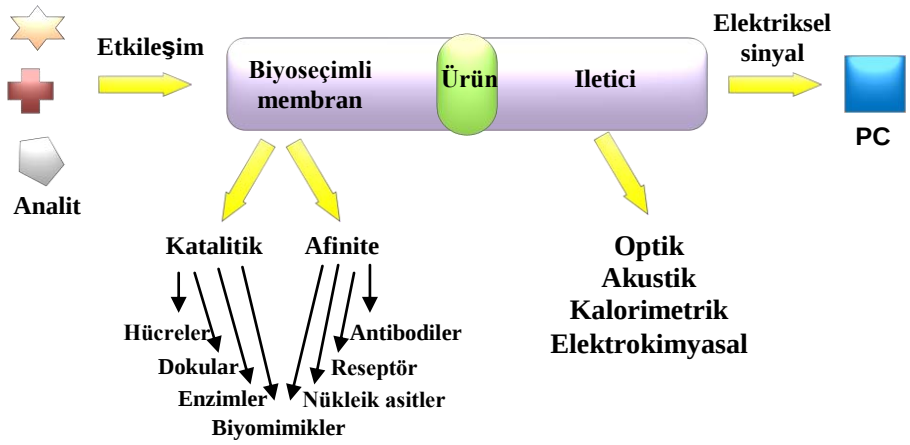
PMSF	Fenilmetilsülfonil florür
PQQ	Pirolokuinolinkinon
PPI	Poli(propilenimin) dendrimeri
PVA	Polivinilalkol
RID	Refraktif indeks dedektör
PyOx	Piranoz oksidazlar
QD	Kuantum noktalar
SAM	Kendiliğinden oluşan tek tabakalar
SNS-NH_2	4-(2,5-(di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)benzenamin
SNS(NO_2)	1-(4-nitrofenil)-2,5-di(2-tienil)-1 H-pirol
SS	Standart sapma
Suc	Sükroz
SWCNT	Tek duvarlı karbon nanotüpler
TAO	Tetraoktamonyum
TCA	Trikarboksilik asit
TOP	Triostilfosfin
TOPO	Triositilfosfin oksit
% VK	Varyasyon katsayısı
Xyl	Ksiloz

1. GİRİŞ

1.1 Biyosensörler

Biyosensörler, biyolojik sistemler ve bu sistemlerden gelen bilgiyi analitik olarak kullanışlı bir sinyale dönüştüren iletici sistemlerden meydana gelir (Şekil 1.1). Spesifik bir analit ya da analitler grubunun konsantrasyonuna bağlı olarak sinyal oluşturur. Biyosensörlerin biyolojik bileşeni; katalitik özellik taşıyan ve katalitik özellik taşımayan biyomateryaller olarak iki önemli gruba ayrılır. Katalitik özellikteki grup enzim, mikroorganizma ve dokuları içerirken, katalitik özellik göstermeyen grup ise antikorlar, reseptörler ve nükleik asitlerden oluşur (Sharma et al., 2003). Biyosensörlerin, analit tayini için gerekli olan iletici kısmı ise elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik ve kondüktometrik), optik, termometrik, piezolelektrik ya da manyetik özellikteki gruplardan oluşabilir (Sharma et al., 2003; Velasco-Garcia and Mottram, 2003) (Şekil 1.1). Bir biyosensörün fonksiyonu biyolojik aktif materyalin biyokimyasal spesifikliğine bağlıdır. Biyolojik materyalin seçimi spesifiklik, depolama, operasyonel stabilite gibi birçok faktöre bağlıdır. Aynı zamanda kimyasal bileşik, antijenler, mikroplar, hormonlar, nükleik asitler ya da tat ile koku parametrelerinin hangisinin tayin edileceği biyolojik materyalin seçimini etkiler (D'Souza, 2001). Biyolojik sistem ve iletici sistemin iyi bir şekilde etkileşmesi yani başarılı bir immobilizasyon tekniğinin kullanılması etkili bir biyosensörün hazırlanmasında önemlidir (Tkac et al., 2005).

Günümüzde birçok tipte biyosensör sistemi geliştirilmiştir ve bunlar klinik, medikal, çevresel görüntüleme, endüstriyel proseslerin kontrolü ve diğer pek çok alanda çeşitli analizler için kullanılmıştır. Mikrosensör teknolojileri ve biyoteknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak, biyosensörler konusundaki araştırma ve geliştirme çalışmaları hızlı bir yükseliş göstermektedir. Sensörlerde biyolojik materyalin kullanılmasının en önemli avantajlarından biri belirli bileşiklere olan seçimliliğin artmasıdır. Diğer bir avantaj ise; biyolojik ilgisinin olduğu molekülü direk olarak tanımasıdır (Karube and Nakanishi, 1994). Birçok geleneksel yöntemde biyomolekülün dedeksiyonu için ön işlemler gereklidir, ancak çoğu zaman biyosensörlerde ön işlemlere gerek duyulmaz. Geleneksel metotların duyarlılığı yüksektir ancak bunların minyatürizasyonu zordur. Elektronik ya da elektrokimyasal dedeksiyon bu yönleri ile diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır (Balasubramanian and Burghard, 2006).



Şekil 1.1. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi.

Biyosensörler real-time analiz için uygundur ve özellikle endüstride örneğin; proses görüntüleme ve kontrolde hızlı ölçüm yapılabilmesi açısından önemlidir. Bunların yanı sıra biyosensörler farmasötik endüstrisi, medikal diyagnostik, yiyecek ve ilaç testleri ve çevresel analizlerde gibi birçok alanda uygulama olanağı bulmaktadır (Karube and Nakanishi et al., 1994).

1.1.1 Amperometrik enzim sensörleri

Enzim ile modifiye edilmiş elektrotlar amperometrik biyosensörlerin ve biyoyakıt hücrelerinin temel parçalarındandır. Enzim elektrotları elektrokimyasal prosesi immobilize enzimin aktivitesi ile kombine eden minyatür kimyasal iletici sitemlerdir (Dzyadevych et al., 2008). Bu sistemler enzimin biyolojik fonksiyonu sayesinde biyolojik orijinli olan substrat moleküllerine karşı genellikle yüksek seçimlilik gösterir. Bu nedenle, enzimlerin sahip olduğu bu özellik enzim sensörleri oluşturulmasında avantaj sağlar. Tipik olarak, enzim reaksiyonunun kinetiği ürün oluşumunun ya da reaktantın eksilmesinin hızı olarak izlenir. Eğer ürün ya da reaktant elektroaktif ise reaksiyon direkt olarak amperometri ile izlenebilir. Böylece bu tip elektrokimyasal reaksiyonlar amperometrik biyosensörlerin oluşturulmasında kullanılabilir. Elektrokimyasal biyosensörlerin büyük bir kısmı katalitik reaksiyon sırasında elektronlar kullanan ya da üreten oksidoredüktaz sınıfı enzimleri içerir. Bu elektrokimyasal reaksiyonlar elektrot yüzeyinde gerçekleşir ve akım oluşturmak için kullanılır. Enzimatik oksidasyon sonucu açığa çıkan elektronlar anoda transfer edilir. Burada, oksijen gibi yüksek bir elektron alıcısına taşınır.

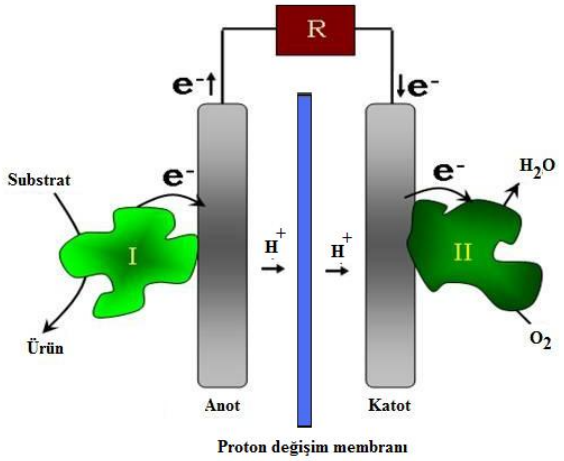
Enzim elektrotlarının değişmez parçaları enzimler ve elektrot materyalidir. Elektrot materyalinin seçiminde önemli olan parametreler elektriksel iletkenlik ve materyalin sertliğidir. Bu nedenle, altın (folyo ya da çubuk), platin (folyo ya da çubuk) ya da karbon (kâğıt, çubuk, pasta, metallenmiş karbon, camımsı karbon, karbon fiber, nanotüp film) gibi katı destek elektrotlar kullanılır. Enzim elektrotlarını oluşturmak amacıyla kullanılan enzimler analizlemek isteğimiz analitin reaksiyon tipine bağlı olarak seçilir. Redoks enzimleri (oksidoredüktazlar) en çok kullanılan enzimlerdir. Ayrıca lipazlar ve esterazlar gibi hidrolaz sınıfı enzimler de redoks enzimleri ile beraber kullanılabilmektedir. Enzim biyosensörlerinin hazırlanmasında biyolojik materyal olarak en çok kullanılan enzimler Tablo 1.1'de verilmiştir. Tüm bu enzimlerin içinde glukoz oksidaz kan glukoz tayininin öneminden dolayı en çok kullanılan enzimdir. Enzim elektrotlarının en önemli problemi ko-substrat olarak oksijene ihtiyaç duymaları ve reaksiyonun amperometrik yöntemlerle izlenmesinin hidrojen perokside dayalı olmasıdır. Bu problem medyatörler kullanılarak aşılmaya çalışılmaktadır (Sarma et al., 2009).

Tablo 1.1. Amperometrik biyosensörlerde kullanılan çeşitli enzimler.

Enzim	Substrat	Referans
Glukoz oksidaz	Glukoz	Newman and Turner, 2004
Laktat oksidaz	Laktat	Romero et al., 2008
Aldehid dehidrogenaz	Aldehid	Vianello et al., 1996
Peroksidaz	H_2O_2	Mathebe et al., 2004
Kolin oksidaz	Kolin	Shi et al., 2006
Katalaz	H_2O_2, florür, siyanür	Stein and Hain, 1995
Üreaz	Üre	Soldatkin et al., 2000
Galaktoz oksidaz	Galaktoz	Tkac et al., 1999
Alkol oksidaz	Etanol, metanol, formaldehid	Akin et al., 2009
Glutamat oksidaz	Glutamat	Mikeladze et al., 2002
Triptofan-2-monooksigenaz	Triptofan	Al et al., 1997
Lizin oksidaz	Lizin	Saurina et al., 1999
Ksantin oksidaz	Ksantin, Hipoksantin	Cubukcu et al., 2007
Alkol dehidrogenaz	Alkol	Manso et al., 2008
Bilirubin oksidaz	Bilirubin	Shleev et al., 2004
Lakkaz	Fenolik bileşikler	Odaci et al., 2007
Sülfidril oksidaz	Tiyolik bileşikler	Timur et al., 2007a
Glutatiyon redüktaz	İndirgenmiş glutatiyon	Timur et al. 2008
L-homosistein desülfüraz	Homosistein	Alaçam et al., 2007
Tirozinaz	Fenolik bileşikler	Zhang et al., 2003
Piranoz oksidaz	Piran halkasına sahip şekerler	Ozdemir et al., 2010
Pirüvat oksidaz	Pirüvat, fosfat	Akyilmaz and Yorganci, 2007
Ürat oksidaz	Ürat	Akyilmaz et al., 2003
Kreatinin amidohidrolaz	Kreatinin	Altug and Dinckaya, 2007
Glutaminaz	Glutamin	Cattaneo and Luong 2004
Esteraz	Aspartam	Kirgoz et al., 2006
Lipaz	Tribütirin	Kartal et al., 2007

Enzim sensörleri hazırlanırken immobilizasyon matreryali olarak iletken polimerler, fonksiyonelleştirilmiş polimerler, kompozit materyaller, sol-gel ve nanomateryaller kullanılabilmektedir (Sarma et al., 2009).

Enzim elektrotları biyosensör olarak belirli bir analitin tayini için kullanımları yanında biyoyakıt hücrelerinde de kullanılabilir (Sarma et al., 2009). Yakıt hücreleri kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine çeviren sistemlerdir. Biyoyakıt hücreleri katalizörün tipine göre isimlendirilirler, yakıtların oksidasyonunu katalizleyen enzimler ise enzimatik biyoyakıt hücresi olarak adlandırılır (Minteer et al., 2007). Enzimatik biyoyakıt hücrelerinin tipik olarak gösterimi Şekil 1.2'de verilmiştir. Anot ve katot yarı geçirgen bir membran ile birbirinden ayrılır ancak bunun dışında tek bölmeli yapılar da mevcuttur. Biyolojik türler anodik kompartmanda olabilir ya da elektrot yüzeyinde immobilize edilebilir. Uygun yakıt eklendiğinde anotta kısmen ya da tamamen oksitlenir, elektronlar katota taşınarak oksijen indirgenir (Davis and Higson, 2007). Enzimatik biyoyakıt hücreleri mikrobiyal yakıt hücrelerinden daha yüksek güç yoğunluğuna (güç yoğunluğu elektrot yüzeyinde oluşturulan gücün birimidir; Watt/cm^2) sahiptir ancak ömürleri daha kısadır (tipik olarak 7–10 gün). Anotta ve katota uygun seçimliliğe sahip enzimler kullanılırsa bunları ayıran membrana olan ihtiyaç ortadan kalkmış olur, bu durum enzimatik biyoyakıt hücrelerinin önemli bir avantajıdır (Minteer et al., 2007).



Şekil 1.2. Biyoyakıt hücrelerinin şematik gösterimi.

1.1.2 Mikrobiyal biyosensörler

İmmobilize mikrobiyal hücreler biyoreaktörlerde, hidrojen üretiminde, amino asitler, organik asitler, antibiyotikler, steroidler, ekzopolisakkaritler gibi

yararlı birçok bileşiğin sentezinde ve çevre ile ilgili endüstriyel ve bilimsel çalışmalarda kullanılmaktadır (Cassidy et al., 1996; Amin et al., 2007; Deo et al., 2004a; Jo et al., 2008; Sauer et al., 2008; Jenkins et al., 2004; Kapoor et al., 2008; Singh et al.; 2008). Aynı zamanda mikrobiyal hücrelerin biyobileşen olarak kullanıldığı mikrobiyal biyosensörlerin hazırlanmasındaki uygulamaları oldukça sık karşımıza çıkmaktadır (Reshetilov et al., 2001).

Son zamanlarda, organik bileşiklerin tayini için birçok biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Bunların büyük bir kısmı enzim katalizli ya da mikrobiyal katalizli reaksiyonları temel almaktadır. Enzim sensörleri ilgili substratlarına karşı yüksek spesifiklik gösterir, ancak enzimler genelde pahalıdır ve stabil değildir. Mikrobiyal biyosensörler biyokimyasal proseslerin on-line kontrolü için uygundur ve birçok araştırmacı için çalışma konusu olmuştur (Karube and Nakanishi, 1994).

Mikrobiyal biyosensörlerin kullanılmasının avantajlarını şöyle sıralamak mümkündür:

1) Birçok yerde bulunurlar geniş bir aralıktaki kimyasal bileşikleri metabolize edebilirler (D'Souza, 2001),

2) Farklı koşullara adapte edilebilirler ve zamanla yeni molekülleri degrede edebilme yetenekleri geliştirilebilir (D'Souza, 2001),

3) Çözgen inhibisyonlarına enzim elektrotlarından daha az duyarlıdırlar ve optimum pH veya sıcaklık değerlerinden farklı koşullara sahip ortamlara daha toleranslıdırlar (Karube and Nakanishi, 1994),

4) Enzim elektrotlarından daha uzun süre dayanıklıdırlar (Karube and Nakanishi, 1994),

5) Daha ucuzdurlar çünkü aktif enzimlerin izolasyonuna ihtiyaç yoktur (Karube and Nakanishi, 1994),

6) Hücreler özellikle çoklu katalizler için kullanılabilirler (D'Souza, 2001).

Aynı zamanda mikrobiyal biyosensörlerin bazı dezavantajları vardır:

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

2) Mikrobiyal biyosensörlerin bir diğer dezavantajı ise kullanıldıktan sonra rejenerasyon için daha fazla zamana ihtiyaç duyulmasıdır (Karube and Nakanishi, 1994),

3) Hücreler birçok enzim içerirler ve seçimlilik düşüktür. Ancak belirli enzimleri eksik olan mutant mikroorganizmalarla mikrobiyal sensörler hazırlanabilir. Bu uygulama real-time analize olanak sağlayarak, endüstriyel prosesler ve çevresel görüntülemede kontaminantların seviyesi ile akış hızının *in situ* tayini ve analitlerin hızlı ölçümü için gerekli olan gereksinimi karşılamaktadır. Mikrobiyal biyosensörlerin seçimliliğini artırmak için yapılan bir diğer uygulama hücre geçirgenliğinin artırılmasıdır. Geçirgenlik artınca küçük moleküler kütleye sahip kofaktörlerin birçoğu hücreden dışarı difüzlenir ve istenmeyen yan reaksiyonlar bu şekilde minimize edilmiş olur (D'Souza, 2001).

Bazı durumlarda bir tek hücre dizi şeklindeki reaksiyon setleri için gerekli tüm enzimleri içermeyebilir, bu durumda karışık mikrobiyal kültürler kullanılabilmektedir. Alternatif olarak ise; eksik olan enzim hücre membranı yüzeyine bağlanabilir (D'Souza, 2001). Mikrobiyal biyosensörler ile yapılcak uygulamalarda bunları kullanmanın avantajları bilinen dezavantajları ile dengelenmelidir (Karube and Nakanishi, 1994).

Bir biyosensörün en basit ihtiyacı biyolojik materyali fizikokimyasal değişimleri ölçmeye yarayan sistem ile başarılı bir şekilde kombine edilmesidir. Bu durumda immobilizasyon teknolojisi önemli role sahiptir. İmmobilizasyon

sadece biyomateryal ve iletici sistemin arasındaki bağlantıyı sağlamaz aynı zamanda tekrar kullanım için stabilizasyonda yardımcı olur. Biyomateryaller adsorbsiyon, tutuklama, kovalent bağlama, çapraz bağlama ya da tüm bu tekniklerin kombinasyonu ile immobilize edilebilirler (Lei et al., 2006; D'Souza, 2001). Canlı hücreler kullanılacağı zaman uygulanan tekniklerin ılımlı koşullarda gerçekleştirilmesi gerekir. Kovalent bağlama, enzim ve antibadilerin immobilizasyonu için kullanılan genel bir yöntemdir, ancak hücrelerin immobilizasyonu için kullanışlı değildir. Kovalent bağlamadaki genel problemlerden bir tanesi reaktif gruplara ve diğer sert reaksiyon koşullarına maruz kalan hücrelerin canlılığını yitirmesidir. Glutaraldehid gibi bifonksiyonel çapraz bağlayıcılar çeşitli materyallere hücrelerin immobilizasyonunda başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Diğer bir immobilizasyon yöntemi olan çapraz bağlama enzimlerin ve mikrobiyal hürelerin stabilizasyonu için sıklıkla tercih edilmektedir. Canlı hücreler kullanıldığında tutuklama ve adsorbsiyon teknikleri daha kullanışlıdır. Genel bir uygulama diyaliz membranı gibi membranları kullanarak iletici sisteme hücrelerin immobilizasyonudur. Jelatin, albümin ve tavul yumurtası beyazı gibi protein yapılı materyallerden sıklıkla yararlanılmaktadır. Ayrıca sentetik polimerler, poliakrilamid, poliüretan temelli hidrojeller ve polivinil alkol immobilizasyon amacıyla kullanılmışlardır. Sentetik polimerlerin kullanımını sınırlayan en önemli şey, hücrenin canlılığını kaybetme olasılığıdır. Hücreleri tutuklama yöntemi ile immobilize edebilmek için kullanılan doğal polimerler aljinat, karragenan, agaroz ve kitosandır. Bu polimerlerin hücre immobilizasyonunda çok kullanışlı oldukları bilinmektedir. Adhezyonla immobilizasyon hücrelerin substrat içeren sıvı fazla direkt etkileşimini sağladığı için avantajlı bir yöntemdir, böylece indirgeme ya da kütle transferi problemlerini elimine etmektedir. Ancak bu yöntemi sınırlayan en önemli etmen, sürekli kullanım sırasında yıkama sonucunda hücrelerin yüzeyden uzaklaşmasıdır (D'Souza, 2001).

Mikrobiyal biyosensörlerin ölçüm prensipleri

Mikrobiyal biyosensörlerde, ilgili türü spesifik olarak tanıyan mikroorganizma biyobileşen olarak kullanılır. Biyomateryal uygun iletici sisteme immobilize edilir. İletici sistem biyokimyasal sinyali elektronik sinyale dönüştürür. Bu şekilde analizlenenen bileşiğin derişimine bağlı olarak elde edilen sinyaller değişir. Mikrobiyal biyosensörlerde kullanılan iletici sistemler; optik, potansiyometrik, amperometrik ya da kalorimetrik temelli olabilmektedir (Karube and Nakanishi, 1994; Tkac et al., 2005; D'Souza, 2001). Mikrobiyal

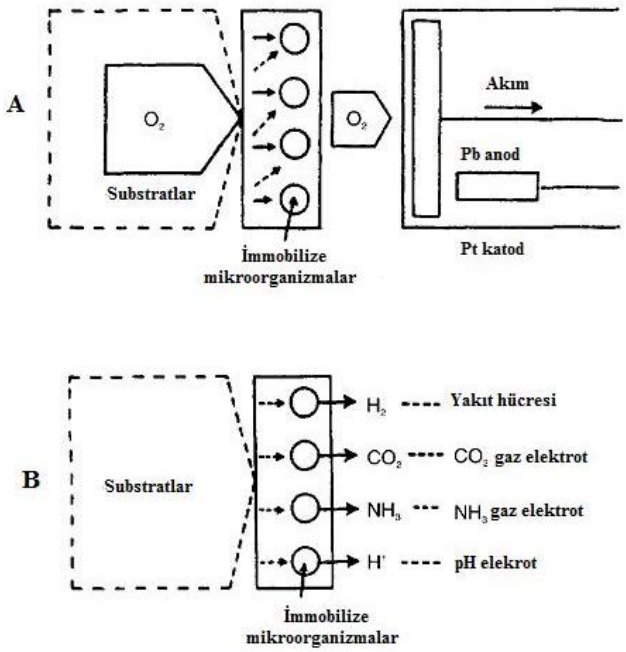
biyosensörleri ölçüm prensibine bağlı olarak metabolik aktivitenin ölçüldüğü ya da elektrokimyasal aktif metabolitin ölçüldüğü biyosensörler olarak sınıflandırmak mümkündür. Elektrokimyasal mikrobiyal biyosensörler amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik temelli ya da mikrobiyal yakıt hücresi tipinde olabilirler (Lei et al., 2006).

Elektrokimyasal ölçüm prensibini temel alan mikrobiyal biyosensörleri metabolik aktiviteyi ve mikroorganizmalar tarafından üretilen aktif metabolitlerin ölçümü temel alan sistemler olarak iki grupta toplamak mümkündür (Şekil 1.3). Metabolik aktivitenin ölçümü; hücrelerin asilimilasyon sonucu metabolik aktivelerindeki değişimi temel alır ve genel olarak substratın ortama eklenmesiyle artar. Bu değişim substrat derişimi ile ilişkilendirilir ve ortamdaki oksijen değişimine bağlı olarak izlenir. Bu tip biyosensörlerin prensibi Şekil 1.3A'da görülmektedir. Bu sensörlerde aerobik mikroorganizmalar kullanılır. Mikrobiyal biysensör oksijenle doyurulmuş tampon çözeltiye daldırılır. Substratın eklenmesinin ardından analitin derişimine bağlı olarak oksijende azalma gözlenir (Karube and Nakanishi, 1994).

Diğer sınıf mikrobiyal biyosensörlerde ise; mikroorganizmalar tarafından ortama salınan H_2, CO_2, NH_3 ve organik asitler gibi elektrokimyasal aktif metabolitlerin ölçümü esas alınır. Bu tip biyosensörlerin prensibi Şekil 1.3B'de görülmektedir. Bu biyosensör sistemlerinde aerobik mikroorganizma kullanma zorunluluğu yoktur. Yapılan çalışmalara bakıldığında geliştirilen mikrobiyal sensörlerin birçoğu metabolik aktiviteyi temel aldığını görmekteyiz. Ayrıca bunların dışında medyatörler kullanılarak çeşitli mikrobiyal biyosensörler hazırlanmıştır (Timur et al., 2007b; Vostiar et al., 2004).

Optik esaslı mikrobiyal biyosensörlerin hazırlanmasında lüminesans temelli fiziksel iletim sistemleri kullanılmaktadır. Fotobakterilerin lüminesans yoğunlukları metabolik aktivitelerine bağlıdır. Fotobakteriler optik sistemlerle kombine edilerek yüksek duyarlılıkta mikrobiyal biyosensörler hazırlanabilir (Karube and Nakanishi, 1994). Biyolüminesans özelliğe sahip bakteriler sudan (*Vibrio fischeri*) karaya kadar (*Photorhabdus luminescens*) çok farklı ortamlarda bulunabilir. Biyolüminesans hücre biyosensörleri genetik olarak modifiye edilmiş mikroorganizmalar (GEM) kullanılarak da geliştirilebilir. Bunlar organik, pestisit ve ağır metal kontaminasyonlarının görüntülenmesinde kullanılabilirler. İlgili analiti tanıyan promotorun kontrolü altında lüsiferazı kodlayan genler plazmide yerleştirilerek modifiye organizmalar hazırlanabilir. Bu şekilde hazırlanan

mikroorganizmalar organik kirleticileri metabolize ettiği zaman genetik kontrol mekanizması lüsiferazın sentezi için devreye girer, böylece üretilen ışık lüminometre ile belirlenebilir (D'Souza, 2001).



Şekil 1.3. Mikrobiyal biyosensörlerde ölçüm prensipleri [Karube and Nakanishi, 1994].

Canlı hücrelerin metabolizmaları sonucu sıcaklıktaki değişim temel alınarak termal esaslı mikrobiyal biyosensörler hazırlamak mümkündür. Örneğin enjeksiyon sonrasında farklanan sıcaklık ile analitin konsantrasyonu arasında ilişki kurulabilir. Değişen sıcaklığı termistörlerle ölçmek mümkündür (Tkac et al., 2005).

Mikrobiyal biyosensörler ile Clark tip oksijen elektrodu, iyon ya da gaz duyar elektrotlar, yakıt hücresi elektrotları (H_2 dedeksiyonu), CO_2 elektrotları, NH_3 elektrotları, pH elektrotlarını kullanarak gıda, fermentasyon, gibi alanlarda önemli moleküllerin analizini yapmak mümkündür. Glukoz (Odaci et al., 2008; Tuncagil et al, 2009a; Tuncagil et al, 2009b, Yeni et al., 2008), asetik asit (Subrahmanyam et al., 2001), BOD (Pasco etal., 2000), etanol (Ikeda et al., 1997; Akyilmaz and Dinckaya, 2005), p-nitrofenol (Mulchandani et al., 2002), fenolik bileşikler (Timur et al., 2007b), siyanür (Okochi et al., 2004), hidrojen peroksit (Rajasekar et al., 2000), polisiklik aromatik hidrokarbonlar (Koenig et al., 1996), paraokzan, metil paratiyon, diazinon gibi organofosfat bileşikler (Mulchandani et

al., 1998), diuron, atrazin gibi herbisit (Rouillon et al., 1995), kısa zincirli yağ asitlerinin (Schmidt et al., 1996) tayinleri mikrobiyal biyosensörlerle gerçekleştirilmiştir.

Mikrobiyal hücreler ile modifiye edilmiş elektrotlar belirli analitlerin tayini yanında mikrobiyal yakıt hücrelerinde de sıklıkla kullanılmaktadır. Anodik bölmedeki mikroplar substratları oksitleyerek elektron ve protonları oluşturur ve elektronlar katoda taşınır. Oksijen en fazla kullanılan elektron akseptörüdür (Du et al., 2007). Bunun dışında nitrat, manganez, demir, sülfat, fumarat ve arsenat elektron alıcısı olarak fonksiyon gösterebilir (He and Angenent, 2006). Mikroorganizmaların kullanılması çoklu enzim sistemi sağlar ve böylece birden fazla substrat dönüşüme uğratılabilir (Bullen et al., 2006). Ayrıca bir tek tür yerine karışık kültürler kullanılarak substrat aralığı biraz daha genişletilebilir. Enzimatik biyoyakıt hücrelerine kıyasla güç yoğunlukları daha düşük olmasına rağmen mikrobiyal yakıt hücrelerinin kullanım ömrü daha uzundur (Minteer et al., 2007).

1.1.3 Immünosensörler

Stabil bir kompleks oluşturarak antikorların antijenleri moleküler tanımasının spesifikliği; hem analitik immünoassaylerde hem de katı destek materyali ile oluşturulan immünosensörlerde temel alınmaktadır. İmmonuassay teknolojisi özellikle klinik laboratuarları için oldukça önemlidir ve bu konudaki araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Klinik çalışmaların yanı sıra gıda endüstrisinde kalite kontrol ve çevresel analizlerde eser miktardaki maddelerin tayini için immnuoassaylere gerek duyulmaktadır. Bu uygulamalardaki gereksinimler sürekli analize olanak sağlayan immünosensörlere ilgiyi arttırmaktadır (Luppa et al., 2001).

Tüm immünosensörler ve aynı zamanda immünoassayler için analitin ölçümünde spesifikliğin öncelikle bağlanan moleküle bağlı olduğu bilinmelidir. Bu özellik her iki teknik için de kullanılmaktadır. İmmunoglobulinler (antikor parçaları, kimerik antikorlar vb.) ya da alternatif bağlanma parçalarına (aptamerler) sübstitüe olan antikorlar ya da diğer yapılar (moleküler baskılama) için protein mühendisliğinde yeni gelişmeler mevcuttur. Antikor mühendisliğinin antikorların spesifikliği ve ilgilerinde olumlu değişiklikler yapacağı beklenmektedir.

İmmünosensörlerde ölçüm direkt (işaretlenmemiş) ya da indirekt (işaretlenmiş) yolla yapılabilmektedir. Direkt sensörlerde immün kompleksin oluşumu sonrasındaki fiziksel değişim dedekte edilebilirken, indirek sensörlerde sinyal üreten işaretleyiciye ihtiyaç duyulur. İşaretleyici olarak peroksidaz, fosfataz, katalaz, lüsiferaz gibi çeşitli enzimler, ferrosen, In^{2+} tuzları ya da floresans moleküller (rodamin, floressein, rutenyum dimin kompleksleri, fosforesans porfirin boyalar) kullanılabilir (Luppa et al., 2001).

İşaretleyici kullanmadan yapılan ölçümler döngüsel voltammetri, kronoamperometri, impedimetri, yüzey plazmon rezonans, ya da quartz kristal mikrobalans sistemlerini temel alırken, işaretleyici kullanılan immünosensörlerde genellikle amperometrik ya da florimetrik yöntemler yaygındır (Warsinke et al., 2000**;** Luppa et al., 2001; Jiang et al. 2008; Prodromidis, 2010; Skladal, P., 1997).

1.1.4 DNA sensörleri

Deoksiribonükleik asit (DNA) kalıtsal karakteristiklerin belirlenmesinde ve replikasyon için gerekli olan bilginin taşınmasında önemli bir moleküldür. Kimyasal ve biyofiziksel özelliklerinden dolayı, DNA genetik kodun ve genom dizisinin keşfi için gerekli olan analizlerde önemli bir konu olmuştur (Diculescu et al., 2005).

DNA biyosensörleri reseptör ve iletici sistemin kombinasyonuyla oluşturulur. DNA biyosensörlerinin hazırlanmasında önemli parametrelerden bir tanesi, tek zincir probun doğru bir oryantasyonla yüzeyde immobilizasyonudur. Analizlenmek istenen DNA tek zincirinin probla hibridizasyonu sonrasında sinyal elde edilmiş olur (Palecek, 2009**)**. DNA hibridizasyonunun sinyalinin belirlenmesi direkt (işaretleyici olamadan) ya da indirekt (enzimler, floroforlar, manyetik boncuklar, metal kompleksleri, organik redoks boyalar işaretleyici olarak kullanılabilir) metotlar olarak iki grupta toplanabilir. Direkt iletimde mikrogravimetrik, elektriksel, elektrokimyasal ya da optik yöntemler kullanılırken indirekt metotlar elektrokimyasal ya da florimetrik ölçümler yapılmaktadır (Cosnier, S., and Mailley, P., 2008; Teles and Fonseca, 2008; Drummond et al., 2003). Tekli zincirin immobilizasyonunda kovalent bağlama, kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM), adsorbsiyon ve polimer matrikste tutuklama yöntemleri kullanılabilmektedir (Rivas et al., 2005).

DNA biyosensörleri kirletici ajanların ya da metallerin, genetik modifiye gıdalar ve organizmaların, DNA-ilaç etkileşim mekanizmalarının, biyoterörizm, hastalıkların teşhisi, DNA baz hasarının ve insan, virüs ya da bakterilerde spesifik DNA dizisinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Hahn et al., 2005; Mikkelsen, 1996).

1.1.5 Doku temelli biyosensörler

İzole enzimler yerine doku kesitlerinin kullanıldığı biyosensörler çeşitli çalışmalarda karşımıza çıkmaktadır. Bu sistemler enzimin daha stabil olması, yüksek enzim aktvitesine sahip olmaları, ucuz olmaları, kolay hazırlanmaları ve enzimin kofaktörüne ihtiyaç duymamaları gibi avantajlara sahiptir (Filho and Vieira, 2000). Özellikle bitki dokuları kullanılarak hazırlanan biyoelektrotlarda hidrojen peroksidin ya da oksijenin izlenmesiyle sinyal elde edilmektedir.

Hindistan cevizi dokusu ile H_2O_2 (Kozan et al., 2007), bezelye dokusu ile diamin (Mei et al., 2007), mantar dokusu ile etanol (Huang and Wu, 2006), elma dokusu ile flavonol (Cummings et al., 1998), avokado dokusu ile parasetamol (Filho et al., 2001), yer elması dokusu ile fenol tayini (Odaci et al., 2004), ıspanak dokusu ile glikolik asit (Zhu et al., 2004) ve salatalık dokusu ile glutatiyon (Sezginturk and Dinckaya, 2004) tayini başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

1.2 Nanomateryaller ve Biyosensörlerde Kullanım Olanakları

Nanoteknoloji; günümüzde bilim ve teknoloji alanındaki önemli bir disiplindir (Merkoçi, 2007). 100 nm'den daha küçük boyutlardaki sistem ve cihazların oluşturulması, çalışması ve kullanımını amaçlar (Van Hove, 2006). Biyosensörlerin geliştirilmesinde nanoteknolojinin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Biyosensörlerin duyarlılıkları ve diğer özellikleri, nanomateryallerin kullanılmasıyla iyileştirilebilmektedir (Jianrong et al., 2004). Geliştirilen nanomateryaller biyolojik sistemlerdeki yapıların boyutlarına benzer büyüklüktedir (Şekil 1.4).

Namomateryaller; bazı özelliklerinden dolayı biyosensör uygulamalarında ilgi çekici moleküller olmuşlardır. Bunlar:

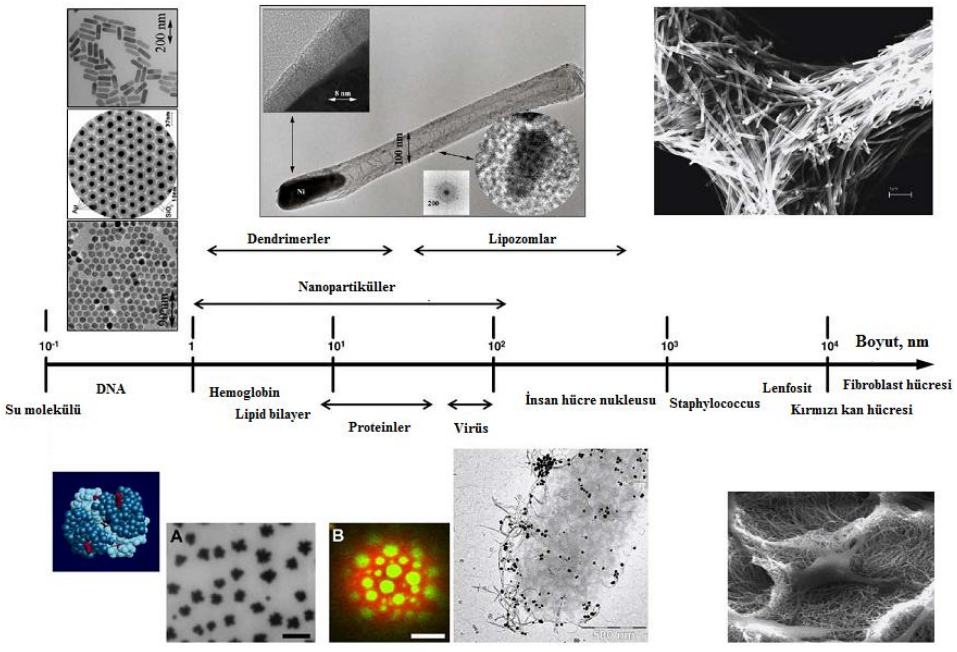
1) Küçük boyut (1–100 nm) ve buna bağlı olarak yüzey/hacim oranının büyük olması, 2) Boyut, kompozisyon ve şekille ilişkilendirilen fiziksel özelliklerin kimyasal olarak modifiye edilebilmesi, 3) Hedef molekülleri bağlama özelliklerinin farklı olması, 4) Yapısal sağlamlık.

Nanomateryaller, biyomoleküllerle birlikte birçok biyoanalitik uygulamada kullanılmaktadır. Nanomateryallerin elektroanalizlerde kullanılmalarının sağladığı bazı avantajlar şunlardır:

- Elektrot yüzeyine immobilize edilmeleri büyük yüzey alanı-düzgün iletkenlik sağlar, moleküler ve biyomoleküler analitlerin duyarlı elektrokimyasal dedeksiyonuna imkân tanır.

- Nanopartiküller analitlerin elektrokimyasal tayininde sinyali artıran etkili işaretleyicilerdir.

- Metal nanopartiküllerin iletkenlik özellikleri, kontrollü elektrokimyasal fonksiyonları ile biyomateryal yapılarının tasarlanmasına olanak sağlar (Merkoçi, 2007).



Şekil 1.4. Biyolojik sistemlerle aynı boyutlardaki nanomateryaller [Yukarıdaki nanomateryaller, soldan sağa: AuNP (çap:37 nm) ve nanopartiküller, CNT (çap: 200 nm), CNT demetleri; aşağıdaki biyolojik yapılar soldan sağa: DNA, akciğer sürfaktant vezikülü ve lipozomlar, CNT ve AuNP vasıtasıyla transfekte edilmiş gram negatif bakteri, CNT demeti üzerindeki fibroblast] [Pison et al., 2006].

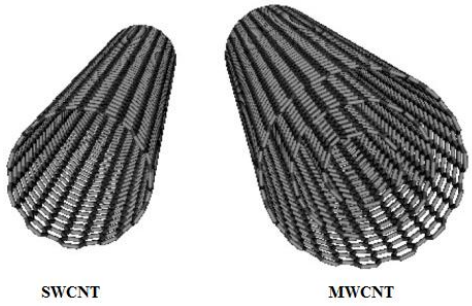
1.2.1 Karbon nanotüpler (CNT)

Karbon yerküredeki en çok bulunan element olarak bilinmektedir. Atomların nasıl düzenlendiğine bağlı olarak çeşitli özellikler kazanan karbon, farklı amaçlar için kullanılabilir. 6000 yıldan daha uzun bir zamandır karbon metal oksitlerin indirgenmesi için kullanılmıştır. Karbonun formlarından olan grafit 1779 yılında ve 10 yıl sonrasında ise elmas keşfedilmiştir. Yaklaşık 200 yıl sonra Kroto, Smalley ve Curl tarafından karbonun bir diğer formu olan fulleren ve birkaç yıl sonra ise karbon nanotüpler keşfedilmiştir. Karbon nanotüpler (CNT) 1991 yılında Sumio Ijima tarından fulleren isinden, fulleren hazırlamakta kullanılan karbon-arc metoduna benzer bir yöntemle elde edilmiştir. Bu şekilde karbon nanoskobik düzeyde tübüler oluşumlar şeklinde düzenlenmiştir. Bu materyalleri görüntülemek için yüksek çözünürlükteki transmisyon elektron mikroskobu kullanılmıştır. CNT karbon fiberlerin tamamıyla yeni bir tipidir, 2–50 arasında değişen sayıdaki grafit tabakaların ko-aksiyel oluşumlarıdır. Sumio'nun ilk gözleminde elde ettikleri çok tabakalı nanotüplerdir ve yaklaşık olarak 2 yıl sonra tek duvarlı CNT elde edilmiştir (Paradise and Goswami, 2007).

Karbon nanotüp ismi bunların birkaç nanometrelik genişlikteki boyutlarından gelmektedir. Bu tüpler insan saçından 10 000 kez daha ince silindir şeklindeki hegzagonlardan oluşurlar (Paradise and Goswami, 2007).

CNTler nanomateryallerin en fazla uygulama alanı bulan türüdür. CNTler çelikten 100 kat daha fazla dirence, saf elmastan daha bir termal iletkenliğe ve bakırla aynı elektriksel iletkenliğe ve bakırdan daha yüksek akım taşıma özelliklerine sahip oldukları için ilgi çekici yapılar olmuşlardır (Merkoçi et al., 2005a; Antiochia and Gorton, 2007).

Tek duvarlı (SWCNT) ve çok duvarlı (MWCNT) olmak üzere iki farklı tip karbon nanotüp mevcuttur (Şekil 1.5). SWCNTler karbon atomlarının grafit benzeri atomik bir düzlemde düzenlenmesiyle karakterize edilir. Grafit tabaka yaklaşık 2 nm çapında silindir şeklinde sarılmış durumdadır. MWCNTler aralarında 3,4 Å boşluk bulunan birçok grafit silindirlerin iç içe geçmesiyle oluşurlar. MWCNTlerin dış çapları 1–50 nm aralığında ve iç çapları genelde bir kaç nanometre civarındadır (Yao and Shiu, 2007). Bunların dışında çift duvarlı (DWCNT), üç duvarlı (TWCNT) yada dört duvarlı karbon nanotüpler sentez koşullarının değiştirilmesiyle değişik amaçlar için hazırlanabilmektedir (Flahaut et al., 2005).



Şekil 1.5. Tek duvarlı (SWCNT) ve çok duvarlı (MWCNT) karbon nanotüplerin gösterimi.

CNTler keşfedilmelerinden sonra birçok alanda önemli bir konu haline gelmiştir. CNTler elektriksel, mekanik, kimyasal ve yapısal özelliklerinden dolayı özel moleküllerdir. CNTler metalik, yarı iletken ve süper iletken elektron transferinde rol oynar, moleküllerin depolanması için uygun bir çekirdek yapısına sahiptir ve bilinen materyallerin arasında en elastik yapıya sahip moleküldür (Wang, 2005a).

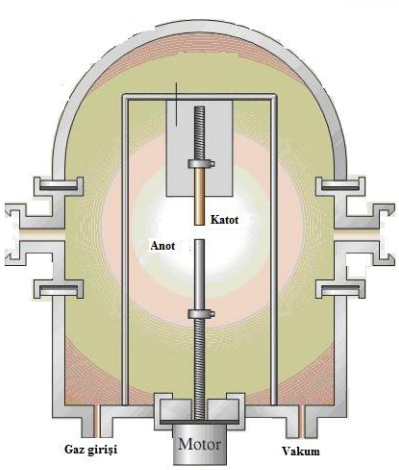
1.2.1.1 CNT sentez yöntemleri

CNTlerin üretimi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. CNTler kimyasal buhar biriktirilmesi, karbon arc metodu ya da lazer buharlaştırma yöntemleri ile elde edilebilir. İlk metod çok tabakalı CNTlerin sentezi için kullanılan arc metodudur (Wang, 2005a).

Karbon Arc Metodu: CNTleri hazırlamak için çeşitli yöntemler vardır ve arc metodu bunlardan ilkidir (Paradise and Goswami, 2007). Bu metod düşük başınçta (50-700 mbar) genellikle inert bir gazın (Helyum, Argon) varlığında iki grafit çubuğun buharla bir araya getirilmesiyle MWCNTleri oluşturmak için kullanılır. Birbirinden ayrı grafit çubuklara arc voltajı uygulandıktan sonra buharlaşan anot, is şeklinde birikerek fullerenleri oluşturur, buharlaşan anodun bir kısmı katoda toplanır. Grafit çubuk, metal katalizörlerden (Fe ve Co) birbirini içeriyorsa, anod ve katoddan oluşuyorsa MWCNT yerine SWCNT sentezlenir (Şekil 1.6).

Arc metoduyla büyük ölçekli MWCNT sentezi helyum atmosferinde gerçekleştirilmiştir. Saf grafit tabakaların arc ile biriktirilmesi sadece helyum ya da argon gibi inert gazlarla değil aynı zamanda metan kullanılarak da gerçekleştirilebilir. Metanın MWCNTlerin sentezi için en iyi gaz olduğu

bulunmuştur. Bunun sebebi metanın termal dekompozisyonudur ($2\ CH_4 \rightarrow C_2H_2 + 3\ H_2$), yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen denemeler He ya da Ar gibi inert gazlarla karşılaştırılmıştır. MWCNTlerin sentezinde hidrojenin etkisinin olmadığı bulunmuştur.



Şekil 1.6. Arc metodunun prosesinin şematik gösterimi.

Bu yöntemin en büyük zorluğu CNTlerin saflaştırılmasıdır. Nanotüp oluşturmayan karbonun uzaklaştırılması yani CNT saflaştırılması sentezinden çok daha pahalı olan bir işlemdir (Merkoçi et al., 2005a).

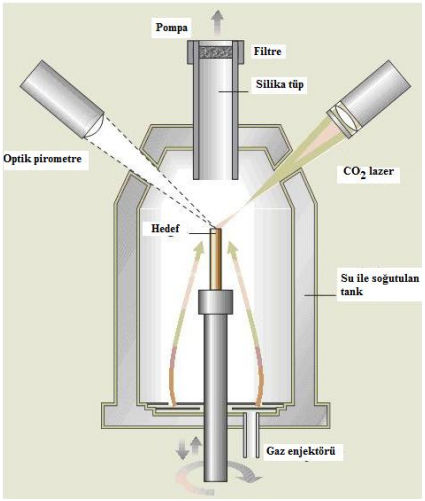
Lazerle Buharlaştırma Metodu: Lazer ocağı ya da lazer alevi metodu olarak da adlandırılan yöntem, orijinal metal demetleri ya da ultra incelikteki partikülleri kaynak olarak kullanır. Fulleren ve CNT sentezi için geliştirilmiştir. Lazerle buharlaştırma metodu daha yaygın olarak SWCNT sentezinde kullanılır. Lazer, yüksek kaynama sıcaklığına sahip karbon gibi materyaller için uygundur. Diğer buharlaştırma sistemlerine göre lazerin enerji yoğunluğu daha yüksektir. Metodun prensibi basitçe şöyledir:

- CO_2 lazer ışığı kuartz tüp fırının merkezindeki hedefe (katalitik metallerle kaplı karbon kompozit) gönderilir.

- Hedef yüksek sıcaklıktaki argon atmosferinde buharlaşır ve SWCNTler oluşturulur.

- Üretilen SWCNTler özel bir toplayıcı gazla taşınır (Şekil 1.7).

Metodun bazı avantajları şunlardır; çapın kalitesinin yüksek olması ve SWCNTlerin kontrollü sentezini sağlamasıdır. Fırının sıcaklığı, katalitik metaller ve akış hızındaki değişimler direkt olarak SWCNT çapını etkiler.



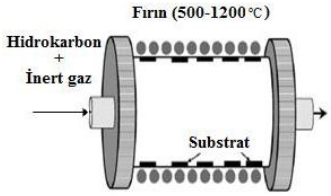
Şekil 1.7. Lazerle buharlaştırma metodunun şematik gösterimi.

Kimyasal Buhar Biriktirilmesi: Arc ve lazerle buharlaştırma metodları sentezlenen CNTlerin düzenlerinin ve yerleşimlerinin kontrolünü sağlayamaz. Bu durum kimyasal buhar biriktirilmesi (CVD) yöntemi ile aşılabilir. Bu popüler metod hidrokarbon buharını (örneğin; metan) kullanır, metal katalizör varlığında hidrokarbon buharı termal olarak dekompoze edilir (Şekil 1.8). Metod, aynı zamanda termal ya da katalitik CVD olarak da bilinir.

CVD, gaz fazındaki molekülleri film ya da partikül oluşumunu sağlayan reaktif hücrelere dekompoze eden kullanışlı bir prosestir. CVD düşük sıcaklıkta çevresel basınçta CNTlerin sentezi için basit ve ekonomik bir tekniktir. CVD 1959'dan gününüze kadar karbon filamentleri ve fiberlerin üretilmesi için kullanılmaktadır. Proses, yüksek sıcaklıkta katalizör bulunan tüp fırının içinden hidrokarbon buharının geçirilmesini içerir ve hidrokarbon dekompoze olur. CNTler katalizör sayesinde oluşur ve oda sıcaklığına soğumalarını sağlayan bir sistemle toplanır. CNTler aynı zamanda organometalik katalizör ön maddelerinin kullanılmasıyla başarılı bir şekilde sentezlenebilir. CVD ile CNT sentezinde üç önemli parametre; hidrokarbonun tipi, katalizörün tipi ve sıcaklıktır.

Büyük skalada üretimin yanında, CVD aynı zamanda atomik güç mikroskoplarında (AFM) prob ucu olarak kullanılmak üzere bir tek CNT

sentezinde de kullanılabilir. Bunlar mekanik olarak üretilenlerden daha küçük boyutlarda oluşturulabilir ve AFM'nin çözünürlüğünü arttırabilir.

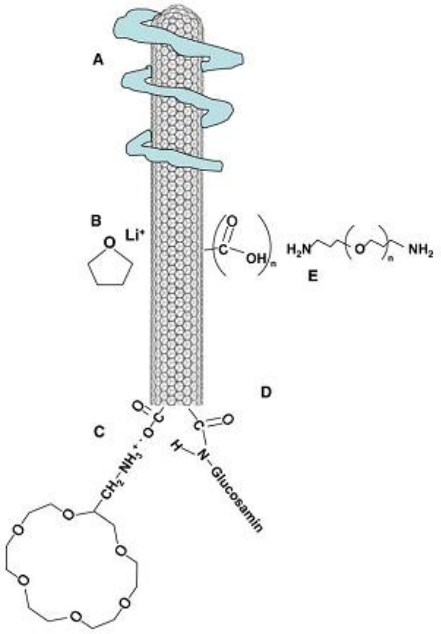


Şekil 1.8. CVD prosesinin şematik gösterimi.

Bu metodların dışında son günlerde kullanılmaya başlanılan bir diğer metod da güneş enerjisi ile CNT üretimidir. Bu metoddaa CNTler yüksek konsantrasyonda güneş ışığı ile üretilir. Güneş ışığı grafit örnek üzerinde yoğunlaştırılır ve karbon buharlaşır. Bir reaktörde CNTler toplanır ve su ile soğutularak oluşturulur. CNT sentezi için kullanılan bir diğer yöntem ise kimyasal yöntemdir. Hidrokarbonların katalitik dekompozisyonu yüksek sıcaklıklarda akış fırını ile gerçekleştirilir. Bu sistem dört farklı formla sonuçlanır: katalizörün yüzeyinde amorf karbon tabakaları, amorf karbonda filamentler, metal parçacıkları kaplayan grafit tabakalar ve çok duvarlı karbon nanotüplerdir (Paradise and Goswami, 2007).

1.2.1.2 CNT çözünürleştirilmesi

CNTler (biyo)analitik denemelerde uygulanmadan önce ilk olarak çözünür ürünlere dönüştürülmelidir. Homojen CNT dispersiyonlarının hazırlanması, ince film oluşturulmasında ve diğer uygulamalarda büyük öneme sahiptir. CNTlerin geniş kullanım olanaklarını sınırlayan en önemli etmen bunların çözünürlükleridir (Zhao H. and Ju H., 2006; Balasubramanian and Burghard, 2006). Çeşitli materyaller bu amaçla kullanılabilir. Uçlardan ya da yan duvarlardan fonksiyonelleştirme, sonikasyonla sürfaktantların kullanımı, nanotüplerin polimerlerle sarılmaları ve süperasitlerle protonlanmaları yaygın olarak kullanılan metodlardır (Şekil 1.9). Kullanılan bazı metodlar Tablo 1.2'de özetlenmiştir. Bu metodlar (sonikasyon ve/veya fonksiyonelleştirme) oldukça başarılı olmalarına rağmen CNTlerin küçük parçalara bölünmesine neden olur ve sonuçta CNTler beklenenden daha düşük bir performans gösterebilir.



Şekil 1.9. CNT çözünürleştirmeye ilişkin alternatifler: (A) polimer ile supramoleküler kaplama, (B) CNT-Li+ iletken polielektrolit, (C) 2-aminometil 18-crown-6-eter, (D) glukozaminle amid bağı, (E) diamin ile sonlandırılmış oligomerik poli(etilen glikol).

Kim et al., tarafından yapılan bir çalışmada dimetilsülfoksit-H_2O (DMSO-H_2O) içinde hazırlanmış amiloz ile CNT dispersiyonları hazırlanmıştır. Bu proses iki önemli adımdan oluşmaktadır. İlk olarak CNTler DMSO-H_2O ile ön sonikasyona tabi tutulur ve CNT demetlerinin oluşturduğu agregasyon bozulur. Daha sonra CNT ile amiloz arasındaki kooperatif etkileşimler maksimize edilerek hızlı ve komple bir çözünürlük sağlanmış olur. Kovalent modifikasyonlar ile CNTlerin çözünürleştirilmesi Luong et al., tarafından yapılan bir çalışmada verilmiştir. MWCNTler nafyon (perflorlanmış iyon değişim reçinesi) (Wang et al., 2003b; Lee et al., 2007), setil trimetil amonyum bromür (CTAB) (Wang et al., 2009), tiyonin (Li et al., 2004), (3-aminopropiletoksisilan (APTES), poli(stiren-b-izobütilen-b-stiren) (Gilmore et al., 2007), polilaktik asit (PLA) (Supronowicz et al., 2002) and polivinilalkol (PVA) (Roy et al., 2006), hiyaluronik asit (Thompson et al., 2009) ve etanolde sonikasyonla çözülerek sensör uygulamalarında kullanılmışlardır. CNT ve amino uçlu organik türler arasındaki etkileşimler komplekstir ve fonksiyonelleştirme reaksiyonun koşullarına bağlıdır.

Tablo 1.2. Karbon nanotüplerin çözünürleştirilmesi için bazı yaklaşımlar.

Çözünürleştirici ajan	Açıklama	Kaynak
DMSO-H_2O içinde hazırlanan heliks yapıdaki amiloz	Supromoleküler enkapsülasyon	Luong et al., 2004
Polivinil pirolidon ve polistiren sülfonat	Lineer polimerler ile kovalent olmayan CNT etkileşimi	Star et al., 2001
β-siklodekstrin	Kompleks oluşumu	Dodziuk et al., 2003
Nafyon	CNT'nin elektrokatalitik özelliklerini nafyon bozmaz	Wang et al., 2003b
Tetrahidrofuran/Li^+	Negatif yüklü CNT ile Li^+ arasında iletken polielektrolit tuzlar	Penicaud et al., 2005
Diamin-uçlu oligomerik poli(etilen glikol)	Polimerin amino grupları ile oksitlenmiş CNT'nin karboksil grupları arasında reaksiyon	Huang et al., 2003
2-Aminoetil-18-crown-6 eter	Crown eterin amino grupları ile oksitlenmiş CNT'nin karboksil grupları arasında reaksiyon	Kahn et al., 2002
Glukozamin	Glukozaminin amino grupları ile oksitlenmiş CNT'nin karboksil grupları arasında reaksiyon	Pompeo and Resasco, 2002
3-aminopropiltrietoksisilan	3-aminopropiltrietoksisilan ile CNT iletken bir ağ oluşturur	Yao et al., 2000
Daimin uçlu oligomerik poli(etilen glikol), poli(propiyoniletilenimin-co-etilenimin) ve poli(vinil alkol)	Polimerin amino (ya da hidroksi) grupları ile oksitlenmiş CNT'nin karboksil grupları arasında reaksiyon	Fernando et al., 2004
Tris-trifenilfosfin rodyum (I) klorür ($RhCl(pph_3)_3$- Wilkinsons's bileşiği)	Nanotüplerin oksijen atomları sayısının artmasıyla Rh atomları etrafında hekzakordinat yapısının oluşumu	Banerjee and Wong, 2002
Poli(propiyoniletilenmimin-co-etilenimin)	Polimerin imido grupları ve oksitlenmiş CNT'nin karboksil grupları arasında sonikasyonla gerçekleştirilen reaksiyon	Huang et al., 2002

1.2.1.3 CNT uygulamaları

CNTler keşfedildikten sonra, alışılmışın dışındaki özellikleri nedeniyle birçok çalışma alanı için umut verici olmuştur. CNTler nanoteknolojinin etkilediği mühendislik, biyoloji, kimya, tıp, elektronik ve malzeme bilimlerini kapsayan birçok alanda önemli rol oynar. CNTlerin alan emisyon sistemleri, katalizör destek materyali (Planeix et al., 1994), elektronik sistemler (Saito 1997), meteoroloji, biyomedikal ve kimyasal sistemlerde nanoprob (Dai et al., 1996), pillerde anot, lityum ve hidrojen depolama (Ajayan and Zhou, 2001), (Journet et al., 1997), nano boyutlu transistörler, işletimciler, yakıt hücreleri (Planeix et al.,

1994; Yao et al., 2004), gaz sensörleri, taramalı mikroskoplarda algılayıcı uç olarak ya da kompozit materyaller için bileşen olarak kullanımları artan bir şekilde ilgi görmektedir (Merkoçi et al., 2005a; Wang et al., 2003). CNTlerin hidrofobik yüzeyleri bazı bileşiklere karşı yüksek soğurum gösterir, örneğin küçük gaz moleküllerinin SWCNT yüzeyinde adsorblandığı belirtilmiştir. Yayınlanan çalışmalarda eser elementlerin ön deriştirilmesinde CNTlerin kullanımı örneklendirilmiştir. Çevre korumasında dioksin gibi bileşiklerin uzaklaştrılması için CNTlerin sorbent özelliği olduğu bulunmuştur. CNTler aynı zamanda Pb^{2+}, Cd^{2+}, Cu^{2+} gibi iyonların sulu ortamlardan uzaklaştırılmasında da kullanılmıştır (Trojanowicz, 2006). Ayrıca çok yeni olan bir uygulamada karbon nanotüpler bazı katalizörler varlığında yüksek basınç ve sıcaklıkta elmasa dönüştürülmüştür (Wang ve Cao, 2001). En önemli uygulamalardan bir tanesi de ultraduyarlı sistemler, ilaç taşınımı ve fonksiyonel nanosistemlerin oluşturulması için biyomoleküllerle nanotüplerin kombine edilmesidir. Birçok bileşiğin daha düşük potansiyelde elektrokimyasal tayinini kolaylaştırması CNTleri özellikle medikal uygulamalar için elektrokimyasal biyosensörlerin hazırlanmasında ideal materyal haline getirmektedir (Tkac and Ruzgas, 2006).

CNT temelli biyosensörler

CNTlerin analitik sistemlerdeki uygulamalarına bakıldığında, büyük çoğunluğu gaz sensörleri, voltammetrik uygulamalar ve biyosensörler oluşturur (Trojanowicz, 2006).

Son günlerdeki çalışmalarda CNTlerin önemli biyomoleküllerin elektrokimyasal reaktifliğini ve proteinlerin (redoks merkezin iç kısımlarda gömülü olduğu glikoproteinlerde) elektron tarnsfer reaksiyonlarını zenginleştirdiği yayınlanmıştır. Elektrokimyasal reaktiflikleri yanında CNT ile modifiye elektrotlar önemli biyomolekülleri (örneğin; nükleik asitler) immobilize etmek ve yüzey bozunmasını azaltmak (NADH oksidasyon prosesi) açısından kullanışlıdır. Bu özellikler CNTleri, amperometrik enzim elektrotlarından DNA hibridizasyon biyosensörlerine kadar geniş bir aralıkta kullanışlı hale getirmektedir (Wang, 2005a).

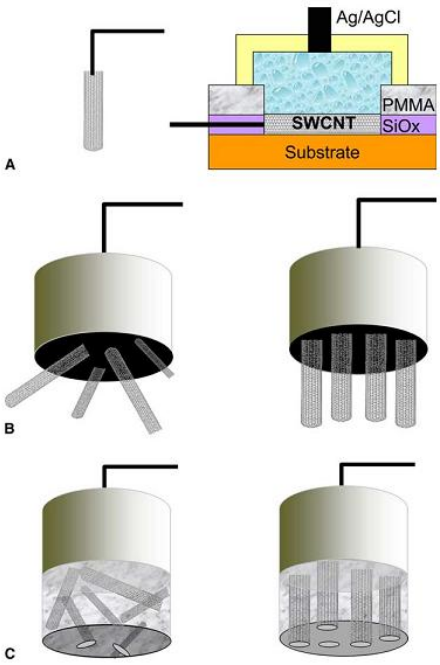
Genelde amperometrik ya da voltametrik analizler için camımsı karbon veya metal elektrotlar (Au, Pt ya da Cu) kullanılmaktadır. Bu elektrotlar düşük duyarlılık ve stabilite, düşük tekrar üretilebilirlik, uzun cevap süresi ve elektron transfer reaksiyonları için yüksek potansiyellerde kullanılmaları gerektiği için

dezavantajlıdırlar (Balasubramanian and Burghard, 2006). Karbon, yüksek elektrot cevapları elde etmek için çeşitli kimyasal ve elektrokimyasal yöntemlerle modifikasyona uygundur. Karbon elektrotları karbon oksidasyonunun yavaş kinetiğinden dolayı özellikle pozitif yönde geniş bir potansiyel aralığında kullanılabilir (Lin et al., 2004b). CNTler hızlı elektron transferi ve yüzey bozunmasına karşı dayanıklı olmaları nedeniyle daha avantajlıdır (Balasubramanian and Burghard, 2006). Ayrıca aktivite kaybı olmadan protein immobilizasyonuna olanak sağlamaları, duyarlılığı artırmaları ve minyatürizasyon için uygun olmaları CNTlerin diğer avantajlarıdır (Paradise and Goswami, 2007). Elektrokimyasal dedeksiyonlar için CNT'ler çeşitli konfigürasyonlarda elektrot sistemlerine entegre edilebilir. Başlıca formatlar şu şekilde gruplandırılabilir (Şekil 1.10):

- Bireysel CNT konfigürasyonları,

- Yönlendirilmiş ya da yönlendirilmemiş formdaki CNTlerle geleneksel elektrotların modifiye edilmesi,

- CNT kompozitleri oluşumu için polimer matrikste entegrasyondur (Merkoçi et al., 2005a).

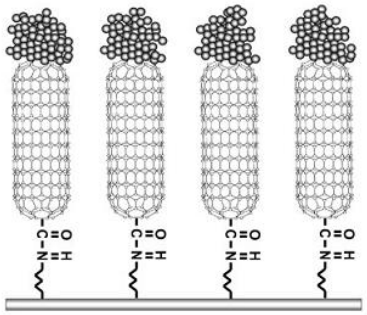


Şekil 1.10. CNTlerin biyosensörlerde uygulanma formları.

A) Bireysel CNT konfigürasyonları; CNTler kendilerine has üstün özellikleri nedeniyle nanoprob olarak kullanılmaktadır. Yüksek çözünürlükte görüntüleme, nanolitografi, nanoelektrotlar, ilaç taşınımı, sensörler ve alan emisyon sistemleri gibi birçok alanda nanoprob olarak rol oynar. Elektrokimyasal nanoelektrot olarak SWCNT kullanımı Dekker at el. tarafından gerçekleştirilmiştir. SWCNTler nanolitografi tekniğiyle düzenlenmiş ve sulu çözeltide döngüsel voltammetri işlemi uygulanmıştır (Merkoçi et al., 2005a). Aynı zamanda taramalı tünel mikroskobu (STM), atomik güç mikroskobu (AFM), elektrostatik güç mikroskobu gibi mikroskoplarda algılayıcı uçlara CNT bağlanarak, görüntüleme ve elektrokimyasal ölçümler yapılmıştır (Paradise and Goswami, 2007) (Lee, 2006).

B) Elektrot yüzeylerinin modifikasyonunda CNTler; CNTler yönlendirilmiş ya da yönlendirilmemiş şekilde çeşitli elektrotların yüzeylerinin modifikasyonunda kullanılmıştır, camımsı karbon elektrotlar en fazla kullanılan elektrottur (Deo, and Wang, 2004b).

Yönlendirilmiş olarak CNT ile modifikasyonları elektrodun yüzeyine CNTlerin bir tabaka şeklinde biriktirilmesi ile gerçekleştirilebilmiştir (Şekil 1.11). Bu şekilde yerleştirilen CNTler elektrot yüzeyi ve redoks enzimi arasında elektriksel iletimi sağlayan moleküler kablolar olarak görev yapar. Enzimin prostetik grubu ve elektrot yüzeyi arasında bu şekilde direkt elektron transferi redoks medyatörlerine gereksinimi azaltır ve reaktifsiz sensör sistemlerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu şekilde hazırlanan "CNT ormanlarının" spesifik biyosensör uygulamaları mevcuttur.



Şekil 1.11. Moleküler kablolar olarak görev yapan CNTlerin dikey olarak yönlendirilmesi ile "nanoorman" yapılar [Wang, 2005a].

MWCNTlerin açık ucu grafit elektrotlara benzer hızlı bir elektron transfer hızına sahipken SWCNTler çok yavaş elektron transfer hızına ve düşük

kapasitansa sahiptir. Bu düşünceleri temel alan Li et al. elektrodun yapısı ve yöneliminin elektrokimyasal özellikleri için kritik bir nokta olduğuna inanmaktadır. Bu nedenle, Si-mikrofabikasyon tekniği ile uyumlu olan "bottom-up" yaklaşımını kullanmıştır. CNT oluşturulmasında kullanılan katalitik teknikler ile mikrolitografi ve nanolitografiyi birleştirmiştir. Plazma ile zenginleştirilmiş CVD yöntemini kullanarak orman benzeri dikey bir düzenleme ile yönlendirilmiş MWCNT arraylarini Ni-katalizli film üzerinde hazırlamıştır. Yönlendirilmiş CNT arraylerinin elektriksel ve elektrokimyasal özellikleri küçük redoks molekülleri için karakterize edilmiştir (döngüsel voltammetri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile), bunların yarı dönüşümlü nanoelektrot özelliği gösterdikleri ve ultra duyarlı bir dedeksiyon temeline dayandıkları bulunmuştur. Palleschi et al. SWCNT tabakaları ile homojen bir şekilde kaplanmış tungsten mikroelektrotların fabrikasyonunu gerçekleştirmiştir.

CNT ile yönlendirilmemiş elektrot modifikasyonlarına bakıldığında ise, en çok geleneksel camımsı karbon elektrotların yüzeylerinin modikasyonu ile karşılaşılmaktadır. CNTlerin ilk kullanımı sülfürik asitte disperse edilen CNT ile camımsı karbon elektrotların yüzeyinin modifiye edilmesidir. CNTlerin asitlerle muamelesi uçta ve yan duvarlarda oksijen içeren çeşitli grupların (özellikle karboksil grupları) oluşumunu sağlar ve böyle su gibi polar çözgenlerde çözünürlükleri artar. Ayrıca hedeflenen bir molekülün bağlanmasıyla biyouyumlulukları artırılabilir (Balasubramanian and Burghard, 2006). Karboksil gruplarının varlığının MWCNTler arasındaki van der Waals etkileşimlerinin bozulmasına neden olduğu savunulmaktadır. MWCNT demetlerinin ayrılmalarını kolaylaştırır (Tsai et al., 2006). Ayrıca camımsı karbon elektrotların yüzeyleri dimetilformamid, konsantre nitrik asit ve nafyon/su içinde hazırlanmış CNTlerle modifiye edilmiştir.

Yao et al. çalışmalarında camımsı karbon elektrotları su içinde dispersiyonu yapılmış CNT ile modifiye ederek $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ için elektroaktiviteyi izlemiştir. SWCNT ile modifiye elektrotlarla MWCNT ile modifiye olanlar karşılaştırıldığında; SWCNT ile hazırlananların ve daha küçük çaplı MWCNT ile hazırlananların elektron transfer özelliklerinin daha iyi olduğu bulunmuştur. Ayrıca aynı çapa ancak farklı uzunluğa sahip MWCNTler ile yaptıkları çalışmada CNTlerin uzunluğunun elektron özelliklerinde etkili olmadığını bulmuşlardır (Yao and Shiu, 2007)

C) Pasta ve kompozitler; Karbon pasta (CP) ve kompozit elektrotlar uzun yıllardır elektrokimyasal sensörlerde kullanılmaktadır. Elektrokimyasal sensörler alanında son yıllarda CNT içeren benzer matrikslere odaklanılmıştır. Polimer matriks içinde yer alan CNTler yönlendirilmiş ya da kendiliğinden oluşmuş düzensiz bir yönelim gösterebilir. CNT pasta ve kompozitlerini hazırlamak için çeşitli bağlayıcılar (mineral yağı, bromoform, teflon ya da epoksi reçineler) yayınlanmıştır (Merkoçi et al., 2005a; Balasubramanian and Burghard, 2006).

Mineral yağı; 1958'de Adams'in yayınladığı çalışmadan sonra karbon kompozit elektrotlar ilgi çekici olmuştur. Bunların arasında grafit tozu ve mineral yağı ile hazırlananlar en iyi bilinenlerdir (Rubianes and Rivas, 2003). CNT pasta elektrotlar da mineral yağı ile CNTlerin karışımı sonrasında hazırlanabilmektedir. CNTlerin geniş yüzey alanları ve üstün özellikleri oldukça stabil ve sağlam elektrotların hazırlanmasına olanak tanımaktadır. CNT pasta elektrotların geniş potansiyel aralığı ve düşük zemin akımı gösterdikleri yayınlanmıştır (Rubianes and Rivas, 2003). CNT pasta elektrotların (CNTPE) ferisiyanür, sodyum hekzakloroiridat (III) hidrat, kateşol, dopamin, serotonin 5-HT ve kafeik asit, askorbik asit, ürik asit için elektrokimyası incelenmiştir (Merkoçi et al., 2005a; Rubianes and Rivas, 2003).

Teflon; CNT/teflon kompozit elektrotları belirli miktarda CNT ile granüler teflonun kuru halde karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Oluşturulan kompozit elektrotla, peroksit ve NADH için 0,6 ve 0,5 V'dan daha düşük potansiyellerde redoks aktivitesi gözlemlenmiştitr. Kontrol olarak hazırlanan grafit/teflon elektrot sinyalleri daha yüksek potansiyellerde çok düşük olarak görülmüştür.

Rijit epoksi kompozitler; CNT ile hazırlanan yeni bir kompozit CNT epoksi (CNTEC) elektrotlardır. Epoksi reçine ve katılaştırıcı 20:3 (w/w) oranında karıştırılmıştır. CNTEC elektrotları 0,5–2 ve 0,5–200 μm uzunluklardaki farklı MWCNT kullanılarak üretilmiştir. Elektrokimyasal geri dönüşüm ve duyarlılık çalışmaları sonrasında % 20 (w/w) oranında CNT kullanılmasının optimum kompozisyon olduğuna karar verilmiştir. Polimer matrikste CNTlerin iyi bir şekilde dispersiyonu ile yüzeyde sünger benzeri topografinin oluştuğu SEM mikrografikleri ile ispatlanmıştır. CNTEC elektrotların özellikleri geleneksel grafit epoksi kompozit (GEC) ile kıyaslanmıştır. Uzun MWCNT (0,5–200 μM) temelli epoksi kompozit elektrotlar NADH ve hidrojen perokside karşı güçlü

elektrokatalitik aktivite gösterirken kısa MWCNT (0,5–2 μM) temel alan epoksi kompozit elektrotlar hem NADH hem de H_2O_2 için GEC elektrotlarına benzer oksidasyon potansiyeli göstermişlerdir. Her iki durumda da, CNTEC elektrotlar GEC elektrotlara nazaran daha iyi bir geri dönüşüm, pik şekli, duyarlılık ve stabilite göstermişlerdir (Merkoçi et al., 2005a; Pumera et al., 2006).

Aynı zamanda, CNTler polianilin (Tsai et al., 2006) ve polipirol gibi iletken polimerlerle beraber kullanılarak hidrojen peroksit (Luo et al., 2006), tayinine yönelik elektrokimyasal biyosensörler hazırlanmıştır ve biyosensör cevaplarında olumlu bir artış olduğu yayınlanmıştır.

CNT ve biyolojik moleküllerin beraber kullanımları

Enzimler; Biyosensör dizaynında temel amaçlardan bir tanesi enzimin aktif merkezi ve elektrokimyasal transdüser arasında hızlı bir elektron transferinin gerçekleştirilmesidir. Sistemlerin minyatürizasyonu düşünüldüğünde, enzim temelli biyosensörler için bunun anlamı büyüktür. Yayınlanan çalışmalara bakıldığında temel olarak söylenen CNT ile modifiye olmayan elektrotlara kıyasla CNT ile modifiye edilmiş elektrotların daha düşük potansiyellerde elektron transfer reaksiyonlarını artırdığı ve sensörlerdeki yüzey bozunmasını minimize ettiğidir. Bu avantaj CNT temelli biyosensörlere olan ilgiyi artırmıştır (Balasubramanian and Burghard, 2006; Merkoçi et al., 2005a).

Enzim elektrotları elektrokimyasal cihazların analitik gücü ile enzimlerin spesifikliğini bir araya getiren sistemlerdir, özellikle klinik tanı ve çevresel analizler için uygundurlar. H_2O_2 ve NADH'ın oksidasyonu sırasında yüzeyin minimum bozunmasıyla NADH'ın düşük potansiyelde etkili bir şekilde dedeksiyonu CNTleri oksidaz ve dehidrogenaz temelli enzim elektrotları için ilginç hale getirmektedir. 200'den fazla dehidrogenaz ve 100'den fazla oksidaz enzimi bulunmaktadır. Bu enzimlerin çoğu klinik olarak önemli analitlerin (örneğin; glukoz, laktat, kolesterol, amino asit, ürat, pirüvat, glutamat alkol, hidroksibütirat vb.) reaksiyonunu spesifik olarak katalizler. Reaksiyon sonrası NADH ya da hidrojen peroksit gibi elektrokimyasal olarak analizlenebilen ürünler oluşur. Tirozinaz, peroksidaz, organofosfor hidrolaz ve alkalin fosfataz içeren enzimleri temel alan biyoelektrokimyasal biyosensörler için benzer duyarlılık ve stabilitede olumlu etkiler elde edilmiştir (Wang, 2005a).

Glukoz, diyabet hastalığının tanısında ve fermantasyon teknolojisinde önemli bir molekül olduğu için enzim-CNT elektrotları ile tayini en fazla gerçekleştirilen analittir (Wang et al., 2003a). Birçok strateji glukoz tayinine yönelik enzimlerin immobilizasyonu için kullanılmaktadır. Glukoz oksidaz (GOx) CNT üzerinde polipirol vasıtasıyla immobilize edilirken bir diğer çalışmada ise glukoz dehidrogenaz (GDH) kovalent olarak CHIT-CNT filmi ve glutataraldehid (GDI) ile immobilize edilmiştir. CHIT-CNT-GDI-GDH ile GC elektrotları modifiye edilmiştir, glukoz tayini fizyolojik matrikslerde girişim olmadan stabil ve duyarlı bir şekilde tamamlanmıştır.

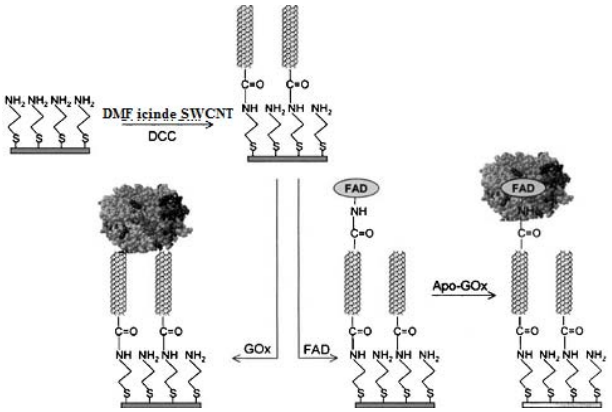
Biyosensörler ve biyoyakıt hücrelerinin tasarlanmasında redoks enzimlerinin kullanımını sınırlayan en önemli etmenlerden biri elektrot materyali ve redoks proteini arasında direk elektriksel bağlantının olmayışıdır. Bunu aşmak için difüzlenebilen elektron materyallerinin kullanımı, proteinlerin redoks reaksiyonlarını kolaylaştıran redoks taşıyıcıların bağlanması ve elektroaktif polimerlerde redoks proteinlerinin immobilzasyonu gibi uygulamalar yapılmıştır. Son zamanlarda proteinden kofaktör ekstrakte edilmekte ve elektrot yüzeyine redoks özelliği zenginleştirilerek immobilize edilmekte, daha sonra apoenzim tekrar kofaktöre bağlanmaktadır. Bu şekilde ilgili enzimlerin biyoelektrokatalitik aktivasyonu artırılmış olmaktadır (Willner et al., 2007). Buna örnek olarak verilebilecek bir çalışmada enzimin redoks aktif bölgesindeki flavin adenin dinükleotid (FAD) ile transdüser arasında hızlı bir direkt elektron transferi gerçekleştirmek için CNT ile modifiye edilmiş altın elektrotlar kullanılmıştır. Altın elektrotların yüzeyi kendiliğinden oluşan tek tabaka metodu temel alınarak sisteamin ile modifiye edilmiştir. Daha sonra kısa MWCNT elektrot yüzeyine sıralanmıştır. CNTler elektrot yüzeyine iki farklı şekilde yerleştirilmiştir (Liu and Lin, 2006):

- Doğal GOx nanotüplerin ucuna kovalent olarak tutturularak FAD ile yakın olacak şekilde yerleştirilmiş ve direkt elektron transferi 0,3/s hız sabiti ile sağlanmıştır.

- FAD nanotüplerin ucuna ve enzim ise immobilize FAD etrafında yerleştirilmiştir. Bu uygulama 9/s hız sabiti ile daha etkili bir elektron transferine neden olmuştur (Şekil 1.12).

Asetilkolin esterazı (AChE) temel alan CNT-modifiye elektrotlarla tiyokolin tayin edilmiştir (Liu et al., 2005a). CNT temelli biyosensörlerin bir diğer

uygulamasında peroksidaz (HRP) SWCNTlere kovalent olarak bağlanmıştır. Alkoksi silan sol-jel prosesi ile L-aminoasit oksidazlar immobilizasyonu yayınlanan bir diğer çalışmadır. Sol-jel prosesi ile üreaz ve asetilkolin esteraz enzimlerinin immobilizasyonu gerçekleştirilip CNT ile modifiye sistemlerle elektrokimyasal mekanizmaları incelenmiştir. Tirozinaz, organofosfor hidrolaz, kolesterol oksidaz (Li et al., 2005) ve aflatoksin B1'in öncül maddesi olan sterigmatosistinin tayini için aflatoksin–detoksifizem (Yao et al., 2006), laktat oksidaz ve alkol dehidrogenaz (Rubianes and Rivas, 2005), lakkaz (Liu et al., 2006a), kolin oksidaz (Song et al., 2006) enzimleri CNT modifiye elektrotlarla kombine edilen diğer enzimlerdir (Balasubramanian and Burghard, 2006).



Şekil 1.12. Glukoz oksidaz biyosensörünün CNT ile modifikasyonu.

DNA; DNA immobilizasyonu için yeni bir platform olarak CNTlerin kullanımı çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmektedir. Aminlenmiş ya da karboksillenmiş DNA oligonükleotidleri, karboksillenmiş ya da aminlenmiş SWCNT-çok tabakalı filmleri ile kovalent olarak bağlanmıştır. Oluşan DNA-fonksiyonelleştirilmiş SWCNT çok tabakalı filmleri, DNA hibridizasyon koşullarında mükemmel spesifiklik ve kimyasal stabilite göstermiştir. Bu modifiye tabakalar hassas DNA hibridizasyon sensörleri geliştirilmesinde yeni bir yöntem oluşturmuştur.

Fonksiyonelleştirilmiş MWCNT-COOH DNA probunun kovalent immobilizasyonu için kullanılmıştır ve sekansa spesifik DNA dedeksiyonunun duyarlılığını artırmıştır. Elektroaktif daunomisin elektrokimyasal DNA sensöründe marker (interkalatör) olarak kullanılmıştır. Karbon elektrotlara direkt olarak oligonükleotidlerin bağlanmasıyla oluşturulan diğer DNA sensörleri ile kıyaslandığında, MWCNT-COOH temel alan bu deneme elektrot ve redoks aktif daunomisin arasındaki heterojen elektron transferini artırmıştır (Lin et al., 2004a).

CNTler tanıma ve transdüksiyonun her ikisinde çiftli amplifikasyon rolü oynayabilirler. Bu durum yüksek duyarlılıkta DNA dedeksiyonunu gösterir, CNTler çeşitli enzimlerle işaretlenebilir ve hibridizasyonun dedeksiyonu için DNA işaretleyici olarak kullanılabilirler. Enzimle işaretlemelerin yanında DNA sinyalini zenginleştiren enzimatik reaksiyon ürünleri biriktirilerek yapılabilir. CNTlerin yeni bir destek ve ön deriştirme fonksiyonları bunların büyük spesifik yüzey alanlarından kaynaklanır ve alkalen fosfataz (ALP) enzimi ile örneklenebilir (Wang et al., 2004a). Birçok CNT türevli amplifikasyon prosesi elektriksel DNA dedeksiyonu için daha düşük dedeksiyon limitine neden olmuştur. Aynı etki kuantum noktaların elektroaktif işaretleyici olarak kullanıldığı DNA hibridizasyon dedeksiyonunda görülmüştür.

Proteinler; DNA için kullanılan strateji proteinlerin dedeksiyonuna da uygulanabilir. CNTler enzim moleküllerini bağlamak için ve aynı zamanda komple sandviç dedeksiyon şeması ile enzimatik reaksiyondan gelen ürünleri biriktirmek için kullanılabilir. Wohlstadter ve ark. biyotinlenmiş anti-alfa feto protein (AFP) antibodilerini, (poli(etilen)-vinil asetatın bağlayıcı olarak kullanıldığı streptavidin kaplı CNT kompozitlerinin yüzeyine immobilize etmiştir ve AFP ve koloidal altın-$Ru(bpy)_3^{2+}$ ile konjuge anti-AFP antibodilerini içeren örnekle bu türevlendirilmiş kompozit muamele edilmiştir. Sandviç immunoassay biyospesifiktir ve bu veriler SEM ve elektrokimyasal lüminesans (ECL) ölçümleri ile kanıtlanmıştır. Bu çalışma CNTlerin immobilizasyon platformu ve aynı zamanda çalışma elektrodu olarak kullanılabileceğini gösteren bir örnektir.

1.2.2 Altın nanopartiküller (AuNP)

Nanobiyoteknolojideki son gelişmeler biyoelektronik uygulamalar için biyomolekül-nanopartikül (NP) hibrid sistemlerinin kullanımını hedef almaktadır. Biyomoleküllerin nanoboyutlu materyallerle entegre edilmesi ile elde edilen hibrid materyaller biyomateryalin tanıma ve katalitik özellikleri yanında nanomateryalin elektronik, optik ve katalitik özelliğini de taşır (Willner et al., 2007). Gümüş (Ag), altın (Au), platin (Pt), bakır (Cu) ve paladyum (Pd) metal nanopartikülleri son yıllarda ilgi çeken önemli nanomateryallerdir (Du et al., 2006; Male et al., 2004; Yang et al., 2006; Huang et al., 2004). Metal nanopartiküller genellikle 1 ile 50 nm arasında boyutlara ve bunların aglomerilizasyonunu önleyen kabuk kısmına sahiptir. Küçük boyutlarından dolayı metallerden daha farklı fiziksel, elektronik ve kimyasal özellikleri vardır. Özellikleri partikülü oluşturan atomların sayısı ve tipine bağlı olarak değişir.

Nanopartiküllerin sentezi ve özellikleri üzerine oldukça fazla çalışma yayınlanmıştır. Tipik olarak bu partiküller bir stabilizatör varlığında (sitrat ya da tiyol gibi reaktifler) ilgili geçiş metal tuzunun kimyasal indirgenmesiyle hazırlanır. Stabilize edici ajan yüksek dayanıklılık sağlamak ve bağlanma kimyasını zenginleştirmek amacıyla yüzeylere bağlanır, istenilen özellikte yük ve çözünürlüğü sağlar (Wang, 2005b).

Nanopartiküller biyosensörlerde çeşitli uygulamalara sahiptir. Örneğin fonksiyonel nanopartiküller biyolojik moleküllere (peptid, protein ve nükleik asitler) bağlanır ve çeşitli sistmlerde sinyalin amplifikasyonu için kullanılır (Jianrong et al., 2004).

Metallerin nanoboyutlu partikülleri özellikle altın nanopartiküller (AuNP) üstün elektronik, optik ve termal özellikleri yanında katalitik özellikleri ile fizik, kimya, biyoloji, tıp ve materyal bilimlerindeki uygulama alanı bulmaktadır. Bu nedenle AuNP sentezi ve karakterizasyonunun önemi gün geçtikçe artmaktadır. Bilindiği gibi, AuNP sentezi organik fazda, sulu fazda ya da iki fazda altın tuzlarının kimyasal indirgenmesi ile gerçekleştirilir. Ancak yüksek yüzey enerjisi AuNPleri çok reaktif hale getirir ve yüzeyin koruması ya da pasivasyonu yapılmazsa agregasyon gerçekleşir. Bu nedenle agregasyon ya da presipitasyonu önlemek nedeniyle bazı reaktifler kullanılır. AuNP sentezinde kullanılan stabilizatörlere bakıldığında özellikle sitrat, tiyol ile fonksiyonelleştirilmiş organikler ve polimerik matriksler karşımıza çıkmaktadır. Biyoteknolojideki gelişmelerle birlikte biyokonjugat (AuNPlere bağlı bazı biyomoleküllerin kullanımı) araştırmalarına verilen önem artmaktadır çünkü hibrid biyomateryaller AuNPler tarafından sağlanan özelliklere sahiptir. Biyomoleküllerin AuNP ile fonksiyonelleştirilmesi ve stabilizasyonu, bioanaliz, biyogörüntüleme ve biyosensör geliştirilmesi gibi alanlarda önem taşımaktadır. AuNP'lerin biyomoleküller ile sulu ortamda sentezi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. R-aminoizobütirik asidi temel alan tiyollenmiş peptidler ve polipeptid (poli (γ-benzil-L-glutamat)) ile kaplanmış AuNP'ler peptitlerin kullanıldığı yöntemlere örnek olarak verilebilir. Bunlara ek olarak bazı lipid ve sentetik lipidler örneğin fosfolipid, didodesildimetilamonyum bromür (DDAB), setiltrimetil amonyum bromür (CTAB), tetraoktamonyum (TAO) AuNP sentezinde kullanılmıştır. Diğer bir ilginç uygulama ise mikroorganizmaların kullanıldığı yöntemlerdir. Ekstremofil A*ctinomycete, E. coli DH5a* ve virüsler direkt olarak nanopartikül sentezinde kullanılmıştır. Bunların dışında dopamin

hidroklorür, N-izobütiril-L-sistein ya da N-izobütiril-D-sistein gibi küçük moleküller de bu amaca hizmet etmektedir (Guo and Wang, 2007).

Son yıllardaki çalışmalarda "yeşil kimya" konusuna artan bir ilgi olduğu görülmektedir. Bunu gerçekleştirmek için toksik olmayan çevreyle dost ve yenilenebilir kimyasallar kullanılmaktadır. Atık eliminasyonu ya da minimizasyonu yolunda çalışmalar yapılmaktadır. Bu srateji AuNP sentezi amacıyla da kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda kitosan ve sükroz gibi karbohidratlar indirgeyici/stabilize edici ajan olarak kullanılmıştır (Guo and Wang, 2007).

AuNP sentezi için kullanılan ajanların bir diğer grubu ise polimerlerdir. Çünkü homopolimerin ya da blok kopolimerin az bir konsantrasyonu ile sitrat gibi bilinen ajanlarla hazırlananlara göre çok daha stabil nanopartiküller sentezlemek mümkündür (Guo and Wang, 2007). Poliamfolit (Note et al., 2007), çok dallanmaya sahip olan polimerler (Wan et al., 2006), lineer polimerler (Teranishi etal., 1998), π-konjuge polimerler (Herrikhuyzen et al., 2006), amfifilik polimerler (Jewrajka and Chatterjee, 2006), sıcaklık duyar (Kim and Lee, 2004) ve pH duyar polimerler (Zheng et al., 2006) gibi fonksiyonel polimerler bu amaçla kullanılmışlardır. Poli(metakrilik asit) ile fonksiyonelleştirilmiş suda çözünen alkil tiyoeter (Hussain et al., 2005), poli(etilen glikol)-b-poli(4-vinilpiridin)-b-poli(N-izopropilakrilamid) (PEG_{110}-b-$P4VP_{35}$-b-$PNIPAM_{22}$) (Zheng et al., 2006), poli(etilenimin) (Sun et al., 2004), poli(diallil dimetilamonyum) klorür (Chen et al., 2006a) polimer ile stabilize edilen AuNP sentezine örnek olarak verilebilir. Lineer polimerlere ek olarak dendrimerlerle gerçekleştirilen AuNP sentezi son günlerdeki ilgi çekici çalışmalardandır. Poli(amidoamin) (PAMAM) (Garcia et al., 1999) ve poli(propilenimin) (PPI) dendrimerleri (Sun et al., 2003) AuNP sentezinde stabilize edici ajan olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

AuNPler iyi bir biyouyumluluğa sahip olmaları ve kendilerine özgü yapısal, elektronik, optik ve katalitik özelliklerinden dolayı biyosensörler, kimyasal sensörler ve elektrokatalizörler için ilgi çekici materyaller olmuştur. Son yıllarda bioassay, biyosensör, kimyasal sensör hazırlanması gibi çalışmalarda kullanımları yaygındır (Guo and Wang, 2007). Ayrıca AuNPler biyomoleküllerin biyoaktivitelerini kaybetmeden stabil immobilizasyonlarının gerçekleştirilmesinde önemlidir. Elektrokimyasal enzimatik biyosensörlerde redoks enzim ile elektrot arasındaki direkt elektron transferini sağlarlar ve medyatöre olan ihtiyacı ortadan kaldırmış olurlar. Bir diğer önemli özellikleri de biyokimyasal reaksiyonlar için

anlamı büyük olan H_2O_2, O_2 ve NADH gibi moleküllerin elektrokatalizini zenginleştirmeleridir (Pingarron et al., 2008) (Sedeno and Pingarron, 2005). Sitokrom c (Brown et al., 1996), turp peroksidazı (Jia et al., 2002), glukoz oksidaz (Lan et al., 2008), hemoglobin (Gu et al., 2001), miyoglobin (Liu and Ju, 2003), ksantin oksidaz (Agui et al., 2006; Cubukcu et al., 2007), L-laktat dehidrogenaz (Jena and Raj, 2007), alkol dehidrogenaz (Liu et al., 2003), tirozinaz (Liu et al., 2006b), asetilkolin esteraz (Shulga and Kirchhoff, 2007) ve piranoz oksidaz (Ozdemir et al., 2010) ile hazırlanan enzimatik biyosensörlerde AuNPin sensör cevabına etkileri incelendiğinde çeşitli potansiyellerde alınan ölçümler sonrasında akım değerlerinin arttığı gözlemlenmektedir.

Enzimatik biyosensörlerin dışında genosensörlerde de AuNP kullanımına yönelik çalışmalar oldukça fazladır. AuNP temelli DNA sensörleri ile yapılan ölçümlerde farklı stratejiler kullanılmaktadır ve bunlar kısaca özetlenecek olursa şöyle bir sınıflandırma yapılabilir (Şekil 1.13):

A) Asitle çözme sonucu salınan altın iyonlarının dedeksiyonu yoluyla AuNP'in elektrokimyasal dedeksiyonu,

B) Geleneksel genosensörün yüzeyine takılan AuNPlerin direk dedeksiyonu (sıyırma voltammetrisi temelli),

C) Kondüktometrik tekniklerin kullanımıyla gümüşle zenginleştirme,

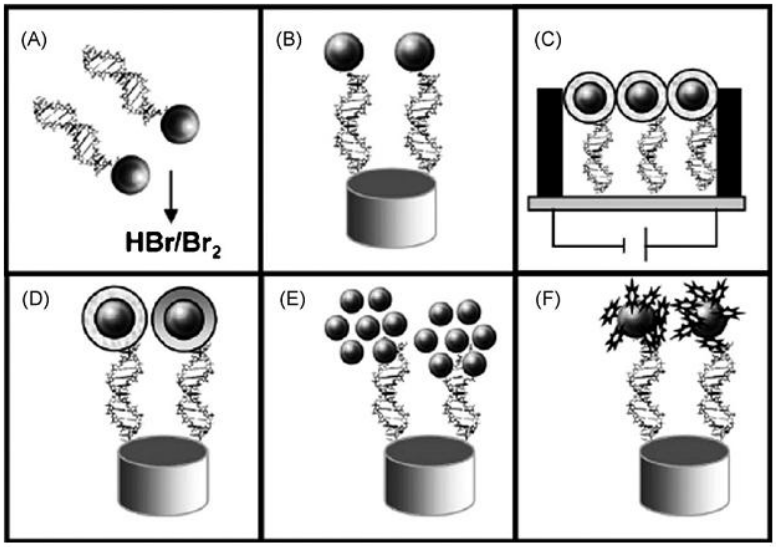
D) Gümüş ya da altın kullanılarak geleneksel genosensörün yüzeyine takılan AuNPlerin zenginleştirilmesi,

E) Diğer AuNP için AuNPlerin taşıyıcı olması,

F) Diğer elektroaktif işaretleyiciler için AuNPlerin taşıyıcı olarak kullanılmasıdır.

DNA biyosensörleri hazırlarken tek zincirli DNA (ssDNA) immobilizasyonu çeşitli teknikler geliştirilmiştir. AuNP filmler de ssDNA immobilizasyonu için uygun bir materyal olabilmektedir. AuNPler tek tabaka şeklinde yüzeyde biriktirilirlerse elektrot yüzeyini artırmış olur ve daha fazla ssDNA immobilizasyonu gerçekleştirilebilir. Bakteriler, patojenler virüsler (Cai et al., 2004), transgenik bitkilerden elde edilen besinler (Yang et al., 2007),

mutasyonlar (Ozsoz et al., 2003), genetik hastalıklar, doku uygunluğu ve adli vakalar için önemli olan genler (Kerman et al., 2004) AuNP modifiye elektrotlarla daha duyarlı bir şekilde analizlenebilir.



Şekil 1.13. AuNP temelli DNA sensörlerinin sınıflandırılması [Guo and Wang, 2007].

Biyosensörlerin bir diğer grubunu oluşturan immünosensörlerde de AuNPler yaygın olarak kullanım olanağı bulmuştur. Özellikle elektrokimyasal dedeksiyonu temel alan immünosensörlerde kullanılmaktadır. Örneğin immünoglobulin G (IgG) (Dequaire et al., 2000), insan koriyonik gonadotropin hormonu (hCG) (Chen et al., 2006b), karsinoembriyojenik antijen (CEA) (Tang et al., 2007), hepatit B virüsü (Wang et al., 2004b), difteri toksini (Tang et al., 2005), hepatoselüler karsinoma için tümör marker olarak kullanılan alfafetoprotein (Zhuo et al., 2005), pankreatik, kolorektal, gastrik ve hepatik karsinomalarda en önemli karbohidrat tümör marker olan karbohidrat antijeni 19-9 (Dan et al., 2007), prostat spesifik antijen (Liu, 2008) ve aflatoksin B1 (Liu et al., 2006c) belirlenmesine yönelik çalışmalarda AuNPlerin kullanılması sonucu daha düşük dedeksiyon limitlerine sahip sistemler geliştirilmiştir.

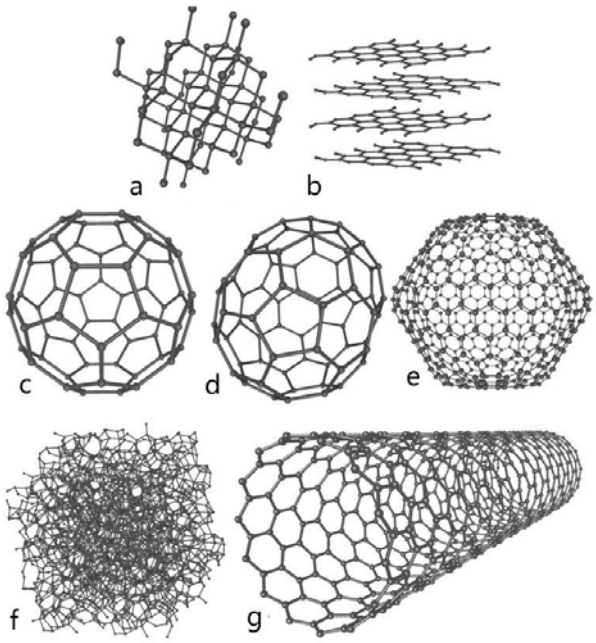
Elektrokimyasal metotlar canlı hücrelerle yapılan çalışmalarda da büyük öneme sahiptir. Elektrot yüzeyinde bulunan hücrelerden elde edilen elektrokimyasal sinyal, ilaçlar ve diğer ekzojen faktörlerin hücre canlılığındaki etkilerini test etmek için kullanılabilmektedir. AuNPler hücreleri immobilize etmek için de kullanışlı olabilmektedir. Pankreatik adenokarsinoma hücreleri (Du et al., 2005) ve lösemi K562 (Yan et al., 2007) hücrelerinin immobilizasyonu için

AuNP ile modifiye sistemler kullanılmıştır ve çeşitli ilaçların bu hücrelere olan etkileri döngüsel volatmmetrik yöntemlerle izlenmiştir.

1.2.3 Fullerenler

Fullerenler 1985 yılında Kroto et al. tarafından keşfedilmiştir, Kroto, Smalley ve Curl bu buluşlarından ötürü 1996'da Nobel ödülünü kazanmışlardır. Fullerenler C_{20+m} sayıdaki karbon atomlarının pentagonal ve hegzagonal düzenlenmesi sonucu oluşturulmuştur. Karbonun grafit ve elmastan sonraki üçüncü allotropik formudur. Fullerenler birçok seri içermelerine rağmen en çok çalışılanlar C_{60} ve C_{70} şeklinde olanlarıdır (Şekil 1.14). C_{60}'ın yarıçapı 10 Å (10^{-10} m) civarındadır (N. Chaniotakis, 2007). C240, C540 ve C720 ise yüksek fullerenler olarak adlandırılırlar (Baena et al., 2002).

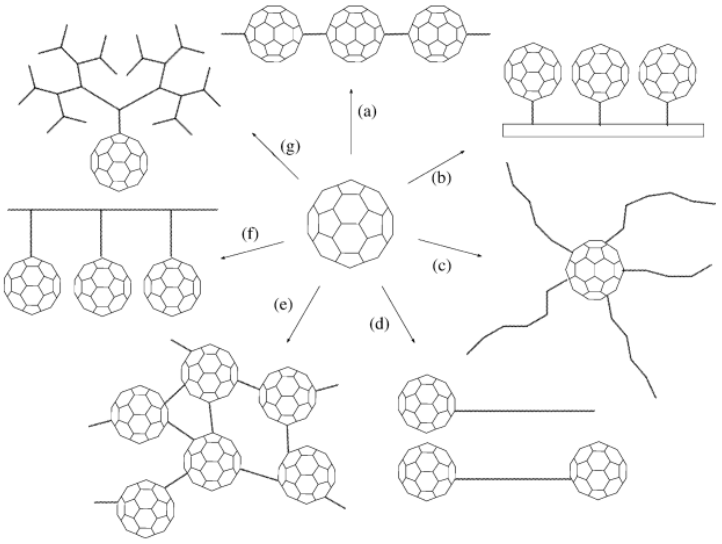
Fullerenlerin sentezinde çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bunların birçoğunun temeli lazer buharlaştırma yöntemidir. Sentezlenen fullerenler basit kromatografik tekniklerle saflaştırılabilir (Chaniotakis, 2007).



Şekil 1.14. Karbonun allotroplarının yapıları: a) Elmas b) Grafit c) C60 Fulleren d) C70 Fulleren e) C540 Fulleren f) Amorf karbon g) SWCNT.

Fullerenler analitik bilimlerde; kromatografik durağan faz, akış sistemlerinde sorbent materyali ya da elektron medyatörü aktivitesinin temel alındığı farklı elektrokimyasal sensörlerde kullanılmıştır (Baena et al., 2002).

Fullerenler çeşitli alanlarındaki uygulamalarında türevlendirilmiştir. Özellikle yapıya polimerler eklenerek yeni özellikler kazandırılmıştır. Polimerlerin eklenmesiyle fullerenler bazı solventlerde çözünür hale getirilebilmiştir. Yan zincir, ana zincir ve yıldız polimerler ile fullerenleri modifiye etmek mümkündür (Şekil 1.15) (Wang et al., 2004c).



Şekil 1.15. Polimerik C60 türevlerinin farklı tipleri: (a) Katı yüzeyde amin zincirli fulleren, (b) Katı yüzeyde fulleren immobilizasyonu, (c) yıldız şekilli fulleren polimerleri, (d) fulleren uçlu polimerler, (e) çapraz bağlanmış polimerik fulleren türevleri, (f) yan zincirinde fulleren bulunan polimerler, (g) fullerodendrimerler [Wang et al., 2004c].

Fullerenler süperiletkenlik çalışmalarında ve güneş enerjisi hücrelerinde kullanılmıştır. Biyolojik uygulamalarına bakıldığında, fizyolojik ortamda düşük çözünürlüklerine rağmen, fullerenler artan bir ilgi görmektedir. Boyutları, hidrofobik olmaları ve elektron kapasiteleri gibi özellikleri biyolojik bilimlerde kullanım için uygundur. Biyolojik uygulamalarda şu amaçlarla kullanılmışlardır:

- DNA-kesim kapasiteleri; fotodinamik terapide ve genetik transkripsiyon çalışmalarında kullanımlarını sağlamıştır.

- HIV proteaz için inhibitör etkisi; C60 boyutu ve şekli sayesinde enzimin yarı küresel hidrofobik cebinin içine girerek etkisini gösterir.

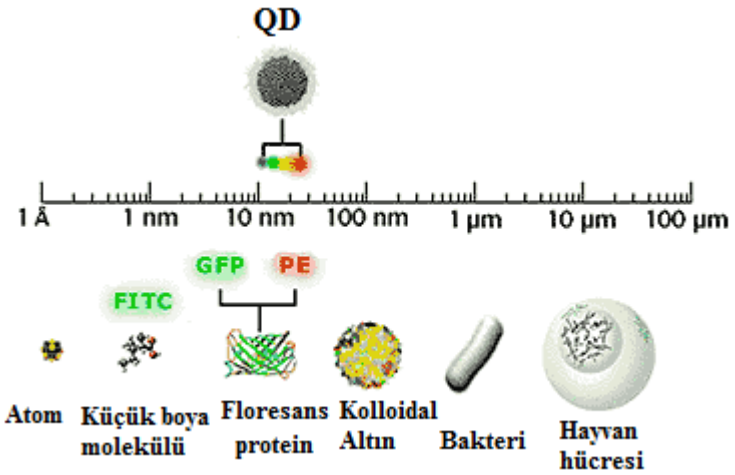
- Fulleren ve türevleri apoptozis ve nörodejeneratif hastalıklara karşı radikal tutucu özellikleriyle kozmetikte, tıpta ve ayrıca bazı uygulamalarda

antibakteriyel ajan olarak kullanılmıştır (Baena et al., 2002; Andrievsky et al., 2005; Ros et al., 2001).

1.2.4 Kuantum noktalar (QD)

Kuantum noktalar (QD), 1–10 nm çapa ve flofor özelliğe sahip, organik ligand tabakasıyla stabilize edilmiş inorganik atomları temel alan yeni bir tür kolloidal semikondüktör nanopartiküllerdir (Galian and Guardia, 2009; Merkoçi et al., 2005b) (Şekil 1.16). QDlar tıp, biyoloji, teknoloji ve son günlerde ise analitik kimya alanlarında kullanım olanağı olan moleküllerdir (Tansil and Gao, 2006). Klasik organik boyalarla kıyaslandığında tercih edilmelerini sağlayan bazı özel fotokimyasal özellikleri şöyle sıralanabilir:

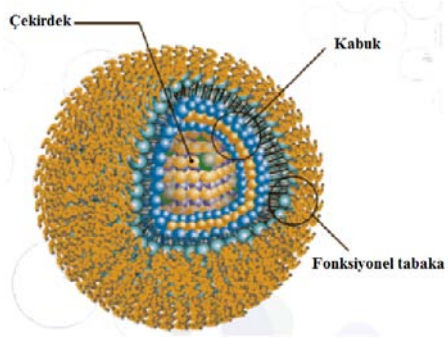
- Geniş absorpsiyon spektrumu,
- Çok dar emisyon spektrumu,
- Uzun floresans yarı ömrü
- Yüksek fotostabilite



Şekil 1.16. Kuantum noktaların büyüklüğü ve diğer bazı yapılarla kıyaslanmaları [Merkoçi et al., 2005b].

Bu özellikler partikül boyutuna ve elektronik durumlarının yoğunluğundan kaynaklanan quantum sınırlamasına bağlıdır. QDlar grup II (alkil metaller, metal oksitler ve organik tuzlar) ve grup IV (Se, S ve Te) kapsamındaki

atomlardan oluşturulur. İnorganik kabuk kısmının eklenmesi ile (örneğin; ZnS) yüksek floresans kuantum verimine sahip çekirdek-kabuk şeklindeki QDlar meydana gelir (Şekil 1.17). Genellikle QDlar organik çözgenlerde çözünebilmelerini sağlayan triositilfosfin oksit (TOPO) ve triostilfosfin (TOP) ligandlarının kullanılmasıyla sentezlenir (Galian and Guardia, 2009).



Şekil 1.17. QD yapısı.

QDların biyouygulamalarda ve analitik kullanımında en önemli şey bunların sudaki çözünürlükleridir, bu amaçla başlıca iki metot kullanılmaktadır:

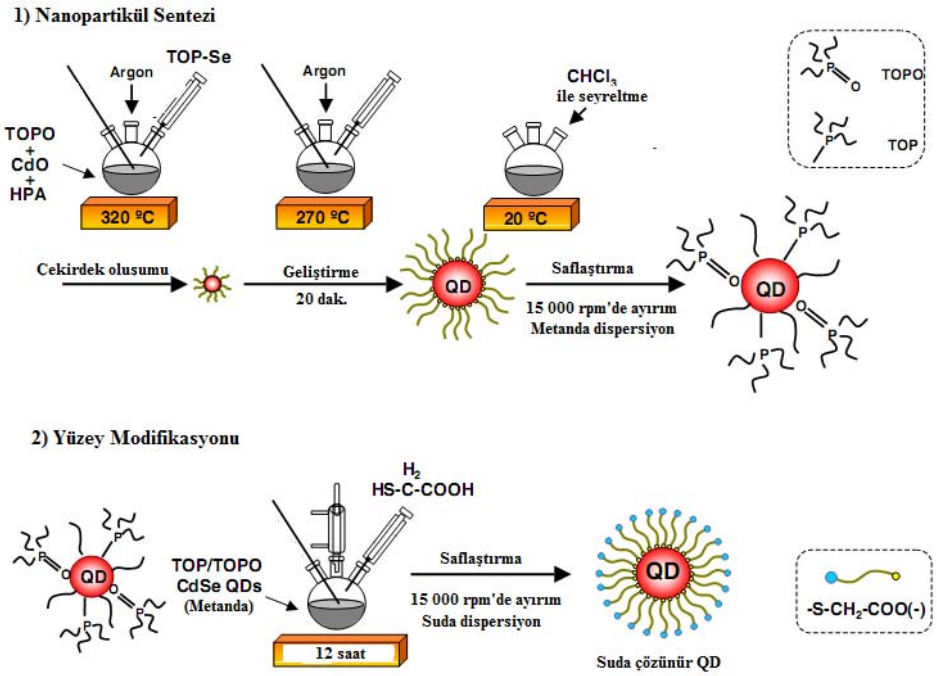
- Ligand olarak tiyol türevlerinin (merkaptoasetik asit) kullanımı
- Silika tabakalarının eklenmesi (silanizasyon)

Birinci durumda, ligand proteinlerle biyokonjugat oluşturur, ikinci durumda ise biyomoleküllerle etkileşimi sağlayan bir hedef molekülle silika yüzeyi modifiye edilir.

Yarı iletken nanopartiküllerin hazırlanması için çeşitli sentez metotları mevcuttur. Bunlar; model oluşturma (sürfaktant misellerle oluşturulan kolloidal yapılar), organometalik termolizis ya da elektrokimyasal biriktirmedir. Model oluşturma ve organometalik termolizis yöntemleri en sık kullanılanlarıdır. Bu yöntemlerde QDlar, CdS gibi tek nanokristal materyaller ya da CdSe/ZnS gibi çekirdek/kabuk hibritleri olarak üretilir. Özellikle elektrokimyasal sensörlerde sıklıkla kullanılan, kadmiyum selenit (CdSe) ve indiyum arsenit (InAs) yarı iletken patiküller olarak karşımıza çıkmaktadır. Stabilize edici materyallerin yokluğunda, QDlar agregasyona eğilimlidir, bu yüzden bunları tek başlarına, agregatlaşmamış yapılar olarak koruyabilmek için türevlendirmek gerekir. Organometalik termolizis genel olarak organik çözgende (triostilfosfinoksit

[TOPO] ya da triostilfosfin [TOP]), argon atmosferi altında ve 300-320 ^{o}C derece civarındaki yüksek sıcaklıkta gerçekleşir. Öncül maddeler (Se; $Cd(CH_3)$ ve $InCl_3$ tribütilfosfinde çözülür) karıştırılan sıcak çözgene hızlı bir şekilde enjekte edilir (Şekil 1.18). (Merkoçi et al., 2005b; Galian and Guardia, 2009). Enjekte edilen öncüllerin miktarı değiştirilerek ve reaksiyon değişik zamanlarda durdurularak farklı boyutlarda QDlar sentezlenir. Oluşan nanokristaller hidrofobiktir, bunlar bir sürfaktant tabakayla kaplanır. Aynı zamanda sürfaktant molekülleri QDların agregatlaşmasını engelleyen stabilizatör olarak görev yapar (Merkoçi et al., 2005b). TOPO oksijeni ve Cd arasındaki bağ zayıfıtr ve çözgenler (örneğin; piridin) eklenerek koparılabilir. Nanopartiküldeki yüzey atomları ve bazı organik ligandların arasındaki elektron-yük transferi teorik çalışmalarla tahmin edilebilir (Galian and Guardia, 2009). QDlar aynı zamanda ters misel modu olarak isimlendirilen bir formda olabilir. Bu teknik, sodyum diostil sülfosüksinat (AOT) gibi amfifilik bir sürfaktantın eklenmesiyle oluşturulan su-yağ karışımı sonucu meydana gelmiş doğal bir yapıyı temel alır. Karışımın su içeriğinin değiştirilmesiyle yağ fazda süspanse olan su damlacıklarının boyutu değiştirilebilir. Bu durum nano skalalı kimyasal reaksiyonların gerçekleştirilmesi için mikro reaktör olarak su havuzlarının kullanılması fikrini doğurmuştur. Misellerle oluşturulan PbS nanopartikülleri kurşun asetat ve alkantiyoller kullanarak sentezlenebilir. Yeni bir uygulama; metal-organik kimyasal buhar biriktirilmesi (MOCVD) yoluyla nano boyutlu ZnS ile pasifleştirilen CdS partiküllerinin ince filmlerinin hazırlanmasıdır. Diğer bir yöntem olan moleküler ışın epitaksi ise; nanopartikül oluşturmada ve elektrokimyasal sensör dizaynında kullanılabilmektedir (Merkoçi et al., 2005b).

QDlar genel olarak TOP veya TOPO gibi bir ya da daha fazla organik ligantın kullanılmasıyla üretilir. Bu ligantlar hidrofobiktir, bu yüzden bunlarla kaplanan nanokristaller sulu çözeltide çözünür değildir. Bu nedenle, QDların sentezinden sonra hidrofilik ajanlarla muamele edilirler. Hidrofilik yüzey oluşturmak için en kolay yol; TOPO ve TOP gibi sürfaktant moleküllerin merkaptokarboksilik asit, merkaptopropiyonik veya merkaptodekanoik gibi bifonksiyonel moleküllerle değiştirilmesidir (Şekil 1.18). Bu moleküllerin bir ucu hidrofiliktir (örneğin; ZnS) ve diğer bir ucuyla (-SH) QDlara bağlanır. Karboksil grupları nötral pH'da negatif yüklüdür. QDlar elektrostatik bir uçla kaplanırlar ve böylece agregasyonları engellenir. QDları suda çözünür hale getirmek için kullanılan diğer yöntem silikayla CdS/CdS (çekirdek/kabuk) QDlarını kaplamaktır (Merkoçi et al., 2005b).

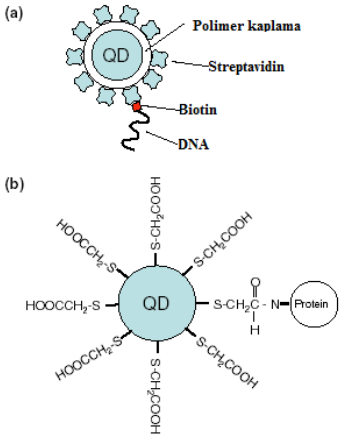


Şekil 1.18. CdO'nun başlatıcı olarak kullanımını temel alan luminesans QD sentezi ve yüzey modifikasyonunun şematik gösterimi [TOP: triostilfosfin; TOPO: triostilfosfinoksit; HPA: hekzilfosfonik asit] [Fernandez et al., 2006].

QDların analiz ve sensörlerde uygulamalarına ilişkin (hücrelerin izlenmesi, moleküllerin işaretlenmesi, immünoassayler, biyokimyasal moleküllerin dedeksiyonu) son yıllarda 2900'den fazla makale bulunmaktadır. Ayrıca *in vivo* uygulamalarına ilişkin QD temelli sensörler de (kadmiyum toksisitesi, nanopartiküllerin özellikleri ve spesifik olmayan hücresel bağlanma) bulunmaktadır (Galian and Guardia, 2009).

QDlara DNA immobilizasyonu en çok çalışılan konulardan biridir. Mitchell et al. 5' yada 3' tiyollenmiş oligonükleotidleri TOPO/merkaptoasetik asit kaplı QDlara immobilize etmişlerdir. Bu durumda, immobilizasyon kovalent değildir, tiyollenmiş oligonükleotidlerle yüzeyi kaplayan ajanların yer değiştirmesi sonucu gerçekleştirilir. Bir diğer çalışmada oligonükleotidlerin immobilizasyonu için sistamin kaplı QDlar kullanılmıştır.

Suda çözünen QDlar ile konjugasyon için; adsorbsiyon, tiyol gruplarıyla bağlanma, elektrostatik etkileşim ve kovalent bağlanma gibi birkaç yöntem yayınlanmıştır. Şekil 1.19; Streptavidin-biyotin yoluyla DNA'nın QDlara bağlanmasını şematize etmektedir. Merkaptoasetik asit yoluyla proteinlerin kovalent bağlanması da gerçekleştirilebilir (Şekil 1.19b).



Şekil 1.19. Streptavidin ile modifiye polimerle kaplanmış QD (a). Biotin ile fonksiyonelleştirilmiş DNA yüzeye tutunmaktadır. Bifonksiyonel ajan etil-3-(dimetil-amino-propil)karboksidiimid kullanarak merkaptoasetik asit vasıtasıyla protein ve CdS QD'ın kovalent bağlanmsına ilişkin şema (b).

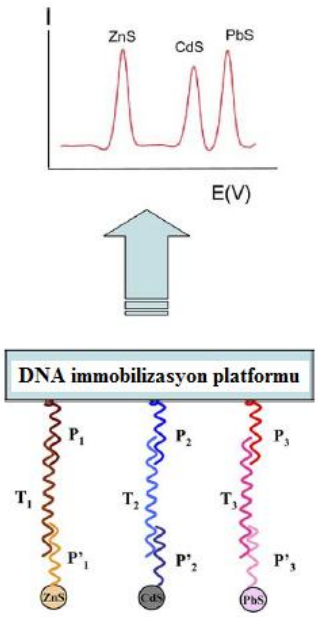
Misel oluşumu sırasında amino n-poli(etilenglikol) fosfatidiletanolamin (PEG-PE) ve fosfatidilkolin (PC) fosfolipidlerinin % 50'den fazlasının yer değiştirmesiyle QD miseller DNA'ya bağlanabilir, böylece miselin dış yüzeyine bir primer amin girer. Daha sonra tiyolle modifiye edilen DNA bifonksiyonel bağlayıcı kullanılarak aminlere kovalent olarak bağlanır, bağlanmayan DNA santrifüjle uzaklaştırılır (Merkoçi et al., 2005b).

CdS-QD ile işaretlemeyi temel alan DNA hibridizasyon metodlarını kadmiyumun ölçümünü temel alan elektrokimyasal sıyırma metotları takip etmiştir. Nanopartikül içeren kadmiyumun çöktürülmesinde taze kadmiyum çözeltisi kullanışlıdır, bu çözelti hidrokinon içermektedir, hidrokinon nanopartikül etiketini zenginleştirmek ve sıyırma DNA hibridizasyon sinyalini amplifiye etmek için kullanılmıştır. Çözünmüş kadmiyum ölçümlerine ek olarak, direkt "katı hal" ölçümleri ve "manyetik boncuk/DNA hibridi/CdS" ölçümleri elektrot yüzeyinde yapılmıştır (Merkoçi et al., 2005b).

QDların yanında, altın kaplı demir nanopartikülleri DNA dedeksiyon sistemlerinde kullanılmaktadır. Hibridizasyondan sonra, altın-demir nanopartikülleri çözünürleştirilir ve 1-nitrozo 2-naftol ligandı varlığında ve bromat katalizörlüğünde katodik sıyırma voltametrisiyle salınan demir kantite edilir. DNA işaretleme modu yüksek duyarlılık, konsantrasyonun iyi belirlenmesi ve komplementer olmayan nükleik asitlerden gelen küçük etkileşimlerin varlığında geliştirilmiştir.

Sıyırma tekniklerinin yanı sıra, CdS-oligonükleotidleri temel alan elektrokimyasal impedans spektroskopisiyle de (ESI) çalışmak mümkündür. DNA hidrizasyonu olduğu zaman çözeltiden iletici yüzeye ulaşan redoks medyatörünün ($Fe(CN_6)^{4-/3-}$) elektron transfer resistansının (R_{et}) değişimini ESI belirler. DNA probuyla hedef ssDNA-CdS nanokonjugatları hibridizasyonu, R_{et} değerinde bir artışla gözlenir.

Farklı DNA problarının farklı nanopartiküllerle işaretlenmesi Şekil 1.20'de gösterildiği gibi birden fazla dizinin birlikte tayinine olanak sağlar. Birbirinden farklı nanopartikül markırları voltammetrik olarak belirlenebilir. Yapılan bir çalışmada, DNA'ya bağlı QD; -1,12 V (Zn), -0,68 V (Cd) ve -0,53 V (Pb) değerlerinde (Ag/AgCl referans elektroda karşı) civa kaplı camımsı karbon elektrotlarla belirlenmiştir. ZnS, PbS, CdS, InAs ve GaAs yarı iletken partikülleri kullanarak biyoassayleri zenginleştirmek mümkündür (Merkoçi et al., 2005b).



Şekil 1.20. DNAnın çoklu dedeksiyonu için şematik gösterim (DNA probları (P'1, P'2 ve P'3) farklı nanopartiküllerle (ZnS, CdS, PbS) işaretlenmiş DNA dizilerini gösterir, hedef DNAlar (T1, T2, T3) ilgili DNA probları ile hibride olmaktadır).

Nükleik asit denemelerinde tek nükleotid polimorfizmlerinin, hepatit B, hepatit C virüslerinin (Gerion et al., 2003) ve kromozom anomalilerinin dedeksiyonunda (Pathak et al., 2001), immünoassaylerde ise QD işaretli antibadilerle kanser hücresi marker proteini her2 (Wu et al., 2003), difteri toksini ve tetanoz toksininin belirlenmesinde (Hoshino et al., 2005) QDlar optik işaretleyici olarak kullanılmışlardır.

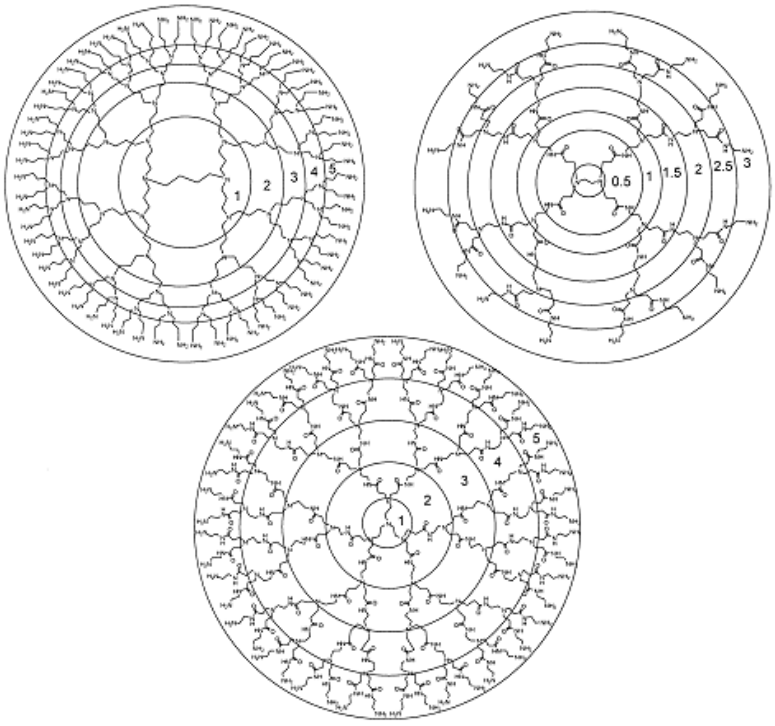
Bu uygulamaların dışında QD biyokonjugasyonu için enzimler de kullanılmıştır. Bu amaçla, Cd/ZnS-QDlar glukoz oksidaz ve turp peroksidazı ile konjuge edilmiştir ve glukoz analizinde kullanılmıştır. QDlar elektron donörü iken, enzimler ise akseptördür. Yapılan çalışmada rutenyum kompleksleri ile kıyaslandığında floresans sonuçlarının daha iyi olduğu bulunmuştur (Duong and Rhee, 2007).

Nanopartiküllerle gelecekteki çalışmalar daha umut vericidir. Genomik ve proteomik çalışmalarında kullanıma uygun hale getirmek hedeflerdendir. Geleneksel yöntemlerde çoklu organik floforlar kullanılır ancak floforlar arasındaki çapraz sinyaller nedeniyle identifikasyon oldukça zordur.

1.2.5 Dendrimerler

Dendrimerler bir çekirdek etrafında seri halde dallanmalar gösteren makromoleküllerdir (Cloninger, 2002). Dendrimerik yapılar doğada birçok yerde karşımıza çıkmaktadır. Çok fazla dallanmaya sahip bu yapılar istenilen motifte hazırlanabilmeleri açısından avantajlıdır. Dendrimerler iyi tanımlanmış büyük moleküler yapıları ile geleneksel polimerlerden farklanır. Moleküler düzeyde dendritik dallanmış yapıları yarı globüler yada globüler şekillidir. Bu globüler yapıdan dolayı lineer polimerlere göre daha küçük hidrodinamik hacimlidirler, ancak globüler proteinlerden daha büyük hacimleri vardır. Dendritik yapıdaki tabakalar diğer bir deyişle her bir uçtan diğer bir uca geçiş ya da kaskat noktaları jenerasyon olarak adlandırılır (Şekil 1.21). Çekirdek genel olarak G0 olarak simgelenir. Örneğin polipropilen imin (PPI) dendrimeri için çekirdek 1,4-diaminobütan iken, poliamido amin (PAMAM) dendrimeri için çekirdek amonyaktır. PAMAM dendrimerinde ara ürünler karboksilat yüzey grupları içerirler, bunlar yarı-jenerasyon dendrimerlerdir ve G1,5 ya da G2,5 olarak adlandırılırlar (Boas and Heegaard, 2004).

Dendrimer dizaynı poliaminler (PPI dendrimerleri), poliamid ve aminler (PAMAM dendrimerleri) ya da daha hidrofobik poli(aril eter) alt birimleri gibi çeşitli bağlanmaları temel almaktadır. Son günlerdeki çalışmalarda dendrimerler karbohidrat ya da calixarene çekirdek yapılarını ya da silikon, fosfor gibi üçüncü periyot elementlerini temel almaktadır (Şekil 1.22) (Boas and Heegaard, 2004).



Şekil 1.21. Ticari olarak bulunabilen dendrimerler (Üst sol: Polipropilen imin dendrimer (G5), üst sağ: Poliamidoamin dendrimer (G3), alt: Poliamidoamin (Starburst™) dendrimer (G5), Her bir jenerasyon daire ile gösterilmiştir).

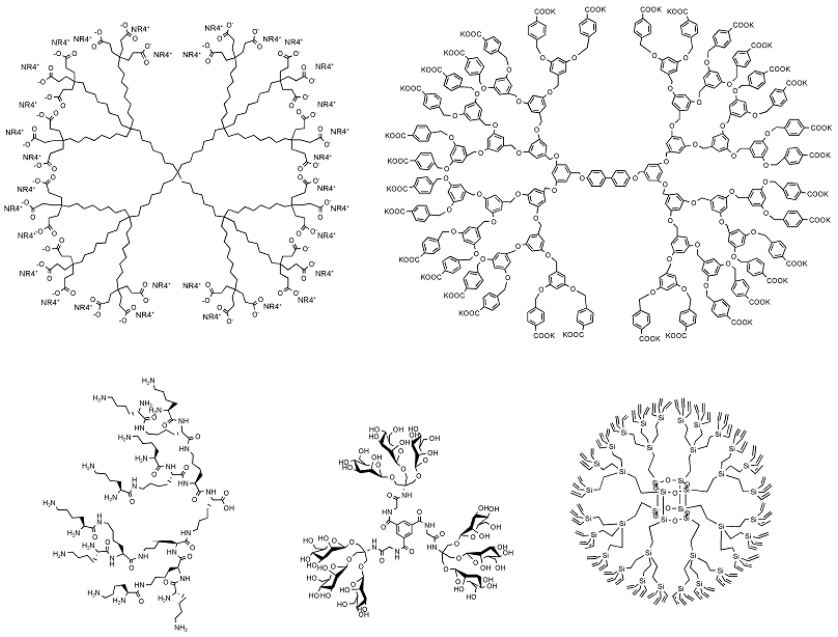
Dendritik yapılar parçaların sentezi; ıraksak ya da yakınsak olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilmektedir. Iraksak sentezde, başlangıç noktası olan çekirdekten başlayarak tek tek her bir jenerasyon sentezlenir. Yakınsak sentez ise yüzeyden başlar ve dendrimer parçalarının (dendron) çekirdeklerinin birleştirilmesi ile sonlanır (Şekil 1.23).

Dendrimerler başlıca 3 kısımdan oluşurlar:

- Çok fazla reaktif grup içeren dış yüzey,
- Dış kısmında dendrimer yüzeyiyle korunmuş olan ve iyi tanımlanmış bir mikroçevreye sahip dallanma birimleri,
- Dendrimerik dallanmalarla sarılmış olan çekirdek kısmıdır

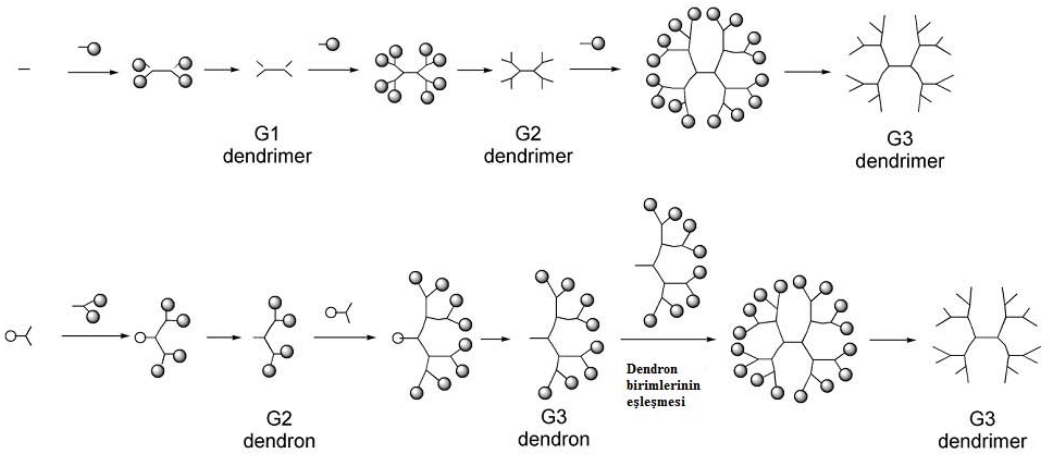
Dendrimerler bu 3 parçaları sayesinde dendritik sensörlerde ve ilaç taşıyıcısı olarak birçok alanda uygulama olanağı bulur. Dendrimerler; toksik olmamaları; immünogenik olmamaları; barsak, kadoku bariyeri, hücre membranı gibi biyobariyer olarak kullanılabilmeleri; klinik etkisi olarak sirkülasyona

girmeleri için zamanın gerekli olması; spesifik yapıların hedeflenebilmesi gibi avantajlarından dolayı özellikle ilaç taşıyıcı moleküller olarak sıklıkla karşımıza çıkmaktadırlar.



Şekil 1.22. Çeşitli şekillerde dizayn edilen dendrimerler [Üst sol: Unimoleküler misel, üst sağ: Poli aril eter dendrimer, alt sol: polilizin, orta: karbohidrat dendrimeri, alt sağ: silikon temelli dendrimer].

Dendrimerler yüzeylerine karbohidratların eklenmesi sonucu glikodendrimer olarak protein-karbohidrat etkileşimlerinin incelenmesinde, yüzeylerine aminoasit takılan peptid dendrimerler ise protein mimikleri; antiviral, antikanser ilacı; immünoassaylerde (Sadler and Tam, 2002), peptid inhibitör, aşı, ilaç, gen taşıyıcı sistemleri olarak (Cloninger, 2002) ve antibakteriyel, antitümör ilaç taşıyıcısı olarak çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır (Boas and Heegaard, 2004; Florence, 2005; Aulenta et al., 2003). Ayrıca boya molekülleri dendrimerlerin uç grupları, dalları ya da çekirdek grubundan bazıları ile etkileşime girebilmektedir. Etkileşimler boyanın absorbsiyon ya da emisyon özelliğinde değişimlere sebep olmaktadır (Froehling, 2001). Dendrimerlerin dallanma birimlerine ya da periferik kısımlarına Fe, Cu, Zn, Ni, Au, Co, Pd/Pt, Os/Ru, Rh, ve Ge gibi metaller inkorpore edilerek metalodendrimerler oluşturulmuştur, bunlar biyolojik redoks potansiyellerinin mimiklerinde, sensörlerde, katalizde, enerji dönüşümleri için yeni materyaller ve organik semikondüktörler olarak kullanılmıştır (Inoue, 2000).



Şekil 1.23. Dendrimer sentezi [Üst: Iraksak, alt: yakınsak strateji].

Dendrimerlerin biyosensörlerindeki uygulamalarına bakıldığında penisilamin için tirozinaz (Li and Kwaka, 2007), diklorvos, karbofuran, eserin pestisitleri için asetilkolin esteraz-kolin oksidaz (Snejdarkova et al., 2003), glukoz için glukoz oksidaz (Xu et al., 2007) ve glukoz oksidaz-peroksidaz (Losada et al., 2006), H_2O_2 için peroksidaz (Liu et al., 2005b), alkol için alkol oksidaz (Akin et al., 2010) ve DNA hibridizasyon biyosensörleri (Li et al, 2007; Chang et al., 2001) karşımıza çıkmaktadır.

1.3 Karbohidrat Tayini ve Önemi

Karbohidratlar biyosferde en bol bulunan organik moleküllerdir ve monosakkaritler, oligosakkaritler, polisakkaritler şeklinde isimlendirilen geniş bir grubu oluştururlar (Jahnel et al., 1998). Basit, polimerik ve kompleks formlarda olabilirler. Karbohidratların tüm formlarının polaritesi yüksektir ve suda çözünürdür.

Karbohidratlar birçok farklı alanda önemli bileşikler oldukları için analitik tayinleri önem kazanmaktadır; özellikle biyolojide enerji veren moleküllerdir ve gıdalardaki genel katkı maddeleridir. İnsan sağlığında, kardiyovasküler hastalılardan, diyabete ve diş çürüklerine kadar geniş bir alanda önemlidirler. Fermentasyon teknolojisinde şeker ya da şeker karışımları mikrobiyal hücreler için karbon kaynağı olarak kullanıldığından dolayı biyoprosesin izlenmesi açısından tayinleri önem kazanmaktadır (Plaga et al., 1989). Glukoz, fruktoz, sükroz, maltoz, laktoz ve şeker alkoller gibi karbohidratlar yiyecek ve endüstrisinde önemlidir. Glukoz diyabet hastalığının izlenmesinde ve tedavisinde önemli olan bir moleküldür.

Karbohidratlar uzun yıllardır kimyasal yöntemlerle tayin edilebilmiştir. Bunların indirgen özelliklerinden yararlanılarak birçok yöntem geliştirilmiştir. Fenol-sülfürik asit, Somogyi-Nelson ya da 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi ile kolorimetrik olarak, Lane-Eynon yöntemi ile titrimetrik olarak, Munson and Walker yöntemi ile gravimetrik olarak karbohidrat tayini yapmak mümkündür. Ancak bu yöntemler seçimli değildir ve birbiri yanında şekerleri analizlemeye olanak sağlamazlar.

Karbohidratlar uçucu bileşikler olmadıkları için HPLC ile tayin etmek kolaydır. Türevlendirilmemiş karbohidratları ayırmak için kullanılan kromatografik sistemler dört grupta toplanabilir:

1) Baz ya da tuzları içeren suyun elüent olarak kullanıldığı anyon değişim kolonları,

2) Suyun elüent olarak kullanıldığı katyon değişim kolonları,

3) Suyun elüent olarak kullanıldığı alkil bağlı silika jel kolonlar,

4) Su-asetonitrilin elüent olarak kullanıldığı amin bağlı silika jel kolonlardır.

Bu sistemlerin arasında amin bağlı silika jel kolonlar en fazla kullanılandır. Ancak bu kolonda karbohidratların ayırımı kantitatif değildir. İndirgen şekerler ve ligandın amino grupları arasındaki etkileşim (Schiff's bazı oluşumu) ve bazik materyallerin kendiliğinden hidrolizi nedeniyle karbohidratları ayırmak zorlaşır. Bu nedenle amin kolonlar farklı konfigürasyonlarda hazırlanabilmektedir. Karbohidratlar genel olarak UV ve floresans dedeksiyon için gerekli olan kromoforik ya da floroforik gruplara sahip değildir (Wei and Ding, 2000). Bu nedenle HPLC ile beraber en sık kullanılan teknik refraktif indeks dedektördür (RID). RID, gradient elüsyona imkân tanımadığından dolayı buna alternatif olarak; ışık toplayıcı detektörler bazı durumlarda tercih edilmektedir. Bunların dışında, puls amperometrik dedektör (PAD) ile türevlendirilmemiş şekerleri analizlemek mümkündür. Türevlendirilmiş şekerler HPLC ile ayrım sonrasında UV ya da fluroesans dedektörlerle ve GC ile analizlenmiştir (Ivanov et al., 2000).

Karbohidratların kolayca yükseltgenebilen redoks yeteneğine sahip grupları olmadığı için elektrokimyasal yöntemlerle tayinleri oldukça zordur. Amperometrik ya da voltammetrik koşullarda Hg elektrotlar, karbon elektrotlar gibi geleneksel birçok elektrot düşük potansiyellerde karbohidrat tayini yapmak mümkün değildir. Ancak elektrot materyalleri ve dizaynlarındaki son gelişmelere paralel olarak karbohidratların tayinine yönelik elektrokimyasal yöntemler geliştirilmiştir. Puls amperometrik dedeksiyonla Au ya da Pt elektrotlar, Cu, Ni, Co, Ru gibi çeşitli geçiş metalleri ile hazırlanmış elektrotlar kullanılarak karbohidrat tayini yapmak mümkün olmuştur (Baldwin, 1999).

Karbohidratların florimetrik yöntemlerle tayini için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Floresans metotlar duyarlı olmaları, uygun floroforlar kullanılarak yapıya zarar vermeden analize imkân tanımaları, özel yöntemler kullanıldığında makromoleküllerin yapısı ve mikroçevreleri hakkında bilgi vermeleri nedeniyle tercih edilmektedir. Örneğin Konkavalin A karbohidrat tayini için (özellikle glukoz) sıklıkla kullanılan bir lektindir. Ayrıca enzimlerin yapılarında bulunan FAD'nin florimetrik özelliğini temel alan sistemlerde geliştirilmiştir. FAD floresansı zayıftır, bu nedenle enzimler floressein–5(6)-karboksiamido-kaproik asit gibi floresans özelliği olan moleküllerle de modifiye edilebilmektedir. Ayrıca oksidaz sınıfı enzimler flofor özellik gösteren moleküllerle eşleştirilebilmektedir. Ortama substrat eklendiğinde oksijen konsantrasyonun düşmesiyle birlikte florofor özelliğe sahip molekülün floresans şiddetindeki farklanmadan giderek karbohidrat tayini yapmak mümkündür (Pickup et al., 2005). Poliaromatik hidrokarbonlar, rutenyum (II) kompleksleri, platin (II) ya da paladyum (III) porfirinler ve piren molekülleri bu amaç için kullanılan moleküllerdir (Odaci et al., 2009a). Ayrıca boronik asidin glukoz bağlama ilgisi olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Fizyolojik pH'da glukoz tayini amacıyla boronik asit ve türevleri hem florimetrik hem de kimyasal yöntemlerde kullanılmıştır (Kabilan et al., 2005).

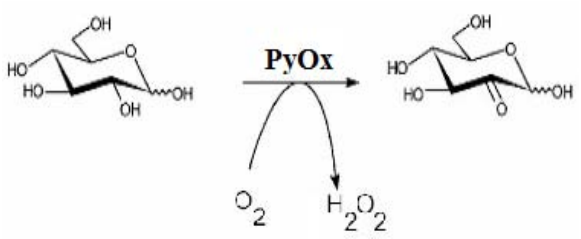
Karbohidrat tayini amacıyla kullanılan bir diğer yöntem kapiler elektroforezdir (Soga and Serwe, 2000). Kromoforik ya da floroforik özellik taşıyan moleküllerle modifikasyon sonrasında spektrofotometrik ya da florimetrik dedektörlerle ve elektrokimyasal dedektörlerle eşleştirilen kapiler elektroforetik teknikler karbohidratları birbiri yanında analizlemeye imkân tanır. Karbohidratlar yüksüz moleküllerdir, kapiler elektroforez ile karbohidratların ayırımı için yüklü hale getirilmeleri gerekmektedir. Bazı anyonlarla komplekleştirilerek (çoğunlukla

borat kompleksleri), pH'yı bazik bölgeye kaydırarak ya da kimyasal türevlendirmeyle karbohidratlara yük kazandırılır (Cabalkova et al., 2004).

Ayrıca enzimatik yöntemler kullanılarak seçimli, hızlı ve duyarlı bir şekilde analiz yapmak mümkündür (Tessema et al., 1997). Çeşitli enzimler spektrofotometrik yöntemlerle ve farklı iletici sistemlerle kombine edilerek karbohidrat tayini amacıyla kullanılmıştır. Glukoz oksidaz, glukoz dehidrogenaz, galaktoz oksidaz, heksoz oksidaz, sellobioz dehidrogenaz, piranoz dehidrogenaz, fruktoz dehidrogenaz, karbohidrat oksidaz gibi oksidoredüktazlar ve α-glukozidaz, β-glukozidaz, α-galaktozidaz, amiloglukozidaz, invertaz gibi hidrolazlar en fazla kullanım olanağına sahip enzimlerdir.

1.4 Piranoz Oksidazlar (PyOx, piranoz: oksijen 2-oksidoredüktaz; EC 1.1.3.10)

Piranoz oksidaz (sinonimi; glukoz-2-oksidaz) şeker oksidoredüktazlar sınıfına ait bir enzimdir ve özellikle *Aphyllophorales* sınıfının üyesi, ağaç degrede eden birçok basidiomycete funguslarda ekspresse edilir. Glukoz oksidazdan farklı olarak (GOx, β-D-glukoz: oksijen 1-oksidoredüktaz, EC 1.1.3.4; sinonimi, glukoz–1-oksidaz) PyOx; D-glukozun C–2 oksidasyonunu katalizler (Şekil 1.24) ve birçok aldopiranozu ilgili 2-keto şekerlere dönüştürür (Bannwarth et al., 2006; Sukyai et al., 2008; Seto et al., 2008; Maresova et al., 2007).



Şekil 1.24. Piranoz oksidazların reaksiyon mekanizması.

PyOx tarafından katalizlenen reaksiyonun mekanizması flavoprotein oksidoredüktazlarda tipik olan Ping Pong Bi Bi tiptir ve indirgen yarı-reaksiyondan oluşur. İlk olarak aldopiranoz substrat flavin adenin dinükleotidi (FAD) $FADH_2$'ye indirger. Daha sonra C-2 pozisyonundan oksidasyona uğrayan şekerden 2-dehidroaldoz (2-ketoaldoz) oluşur ve yarı-reaksiyonda elektron akseptörü tarafından $FADH_2$'nin reoksidasyonu gerçekleştirilir. Bu oksidatif yarı reaksiyonda oksijen kullanıldığında C-4a-hidroperoksiflavin ara ürün olarak

oluşur (Spadiut et al., 2009). Piranoz şekerlerin C-2 pozisyonundan regiyoselektif oksidasyonuna ek olarak PyOx aynı zamanda 2-deoksi-D-glukoz, 2-keto-D-glukoz ve metil-β-D-glukozid gibi bazı substratları C-3'den okside eder (Kujawa et al., 2006). Bunlardan başka, PyOx D-ksiloz, D-galaktoz ve L-arabinoz gibi hemiloselülozik yapılarda bulunan monosakkaritleri de oksidasyona uğratır. Diğer bir ilginç katalitik özelliği ise, *P. gigantea* PyOx enziminin reaksionunda gözlenmektedir, β1→4 bağı yapmış disakkaritlerden sellobioz, laktozun, α1→4 bağı yapmış disakkaritlerden maltozun hidrolizini ve oluşan monosakkaritlerin C-2'den regiyoselektif oksidasyonunu katalizler (Hallberg et al., 2004).

PyOx biyodönüşüm reaksiyonlarında kullanılmıştır. Birçok monosakkaridin yarı-preparatif ölçekte dönüşümü gerçekleştirilmiş ve üretilen 2-keto şekerler tanımlanmıştır. Son günlerdeki çalışmalarda, gentobiyoz, allolaktoz, izomaltoz ve melibiyoz ilgili keto şekerlerine PyOx katalizi ile dönüştürülmüştür (Volc et al., 1999; Leitner et al., 2001a). Kantitatif kinetik bilgiler kullanılarak enzim-substrat etkileşimi için gerekli olan yapısal model oluşturulmuştur. Buna göre, enzim C–2 ve C–3 oksidasyonu için iki farklı bağlanma modunu kullanır. Okside edilebilen substratlar için en temel özellik altı üyeli piranoid monosakkarit halkası ve D-glukozdaki gibi 2-OH grubuna sahip olmalarıdır. 3-OH grupları esansiyel değildir, çünkü 3-deoksi-D-glukoz ve D-glukoz ile aynı etkinlikte dönüşüme uğratılmıştır. C-3 ve aksiyel -OH gruplarındaki sübstitüsyonlar için aktivite gözlenmez. (F. Giffhorn, 2000).

PyOx, lignin dekompoze eden peroksidazlar için H_2O_2 oluşumunu sağlamasından dolayı beyaz çürükçül funguslarda önemli bir rol oynar. Beyaz çürükçül fungusların bazı türlerinde PyOx sekonder metabolit yolunda β-piran-antibiyotik kortalseron oluşumu için gerekli olan 2-keto-D-glukozu, D-glukozun oksidasyonuyla sağlar. İlk defa Janssen ve Ruelius (1968) tarafından karakterize edildikten sonra, çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda PyOx önemi fark edilmiştir ve daha sonra PyOx ile ilgili patentler elde edilmiştir. PyOx klinik kimyada ve endüstriyel proseslerin izlenmesi gibi çeşitli analitik uygulamalarda kullanılmıştır. Aynı zamanda, sentetik karbohidrat kimyasında piranoz oksidazın umut verici uygulamaları vardır (F. Giffhorn, 2000).

Beyaz çürükçül funguslar; şeker oksidazlar, metanol oksidaz, gliokzal oksidaz, yağ asidi açil-CoA oksidaz ve veratril oksidazı içeren farklı çeşitteki oksidazları üretmektedir ve bunların lignin degredasyonundaki rolleri birçok çalışma için konu olmuştur. Oksidazlar, O_2'nin H_2O_2'ye indirgenmesi sırasında

substratın oksidasyonunu katalizler, oluşan H_2O_2 lignin degredasyonunda ekstraselüler peroksidazlar tarafından kosubstrat olarak kullanılır. Ligninolitik kültürlerde farklı oksidazların ekspresyon düzeyindeki büyük varyasyonlar olduğundan dolayı ligninolitik sistemler için en önemli H_2O_2 kaynağının hangi enzim olduğu kesin değildir. *Phanerochaete chrysosporium*'da gliokzal oksidazın fizyolojik önemi olduğu bulunmuştur, çünkü bu enzim ekstraselüler lokalize olmuştur ve lignin yıkım sırasında oluşturulan C-2 bileşiklerinin büyük kısmını okside edebilir. Şeker oksidazlar olarak PyOx ve GOx enzimleri *P. chrysosporium'un* 2 suşundan elde edilmiştir, bu durum lignin degredasyonu sırasında H_2O_2'nin esas kaynağının hangisi olduğu sorusunu akla getirmektedir. Yapılan çalışmalarda lignin degrede eden funguslarda H_2O_2'nin kaynağı olarak piranoz oksidazın önemli bir rol oynadığına dair artan kanıtlar mevcuttur. Glukoz oksidazın tersine, PyOx varlığının geniş bir aralıkta fungal türlerde olduğu kanıtlanmıştır. PyOx geniş bir substrat spesifikliği gösterir ve ağaçtan türevlenen başlıca şekerler D-glukoz ve D-ksiloz karşı yüksek bir aktivite gösterir. Fizyolojik rolüne göre ağaç degrede eden *P. chrysosporium* ve *Oudemansiella mucida* suşlarının hifsel periplazmik boşluklarında lokalize olabilmektedir ve ayrıca PyOx ile mangan peroksidaz aktivitesi arasında kooperatif fonksiyon olarak adlandırılan bir korelasyon bulunmuştur. Buna rağmen *P. chrysosporium* orijinal suşlarının lignin degrede eden kültürlerinde GOx değil sadece PyOx varolduğu bulunmuştur, PyOx ve GOx arasında kooperatif fonksiyon ve birlikte ekspresyon olasılığı kabul görmemektedir. Beyaz çürükçül funguslarda H_2O_2 için başlıca kaynaklardan birisinin PyOx olduğuna dair kanıtlar var olmasına rağmen, bu fonksiyonda PyOx rolünün kısıtlandırılıp kısıtlandırılmadığına açık değildir. Beyaz çürükçül funguslarda PyOx baskınlığı özetlenecek olursa, PyOx ve lakkazlar arasında bir ilişki de olasıdır. Lakkazları ve oksidoredüktazları içeren redoks çevrimlerine bakıldığında lignin degredasyonunu hızlandırdıkları görülebilir. Bir redoks çevriminin devam etmesiyle lignin yıkımı sırasında oluşan kinoid ya da radikal ara ürünler indirgenebilir ve bunların tekrar polimerizasyonu engellenebilir. Böyle bir çevrime glukoz oksidazın katıldığı önerilmiştir, çünkü GOx ile kinoid bileşiklerin indirgendiği iyi bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda GOx ile PyOx arasında kesin bir ayırım yapılamamaktadır ve PyOx'ın kompleks metal iyonlarını ve radikalleri, 1,4-benzokinon, flavin mononükleotid (FMN), fenilmetilsülfonil florür (PMSF) ve dikolorofenolindofenol (2-DCPIP) gibi çeşitli medyatörleri indirgeyebildiği yayınlanmıştır (Spadiut et al., 2009), böyle bir redoks çevriminde PyOx'ın varlığı olasıdır. PyOx-lakkaz medyatörlü redoks çevrimine PyOx'ın olası katılımı üzerine çalışmalar devam etmektedir (F. Giffhorn, 2000).

PyOx'ın diğer bir fizyolojik rolü D-glukozdan β-piron antibiyotik kortalseronu üreten birçok beyaz çürükçül fungusun sekonder metabolizmasına katılmasıdır. Bu antibiyotik 1976 yılında Baute tarafından ilk olarak *Corticium caeruleum* kültürlerinde keşfedilmiştir. Daha sonra Baute PyOx tarafından D-glukozun ilk olarak 2-keto-glukoza oksidasyona uğratıldığı bir yol önerdi, oluşan ürün stabilitesi düşük, doygun olmayan rasemik kortalserona kendiliğinden enzimatik dehidrasyona uğramaktadır (F. Giffhorn, 2000).

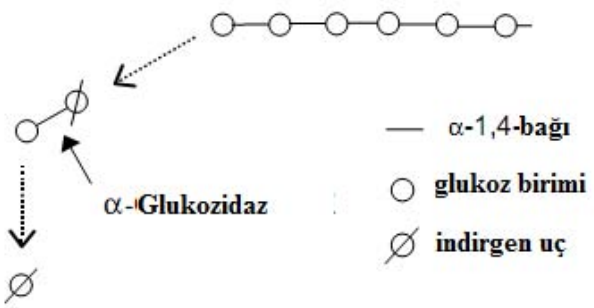
PyOx üretimi, *Trametes ochracea* (Rungsrisuriyachai and Gadda 2009), *Peniophora sp.* (Bannwarth et al., 2004), *Phanerochaete chrysosporium* (Artolozaga et al., 1997; Koker et al., 2004), *Phlebiopsis (Peniophora) gigantea* (Danneel et al., 1993), *Pleurotus ostreatus* (Shin et al., 1993), *Polyporus obtusus* (Janssen and Ruelius, 1975), *Coriolopsis occidentalis* (Volc et al.,1985) , *T. multicolor (*Spadiut et al., 2009*;* Leitner et al., 2001b), *T. (Coriolus) versicolor* (Machida and Nakanishi, 1984; Karmali and Oliveira, 1999), *Trametes pubescens* (Maresova et al, 2005), *Tricholoma matsutake* (Takakura and Kuwata, 2003) ve basidiomycetous fungus no. 52 (Izumi et al., 1990) ile gerçekleştirilmiştir. Bir çok çalışmada kompleks ortamın pH'sı 6,5'tir, karbon kaynağı olarak D-glukoz kullanılmıştır. *P. gigantea* ve *Ph. gigantea* büyüme ortamlarında D-glukoz yerine poliolleri ve basidiomycetaous fungus no. 52 ve *T. multicolor* laktozu içermektedir. Genellikle 25 ^{o}C'de çalkalamalı olarak erlenmayerde üretilmektedirler. Bu kültürlerde, 5–12 günde maksimum PyOx üretimi idiyofazik indüksiyon profilleri ile sağlanır ve D-glukozun eksilmesi ve kültür brothunun pH'sının artışı gözlenir. *Ph. gigantea* ile fermentörde sulu ortam koşullarında ya da erlenmayerde çalkalamalı olarak değil yalnızca yüzey kültür ile PyOx üretimi yapılır. 14 gün sonra kültür durağan faza ulaştığında maksimum PyOx üretimi yapılmış olur. PyOx'ın büyük ölçekli üretimi *P. gigantea, T. multicolor ve* basidiomycetaous fungus no. 52 ile yapılmıştır. Bu funguslar laboratuar fermentörlerinde havalandırma ve ılımlı ajitasyonla büyütülürler. 2–3 gün sonra PyOx indüklenir, 4–7 gün sonra 100–600 U/l olarak maksimum seviyeye ulaşır. *P. gigantea* ile çalışırken iki oksidazın idiyofazik indüksiyonu yapılır. 2 gün sonunda fungus durağan faza ulaştığı zaman ilk olarak alkol oksidaz indüklenir daha sonra yaklaşık 1 günlük ertelmeyle PyOx indüklenir. Tekrarlı olarak ortama laktozun eklendiği basidiomycetaous fungus no. 52 ve *T. multicolor* kültürleri ile sırasıyla 12,500 U/l ve 1,650 U/l aktiviteye sahip PyOx üretimi yapılmış olur. Yapılan tüm fungus çalışmalarında PyOx kültür ortamına serbest halde bırakılmamış ve misel kültürlerinden sağlanmıştır (F. Giffhorn, 2000).

PyOx enziminin saflaştırılmasında amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon, immünoaffinite kromatografi ve yüksek çözünürlükte kromotofokuslama gibi geleneksel teknikler kullanılmıştır (Kotik et al., 2004; Halada et al., 2003; Heckmann-Pohl et al., 2006; Schafer et al., 1996; Daniel et al., 1994). Genel olarak, PyOx oldukça büyük homotetramerik flavoproteindir, bunların bazıları glikozillenmiştir. Her bir alt birimi ~70 000 ve molekül kütlesi (Mr) ~280 000-320 000 civarındadır. Enzimin alt birimlerinin elipsoid şeklinde görünümleri vardır. Homojen PyOx preparatları ile 275, 360 ve 455 nm dalga boylarında flavoproteinlerde tipik olan absorbsiyon gözlenir. Saflaştırılan enzimlerde her bir alt birim için bir adet FAD varlığı saptanmıştır. Genel olarak, PyOx geniş bir pH aralığında iyi bir depo kararlılığına sahiptir (F. Giffhorn, 2000).

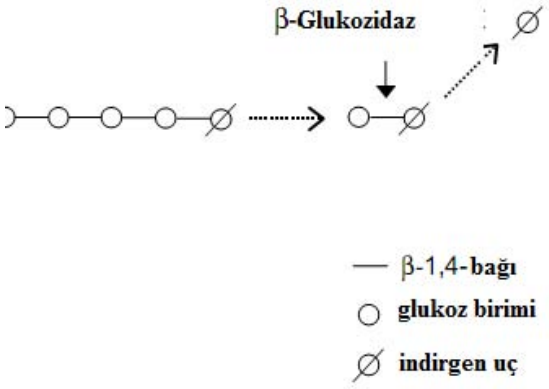
PyOx'den farklı olarak, GOx çok daha iyi tanımlanmış bir enzimdir ve diyagnostik kitlerinde ve biyosensörlerde kullanılmaktadır. GOx daha çok kullanılmasına rağmen PyOx'in bazı üstün özellikleri vardır. En önemli avantajı D-glukoz için yüksek afiniteye (Km ~1 mM) sahip olması ve anomerik seçimliliği bulunmayışı ve bu sayede cevap süresinin daha kısa olmasıdır. PyOx'in serum ve serebrospinal sıvıda bulunan ve D-glukozun doğal bir analoğu olan 1,5-anhidro-D-glusitol (1-deoksi-D-glukoz) tayini için spesifik uygulamaları mevcuttur. PyOx ayrıca endüstriyel proseslerin izlenmesinde de kullanılmıştır. İmmobilize birçok oksidazı içeren enzim kartuşları hazırlanmış, optimize edilmiş ve akışa enjeksiyon analiz sistemlerinde kullanımı standardize edilmiştir. Alkol oksidaz, L-aminoasit oksidaz ve laktat oksidazın sinyalleri tuz konsantrasyonundan etkilenirken, PyOx sinyalleri ve cevap süresi bu durumdan olumsuz etkilenmemiştir (F. Giffhorn, 2000).

1.5 Glikozidik Bağları Parçalayan Hidrolazlar

α-Glukozidazlar (AG; α-D-glukozid hidrolaz, EC 3.2.1.20) aynı zamanda maltaz olarak adlandırılırlar ve (1→4) α-D-glikozid bağlarını indirgenmemiş uçtan parçalayan ve α-D-glukoz açığa çıkaran ekzoenzimlerdir. α-Glukozidaz için esas substrat maltozdur, ancak bu enzim glukoz oligomerleri ve polimerlerine de düşük bir hızla da olsa etki eder. Bu enzimin genel kaynakları arasında *Drosophila melanogaster* ve *Saccharomyces carlsbergensis* vardır (Richardson and Gorton, 2003).



β-Glukozidazlar (BG; β-D-glukozid glukohidrolaz, EC 3.2.1.21) β-D-glukozidlerin indirgen olmayan uç kısımdaki β-D-glukoz artıklarını hidrolizleyerek β-D-oligosakkaritleri açığa çıkaran bir ekzoenzimdir. Enzim aynı zamanda sellobiaz olarak da isimledirilmekte ve sellobiozu hızlı bir şekilde glukoza hidrolizlemektedir. Selülozun degredasyonuyla açığa çıkan sellobioz üzerine olan bu etki selülozun tamamen hidrolizini gerçekleştirebilmek açısından önemlidir. Ayrıca, selülozun parçalayabilen diğer enzimlerden hiç birisinin sellobiozu glukoza parçalama kapasitesi yoktur (Richardson and Gorton, 2003). Bu enzim çeşitli fungus, bakteri, hayvan bitkilerde tanımlanmıştır (Chang et al., 2008). Dimerik ve 130 kDa molekül ağırlığına sahip bir proteindir (Gomez et al., 2009).



β-Galaktozidaz (β-Gal; β-D-galaktozid galaktohidrolaz; 3.2.1.23), laktoz ve diğer β-galaktozidleri monosakkaritlerine hidrolizleyen hidrolaz sınıfı bir enzimdir. Enzim lacZ operonunun bir ürünüdür. β-Galaktozidaz 2 farklı katalitik aktiviteye sahiptir. Bunlardan birincisi, laktozun galaktoz ve glukoza hidrolizlenmesidir. İkincisi ise, laktozu lac operonun doğal bir indüktörü olan, bir diğer disakkarit allolaktoza dönüştürmesidir (Sezgintürk ve Dinçkaya, 2007).

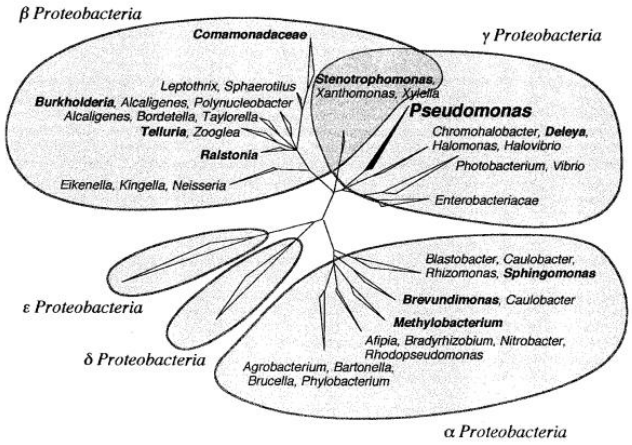
1.6 *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas, Proteobacteria'ların γ altsınıfı içinde ve *Pseudomonadaceae* familyası içerisinde yer alır. Çoğunlukla floresans *Pseudomonas* spp. türleri içerirken oldukça az sayıda floresans olmayan suşlara da sahiptir. Bu genus 3 farklı sınıfta incelenmektedir (Bossis et al., 2000).

i) Fitopatojenik sitokrom c oksidaz-pozitif floresans *Pseudomonas* (*P. cichorii*, *P. marginalis* ve *P. tolaasii*) ile fitopatojenik ve nekrojenik olmayan suşlar (*P. fluorescens, P. putida, P. chlororaphis, P. aureofaciens* ve *P. aeruginosa*)

ii) Nekrojenik ve fitopatojenik olup sitokrom c oksidaz içermeyenler (*P. syringae* ve *P. viridiflava*;)

iii) Fluoresans özellik göstermeyenler (*Pseudomonas* spp.: *P. stutzeri, P. mendocina, P. alcaligenes* ve *P. pseudoalcaligenes*) Tüm türler Şekil 1.25'de görülmektedir.

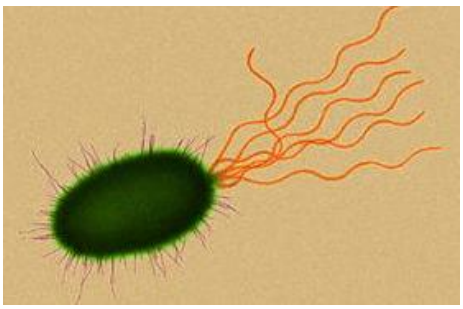


Şekil 1.25. Proteobacterial grupların filogenetik ilişkileri [Bossis et al., 2000].

P. fluorescensce ve *P. putida* ubiquiton içeren bakterilerdir. Doğada genellikle toprak ve sularda yoğun olarak bulunan bu bakterilerin bazı türleri insan, hayvan ve bitki patojenidir (Bossis et al., 2000). Türlerin tamamı katalaz pozitif, gram negatif, aerobik, polar flagellasıyla hareket edebilen çubuk şekilli bakterilerdir. Glukozu oksidasyon yoluyla parçalarlar. Kendi gelişmeleri için gerekli olan gelişme faktörlerini ve vitaminleri sentezleme yeteneğindedirler. Isı ve radyasyonla kolaylıkla inhibe olabilmektedirler. Oksijensiz koşullarda ve 42

ºC' nin üzerinde çoğalamazlar. *Pseudomonas* lipolitik ve proteolitik aktiviteleri sonucunda gıdalarda istenmeyen tat, renk ve koku oluşturur. Uzunlukları çok değişik olmakla beraber 1,5–3 µm genişliğinde, bazen ikili bazen de kısa zincirler halinde görülen sporsuz, kapsülsüz, çubuk şeklinde, aerob bakterilerdir. Çoğu kez bir uçlarında bir, nadiren iki-üç adet flagellaları vardır ve çok hareketlidirler (Şekil 1.26).

Kolay boyanırlar ve gram negatiftirler. Uzun süre beklemiş kültürlerinde ve antiseptik maddelerin bulunduğu ortamlarda kısa veya çok uzun deforme şekilleri, hareketsiz ve pigmentsiz olanları, R (rough) tipinde üreyenlerin bulunduğu bilinmektedir. *Pseudomonas* suşlarının çoğu kültür ortamında pigment üretir. Pigment oluşumu kültür koşullarına bağlıdır. Mutasyonla bu özellik kaybolur ya da aynı anda birçok pigment oluşumu görülebilir. Bu pigmentler oksijensiz ortamda oluşmaz, oda sıcaklığında daha iyi oluşur. Fluoresans pigmentler, fluoresans özellik taşıyan *Pseudomonas'*ların (*P. aeruginosa*, *P.putida*, *P.fluorescens, P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichori*, *P. fla*v*escens*) karakteristiğidir (Yeni ve Timur, 2009).



Şekil 1.26. *Pseudomonas* hücrelerinin görünümü.

Özellikle toksik kimyasal bileşiklerin degredasyonu amacıyla sıklıkla kullanılmaktadırlar (Bossis et al., 2000). Bu amaca yönelik olarak fenol, kateşol, 2-metilfenol, 2-klorofenol, 3-metilfenol, 2-nitrofenol, 4-klorofenol, 4-metilfenol, rezorsinol, 2,5-dimetilfenol, dimetilfenol gibi fenolik bileşikler (Park et al., 2003), 2,4-klorofenoksiasetik asit (2,4-D) (Gungör ve Pazarlıoğlu, 2007), stiren (O'Leary et al., 2001), plastik, pestisit, ilaç üretiminde kullanılan heterosiklik solvent morfolin (Chandrasekaran and Lalithakumari, 1998), fungusit propikonazol (Sarkar et al., 2009) etilbenzen (Corkery et al., 2006), toluen (Zylstra and Gibson, 1989) bileşiklerinin biyodegredasyonu *P. putida* ve *P. fluorescens* kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

1.7 *Gluconobacter oxydans*

Gluconobacter suşları *Acetobacteraceae* ailesine aittir ve 1980'lerde *Gluconobacter* suşlarının birçoğu *G. oxydans* olarak bir tek tür altında toplanmıştır, ayrıca *subsp. oxydans, suboxydans, industrius ve melanogenus* olarak dört alt türe ayrılmışlardır. Ancak daha sonraki çalışmalarda bu sınıflama değiştirilmiştir. Bergey Manuel Sistematik Bakteriyoloji sınıflamasına göre, *Gluconobacter* için *G. oxydans, G. asaii, G. cerinus* ve *G. frateurii* olarak dört farklı türün ait olduğu belirtilmiştir. NCBI Taksonomi araştırmalarına (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/11/12/2006) göre, *G. oxydans, G. cerinus, G. frateurii, G. albidus, G. krungthepensis, G. thailandicusi Gluconobacter* sp. NBRC3243 şeklinde yedi suş olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, *Acetobacter suboxydans, Acetobacter oxydans* ve *G. suboxydans* suşları da *G. oxydans* olarak sınıflandırılmıştır. Ancak son günlerdeki 16S rRNA dizi analizlerine göre oluşturulan filogenetik ağaçta *Gluconobacter; G. albidus, G. cerinus, G. frateurii, G. oxydans* ve *G.thailandicus* olarak isimlendirilen beş tür olduğu belirlenmiştir. *G. asaii* suşu *G. cerinus* içine alınmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında *Gluconobacter* türlerini kesin bir şekilde sınıflandırmanın mümkün olmadığı görülmektedir. *Gluconobacter* ve *Acetobacter* birbirine çok yakındır ve her ikisi de asetik asit bakterileri olarak sınıflandırılırlar. *Gluconobacter* etanolü asetat üzerinden CO_2 ile H_2O'ya ve laktatı CO_2 ile H_2O'ya okside edemez ancak *Acetobacter* bunları gerçekleştirebilmektedir (Gupta et al., 2001).

G. oxydans türlerinin Gram negatif, elipsoidalden çubuğa doğru bir yapıda 0,5-0,8 X 0,9-4,2 μm boyutlarda tek başına, çiftler halnde ya da nadir olarak zincir şeklinde sıralı biçimde oldukları bilinmektedir (Gupta et al., 2001) (Şekil 1.27). Bu hücreler hareketli ya da hareketsiz olabilirler. Eğer hareketli iseler, hücrelerin 3–8 arasında flagel yapıları bulunur. Endospor oluşturmaz. Türler kemoorganotropiktir ve obligat aerobtur, oksijen son elektron alıcısıdır.

Doğada, bu bakteri türleri çiçek ve meyve gibi şekerli yapılarda bulunurlar. Bu nedenle, bahçe toprakları, meyva, pirinç rakısı, elma şarabı, bira, şaraptan izole edilmişlerdir. Bu türler ananasta pembe hastalığa, elma ve armutta çürümeye, balarılarında hastalığa yol açmaktadır. *Gluconobacter* suşlarının insanlar ya da hayvanlar üzerinde bilinen her hangi bir toksik etkisi yoktur.



Şekil 1.27. *G. oxydans* hücrelerinin görünümü.

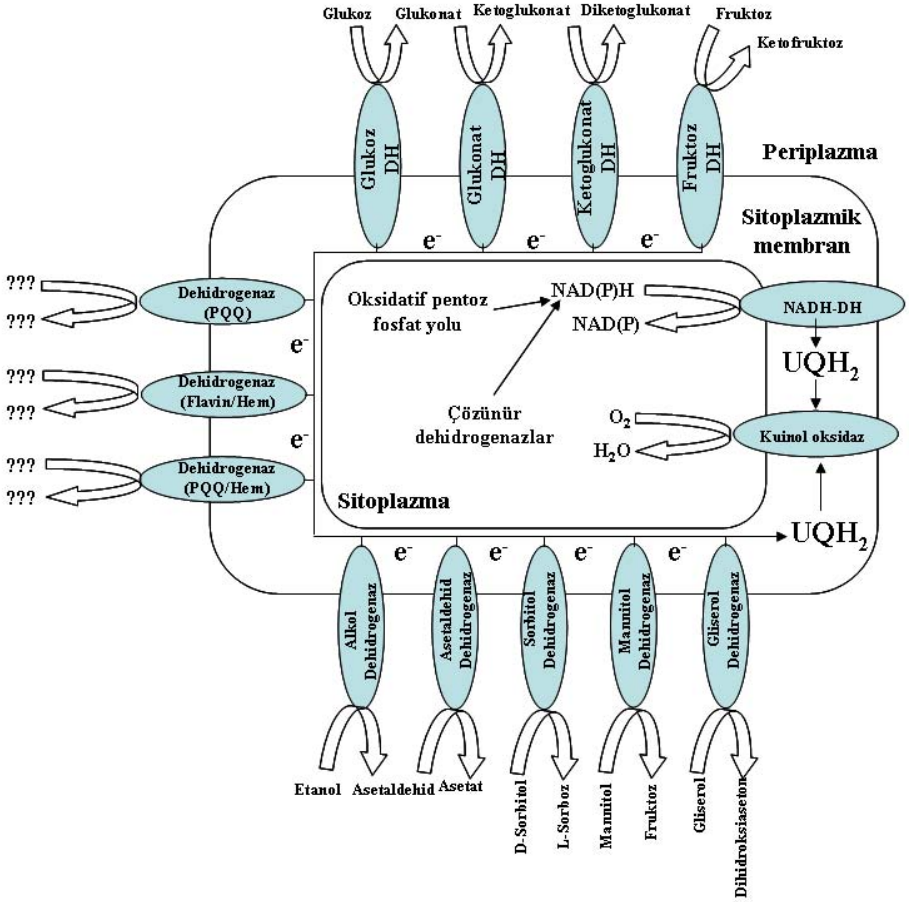
Gluconobacter suşlarında pentoz fosfat yolu şekerler, şeker türevleri ve poliollerin karbon diokside yıkımındaki en önemli katabolik yoldur. *Acetobacteraceae* hücrelerinde fosfofruktokinaz enziminin eksikliğinden dolayı glikoliz yoktur ve *Gluconobacter* hücrelerinde süksinat dehidrogenaz eksikliğinden dolayı trikarboksilik asit çevriminin tamamlanamaz ve böylece asetik asit CO_2 ve H_2O'ya kadar tamamen okside edilemez. Ayrıca, pentoz fosfat ve Entner-Doudoroff metabolik yollarının tüm enzimlerinin genleri kodlanmıştır. Ancak diğer metabolik yolların bazı önemli enzimleri henüz bulunmadığından pentoz fosfat yolu şu anda en kabul edilebilir yoldur.

G. oxydans genomik yapılarında fosfoenolpirüvat sentaz ya da fosfoenolpirüvat sentezleyen diğer enzimlere ilişkin hiçbir veri yoktur, bu yüzden bu türler glukoneogenez yoluyla C_6 şekerleri üretemezler. Örneğin pentozlar ya da gliserolden glukoz üretimi pentoz fosfat yoluna bağımlıdır. Ayrıca süksinat dehidrogenaz enziminin yokluğundan dolayı trikarboksilik asit (TCA) çevrimi tamamen gerçekleşmez. *Acetobacter* asetatı O_2 ve H_2O'ya tamamen okside edebilirken *Gluconobacter* bunu yapamaz. *Gluconobacter* hücrelerinde TCA çevriminin bulunmasının temel sebebi glutamat, aspartat ve süksinat biyosentezini gerçekleştirmektir. Bundan başka, G. *oxydans* nükleotidleri, amino asitleri, fosfolipidleri ve bir çok vitaminin *de novo* sentezi için metabolik yollara sahiptir.

G. oxydans hücrelerinde elektron taşıma sisteminin kompozisyonu hala kesin değildir. Solunum zincirinin ubikinon–10 (Q_{10}), c-tip sitokromların 2 tipini (Cyt. c), ve o-tip sitokromların (Cyt. o) iki tipini, NADH oksidaz sistemini içerdiği bilinmektedir, ancak sitokrom d ya da a yoktur. Yeni yapılan çalışmalarda aa_3-tipinin sitokrom c oksidazının bulunduğu yayınlamıştır.

Şeker ve alkollerin oksidasyonu için solunum kompleksi dışında, membrana bağlı dehidrogenazlar iş görmekte ve ürünler (aldehidler, ketonlar ve asitler) ortama salınmaktadır. Bu suşları biyoteknolojik uygulamalarda ilgi çekici

hale getiren bu özellikleridir (Muynck et al., 2007). *Gluconobacter oxydans* hücreleri membrana bağlı birçok enzim içerirler (Şekil 1.28). Membrana bağlı bu dehidrogenazların aktif merkezleri periplazmaya doğru yönlenmiştir. Bu nedenle enerji kaynağı olarak kullanılacak substratlar yalnızca dış membrandan taşınmak zorundadır, sitoplazmaya taşımaya gerek yoktur. Oksidasyon ürünleri dış membrandan ortama porinler vasıtasıyla kolayca salınırlar.



Şekil 1.28. *Gluconobacter* türlerinde şeker ve alkol okside eden enzim sistemleri [Soru işaretleri henüz karakterize edilmeyen dehidrogenazları gösterir, DH: Dehidrogenaz, UQH_2: ubikuinol] [Deppenmeier et al., 2002].

Enerji kaynaklarının kullanımında ikinci yol; Substratlar hücre içine taşındıktan sonra sitoplazmada çözünmüş $NAD(P)^+$-bağımlı dehidrogenazlarla substratların oksidasyonudur, oluşan ara ürünler fosforillenir ve pentoz fosfat yolu ile metabolize edilirler. Membrana bağlı dehidrogenazlar biyoteknolojik olarak önemli olan substratların hızlı oksidasyonundan sorumluyken, $NAD(P)^+$-bağımlı enzimler biyosentetik öncül maddelerin sentezinde önemlidir ve stasyoner büyüme fazında hücrelerin onarımında görev yapar. Yapılan çalışmalarda membrana bağlı birçok dehidrogenaz tanımlanmıştır, bunların en önemlileri

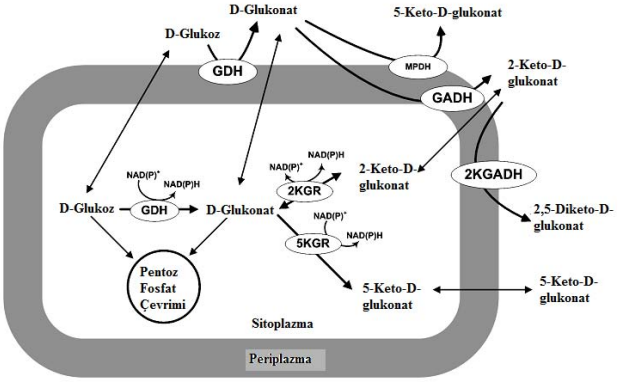
glukoz, fruktoz, alkol, aldehid, fruktoz ve gliserol dehidrogenazlardır ve prostetik grup olarak pirolokuinolinkinon (PQQ) içerirler. Ayrıca alkol, aldehid, fruktoz ve sorbitol dehidrogenaz hem c-içeren alt birimlere sahiptir. Bunlardan başka glukonat, ketoglukonat, sorbitol ve sorboz için flavin-bağımlı dehidrogenazlar tanımlanmıştır. Bahsedilen dehidrogenazlar solunum zincirine bağlıdır, elektronlarını ubikinon yoluyla bo3-tip kuinol oksidaza transfer eder. Böylece oksidatif prosesle indirgenmiş ekivalentler oksijene transfer edilir (Deppenmeier et al., 2002).

Membrana bağlı *Gluconobacter* dehidrogenazları üç kategoriye ayrılabilir. Birinci grup glukoz/aldoz dehidrogenaz gibi PQQ redoks bölgesi olan ve yalnızca bir alt birimden oluşan kuinoproteinler. İkinci grup; alkol dehidrogenaz, aldehid dehidrogenaz ve fruktoz dehidrogenaz gibi 2 alt birimden oluşan ve PQQ redoks bölgesi ile hem c bölgesi içerenlerdir. Üçüncü grubu FAD ve hem c bölgesi içeren enzimler (örneğin; 2-D-glukonat dehidrogenaz) oluşturur (Tkac et al., 2009).

Gluconobacter glukozu iki farklı yolla oksidasyona uğratabilir. Birincisi glukozun hücre içine alımını, intraselüler oksidasyonu ve pentoz fosfat yolu ile disimilasyonunu kapsar. İkinci yol ise membrana bağlı dehidrogenazlarla periplazmik boşlukta direkt oksidasyonu kapsar (Şekil 1.29). Glukonat üretimi temel olarak membrana bağımlı glukoz dehidrogenaz (GDH) ile gerçekleştirilmektedir, sitozolik GDH ile kıyaslandığında 30 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (Muynck et al., 2007).

Glukoz dehidrogenaz (EC 1.1.99.17) bağlı pirolokuinolin kinon (PQQ) içeren membrana bağlı kuino-proteindir ve birçok bakteri suşunda D-glukozun D-glukonik aside direkt oksidasyonunu katalizler (Gupta et al., 2001) (Şekil 1.29). PQQ, 2-7-9 trikarboksi pirolol[2,3-f] kuinolin dion pirol halkasına sahip bir prostetik gruptur ve enzim kovalent olarak çok sıkı bir şekilde bağlanmıştır. Membrandaki elektron akseptörü ubikinondur (Muynck et al., 2007). İndirgenmiş ekivalentleri elektron transport sistemine taşır (Gupta et al., 2001). $NAD(P)^+$-bağımlı olmayan bakteriyel dehidrogenazlarda bu sistem bulunmaktadır. Glukonik asit ve tuzları içeceklerdeki mineral birikimini önlemek, dekompoze etmek, uzaklaştırmak ve bulanıklığı önlemek için kullanılırlar. Ayrıca tekstil ve deri tabaklanmasında, farmasötik ve yem endüstrisinde kullanımı tanımlanmıştır. D-glukozun 2,5-diketoglukonik aside dönüşümü NADP-bağımlı olmayan membrana bağlı üç farklı dehidrogenaz enzimi ile (glukoz dehidrogenaz, glukonat

dehidrogenaz ve 2-ketoglukonat dehidrogenaz) gerçekleştirilir (Muynck et al., 2007).



Şekil 1.29. *G. oxydans* ile glukozun oksidasyonu için metabolik yollar; GDH:glukoz dehidrogenaz, GADH: glukonat dehidrogenaz, 2KGADH: 2-keto-G-glukonat dehidrogenaz, 2KGR: 2-keto-D-glukonat redüktaz, 5KGR: 5-keto-D-glukonat redüktaz, MPDH: Majör poliol dehidrogenaz [Muynck et al., 2007].

Gluconobacter türlerinde alkol oksidasyonu, glukoz oksidasyonunda olduğu gibi farklı metabolik yollarla gerçekleştirilir. Birinci yolda alkol sitoplazmik membran yolu ile taşınır ve sitozolik alkol ve aldehid dehidrogenazlarla oksidasyonu gerçekleştirilir. İkinci yolda ise membrana bağlı dehidrogenazlarla periplazmik boşlukta direkt oksidasyon yapılır.

Gliserol dehidrogenaz (EC1.1.99.22) membrana bağlı bir enzimdir ve gliserolün dihidroksiasetona (DHA) dönüşümünü katalizler. DHA kimyasal ve farmasötik endüstrisinde kullanışlı bir moleküldür.

G. oxydans endüstriyel biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmadır (Muynck et al., 2007). Subtratların regio- ve stereoselektif olarak oksidasyona uğtılamalrı çok büyük bir avantajdır (Deppenmeier et al., 2002). *G. oxydans* ile poliol substratların tamamen oksidasyonu sonucu açığa birçok bileşiğin C vitamini, (keto)glukonik asitler, dihidroksiaseton, a-glukozdaz inhibitörü olduğu için insüline bağımlı olmayan diyabet hastalığının tedavisinde kullanılan 1-deoksinojirimicin ve sirke üretiminde önemli olduğu bilinmektedir (Deppenmeier et al., 2002; Gupta et al., 2001; Muynck et al., 2007). D-sorbitolden L-sorboz (Giridhar and Srivastava, 2002), D-glukozdan D-glukonik asit (Gupta et al., 2001), 5-keto- ve 2-ketoglukonik asitler ile 2,5-diketoglukonik asit (Qazi et al., 1991), gulono-γ-laktondan askorbik asit (Sugisawa et al., 1995), alkolden aldehid (Molinari et al., 1995), etanolden asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit, aseton, 2-bütanon (Svitel and Kullnik, 1995), D-galaktozdan D-

galaktonik asit (Svitel and Sturdik, 1994), n-propanolden propiyonik asit (Svitel and Kullnik, 1995), izoamil alkolden izovaleraldehid (Molinari et al., 1996), gliserolden dihidroksiaseton üretimi (Navratil et al., 2001) *G. oxydans*'larla yapılmıştır (Gupta et al., 2001). Son günlerde D-tagatoz, L-ribuloz, miglitol, kiral aldehid ve asitlerin sentezi de bu baktrilerle gerçekleştirilmiş olan çalışmalardır. Aynı zamanda, bu hücrelerin sahip olduğu poliol dehidrogenaz enzimleri biyosensör teknolojisi ve koenzim rejenerasyonu uygulamalarında geniş bir kullanım olanağına sahiptir. Sahip oldukları poliol dehidrogenazlar yanında, *G. oxydans* aynı zamanda biyopolimer üretimi (selüloz ve dekstran) ve transglukozilasyon enzimleri (dekstran dekstrinaz) enzimlerinin üretiminde de kullanılmışlardır. *G. oxydans* genomunun dizisi hakkında elde edilen son günlerdeki çalışmalardan metabolizmasını ve solunum zincirini anlamaya yönemlik önemli bulgular elde edilmiştir (Muynck et al., 2007).

1.8 Kolon Sonrası Dedektör Olarak Biyosensörler

Uygun dedektör ve etkili bir örnek hazırlama tekniği; her bir yüksek performanslı ayırma metodları için gerekli olan kompleks örneklerin analizinde matriks etkilerinin eliminasyonunu sağlar. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiler elektroforezde (CE) biyosensörlerin uygulanması genel metodlarla analizlenemeyen diğer bileşiklerin analizlenmesine izin verir.

Biyokimyasal metodlarla analiz ve yüksek performanslı ayırma metodları modern kimyasal analizin en fazla gelişen alanlarıdır ve gıda kontrolü, çevre koruma, proses analizi ve medikal diyagnostik alanlarında geniş olarak kullanılmaktadırlar. Enzimler yada immunokimyasal etkileşimlerin biyokatalitik özelikleri temel alındığında biyokimyasal analitik metodlar kompleks matrikslerde limitli bir seçimliliğe sahiptir ve biyosensörler kullanıldığında sinyal iletimi sınırlı olmaktadır. Kullanılan dedektöre bağlı olarak değişmekle birlikte kromatografik metodlar yada kapiler elektroforezde kompleks matrikslerde tayin sıklıkla zor olmaktadır; çünkü sinyal üreten çok fazla bileşik vardır yada bazı analitler için dedeksiyon limiti (LOD) çok düşüktür. Bu gibi durumlarda analitlerin uygun bir yöntemle türevlendirilmesine ihtiyaç duyulur. Her iki grup metodlar için geçerli olan bu tip sınırlayıcılar yüksek performans ayırma metodları (HPLC, GC ve CE) ve uygun biyokimyasal reaksiyonların birlikte kullanımıyla azaltılabilir veya tamamen ortadan kaldırılabilir. Biyodedeksiyonun yüksek performans ayırma teknikleriyle kombinasyonu ile kromatografi ve migrasyon teknikleri için temel olan genel fizikokimyasal özelliklerden çok

moleküler tanıma mekanizmalarına dayalı analit tayini yapılır. İzole enzimler, immunokimyasal sistemlerin bileşenleri, membran reseptörleri, hücreler ve canlı organizmalar biyodedeksiyon elemanı olarak kullanılabilirler.

Bu alandaki ilk çalışma (florometrik dedeksiyonla safra asitlerinin HPLC ile ayrımında enzimatik türevlendirmenin uygulanması) 1979 yılında yayınlandı. İmmobilize enzimlerle akış reaktörleri kolon sonrası pompasız reaksiyon dedeksiyon metodları ile birlikte kullanıldığı kadar kolon öncesi türevlendirme metodlarıyla da kullanılmaktadır, 1980'lerden itibaren bu şekilde uygulamalarla ilgili birçok çalışma mevcuttur. Örnek olarak kolon sonrası türevlendirme için geliştirilen homojen enzim kolonu ile asetilkolin ve kolin tayini verilebilir, ancak enzimleri çözünür formda ortama eklemek maliyeti ve kromatografik düzeneğin kompleksliğini artırdığı için sık kullanılmamaktadır. 1990'ların başından itibaren çeşitli tip transdüserlerin kullanıldığı biyosensörler geliştirilmiştir ve enzim reaktörleriyle kıyaslandığında kromatogreafik sistemlerde anlamlı bir basitleştirme sağlanmıştır.

HPLC sistemlerinde; enzimatik dedeksiyonun yanı sıra immunoassay ya da afinite temelli metodlar da kullanılmaktadır. Afinite sistemlerinin immobilize ya da çözünmüş formdaki akış reaktörleri, immunokimyasal sistemler ya da immunosensörlerle dedeksiyon yapılabilir. Aynı zamanda, bu grup metodlarda da immunoayırım kromatografik adımdan önce ya da sonra gelebilir, kromatografik-immunokimyasal analizin beraber kullanıldığı farklı modlar seçilebilir.

Saf enzimlerden daha kompleks olarak antikor yada reseptörlerdeki biyokimyasal etkileşimler gaz kromatografik dedeksiyonda kullanılır. Bu durumda antenografik dedeksiyonda farklı böceklerin koklama duyusunu sağlayan organları ya da insan burnu gibi etkili olabilen canlı organizmaların organları GC/koklama duyusu sistemlerinde kullanılmışlardır. Bu ölçüm sistemi özel uygulamalarda tercih edilmektedir.

İmmunokimyasal etkileşimler aynı zamanda HPCE'de dedeksiyon için kullanılabilirler. Bu ayırma için özel sofistike dedeksiyon sistemi tek bir canlı hücrenin kullanımıyla biyosensör olarak geliştirilmiştir, analitik sinyal hücresel metabolizmadaki değişimi temel alır. Bu değişimler, ektraselüler ortamda asidifikasyon, kalsiyum konsantrasyonundaki değşim ya da enzimatik indirgemeyi kapsamaktadır (Trojanowicz and Szewczynska M., 2005).

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

Kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar şunlardır: Glutaraldehid (% 25), piranoz oksidaz (PyOx; piranoz: oksijen 2-oksidoredüktaz; E.C 1.1.3.10; *Coriolus* sp.'den, rekombinant; *E. coli'*de ekspresyon; 5,3 U/mg), α-glukozidaz (AG; α-D-glukozid hidrolaz; EC 1.1.3.20; *Saccharomyces cerevisiae'*dan; rekombinant; 84 U/mg), β-glukozidaz (BG; β-D-glukozid glukohidrolaz; EC 3.2.1.21; Bademden; 2,6 U/mg), β-galaktozidaz (β-gal; β-D-galaktozid galaktohidrolaz; EC 3.2.1.23; *Aspergillus oryzae*'dan; 11,8 U/mg), kitosan (yengeç kabuğundan, minimum 85 % deasetillenmiş), grafit tozu (<20 μm, sentetik), çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT; çap: 110–170 nm, uzunluk: 5–9 μm, 90%), mineral yağı, D-glukoz, D(+)-mannoz, D(+)-galaktoz, D(+)-ksiloz, β-laktoz, sellobioz, sükroz, Sigma (St. Louis, MO, ABD) firmasından temin edildi. D(−)-fruktoz, N-asetil D-glukozamin, maltoz monohidrat Fluka (Steinheim, Almanya) firmasından temin edildi. *Pseudomonas putida* DSMZ 50026, *Pseudomonas fluorescens (Pseudomonas putida* DSM 6521*),* ve *Gluconobacter oxydans* DSM 2343 hücreleri DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; Braunschweig, Almanya) firmasından satın alındı. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

2.2 Cihaz ve Sistemler

Çalışmanın deneysel kısımlarında kullanılan araç ve gereç aşağıda verilmiştir: Voltalab PGP 201 potansiyostat (Radiometer/Fransa), PalmSens potansiyostat (The Netherlands), inkübatör (New Brunswick Scientific, ABD), otoklav (Hirayama, Japonya), santrifüj (Denley, İngiltere), pH-metre (Hana Instrument, ABD), yüksek performans sıvı kromatografisi-refraktif indeks dedektör (HPLC-RI) (Agilent HP1100, Hewlett and Packard, ABD) HPLC kontrol programı (HP-Chemstation, Agilent, Germany), HPLC kolonu (GL Sciences Inc. Inertsil NH_2 5,0 μm (4,6 I.D x 250 mm), Japonya), taramalı elektron mikroskobu (JEOL JSM 5200 SEM, Japonya), kamera (Vilber Lourmat, Fransa), distile su cihazları (Fistream, England ve Milli-Q Milipore, ABD), ultrasonic banyo (Ultrasonic LC 30, Almanya), su banyosu (Nüve, Türkiye), tek kullanımlık şiringa filtre (pirojenik olmayan, hidrofilik, 0,20 μm; Sartorius Stedim Biotech. Minisart High Flow, Almanya)

Karbon pasta ya da grafit elektrotlar çalışma elektrodu olarak, Ag/AgCl elektrotlar (İç çözelti olarak doygun AgCl içeren 3M KCl çözeltisi kullanılan Radiometer Analytical elektrotlar, REF321) referans elektrot olarak ve Platin elektrotlar (Metrohm, İsviçre) karşıt elektrot olarak kullanıldı.

2.3 Metod

Tez kapsamında karbohidrat tayinine yönelik olarak hazırlanan biyosensör sistemleri iki sınıfta toplanmaktadır:

A) Enzim sensörleri:

1) Glukoz tayinine yönelik CNT ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrotları temel alan piranoz oksidaz biyosensörleri

2) Kitosan ve karbon nanotüplerin (CHIT-CNT) immobilizasyon materyali olarak kullanıldığı PyOx ve bazı hidrolaz sınfı enzimleri (AG, BG ve β-gal) temel alan bienzimatik biyosensörler:

- Maltoz tayinine yönelik AG/PyOx temelli biyosensörler
- Sellobioz tayinine yönelik BG/PyOx temelli biyosensörler
- Laktoz tayinine yönelik β-gal/PyOx temelli biyosensörler

B) Mikrobiyal biyosensörler

İmmobilizasyon materyali olarak CHIT-CNT çözeltisinin kullanımıyla *Pseudomonas putida, Pseudomonas fluorescens* ve *Gluconobacter oxydans* hücreleri grafit elektrotların yüzeyinde immobilize edildi. Optimizasyon çalışmaları sonrasında glukoz için analitik karakterizasyon gerçekleştirildi.

2.4 Biyolojik Materyalin Eldesi

Bakteri hücrelerinin tümü katı agarda depo edildi ve stoklar ayda bir yenilendi. Biyosensör hazırlanmasında kullanılmadan önce sıvı ortama inoküle edildi. Geç logaritmik fazdaki hücrelerin sayımları dökme plaka yöntemi ile gerçekleştirildi (Sekin ve Karagözlü, 2004). Bu yöntemde hücreler % 0,9'luk

NaCl çözeltisi ile uygun oranlarda seyreltildi ve 1 ml örneğin üzerine 10 ml agar ortamı eklendi. 24 saat büyüme sıcaklığında inkübe edilen hücrelerin sayımı yapıldı.

2.4.1 *Pseudomonas putida* hücreleri için kültivasyon koşulları

P. putida tek karbon kaynağı olarak 1 g/l glukoz içeren 50 ml Mineral Tuz Ortamında (Mineral Salt Medium-MSM), 175 rpm karıştırma hızında ve 28 ^{o}C'de kültive edildi. MSM hazırlamak için gerekli olan tüm kimyasal maddeler Tablo 2.1'de verilmiştir. Hücrelerin büyüme eğrileri oluşturulurken her saat başı büyüme ortamından 1 ml örnek alındı ve 560 nm'de absorbansları okundu. Elde edilen optik yoğunluk değerlerine karşılık gelen hücre sayıları hesaplandı. Zamana bağlı hücre sayısı grafikleri oluşturuldu.

Tablo 2.1. *P. putida* hücreleri için büyüme ortamı kompozisyonları.

MSM büyüme ortamı		**İz element çözeltisi**	
Bileşik	**%**	**Bileşik**	**%**
NH_4NO_3	0,10	$FeSO_4.7H_2O$	0,10
$(NH_4)_2SO_4$	0,05	$MnSO_4.2H_2O$	0,1
NaCl	0,05	$NaMoO_4.2H_2O$	0,025
$MgSO_4.7H_2O$	0,05	H_3B_3	0,01
K_2HPO_4	0,15	$CuSO_4.5H_2O$	0,025
KH_2PO_4	0,05	$ZnSO_4.7H_2O$	0,025
$CaCl_2.2H_2O$	0,0014	$NH_4.NO_3$	0,01
$FeSO_4.7H_2O$	0,001	$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0,05
1 ml/l iz element çözeltisi eklenir.		$NiSO_4.6H_2O$	0,001
pH:6,9'a ayarlanır.		Der. H_2SO_4	0,5 ml

2.4.2 *Pseudomonas fluorescens* hücreleri için kültivasyon koşulları

P. fluorescens hücrelerinin kültivasyonu için tek karbon kaynağı olarak 1 g/l glukoz içeren MSM kullanılmıştır. Hücreler 250 ml'lik erlen içinde 50 ml MSM içeren ortamda, 175 rpm karıştırma hızında ve 28 ^{o}C'de kültive edildi. MSM hazırlamak için gerekli olan tüm kimyasal maddeler Tablo 2.2'de

verilmiştir. Hücre sayımı ve optik yoğunluk değerleri belirlenerek büyüme eğrilerinin oluşturulmasında *P. putida* ile aynı yöntemler uygulandı.

Tablo 2.2. *P. fluorescens* hücreleri için büyüme ortamı kompozisyonları.

MSM büyüme ortamı		**İz element çözeltisi**	
Bileşik	**%**	**Bileşik**	**%**
Na_2HPO_4	0,244	$FeSO_4.7H_2O$	0,10
K_2HPO_4	0,152	$MnSO_4.2H_2O$	0,1
$(NH_4)_2SO_4$	0,05	$NaMoO_4.2H_2O$	0,025
$MgSO_4.7H_2O$	0,02	H_3B_3	0,01
$CaCl_2.2H_2O$	0,005	$CuSO_4.5H_2O$	0,025
10 ml/l iz element çözeltisi eklenir.		$ZnSO_4.7H_2O$	0,025
		$NH_4.NO_3$	0,01
		$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0,05
pH:6,9'a ayarlanır.		$NiSO_4.6H_2O$	0,001
		Der. H_2SO_4	0,5 ml

2.4.3 *Gluconobacter oxydans* hücreleri için kültivasyon koşulları

G. oxydans hücrelerinin kültivasyonu için tek karbon kaynağı olarak glukoz içeren ortam kullanılmıştır (Tablo 2.3). Ön kültür ortamı hücreleri depolama ve saklama amacıyla hazırlanmıştır. Hücreler 50 ml büyüme ortamı içeren 250 ml'lik erlenlerde, 175 rpm karıştırma hızında ve 28 ^oC'de kültive edildi. Büyüme ortamları hazırlanırken ilk olarak 50 ml % 0,5 maya ekstraktı içeren erlenler otoklandı, daha sonra ortama steril bir şekilde glukoz eklendi. Hücrelerin büyüme eğrileri oluşturulurken her saat başı büyüme ortamından 1 ml örnek alındı ve 600 nm'de absorbansları okunarak büyüme eğrileri oluşturuldu (Gatgens et al., 2007). Hücre sayımı yapılırken dökme plaka yöntemi kullanıldı, bu işlemler sırasında hücreler % 0,'luk NaCl ile belirli oranlarda seyretildi ve bunlardan 1 ml steril petrilere alındı. Daha sonra üzerlerine ön kültür ortamı eklendi ve büyüme koşullarında inkübe edildi. 24 saat sonunda hücrelerin oluşturduğu koloniler sayıldı ve ilgili seyreltme faktörü ile çarpıldı.

Tablo 2.3. *G. oxydans* hücreleri için ön kültür ve büyüme ortamı kompozisyonları.

Ön kültür ortamı		**Büyüme ortamı**	
Bileşik	**%**	**Bileşik**	**%**
Glukoz	10	Glukoz	0,5
Maya ekstraktı	1		
Kalsiyum karbonat	2	Maya ekstraktı	0,5
Agar	2		

2.5 Biyosensörlerin Hazırlanması

2.5.1 CHIT-CNT çözeltisinin hazırlanması

% 1'lik (w/v) CHIT çözeltisi % 1'lik asetik asit çözeltisi içinde hazırlandı ve çözülmesi için 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Kullanılmadığı zamanlarda + 4 ^{o}C'de saklandı (Timur et al., 2008).

CHIT-CNT çözeltisi hazırlamak için farklı miktarlarda MWCNT % 1'lik CHIT çözeltisi içinde disperse edildi ve 10 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletildi. CHIT-CNT karışımı 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu işlemler sırasında, CHIT makromolekülleri CNT yüzeyinde adsorblanır ve CHIT; CNTleri stabilize etmek için polimer katyonik sürfaktan olarak rol oynar (Liu et al., 2005c). CNTler birçok çözgende çözünmezler, çözeltilerin hazırlığı sırasında CNTlerin etkili bir şekilde dispersiyonu için ultrasonikasyon gerekmektedir (Balasubramanian and Burghard, 2006). Farklı oranlarda CNT içeren CHIT-CNT çözeltileri Şekil 2.1'de görülmektedir.



Şekil 2.1. Farklı konsantrasyonlarda CNT içeren CHIT-CNT çözeltileri.

2.5.2 PyOx temel alan enzim sensörlerinin hazırlanması

PyOx biyosensörleri CNT içeren karbon pasta elektrotlar (CNT/CPE/PyOx) ve CNT içermeyen karbon pasta elektrotlar (CPE/PyOx) kullanılarak hazırlandı. CNT/CPE/PyOx hazırlanırken 2:4:68:26; 4:4:66:26; 8:4:62:26 [(w/w) % MWCNT:PyOx:grafit tozu:mineral yağı] ve CPE/PyOx hazırlanırken ise 1:73:26, 2:72:26, 4:70:26, 8:68:26 [(w/w) % PyOx:grafit tozu:mineral yağı] oranları kullanıldı. Tartılan bileşenler karıştırılarak teflon gövde içine doldurulduu ve yüzeyleri prüzsüz olacak şekilde temizlendi. Bakır tel ile yapılan bağlantı sayesinde çalışma elektrodu olarak kullanıldı.

2.5.3 Bazı hidrolaz enzimleri ve PyOx temelli çiftli enzim sensörlerinin hazırlanması

Hidrolaz sınıfı bazı enzimler ve PyOx kullanılarak geliştirilen biyosensörlerin hazırlanması için sırasıyla şu işlemler gerçekleştirilmiştir:

1) 10 μl hidrolaz enzim çözeltisi, 10 μl PyOx çözeltisi ve 20 μl CHIT grafit elektrot yüzeyine damlatıldı.

2) 18 saat +4 ^{o}C'de kuruması için bekletildi.

3) Daha sonra glutaraldehid çözeltisi ile 30 dakika +4 ^{o}C'de muamele edildi.

4) Elektrot yüzeyi distile su ile yıkanarak çalışma sıcaklığı ve tamponunda 20 dakika bekletildi.

CNT varlığının biyosensör cevabına etkisini incelemek amacıyla CHIT-CNT immobilizasyon materyali olarak kullanıldı. CHIT ve CHIT-CNT çözeltileri ile modifiye edilen bienzimatik elektrotlar Şekil 2.2'de görülmektedir.



Şekil 2.2. CHIT (a) ve CHIT-CNT (b) kullanılarak hazırlanan çiftli enzim sistemini temel alan biyosensörler.

2.5.4 Mikrobiyal biyosensörlerin hazırlanması

Mikrobiyal biyosensörler günlük inokulasyonlar sonucu elde edilen canlı hücrelerin CHIT vasıtasıyla grafit elektrodu yüzeyine immobilizasyonuyla hazırlandı. Log fazın sonundaki hücrelerin optik yoğunlukları spektrofotometrik olarak ölçüldü. *Pseudomonas* türlerinin optik yoğunlukları 560 nm'de (Kirgoz et al., 2006), *G. oxydans* hücrelerinin ise 600 nm'de (Gatgens et al., 2007) izlendi. Hazırlanan her mikrobiyal biyosensörün aynı sayıda hücre içermesi biyosensörlerin performans faktörleri açısından önemlidir. Bu nedenle elde edilen optik yoğunluk sonuçlarına bağlı olarak gerekli seyreltmeler yapılarak biyosensörler hazırlandı. Biyosensörlerin hazırlanışı sırasında ilk olarak hücreleri içeren 10 ml büyüme ortamı 6000 g'de 15 dakika santrifüjlendi. Üst faz atıldı, çöken hücreler 50 µl pH: 7,0; 50 mM fosfat tamponunda çözüldü ve bu karışım biyosensör hazırlanmasında kullanıldı.

Mikrobiyal biyosensörlerin hazırlanma aşamaları:

1) 20 µl CHIT (% 1'lik) grafit elektrot yüzeyine damlatıldı ve 18 saat +4 ^{o}C'de kuruması için bekletildi

2) 20 µl hücre ve 20 µl glutaraldehid çözeltisi (% 1'lik) kitosan membran üzerine eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika muamele edildi.

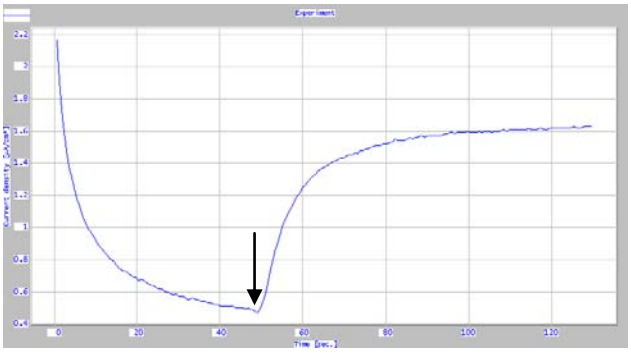
3) Elektrot yüzeyi distile su ile yıkanarak çalışma sıcaklığı ve tamponunda 10 dakika bekletildi.

2.6 Biyosensörlerin Çalışma İlkesi

2.6.1 PyOx temelli biyosensörlerin çalışma ilkesi

PyOx biyosensörlerinin kullanımıyla yapılan ölçümlerde, enzimin substratını oksidasyonu sonrasında açığa çıkan H_2O_2'nin ölçümü temel alınmıştır. Karbon pasta elektrotlara fiziksel adsorbsiyon yöntemiyle PyOx immobilize edilmiştir. Enzimatik aktivite sonucunda çalışma koşullarında karbohidratların oksidasyonu gerçekleşir. Ölçüm hücresine substrat ilavesinin ardından, enzimatik reaksiyonun başlamasıyla birlikte H_2O_2 açığa çıkmaktadır.

PyOx biyosensörleri ile yapılan ölçümlerde; reaksiyon +900 mV'da kronoamperometrik yöntemle akımdaki değişim olarak izlendi. Piranoz oksidaz temelli biyosensörlerle yapılan çalışmalarda ölçüm yapılmadan önce PyOx biyosensörü termostata bağlı reaksiyon hücresine alınarak ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çalışma tamponu ve 35 ^{o}C sıcaklıkta 3 dk. boyunca bekletildi. Substrat ilavesi öncesinde sistemin dengeye gelmesiyle belirlenen akım değeri kaydedildi ve ardından substrat ilavesi yapıldı. Oluşan enzimatik reaksiyon 50 saniyede tamamlandı ve yeni bir denge durumuna ulaşıldı (Şekil 2.3). Bu durumda okunan akım değeri, substrat yokluğuna kıyasla daha yüksektir. Deneysel çalışmalarda, her iki denge durumunda okunan akım değerinin farkı alındı. Söz konusu farklanma, substrat konsantrasyonuyla orantılıdır ve $\mu A/cm^2$ olarak belirlenir. Yapılan çalışmalarda öncelikle glukoz konsantrasyonu ile akım miktarındaki farklanmalar arasında grafikler çizildi ve çeşitli parametrelerin sensör cevabına etkileri belirlendi.



Şekil 2.3. Substrat ilavesinin ardından gerçekleşen enzimatik reaksiyonla akım değişimi.

2.6.2 Hidrolaz/PyOx çiftli enzim sistemlerini temel alan biyosensörlerin çalışma ilkesi

Hidrolaz/PyOx enzimleri kullanılarak hazırlanan biyosensörlerde; hidrolaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyon sonucu disakkaritler monosakkaritlere hidrolizlenir. Aşağıda verilen reaksiyonlar sonucunda oluşan monosakkaritlerin PyOx ile katalizlenen oksidasyonu sırasındaki O_2 miktarındaki azalmadan gidilerek disakkaritlerin tayini gerçekleştirilir.

$$\textbf{Maltoz} + H_2O \xrightarrow{\alpha\text{-glukozidaz}} \textbf{2 D-glukoz}$$

$$\textbf{Sellobioz} + H_2O \xrightarrow{\beta\text{-glukozidaz}} \textbf{2 D-glukoz}$$

$$\textbf{Laktoz} + H_2O \xrightarrow{\beta\text{-galaktozidaz}} \textbf{D-glukoz + D-galaktoz}$$

Yapılan çalışmalarda reaksiyon -700 mV'da kronoamperometrik yöntemle akımdaki farklanma olarak izlenirdi. Ölçüm yapılmadan önce bienzimatik termostata bağlı reaksiyon hücresine alınarak ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çalışma tamponu ve 35 ^{o}C sıcaklıkta 3 dk. boyunca bekletildi. Substrat ilavesi öncesinde sistemin dengeye gelmesiyle belirlenen akım değeri kaydedildi ve ardından disakkaritlerin ilavesi yapıldı. Enzimatik reaksiyonlar tamamlandıktan sonra yeni bir denge durumuna ulaşıldı. Deneysel çalışmalarda, her iki denge durumunda okunan akım değerinin farkı alındı. Söz konusu farklanma, substrat derişimiyle orantılıdır ve $\mu A/cm^2$ olarak belirlenir.

2.6.3 Mikrobiyal biyosensörlerin çalışma ilkesi

Mikrobiyal biyosenörlerle yapılan ölçümlerde canlı hücrelerin metabolik aktiviteleri sonucu kullandıkları oksijenden kaynaklanan sinyal izlenmektedir. Elektrotların yüzeyine canlı hücreler immobilize edilmiştir. Ölçüm hücresine substrat ilavesinin ardından, metabolik aktivite sonucunda oksijenin kullanımıyla çözünmüş oksijen miktarının farklanmasına neden olmaktadır. Çözünmüş oksijen miktarındaki farklanmanın bakteri hücrelerini temel alan biyosensörlerle belirlenmesi mümkündür.

Yapılan çalışmalarda reaksiyon -700 mV'da kronoamperometrik yöntemle akımdaki farklanma olarak izlendi. Ölçüm yapılmadan önce mikrobiyal biyosensör termostata bağlı reaksiyon hücresine alınarak ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çalışma tamponu ve 30 ^{o}C sıcaklıkta 3 dk. boyunca bekletildi. Substrat ilavesi öncesinde ve sonrasında akım değerleri biribirinden farklıdır. Metabolik aktivite sonucunda okunan akım değeri, substrat yokluğuna kıyasla daha düşüktür. Deneysel çalışmalarda, her iki denge durumunda okunan akım değerinin farkı alındı. Söz konusu farklanma, substrat derişimiyle orantılıdır ve $\mu A/cm^2$ olarak belirlenir. Bu kısımda öncelikle glukoz derişimi ile akım değerindeki farklanmalar arasında grafikler çizildi ve çeşitli parametrelerin sensör cevabına etkileri belirlendi.

2.7 3,5-Dinitrosalisilik Asit (DNS) Yöntemi ile Karbohidrat Tayini

Hazırlanan biyosensör sistemleri ile örneklerde karbohidrat analizi yapıldı. Daha sonra referans yöntem olarak DNS (3,5-dinitrosalisilik asit) yöntemi ile de örneklerdeki glukoz miktarı belirlendi ve sonuçlar birbiri ile kıyaslandı.

DNS yönteminin temeli indirgen şeker tayine dayanmaktadır (Miller, 1959). 0,04 M 3,5-dinitrosalisilik asit, 1 M Na-K tartarat ve 0,4 M NaOH içeren çözelti DNS reaktifi olarak kullanılmıştır. DNS yöntemi ile ölçüm yapılırken reaktifler Tablo 2.4'deki sıra ile eklenirler.

Karbohidrat konsantrasyonu ile 546 nm'de elde edilen absorbans değerleri arasında kalibrasyon grafikleri çizildi. Daha sonra karbohidrat miktarı izlenecek örneklere uygun seyreltmeler yapıldı ve ilgili kalibrasyan grafikleri yardımıyla içeriklerindeki karbohidrat miktarları hesaplnadı. Örneklerin karbohidratla içerikleri hazırlanan biyosensörler ile hesaplanarak DNS yöntemi ile kıyaslandı.

Tablo 2.4. DNS yöntemi ile şeker tayini.

Reaktif	Kör	Standart	Örnek
D. Su (ml)	1	-	-
Standart Glukoz çöz. (ml)	-	1	-
Örnek çöz. (ml)	-	-	1
DNS çözeltisi (ml)	1	1	1
Tüpler vortekslenir, 10 dakika kaynar su banyosunda inkübe edilir			
D. su (ml)	10	10	10
546 nm'de absorbanslar okunur.			

2.8 PyOx Biyosensörüne Yönelik Çalışmalar

Glukoz tayinine yönelik olarak geliştirilen PyOx biyosensörüne ilişkin çalışmalarda öncelikle biyoaktif tabakasını oluşturan bileşenlerin optimizasyonları gerçekleştirildi. Daha sonra aktivitede etkili olan diğer önemli parametrelerden pH ve sıcaklık optimizasyonu yapıldıktan sonra PyOx biyosensörünün karakterizasyonuna ilişkin bulgular elde edildi.

2.8.1 Enzim miktarının biyosensör cevabına etkisi

Çalışmanın bu kısmında diğer bileşenler sabit tutularak farklı miktarlarda PyOx içeren biyosensörler hazırlandı. Hazırlanan PyOx biyosensörleri ile değişen glukoz derişimi ve akım yoğunluğu arasında grafikler oluşturuldu. En iyi biyosensör cevabına sahip olan sistem belirlendi. Bu amaca yönelik olarak

aşağıdaki oranlarda CPE/PyOx biyosensörleri hazırlandı ve ölçümler sodyum fosfat tamponunda (pH 7,5; 50 mM), 35 ^{o}C ve +700 mV'da gerçekleştirildi.

PyOx Biyosensörü	Karbon tozu (mg)	**PyOx (mg)**	Mineral yağı (mg)
I	18,3	**0,2 (1 U)**	6,5
II	17,9	**0,6 (3 U)**	6,5
III	17,3	**1,2 (6 U)**	6,5
IV	16,9	**1,6 (8 U)**	6,5

2.8.2 CNT miktarının biyosensör cevabına etkisi

Biyokompozitteki PyOx enziminin değişen oranlarıyla hazırlanan biyosensörlerden elde edilen sonuçlara göre enzim aktivitesi sabit tutuldu ve değişen CNT miktarlarının biyosensör cevabına etkisi belirlendi. Bu amaç doğrultusunda aşağıdaki oranlar kullanılarak biyosensörler hazırlandı ve ölçümler sodyum fosfat tamponunda (pH 7,5; 50 mM), 35 ^{o}C ve +700 mV'da gerçekleştirildi.

PyOx Biyosensörü	Karbon tozu (mg)	**MWCNT (mg)**	PyOx (mg)	Mineral yağı (mg)
I	16,8	**0,5**	1,2 (6 U)	6,5
II	16,3	**1,0**	1,2 (6 U)	6,5
III	15,3	**2,0**	1,2 (6 U)	6,5

2.8.3 Optimum pH'nın belirlenmesi

PyOx biyosensörlerinin optimum pH'ını belirlemek amacıyla hem CPE/PyOx hem de CNT/CPE/PyOx biyosensörleri ile ölçümler gerçekleştirildi ve pH'sı 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,2 olan 50 mM sodyum fosfat tamponları kullanılarak en iyi biyosensör cevabının hangi pH değeri ile alındığı belirlendi. Yapılan denemeler sonucunda pH ve % biyosensör cevabı arasında grafik çizildi.

2.8.4 Optimum sıcaklığın belirlenmesi

PyOx biyosensörlerinin optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik çalışmalarda 25–42 ^{o}C'de düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru ölçümler yapılarak PyOx biyosensörüne ait akım yoğunluğu değerleri izlendi. Çalışmalar

pH 7,5; 50 mM sodyum fosfat tamponunda gerçekleştirildi. Yapılan denemeler sonucunda sıcaklık ve % biyosensör cevabı arasında grafik çizildi.

2.8.5 Çalışma potansiyelinin biyosensör cevabına etkisi

PyOx biyosensörlerinde çalışma potansiyelinin akıma etkisini belirlemek amacı ile hem CPE/PyOx hem de CNT/CPE/PyOx için çalışma potansiyeli araştırıldı ve sonuçlar birbiriyle kıyaslandı. Ayrıca yine her iki sistemle glukoz varlığında ve yokluğunda döngüsel voltammetrik ölçümler alındı. Ölçümler sodyum fosfat tamponunda (pH 7,5; 50 mM) ve 35 ^{o}C'de gerçekleştirildi.

2.8.6 PyOx temelli biyosensörlerin karakterizasyonu

2.8.6.1 Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Geliştirilen PyOx biyosensörlerinin hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrası karakterizasyonu amacıyla standart grafik çizilerek glukoz için ölçüm aralığı belirlendi. Ayrıca CNT ile modifikasyonun akım değerlerine etkileyip etkilemediği de bu bölümde araştırıldı. Ölçümler sodyum fosfat (50 mM; pH 7,5), 35 ^{o}C ve +900 mV'da gerçekleştirildi. Yapılan tüm çalışmalarda, glukoz eklenmeden önce çalışma tamponu değiştirildi. Tamponu değiştirmeden ölçüm alındığında elde edilen akım değerleri tampon değiştirilerek elde edilen akım değerleri ile kıyaslandı.

2.8.6.2 Tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılığın belirlenmesi

Bu çalışmada hazırlanan biyosensörlerin tekrar kullanılabilirliği incelendi. CPE/PyOx ve CNT/CPE/PyOx biyosensörlerinin her ikisi için 2,0 mM glukoz içeren standartlar kullanılarak ölçüm yapıldı. Tekrarlanan ölçümler sonrasında ilgili sistemin standart grafikleri yardımıyla derişim değerleri saptandı. Bu işlemler sonrasında standart sapma (SS) ve % varyasyon katsayısı (% VK) hesaplandı.

Biyosensörlerin operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensörler daha önce optimizasyonu yapılarak belirlenmiş olan çalışma sıcaklığında ve çalışma tamponu içinde bekletilerek 10 mM glukoz standardı için ölçümler gerçekleştirildi. Başlangıçta elde edilen biyosensör

cevapları % 100 kabul edilerek belirli zaman dilimlerinde yapılan ölçümlerde elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı. Ölçümler sodyum fosfat tamponunda (pH 7,5; 50 mM), 35 ^{o}C ve +900 mV'da gerçekleştirildi.

2.8.7 Farklı karbohidratlar için doğrusal tayin aralıklarının belirlenmesi

PyOx biyosensörleri ile diğer bazı karbohidratların tayin edilip edilemeyeceğinin anlaşılması için mannoz, fruktoz, galaktoz, ksiloz, maltoz, laktoz, sakkaroz ve N-asetilglukozamin kullanılarak ölçümler yapıldı ve ilgili karbohidratlara ait standart grafikleri çizildi. Ayrıca glukoz ve diğer sakkarit ortama beraber ilave edildi ve diğer sakkaridin varlığında PyOx biyosensörlerinin glukoz için verdikleri akım değerleri saptandı. Ölçümler sodyum fosfat (pH 7,5; 50 mM), 35 ^{o}C ve +900 mV'da gerçekleştirildi.

2.8.8 Örneklerde glukoz analizi

Hazırlanan PyOx biyosensörlerinin örneklerdeki glukoz analizine yönelik uygulanabilirliğini izlemek amacıyla iki tane şarap örneği kullanıldı. Reaksiyon ortamına glukoz yerine şaraplar 10 kat seyreltme yapılarak eklendi ve ilgili standart grafiğinden konsantrasyonu hesaplandı. Ayrıca referans yöntem olarak DNS yöntemi ile de örneklerdeki glukoz miktarı belirlendi ve sonuçlar birbiri ile kıyaslandı (Miller, 1959).

2.9 AG/PyOx Temelli Biyosensör Sistemine Yönelik Çalışmalar

Maltoz tayini amacıyla hazırlanan AG/PyOx biyosensörleri ile yapılan çalışmalarda öncelikle enzimler, CHIT ve glutaraldehidin optimum miktarları belirlendi, daha sonra CNT varlığının biyosensör cevabını etkileyip etkilemediği test edildi. Biyosensör sisteminin analitik karakterizasyonu sonrasında bira örneklerinde maltoz tayini gerçekleştirildi.

2.9.1 Enzim miktarlarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

Biyoaktif tabakadaki diğer tüm bileşenlerin miktarları sabit tutularak AG ve PyOx enzimlerinin değişen oranları ile farklı biyosensörler hazırlandı. İlk olarak AG aktivitesi farklandırıldı ve bu amaçla aşağıdaki oranları içeren

biyosensörler hazırlanarak maltoz konsantrasyonuna bağlı akımdaki değişime ilişkin grafikler oluşturuldu:

AG/PyOx	**AG (U)**	PyOx (U)	CHIT (%)	Glutaraldehid (%)
I	**0,3**	9,0	1,0	1,0
II	**0,6**	9,0	1,0	1,0
III	**0,9**	9,0	1,0	1,0

Optimum AG miktarı belirlendikten sonra en iyi biyosensör cevabının alındığı PyOx miktarı belirlendi. Bu amaçla aşağıdaki bileşenleri içeren AG/PyOx biyosensörleri hazırlandı ve maltoz tayinine yönelik grafikler oluşturuldu:

AG/PyOx	AG (U)	**PyOx (U)**	CHIT (%)	Glutaraldehid (%)
I	0,6	**6,0**	1,0	1,0
II	0,6	**9,0**	1,0	1,0
III	0,6	**12,0**	1,0	1,0

2.9.2 CHIT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmında enzim miktarı ve glutaraldehid miktarı sabit tutularak değişik miktarlarda CHIT içeren AG/PyOx biyosensörleri hazırlandı ve en yüksek biyosensör cevabının alındığı kitosan miktarı bulundu. CHIT miktarı değiştirilerek hazırlanan biyosensörlerin biyoaktif tabaka bileşenleri şöyledir:

AG/PyOx	AG (U)	PyOx (U)	**CHIT (%)**	Glutaraldehid (%)
I	0,6	9,0	**0,5**	1,0
II	0,6	9,0	**1,0**	1,0
III	0,6	9,0	**2,0**	1,0

2.9.3 Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

AG/PyOx biyosensörlerinin hazırlama koşullarının optimizasyonuna yönelik olarak yapılan çalışmalarda optimize edilen son parametre glutaraldehid

miktarıdır. AG, PyOx ve CHIT miktarları sabit tutularak aşağıdaki oranlarda AG/PyOx biyosensörleri hazırlanmıştır:

AG/PyOx	AG (U)	PyOx (U)	CHIT (%)	**Glutaraldehid (%)**
I	0,6	9,0	1,0	**0,5**
II	0,6	9,0	1,0	**1,0**
III	0,6	9,0	1,0	**1,5**

2.9.4 CNT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

Biyosensörlerin performanslarını artırmak amacıyla kullanılan nanomateryallerin başında CNTler gelmektedir. Bu çalışmada % 1'lik CHIT çözeltileri CNT ile modifiye edilerek CHIT-CNT hazırlandı ve immobilizasyon matriksi olarak kullanıldı. Maltoz tayinine yönelik grafikler oluşturularak CNT miktarının elde edilen akım değerlerinde farklanma yaratıp yaratmadığı test edildi. Aşağıdaki miktarlarda CNT içeren CHIT-CNT çözeltileri ile AG/PyOx biyosensörleri hazırlandı:

AG/PyOx	AG (U)	PyOx (U)	**CHIT-CNT (mg/ml CNT)**	Glutaraldehid (%)
I	0,6	9,0	**0,2**	1,0
II	0,6	9,0	**0,5**	1,0
III	0,6	9,0	**0,7**	1,0

2.9.5 Optimum pH'ın belirlenmesi

AG/PyOx biyosensörlerinin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 50 mM, pH:5,5 sodyum asetat ve pH: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 sodyum fosfat tamponları hazırlandı. Farklı tamponlarda ve 2,0 mM maltoz varlığında AG/PyOx biyosensörünün akım değerlerindeki farklanma belirlendi. Elde edilen biyosensör cevaplarından en yüksek akım değeri 100 olarak kabul edilerek diğer akım değerleri, en yüksek akım değeri ile oranlanarak bağıl değerler hesaplandı. Bu veriler doğrultusunda pH değişimine bağlı % biyosensör cevabına ilişkin grafikler çizildi.

2.9.6 Optimum sıcaklığın belirlenmesi

AG/PyOx biyosensörünün optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik olarak 25–40 ^{o}C arasındaki sıcaklıklarda, 2,0 mM maltoz varlığında ölçümler alındı. Sıcaklık ile % biyosensör cevabı arasında grafikler oluşturularak AG/PyOx biyosensörü için optimum sıcaklık bulundu.

2.9.7 Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Bu çalışmada, kronoamperometrik ölçümleri temel alan AG/PyOx biyosensörü ile en iyi performansın alınması için çalışılması gereken potansiyel belirlendi. Ölçümler -850 ile -550 mV potansiyel aralığında, 2,0 mM maltoz varlığında gerçekleştirildi. Ölçüm alınan potansiyel ile % biyosensör cevabı arasında grafikler çizilerek en uygun çalışma potansiyeli belirlendi ve tüm ölçümler bu potansiyel değerinde gerçekleştirildi.

2.9.8 AG/PyOx temelli biyosensörlerin karakterizasyonu

2.9.8.1 Maltoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Optimize edilen hazırlama koşulları ve çalışma koşulları kullanılarak AG/PyOx biyosensörü ile maltoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı belirlendi.

2.9.8.2 Tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılığın belirlenmesi

Hazırlanan AG/PyOx biyosensörlerini doğruluğunu belirlemek amacıyla 1,0 mM maltoz standardı için 10 kez ölçümler alındı. Maltoz için çizilen kalibrasyon grafiğinden yaralanarak elde edilen akım değerlerine karşılık gelen maltoz konsantrasyonları hesaplandı. Elde edilen değerlerden SS ve % VK hesaplanarak tekrarlanabilirlik çalışmaları tamamlandı.

AG/PyOx biyosensörlerinin belirlenen çalışma koşullarındaki operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla 4,5 saat boyunca ölçümler alındı. Bu süre sonunda aktivitesinin ne kadarını koruduğu gözlenmiş oldu.

2.9.9 Farklı karbohidratlar için doğrusal tayin aralıklarının belirlenmesi

AG/PyOx biyosensörlerinin diğer karbohidratlar için biyosensör cevabının test edilmesi için glukoz, galaktoz, ksiloz, sükroz, mannoz, laktoz, sellobioz, fruktoz, N-asetilglukozamin gibi bazı mono- ve disakkaritler kullanıldı. AG/PyOx biyosensörlerine substrat olabilecek karbohidratlar için doğrusal tayin aralığı belirlendi. Daha sonra 0,5 mM maltoz yanında diğer karbohidratlar aynı anda eklenerek biyosensör cevabı belirlendi. Bu ölçümler sonrasında diğer karbohidratların varlığının maltoz tayini için girişim yapıp yapmadığı test edilmiş oldu.

2.9.10 Örneklerde maltoz analizi

Maltoz bilindiği bira endüstrisi için önemli olan karbohidratlardan bir tanesidir. İki farklı marka biranın maltoz içeriği hazırlanan AG/PyOx biyosensörü ile belirlendi ve elde edilen sonuçlar DNS yöntemi ile kıyaslandı. Ayrıca biranın içeriğindeki diğer maddelerin sonuçlara girişim yapıp yapmadığını belirlemek amacıyla standart katma yöntemi ile biralardaki maltoz analizi tekrarlandı.

2.10 BG/PyOx Temelli Biyosensör Sistemine Yönelik Çalışmalar

2.10.1 Enzim miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

BG/PyOx biyosensörleri ile sellobioz analizine yönelik olarak yapılan optimizasyon çalışmalarında ilk olarak enzim miktarlarının optimizasyonu gerçekleştirildi. Biyoaktif tabakayı oluşturan PyOx sabit tutularak BG enziminin farklı miktarlarının kullanılmasıyla üç farklı biyosensör sistemi hazırlandı:

BG/PyOx	**BG (U)**	PyOx (U)	CHIT (%)	Glutaraldehid (%)
I	**0,3**	6,0	1,0	1,0
II	**0,6**	6,0	1,0	1,0
III	**0,9**	6,0	1,0	1,0

En yüksek biyosensör cevabının alındığı BG aktivitesi belirlendikten sonra, biyoaktif tabakadaki diğer tüm bileşenler sabit tutularak PyOx miktarları

farklandırıldı ve aşağıdaki oranlara sahip üç farklı BG/PyOx biyosensörü hazırlandı:

BG/PyOx	BG (U)	**PyOx (U)**	CHIT (%)	Glutaraldehid (%)
I	0,6	**3,0**	1,0	1,0
II	0,6	**6,0**	1,0	1,0
III	0,6	**9,0**	1,0	1,0

2.10.2 CHIT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

Biyomatriks bileşeni olan BG ve PyOx enzimlerinin miktarlarının optimizasyonu sonrasında CHIT miktarı optimize edildi. Üç faklı konsantrasyonda CHIT içeren çözeltiler enzimlerin immobilizasyonunda kullanıldı ve en yüksek biyosensör cevabının elde edildiği miktar belirlendi.

BG/PyOx	BG (U)	PyOx (U)	**CHIT (%)**	Glutaraldehid (%)
I	0,6	6,0	**0,5**	1,0
II	0,6	6,0	**1,0**	1,0
III	0,6	6,0	**2,0**	1,0

2.10.3 Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

Biyobileşenlerin stabil bir şekilde immobilizasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan glutaraldehidin optimum miktarını belirlemek amacı ile konsantrasyonu farklandırılarak aşağıdaki oranlarda BG/PyOx biyosensörleri hazırlandı ve sellobioz standart grafikleri çizildi:

BG/PyOx	BG (U)	PyOx (U)	CHIT (%)	**Glutaraldehid (%)**
I	0,6	6,0	1,0	**0,5**
II	0,6	6,0	1,0	**1,0**
III	0,6	6,0	1,0	**1,5**

2.10.4 CNT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

Hazırlanan BG/PyOx biyosensörü ile sellobioz tayinine yönelik olarak elde edilen sinyallere, CNT varlığının etkisini incelemek amacı ile farklı miktarlarda CNT içeren CHIT-CNT çözeltilerinden yola çıkılarak biyosensörler hazırlandı. CHIT içerisindeki CNT miktarları farklandırılarak hazırlanan BG/PyOx biyosensörlerinin bileşimi aşağıdaki çizelgede gösterilmektedir:

BG/PyOx	BG (U)	PyOx (U)	**CHIT-CNT (mg/ml CNT)**	Glutaraldehid (%)
I	0,6	6,0	**0,1**	1,0
II	0,6	6,0	**0,2**	1,0
III	0,6	6,0	**0,5**	1,0

2.10.5 Optimum pH'nın belirlenmesi

BG/POx biyosensörlerinin hazırlama koşullarının optimumizasyonu sonrasında çalışma koşullarının opimizasyonu çalışmalarına geçildi. Bu amaçla ilk olarak optimum pH denemeleri yapıldı, pH'ı belirlemek amacıyla 50 mM pH 5,5 sodyum asetat tamponu ve 50 mM pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 sodyum fosfat tamponları kullanıldı.

2.10.6 Optimum sıcaklığın belirlenmesi

BG/PyOx biyosensörlerinin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 25–42 ^{o}C sıcaklık aralığında çalışıldı, ölçümler düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru gidilerek yapıldı.

2.10.7 Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Çalışma koşullarının optimizasyonuna ilişkin olarak incelenen son parametre çalışma potansiyelinin biyosensör cevabına etkisi oldu. Uygulanan potansiyel -550 ile -850 mV arasındaki değiştirilerek en yüksek biyosensör cevabının alındığı potansiyel belirlendi ve tüm ölçümler bu potansiyelde gerçekleştirildi.

2.10.8 BG/PyOX temelli biyosensörlerin karakterizasyonu

2.10.8.1 Sellobioz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Hazırlanan BG/PyOx biyosensörlerinin analitik karakterizasyonu amacı ile sellobioz için doğrusal tayin aralığının, analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin ve operasyonel kararlılığın belirlenmesine yönelik çalışmalar yapıldı. CHIT ile hazırlanan BG/PyOx biyosensörü için analitik karakterizasyon yapılırken CNT/BG/PyOx biyosensör sistemleri için de aynı çalışmalar gerçekleştirildi. Ölçümler sodyum fosfat tamponunda (pH 6; 50 mM), 35 ^{o}C ve -700 mV'da gerçekleştirildi. Sellobioz için doğrusal tayin aralığı belirlenirken çalışma ortamına stok sellobioz çözeltilerinden farklı miktarlarda eklenerek elde edilen akım değerleri kaydedildi. Daha sonra sellobioz konsantrasyonuna bağlı akım değerindeki farklanma arasında kalibrasyon grafikleri çizildi.

2.10.8.2 Tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılığın belirlenmesi

Bu çalışmada CNT/BG/PyOx ve BG/PyOx sistemlerinin tekrar kullanılabilirliği incelendi. İlgili sistemle 1 mM sellobioz içeren standartlar kullanılarak ölçüm yapıldı. Bu işlemler sonucunda çalışma koşullarında, her iki biyosensörler sistemi için SS ve % VK hesaplandı.

Biyosensörlerin operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensörler daha önce optimizasyonu yapılarak belirlenmiş olan çalışma sıcaklığında ve çalışma tamponu içinde bekletilerek 1 mM sellobioz standardı için ölçümler gerçekleştirildi. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevapları %100 kabul edilerek belirli zaman dilimlerinde yapılan ölçümlerde elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı. Ölçümler sodyum fosfat tamponunda (pH 6; 50 mM), 35 ^{o}C ve -700 mV'da gerçekleştirildi.

2.10.9 Farklı karbohidratlar için doğrusal tayin aralıklarının belirlenmesi

Hazırlanan BG/PyOx biyosensörleri ile diğer bazı karbohidratların tayin edilip edilemeyeceğinin anlaşılması için glukoz, mannoz, fruktoz, galaktoz, ksiloz, maltoz, laktoz, sakkaroz ve N-asetilglukozamin kullanılarak ölçümler

yapıldı. Ölçümler sodyum fosfat (50 mM pH 6), 35 ^{o}C ve -700 mV'da gerçekleştirildi.

2.10.10 Örneklerde sellobioz analizi

G. oxydans hücrelerinin Bölüm 2.4.3, Çizelge 2.3'de belirtilen büyüme ortamları hazırlandı, 5 g/l sellobioz karbon kaynağı olarak kullanıldı ve zamana bağlı olarak ortamdaki sellobioz konsantrasyonu BG/PyOx ve CNT/BG/PyOx biyosensörü ile belirlendi. Elde edilen sonuçlar HPLC ile elde edilen değerlerle kıyaslandı. HPLC ile yapılan çalışmanın kolon özellikleri ve ayırma koşulları Bölüm 2.16.1'de ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

2.11 β-Gal/PyOx Temelli Biyosensör Sistemine Yönelik Çalışmalar

2.11.1 Enzim miktarlarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

β-Gal/PyOx enzimlerini içeren çiftli enzim sistemini temel alan biyosensörlerin hazırlama koşullarının optimizasyonuna yönelik çalışmalarda ilk olarak β-gal ve PyOx enzimlerinin biyosensör cevabına etkisi incelendi. Aşağıdaki çizelgede verilen değerlerde β-gal aktivitesine sahip biyosensörler hazırlandı ve laktoz tayini amacıyla kullanıldı:

β-Gal /PyOx	**β-Gal (U)**	PyOx (U)	CHIT (%)	Glutaraldehid (%)
I	**0,3**	6,0	1,0	1,0
II	**0,6**	6,0	1,0	1,0
III	**0,9**	6,0	1,0	1,0

Biyobileşenlerden β-Gal enziminin aktivitesi belirlendikten sonra laktoz tayini amacı ile en yüksek biyosensör cevabının elde edildiği PyOx miktarı belirlendi. PyOx aktiviteleri biribirinden farklı olan üç adet β-gal/PyOx biyosensörü aşağıdaki oranlar kullanılarak hazırlandı:

β-Gal /PyOx	β-Gal (U)	**PyOx (U)**	CHIT (%)	Glutaraldehid (%)
I	0,6	**3,0**	1,0	1,0
II	0,6	**6,0**	1,0	1,0
III	0,6	**9,0**	1,0	1,0

2.11.2 CHIT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmında diğer bileşenler sabit tutularak CHIT miktarındaki farklanmanın biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi. Farklı konsantrasyonlardaki CHIT çözeltileri β-gal/PyOx biyosensörü hazırlamak için kullanıldı ve dizayn edilen biyosensör sistemleri kullanılarak laktoz konsantrasyonuna bağlı akım değerindeki farklanmaya yönelik grafikler çizildi. Bu amaçla β-gal/PyOx biyosensörlerini hazırlamak için kullanılan CHIT konsantarsyonu ve diğer biyobileşenlerin oranları aşağıdaki çizelgede verilmiştir:

β-gal /PyOx	β-gal (U)	PyOx (U)	**CHIT (%)**	Glutaraldehid (%)
I	0,6	6,0	**0,5**	1,0
II	0,6	6,0	**1,0**	1,0
III	0,6	6,0	**2,0**	1,0

2.11.3 Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

β-Gal/PyOx enzimlerinin grafit elektrot yüzeyine immobilize edilmesindeki bir diğer önemli bileşen çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan glutaraldehiddir. β-Gal, PyOx ve CHIT miktarları daha önce çalışmalarda optimize edilen değerlerde sabit tutularak bu çalışmada glutaraldehid miktarı değiştirildi. Bu şekilde üç farklı konsantrasyonda çapraz bağlayıcı ajan ile üç farklı biyosensörler hazırlandı, kullanılan glutaraldehid oranları aşağıdaki şekildedir:

β-Gal/PyOx	β-Gal (U)	PyOx (U)	CHIT (%)	**Glutaraldehid (%)**
I	0,6	6,0	1,0	**0,5**
II	0,6	6,0	1,0	**1,0**
III	0,6	6,0	1,0	**1,5**

2.11.4 CNT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

Doğal bir polimer olan kitosanın CNT ile modifikasyonu sonrası elde edilen CHIT-CNT çözeltileri farklı konsantrasyonlarda CNT içerek şekilde hazırlandı ve 3 farklı β-Gal/PyOx biyosensörünün hazırlanmasında kullanıldı, farklı miktarlarda CNT içeren çözeltilerle hazırlanan bienzimatik biyosensörlerin oranları aşağıda görülmektedir:

β-Gal/PyOx	β-Gal (U)	PyOx (U)	**CHIT-CNT (mg/ml CNT)**	Glutaraldehid (%)
I	0,6	6,0	**0,2**	1,0
II	0,6	6,0	**0,5**	1,0
III	0,6	6,0	**1,0**	1,0

2.11.5 Optimum pH'nın belirlenmesi

Optimize edilen miktarlarda β-gal, PyOx, CHIT ve glutaraldehid içeren β-gal/PyOx biyosensörleri hazırlanarak 50 mM pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 sodyum fosfat tamponlarının biyosensör cevabına etkisi incelendi. Ayrıca biyosensör hazırlanmasında kullanılan CNT varlığının optimum pH'ı etkileyip etkilemediğini test etmek için CNT/β-gal/PyOx biyosensörleri ile ölçümler yapıldı.

2.11.6 Optimum sıcaklığın belirlenmesi

β-Gal/PyOx biyosensörlerinin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 25–42 ^{o}C aralığındaki sıcaklıklarda ölçümler alındı. Elde edilen akım değerlerindeki farklardan her bir sıcaklık için bağıl biyosensör cevapları hesaplanarak sıcaklığa bağlı % biyosensör cevabı grafikleri oluşturuldu.

2.11.7 Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

β-Gal/PyOx biyosensörleri ile çalışma potansiyeli belirlemek amacıyla -850 ile -550 mV'da ölçümler alındı. Uygulanan potansiyel ile % biyosensör cevabı arasında çizilen grafiklerden çalışılması en uygun olan potansiyel belirlendi.

2.11.8 β-Gal/PyOx temelli biyosensörlerin karakterizasyonu

2.11.8.1 Laktoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Optimize edilen hazırlama koşulları ile dizayn edilen β-Gal/PyOx biyosensörleri ile uygun çalışma koşulları kullanılarak laktoz tayinine yönelik kalibrasyon grafikleri hazırlandı. Ayrıca CHIT-CNT çözeltisi ile hazırlanan biyosensörler için yapıda CNT varlığının biyosensör cevabını etkileyip etkilemediği test edildi.

2.11.8.2 Tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılığın belirlenmesi

Tekrarlanabilirliğin belirlenmesi için belirli 0,2 mM laktoz kullanılarak 10 defa ölçümler alındı, aynı işlemler CNT/β–Gal/PyOx biyosensörleri ile tekrarlandı. Elde edilen akım değerlerine karşılık gelen konsantrasyonlar ilgili kalibrasyon grafikleri yardımıyla hesaplandı ve her iki sistem için SS ve % VK bulundu.

Biyosensörlerin operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensörler daha önce optimizasyonu yapılarak belirlenmiş olan çalışma sıcaklığında ve çalışma tamponu içinde bekletilerek 0,2 mM laktoz standardı için ölçümler gerçekleştirildi. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevapları %100 kabul edilerek belirli zaman dilimlerinde yapılan ölçümlerde elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı.

2.11.9 Farklı karbohidratlar için doğrusal tayin aralıklarının belirlenmesi

β–Gal/PyOx biyosensörleri ile laktoz dışındaki, glukoz, galaktoz, ksiloz, maltoz, sellobioz, sükroz, fruktoz, N-asetilglukozamin gibi diğer mono- ve disakkaritler için doğrusal tayin aralığı belirlenmeye çalışıldı. Daha sonra laktoz yanında bir diğer karbohidartın varlığının biyosensör cevabına etkisi test edildi.

2.11.10 Örneklerde laktoz analizi

Laktoz bilindiği gibi süt şekeri olarak da isimlendirilir. Sütün yapısındaki önemli şekerlerden olduğu için farklı markalardaki sade ve muz

aromalı sütlerde laktozun tayini gerçekleştirildi. Sütlerin 5 ml'sine 1M 1 ml asetik asit eklenerek deproteinizasyon işlemi yapıldı ve 4000 g'de 10 dakika santrifüj yapılarak kazein uzaklaştırıldı. Laktozun asidik hidrolizinin engellenmesi için ortama 10 M 100 ml NaOH eklenerek ortam pH'ı nötralleştirildi (Amarita et al., 1997). Elde edilen sonuçlar spektrofotometrik DNS yöntemi ile karşılaştırıldı. Ayrıca standart katma yöntemi ile örneklere laktoz ilave edilerek elde edilen sonuçların doğruluğu test edildi.

2.12 *P. putida* Temelli Biyosensör Sistemine Yönelik Çalışmalar

Mikrobiyal biyosensörlere yönelik olarak yapılan çalışmalarda ilk olarak *P. putida* bakterileri kullanıldı. Canlı hücreler kullanılarak hazırlanan mikrobiyal biyosensörlerde daha önceki bölümlerde belirtildiği gibi hücrelerin yaşamsal aktivitelerinden gidilerek akım değerleri elde edildi. Gram negatif bir bakteri olan *P. putida* ile hazırlanan biyosensörlerde ilk olarak hücre, CHIT ve glutaraldehid miktarı gibi hazırlama koşulları optimize edildi. Daha sonra immobilizasyon materyali olarak CHIT-CNT çözeltileri kullanılarak bakteriler elektrot yüzeyine immobilize edildi. Yapıdaki CNT varlığının biyosensör cevabı ve stabilitesi üzerindeki etkisi incelendi. pH, sıcaklık ve çalışma potansiyelinin optimizasyonu sonrasında *P. putida* biyosensörlerinin glukoz tayini amacı ile kullanılıp kullanılamayacağı test edildi. Tekrarlanabilirlik çalışmaları sonrasında farklı karbohidratlara karşı biyosensör cevabı incelendi.

2.12.1 Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

P. putida biyosensörleri ile alınan ölçümlere hücre miktarının etksinin belirlenmesi amacıyla CHIT ve glutaraldehid miktarı sabit tutularak üç farklı miktarda hücre içeren (10, 20 ve 30 μl) mikrobiyal biyosensörler hazırlandı. Glukozun değişen konsantrasyonları ile akım değerleri arasında grafikler çizilerek en yüksek biyosensör cevabının elde edildiği hücre miktarı bulundu. Bundan sonraki çalışmalarda bu miktar kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Kullanılan hücre ve diğer biyolojik bileşenlerin miktarları şu şekildedir:

P. putida Biyosensörü	**Hücre (μl)**	CHIT (%)	Glutaraldehid (%)
I	**10**	1,0	1,0
II	**20**	1,0	1,0
III	**30**	1,0	1,0

2.12.2 CHIT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmında diğer koşullar sabit tutularak CHIT miktarları farklandırıldı. 10 µl hücre ve % 1,0 oranında glutaraldehid kullanılarak 3 farklı CHIT çözeltisi ile *P. putida* biyosensörleri hazırlandı. Kullanılan CHIT çözeltilerinin konsantrasyonları şu şekilde farklanmaktadır:

P. putida Biyosensörü	Hücre (µl)	**CHIT (%)**	Glutaraldehid (%)
I	20	**0,5**	1,0
II	20	**1,0**	1,0
III	20	**2,0**	1,0

2.12.3 Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

Glutaraldehid, CHIT ile hazırlanan biyosensörlerde çapraz bağlayıcı reaktif olarak görev yapmaktadır. Glutaraldehid yüzdesinin *P. putida* biyosensörleri ile edilen akım değerlerine olan etkisini belilemek bu bölümde amaçlandı ve şu oranlarda glutaraldehid içeren biyosensörler hazırlandı:

P. putida Biyosensörü	Hücre (µl)	CHIT (%)	**Glutaraldehid (%)**
I	20	1,0	**0,5**
II	20	1,0	**1,0**
III	20	1,0	**1,5**

2.12.4 CNT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

P. putida biyosensörleri ile elde edilen biyosensör cevaplarına, immobilizasyon materyali olarak kullanılan CHIT'ın CNT ile modifikasyonunun nasıl etki yapacağı bu bölümde test edildi. Bienzimatik biyosensörlerde olduğu gibi mikrobiyal biyosensörlerde de farklı miktarlarda CNT içeren CHIT-CNT çözeltileri hazırlanıp bunlar hücre immobilizasyonunda matriks olarak kullanıldı. Hazırlanan üç farklı *P. putida* biyosensörünün içerdiği CHIT-CNT çözeltilerindeki CNT miktarları aşağıda verilmektedir:

P. putida Biyosensörü	Hücre (µl)	Glutaraldehid (%)	**CHIT-CNT (mg/ml CNT)**
I	20	1,0	**0,1**
II	20	1,0	**0,2**
III	20	1,0	**0,5**

2.12.5 Optimum pH'nın belirlenmesi

Bu bölümde *P. putida* biyosensörlerinin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 50 mM pH 5,0; 5,5 sodyum asetat tamponları ve 50 mM pH 6,0; 6,5; 7,0 sodyum fosfat tamponları kullanılarak akım değerlerindeki farklanma belirlendi. Elde edilen akım değerlerinden % biyosensör cevapları hesaplanarak optimum pH grafikleri oluşturuldu. En iyi biosensör cevabının alındığı pH değeri ile hazırlanan tampon sistemi tüm çalışmalarda ölçüm tamponu olarak kullanıldı.

2.12.6 Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Mikrobiyal biyosensörün optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla termostatik ölçüm hücresi kullanılarak 20–40 ^{o}C arasındaki sıcaklıklarda ölçümler gerçekleştirildi. Sıcaklık ile % biyosensör cevabına ilşikin optimum sıcaklık grafikleri oluşturulduktan sonra optimum sıcaklık değeri bulundu.

2.12.7 Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Oksijenin izlenmesini temel alan ölçüm sisteminde, uygulanacak potansiyelin *P. putida* biyosensörleri ile elde edilecek biyosensör cevabına etkisi bu bölümde test edildi. Elde edilen akım değerlerindeki farklanmadan yola çıkılarak % biyosensör cevapları hesaplandı ve grafikler oluşturuldu.

2.12.8 *P. putida* temelli biyosensörlerinin analitik karakterizasyonu

2.12.8.1 Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Optimize edilen hazırlama ve çalışma koşulları kullanılarak *P. putida* biyosensörleri ile glukoz tayini gerçekleştirildi. Farklı konsantrasyonlardaki glukoz çözeltileri çalışma tamponuna eklenerek konsantrasyona bağlı akım

değerindeki farklanmalar kaydedildi. Daha sonra glukoz konsantrasyonu ile akım değerindeki farklanma arasında grafikler çizildi. Ayrıca yapıda CNT varlığının doğrusal tayin aralığı ve biyosensör cevabını ne yönde etkileyeceği incelendi.

2.12.8.2 Tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılığın belirlenmesi

Hazırlanan *P. putida* biyosensörlerinin tekrarlanabilirliğinin test edilmesi amacıyla 0,7 mM glukoz standardı ile ard arda 10 ölçüm alınarak hem CHIT/*P. putida* hem de CHIT-CNT/*P. putida* biyosensörleri için ilgili kalibrasyon grafikleri kullanılarak SS ve % VK değerleri hesaplandı.

Operasyonel kararlılığın belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan CHIT/*P. putida* hem de CHIT-CNT/*P. putida* biyosensörleri ile gün içindeki belirli aralıklarla ölçüm alındı ve zamanla akım değerindeki düşmeden yararlanılarak ne kadar süre aktivite kaybetmeden kullanılabilecekleri belirlenmiş oldu.

2.12.9 Farklı karbohidratlar için doğrusal tayin aralıklarının belirlenmesi

Mikroorganizmaların içerdikleri birçok enzimden dolayı, mikrobiyal biyosensörler için çok farklı bileşikler substrat olarak kullanılabilir. Bazı bileşiklere mikrobiyal biyosensörlerle cevap elde edilebilmesi için mikroorganizmaların adaptasyonu gerekmektedir. *P. putida* hücrelerinin diğer karbohidratların tayini için de kullanılıp kullanılamayacağı bu bölümde test edildi. Daha sonra glukozun yanında ikinci bir karbohidratın varlığının biyosensör cevabını nasıl etkilediğine ilişkin çalışmalar yapıldı.

2.13 *P. fluorescens* Temelli Biyosensör Sistemine Yönelik Çalışmalar

Bu bölümdeki çalışmalarda mikrobiyal biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan bir diğer mikroorganizma *P. fluorescens* hücreleridir. Bakteri hücreleri canlı olarak grafit elektrot yüzeyine CHIT ve çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehid vasıtasıyla immobilize edildi. Hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrasında *P. fluorescens* biyosensörleri ile glukoz tayin aralığı belirlendi, tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılık çalışmaları yapıldı. Son olarak substrat spesifikliği çalışmaları yapılarak *P. fluorescens* biyosensörlerine ilişkin çalışmalar tamamlandı.

2.13.1 Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

P. fluorescens biyosensörlerinin optimizasyon çalışmalarına yönelik olarak yapılan ilk deneme hücre miktarının belirlenmesidir. Mikrobiyal biyosensörler hazırlanırken ilk olarak hücreler santrifüjlendi ve hücre pastaları sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0; 50 mM) çözüldü. Daha sonra 10, 20 ya da 30 µl hücre ve 20 µl % 1'lik glutaraldehid CHIT ile modifiye edilmiş grafit elektrot yüzeyine eklenerek *P. fluorescens* biyosensörleri hazırlandı. Her üç biyosensör için de glukoz susbstrat olarak kullanıldı ve glukozun tayinine yönelik grafikler oluşturuldu. Kullanılan hücre ve diğer biyolojik bileşenlerin miktarları aşağıda özetlenmiştir:

P. fluorescens Biyosensörü	**Hücre (µl)**	CHIT (%)	Glutaraldehid (%)
I	**10**	1,0	1,0
II	**20**	1,0	1,0
III	**30**	1,0	1,0

2.13.2 CHIT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmında diğer bileşenler sabit tutularak CHIT miktarı değiştirilmesiyle 3 farklı biyosensör sistemi hazırlandı. Her bir sistem için glukoz derişimine bağlı olarak akım değerindeki değişim izlendi. Çizilen grafikler sonrasında optimum CHIT miktarı belirlendi. CHIT miktarı farklandırılarak hazırlanan *P. fluorescens* biyosensörlerinin biyolojik tabaka oranları şu şekildedir:

P. fluorescens Biyosensörü	Hücre (µl)	**CHIT (%)**	Glutaraldehid (%)
I	20	**0,5**	1,0
II	20	**1,0**	1,0
III	20	**2,0**	1,0

2.13.3 Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

Glutaraldehid miktarının *P. fluorescens* biyosensörleri ile elde edilen akım değerlerini nasıl etkilediği bu bölümde araştırıldı. Hücre miktarı ve CHIT yüzdesi sabit tutulup aşağıdaki yüzdelerde glutaraldehid kullanılarak 3 farklı *P.fluorescens* biyosensörü hazırlandı:

P. fluorescens Biyosensörü	Hücre (µl)	CHIT (%)	**Glutaraldehid (%)**
I	20	1,0	**0,5**
II	20	1,0	**1,0**
III	20	1,0	**1,5**

2.13.4 CNT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

Bu çalışmada, farklı miktarlarda CNT ile modifiye edilen CHIT çözeltileri ile CHIT-CNT/*P. fluorescens* biyosensörleri hazırlandı. Daha sonra glukoz tayinine yönelik kullanılabilirlikleri incelendi ve en yüksek akım değerlerinin elde edildiği CNT miktarı belirlendi. Bu amaca yönelik olarak hazırlanan CHIT-CNT/*P. fluorescens* biyosensörlerinin bileşimi aşağıda verilmiştir:

P. fluorescens Biyosensörü	Hücre (µl)	Glutaraldehid (%)	**CHIT-CNT (mg/ml CNT)**
I	20	1,0	**0,1**
II	20	1,0	**0,2**
III	20	1,0	**0,5**

2.13.5 Optimum pH'ın belirlenmesi

CHIT/P. *fluorescens* ve CHIT-CNT/*P. fluorescens* biyosensörlerinin optimum pH'ını belirlemek amacıyla 50 mM pH 5,0; 5,5 sodyum asetat tamponları ve 50 mM pH 6,0; 6,5; 7,0 sodyum fosfat tamponları kullanılarak ölçümler alındı. pH ile % biyosensör cevabı arasındaki ilişkiyi gösteren optimum pH grafikleri oluşturuldu.

2.13.6 Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Hazırlanan mikrobiyal biyosensörlerin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 20–42 ^{o}C aralığında düşük sıcaklıktan yükseğe doğru ölçümler alındı. Sıcaklık değişimine bağlı olarak farklanan biyosensör cevapları arasında çizilen grafiklerden, hazırlanan biyosensörler için optimum sıcaklık değerleri elde edildi ve *P. fluorescens* biyosensörleri ile yapılan tüm ölçümlerde bu sıcaklık değeri kullanıldı.

2.13.7 Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

P. fluorescens biyosensörleri ile yapılacak ölçümlerde kullanılacak potansiyelin belirlenmesi amacı ile -550 ile -850 mV arasındaki potansiyellerde çalışıldı. Oluşturulan grafiklerden çalışma potansiyeli belirlendi. Ayrıca CNT modifikasyonun çalışma potansiyelini etkileyip etkilemediğini test etmek amacıyla aynı potansiyellerde ölçümler CHIT-CNT/*P. fluorescens* biyosensörleri için de tekrarlandı.

2.13.8 *P. fluorescens* temelli biyosensörlerin karakterizasyonu

2.13.8.1 Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Optimize edilen koşullarda *P. fluorescens* biyosensörlerinin glukoz tayinine yönelik kullanımı test edildi. Değişen derişimlerde glukoz çözeltileri çalışma tamponuna eklenerek her biri için akım değerleri kaydedildi ve glukoz için doğrusal tayin aralığı belirlendi. Ayrıca CHIT modifikasyonunun tayin aralığına ve akım değerlerine etkisi araştırıldı.

2.13.8.2 Tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılığın belirlenmesi

Tekrarlanabilirlik çalışmaları kapsamında 0,4 mM glukoz standart çözeltisi ile ard arda 10 ölçüm yapılarak CHIT/P. *fluorescens* ve CHIT-CNT/*P. fluorescens* biyosensörleri için SS ve % VK hesaplandı.

Operasyonel kararlılığa yönelik çalışmalarda CHIT/P. *fluorescens* ve CHIT-CNT/*P. fluorescens* biyosensörlerinin her ikisi ile 4 saat boyunca ölçümler

alındı. Bu sürenin sonunda elde edilen akım değerlerinden % aktivite kaybı hesaplandı.

2.13.9 Farklı karbohidratlar için doğrusal tayin aralıklarının belirlenmesi

CHIT/P. *fluorescens* ve CHIT-CNT/*P. fluorescens* biyosensörleri kullanılarak galaktoz, mannoz, fruktoz, ksiloz gibi monosakkaritler ile maltoz, laktoz, sükroz ve sellobioz gibi disakkaritler ve ayrıca N-asetilglukozamin için doğrusal tayin aralıkları belirlenmeye çalışıldı. Bunlara ek olarak, glukozun yanında bir diğer bileşiğin varlığının biyosensör cevabına etkisi araştırıldı.

2.14 *G. oxydans* Temelli Biyosensör Sistemine Yönelik Çalışmalar

P. putida ve *P. fluorescens* hücreleri kullanılarak hazırlanan biyosensör sistemleri ile karbohidrat tayinine yönelik çalışmalar tamamlandıktan sonra asetik asit bakterilerinden *G. oxydans* hücreleri ile mikrobiyal biyosensörler hazırlandı. Tasarlanan *G. oxydans* biyosensörlerinin optimizasyonu sonrasında analitik karakterizasyonu ve substrat spesifikliği çalışmaları yapıldı. Ayrıca CNT varlığının biyosensör cevabına etkileri araştırıldı.

2.14.1 Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

G. oydans biyosensörlerinin optmizasyon çalışmalarında ilk olarak hücre miktarının optimizasyonu gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası elde edilen hücre pastası 50 µl 50 mM, pH 7,0 sodyum fosfat tamponunda çözüldü. CHIT ile modifiye edilmiş grafit elektrot yüzeyine 20 µl glutaraldehid çözeltisi ile birlikte 5, 10 ve 20 µl hücre pipetlenerek 3 farklı *G. oxydans* biyosensörü hazırlandı:

G. oxydans Biyosensörü	**Hücre (µl)**	CHIT (%)	Glutaraldehid (%)
I	**5**	1,0	1,0
II	**10**	1,0	1,0
III	**20**	1,0	1,0

2.14.2 CHIT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

Hücre miktarı optimize edildikten sonra ikinci olarak CHIT miktarının biyosensör cevabına etkisi incelendi. Hazırlanan 3 farklı biyosensör sistemi ile glukoz konsantrasyonu ile akım değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafikler oluşturuldu ve en yüksek akım değerlerinin elde edildiği CHIT miktarı belirlendi. 3 farklı *G. oxydans* biyosensörünü hazırlamak için kullanılan biyobileşenlerin miktarları şöyledir:

G. oxydans Biyosensörü	Hücre (µl)	**CHIT (%)**	Glutaraldehid (%)
I	10	**0,5**	1,0
II	10	**1,0**	1,0
III	10	**2,0**	1,0

2.14.3 Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

G. oxydans biyosensörleri hazırlanırken optimize edilen son parametre glutaraldehid miktarıdır. Hücre miktarı ve CHIT miktarı sabit tutularak üç farklı glutaraldehid konsantrasyonu ile immobilizasyon gerçekleştirildi:

G. oxydans Biyosensörü	Hücre (µl)	CHIT (%)	**Glutaraldehid (%)**
I	10	0,5	**0,5**
II	10	1,0	**1,0**
III	10	2,0	**1,5**

2.14.4 CNT miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi

Farklı miktarlarda CNT içeren stok CHIT-CNT çözeltileri kullanılarak *G. oxydans* biyosensörleri hazırlandı. Hücre miktarı ve glutaraldehid yüzdesi sabit olacak şekilde 3 farklı biyosensör tasarlandı:

G. oxydans Biyosensörü	Hücre (µl)	Glutaraldehid (%)	**CHIT-CNT (mg/ml CNT)**
I	10	1,0	**0,2**
II	10	1,0	**0,5**
III	10	1,0	**0,7**

2.14.5 Optimum pH'nın belirlenmesi

CHIT/*G. oxydans* ve CHIT-CNT/*G. oxydans* biyosensörlerinin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 50 mM pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 sodyum fosfat tamponlarında ölçümler alındı. pH ile % biyosensör cevabı arasında çizilen optimum pH grafiklerinden çalışma tamponu belirlendi.

2.14.6 Optimum sıcaklığın belirlenmesi

G. oxydans biyosensörlerinin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 20–40 ^{o}C arasında ölçümler yapıldı. Sıcaklık ve buna bağlı olarak elde edilen akım değerleri kaydedildi. Sıcaklık ile % biyosensör cevabı arasında çizilen grafiklerde optimum sıcaklık değeri bulundu.

2.14.7 Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Bu çalışmada CHIT/*G. oxydans* ve CHIT-CNT/*G. oxydans* biyosensörlerinin hazırlanmasına yönelik koşullar optimize edildikten sonra, çalışma potansiyelinin bulunması hedeflendi. Bu nedenle -550 ile -850 mV arasında ölçümler alınarak uygulanan potansiyele karşılık gelen akım değerleri kaydedildi. Potansiyel ile % biyosensör cevabı arasında grafikler çizildi ve uygun çalışma potansiyeli belirlendi.

2.14.8 *G. oxydans* temelli biyosensörlerin karakterizasyonu

2.14.8.1 Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Optimize edilen koşullarda CHIT/*G. oxydans* ve CHIT-CNT/*G. oxydans* biyosensörleri kullanılarak glukoz tayini gerçekleştirildi. Farklı miktarlarda glukoz çalışma tamponuna eklenerek buna karşılık gelen akım değerleri

kaydedildi. Glukoz konsantrasyonu ve akım arasındaki kalibrasyon grafikleri oluşturularak glukoz için doğrusal tayin aralıkları belirlendi.

2.14.8.2 Tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılığın belirlenmesi

Analitik karakterizasyon çalışmalarında ikinci adım hazırlanan *G. oxydans* biyosensörleri ile tekrarlanabilir ölçüm alınıp alınmadığını test etmekti. Biyosensörler için tekrarlanan işlemler sonrasında ilgili sistemin kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptandı. Her iki sistem için 0,4 mM glukoz içeren standartlar kullanılarak 10 ölçüm yapıldı. CHIT/*G. oxydans* ve CHIT-CNT/*G. oxydans* biyosensörlerinin her ikisi için de SS ve % VK hesaplandı.

Hazırlanan CHIT/*G. oxydans* ve CHIT-CNT/*G. oxydans* biyosensörlerinin operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla daha önce optimizasyonu yapılan koşullarda ard arda ölçümler alınmıştır. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevabı % 100 kabul edilerek 5 saat boyunca yapılan ölçümlerde elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı.

2.14.9 Farklı bileşikler için doğrusal tayin aralıklarının belirlenmesi

Hazırlanan mikrobiyal sensör ile diğer bazı bileşiklerin tayin edilip edilemeyeceğinin anlaşılması için mannoz, galaktoz, ksiloz, maltoz, laktoz, sükroz, fruktoz, sellobioz, N-asetilglukozamin, etanol ve metanol kullanılarak ölçümler yapıldı. Ölçümler fosfat (50 mM; pH 7,0), 30 ^{o}C ve -700 mV'da gerçekleştirildi. Ayrıca glukoz yanında diğer bileşiklerin varlığının biyosensör cevabına etkisi bu bölümde incelendi.

2.15 CHIT-CNT ile Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu için Yapılan Çalışmalar

Bu bölümde CHIT ve CHIT-CNT ile modifiye edilen grafit elektrotlara biyolojik moleküller immobilize edilmeden medyatörlü biyosensörlerde kullanımına yönelik çalışmalar yapıldı. -200 ile 600 mV potansiyel aralığında, sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0; 50 mM) ve 5 mM varlığında $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ gerçekleştirilen döngüsel voltammetrik çalışmalarla CHIT ve CHIT-CNT ile modifiye edilen grafit elektrotların elektrokimyasal özellikleri test edildi. Yapıya

CNT eklenmesinin elektrokimyasal özelliklere etkisi incelendi. Ayrıca farklı tarama hızlarında ölçümler alınarak CNTlerin $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ mekanizmasına etkisi araştırıldı.

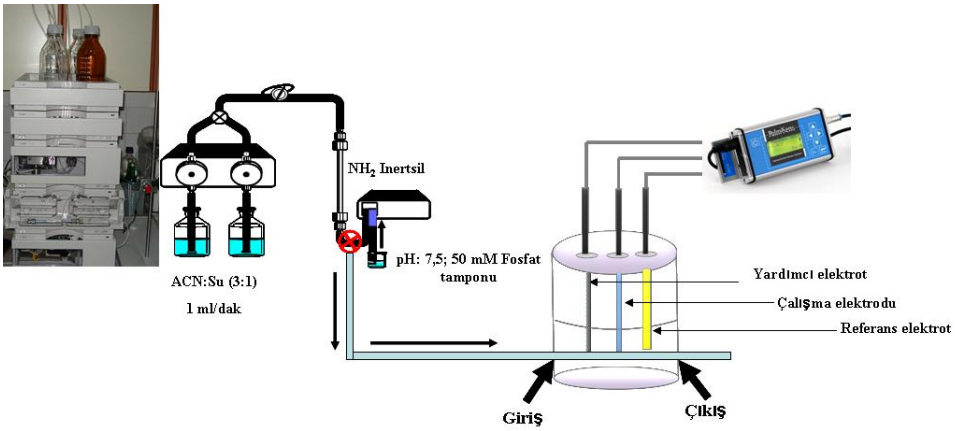
2.16 HPLC Sonrası Dedektör Olarak Kullanım

2.16.1 HPLC ile ayırım ve ölçüm koşulları

HPLC ile karbohidratların ayrımı için Inertsil NH_2 kolon kullanıldı. Enjeksiyon hacmi 20 µl ve kolon sıcaklığı 30 ˚C olarak ayarlandı. Mobil faz olarak asetonitril: su (3:1; v/v) ve akış hızı olarak 1.0 ml/dak. kullanıldı. Refraktif indeks dedektör (RID) ve PyOx biyosensörleri kullanılarak karbohidratlar analizlendi (Plaga et al., 1989). PyOx biyosensörlerinin kolon sonrası dedektör olarak kullanılabilmesi için HPLC ile kombinasyonu dizayn edilen akış hücresi vasıtasıyla sağlandı. Ölçümler sırasında asetonitrilin enzimin aktivitesine olumsuz etkisini bertaraf etmek amacıyla kolondan çıkan mobil faz sodyum fosfat tamponu (pH: 7,5; 50 mM) ile seyreltildi. Tasarlanan bu akış hücresi ve HPLC ile PyOx biyosensörlerinin kombinasyonuna ilişkin hazırlanan düzenek Şekil 2.4'te ayrıntılı olarak verilmiştir. Karbohidratlar HPLC-RID sistemine tek tek enjekte edildikten sonra her biri için kolondan çıkış süresi belirlendi. Daha sonra karışım halinde enjekte edilen karbohidratların her biri için standart grafikler çizildi. HPLC ile ayırım sonrasında dedeksiyon için PyOx biyosensörleri kullanılırken aynı yöntem tekrarlandı. RID ve PyOx biyosensörleri kullanılarak ksiloz, fruktoz, glukoz, galaktoz, sükroz, maltoz, laktoz için kalibrasyon grafikleri oluşturulmaya çalışıldı.

2.16.2 Örnek uygulama

Farklı örneklerde (Gazlı içecek, bal) glukoz miktarını belirlemek amacıyla hem refraktif indeks dedektör hem de PyOx biyosensörleri kullanıldı. İlk olarak örnekler ultra saf su ile 5 kat seyreltildi. Daha sonra yürütücü faz olarak kullanılan asetonitrilin eklenmesi sonucu örnekler 20 kat seyreltildi. Ardından, membran filtreden geçirilen örnekler kolona enjekte edildi. Daha sonra glukoz düzeyleri ilgili kalibrasyon grafikleri vasıtasıyla hesaplandı.



Şekil 2.4. PyOx biyosensörlerinin HPLC ile kombinasyonunda kullanılan akış hücresinin şematik gösterimi.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 PyOx Temel Alan Enzim Sensörlerine İlişkin Bulgular

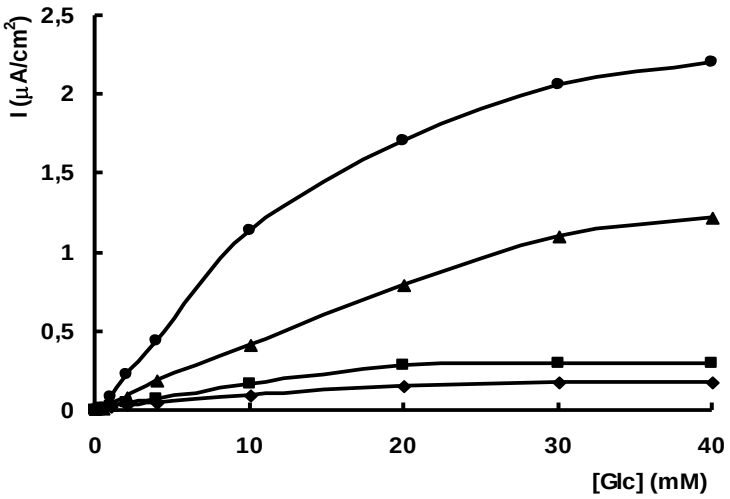
Karbon pasta ve CNT pasta elektrotlar kolay hazırlanmaları ve yüzeylerinin yenilenebilmeleri nedeniyle elektrot modifikasyonları için birçok çalışmada tercih edilmektedirler (Antiochia and Gorton, 2007). Bu kısımda, glukoz tayini amacı ile karbon pasta elektrotlar kullanılarak hazırlanan PyOx biyosensörleri ile yapılan çalışmalara ilişkin sonuçlar verilmiştir. Öncelikle çalışma ve sensörlerin hazırlanmasına ilişkin parametrelere yönelik elde edilen sonuçlar, daha sonra CNT ile modifikasyonun biyosensör cevabına etkisi, analitik karakterizasyon ve son olarak hazırlanan PyOx biyosensörlerinin örneklerde glukoz tayini amacıyla kullanımına ilişkin veriler sunulmuştur.

3.1.1 Optimizasyon çalışmaları

PyOx biyosensörlerinin optimizasyonuna ilişkin çalışmalarda çeşitli parametrelerin biyosensör cevabına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, hazırlama koşullarının optimizasyonuna yönelik olarak enzim miktarının ve CNT miktarının biyosensör cevabına etkisi, çalışma koşullarının optimizasyonuna yönelik olarak ise çalışma potansiyelinin, pH ve sıcaklığın biyosensör cevabına etkisi araştırılmıştır.

3.1.1.1 Enzim miktarının optimizasyonu

Çalışmanın bu kısmında diğer bileşenler sabit tutularak farklı miktarlarda PyOx içeren biyosensörlere ilişkin sonuçlar verilmektedir. Hazırlanan PyOx biyosensörleri ile farklı glukoz konsantrasyonları ve akım yoğunluğu arasında grafikler oluşturulmuştur. Şekil 3.1'den görüldüğü gibi 1,0 ve 3,0 U PyOx ile hazırlanan enzimatik biyosensörlerle elde edilen akım değerleri 6,0 ve 8,0 U PyOx kullanılarak elde edilen akım değerlerine oranla oldukça düşüktür. Ancak 6,0 U PyOx kullanılarak hazırlanan enzimatik biyosensörle glukoz için tayin üst sınırının 30 mM iken 8,0 U PyOx ile hazırlanan biyosensörle 10 mM olduğu görülmektedir. Bu nedenle 6,0 U enzim aktivitesine sahip PyOx biyosensörleri ile çalışmalara devam edilmiştir.

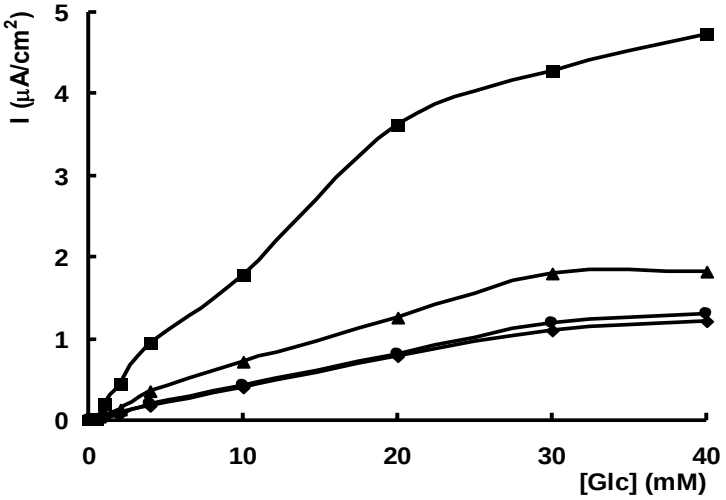


Şekil 3.1. Enzim miktarının biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 7,5 sodyum fosfat tamponu; 35 ^{o}C; 700 mV; ♦ 1 U; ■ 3 U; ▲ 6 U; ● 8 U].

3.1.1.2 CNT miktarının optimizasyonu

Birçok araştırmada farklı biyomoleküllerin redoks yeteneklerinin CNTlerin elektrokatalitik özelliklerinden etkilendiğini belirtilmiştir. Hill et al. mineral yağı, deiyonize su, nujol ya da broform içinde hazırlanmış CNTleri cam kapilerlere doldurarak elektrotlar tasarlamıştır. Oluşturulan elektrodun elektrokimyasal özelliklerini sitokrom c ve azurin kullanarak değerlendirmiştir, bu materyallerin denatüre olmadan CNT'lerle immobilize edilebileceğini göstermiştir. Wang ve Musamah ise teflonda MWCNT'lerin dispersiyonuyla kompozit elektrot hazırlamışlardır. Hidrofobik materyalin varlığında dahi CNTler yüksek elektroaktivitesini korumuştur. Enzimatik biyosensörlerin geliştirilmesi için alkol dehidrogenaz ve glukoz oksidaz gibi enzimlerin immobilizasyonu sonrasında yapılan çalışmalarda yine olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Rubianes ve Rivas ise çalışmalarında mineral yağı bağlayıcı olarak kullanmış ve karbon nanotüp pasta elektrotları (CNTPE) kolay, hızlı ve etkili bir şekilde hazırlamıştır. CNTPE farklı materyallerin katılabilmesine olanak sağlaması, düşük zemin akım, kolay yenilenebilirlik ve kompozit yapı özelliklerine sahiptir. Ayrıca bu yeni kompozit elektrot, iyi bir elektron transfer özelliğine sahip CNTlerle kompozit materyallerin avantajlarını birleştirmiştir. Bu yeni kompozit materyalle dopamin, askorbik asit ve ürik asit gibi farklı biyomoleküllerin elektrokimyasal özellikleri incelenmiştir. Ayrıca glukoz oksidaz immobilize edilerek enzimatik glukoz biyosensörleri hazırlanmıştır. Rubianes ve Rivas tarafından gerçekleştirilen çalışmada H_2O_2 tayinine yönelik kalibrasyon grafiklerine bakıldığında CNT ile hazırlanan sistemlerin modifiye edilmeyen sisteme göre 50 kat daha duyarlı olduğu bulunmuştur. GOx kullanılarak CNT ile modifiye enzimatik biyosensör

hazırlandığında ise, modifiye olmayan sisteme göre 43 kat daha duyarlı sonuçlar elde edildiği görülmektedir (Rubianes and Rivas, 2003). Birçok çalışmada gözlenen CNT'lerin elektrokatalitik aktivitesinin bizim çalışmamızdaki etkisini incelemek amacıyla bu bölümde CPE/PyOx ve CNT/CPE/PyOx biyosensörleri kıyaslanmıştır. Bu amaç doğrultusunda 0,5; 1,0; 2,0 mg CNT içeren PyOx biyosensörleri ile glukoz tayinine yönelik elde edilen grafikler Şekil 3.2'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi 0,5 mg CNT varlığında ve CNT içermeyen elektrotlarla alınan sinyaller daha düşüktür. Ancak 2,0 mg CNT kullanıldığı zaman daha yüksek akım değerlerine ulaşılmıştır. Glukoz için tayin aralığı incelendiğinde 1,0 mg CNT içeren CNT/CPE/PyOx ile 0,2–30 mM iken, 2,0 mg CNT içeren CNT/CPE/PyOx ile 0,2–20 mM olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda, biyokompozit yapısına katılması gereken optimum CNT miktarı 1,0 mg olarak belirlenmiştir.

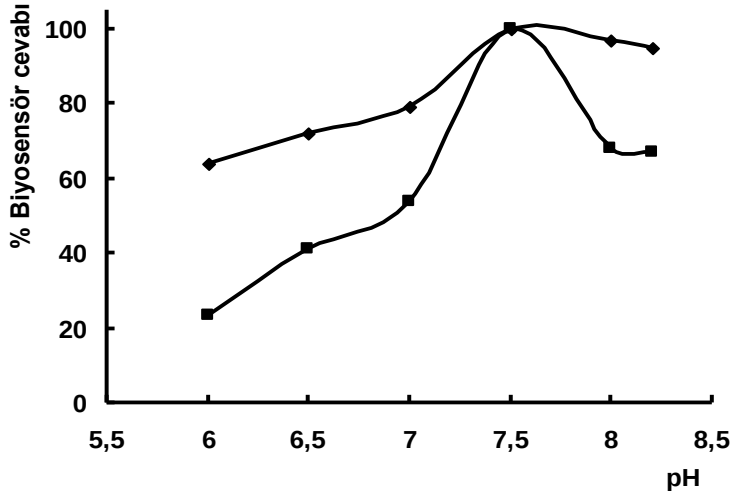


Şekil 3.2. CNT miktarının biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 7,5 sodyum fosfat tamponu; 35 °C; 700 mV; ♦ CPE/PyOx; ● CNT/CPE/PyOx (0,5 mg CNT); ▲ CNT/CPE/PyOx (1,0 mg CNT); ■ CNT/CPE/PyOx (2,0 mg CNT)].

3.1.1.3 Optimum pH

Enzimler protein yapısındaki moleküller oldukları için katalitik aktiviteleri çevre koşullarından önemli oranda etkilenmektedir. Bunlardan birisi de ortamın pH değeridir. Bu nedenle immobilizasyonun neden olduğu pH-aktivite davranışlarındaki değişimler hakkında elde edilen bilgiler, enzim proteinin yapı-fonksiyon ilişkisini anlamak ve biyosensörün optimum çalışma koşullarını belirlemek açısından faydalı olacaktır. PyOx biyosensörlerinin optimum pH'ını belirlemek amacıyla hem CPE/PyOx hem de CNT/CPE/PyOx biyosensörleri ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda pH ve % biyosensör

cevabı arasında çizilen optimum pH grafiği Şekil 3.3'de verilmiştir. Görüldüğü üzere her iki sistem için de optimum pH değeri 7,5 olarak bulunmuştur. Biyosensör hazırlanırken yapıya katılan CNT, optimum pH değerinde değişiklik yaratmamıştır. Bu sonuçlar serbest enzimin optimum pH değeri ile uyumludur (Nishimura et al., 1996).



Şekil 3.3. Biyosensör cevabına pH'ın etkisi [pH 6,0–8,2; 50 mM sodyum fosfat tamponları; 35 ^{o}C; 900 mV; ♦ CPE/PyOx; ■ CNT/CPE/PyOx].

3.1.1.4 Optimum sıcaklık

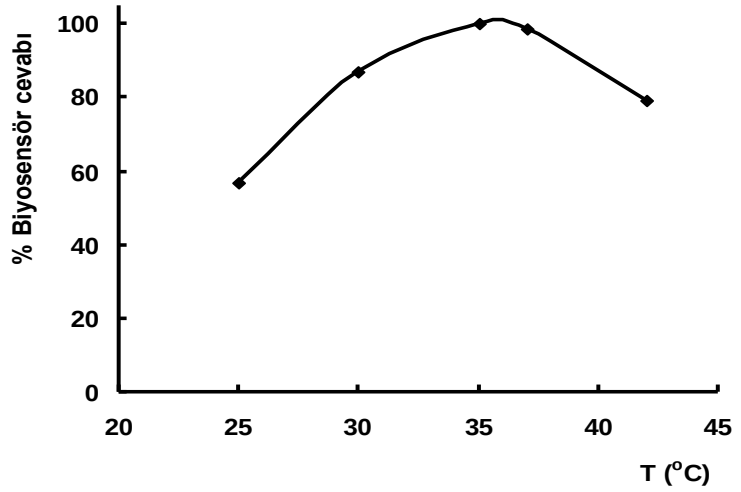
PyOx biyosensörlerinin optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik çalışmalarda 25–42 ^{o}C'de düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru CPE/PyOx biyosensörü ile ölçümler yapılarak akım yoğunluğu değerleri izlenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda sıcaklık ve % biyosensör cevabı arasında oluşturulan grafikten optimum sıcaklık 35 ^{o}C olarak bulunmuştur (Şekil 3.4). Serbest enzimin optimum sıcaklığı kaynağa bağlı olarak değişmekle beraber 45–65 ^{o}C arasındadır (http://www.brenda.uni-koeln.de). Serbest ve immobilize enzim arasındaki bu farkın kompozit matriksten kaynaklandığı, yüksek sıcaklığın kompozit yapıyı bozduğu düşünülmektedir.

3.1.1.5 Çalışma potansiyelinin optimizasyonu

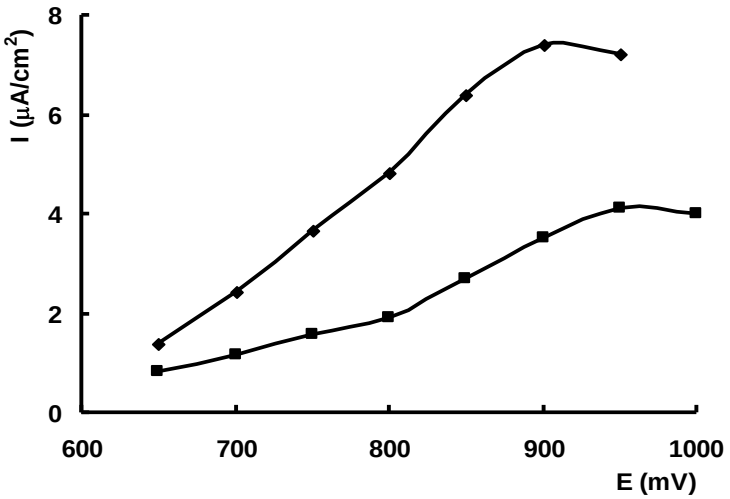
PyOx biyosensörlerinde çalışma potansiyelinin akıma etkisini belirlemek amacı ile hem CPE/PyOx hem de CNT/CPE/PyOx için çalışma potansiyeli araştırılmış ve sonuçlar birbiriyle kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.5'de verilmiştir. PyOx biyosensörleri ile çizilen hidrodinamik voltammogramlara bakıldığında CNT/CPE/PyOx biyosensörlerinin +900 mV'da, CPE/PyOx

biyosensörlerinin ise +950 mV'da maksimum biyosensör cevabına ulaştığını görmekteyiz (Şekil 3.5). Bununla birlikte H_2O_2'nin izlenmesini temel alan PyOx biyosensörleri ile bu potansiyelde ölçüm alırken oksijenin elektrokimyasından ileri gelen herhangi bir girişim söz konusu değildir (Tkac and Ruzgas, 2006).

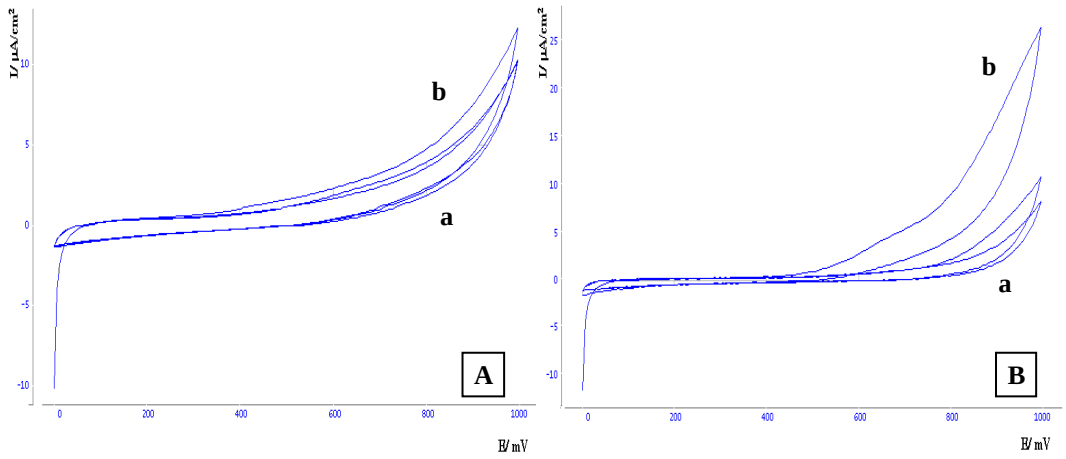
Ayrıca yine her iki sistemle glukoz varlığında ve yokluğunda döngüsel voltammetrik ölçümler alınmıştır. Şekil 3.6'dan görülmektedir ki CNT/CPE/PyOx biyosensörleri ile daha yüksek akım değerlerine ulaşılmıştır. CNTlerin H_2O_2 ve NADH gibi elektroaktif türlerin elektron transfer kinetiklerini hızlandırdığı bilinmektedir (Balasubramanian and Burghard, 2006). Ayrıca CNT modifiye elektrotlarla düşük potansiyelde H_2O_2nin amperometrik dedeksiyonu literatür verileri ile de desteklenmektedir (Lin et al., 2004b). CHIT-CNT filmleri ile camımsı karbon elektrot yüzeylerinin modifiye edildiği bir çalışmada, NADH oksidasyonu CNT ile modifiye edilmeyen elektrotlarda +0,6 V ve modifiye elektrotlarda ise +0,34 V olarak gerçekleşmiştir. NADH oksidasyonu için potansiyeldeki bu düşüş CNTlerin elektronik durumunun yüksek lokal yoğunluğuna, heliks şeklinde oluşlarına ve topolojik bozukluklara bağlanmıştır (Zhang et al., 2004).



Şekil 3.4. Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisi [50 mM, pH 7,5 sodyum fosfat tamponu; 900 mV].



Şekil 3.5. CPE/PyOx ve CNT/CPE/PyOx biyosensörlerine ilişkin hidrodinamik voltammogram [50 mM, pH 7,5 sodyum fosfat tamponu; 35 ^{o}C; ■ CPE/PyOx; ♦ CNT/CPE/PyOx; [Glc]: 20 mM].



Şekil 3.6. CPE/PyOx ve CNT/CPE/PyOx biyosensörlerine ilişkin döngüsel voltammetrik ölçümler [50 mM, pH 7,5 sodyum fosfat tamponu; 35 ^{o}C; A: CPE/PyOx; B: CNT/CPE/PyOx; a: glukoz yokken, b: 40 mM glukoz varlığında].

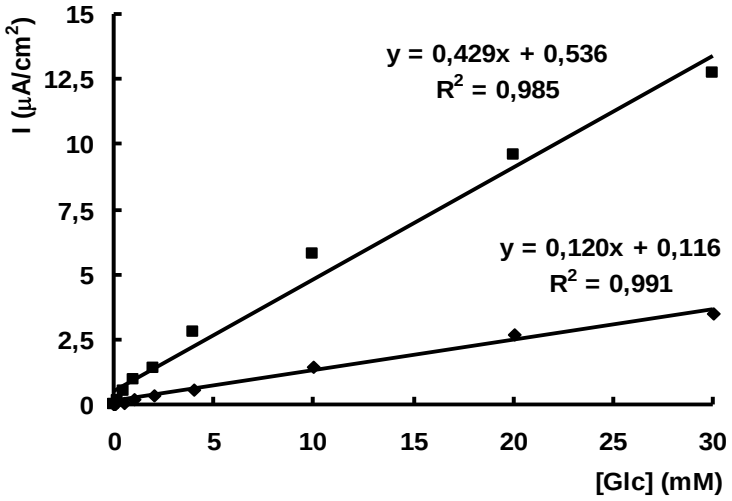
PyOx temel alarak hazırlanan enzim biyosensörlerinin analitik performansları Tablo 3.1'de kıyaslanmıştır.

3.1.2 Analitik karakterizasyon

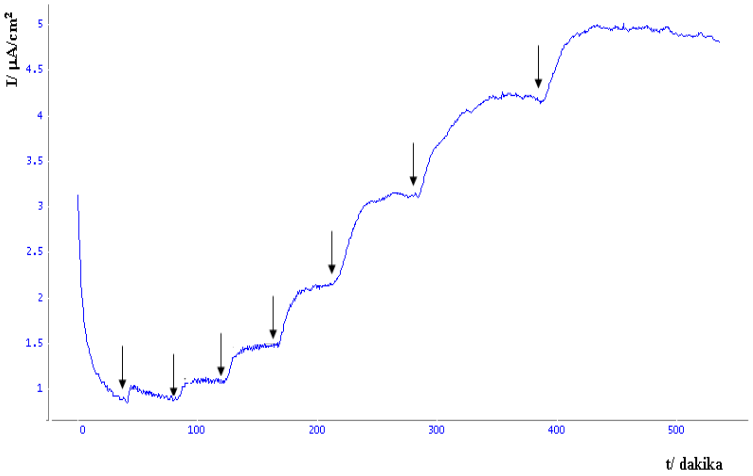
3.1.2.1 Glukoz için doğrusal tayin aralığı

Geliştirilen PyOx biyosensörlerinin hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrasında, karakterizasyonu amacıyla glukoz için ölçüm aralığı belirlenmiştir. Ayrıca CNT ile modifikasyonun akım değerlerini etkileyip

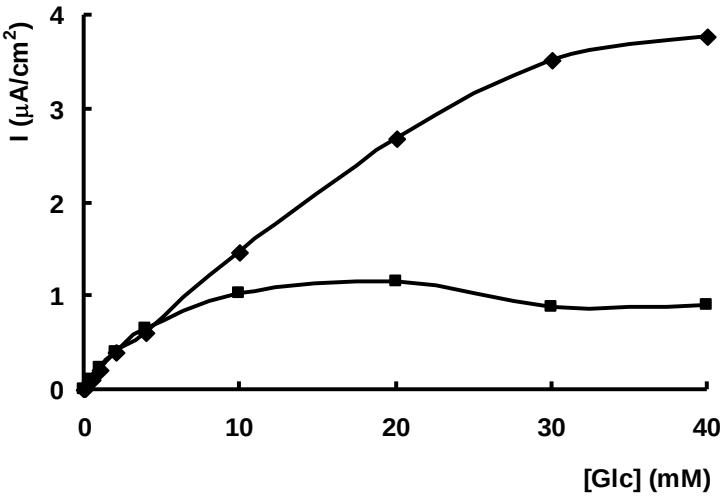
etkilemediği de bu bölümde araştırılmıştır. Şekil 3.7'den görüldüğü gibi CPE/PyOx ile 0,5–30 mM aralığında ve CNT/CPE/PyOx ile 0,2–30 mM aralığında glukoz dedeksiyonu gerçekleştirilebilmektedir. PyOx biyosensörleri ile glukoz analizi çalışmalarında cevap süresi 50 saniye olarak bulunmuştur. Farklı gruplar tarafından hazırlanan PyOx biyosensörlerinin analitik performanslarının kıyaslanması Tablo 3.1'de verilmiştir. Yapılan tüm çalışmalarda, glukoz eklenmeden önce çalışma tamponu değiştirilmiştir ancak tamponu değiştirmeden ölçüm alındığında elde edilen akım değerleri tampon değiştirilerek elde edilen akım değerleri ile CPE/PyOx biyosensörleri kullanılarak kıyaslanmıştır (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9).



Şekil 3.7. Glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği [50 mM, pH 7,5 sodyum fosfat tamponu; 35 °C; 900 mV; ♦ CPE/PyOx; ■ CNT/CPE/PyOx].



Şekil 3.8. Çalışma tamponu değiştirilmeden glukoz standart çözeltilerinin eklenmesiyle elde edilen zamana bağımlı akım değerleri [50 mM, pH 7,5 fosfat tamponu; 35 °C; +900 mV; Glc konsantrasyonları aşağıdan yukarıya doğru sırası ile: 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; 30 mM].



Şekil 3.9. CPE/PyOx biyosensörleri ile glukoz tayinine yönelik kalibrasyon grafiği [50 mM, pH 7,5 sodyum fosfat tamponu; 35 ^{o}C; +900 mV; ♦ Tamponu değiştirerek; ■ Ard arda substrat eklenerek].

Tablo 3.1. PyOx ile hazırlanan enzim biyosensörlerinin kıyaslanması.

Elektrot	İmmobilizasyon metodu	Enzim miktarı	Çalışma potansiyeli (mV)	Analitik performans			Kaynak
				Doğrusal aralık	% VK	Operasyonel stabilite	
CP	Fiziksel adsorbsiyon	110 U (HRP ile beraber)	-50	0,3-2,5 g/l	-	4 saat sonunda % 7 kayıp	Liden et al., 1998
CP	Kovalent immobilizasyon	132 U (HRP ile beraber)	-50	40-650 μM	0,3-1,3	5 saat sonunda % 20 kayıp	Liden et al., 1998
GE	OP (DGE ile çapraz bağlama)	0,43 U	+300	0,25-6 mM	2,82	8 saat sonunda % 22 kayıp	Timur et al., 2006b
GE	OP (DGE ile çapraz bağlama)	0,43 U	-80	0,125-2 mM	0,6	18 saat sonunda % 6 kayıp	Timur et al., 2006b
GE	OP (PEG-DGE ile çapraz bağlama)	0,4 U	+300	10-400 μM	4,4	-	Tasca et al., 2007
GC	Nanokompozit matrikste tutuklama	0,75 U	-700	0,05-0,75 mM	2,16	6 saat sonunda % 12 kayıp	Ozdemir et al., 2010
CP	Fiziksel adsorbsiyon	6 U	+900	0,5-30 mM	2,5	7 saat sonunda % 4 kayıp	Bu çalışma
CP MWCNT	Fiziksel adsorbsiyon	6 U	+900	0,2-30 mM	2,3	7 saat sonunda % 7 kayıp	Bu çalışma

CP: Karbon pasta; GE: Grafit elektrot; GC: Camımsı karbon; HRP: Peroksidaz; OP: Osmiyum polimeri; DGE: diglisidil eter; PEG: poli(etilen glikol)

3.1.2.2 Tekrarlanabilirlik ve operasyonel stabilite

Bu çalışmada hazırlanan biyosensörlerin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Her iki sistem için 2,0 mM glukoz içeren standartlar kullanılarak ölçüm yapılmıştır. CPE/PyOx ve CNT/CPE/PyOx biyosensörleri için 10 kez

tekrar edilen ölçümler sonrasında ilgili sistemin standart grafikleri yardımıyla derişim değerleri saptanmıştır. CPE/PyOx ve CNT/CPE/PyOx biyosensörleri için SS ve % VK sırası ile ±0,06 mM ile % 2,5 ve ±0,05 mM ile % 2,3 (n = 10) olarak hesaplanmıştır.

CPE/PyOx ve CNT/CPE/PyOx biyosensörlerinin belirlenen çalışma koşullarındaki operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla 7 saat boyunca ölçümler alınmıştır. Bu süre sonunda CPE/PyOx biyosensörlerinin aktivitesini % 7 ve CNT/CPE/PyOx biyosensörlerinin ise % 4'ünü kaybettiği gözlenmiştir.

3.1.3 Substrat spesifikliği

PyOx grup spesifik bir enzim olduğu için farklı mono- ve disakkaritler ya da aminoşekerlerin oksidasyonunu katalizleyip katalizlemediği bu çalışmada test edilmiştir. PyOx biyosensörleri ile diğer bazı karbohidratlar örneğin; mannoz, fruktoz, galaktoz, ksiloz, maltoz, laktoz, sakkaroz ve N-asetilglukozamin kullanılarak ölçümler yapılmıştır, ilgili karbohidratların analizine yönelik olarak elde edilen doğrusal tayin aralıkları ve standart grafiklerine ilişkin veriler Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. PyOx temelli biyosensörler ile karbohidrat analizi.

Substrat	Doğrusal Aralık (mM)	CPE/PyOx		CNT/CPE/PyOx	
		Denklem[a]	R^2	Denklem[a]	R^2
Gal	1,0–30	y=0,050x+0,007	0,994	y=0,194x+0,071	0,992
Man	10–40	y=0,005x+0,010	0,979	y=0,020x-0,018	0,998
Xyl	1,0–40	y=0,084x+0,066	0,983	y=0,294x+0,189	0,990
Mal	2,0–40	y=0,010x-0,007	0,937	y=0,081x-0,007	0,986
Lac	10–40	-	-	y=0,047x-0,054	0,986

Fruktoz, sükroz, sellobioz ve N-asetilglukozamin test edildi ve çalışma koşullarında tayin edilemediler (50 mM'dan düşük konsantrasyonlar için).
[a]x: substrat konsantrasyonunu (mM) ve y:akım yoğunluğunu ($\mu A/cm^2$) ifade etmektedir.

Ayrıca glukoz ve diğer bir karbohidrat ortama beraber ilave edilerek diğer karbohidratın varlığında hem CPE/PyOx hem de CNT/CPE/PyOx biyosensörlerinin glukoz için verdikleri akım değerleri saptanmıştır. Bu deneme sonrası elde edilen sonuçlar Tablo 3.3'de verilmektedir. Glukozun tek başına subtrat olarak kullanıldığı ve bir diğer karbohidratla birlikte reaksiyon ortamına

eklendiğinde elde dilen sinyallere bakıldığında; ortamda PyOx için substrat olabilecek ya da olamayacak başka bir karbohidratın varlığı hem CPE/PyOx hem de CNT/CPE/PyOx biyosensörleriyle elde edilen sinyal için girişim yaratmamıştır.

Tablo 3.3. Farklı karbohidratların varlığının glukoz cevabına etkisi.

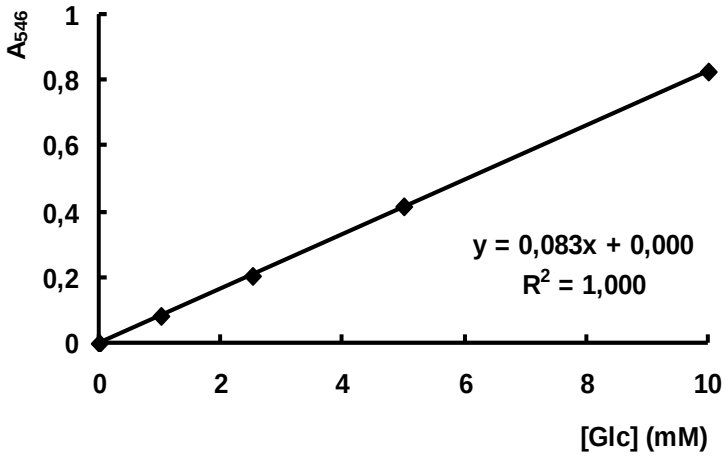
Substrat	CPE/PyOx		CNT/CPE/PyOx	
	Akım ($\mu A/cm^2$)	% Geri kazanım	Akım ($\mu A/cm^2$)	% Geri kazanım
Glc (4 mM)	**0,732**	**-**	**2,730**	**-**
Gal (4 mM)	0,315	-	0,707	-
Glc+Gal	**1,12±0,059**	**107**	**3,5±0,141**	**102**
Man (10 mM)	0,068	-	0,146	-
Glc+Man	**0,796±0,007**	**100**	**2,985±0,011**	**104**
Fru (10 mM)	-	-	-	-
Glc+Fru	**0,753±0,013**	**103**	**2,826±0,079**	**103,5**
Xyl (4 mM)	0,442	-	0,944	-
Glc+Xyl	**1,112±0,053**	**95**	**3,99±0,058**	**109**
GlcNAc (10 mM)	-	-	-	-
Glc+ GlcNAc	**0,757±0,071**	**103**	**2,75±0,071**	**101**
Lac (10 mM)	-	-	0,050	-
Glc+Lac	**0,789±0,078**	**108**	**2,77±0,042**	**100**
Mal (4 mM)	0,069	-	0,478	-
Glc+Mal	**0,768±0,046**	**96**	**3,184±0,067**	**99**
Suc (10 mM)	-	-	-	-
Glc+Suc	**0,774±0,034**	**106**	**2,895±0,006**	**109**
Cel (10 mM)	-	-	-	-
Glc+Cel	**0,8±0,076**	**109**	**2,765±0,049**	**101**

*Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3).

3.1.4 Örnek uygulama

Hazırlanan CPE/PyOx ve CNT/CPE/PyOx biyosensörleri ile ticari örneklerde glukoz analizine yönelik uygulanabilirliğini izlemek amacıyla iki tane şarap örneği kullanılmıştır. Reaksiyon ortamına glukoz yerine şaraplar 10 kat seyreltme yapılarak eklenmiş ve ilgili standart grafiğinden şaraplardaki glukoz miktarı hesaplanmıştır. Ayrıca referans yöntem olarak DNS yöntemi ile

örneklerdeki glukoz miktarı belirlendikten sonra sonuçlar birbiri ile kıyaslanmıştır. DNS yöntemi kullanılırken çizilen glukoz standart grafiği Şekil 3.10'da verilmiştir. Şaraplardaki glukoz analizi amacıyla DNS ve PyOx biyosensörleri elde edilen sonuçlar Tablo 3.4'de özetlenmiştir.



Şekil 3.10. DNS yöntemi ile oluşturulan glukoz standart grafiği.

Tablo 3.4. PyOx biyosensörleri ve DNS yöntemi kullanılarak iki farklı şarapta glukoz analizi.

Örnek	Glukoz (g/l)*		
	DNS metodu	**CPE/PyOx**	**CNT/CPE/PyOx**
Marka I	5,20±0,151	3,75±0,009	3,72±0,040
Marka II	8,56±0,235	7,55±0,071	7,25±0,071

*Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3).

Yapılan ölçümler ayrıca standart katma yöntemi ile tekrar edilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3.5. Standart katma yöntemi ile şaraplarda glukoz analizi.

Biyosensör	Örnek	Şarapta glukoz miktarı *(g/l)	Eklenen glukoz miktarı (g/l)	Bulunan glukoz miktarı (g/l)	% Geri Kazanım
CPE/PyOx	Marka I	0,375±0,009	0,925±0,049	1,34±0,124	97
	Marka II	0,755±0,007	0,925±0,049	1,81±0,056	93
CNT/CPE/PyOx	Marka I	0,372±0,004	1,01±0,071	1,26±0,003	109
	Marka II	0,725±0,007	1,01±0,071	1,76±0,056	99

*Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3).

3.2 AG/PyOx Enzim Sensörüne İlişkin Bulgular

Kitinin primer türevi olan kitosan (CHIT), doğal bir polimerdir ve N-deasetilasyonla elde edilir (Jayakumar et al., 2005). N-asetilglukozamin ve glukozaminin kopolimeridir (Krajewska, 2005,). Kitin ve kitosan içecek ve yiyecek endüstrisinde, ziraatte, su ve atık uygulamalarında, kozmetikte, materyal bilimlerinde, biyoteknolojide, ilaç ve biyofarmasötiklerde ve son günlerde gen terapisinde kullanılmaktadır. Kolay film oluşturması, iyi bir biyouyumluluk, toksik olmaması, zararsız moleküllere degrede olması, fizyolojik inertlik, hidrofillik ve biyolojik molekülleri denatürasyondan koruması nedeniyle biyolojik moleküllerle beraber sıklıkla kullanılmaktadır (Prashanth and Tharanathan, 2007; Rinaudo, 2006). Çeşitli biyosensörlerin fabrikasyonunda sıklıkla tercih edilmektedir. Bu çalışmada CHIT, hidrolaz enzimleri ve PyOx ile oluşturulan biyosensörlerde immobilizasyon matriksi olarak kullanıldı. AG/PyOx biyosensörleri ile maltoz analizine yönelik çalışmalarda enzimler, CHIT ve glutaraldehidin optimum miktarları belirlendikten sonra CNT varlığının biyosensör cevabını etkileyip etkilemediği test edilmiştir. Biyosensör sisteminin analitik karakterizasyonu sonrasında bira örneklerinde maltoz tayini gerçekleştirilmiştir.

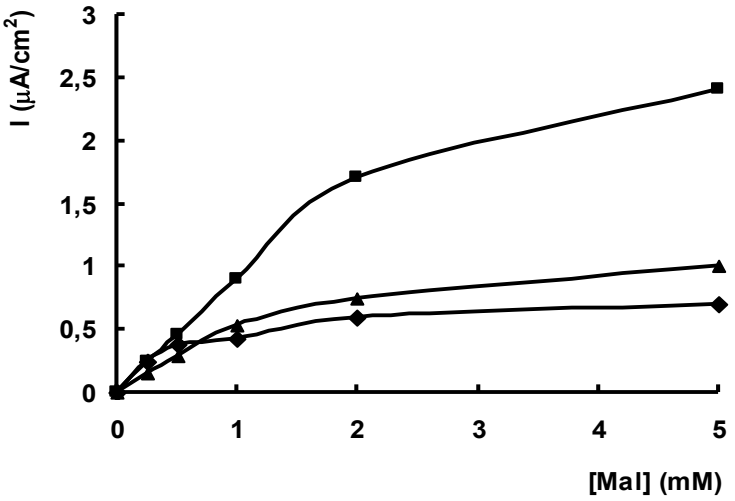
3.2.1 Optimizasyon çalışmaları

3.2.1.1 Enzim miktarlarının optimizasyonu

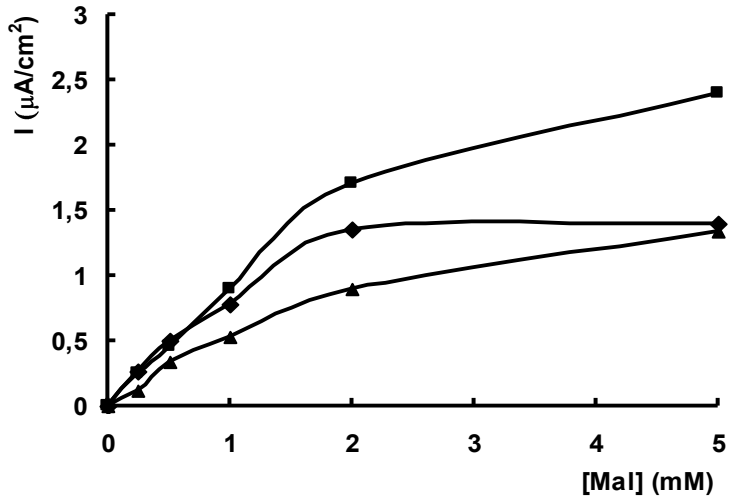
Biyoaktif tabakadaki diğer tüm bileşenlerin miktarları sabit tutularak AG ve PyOx enzimlerinin değişen oranları ile farklı biyosensörler hazırlanmıştr. İlk olarak AG aktivitesi farklı olan üç biyosensör hazırlanmıştır, maltoz konsantrasyonuna bağlı akım değerlerindeki farklanma arsında grafik çizilmiştir. Şekil 3.11'de görüldüğü gibi AG için enzim miktarı 0,6 U olarak bulunmuştur.

Optimum AG miktarı 0,6 U olarak belirlendikten sonra en iyi biyosensör cevabının alındığı PyOx miktarı belirlenmiştir. Bu amaçla farklı PyOx aktivitelerine sahip üç adet AG/PyOx biyosensörleri hazırlanmıştır ve maltoz tayinine yönelik grafikler oluşturularak enzim aktivitesi 9 U olarak bulunmuştur (Şekil 3.12). 3 U ve 12 U PyOx aktivitesine sahip biyosensör hazırlandığında biyosensör cevabı daha düşük olmaktadır. AG aktivitesi sonrasında açığa çıkan glukoz birimlerinin oksidasyonunda 3 U PyOx aktivitesi yetersiz olmaktadır. 12 U PyOx içeren biyosensörlerde ise cevabın düşük olmasının nedeni gerek maltozun

gerekse oksijenin difüzyonu için biyolojik tabakanın bariyer gibi davranması olabilir.



Şekil 3.11. AG miktarının AG/PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 35 ^{o}C; -700 mV; PyOx: 9 U; ♦ 0,3 U; ■ 0,6 U; ▲0,9 U].

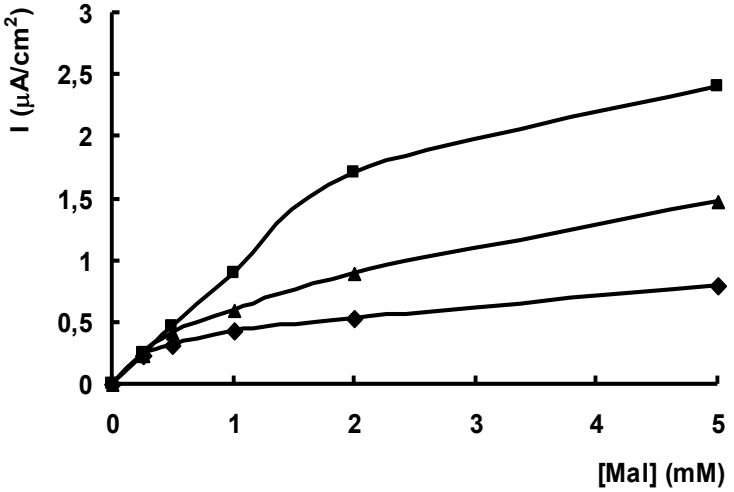


Şekil 3.12. PyOx miktarının AG/PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 35 ^{o}C; -700 mV; AG: 0,6 U; ♦ 3 U; ■ 9 U; ▲12 U].

3.2.1.2 CHIT miktarının optimizasyonu

Çalışmanın bu kısmında enzim miktarı ve glutaraldehid miktarı sabit tutularak değişik miktarlarda CHIT içeren AG/PyOx biyosensörleri hazırlanmıştır CHIT miktarı değiştirilerek hazırlanan biyosensörler ile maltoz tayinine yönelik çizilen grafikler Şekil 3.13'de verilmiştir. Grafikten de görüldüğü gibi en yüksek biyosensör cevabının % 1,0'lik CHIT çözeltisi ile hazırlanan AG/PyOx ile

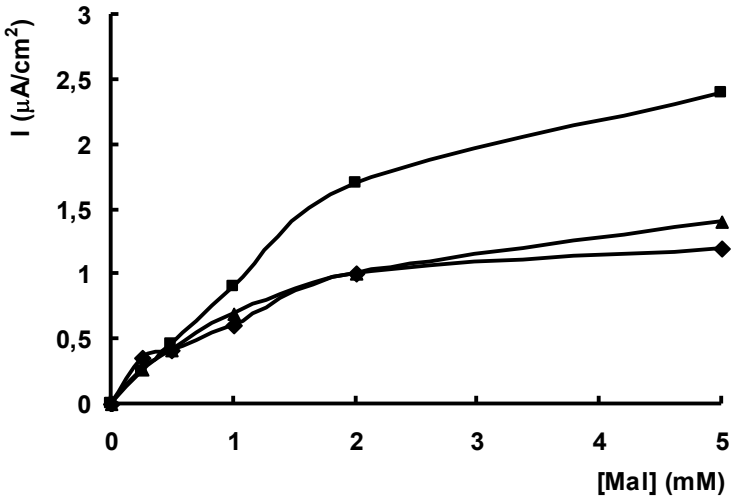
alındığı bulunmuştur. % 0,5'lik CHIT kullanılarak hazırlanan biyosensörlerde glutaraldehid enzimlerin yapısındaki amino grupları ile daha fazla etkileşeceğinden dolayı sterik engellemelere neden olmaktadır. % 2,0'lik CHIT ile hazırlanan biyosensörlerde ise biyoaktif tabaka kalınlaşacağından dolayı substrat ve ko-substratın difüzyonunda bariyer gibi davranmakta ve biyosensör cevabının düşmesine neden olabilmektedir.



Şekil 3.13. CHIT miktarının AG/PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 35 ^{o}C; -700 mV; ♦ % 0,5; ■ % 1,0; ▲% 2,0].

3.2.1.3 Glutaraldehid miktarının optimizasyonu

AG/PyOx biyosensörlerinin hazırlama koşullarının optimizasyonuna yönelik olarak yapılan çalışmalarda optimize edilen son parametre glutaraldehid miktarıdır. AG, PyOx ve CHIT miktarları sabit tutularak farklı yüzdelerde glutaraldehid çözeltileri kullanılarak AG/PyOx biyosensörleri hazırlanmıştır. Farklı yüzdelerde çapraz bağlayıcı reaktif kullanılarak hazırlanan AG/PyOx biyosensörleri ile maltoz tayinine yönelik olarak çizilen Şekil 3.14'de en yüksek biyosensör cevabının % 1 lik glutaraldehid kullanarak hazırlanan biyosensör ile alındığı görülmektedir. Glutaraldehid oranının artırıldığı ya da düşürüldüğü durumlarda akım değerleri düşmektedir. Çapraz bağlayıcı reaktif olarak kullanılan glutaraldehidin yüzdesi % 1'in altında olduğu durumda enzimin immobilizasyonu için yeterli gelmemektedir. % 1,5 glutaraldehid çözeltisi kullanıldığı durumda enzimin çapraz bağlanan amino grupları nedeniyle sterik engeller oluşmaktadır.

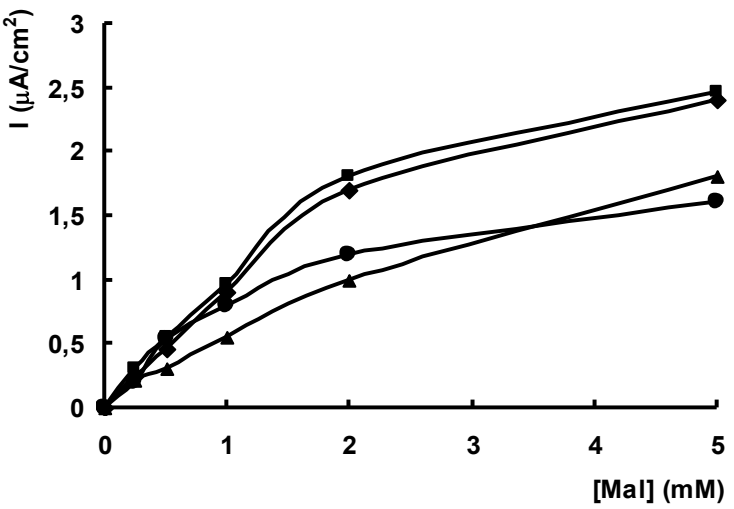


Şekil 3.14. Glutaraldehid miktarının AG/PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 35 ^{o}C; -700 mV; ♦ % 0,5; ■ % 1,0; ▲% 1,5].

3.2.1.4 CNT miktarının optimizasyonu

İlk olarak Davis'in CNT ile enzim/proteinleri kombine etmesinden sonra CNT ile modifiye edilmiş biyosensörlerin hazırlanmasına yönelik çalışmalar başlamıştır (Tkac and Ruzgas, 2006). CNT'ler (biyo)analitik denemelerde uygulanmadan önce, ilk olarak çözünür hale getirilmelidir. Bu işlem oksidatif muamele ile (sülfürik asit ya da nitrik asit), kovalent olmayan stabilizasyonla (sürfaktantlar, doğal ve sentetik polimerler) ve kovalent modifikasyonla gerçekleştirilebilir. Kuvvetli asitlerle muamele CNTlerde fonksiyonel gruplar oluşturmasına rağmen bazı defektler de oluşturmakta, elektronik ve mekanik özelliklerinde istenmeyen değişikliklere neden olmaktadır (Liu et al., 2005c). Ayrıca biyolojik moleküllerle kullanım için uygun bir yöntem değildir (Lin et al., 2004b). CNT dispersiyonları oluşturmak için diğer bir yol ise farklı organik çözgenlerde kullanımıdır (Tkac and Ruzgas, 2006). Organik çözgenlerle hazırlanan CNT dispersiyonları elektrot yüzeyine yayılır ve çözgenin buharlaşmasıyla yüzeyler CNT ile modifiye edilmiş olur. Oluşturulan CNT tabakaları mekanik ve elektriksel olarak stabil değildir ve biyosensör sistemlerinde uygulamaları oldukça kısıtlıdır çünkü organik çözgenler biyolojik moleküllerin denatürasyonuna sebep olabilirler (Zhao et al., 2006). Ayrıca polimerler CNT dispersiyonu için kullanılabilirler. Nafyon iyon değişim özelliği, seçimli olması ve biyouyumluluğu nedeniyle kullanılmaktadır (Lin et al., 2004b). Doğal polimerlerden CHIT; biyouyumludur ve birçok biyomateryal araştırmalarında sıklıkla kullanılan bir biyopolimerdir. CNT'lerin CHIT ile kontrollü bir şekilde modifiye edilmeleri her iki molekülün özelliğini barındıran

yeni bir CHIT-CNT nanomateryalini oluşturmaktadır. Diğer çözgenlerle kıyaslandığında CHIT biyolojik molekülleri denatürasyondan korur, ayrıca enzimler CHIT moleküllerine primer aminleri vasıtasıyla bağlanabilirler. Glutaraldehid bu amaçla en çok kullanılan çapraz bağlayıcı reaktiftir (Qian et al., 2006; (Tkac et al., 2007). Diğer yandan, yüklü polimerlerin solventlere göre CNT'lerin dispersiyonu için daha hızlı ve daha etkili yapılar olduğu bilinmektedir, bunlar daha fazla dispersiyon stabilitesine sahiptirler (Tkac and Ruzgas, 2006). CHIT-CNT hazırlanırken kullanılan birçok metod sert oksidasyon koşullarını temel almaktadır (Liu et al., 2005c). Ancak bu çalışmada kovalent olmayan bir yöntemle CNT'lerin etrafı CHIT ile kaplanmıştır. Dispersiyon sırasında sonikasyon işlemi uygulanır, çünkü karbon nanotüplerin oluşturduğu demetlerin bozulması ve yüzeyde yükseltgen türlerin yüksek yoğunluklu oluşumu için gereklidir (Tkac and Ruzgas, 2006). Kullanılan CHIT-CNT çözeltilerindeki CNT miktarının biyosensör cevabını nasıl etkilediğini incelemek amacıyla % 1'lik CHIT içinde farklı miktarlarda CNT bulunan CHIT-CNT hazırlanmış ve immobilizasyon matriksi olarak kullanılmıştır. Maltoz tayinine yönelik grafikler oluşturularak Şekil 3.15'de verilmiştir. 0,5 mg/ml CNT içeren AG/PyOx biyosensörleri ile CNT içermeyen biyosensörlere göre elde edilen akım değerlerini belirli oranda artırdığı görülmüştür.

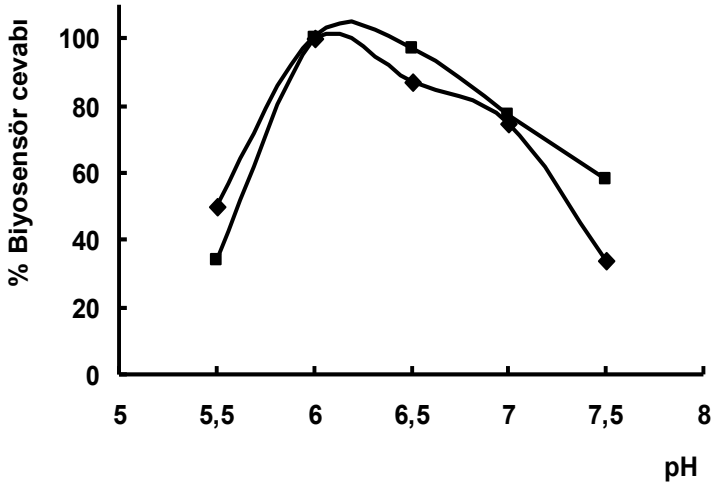


Şekil 3.15. CNT miktarının AG/PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 35 °C; -700 mV; ♦ CNT yok; ▲0,2 mg/ml; ■ 0,5 mg/ml; ● 0,7 mg/ml].

3.2.1.5 Optimum pH

AG/PyOx biyosensörlerinin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 50 mM, pH:5,5 asetat ve pH: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 fosfat tamponları hazırlandı ve farklı

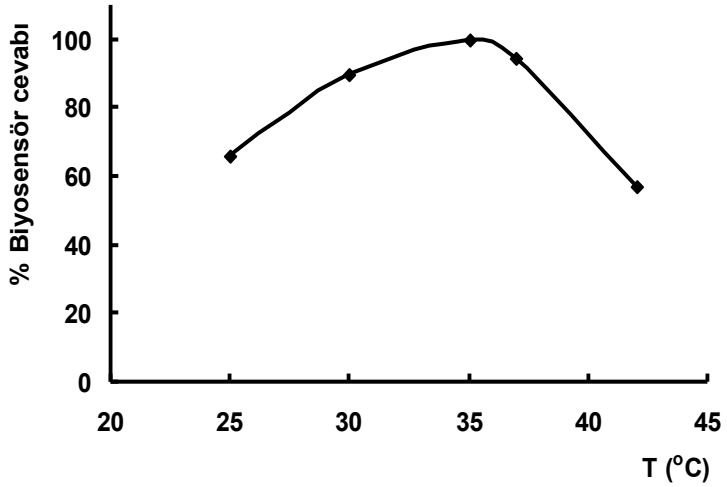
tamponlarda ve 2,0 mM maltoz varlığında ölçümler alınmıştır. Çizilen optimum pH grafiğinden (Şekil 3.16) hem AG/PyOx hem de CNT/AG/PyOx biyosensörleri için optimum pH 6,0 olarak bulunmuştur. Serbest enzimlerin optimum pH değerlerine bakıldığında yayınlanan çalışmalarda PyOx için 7-7,5 ve AG için 6,5-6,8 olduğu görülmektedir (Nishimura et al., 1996; Dhanawansa et al., 2002). AG/PyOx enzimleri ile hazırlanan biosensörlerde optimum pH'ın asidik bölgeye kaymasının nedeni kitosanın sahip olduğu pozitif yükten dolayıdır. Bilindiği gibi kitosan polikatyonik bir moleküldür ve immobilizasyon sonrasında enzimin mikroçevresi değişmektedir ve pH değerlerinin asidik bölgede çıkmasına neden olmuştur (Wilson, 2003). Yapıya CNT eklenmesi pH değişimine neden olmamıştır.



Şekil 3.16. Biyosensör cevabına pH'ın etkisi [pH 5,5 sodyum asetat tamponu, pH 6,0–7,5; 50 mM sodyum fosfat tamponları; 35 ^{o}C; -700 mV; ♦ AG/PyOx; ■ CNT/AG/PyOx].

3.2.1.6 Optimum sıcaklık

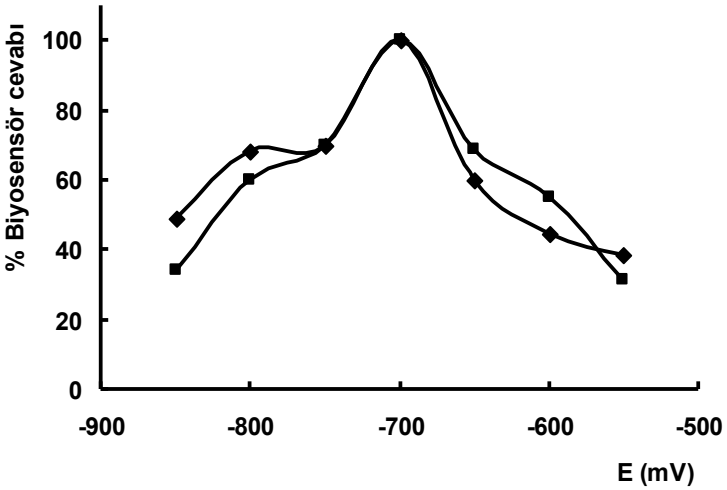
AG/PyOx biyosensörünün optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik olarak 25–40 ^{o}C arasındaki sıcaklıklarda, 2,0 mM maltoz varlığında ölçümler alınmıştır. Sıcaklık ile % biyosensör cevabı arasında optimum pH grafikleri oluşturuldu (Şekil 3.17). Serbest AG için optimum sıcaklık 30-37 ^{o}C olarak yayınlamıştır (Matsusaka et al., 1977). PyOx için optimum sıcaklık daha yüksek olmakla beraber AG/PyOx biyosensörü için optimum sıcaklık 35 ^{o}C olarak bulundu.



Şekil 3.17. Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisi [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; -700 mV].

3.2.1.7 Çalışma potansiyelinin optimizasyonu

Bu çalışmada, kronoamperometrik ölçümleri temel alan AG/PyOx biyosensörü ile en iyi performansın alınması için çalışılması gereken potansiyel araştırılmıştır. 2,0 mM maltoz varlığında ölçüm alınan potansiyel ile % Biyosensör cevabı arasında grafikler (Şekil 3.18) oluşturularak en uygun çalışma potansiyeli -700 mV olarak belirlenmiş ve tüm ölçümler bu potansiyel değerinde gerçekleştirilmiştir.

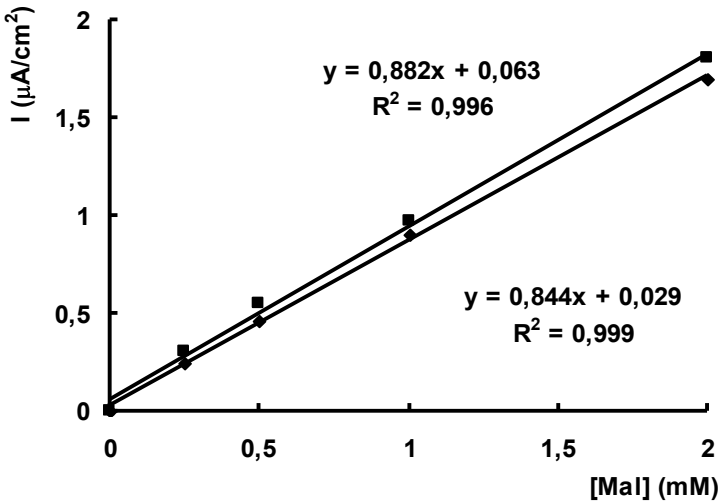


Şekil 3.18. Biyosensör cevabına potansiyelin etkisi [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 35 °C; -700 mV; ♦ AG/PyOx; ■ CNT/AG/PyOx].

3.2.2 Analitik karakterizasyon

3.2.2.1 Maltoz için doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Optimize edilen hazırlama koşulları ve çalışma koşulları kullanılarak AG/PyOx biyosensörü ile maltoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir. Şekil 3.19'dan görüldüğü gibi 0,25-2,0 mM aralığında maltoz tayini yapılabilmektedir. İmmobilizasyon matriksinin CNT ile modifikasyonu biyosensör cevabında çok fazla bir artışa neden olmamıştır. Maltoz tayini için geliştirilen sistemler genellikle spektrofotometrik ya da kromatografik temellere dayanmaktadır. Maltoz biyosensörleri hazırlanırken amiloglukozidaz ve glukoz oksidaz enzimleri kullanılmıştır. Ge et al. tarafından hazırlanan medyatörlü ve medyatörsüz amiloglukozidaz/glukoz oksidaz biyosensörleri ile maltoz için doğrusal aralık sırasıyla 5,0-20 mM (Ge et al., 1998a) ve 10-35 mM (Ge et al., 1998b) olarak bulunmuştur. Bu sistemlerle kıyaslandığında CNT/AG/PyOx ve AG/PyOx biyosensörleri ile tayin sınırının daha düşük olduğunu görmekteyiz. Ayrıca yapıya CNT eklenmesi biyosensör cevabına çok büyük bir artışa neden olmamıştır. Ancak CNTlerin kompozit yapının stabilizasyonunda olumlu bir etkisi olduğu açıktır.



Şekil 3.19. Maltoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 35 ^{o}C; -700 mV; ♦ AG/PyOx; ■ CNT/AG/PyOx].

3.2.2.2 Tekrarlanabilirlik ve operasyonel stabilite

Hazırlanan AG/PyOx biyosensörlerini doğruluğunu belirlemek amacıyla 1,0 mM maltoz standardı için 10 kez ölçümler alınmıştır. Maltoz için çizilen kalibrasyon grafiğinden yaralanarak elde edilen akım değerlerine karşılık gelen

maltoz konsantrasyonları hesaplanmıştır. Elde edilen değerlerden AG/PyOx için SS: ±0,051 mM, % VK: % 4,4 olarak ve CNT/AG/PyOx için ise SS: ±0,023 mM; % VK: % 1,75 olarak hesaplanmıştır.

AG/PyOx biyosensörlerinin belirlenen çalışma koşullarındaki operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla 4,5 saat boyunca ölçümler alınmıştır. Bu süre sonunda AG/PyOx biyosensörlerinin aktivitesini % 15 ve CNT/AG/PyOx biyosensörlerinin ise % 13'ünü kaybettiği gözlenmiştir.

3.2.3 Substrat spesifikliği

AG için maltoz, sükroz gibi disakkaritler (Yamamoto et al., 2004; Gupta and Gauta, 1993) ve PyOx için glukoz, ksiloz, galaktoz gibi monosakkaritler substrat olarak kullanılan moleküllerdir (Giffhorn, 2000). AG/PyOx biyosensörlerinin diğer karbohidratlara yönelik biyosensör cevabının test edilmesi için glukoz, galaktoz, ksiloz, sükroz, mannoz, laktoz, sellobioz, fruktoz, N-asetilglukozamin gibi bazı mono- ve disakkaritler kullanılmıştır. Hem AG/PyOx hem de CNT/AG/PyOx biyosensörleri ile Glukoz, galaktoz, ksiloz ve sükroz için doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir ve veriler Tablo 3.6'da özetlenmiştir.

Tablo 3.6. AG/PyOx biyosensörleri ile karbohidrat analizi.

Substrat	Doğrusal Aralık (mM)	AG/PyOx		CNT/AG/PyOx	
		Eşitlik[a]	R^2	Eşitlik[a]	R^2
Glc	0,025-0,20	y=10,337x+0,008	0,998	y=10,769x+0,090	0,994
Gal	0,05-0,5	y=3,8025x+0,036	0,994	y=6,142x+0,056	0,999
Xyl	0,05-0,5	y=4,867x+0,063	0,990	y=5,840x+0,080	0,996
Suc	0,5-2,0	y=0,258x+0,003	0,999	y=0,321x+0,002	0,999

Mannoz, laktoz, sellobioz, fruktoz, N-asetilglukozamin (2,0 mM) için sinyal elde edilememiştir.

[a]x: substrat konsantrasyonunu (mM) ve y:akım yoğunluğunu ($\mu A/cm^2$) ifade etmektedir.

Daha sonra 0,5 mM maltoz yanında diğer karbohidratlar aynı anda eklenerek biyosensör cevabı belirlenmiştir. Bu ölçümler sonrasında diğer karbohidratların varlığının maltoz tayini için girişim yapmadığı Tablo 3.7'den görülmektedir.

Table 3.7. Diğer karbohidratların varlığında maltoz için alınan biyosensör cevabı.

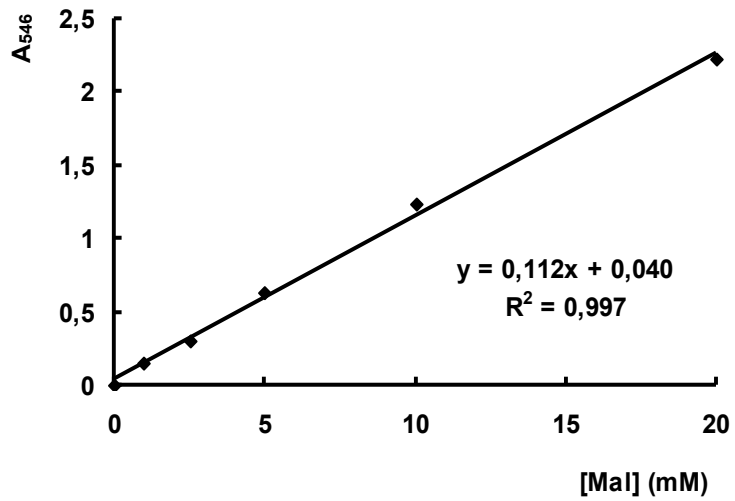
Substrat	AG/PyOx		CNT/AG/PyOx	
	Akım ($\mu A/cm^2$)	% Geri kazanım	Akım ($\mu A/cm^2$)	% Geri kazanım
Mal (0,5 mM)	**0,455**	**-**	**0,545**	**-**
Glc (0,1 mM)	1,1	-	1,23	-
Mal+Glc	**1,565±0,007**	**100**	**1,789±0,015**	**101**
Gal (0,1 mM)	0,4	-	0,7	-
Mal+Gal	**0,862±0,002**	**101**	**1,252±0,006**	**101**
Man (0,5 mM)	-	-	-	-
Mal+Man	**0,455±0,007**	**100**	**0,545±0,008**	**100**
Fru (0,5 mM)	-	-	-	-
Mal+Fru	**0,457±0,009**	**100**	**0,544±0,006**	**100**
Xyl (0,1 mM)	0,5	-	0,688	-
Mal+Xyl	**0,961±0,001**	**101**	**1,234±0,009**	**100**
GlcNAc (0,5 mM)	-	-	-	-
Mal+ GlcNAc	**0,455±0,008**	**100**	**0,545±0,007**	**100**
Lac (0,5 mM)	-	-	-	-
Mal+Lac	**0,482±0,025**	**106**	**0,544±0,006**	**100**
Suc (0,5 mM)	0,160	-	0,170	-
Mal+Suc	**0,632±0,011**	**103**	**0,724±0,005**	**101**
Cel (0,5 mM)	-			
Mal+Cel	**0,457±0,010**	**100**	**0,541±0,001**	**99**

*Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3).

3.2.4 Örnek uygulama

Maltoz bilindiği gibi bira endüstrisi için önemli olan karbohidratlardandır. Bu çalışmada, iki farklı marka biranın maltoz içeriği hazırlanan AG/PyOx biyosensörü ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların DNS yöntemi ile kıyaslamalı sonuçları Tablo 3.8'de verilmiştir. DNS yöntemi ile çizilen maltoz standart grafiği Şekil 3.20'de görülmektedir. Biradaki maltoz oranı

genel olarak 0,7-3 g/l arasındadır (Cortacero-Ramirez et al., 2003) ve CNT/AG/PyOx ile AG/PyOx biyosensörleri kullanarak bulunan maltoz miktarları yayınlanan çalışmalarla uyumludur.



Şekil 3.20. DNS yöntemi ile elde edilen maltoz standart grafiği.

Table 3.8. Bira örneklerinde maltoz tayini.

Örnek	Maltoz (g/l)		
	DNS metodu	**AG/PyOx**	**CNT/AG/PyOx**
Marka I	1,335±0,049	1,435±0,007	1,490±0,042
Marka II	0,945±0,021	0,973±0,003	0,970±0,017

*Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3).

Ayrıca biranın içeriğindeki diğer maddelerin sonuçlara girişim yapıp yapmadığını belirlemek amacıyla standart katma yöntemi ile biralardaki maltoz analizi tekrarlanmıştır. Tablo 3.9'dan görüldüğü üzere sonuçlara herhangi bir girişim etkisi olmamaktadır

Tablo 3.9. Standart katma yöntemi ile maltoz tayini.

Biyosensör	Örnek	Birada maltoz miktarı *(g/l)	Eklenen maltoz miktarı (g/l)	Bulunan maltoz miktarı (g/l)	% Geri kazanım
AG/PyOx	Marka I	1,435±0,007	1,890±0,040	3,320±0,042	100
	Marka II	0,973±0,003	1,890±0,040	2,875±0,062	100
CNT/AG/PyOx	Marka I	1,490±0,042	1,930±0,028	3,640±0,014	94
	Marka II	0,970±0,017	1,930±0,028	2,910±0,056	100

*Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3).

3.3 BG/PyOx Enzim Sensörüne İlişkin Bulgular

Bu bölümde sellobioz tayinine yönelik BG/PyOx biyosensörleri ile elde edilen sonuçlara ilişkin veriler sunulacaktır. CHIT immobilizasyon matriksi olarak kullanılmış ve glutaraldehid ile çapraz bağlama reaksiyonları sonrasında biyosensörler hazır hale gelmiştir. BG/PyOx biyosensörlerinin optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları sonrasında örneklerde sellobioz tayini amacı ile kullanımı araştırılmıştır.

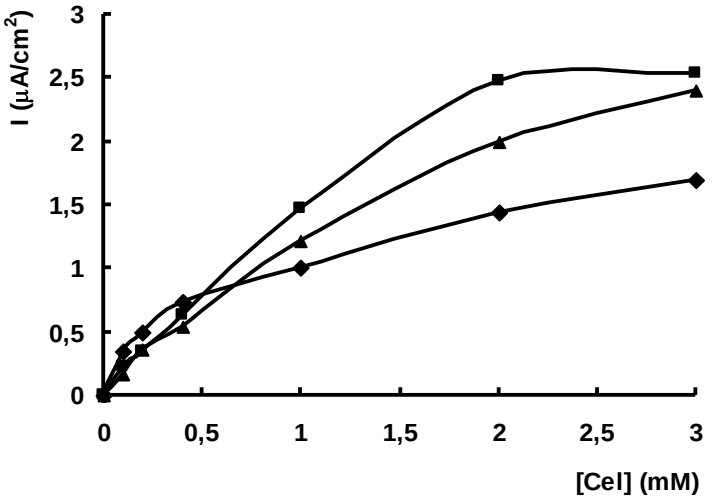
3.3.1 Optimizasyon çalışmaları

3.3.1.1 Enzim miktarlarının optimizasyonu

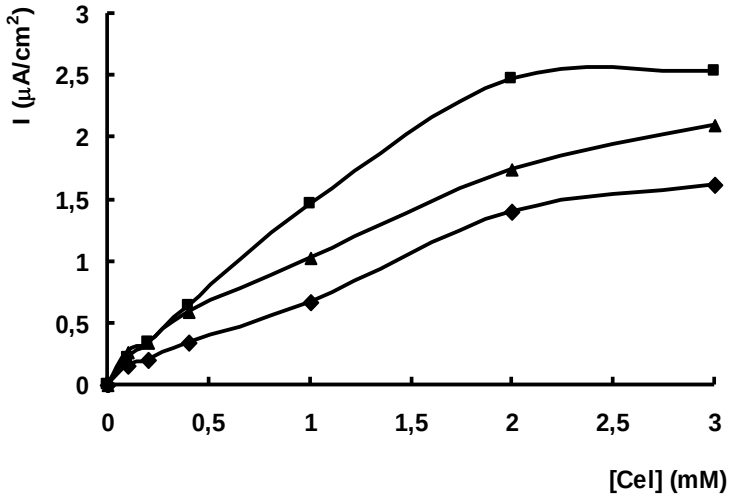
BG/PyOx biyosensörleri ile sellobioz analizine yönelik olarak yapılan optimizasyon çalışmalarında ilk olarak enzim miktarlarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Biyolojik membranı oluşturan PyOx sabit tutularak BG enziminin farklı miktarlarının kullanılmasıyla üç farklı biyosensör sistemi hazırlanmış, glukoz analizine yönelik olarak kullanılmıştır ve elde edilen grafikler Şekil 3.21'de verilmiştir.

Şekil 3.21'den görüldüğü gibi BG aktivitesinin 0,6 U olarak kullanılmasıyla en yüksek biyosensör cevabı elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra PyOx miktarının optimizasyonuna geçilmiştir. BG aktivitesi 0,6 U olarak sabit tutulmuş ve PyOx aktivitesi farklandırılarak 3 farklı BG/PyOx biyosensörü hazırlanmıştır. Hazırlanan sistemlerle elde edilen grafik Şekil 3.22'de görülmektedir. Buradan PyOx için en uygun enzim aktivitesi 6 U olarak

bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar AG/PyOx biyosensörleri ile elde edilen sonuçlara benzemektedir. PyOx miktarı her iki sitem için de 6 U olarak bulunmuştur, ancak BG/PyOx biosensörlerinde birinci ve ikinci enzimin aktivitelerindeki oran 1:10 (BG:PyOx) ve AG/PyOx için ise 1:15 (AG:PyOx) olarak bulunmuştur. Enzimin belirli bir miktarın üzerinde kullanılması sunstratlar için difüzyon problemini ortaya çıkarmaktadır. Daha az kullanıldığında ise aktivite yetersiz gelmektedir.



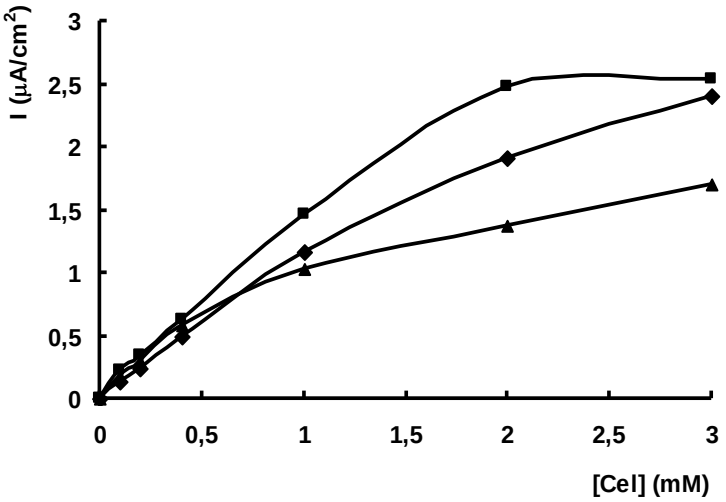
Şekil 3.21. BG miktarının BG/PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 35 ^{o}C; -700 mV; PyOx: 6 U; ♦ 0,3 U; ■ 0,6 U; ▲0,9 U].



Şekil 3.22. PyOx miktarının BG/PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 35 ^{o}C; -700 mV; BG: 0,6 U; ♦ 3 U; ■ 6 U; ▲ 9 U].

3.3.1.2 CHIT miktarının optimizasyonu

Biyomatriks bileşeni olan BG ve PyOx enzimlerinin miktarlarının optimizasyonu sonrasında CHIT miktarı optimize edilmiştir. Üç faklı konsantrasyonda CHIT içeren çözeltiler enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmış ve Şekil 3.23'de görüldüğü gibi en yüksek biyosensör cevabının elde edildiği CHIT miktarı % 1 olarak belirlenmiştir. Optimum CHIT miktarı aynı şekilde AG/PyOx biyosensörleri için de % 1 olarak bulunmuştur. % 1'in üzerindeki konsantrasyonlarda substrat ve kosubstratın enzimin aktif merkezine ulaşması zorlaşmaktadır.



Şekil 3.23. CHIT yüzdesinin BG/PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 35 °C; ♦ % 0,5; ■ % 1; ▲ % 2].

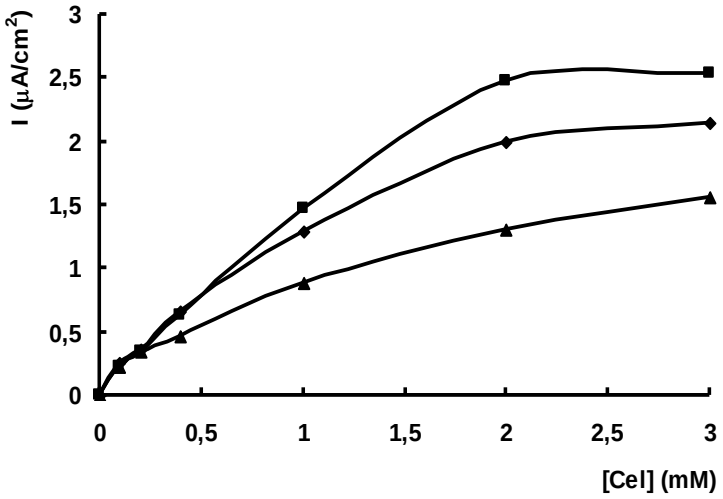
3.3.1.3 Glutaraldehid miktarının optimizasyonu

Biyobileşenlerin stabil bir şekilde immobilizasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan glutaraldehidin optimum miktarını belirlemek amacı ile yüzdesi farklandırılarak üç farklı BG/PyOx biyosensörleri hazırlanmıştır. Tasarlanan BG/PyOx biyosensörleri ile sellobioz tayinine yönelik olarak çizilen Şekil 3.24'den görüldüğü üzere glutaraldehid için optimum miktar AG/PyOx biyosensörlerine benzer olarak % 1 olarak bulunmuştur.

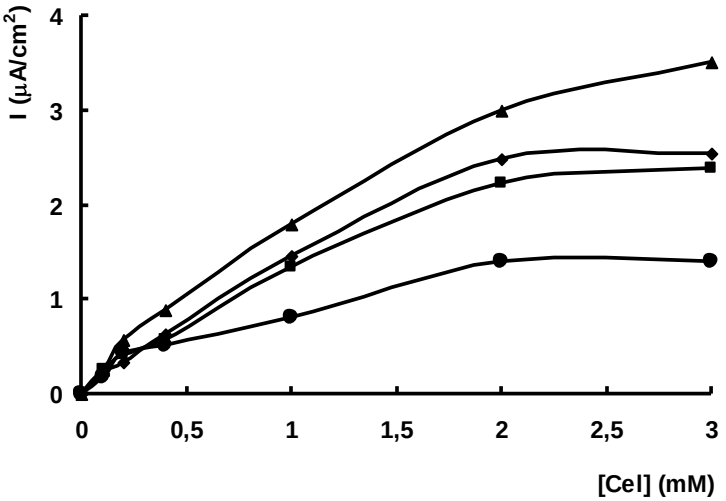
3.3.1.4 CNT miktarının optimizasyonu

Hazırlanan BG/PyOx biyosensörü ile sellobioz tayinine yönelik olarak alınan sinyallere, CNT varlığının etkisini incelemek amacı ile farklı miktarlarda CNT içeren CHIT-CNT çözeltilerinden yola çıkarak biyosensörler hazırlanmıştır.

CHIT içerisindeki CNT miktarları farklandırılarak hazırlanan BG/PyOx biyosensörleri ile çizilen sellobioz tayini grafikleri Şekil 3.25'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi AG/PyOx biyosensörlerinden farklı olarak BG/PyOx için 0,2 mg/ml CNT içeren CHIT çözeltisinin kullanılmasıyla en yüksek akım değerlerine ulaşılmıştır. CNT miktarı 0,1 mg/ml kullanıldığında substrat ve ko-substrat için difüzyon problemi yaratmakta ve akım değerlerini artırmak için yeterli gelmemektedir. CNT 0,2 mg/ml konsantrasyonda kullanıldığında akım değerlerinde artışa neden olduğu için difüzyona olan etkisi gözlenmemektedir. 0,5 mg/ml konsantrasyonda CNT kullanıldığında yine difüzyon problemi karşımıza çıkmaktadır.



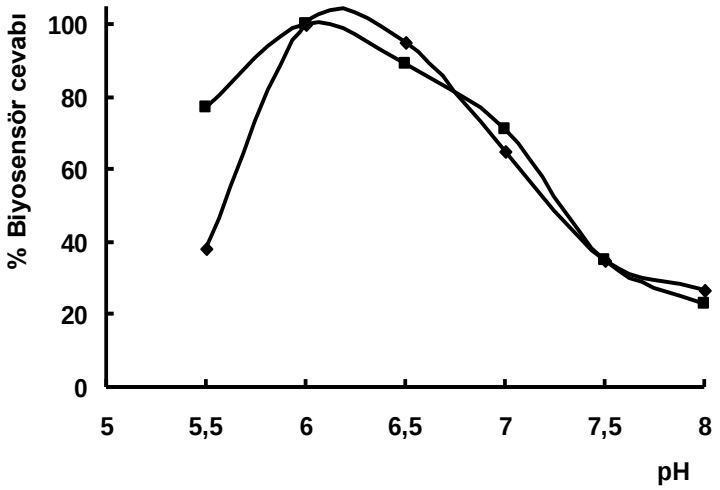
Şekil 3.24. Glutaraldehid yüzdesinin BG/PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 35 °C; ♦ % 0,5; ■ % 1; ▲ % 1,5].



Şekil 3.25. CNT miktarının BG/PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 35 °C; ♦ BG/PyOx; ■ CNT/BG/PyOx (0,1 mg/ml CNT); ▲ CNT/BG/PyOx (0,2 mg/ml CNT); ● CNT/BG/PyOx (0,5 mg/ml CNT)].

3.3.1.5 Optimum pH

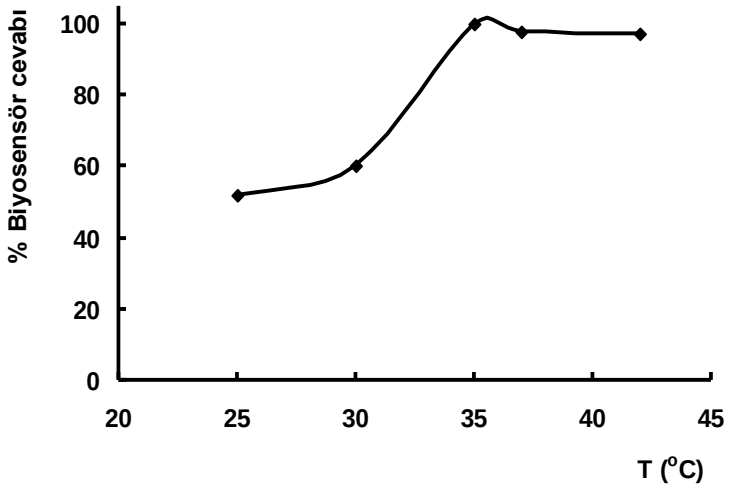
BG/POx biyosensörlerinin hazırlama koşullarının optimumizasyonu sonrasında çalışma koşullarının optimizasyonu çalışmalarına geçilmiştir. Bu amaçla ilk olarak optimum pH denemeleri yapılmış ve pH'ı belirlemek amacıyla 50 mM pH 5,5 asetat tamponu ile 50 mM pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 fosfat tamponları kullanılmıştır. Serbest BG için optimum pH 5,5 (Gomez et al., 2009) ve PyOx için ise PyOx için 7-7,5 olduğu bilinmektedir. Hem BG/PyOx hem de CNT/BG/PyOx biyosensörleri için çizilen optimum pH grafiğinden (Şekil 3.26) optimum pH 6,0 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.26. Biyosensör cevabına pH'ın etkisi [pH 5,5 sodyum asetat tamponu, pH 6,0–7,5; 50 mM sodyum fosfat tamponları; 35 ^{o}C; -700 mV; ♦ BG/PyOx; ■ CNT/BG/PyOx].

3.3.1.6 Optimum sıcaklık

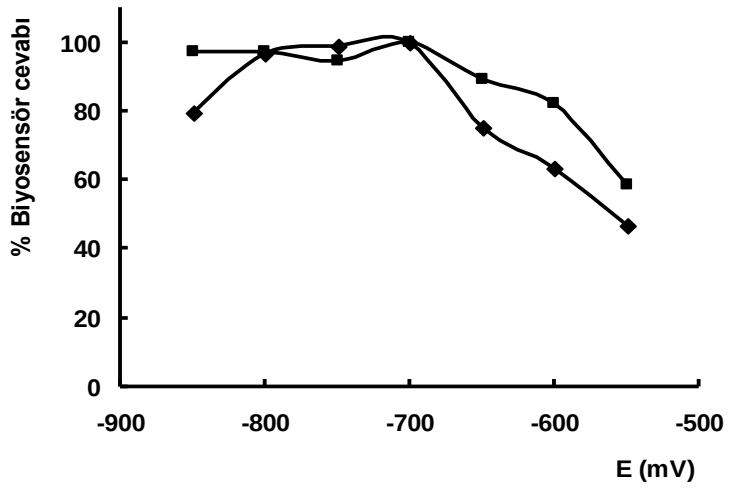
BG/PyOx biyosensörlerinin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 25–42 ^{o}C sıcaklık aralığında çalışılmış, ölçümler düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru gidilerek yapılmıştır. Serbest PyOx oldukça stabil bir enzimdir ancak BG için optimum sıcaklık 25 ^{o}C'dir. Serbest BG için yapılan termal karalılık çalışmalarında 50 ^{o}C'de 60 dakika sonunda aktivitesinin % 40'ını kaybettiği bulunmuştur (Chang et al., 2008). Farklı sıcaklıklarda elde edilen verilerle sıcaklığa bağımlı % biyosensör cevabı arasında çizilen grafiklerden (Şekil 3.27) BG/PyOx biyosensörü için optimum sıcaklık 35 ^{o}C olarak bulunmuştur. BG/PyOx ve CNT/BG/PyOx biyosensörleri ile yapılan tüm çalışmalarda bu sıcaklık ölçüm sıcaklığı olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.27. Sıcaklığın BG/PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 fosfat tamponu; -700 mV].

3.3.1.7 Çalışma potansiyelinin optimizasyonu

Çalışma koşullarının optimizasyonuna ilişkin olarak incelenen son parametre çalışma potansiyelinin biyosensör cevabına etkisi olmuştur. Uygulanan potansiyel -550 ile -850 mV arasında grafikler oluşturulmu (Şekil 3.28) ve AG/PyOx biyosensörlerinde olduğu gibi BG/PyOx biyosensörleri için en yüksek biyosensör cevabının alındığı potansiyel -700 mV olarak belirlenmiştir. Tüm kronoamperometrik ölçümler bu potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

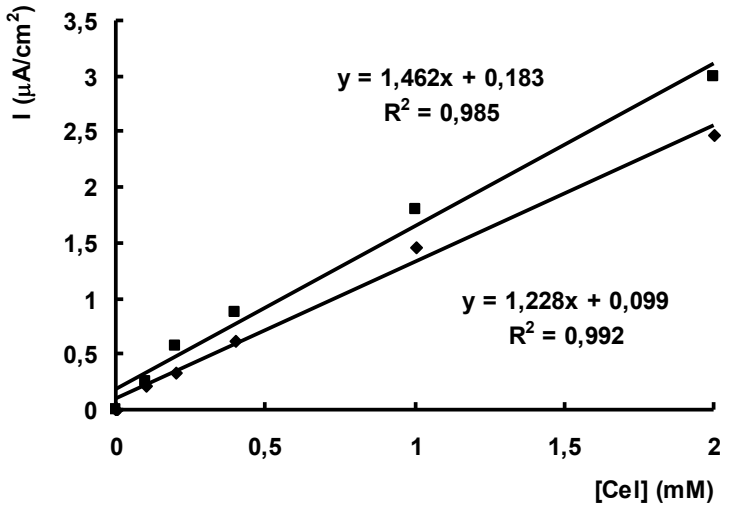


Şekil 3.28. Çalışma potansiyelinin BG/PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 35 °C; -700 mV; ♦ BG/PyOx, ■ CNT/BG/PyOx CNT].

3.3.2 Analitik karakterizasyon

3.3.2.1 Sellobioz için doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Farklı şekillerde hazırlanan BG/PyOx ve CNT/BG/PyOx biyosensörlerinin analitik karakterizasyonu amacı ile bu sellobioz için doğrusal tayin aralığının, analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin ve operasyonel kararlılığın belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Sellobioz konsantrasyonuna bağlı akım değerindeki farklanma ile kalibrasyon grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.29).



Şekil 3.29. Sellobioz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 35 ^{o}C; -700 mV; ♦ BG/PyOx; ■ CNT/BG/PyOx].

3.3.2.2 Tekrarlanabilirlik ve operasyonel stabilite

Bu bölümde BG/PyOx ve CNT/BG/PyOx biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. İlgili sistemle 1,0 mM sellobioz içeren standartlar kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Bu işlemler sonucunda çalışma koşullarında, BG/PyOx biyosensörleri için SS: ±0,009 mM ile % VK: % 0,8 (n=10), CNT/BG/PyOx için ise SS: ±0,014 mM ile % VK: % 1,3 (n=10) olarak bulunmuştur.

Biyosensörlerin operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensörler daha önce optimizasyonu yapılarak belirlenmiş olan çalışma sıcaklığında ve çalışma tamponu içinde bekletilerek 1,0 mM sellobioz standardı için ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda BG/PyOx için

5 saatlik periyot sonrasında % 16 aktivite kaybı varken CNT/BG/PyOx için aynı süre sonunda aktivite % 19 kaybı gözlendi.

3.3.3 Substrat spesifikliği

Hazırlanan BG/PyOx biyosensörleri ile diğer bazı karbohidratların tayin edilip edilemeyeceğinin anlaşılması için glukoz, mannoz, fruktoz, galaktoz, ksiloz, maltoz, laktoz, sükroz ve N-asetilglukozamin kullanılarak ölçümler yapılmıştır. Çalışma ortamına eklenen glukoz, galaktoz ve ksiloz için elde edilen biyosensör cevapları ile kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve Tablo 3.10'da ilgili veriler özetlenmiştir. Glukoz, galaktoz, ksiloz için PyOx aktivitesinden kaynaklanan biyosensör cevapları elde edilmiştir. BG; sellobioz dışındaki diğer disakkaritlerin hidroliz reaksiyonlarını katalizlemediğinden dolayı sonuç elde edilememiştir.

Tablo 3.10. BG/PyOx ve CNT/BG/PyOx ile diğer karbohidratların tayini.

Substrat	Tayin Aralığı (mM)	BG/PyOx		CNT/BG/PyOx	
		Denklem[a]	R^2	Denklem[a]	R^2
Glc	0,05-0,4	y=6,957x+0,047	0,984	y=7,872x+0,195	0,986
Gal	0,1-1	y=2,041x+0,138	0,975	y=2,922x+0,163	0,987
Xyl	0,1-1	y=2,527x+0,112	0,994	y=3,083x+0,301	0,965

Mannoz, laktoz, sellobioz, fruktoz, N-asetilglukozamin (< 2,0 mM) için sinyal elde edilememiştir.
[a]x: substrat konsantrasyonunu (mM) ve y:akım yoğunluğunu ($\mu A/cm^2$) ifade etmektedir.

BG/PyOx ve CNT/BG/PyOx ile sellobioz için biyosensör cevabına diğer karbohidratların varlığı izlenmiştir. Diğer bir karbohidrat sellobiozla birlikte çalışma ortamına eklenerek ölçümler alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.11'de görülmektedir. Bu değerlere göre sellobioz dışındaki BG ya da PyOx için substrat olabilecek birdiğer karbohidratın varlığı biyosensör cevabında herhangi bir girişime neden olmamıştır.

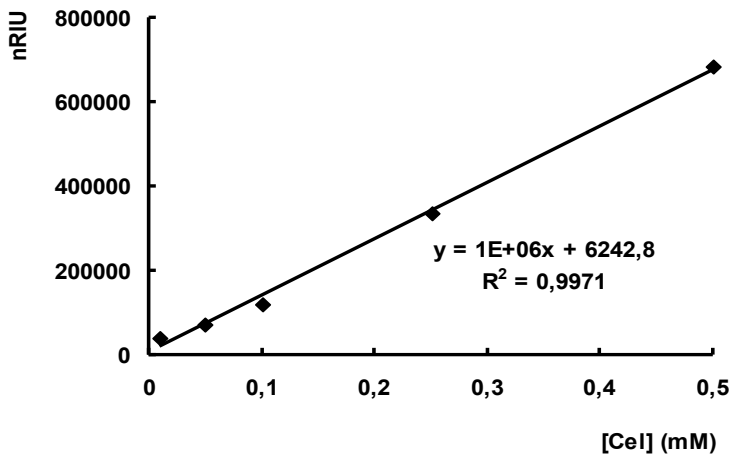
Tablo 3.11. Farklı karbohidratların varlığının sellobioz cevabına etkisi.

Substrat	BG/PyOx		CNT/BG/PyOx	
	Akım ($\mu A/cm^2$)	**% Geri Kazanım**	**Akım ($\mu A/cm^2$)**	**% Geri Kazanım**
Cel (0,2 mM)	**0,342**	**-**	**0,588**	**-**
Glc (0,2 mM)	1,63	-	2	-
Cel+Glc	**1,921±0,06**	**97**	**2,443±0,054**	**94**
Gal (0,2 mM)	0,68	-	0,842	-
Cel+Gal	**0,99±0,023**	**97**	**1,393±0,029**	**94**
Man (0,2 mM)	-	-	-	-
Cel+Man	**0,329±0,016**	**96**	**0,583±0,009**	**99**
Fru (0,2 mM)	-	-	-	-
Cel+Fru	**0,337±0,003**	**99**	**0,587±0,005**	**100**
Xyl (0,2 mM)	0,63		1,1	
Cel+Xyl	**0,932±0,071**	**96**	**1,755±0,069**	**104**
NAcGlc (0,2 mM)	-	-	-	-
Cel+ NAcGlc	**0,337±0,004**	**99**	**0,588±0,003**	**100**
Lac (0,2 mM)	-	-	-	-
Cel+Lac	**0,335±0,007**	**98**	**0,58±0,014**	**99**
Suc (0,2 mM)	-		-	
Cel+Suc	**0,344±0,006**	**101**	**0,58±0,013**	**99**
Mal (0,2 mM)	-	-	-	-
Cel+Mal	**0,337±0,004**	**99**	**0,59±0,003**	**100**

*Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3).

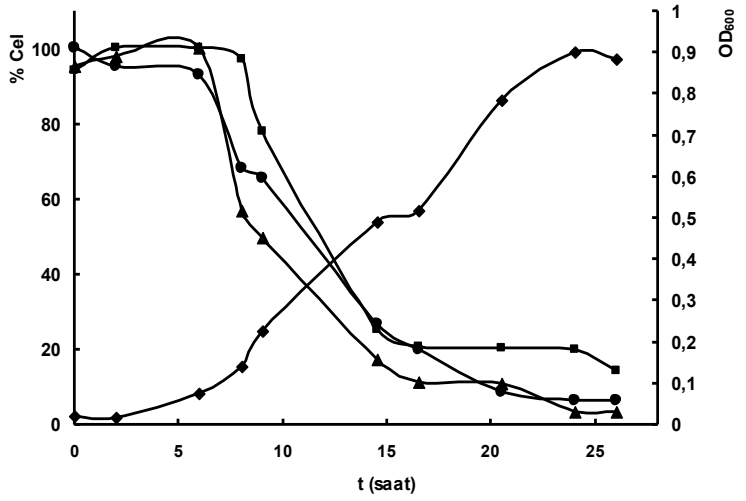
3.3.4 Örnek uygulama

Sellobioz tayini *G. oxydans* hücreleri kullanılarak hazırlanan fermentasyon ortamında gerçekleştirildi. Hücreler sellobioz içeren ortama inoküle edildi ve zamana bağlı olarak konsantrasyondaki azalma izlendi. Ayrıca hücrelerin zamana bağlı olarak büyümelerindeki artış 600 nm'de optik yoğunluk izlenerek belirlendi. Ayrıca sellobioz tayini HPLC-RID kullanılarak gerçekleştirildi. HPLC-RID ile sellobioz için çizilen standart grafik Şekil 3.30'da verilmiştir.



Şekil 3.30. HPLC ile oluşturulan sellobioz için kalibrasyon grafiği [Kolon: NH_2 inertsil; akış hızı: 1,0 ml/dakika; 35 ^oC; Mobil faz: asetonitril:su 3:1 (v/v)].

G. oxydans hücrelerinde membrana bağlı birçok dehidrogenaz enzimi tanımlanmıştır. Sellobioz dehidrogenaz ya da sellobiozun metabolize edildiğine dair henüz bir çalışma bulunmamakla beraber, elde edilen sonuçlara göre hücrelerin sellobiozu karbon kaynağı olarak kullandığı ve zamanla sellobioz konsantrasyonunda azalma Şekil 3.31'de görülmektedir. Hücreler karbon kaynağı olarak sellobiozun kullanıldığı büyüme ortamında ilk saat lag fazını, 6-24 saatleri arasında log fazını ve 24 saat sonunda durağan fazı geçirmektedir. Sellobioz konsantrasyonu ilk 6 saatte sabit kalmıştır, daha sonraki saatlerde azalmaya başlamakta ve 16. saatten itibaren ise sabit bir konsantrasyonda kalmaktadır. HPLC-RID, BG/PyOx ve CNT/BG/PyOx sistemleri kullanılarak yapılan ölçümler sonrasında hesaplanan sellobioz dönüşüm yüzdeleri birbiri ile orantılı olarak bulunmuştur.



Şekil 3.31. *G. oxydans* ile sellobiozun zaman bağlı azalmasının BG/PyOx ve CNT/BG/PyOx biyosensörleri ile izlenmesi [♦ Hücre yoğunluğu; ■ HPLC-RID; ▲ BG/PyOx; ● CNT/BG/PyOx].

3.4 β-Gal/PyOx Enzim Sensörüne İlişkin Bulgular

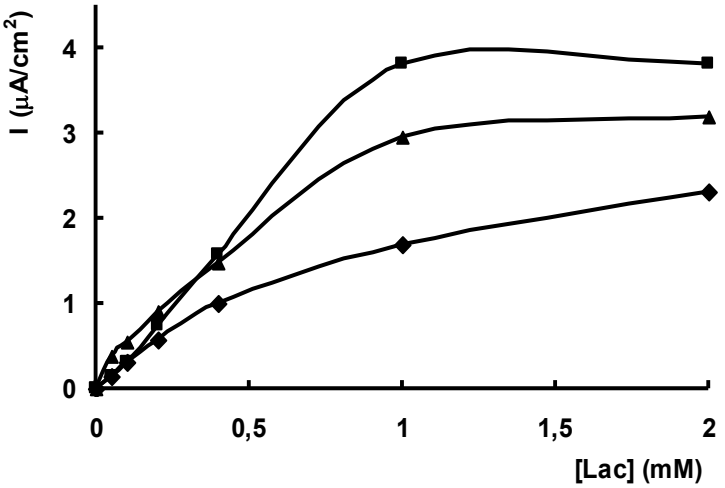
Bienzimatik biyosensör sistemleri kullanarak karbohidrat analizine yönelik çalışmalardan sonuncusu β-gal ve PyOx enzimleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon materyali olarak CHIT kullanılmış ve β-Gal/PyOx biyosensörleri hazırlanarak laktoz analizi yapılmıştır. Tasarlanan β-Gal/PyOx için ilk olarak optimizasyon çalışmaları yapılmış, daha sonra biyosensör cevabına CNT'nin etkisi incelenmiştir. Analitik karakterizasyon sonrası hazırlanan biyosensörler sütte laktoz tayini için kullanılmıştır.

3.4.1 Optimizasyon çalışmaları

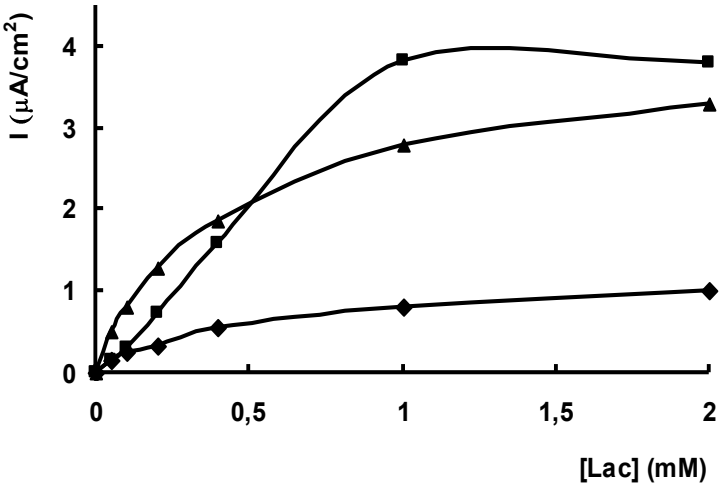
3.4.1.1 Enzim miktarlarının optimizasyonu

β-Gal/PyOx enzimlerini içeren bienzimatik biyosensörlerin hazırlama koşullarının optimizasyonuna yönelik çalışmalarda ilk olarak β-gal ve PyOx enzimlerinin biyosensör cevabına etkisi incelenmiştir. Farklı aktivitelerde β-gal içeren β-gal/PyOx biyosensörleri ile laktoz tayinine yönelik oluşturulan grafik Şekil 3.32'de verilmiştir. Grafikten de görüleceği gibi laktoz için en yüksek akım değerleri 0,6 U β-gal kullanarak hazırlanan β-gal/PyOx biyosensörleri ile elde edilmiştir. İlerideki çalışmalarda optimum olarak belirlenmiş bu miktar kullanılmıştır.

β-Gal aktivitesi belirlendikten sonra en yüksek biyosensör cevabının elde dildiği PyOx aktivitesi araştırılmıştır. Farklı aktivitelerde PyOx içeren β-gal/PyOx biyosensörleri hazırlanarak laktoz tayininde kullanılmıştır. Laktoz tayinine yönelik olarak çizilen grafik Şekil 3.33'den görülmektedir ki; en uygun PyOx aktivitesi 6,0 U'dir ve bu miktar bundan sonraki tüm çalışmalarda kullanılmıştır. AG/PyOx ve BG/PyOx biyosensörlerine benzer olarak hidrolaz enziminin aktivitesi 0,6 U bulunmuşken, PyOx için bulunan enzim miktarı ise BG/PyOx biyosensörleri ile aynıdır.



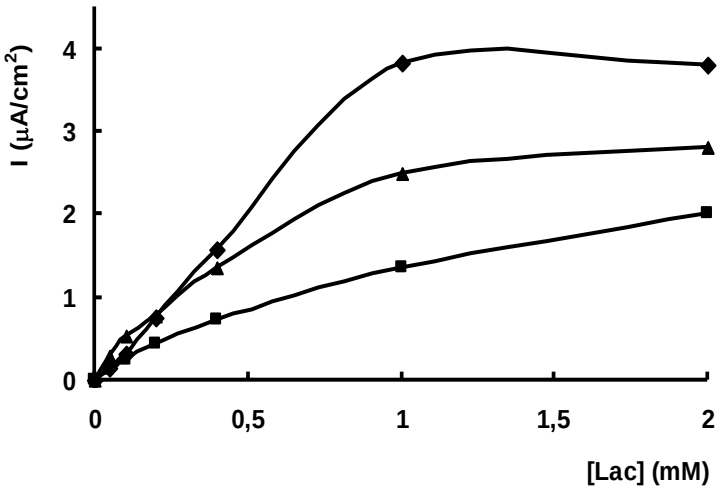
Şekil 3.32. β-Gal miktarının β-gal/PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,5 sodyum fosfat tamponu; 35 °C; -700 mV; PyOx: 6 U; ♦ 0,3 U; ■ 0,6 U; ▲0,9 U].



Şekil 3.33. PyOx miktarının β-gal/PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,5 sodyum fosfat tamponu; 35 °C; -700 mV; β-gal: 0,6 U; ♦ 3 U; ■ 6 U; ▲ 9 U].

3.4.1.2 CHIT miktarının optimizasyonu

Çalışmanın bu kısmında diğer bileşenler sabit tutularak CHIT miktarındaki farklanmanın biyosensör cevabı üzerine etkisi incelenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki CHIT çözeltileri β-gal/PyOx biyosensörü hazırlamak için kullanılmış ve dizayn edilen biyosensör sistemleri kullanılarak laktoz konsantrasyonuna bağlı akım değerindeki farklanmaya yönelik grafikler çizilmiştir. Şekil 3.34'den görüldüğü gibi CHIT için optimum miktar AG/PyOx ve BG/PyOx biyosensörlerine benzer olarak % 1 bulunmuştur.



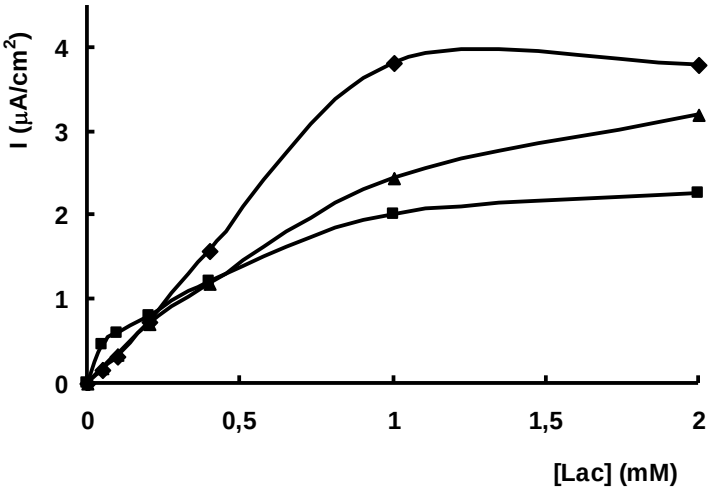
Şekil 3.34. CHIT miktarının β-gal /PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,5 sodyum fosfat tamponu; 35 ^{o}C; -700 mV; ▲ % 0,5; ♦ % 1; ■ % 2].

3.4.1.3 Glutaraldehid miktarının optimizasyonu

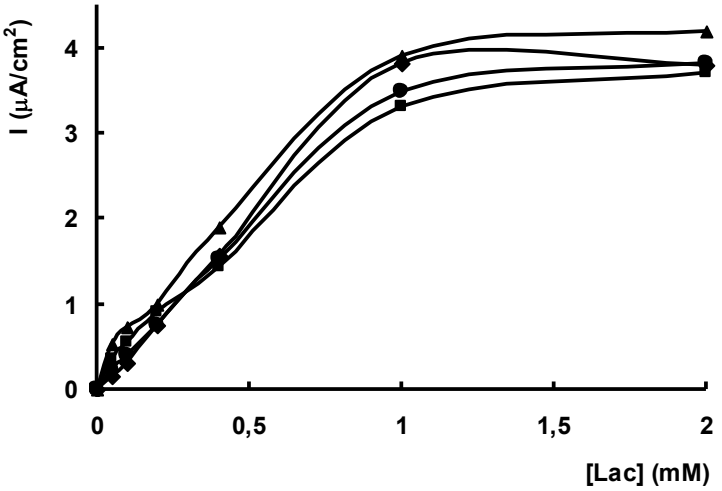
Bu çalışmada, β-Gal, PyOx ve CHIT miktarları daha önce çalışmalarda optimize edilen değerlerde sabit tutularak glutaraldehid miktarı değiştirilmiştir. Bu şekilde üç farklı konsantrasyonda çapraz bağlayıcı ajan kullanılarak üç farklı biyosensörler hazırlanmıştır ve laktoz tayinine yönelik elde edilen grafik Şekil 3.35'de görülmektedir. En yüksek akım değerleri ve en iyi doğrusallık % 1 glutaraldehid kullanılarak hazırlanan β-gal/PyOx biyosensörü ile sağlanmıştır. Bu miktar AG/PyOx ve BG/PyOx biyosensörleri ile bulunan değerle aynıdır.

3.4.1.4 CNT miktarının optimizasyonu

Doğal bir polimer olan kitosanın CNT ile modifikasyonu sonrası elde edilen CHIT-CNT çözeltileri farklı konsantrasyonlarda CNT içerek şekilde hazırlanmıştır ve 3 farklı β-Gal/PyOx biyosensörünün hazırlanmasında kullanılmıştır. Farklı miktarlarda CNT içeren çözeltilerle hazırlanan bienzimatik biyosensörlere ilişkin akım değerleri kıyaslandığında Şekil 3.36'den görüldüğü gibi en yüksek değerler AG/PyOx biyosensörlerinde olduğu gibi 0,5 mg/ml CNT içeren CHIT-CNT çözeltisi ile elde edilmiştir. AG/PyOx ve BG/PyOx biyosensörlerine benzer olarak biyosensör cevabına CNT etkisi belirli bir orandadır.



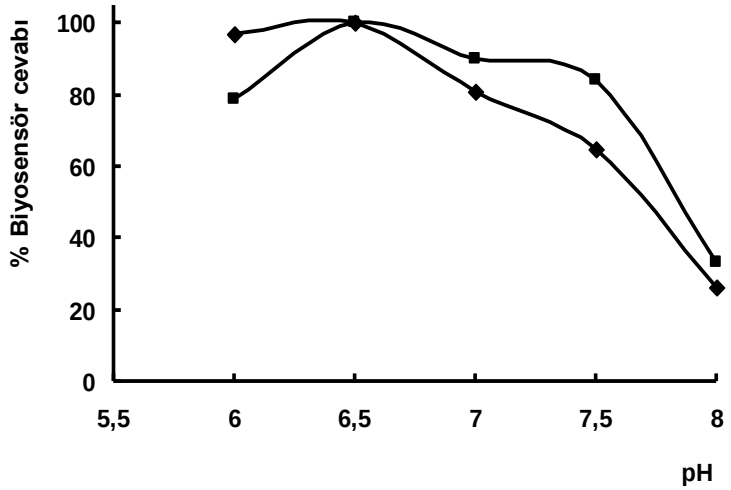
Şekil 3.35. Glutaraldehid miktarının β-gal /PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,5 sodyum fosfat tamponu; 35 °C; -700 mV; ■% 0,5; ♦ % 1; ▲ % 1,5].



Şekil 3.36. CNT miktarının β-gal /PyOx biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,5 sodyum fosfat tamponu; 35 °C; -700 mV; ♦ β-gal /PyOx; ■ CNT/β-gal /PyOx (0,2 mg/ml CNT); ▲ CNT/β-gal /PyOx (0,5 mg/ml CNT); ● CNT/β-gal /PyOx (1 mg/ml)].

3.4.1.5 Optimum pH

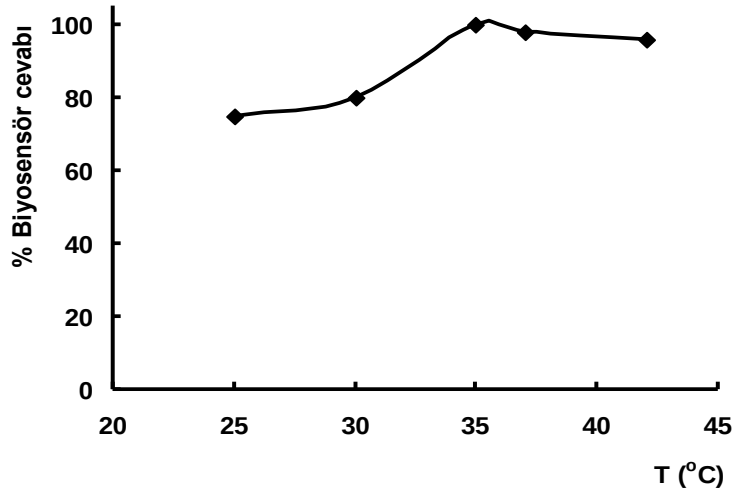
Optimize edilen miktarlarda β-gal, PyOx, CHIT ve glutaraldehid içeren β-gal/PyOx biyosensörleri hazırlanarak 50 mM pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 fosfat tamponlarının biyosensör cevabına etkisi incelenmiştir. Serbast β-gal için optimum pH 4,5 (Van Griethuysen et al., 1985) ve PyOx için ise 7-7,5 iken β-gal/PyOx biyosensörü için optimum pH 6,5 olarak bulunmuştur (Şekil 3.37). Ayrıca biyosensör hazırlanmasında kullanılan CNT varlığının optimum pH'ı etkileyip etkilemediğini test etmek için CNT/β-gal/PyOx biyosensörleri de kullanıldığında pH'da bir değişim olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 3.37. Biyosensör cevabına pH'ın etkisi [pH 6,0–8,0; 50 mM sodyum fosfat tamponları; 35 ^{o}C; -700 mV; ■ β-gal/PyOx; ♦ CNT/β-gal/PyOx].

3.4.1.6 Optimum sıcaklık

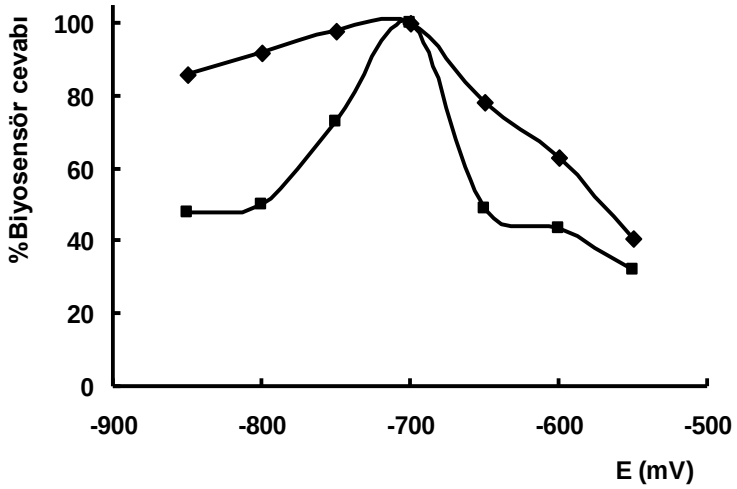
β-Gal/PyOx biyosensörlerinin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 25–42 ^{o}C aralığındaki sıcaklıklarda ölçümler alınmıştır. Elde edilen akım değerlerindeki farklardan her bir sıcaklık için bağıl biyosensör cevapları hesaplanarak sıcaklığa bağlı % biyosensör cevabı grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.38). Serbest β-Gal için optimum sıcaklık 30 ^{o}C (Nizamuddin et al., 2008) ve PyOx için ise 45–65 ^{o}C olduğu bilinmektedir. Optimum sıcaklık grafiğine bakıldığında β-Gal/PyOx biyosensörleri için optimum sıcaklığın 35 ^{o}C olduğu görülmektedir. PyOx β-Gal/PyOx ve CNT/β-Gal/PyOx ile yapılan tüm ölçümlerde çalışma sıcaklığı olarak bu değer kullanılmıştır.



Şekil 3.38. Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisi [pH 6,5, 50 mM sodyum fosfat tamponu; -700 mV].

3.4.1.7 Çalışma potansiyelinin optimizasyonu

β-Gal/PyOx ve CNT/β-Gal/PyOx biyosensörleri ile çalışma potansiyeli belirlemek amacıyla -850 ile -550 mV'da ölçümler alınarak oluşturulan hidrodinamik voltammogramlardan (Şekil 3.39) çalışma potansiyeli AG/PyOx ve BG/PyOx biyosensörlerine benzer olarak -700 mV bulunmuştur.

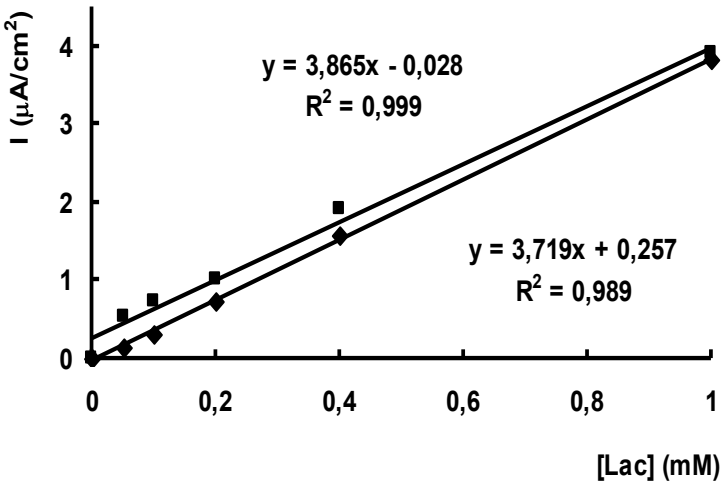


Şekil 3.39. Biyosensör cevabına potansiyelin etkisi [pH 6,5, 50 mM sodyum fosfat tamponu; 35 ^{o}C; ♦ β-gal/PyOx; ■ CNT/β-gal/PyOx].

3.4.2 Analitik karakterizasyon

3.4.2.1 Laktoz için doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Optimize edilen hazırlama koşulları ile dizayn edilen β-Gal/PyOx biyosensörleri ile uygun çalışma koşulları kullanılarak laktoz tayinine yönelik kalibrasyon grafikleri hazırlanmıştır. Ayrıca CHIT-CNT çözeltisi ile hazırlanan CNT/β-Gal/PyOx biyosensörleri ile yapıda CNT varlığının biyosensör cevabını etkileyip etkilemediği test edilmiştir. Her iki sitemle laktoz analizine yöenlik olarak oluşturulan doğrusal grafikler Şekil 3.40'da görülmektedir. Laktoz tayini amacıyla daha önceki çalışmalarda hazırlanan biyosensör sistemleri ile elde edilen sonuçlarla CNT/β-Gal/PyOx ve β-Gal/PyOx biyosensörleri ile elde edilen sonuçlar Tablo 3.12'da kıyaslanmıştır.



Şekil 3.40. Laktoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [50 mM, pH 6,5 fosfat tamponu; 35 ^{o}C; -700 mV; ♦ β-gal/PyOx; ■ CNT/β-gal/PyOx].

3.4.2.2 Tekrarlanabilirlik ve operasyonel stabilite

β-Gal/PyOx ve CNT/β-Gal/PyOx biyosensörlerinin her ikisinin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. İlgili sistemle 0,2 mM laktoz içeren standartlar kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Bu işlemler sonucunda çalışma koşullarında, β-Gal/PyOx için SS: ±0,002 mM ve % VK: % 1 (n=10), CNT/β-Gal/PyOx için SS: ±0,002 mM ve % VK: % 1 (n=10) olarak bulunmuştur.

β-Gal/PyOx ve CNT/β-Gal/PyOx biyosensörlerin operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensörler daha önce optimizasyonu yapılarak belirlenmiş olan çalışma koşullarında (pH 6,5; 50 mM fosfat tamponu; 35 ^{o}C; -700 mV) bekletilerek 0,2 mM laktoz standardı için ölçümler gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevapları %100 kabul edilerek belirli zaman dilimlerinde yapılan ölçümlerde elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslanmıştır. Bu çalışma sonucunda β-Gal/PyOx için 5,5 saatlik periyot sonrasında % 4 aktivite kaybı varken CNT/β-Gal/PyOx için aynı süre sonunda aktivite kaybı gözlenmemiştir.

Tablo 3.12. Literatürdeki farklı laktoz biyosensörlerinin kıyaslanması.

Elektrot	İmmobilizasyon metodu	Enzim sistemi	Çalışma potansiyeli (mV)	Analitik performans			Kaynak
				Doğrusal aralık	% VK	Operasyonel stabilite	
Hg ile modifiye GC	Jelatin-Glutaraldehid	β–Gal/GOX	-200	0,1-3,5 mM	3,74	40 ölçüm sonrası aktivite kaybı	Göktuğ et al., 2005
İTO	P3HT/SA ile LB film	Lac-GalOX	+400	1-6 g/dl	-	10 kullanım sonrası %3 aktivite kaybı	Sharma et al., 2004
CO_2 elektrodu	DE-2	Lac-*S.cerevisiae*	-	0-1,6 mM	-	-	Amarita et al., 1997
GE	CHIT	β–Gal/PyOx	-700	0,05-1,0 mM	1,0	5,5 saat sonunda % 4 aktivite kaybı	Bu çalışma
GE	CHIT-CNT	β–Gal/PyOx	-700	0,05-1,0 mM	1,0	5,5 saat sonunda aktivite kaybı yok	Bu çalışma

GC: Camımsı karbon; GOX: Glukoz oksidaz; Lac: Laktaz; GalOX: Galaktoz oksidaz; LB: Langmuir–Blodgett; P3HT: poli(3-hekziltiyofen); SA: stearik asit; İTO: indiyum oksit kaplı cam elektrot; GE: Grafit elektrot; DE-2:Dietilaminoetil selüloz

3.4.3 Substrat spesifikliği

β-Gal/PyOx ve CNT/β-Gal/PyOx biyosensörleri ile laktoz dışındaki, glukoz, galaktoz, ksiloz, maltoz, sellobioz, sükroz, fruktoz, N-asetilglukozamin gibi diğer mono- ve disakkaritler için doğrusal tayin aralığı belirlenmeye çalışılmıştır ve elde edilen veriler Tablo 3.13'de verilmiştir.

Tablo 3.13. β-Gal/PyOx ve CNT/β-Gal/PyOx ile diğer karbohidratların tayini.

Substrat	Doğrusal Aralık (mM)	β-Gal/PyOx		CNT/β-Gal/PyOx	
		Denklem[a]	R^2	Denklem[a]	R^2
Glc	0,05-0,4	y=7,851x+0,047	0,988	y=8,021x+0,500	0,986
Gal	0,1-1	y=2,053x+0,069	0,996	y=2,640x+0,163	0,987
Xyl	0,1-1	y=2,787x+0,045	0,999	y=3,323x+0,221	0,981

Mannoz, maltoz, sellobioz, sükroz, fruktoz, N-asetilglukozamin (2,0 mM) için sinyal elde edilememiştir.
[a]x: substrat konsantrasyonunu (mM) ve y:akım yoğunluğunu ($\mu A/cm^2$) ifade etmektedir.

Ayrıca diğer karbohidratların varlığında laktoz için elde edilen biyosensör cevapları test edilmiştir. 0,2 mM laktoz ile birlikte diğer bir karbohidrat ölçüm tamponuna substrat olarak eklenip elde dilen akım değerleri Tablo 3.14'de özetlenmiştir.

Tablo 3.14. Farklı karbohidratların varlığının laktoz cevabına etkisi.

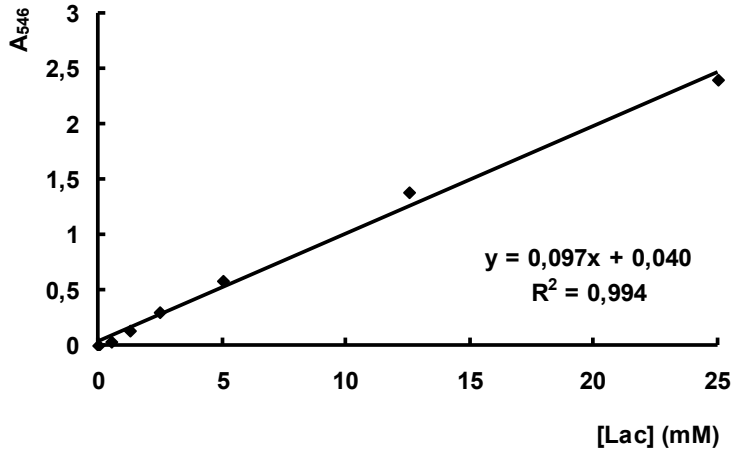
	β-Gal/PyOx		**CNT/β-Gal/PyOx**	
Substrat	**Akım ($\mu A/cm^2$)**	**% Geri Kazanım**	**Akım ($\mu A/cm^2$)**	**% Geri Kazanım**
Lac (0,2 mM)	**0,75**	**-**	**1,06**	**-**
Glc (0,2 mM)	2,250	-	2,3	-
Lac+Glc	**2,95±0,064**	**98**	**3,324±0,102**	**99**
Gal (0,2 mM)	0,54	-	0,8	-
Lac+Gal	**1,29±0,073**	**100**	**1,85±0,089**	**99**
Man (0,2 mM)	-	-	-	-
Lac+Man	**0,748±0,003**	**100**	**1,06±0,001**	**100**
Fru (0,2 mM)	-	-	-	-
Lac+Fru	**0,752±0,003**	**100**	**1,06±0,015**	**100**
Xyl (0,2 mM)	0,6	-	1,047	-
Lac+Xyl	**1,38±0,019**	**102**	**2,03±0,034**	**96**
NacGlc (0,2 mM)	-	-	-	-
Lac+ NacGlc	**0,751±0,001**	**100**	**1,1±0,056**	**104**
Mal (0,2 mM)	-	-	-	-
Lac+Mal	**0,751±0,002**	**100**	**1,009±0,036**	**95**
Suc (0,2 mM)	-	-	-	-
Lac+Suc	**0,775±0,035**	**103**	**1,03±0,042**	**97**
Cel (0,2 mM)	-	-	-	-
Lac+Cel	**0,753±0,004**	**100**	**1,03±0,040**	**97**

*Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3).

3.4.4 Örnek uygulama

Sütün yapısındaki şekerlerden olan laktozu tayin etmek amacıyla sade ve meyve aromalı sütler kullanılmıştır. Sonuçlar spektrofotometrik DNS yöntemi ile karşılaştırılmıştır. DNS yöntemi ile oluşturulan laktoz kalibrasyon grafiği Şekil 3.41'de görülmektedir. Tablo 3.15'te ise β-Gal/PyOx ve CNT/β-Gal/PyOx

biyosensörleri ve DNS yöntemi ile sütte laktoz tayinine yönelik veriler kıyaslanmıştır.



Şekil 3.41. DNS yöntemi ile elde edilen laktoz standart grafiği.

Tablo 3.15. DNS ile kıyaslamalı olarak sütte laktoz tayinine yönelik sonuçlar.

Örnek	Laktoz (g/100 ml)		
	DNS metodu	**β-Gal/PyOx**	**CNT/β-Gal/PyOx**
Aromasız süt	3,84±0,269	3,96±0,162	3,75±0,266
Muzlu süt	3,65±0,099	3,67±0,078	3,65±0,120

*Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n: 3).

Ayrıca standart katma yöntemi ile örneklere laktoz ilave edilerek elde edilen sonuçların doğruluğu test edilmiştir ve sonuçlar Tablo 3.16'da verilmiştir.

Tablo 3.16. Standart katma yöntemi ile sütte laktoz tayini.

Biyosensör	Örnek	Sütte laktoz miktarı (g/100 ml)	Eklenen laktoz miktarı (g/100 ml)	Tayin edilen laktoz miktarı (g/100 ml)	% Geri Kazanım
β-Gal/PyOx	Aromasız süt	3,96±0,162	6,321±0,143	9,675±0,334	106
	Muzlu süt	3,67±0,078	6,321±0,143	10,022±0,077	100
CNT/β-Gal/PyOx	Aromasız süt	3,75±0,266	6,323±0,100	10,212±0,031	99
	Muzlu süt	3,65±0,120	6,323±0,100	10,178±0,254	98

*Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3).

3.5 *P.putida* Hücrelerini Temel Alan Mikrobiyal Biyosensörlere Yönelik Çalışmalar

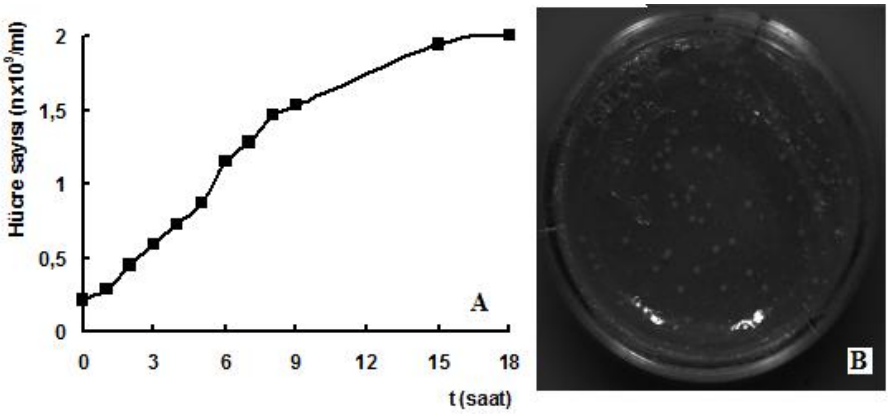
Pseudomonas putida hücreleri ile hazırlanan mikrobiyal biyosensörler kullanılarak kateşol ve glukoz (Timur et al., 2006a; Timur et al., 2007b), fenol (Kirgöz et al., 2006b; Timur et al., 2004; Timur et al., 2003) 4-klorofenol, 2-(4-Hidroksifenil)etanol, 4-Hidroksibenzilalkol, 4-Hidroksifenoksiasetik asit gibi 4-sübstitüe fenoller (McMahon et al., 2005), benzen (Lanyon et al., 2005) (Lanyon et al., 2006), naftalen (Reshetilov et al., 1997a), paraoksan, metilparatiyon, paratiyon gibi p-nitrofenil organofosfor pestisitler (Lei et al., 2005) ve 2,4-dikolorofenoksiasetik asit (2,4-D) (Odaci et al., 2009b), biyolojik oksijen ihtiyacı (BOD) (Chee et al., 2005) analizlerine ilişkin mikrobiyal biyosensörler hazırlanmıştır.

Bu bölümde mikrobiyal biyosensörlerden olan *P. putida* temelli biyosensörler ile elde edilen veriler verilmiştir. İlk olarak *P. putida* hücreleri 1 g/l glukoz içeren MSM ortamında üretilmiştir ve büyüme profilleri çıkarılmıştır. Hücreler ekim yapıldıktan 16 saat sonra ölüm fazına geçmeden önce kullanılmıştır. Hücrelerin büyüdüğü MSM ortamından 10 ml alınıp santrüfüj yapılmıştır, süpernatant atılıp hücre pastası *P. putida* biyosensörlerini hazırlamak için kullanılmıştır. Biyosensörler hazırlanırken immobilizasyon materyali olarak CHIT ve çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehid kullanılmıştır. Glutaraldehid bakteri hücrelerinin % 5'in üzerinde glutaraldehid çözeltisi ile 20 dakika muamele edilmesi hücrelerin canlılıklarını yitirmesine neden olmaktadır (Grobe and Stewart, 2000). Bu nedenle bakteri hücrelerinin immobilizasyonunda glutaraldehid oranı % 5'in altında tutulmuştur. Hazırlanan *P. putida* biyosensörlerinin ilk olarak hazırlama koşullarının optimizasyonu yapılmıştır. Daha sonra optimum pH, sıcaklık ve çalışma potansiyeli optimizasyonu yapılarak CNT miktarının biyosensör cevabına etkisi araştırılmıştır. *P. putida* biyosensörleri ile glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik ve substrat spesifikliği çalışmaları yapılmıştır.

3.5.1 Hücre sayımı ve büyüme eğrisine ilişkin veriler

P. putida biyosensörlerini hazırlamadan önce hücrelerin büyüme eğrileri oluşturularak dökme plaka yöntemi ile hücre sayımları yapılmıştır. Logaritmik fazın sonundaki hücreler kullanılacağı için bu süresinin belirlenebilmesi için *P. putida*'ya ilişkin büyüme eğrileri oluşturuldu ve elde edilen veriler Şekil 3.42'de

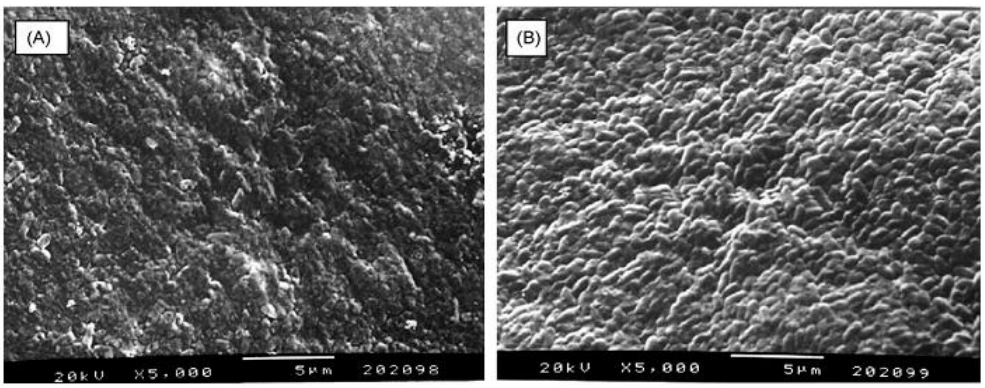
verilmiştir. 16. saatteki hücrelerle *P. putida* biyosensörleri hazırlanmıştır ve bu andaki hücrelerin sayısını belirlemek amacıyla dökme plaka yöntemine göre sayım yapılmıştır (Şekil 3.41B).



Şekil 3.42. *P. putida* hücrelerinin büyümesine ilişkin veriler [A: *P. putida* hücrelerinin büyüme eğrisi; B: Dökme plaka yöntemi ile hücre sayımı].

3.5.2 *P. putida* hücrelerini temel alan biyosensörlerin optimizasyonuna ilişkin veriler

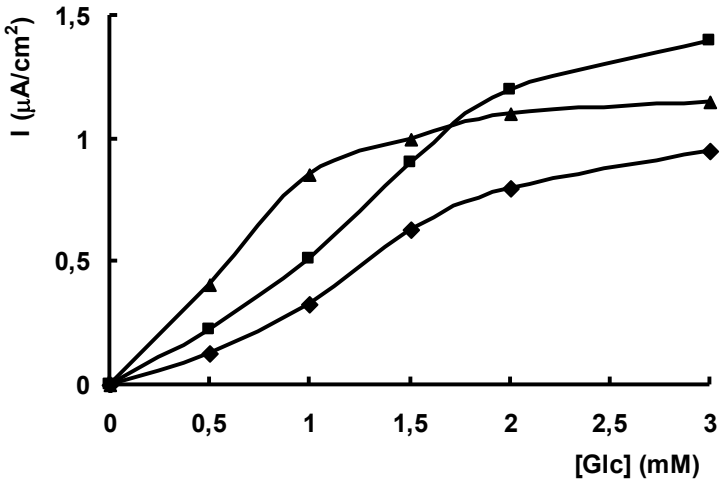
P. putida biyosensörünün optimizasyonuna yönelik çalışmalarda, ilk olarak hücre miktarının, CHIT yüzdesinin ve glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi incelenmiştir. CNT miktarının biyosensör cevabına etkisi incelendikten sonra sonra pH, sıcaklık ve potansiyel gibi çalışma koşulları optimize edilmiştir. CHIT ve CHIT-CNT kullanılarak grafit yüzeye immobilize hücrelerin SEM görüntüleri Şekil 3.43'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi CHIT-CNT ile modifiye edilen yüzeylerde hücrelerin daha yoğun olduğu görülmektedir. Hem Gram (-) hem de Gram (+) bakterilerle gerçekleştirilen çalışmalarda hücrelerin CNT yüzeyinde adsorblandığına dair çalışmalar bulunmaktadır (Upadhyayula et al., 2008).



Şekil 3.43. CHIT (A) ve CHIT-CNT (B) ile modifiye grafit elektrotlar yüzeyine immobilize edilen *P.putida* hücrelerinin SEM görüntüleri.

3.5.2.1 Hücre miktarının optimizasyonu

P. putida biyosensörleri ile alınan ölçümlere hücre miktarının etksinin belirlenmesi amacıyla CHIT ve glutaraldehid miktarı sabit tutularak 3 farklı miktarda hücre içeren (10 µl: $0{,}36\times10^9$; 20 µl: $0{,}72\times10^9$; 30 µl: $1{,}08\times10^9$ hücre) mikrobiyal biyosensörler hazırlanmıştır. Glukozun değişen konsantrasyonları ile akım değerleri arasında grafikler (Şekil 3.44) çizilmiştir. En geniş doğrusal tayin aralığının 20 µl hücre kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle elde edildiği bulunmuştur. Bundan sonraki çalışmalarda bu miktar kullanılarak biyosensörler hazırlanmıştır. 10 µl hücre pastası kullanılarak hazırlanan biyosensörlerde sensör cevabı düşük çıkmıştır, hücre miktarının artırılmasıyla biyosensör cevabı artmaıştır, ancak 30 µl hücre kullanıldığında substratın difüzyonu için engel oluşmakta ve susbstrat konsantrasyonu arttıkça biyosensör cevabı azalmaktadır.

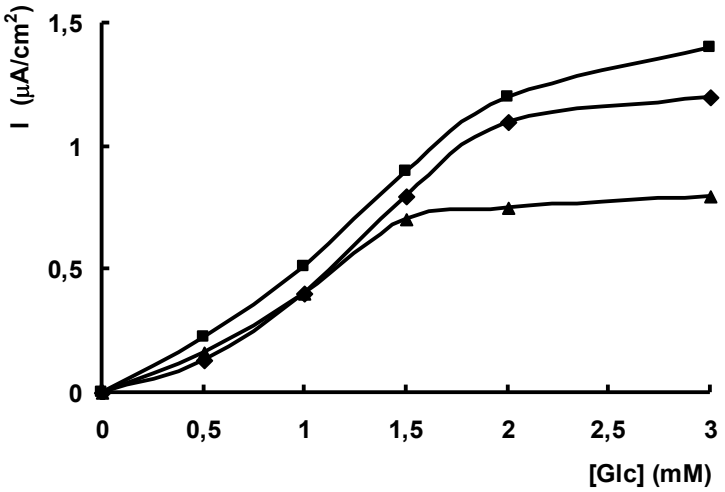


Şekil 3.44. Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 30 °C; -700 mV; ♦ 10 µl, ■ 20 µl, ▲ 30 µl].

3.5.2.2 CHIT miktarının optimizasyonu

Çalışmanın bu kısmında diğer koşullar sabit tutularak CHIT miktarları farklandırılmıştır. 20 µl hücre ve % 1,0 oranında glutaraldehid kullanılarak 3 farklı CHIT çözeltisi ile *P.putida* biyosensörleri hazırlanmıştır. Glukoz tayinine yönelik olarak çizilen grafik Şekil 3.45'ten görüldüğü gibi en yüksek akım değerlerine % 1,0'lik CHIT çözeltisi kullanarak hazırlanan *P.putida* biyosensörü ile ulaşılmıştır. *P. putida* biyosensörlerini hazırlamak için % 1 ve % 0,5'lik CHIT çözeltileri kullanıldığında akım değerleri birbirine oldukça yakındır. Ancak % 2'lik CHIT ile hazırlanan biyosensörlerde akım değerleri düşmektedir. Bunun

sebebi glukozun ve çözünmüş oksijenin hücrelere ulaşmasının daha zor olması olabilmektedir.



Şekil 3.45. CHIT yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 sodyum fosfat tamponu; 30 ^{o}C; -700 mV; ♦ % 0,5; ■ % 1,0; ▲ % 2,0].

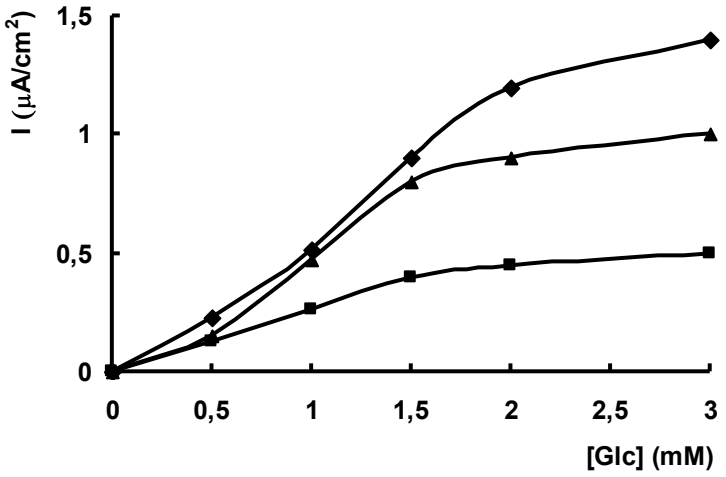
3.5.2.3 Glutaraldehid miktarının optimizasyonu

Çapraz bağlayıcı; glutaraldehid yüzdesinin değiştirilmesi biyosensör cevaplarında farklanma yaratacağı için üç farklı glutaraldehid konsantrasyonuyla *P. putida* biyosensörleri hazırlandı. Şekil 3.46'dan görüldüğü gibi en yüksek biyosensör cevabı % 1,0'lik glutaraldehid kullanıldığı zaman elde edilmiştir. Çapraz bağlayıcı ajan olarak % 5'lik glutaraldehid kullanıldığında yeterli sayıda hücre immobilize edilmemiş olabilir ve tampona hücre kaçışı olabilmektedir. Ancak glutaraldehid konsantrasyonu belirli bir değerin üzerine çıkınca (% 1,5'lik) hücreler için toksik etki yaratabilmektedir. Ayrıca çapraz bağ sayısının artmasıyla hücrelerin membran yapısı bozulabileceğinden biyosensör cevabında azalmaya neden olabilmektedir.

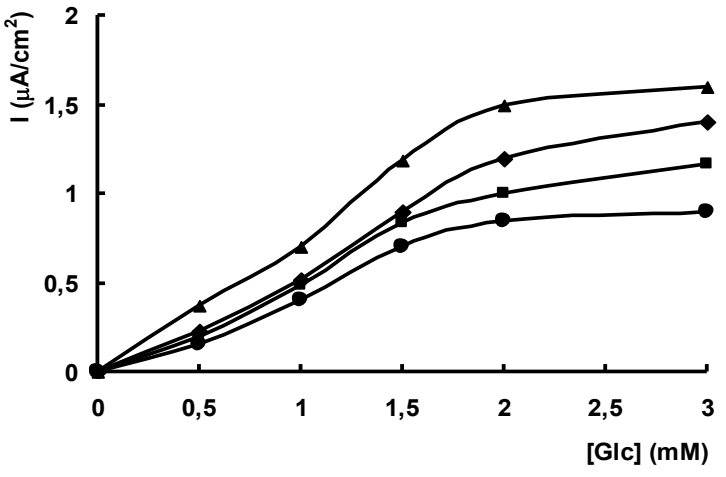
3.5.2.4 CNT miktarının optimizasyonu

P. putida biyosensörleri ile elde edilen akım değerlerine, CHIT'ın CNT ile modifikasyonunun nasıl etki yapacağı bu bölümde test edilmiştir. Bienzimatik biyosensörlerde olduğu gibi mikrobiyal biyosensörlerde de farklı miktarlarda CNT içeren CHIT-CNT çözeltileri hazırlanıp bunlar hücre immobilizasyonunda matriks olarak kullanılmıştır. Farklı miktarlarda CNT içeren çözeltilerle hazırlanan *P. putida* biyosensörü ile glukoz tayinine yönelik olarak elde edilen grafikler Şekil 3.47'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi 0,2 mg/ml CNT

içeren CHIT-CNT çözeltisi ile en yüksek sinyaller alınmıştır. *P. putida* biyosensörleri hazırlanırken konsantrasyonu 0,1 mg/ml olan CNT çözeltisi kullanıldığında CNT kullanılmayan biyosensöre göre biyosensör cevabı daha düşüktür ancak 0,2 mg/ml CNT çözeltisi kullanıldığında biyosensör cevabı artmıştır. Daha öncek bölümlerde olduğu gibi bu konsantrasyon biyosensör cevabını artırırken yarattığı difüzyon engelinin biyosensör cevabına etkisi gözlenmemiştir.



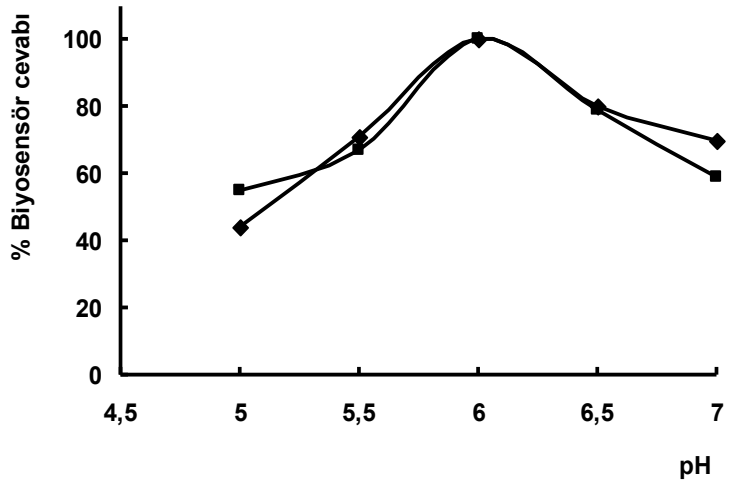
Şekil 3.46. Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 fosfat tamponu; 30 °C; -700 mV; ■% 0,5; ♦ % 1,0; ▲ % 1,5].



Şekil 3.47. CNT miktarının biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 fosfat tamponu; 30 °C; -700 mV; ♦CHIT; ■CHIT-CNT (0,1 mg/ml CNT); ▲CHIT-CNT (0,2 mg/ml CNT); ●CHIT-CNT (0,5 mg/ml CNT)].

3.5.2.5 Optimum pH

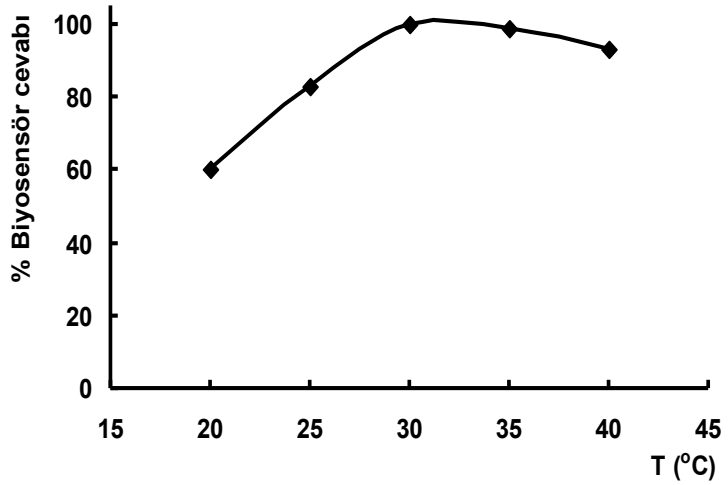
Bu bölümde *P. putida* biyosensörlerinin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 50 mM pH 5,0; 5,5 asetat tamponları ve 50 mM pH 6,0; 6,5; 7,0 fosfat tamponları kullanılarak akım değerlerindeki farklanma belirlenmiştir. Çizilen optimum pH grafiklerinden (Şekil 3.48) hem CHIT/*P. putida* hem de CHIT-CNT/*P. putida* biyosensörleri için çalışma pH'sı 6 olarak bulunmuştur. *P. putida* hücreleri için kullanılan büyüme ortamının pH'sı 6,9'dur ve *P. putida* hücrelerinin için büyümesi uygun olan pH değeridir (Timur et al., 2006a; Timur et al., 2007b). Polikatyonik karaktere sahip olan CHIT optimum pH değerinin asidik bölgeye kaymasına neden olmuştur.



Şekil 3.48. Biyosensör cevabına pH'ın etkisi [pH 5,0–5,5 asetat; pH 6,0-7,0; 50 mM fosfat tamponları; 30 ^{o}C; -700 mV; ♦ CHIT/*P. putida*, ■ CHIT-CNT/*P. putida*].

3.5.2.6 Optimum sıcaklık

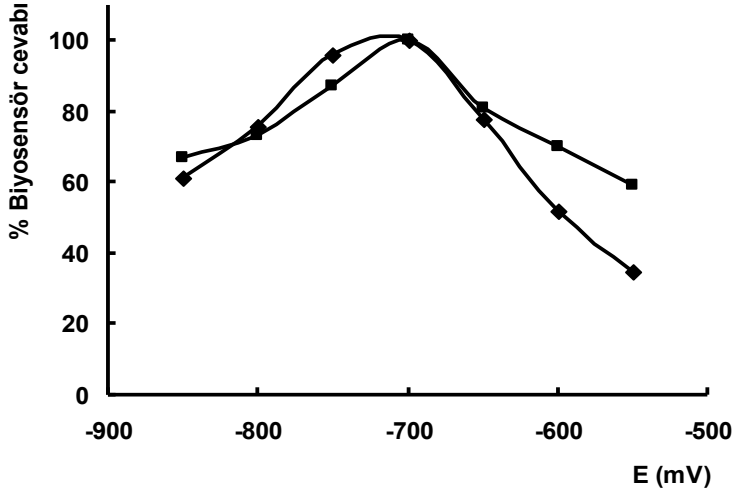
P.putida biyosensörleri ile çalışma sıcaklığının belirlenmesi amacıyla termostatik ölçüm hücresi kullanılarak 20–40 ^{o}C arasındaki sıcaklıklarda ölçümler gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık ile % biyosensör cevabına ilişkin optimum sıcaklık grafiğinden (Şekil 3.49) görüldüğü gibi çalışma sıcaklığı 30 ^{o}C olarak belirlenmiştir. Hücrelerin büyüme sıcaklığı 28 ^{o}C'dir ve bulunan optimum sıcaklık değeri hücrelerin büyüme sıcaklığı ile benzerdir (Timur et al., 2006a; Timur et al., 2007b).



Şekil 3.49. Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisi [pH 6,0, 50 mM fosfat tamponu; -700 mV].

3.5.2.7 Çalışma potansiyelinin optimizasyonu

Oksijenin konsantrasyonundaki değişimi temel alan ölçüm sisteminde, uygulanacak potansiyelin *P.putida* biyosensörleri ile elde edilecek biyosensör cevabına etkisi bu bölümde test edilmiştir. Elde edilen akım değerlerindeki farklanmadan yola çıkılarak hesaplanan % biyosensör cevapları ile uygulanan potansiyel arasında çizilen hidrodinamik voltammogramlardan (Şekil 3.50) CNT ile modifiye edilen ve edilmeyen mikrobiyal biyosensörlerin her ikisi için de en uygun çalışma potansiyeli -700 mV olarak bulunmuştur.

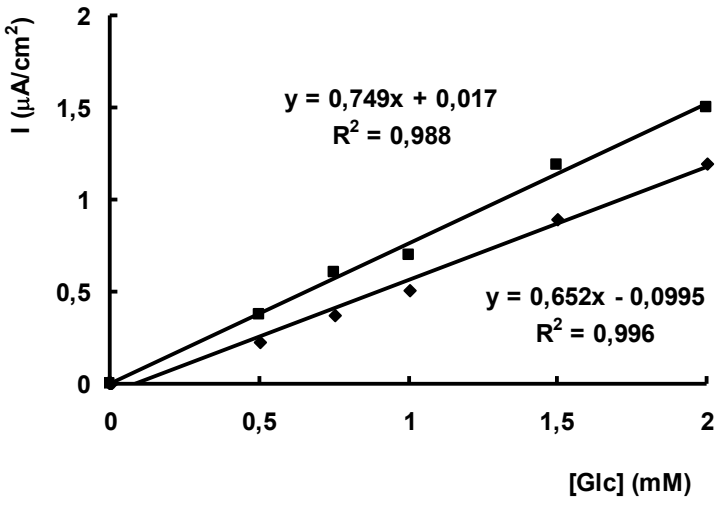


Şekil 3.50. Biyosensör cevabına potansiyelin etkisi [pH 6,0, 50 mM fosfat tamponu; 30 °C; ♦ CHIT/*P.putida*, ■ CHIT-CNT/*P.putida*].

3.5.3 Analitik karakterizasyon

3.5.3.1 Glukoz tayini için doğrusal tayin aralığı

Optimize edilen hazırlama ve çalışma koşulları kullanılarak CHIT/*P. putida* ve CHIT-CNT/*P. putida* biyosensörleri ile glukoz tayini gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki glukoz çözeltileri çalışma tamponuna eklenerek konsantrasyona bağlı akım değerindeki farklanmalar kaydedilerek glukoz konsantrasyonu ile akım değerleri arasında çizilen grafik Şekil 3.51'de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi CHIT-CNT/*P. putida* biyosensörleri ile daha yüksek akım değerlerine ulaşılmıştır. Ancak bu artış glukoz tayini amacıyla hazırlanan PyOx biyosensörlerine kıyasla daha düşüktür. Pozitif çalışma potansiyellerinde H_2O_2'nin ya da medyatörlerin izlendiği sistemlerde akımın artışına CNTlerin pozitif etkisi daha fazladır. Ayrıca daha önceki çalışmalarda farklı elektrotlar ve farklı immobilizasyon yöntemleri kullanılarak hazırlanan glukoz tayinine yönelik *P. putida* biyosensörlerinin kıyaslanmasına ilişkin sonuçlar Tablo 3.17'de verilmiştir.



Şekil 3.51 Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [50 mM, pH 6,0 fosfat tamponu; 30 ^{o}C; -700 mV; ♦ CHIT/*P.putida*, ■ CHIT-CNT/*P.putida*].

Tablo 3.17. Glukoz tayinine yönelik amperometrik *P. putida* biyosensörlerinin kıyaslanması.

Elektrot	İmmobilizasyon metodu	Çalışma potansiyeli (mV)	Analitik performans			Kaynak
			Doğrusal aralık	% VK	Operasyonel stabilite	
CP	Os-redoks polimer tip I	+300	0,05-2,0 mM	2,8	-	Timur et al., 2007b
Au	Os-redoks polimer tip I	+300	0,2-1,4 mM	-	8 saat sonunda % 58 kayıp	Timur et al., 2006a
Au	Os-redoks polimer tip II	-180	0,1-2,2 mM	-	8 saat sonunda % 25 kayıp	Timur et al., 2006a
GE	CHIT	-700	0,5-2,0 mM	2,9	3 saat sonunda % 15 kayıp	Bu çalışma
GE	CHIT-CNT	-700	0,5-2,0 mM	1,2	3 saat sonunda % 11 kayıp	Bu çalışma

CP: Karbon pasta; GE: Grafit elektrot; Os-redoks polimer tip I: Poly(1-vinilimidazol)$_{12}$-[Os-(4,4'-dimetil-2,2'-dipiridil)$_2$Cl$_2$]$^{2+/+}$; Os-redoks polimer Tip II: poli(vinilpiridin)-[Os-(N,N'-metillenmiş-2,2'-biimidazol)$_3$]$^{2+/3+}$

3.5.3.2 Tekrarlanabilirlik ve operasyonel stabilite

Hazırlanan *P. putida* biyosensörlerinin tekrarlanabilirliğinin kontrolü amacıyla 0,7 mM glukoz standardı ile ard arda 10 ölçüm alınmıştır. Hem CHIT/*P. putida* hem de CHIT-CNT/*P. putida* biyosensörleri için ilgili kalibrasyon grafikleri kullanılarak SS değerleri sırasıyla ±0.021 mM ve ±0.009 mM olarak, % VK değerleri ise sırasıyla % 2,9 ve % 1,2 olarak hesaplanmıştır.

Operasyonel kararlılığın belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan CHIT/*P. putida* ve CHIT-CNT/*P. putida* biyosensörleri ile gün içindeki belirli aralıklarla ölçüm alınmıştır ve 3 saatlik ölçümler sonrasında CHIT/*P. putida* için % 15, CHIT-CNT/*P. putida* için ise % 11 aktivite kaybı gözlenmiştir.

3.5.4 Substrat spesifikliği

P. putida hücreleri tek karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı ortamlarda yetiştirilmiştir ve glukoz tayini amacıyla doğrusal bir grafik elde edilebilmektedir. Ancak diğer karbohidratların tayini için CHIT/*P. putida* ve CHIT-CNT/*P. putida* biyosensörlerinin kullanılıp kullanılamayacağı bu bölümde test edilmiştir. Elde dilen sonuçlar Tablo 3.18'de verilmiştir. Glukoz dışındaki diğer karbohidratların ölçüm ortamına glukoz ile beraber eklenmesi sonucu elde edilen akım değerleri ise Tablo 3.19'da görülmektedir.

Tablo 3.18. CHIT/*P. putida* ve CHIT-CNT/*P. putida* ile diğer karbohidratların tayini.

Substrat	Doğrusal Aralık (mM)	CHIT/*P.putida*		CHIT-CNT/*P.putida*	
		Denklem[a]	R^2	Denklem[a]	R^2
Gal	1,0-3,0	y=0,118x+0,008	0,993	y=0,138x+0,023	0,979
Man	1,0-3,0	y=0,132x+0,029	0,960	y=0,201x+0,023	0,988
Xyl	1,0-3,0	y=0,137x-0,019	0,986	y=0,250x-0,042	0,960

Maltoz, sellobioz, sükroz, fruktoz, laktoz, N-asetilglukozamin (3,0 mM) için sinyal elde edilememiştir.
[a]x: substrat konsantrasyonunu (mM) ve y:akım yoğunluğunu ($\mu A/cm^2$) ifade etmektedir.

Tablo 3.19. Farklı karbohidratların varlığının glukoz için biyosensör cevabına etkisi.

Substrat	CHIT/*P. putida*		CHIT-CNT/*P. putida*	
	Akım ($\mu A/cm^2$)	% Geri Kazanım	Akım ($\mu A/cm^2$)	% Geri Kazanım
Glc (1,5 mM)	**0,762**	**-**	**1,185**	**-**
Gal (1,5 mM)	0,195	-	0,269	-
Glc+Gal	**0,873±0,024**	**91**	**0,898±0,003**	**62**
Man (1,5 mM)	0,272	-	0,4	-
Glc+Man	**0,422±0,025**	**41**	**0,939±0,003**	**59**
Fru (1,5 mM)	-	-	-	-
Glc+Fru	**0,707±0,021**	**93**	**0,805±0,005**	**68**
Xyl (1,5 mM)	0,180	-	0,36	-
Glc+Xyl	**0,396±0,005**	**42**	**1,063±0,055**	**69**
GlcNAc (1 mM)	-	-	-	-
Glc+ GlcNAc	**0,263±0,003**	**35**	**0,685±0,004**	**58**
Lac (1,5 mM)	-	-	-	-
Glc+Lac	**0,412±0,011**	**54**	**0,688±0,004**	**58**
Suc (1,5 mM)	-	-	-	-
Glc+Suc	**0,354±0,005**	**46,5**	**0,743±0,003**	**63**
Mal (1,5 mM)	-	-	-	-
Glc+Mal	**0,421±0,018**	**55**	**0,814±0,013**	**69**
Cel (1,5 mM)	-	-	-	-
Glc+Cel	**0,439±0,010**	**58**	**0,687±0,023**	**58**

*Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3).

Tablo 3.18'de görüldüğü gibi CHIT/*P. putida* ve CHIT-CNT/*P. putida* biyosensörleri ile glukoz dışında galaktoz, mannoz ve ksiloz tayini yapılabilmektedir. Biyomatriksin CNT ile modifiye edilmesi sonrasında biyosensör cevaplarında belirli bir artış gözlenmiştir. Tablo 3.19'dan elde edilen sonuçlara göre, enzimatik biyosensörlerle bulunan sonuçların tersine diğer bir karbohidratın varlığı biyosensörler cevaplarında düşüşe neden olmaktadır.

3.6 *P. fluorescens* Hücrelerini Temel Alan Mikrobiyal Sensörlere Yönelik Çalışmalar

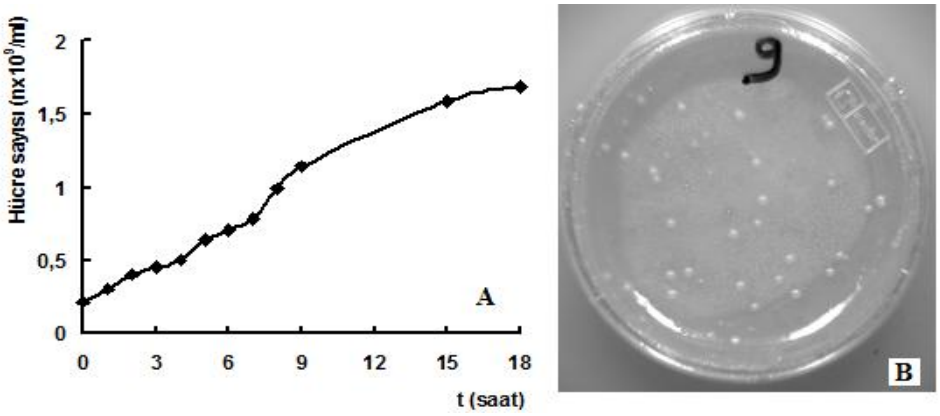
Pseudomonas fluorescens hücreleri ile hazırlanan biosensör sistemleri ile kateşol, fenol, (Timur et al.,, 2006a), glukoz (Timur et al., 2006a; Kirgoz et al., 2007; Odaci et al., 2008; Yeni et al., 2008; Tuncagil, 2009a; Tuncagil, 2009b), naftalin ve salisilat (Trogl et al., 2005) gibi moleküllerin tayini gerçekleştirilmiştir. Ayrıca biyolojik oksijen ihtiyacının (BOD) ölçümüne yönelik olarak hazırlanmış *P. fluorescens* biyosensörleri mevcuttur (Raudkivi et al., 2008).

P. fluorescens hücrelerini temel alan biyosensörlerinin hazırlanmasında izlenen yol *P. putida* biyosensörlerinin hazırlanmasındaki ile benzerlik göstermektedir. İlk olarak, *P. fluorescens* hücreleri karbon kaynağı olarak glukoz bulunan MSM ortamında üretildiler, daha sonra CHIT immobilizasyon matriksi olarak kullanılmış ve CHIT/*P. fluorescens* biyosensörleri hazırlanmıştır. Hazırlama koşullarının optimizasyonu sonrasında biyomatriksin CNT ile modifiye edilerek biyosensör cevabı CNT ile modifiye edilmeyen sistemle kıyaslanarak en yüksek biyosensör cevabının alındığı CNT miktarı belirlenmiştir. Daha sonra çalışma koşullarının optimizasyonu amacıyla optimum pH, sıcaklık ve çalışma potansiyeli bulunmuştur. Bu aşamadan sonra hem CHIT/*P. fluorescens* hem de CHIT-CNT/*P. fluorescens* biyosensörleri ile glukoz analizine yönelik doğrusal tayin aralığı belirlenmiş ve tekrarlanabilirlik ile operasyonel stabilite çalışmaları yapılmıştır. Son olarak glukoz dışındaki karbohidratlar için biyosensör cevapları araştırılmıştır.

3.6.1 Hücre sayımı ve büyüme eğrisine ilişkin veriler

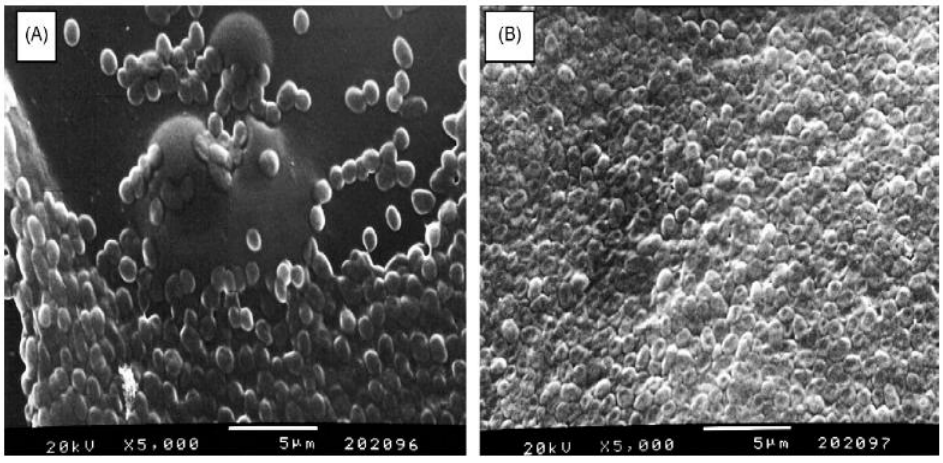
P. fluorescens bakterileri ile hazırlanan biyosensörlerdeki immobilize edilen hücre miktarını ve kullanılacak hücrelerin ekim yapıldıktan sonra kaçıncı saate kullanılma gerektiğinin belirlemek amacıyla hücre büyüme eğrileri ve

dökme plaka yöntemi ile hücre sayımları gerçekleştirildi. *P. fluorescens* için elde dilen büyüme eğrisi ve dökme plaka yöntemi ile katı ağarda ekim sonrası hücrelerin sayısı Şekil 3.52'de verilmiştir. Grafikten de görüleceği gibi hücreler 18 saatin sonunda durağan faza geçmektedir, bu nedenle 15 saatlik hücreler biyosensör hazırlanmasında kullanılmıştır.



Şekil 3.52. *P. fluorescens* hücrelerinin büyümesine ilişkin veriler [A: *P.fluorescens* hücrelerinin büyüme eğrisi; B: Dökme plaka yöntemi ile hücre sayımı].

P. fluorescens hücreleri geç logaritmik faza (15 saat) ulaştığında santrifüjlenerek biyosensör hazırlanmasında kullanıldı. CHIT ve CHIT-CNT kullanarak modifiye edilen grafit yüzeylere bakterilerin immobilizasyonu sonrasında elde edilen SEM görüntüleri Şekil 3.53'de verilmiştir.



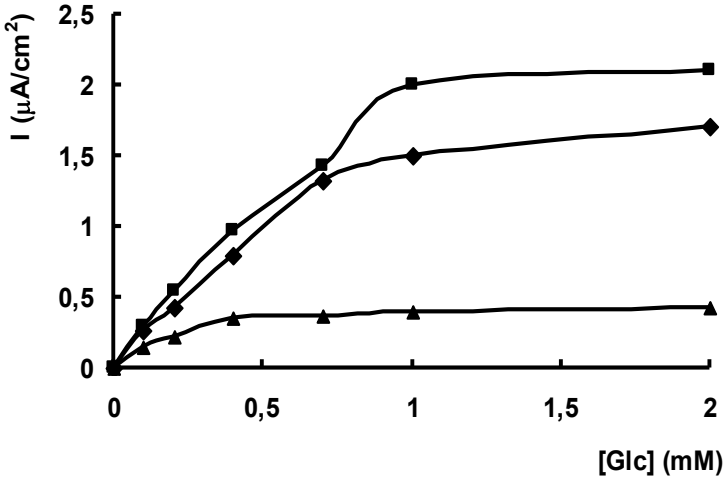
Şekil 3.53. CHIT (A) ve CHIT-CNT (B) ile modifiye grafit elektrotlar yüzeyine immobilize edilen *P. fluorescens* hücrelerinin SEM görüntüleri.

3.6.2 *P. fluorescens* hücrelerini temel alan biyosensörlerin optimizasyonuna ilişkin veriler

P. fluorescens biyosensörleri ile glukoz tayinine yönelik çalışmalarda ilk olarak hazırlama koşulları daha sonra çalışma koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde öncelikle hücre, kitosan ve glutaraldehid miktarının optimizasyonuna ilişkin sonuçlar verilmiş olup CNT miktarının biyosensör cevabına etkisine ilişkin verilerin ardından optimum pH, sıcaklık ve çalışma potansiyeline ilişkin sonuçlar sunulmuştur.

3.6.2.1 Hücre miktarının optimizasyonu

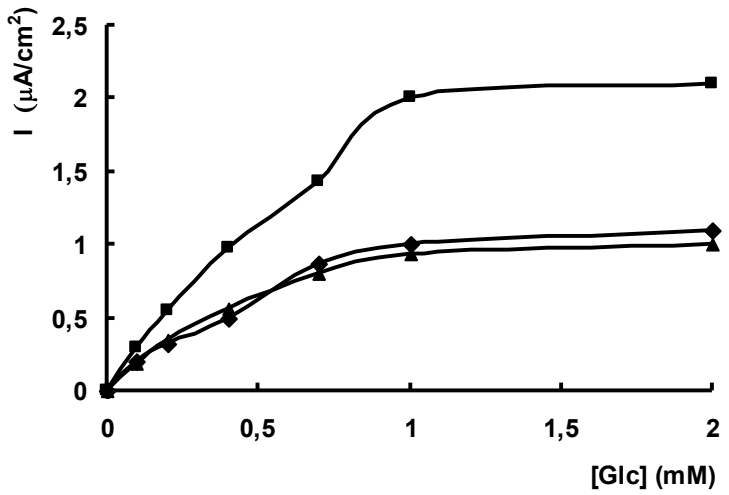
P. fluorescens biyosensörlerinin optimizasyon çalışmalarına yönelik olarak yapılan ilk deneme optimum hücre miktarının belirlenmesidir. Mikrobiyal biyosensörler hazırlanmadan önce MSM ortamındaki hücreler santrifüjlendi. Daha sonra elde edilen hücre pastası potasyum fosfat tamponunda (pH 7,0; 50 mM) çözüldü. 10 µl ($0{,}535\times10^9$ hücre), 20 µl ($1{,}07\times10^9$ hücre) ya da 30 µl ($1{,}605\times10^9$ hücre) hücre pastası ve 20 µl % 1'lik glutaraldehid CHIT ile modifiye edilmiş grafit elektrot yüzeyine eklendi. Üç farklı biyosensör ile glukoz tayinine yönelik elde edilen sonuçlar Şekil 3.54'te verilmiştir. Grafikten görüldüğü gibi en yüksek akım değerleri 20 µl hücre kullanılarak hazırlanan biyosensörle sağlanmıştır. *P. fluorescens* için *P. putida* biyosensörleri ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3.54. Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 fosfat tamponu; 30 °C; -700 mV; ♦ 10 µl, ■ 20 µl, ▲ 30 µl].

3.6.2.2 CHIT miktarının optimizasyonu

Çalışmanın bu kısmında diğer bileşenler sabit tutularak CHIT miktarı değiştirilmesiyle 3 farklı *P. fluorescens* biyosensörü hazırlanmıştır. Her bir sistem için glukoz derişimine bağlı olarak akım değerindeki değişim izlendiğinde Şekil 3.55 elde edilmiştir. Bu çalışma sonrasında % 1'lik CHIT çözeltisi ile hazırlanan mikrobiyal biyosensör ile en yüksek akım değerlerine ulaşıldığı görülmektedir. % 0,5 ve % 2'lik CHIT çözeltisi kullanılarak hazırlanan *P. fluorescens* biyosensörleri ile *P. putida* biyosensörlerinde olduğu gibi daha düşük akım değerleri elde edilmiştir. Bu nedenle *P. fluorescens* temelli tüm çalışmalarda % 1'lik CHIT çözeltisi kullanılmıştır.

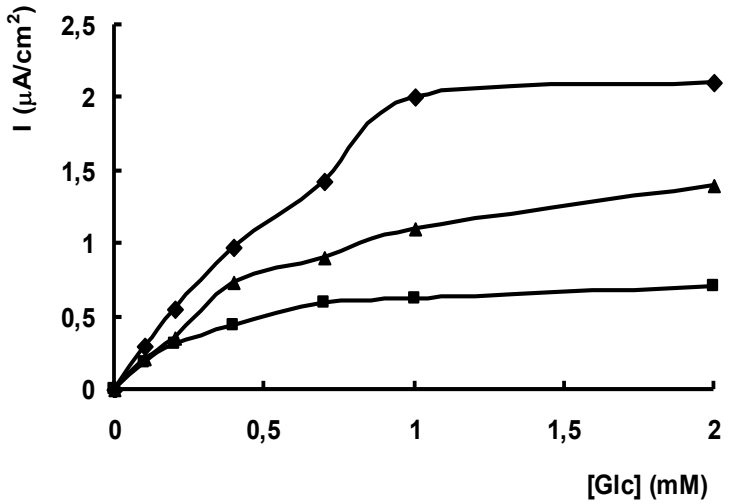


Şekil 3.55. CHIT yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 fosfat tamponu; 30 °C; -700 mV; ♦ % 0,5; ■ % 1,0; ▲ % 2,0].

3.6.2.3 Glutaraldehid miktarının optimizasyonu

Glutaraldehid yüzdesini farklanmanın *P. fluorescens* biyosensörleri ile elde edilen akım değerlerini nasıl etkilediği bu bölümde araştırılmıştır. Hücre miktarı ve CHIT yüzdesi sabit tutulup glutaraldehid yüzdesi değiştirilerek 3 farklı *P. fluorescens* biyosensörü hazırlanmıştır. Şekil 3.56'da görüldüğü gibi en uygun glutaraldehid miktarı *P. putida* biyosensörlerinden farklı olarak % 0,5 bulunmuştur ve tüm *P. fluorescens* biyosensörlerinin hazırlanmasında bu oran kullanılmıştır. *P. fluroescens* biyosensörlerinin hazırlanmasında % 0,25 ya da % 1'lik glutaraldehid çözeltileri kullanıldığnıda daha düşük biyosensör cevapları elde edilmiştir. Glutaraldehid yüzdesi % 0,25 olarak kullanıldığında bu oran

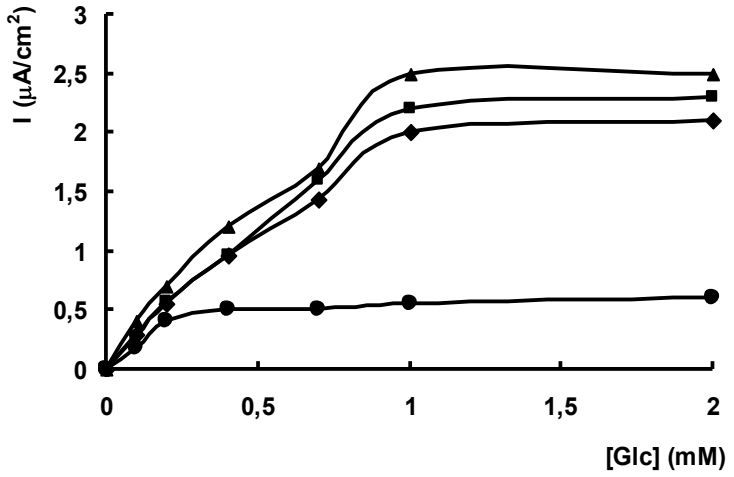
hücrelerin stabil bir şekilde immobilizasyonu için yetersiz olmaktadır, % 1'lik glutaraldehid ise hücreler ile CHIT arasındaki ve hücrelerin kendi arasındaki çapraz bağ sayısında artışa neden olmaktadır.



Şekil 3.56. Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 fosfat tamponu; 30 ^{o}C; -700 mV; ■% 0,25; ♦ % 0,5; ▲ % 1,0].

3.6.2.4 CNT miktarının optimizasyonu

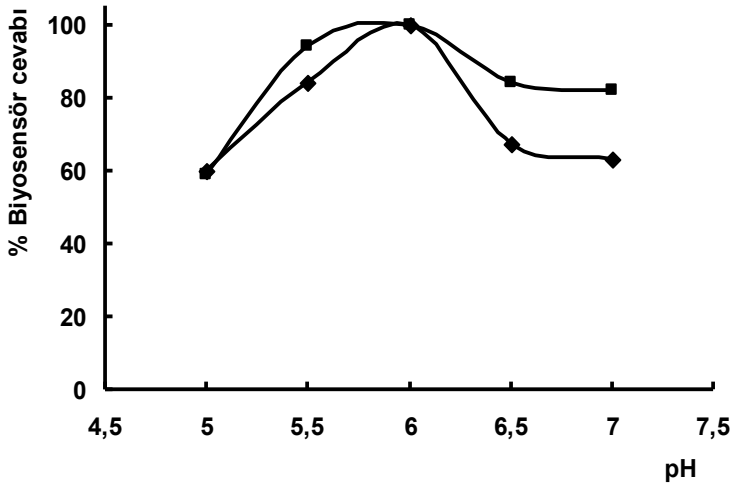
Bu çalışmada, farklı miktarlarda CNT ile modifiye edilen CHIT çözeltileri ile CHIT-CNT/*P. fluorescens* biyosensörleri hazırlanmıştır. Daha sonra glukoz tayininde kullanılabilirliklerine yönelik çalışmalardan elde edilen grafikten (Şekil 3.57) en uygun miktarın 0,2 mg/ml CNT ile modifiye sistemden elde edilmiştir. 0,1 mg/ml CNT içeren CHIT-CNT ile hazırlanan *P. fluorescens* biyosensörleri ile elde edilen akım değerleri CNT içermeyen CHIT ile hazırlanan biyosensörlerle elde edilen akımdan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak 0,2 mg/ml CNT içeren CHIT-CNT ile hazırlanan biyosensörlerde akım değerlerinin belirli bir oranda arttığı görülmektedir. CNT konsantrasyonu 0,5 mg/ml olarak arttığında akım değerlerinin hızlı bir şekilde düştüğü görülmektedir. CNT miktarının artması hem substratın hem de oksijenin hücrelere ve elektrot yüzeyine ulaşmasında engel oluşturmaktadır.



Şekil 3.57. CNT miktarının biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 6,0 fosfat tamponu; 30 °C; -700 mV; ♦CHIT; ■CHIT-CNT (0,1 mg/ml CNT); ▲CHIT-CNT (0,2 mg/ml CNT); ●CHIT-CNT (0,5 mg/ml CNT)].

3.6.2.5 Optimum pH

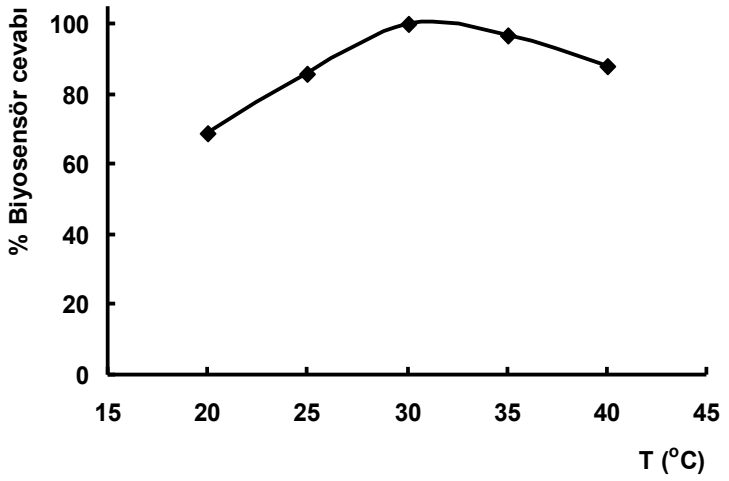
CHIT/P.*fluorescens* ve CHIT-CNT/*P.fluorescens* biyosensörlerinin optimum pH'ını belirlemek amacıyla 50 mM pH 5,0; 5,5 asetat tamponları ve 50 mM pH 6,0; 6,5; 7,0 fosfat tamponları kullanılarak ölçümler alındı. pH ile % biyosensör cevabı arasındaki çizilen grafikten (Şekil 3.58) *P. putida* biyosensörlerine benzer bir şekilde optimum pH 6,0 olarak bulunmuştur. *P. fluorescens* hücreleri için büyüme ortamının pH değeri 6,9'dur. CHIT polikatyonik bir polimer olduğu için optimum pH büyüme ortamının pH değerinden daha düşük olarak bulunmasına neden olmuştur.



Şekil 3.58. Biyosensör cevabına pH'ın etkisi [pH 5,0–5,5 asetat; pH 6,0–7,0; 50 mM fosfat tamponları; 30 °C; -700 mV; ♦ CHIT/*P.fluorescens*, ■ CHIT-CNT/*P.fluorescens*].

3.6.2.6 Optimum Sıcaklık

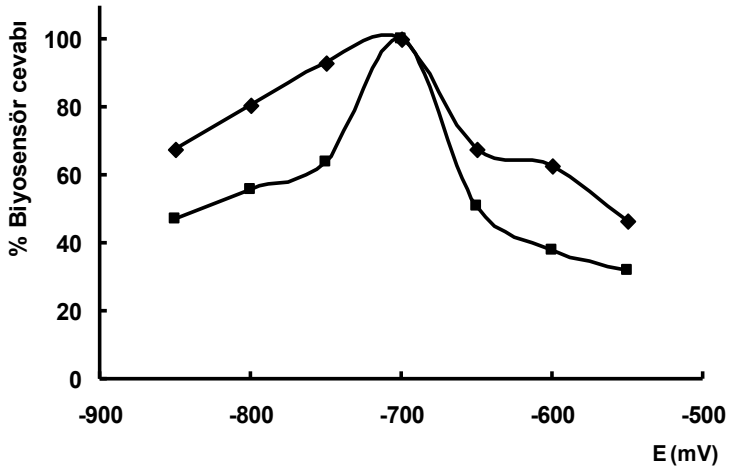
Hazırlanan mikrobiyal biyosensörlerin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 20–42 ^{o}C aralığında düşük sıcaklıktan yükseğe doğru ölçümler alındıktan sonra sıcaklık değişimine bağlı olarak farklanan biyosensör cevapları arasında optimum sıcaklık grafiği çizilmiştir (Şekil 3.59). *P. putida* ve *P. fluorescens* hücreleri için büyüme ortamı sıcaklığı 28 ^{o}C'dir. Oluşturulan optimum sıcaklık grafiğinden CHIT ile immobilizasyon sonrasında her iki suş için optimum sıcaklık 30 ^{o}C bulunmuştur.



Şekil 3.59. Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisi [pH 6,0, 50 mM fosfat tamponu; -700 mV].

3.6.2.7 Çalışma potansiyelinin optimizasyonu

P. fluorescens biyosensörleri ile yapılacak ölçümlerde kullanılacak potansiyelin belirlenmesi amacı ile -550 ile -850 mV arasındaki potansiyellerde çalışılmıştır. Oksijenin tüketimini temel alan diğer biyosensörlerde olduğu gibi hem CHIT/*P. fluorescens* hem de CHIT-CNT/*P. fluorescens* biyosensörleri için çalışma potansiyeli -700 mV olarak belirlenmiştir (Şekil 3.60).

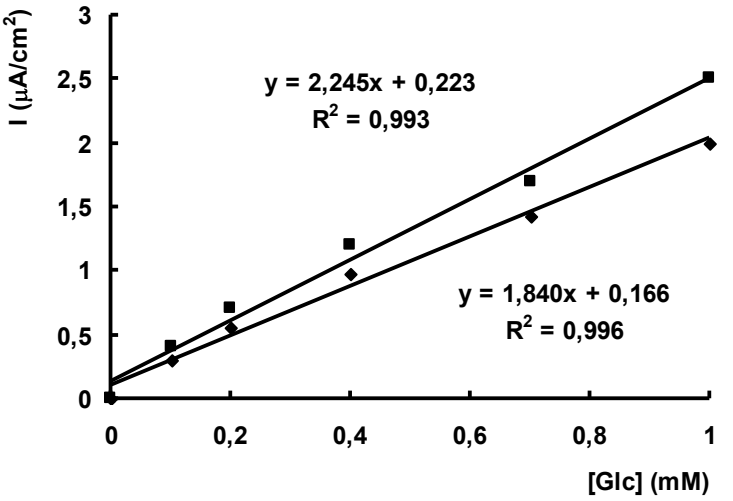


Şekil 3.60. Biyosensör cevabına potansiyelin etkisi [pH 6,0, 50 mM fosfat tamponu; 30 ^{o}C; ♦ CHIT/*P. fluorescens,* ■ CHIT-CNT/*P. fluorescens*].

3.6.3 Analitik karakterizasyon

3.6.3.1 Glukoz için doğrusal tayin aralığı

Optimize edilen koşullarda hem CHIT/*P. fluorescens* hem de CHIT-CNT/*P. fluorescens* biyosensörlerinin glukoz tayinine yönelik kullanımı test edilmiştir. Değişen derişimlerde glukoz çözeltileri çalışma tamponuna eklenerek her biri için akım değerleri kaydedilmiştir ve bu verilerle glukoz için kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.61). Ayrıca daha önceki çalışmalarda hazırlanan *P. fluorescens* biyosensörlerinin kıyaslanmasına ilişkin sonuçlar Tablo 3.20'de verilmiştir.



Şekil 3.61. Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [50 mM, pH 6,0 fosfat tamponu; 30 ^{o}C; -700 mV; ♦ CHIT/*P.fluorescens*, ■ CHIT-CNT/*P.fluorescens*].

Tablo 3.20. Glukoz tayinine yönelik amperometrik *P. fluorescens* biyosensörlerinin kıyaslanması.

Elektrot	İmmobilizasyon metodu	Çalışma potansiyeli (mV)	Analitik performans			Kaynak
			Doğrusal aralık	% VK	Operasyonel stabilite	
CNT-GECE	Jelatin	-700	0,5-4,0 mM	2,7	4 saat sonunda % 13 kayıp	Kirgöz et al., 2007
Au	Os-redoks polimer tip I	+300	0,05-1,0 mM	-	8 saat sonunda % 41 kayıp	Timur et al., 2006a
Au	Os-redoks polimer tip II	-180	0,2-2,0 mM	-	8 saat sonunda % 35 kayıp	Timur et al., 2006a
GE	İletken polimer	-700	0,25-4,0 mM	2,4	5,5 saat aktivite kaybı yok	Odaci et al., 2008
CP	Yumurta kabuğu membranı	-700	5-25 μM	4,09	4 saat sonunda % 7 kayıp	Yeni et al., 2008
CP	Yumurta kabuğu membranı	+400	60-750 μM	4,57	4 saat sonunda % 24 kayıp	Yeni et al., 2008
GE	[SNS(NO2)] iletken polimer	-700	0,2-1,0 mM	1,0	3,5 saat sonunda % 3 kayıp	Tuncagil et al., 2009a
GE	CHIT	-700	0,1-1,0 mM	2,9	4 saat sonunda % 19 kayıp	Bu çalışma
GE	CHIT-CNT	-700	0,1-1,0 mM	4,5	4 saat sonunda % 8 kayıp	Bu çalışma

CP: Karbon pasta; GE: Grafit elektrot; GECE; Grafit epoksi kompozit elektrot; Os-redoks polimer tip I: Poly(1-vinilimidazol)$_{12}$-[Os-(4,4'-dimetil-2,2'-dipiridil)$_2$Cl$_2$]$^{2+/+}$; Os-redoks polimer Tip II: poli(vinilpiridin)-[Os-(N,N'-metillenmiş-2,2'-biimidazol)$_3$]$^{2+/3+}$; [SNS(NO2)]: poli(1-(4-nitrofenil)-2,5-di(2-tienill)-1 H-pirol).

3.6.3.2 Tekrarlanabilirlik ve operasyonel stabilite

Bu çalışmada hazırlanan biyosensörlerin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Biyosensörler için tekrarlanan işlemler sonrasında ilgili sistemin kalibrasyon grafikleri yardımıyla konsantrasyon değerleri saptanmıştır. Her iki sistem için 0,4 mM glukoz içeren standartlar kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Bu işlemler sonucunda çalışma koşullarında, CHIT/*P. fluorescens* için SS: ±0,013 mM ve % VK: % 2,9 (n=10), CHIT-CNT/*P. fluorescens* için SS: ±0,020 mM ve % VK: % 4,5 (n=10) olarak bulunmuştur.

Operasyonel kararlılığın belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan CHIT/*P. fluorescens* ve CHIT-CNT/*P. fluorescens* biyosensörleri ile gün içindeki belirli aralıklarla ölçüm alınmıştır ve 4 saatlik ölçümler sonrasında CHIT/*P. fluorescens* için % 19, CHIT-CNT/*P. fluorescens* için ise % 8 aktivite kaybı gözlenmiştir.

3.6.4 Substrat spesifikliği

CHIT/*P. fluorescens* ve CHIT-CNT/*P. fluorescens* biyosensörleri kullanılarak galaktoz, mannoz, fruktoz, ksiloz gibi monosakkaritler ile maltoz, laktoz, sükroz ve sellobioz gibi disakkaritler ve ayrıca N-asetilglukozamin için doğrusal tayin aralıkları belirlenmeye çalışılmıştır. Bunlara ek olarak, glukozun yanında bir diğer bileşiğin varlığının biyosensör cevabına etkisi araştırıldı. Sonuçlar Tablo 3.21 ve Tablo 3.22'de verilmiştir.

Tablo 3.21. CHIT/*P. fluorescens* ve CHIT-CNT/*P. fluorescens* ile diğer karbohidratların tayini.

Substrat	Doğrusal Aralık (mM)	CHIT/*P.fluorescens*		CHIT-CNT/*P.fluorescens*	
		Denklem[a]	R^2	Denklem[a]	R^2
Gal	0,2-1	y=0,538x+0,004	0,995	y=0,598x+0,041	0,984
Man	0,2-1	y=1,001x+0,033	0,989	y=1,267x+0,047	0,988
Xyl	0,4-1	y=0,257x–0,013	0,976	y=0,329x–0,003	0,983

Maltoz, sellobioz, sükroz, fruktoz, laktoz, N-asetilglukozamin (2,0 mM) için sinyal elde edilememiştir.
[a]x: substrat konsantrasyonunu (mM) ve y:akım yoğunluğunu ($\mu A/cm^2$) ifade etmektedir.

Tablo 3.21'den de görüldüğü gibi CHIT/*P. fluorescens* ve CHIT-CNT/*P. fluorescens* ile glukoz dışında galaktoz, mannoz ve ksiloz tayini yapılabilmekte, ancak diğer karbohidratların (2,0 mM'dan düşük konsantrasyonları için) tayini gerçekleştirilememektedir. Tablo 3.22'de verilen sonuçlara bakılacak olursa *P.fluorescens* biyosensörleri ile glukoz tayini yapılırken ortamda diğer karbohidratların bulunması biyosensör cevabında azalmaya neden olduğu görülmektedir.

Tablo 3.22. Glukoz için elde edilen biyosensör cevabına farklı karbohidratların varlığının etkisi.

	CHIT/*P. fluorescens*		**CHIT-CNT/*P. fluorescens***	
Substrat	**Akım ($\mu A/cm^2$)**	**% Geri Kazanım**	**Akım ($\mu A/cm^2$)**	**% Geri Kazanım**
Glc (0,4 mM)	**0,970**	**-**	**1,200**	**-**
Gal (0,4 mM)	0,233	-	0,300	-
Glc+Gal	**1,085±0,021**	**90**	**1,251±0,009**	**83**
Man (0,4 mM)	0,600	-	0,650	-
Glc+Man	**1,070±0,098**	**68**	**1,285±0,021**	**79**
Fru (1 mM)	-	-	-	-
Glc+Fru	**0,405±0,007**	**42**	**0,625±0,035**	**52**
Xyl (0,4 mM)	0,070	-	0,110	-
Glc+Xyl	**0,597±0,003**	**60**	**0,628±0,011**	**46**
GlcNAc (1 mM)	-	-	-	-
Glc+ GlcNAc	**0,509±0,013**	**52**	**0,520±0,028**	**43**
Lac (1 mM)	-	-	-	-
Glc+Lac	**0,453±0,005**	**46**	**0,575±0,035**	**48**
Suc (1 mM)	-	-	-	-
Glc+Suc	**0,488±0,016**	**50**	**0,885±0,120**	**74**
Mal (1 mM)	-	-	-	-
Glc+Mal	**0,427±0,038**	**44**	**0,850±0,071**	**71**
Cel (1 mM)	-	-		-
Glc+Cel	**0,353±0,019**	**36**	**0,525±0,035**	**44**

*Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3).

3.7 *G. oxydans* Hücrelerini Temel Alan Mikrobiyal Biyosensörlere Yönelik Çalışmalar

Gluconobacter spp. biyosensör hazırlanmasında çok uygun mikrorganizmalardır. Bunlar basit kültivasyon ortamlarında çok hızlı büyürler, oldukça yüksek enzim aktivitesine sahiptirler, immobilizasyon sırasında oldukça stabildirler ve sahip oldukları PQQ-dehidrogenazlar sayesinde ilave kofaktöre ihtiyaç duymazlar (Svitel et al., 2006). *G. oxydans* kullanılarak hazırlanan biyosensörleri iki sınıfta toplayabiliriz. Birinci sınıfı bu hücrelerden saflaştırılan enzimlerle hazırlanan biyosensörler oluşturmaktadır. D-fruktoz dehidrogenaz (Tkac et al., 2001), gliserol dehidrogenaz (Lapenaite et al., 2005) enzimleri

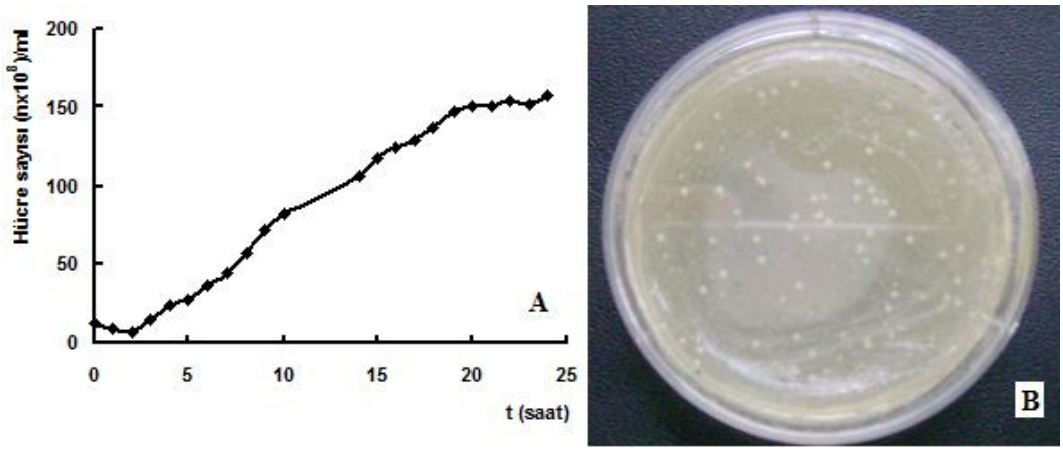
saflaştırılarak biyosensör hazırlamak amacıyla kullanılmışlardır. *G. oxydans* ile hazırlanan biyosensörlerin büyük bölümünü tüm hücrelerle hazırlanan mikrobiyal biyosensörler oluşturmaktadır. Etanol (Hikuma et al., 1995; Reshetilov et al., 1998a; Tkac et al., 2002; Tkac et al., 2003; Valach et al., 2009; Reshetilov et al., 2001), glukoz (Lee et al., 2002; Lobanov et al., 2001), ksiloz (Reshetilov et al., 1998b; Reshetilov et al., 1997b) aldoz, polialkol (Lusta and Reshetilov, 1998), D-sorbitol (Sefcovicova et al., 2009), 1,3-propandiol (Katrlik et al., 2007), ve lignoselüloz hidrolizatı fermentasyonunda karbohidratların (Tkac et al., 2000) tayini için *G. oxydans* hücreleri ile çeşitli biyosensörler hazırlanmıştır. G. oxydans Sükroz tayini için *Saccharomyces cerevisiae* ve laktoz tayini için *Kluyveromyces marxianus* hücreleri ile beraber immobilize edilmiştir (Svitel et al., 1998). *G. oxydans* glukozun her iki anomerini de aynı hızda okside edebildiği için disakkarid tayininde mutorotazın ko-immobilizasyonuna gerek yoktur (Gupta et al., 2001). Ayrıca *G. oxydans* hücreleri kullanılarak mikrobiyal yakıt hücrelerindeki performansları test edilmiştir (Lee et al., 2002; Reshetilov et al., 2006).

Mikrobiyal biyosensörlerle karbohidrat analizine yönelik olarak tasarlanan bir diğer biyosensör sistemi *G.oxydans* hücreleri ile hazırlanan sistemlerdir. *G.oxydans* hücreleri biyosensör hazırlanması amacıyla kullanılmadan önce, diğer bakteriyel biyosensör sistemlerinde olduğu gibi ilk olarak hücrelerin büyüme eğrileri oluşturulmuş ve log faz için gerekli olan süre belirlenmiştir. *G.oxydans* biyosensörlerinin her hazırlanışında eşit sayıda hücre immobilize edilebilmesi için geç logaritmik fazdaki hücrelerin sayımları yapılmıştır. Canlı bakteri hücreleri ile biyosensör hazırlanırken immobilizasyon matriksi olarak CHIT ve çapraz bağlayıcı reaktif olarak ise glutaraldehid kullanılmıştır. Biyosensörlerin optimizasyonuna yönelik çalışmalarda hücre miktarı, CHIT, glutaraldehid ve CNT miktarı optimizasyonu sonrasında en yüksek performansın elde edilebilmesi için optimum pH, sıcaklık ve çalışma potansiyeli belirlenmiştir. Glukoz için doğrusal tayin aralığının bulunmasından sonra substrat spesifikliği çalışmaları yapılmıştır.

3.7.1 Hücre sayımı ve büyüme eğrisine ilişkin veriler

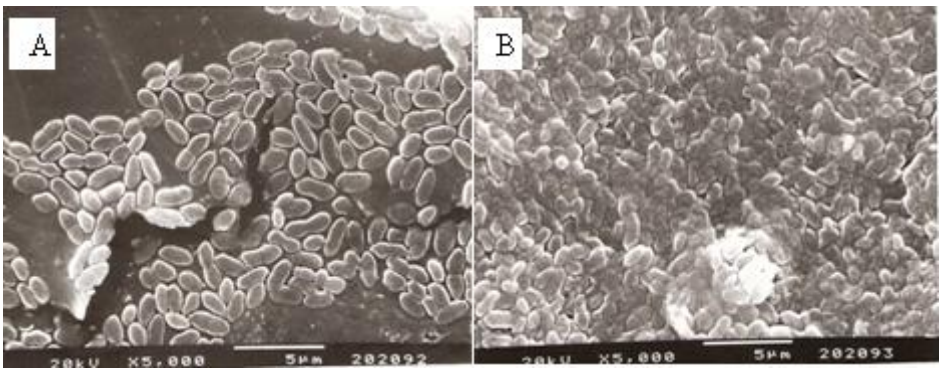
G. oxydans hücreleri karbon kaynağı olarak glukozun bulunduğu maya ekstraktı içeren ortamda büyütülmüşlerdir. Hücrelerin büyüme evrelerini gösteren büyüme eğrileri, her saat başı alınan örneklerin optik yoğunluklarını ölçülerek oluşturulmuştur. Şekil 3.62 A'da verilen *G. oxydans* hücreleri büyüme eğrisine

bakıldığında, hücrelerin ilk iki saat lag fazı, 3. saatten itibaren log fazı ve 20. saatten itibaren ise durağan fazı görmekteyiz. *G. oxydans* biyosensörleri hazırlanırken bakteriler geç log fazda kullanılmışlardır. Şekil 3.62 B'de ise geç log fazdaki hücrelerin dökme plaka yöntemi ile sayımı amacıyla hazırlanmış olan agardaki hücreler görülmektedir.



Şekil 3.62. *G. oxydans* hücrelerinin büyümesine ilişkin veriler [A: *G. oxydans* hücrelerinin büyüme eğrisi; B: Dökme plaka yöntemi ile hücre sayımı].

CHIT ve CHIT-CNT kullanılarak modifiye edilen grafit yüzeylere *G.oxydans* hücreleri immobilize edilerek *G. oxydans* biyosensörleri hazırlandı. Modifiye yüzeylere bakterilerin immobilizasyonu sonrasında elde dilen SEM görüntüleri Şekil 3.63'de verilmiştir. CNT ile modifiye yüzeylerdeki immobilize hücre sayısının daha fazla olduğu ve hücrelerin yüzeyde düzenli bir şekilde dağıldığı şekilde görülmektedir.

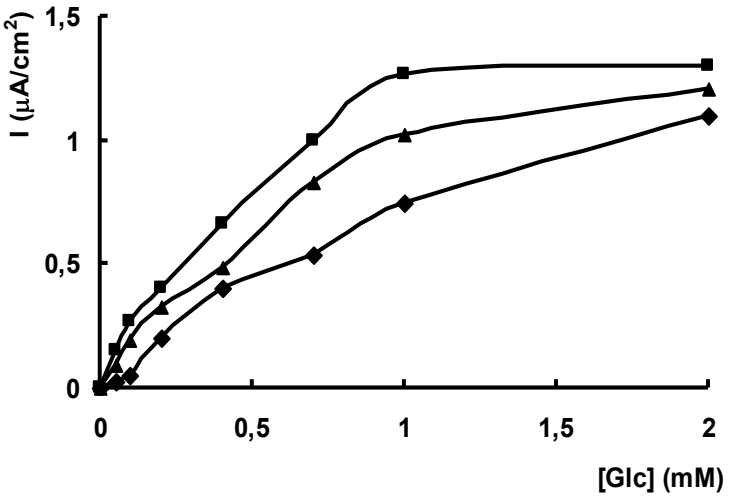


Şekil 3.63. CHIT (A) ve CHIT-CNT (B) ile modifiye grafit elektrotlar yüzeyine immobilize edilen *G. oxydans* hücrelerinin SEM görüntüleri.

3.7.2 *G. oxydans* hücrelerini temel alan biyosensörlerin optimizasyonuna ilişkin veriler

3.7.2.1 Hücre miktarının optimizasyonu

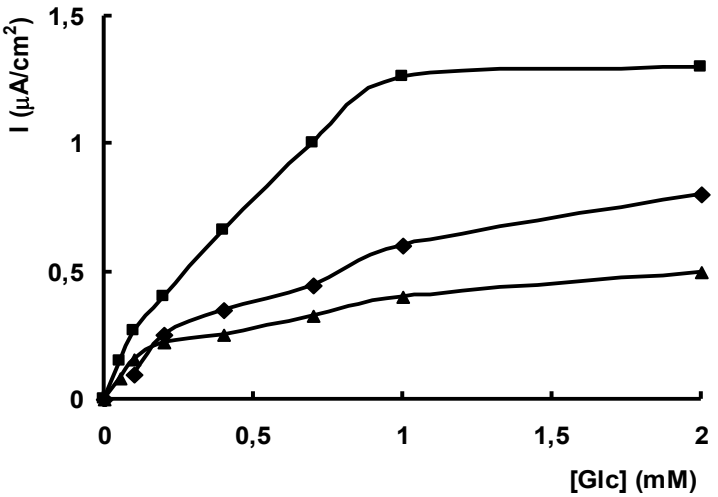
G. oydans biyosensörlerinin optmizasyon çalışmalarında ilk olarak hücre miktarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. CHIT ile modifiye edilmiş grafit elektrot yüzeyine; santrifüjlenip fosfat tamponunda çözülmüş 5 ($7{,}5\times10^9$ hücre), 10 (15×10^9 hücre) ve 20 µl hücre (30×10^9 hücre) 20 µl glutaraldehid çözeltisi ile birlikte pipetlenerek üç farklı *G. oxydans* biyosensörü hazırlanmıştır ve glukoz tayini amacıyla kullanılmışlardır. Şekil 3.64'de farklı hücre miktarları ile çizilen grafikten görüleceği üzere en yüksek akım değerlerinin *P. putida* ve *P. fluorescens* biyosensörleri ile elde edilen sonuçlardan farklı olarak 10 µl hücre kullanılarak hazırlanan *G. oxydans* biyosensörleri ile elde edilmiştir.



Şekil 3.64. Hücre miktarının biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C; -700 mV; ♦ 5 µl, ■ 10 µl, ▲ 20 µl].

3.7.2.2 CHIT miktarının optimizasyonu

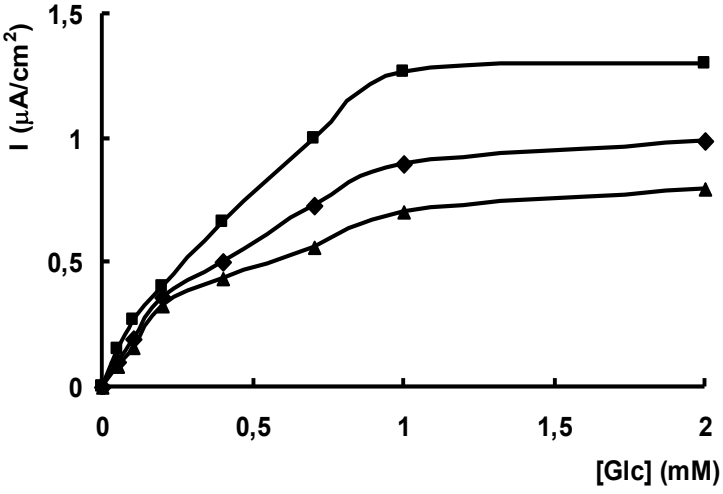
Hücre miktarı optimize edildikten sonra ikinci olarak CHIT miktarının biyosensör evabına etkisi incelenmiştir. Farklı yüzdelerde hazırlanan CHIT çözeltileri kullanılarak tasarlanan *G. oxydans* biyosensörlerine ait glukoz konsantrasyonu ile akım değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafik Şekil 3.65'de verilmiştir. En yüksek akım değerlerine % 1'lik CHIT çözeltisi ile hazırlanan *G. oxydans* biyosensörleri ile elde edildiği için tüm çalışmalarda % 1'lik CHIT çözeltisi kullanılmıştır. CHIT yüzdesi *P. putida* ve *P. fluorescens* biyosensörleri ile elde edilen sonuçlara benzer olarak bulunmuştur.



Şekil 3.65. CHIT yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C; -700 mV; ♦ % 0,5; ■ % 1,0; ▲ % 2,0].

3.7.2.3 Glutaraldehid miktarının optimizasyonu

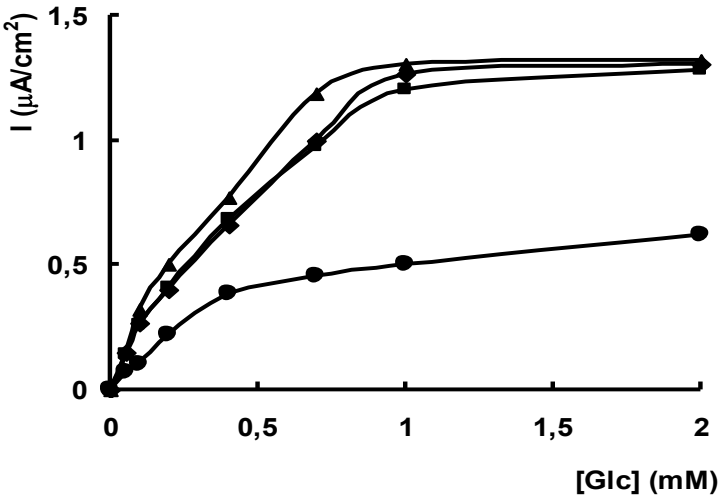
G. oxydans biyosensörleri hazırlanırken optimize edilen son parametre glutaraldehid miktarıdır ve CHIT ve hücre miktarları yukarıda belirtilen oranlarda kullanılarak glutaraldehid yüzdeleri birbirinden farklı 3 adet *G. oxydans* biyosensörü hazırlanmıştır. Glukozun farklı konsantrasyonlarına bağlı olarak bakteriyel biyosensörler ile elde edilen akım değerleri kaydedilmiştir. Veriler grafiğe (Şekil 3.66) geçirildiğinde % 1'lik glutaraldehid çözeltisi kullanıldığı zaman *P. putida* biyosensörlerine benzer olarak en iyi biyosensör cevaplarının elde edildiği açıktır.



Şekil 3.66. Glutaraldehid yüzdesinin biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C; -700 mV; ■ % 0,5; ♦ % 1,0; ▲ % 1,5].

3.7.2.4 CNT miktarının optimizasyonu

Farklı miktarlarda CNT içeren stok CHIT-CNT çözeltileri kullanılarak *G. oxydans* biyosensörleri hazırlanmıştır. Her birisi ile glukoz analizine yönelik çalışmalar yapılarak Şekil 3.67 oluşturulduğunda en yüksek akım değerlerine *P. putida* ve *P. fluorescens* biyosensörlerinden farklı olarak 0,5 mg/ml CNT içeren CHIT-CNT çözeltisi ile hazırlanan *G. oxydans* biyosensörleri ile ulaşılmaktadır.



Şekil 3.67. CNT miktarının biyosensör cevabına etkisi [50 mM, pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C; -700 mV; ♦CHIT; ■CHIT-CNT (0,2 mg/ml CNT); ▲CHIT-CNT (0,5 mg/ml CNT); ●CHIT-CNT (0,7 mg/ml CNT)].

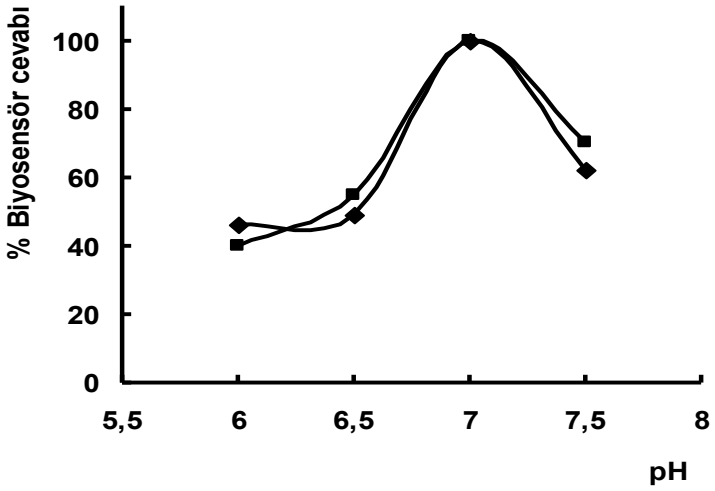
3.7.2.5 Optimum pH

CHIT/*G. oxydans* ve CHIT-CNT/*G. oxydans* biyosensörlerinin optimum pH'sını belirlemek amacıyla 50 mM pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 fosfat tamponlarında ölçümler alınmıştır. pH ile % biyosensör cevabı arasında çizilen optimum pH grafiğinden (Şekil 3.68) çalışma pH'sı 7,0 olarak bulunmuştur. Bu pH değeri hücrelerin büyüme ortamının pH'sı ile uyumludur. Binzimatik, *P. putida* ve *P. fluorescens* biyosensörlerinde görülen kitosanın polikatyonik karakterinin neden olduğu pH değerinde asidik bölgeye kayma *G. oxydans* biyosensörlerinde gözlenmemiştir.

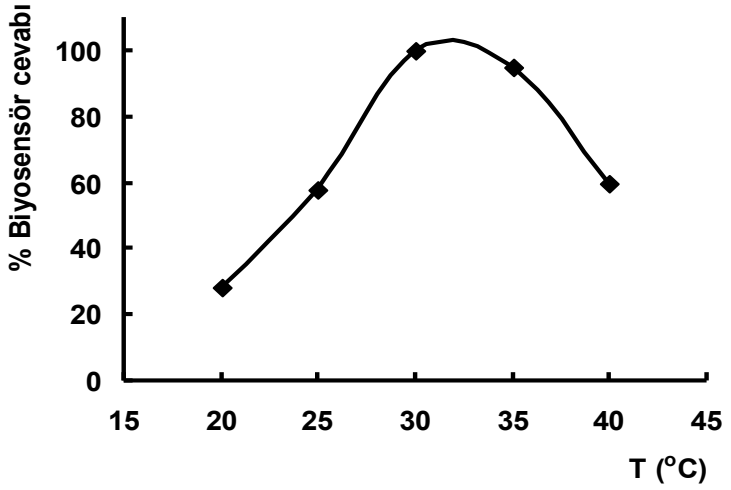
3.7.2.6 Optimum sıcaklık

G.oxydans biyosensörlerinin optimum sıcaklığının belirlenmesi amacıyla 20–40 °C arasında ölçümler yapılmıştır. Sıcaklık ve buna bağlı olarak değişen % biyosensör cevabı arasında çizilen grafiklerden (Şekil 3.69) optimum sıcaklık

değerinin 30 ^{o}C olduğu görülmektedir. *G. oxydans* hücreleri için büyüme sıcaklığı 28 ^{o}C'dir. *P. putida* ve *P. fluorescens* biyosensörlerinde olduğu gibi *G. oxydans* biyosensörleri için optimum sıcaklık büyüme sıcaklığına benzer olarak bulunmuştur.



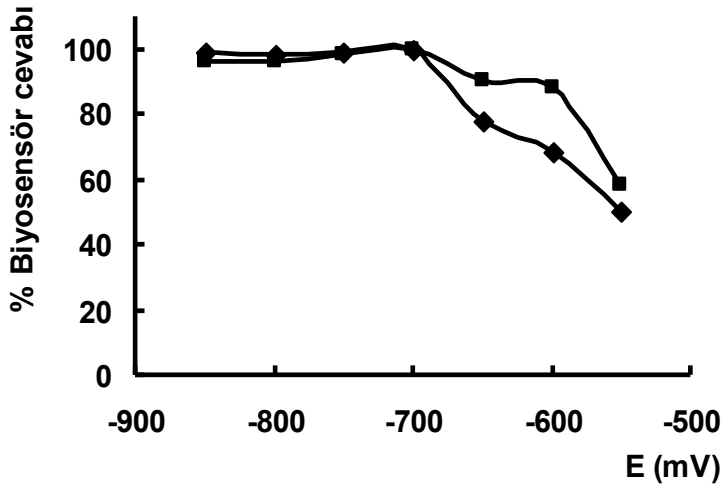
Şekil 3.68. Biyosensör cevabına pH'ın etkisi [pH 6,0–7,5; 50 mM fosfat tamponları; 30 ^{o}C; -700 mV; ♦ CHIT/*G.oxydans*, ■ CHIT-CNT/*G.oxydans*].



Şekil 3.69. Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisi [pH 7,0, 50 mM fosfat tamponu; -700 mV].

3.7.2.7 Çalışma potansiyelinin optimizasyonu

Optimizasyon çalışmalarının sonuncusunda CHIT/*G. oxydans* ve CHIT-CNT/*G. oxydans*, çalışma potansiyelinin bulunması hedeflenmiştir. Potansiyel ile % biyosensör cevabı arasında çizilen grafikten (Şekil 3.70) en uygun potansiyelin -700 mV olduğu görülmektedir.

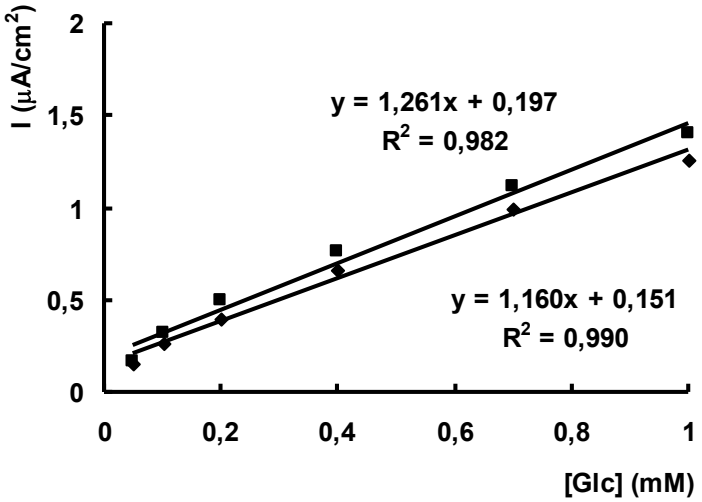


Şekil 3.70. Biyosensör cevabına potansiyelin etkisi [pH 7,0, 50 mM fosfat tamponu; 30 ^{o}C; ♦ CHIT/*G.oxydans,* ■ CHIT-CNT/*G.oxydans*].

3.7.3 Analitik karakterizasyon

3.7.3.1 Glukoz için doğrusal tayin aralığı

Optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra, bulunan koşullarda CHIT/*G. oxydans* ve CHIT-CNT/*G. oxydans* biyosensörleri kullanılarak glukoz tayini gerçekleştirilmiştir ve G.oxydans biyosensörleri için cevap süresi 40 sn olarak bulunmuştur. Glukoz konsantrasyonu ve akım arasındaki ilişkiden yaralanarak oluşturulan kalibrasyon grafikleri Şekil 3.71'de verilmiştir. Literatürlerde *G. oxydans* hücreleri kullanlarak hazırlanan biyosensörlerin analitik performanslarının kıyaslanmasına ilişkin veriler Tablo 3.23'de özetlenmiştir.



Şekil 3.71. Glukoz tayinine yönelik doğrusal tayin aralığı [50 mM, pH 6,0 fosfat tamponu; 30 ^{o}C; -700 mV; ♦ CHIT/*G.oxydans*, ■ CHIT-CNT/*G.oxydans*].

Tablo 3.23. *G. oxydans* biyosensörlerinin kıyaslanması.

Elektrot tipi	Analit	İmmobilizasyon yöntemi	Çalışma potansiyeli (mV)	Analitik performans		Kaynak
				Doğrusal aralık	Operasyonel stabilite	
GC	PDO	Silikon o-ring ile DM	+300	0.3 mg/l-1.2 g/l	10 saat boyunca stabil (0.66 % h^{-1})	Katrlik et al., 2007
GC	PDO	Silikon o-ring ile OP	+150	0,8 mg/l-1,5 g/l	10 saat sonunda % 70 kayıp (0.47% h^{-1})	Katrlik et al., 2007
CTE	Glc	CP üstünde adsorbsiyon	-	0,0 – 10,0 mM	-	Lobanov et al., 2001
CTE	EtOH	CP üstünde adsorbsiyon	-	0,0 – 10,0 mM	-	Lobanov et al., 2001
CTE	EtOH	CP üstünde adsorbsiyon	-	0,05–10 mM	10–12 saat stabil	Reshetilov et al., 2001
GE	Glc	Silikon o-ring ile DM	+300	0,002–2,2 g/l	9 ölçüm sonrası aktivite kaybı yok	Tkac et al., 2000
GDE	EtOH	Silikon o-ring ile OP	+300	0,25-2,5 mM	51 saat sonra % 50 kayıp	Vostiar et al., 2004
GDE	GOH	Silikon o-ring ile OP	+300	2,5-45,0 mM	68 saat sonra % 50 kayıp	Vostiar et al., 2004
GDE	Glc	Silikon o-ring ile OP	+300	0,25-2,0 mM	3 saat sonra % 50 kayıp	Vostiar et al., 2004
CTE	Xyl	CP üstünde adsorbsiyon	-	0,5-20 mM	-	Reshetilov et al., 1997b
GC	EtOH	CA membran	+300	2-270 μM	4,5 saat sonra % 75 kayıp	Tkac et al., 2003
GE	Glc	$SNS-NH_2$ iletken polimerinde adsorbsiyon	-700	0,1-2,5 mM	5 saat sonra % 11 kayıp	Tuncagil et al., 2009a
GE	Glc	$[SNS(NO_2)]$ iletken polimerinde adsorbsiyon	-700	0,25–4,0 mM	5 saat sonra % 6 kayıp	Tuncagil et al., 2009b
GE	Glc	CHIT	-700	0,05-1,0 mM	5 saat sonra % 24 kayıp	Bu çalışma
GE	Glc	CHIT-CNT	-700	0,05-1,0 mM	5 saat sonra % 15 kayıp	Bu çalışma

DM: Diyaliz membranı, OP: Osmium polimer, CTE: Clark-tip elektrot, CP: Kromatografik kağıt, CA: selüloz asetat, GC: Camımsı karbon elektrot, GE: Grafit elektrot, GDE: Altın disk elektrot, CHIT: Kitosan, $[SNS(NO_2)]$: 1-(4-nitrofenil)-2,5-di(2-tienil)-1 H-pirol iletken polimeri, $SNS-NH_2$: 4-(2,5-(di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)benzenamin iletken polimeri, PDO: 1,3-propandiol, Glc: Glukoz, EtOH: Etanol, Xyl: Ksiloz, GOH: Gliserol

3.7.3.2 Tekrarlanabilirlik ve operasyonel stabilite

G. oxydans biyosensörlerinin analitik karakterizasyonuna yönelik olarak yapılan bir diğer çalışma, tekrarlanabilirliklerinin test edilmesidir. Her iki sistem için 0,4 mM glukoz içeren standartlar kullanılarak 10 ölçüm yapılmıştır. Bu

işlemler sonucunda çalışma koşullarında, CHIT/*G. oxydans* için SS: ±0,013 mM ve % VK: 2,9, CHIT-CNT/*G. oxydans* için ise SS: ±0.010 mM ve % cv: 2,3 olarak bulunmuştur.

Hazırlanan mikrobiyal biyosensörlerin operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla daha önce optimizasyonu yapılan koşullarda ard arda ölçümler alınmıştır. Bu çalışma sonunda CHIT/*G.oxydans* için 5 saat sonunda % 24 aktivite kaybı varken CHIT-CNT/*G.oxydans* için % 15 aktivite kaybı gözlenmiştir.

3.7.4 Substrat spesifikliği

CHIT/*G. oxydans* ve CHIT-CNT/*G. oxydans* ile diğer bazı bileşiklerin tayin edilip edilemeyeceğinin anlaşılması için mannoz, galaktoz, ksiloz, maltoz, laktoz, sükroz, fruktoz, sellobioz, N-asetilglukozamin, etanol ve metanol kullanılarak ölçümler yapılmıştır. Glukoz dışındaki diğer bileşikler için elde edilen sonuçlara (Tablo 3.24) bakıldığında etanol dışındaki hiçbir bileşik için sonuç elde edilemediğini görmekteyiz. *Gluconobacter* hücreleri çoklu dehidrogenaz aktivitesine sahiptirler ve bu yüzden substrat aralıkları geniştir. Ancak *G. oxydans* ile hazırlanan biyosensörlerin spesifikliği hücrelerin dehidrogenaz aktiviteleri kontrol edilerek değiştirilebilir. Dehidrogenaz aktiviteleri hücrelerin büyüdüğü karbon kaynağına bağlıdır (Svitel et al., 2006; Lee et al., 2002). Hücreler glukoz içeren ortamda kültive edildiği için glukoz dışındaki hiçbir monosakkaride biyosensöre sinyal elde edilememişken alkol dehidrogenaz aktivitesinden dolayı etanol için biyosensör cevabı gözlenmiştir.

Tablo 3.24. CHIT/*G. oxydans* ve CHIT-CNT/*G. oxydans* ile diğer bileşiklerin tayini.

Substrat	Doğrusal Aralık (mM)	CHIT/*G. oxydans*		CHIT-CNT/*G. oxydans*	
		Denklem[a]	R^2	Denklem[a]	R^2
EtOH	0,2-1,0	y=0,918x+0,151	0,990	y=0,930x+0,058	0,997

Galaktoz, ksiloz, mannoz, maltoz, sellobioz, sükroz, fruktoz, laktoz, N-asetilglukozamin, metanol (2,0 mM) için sinyal elde edilememiştir.
[a]x: substrat konsantrasyonunu (mM) ve y:akım yoğunluğunu ($\mu A/cm^2$) ifade etmektedir.

CHIT/*G. oxydans* ve CHIT-CNT/*G. oxydans* ile yapılan bir diğer çalışmada glukoz dışındaki diğer bileşikler glukoz ile birlikte çalışma tamponuna eklenmiştir, Tablo 3.25'de elde edilen sonuçları görmekteyiz. Akım değerlerine bakıldığında diğer bileşiklerin glukoz ile birlikte ortama eklenmesi diğer

mikrobiyal biyosensörlerde elde edilen sonuçların tersine, biyosensör cevaplarında herhangi bir girişime yol açmamıştır.

Tablo 3.25. Diğer bileşiklerin varlığında glukoz tayini.

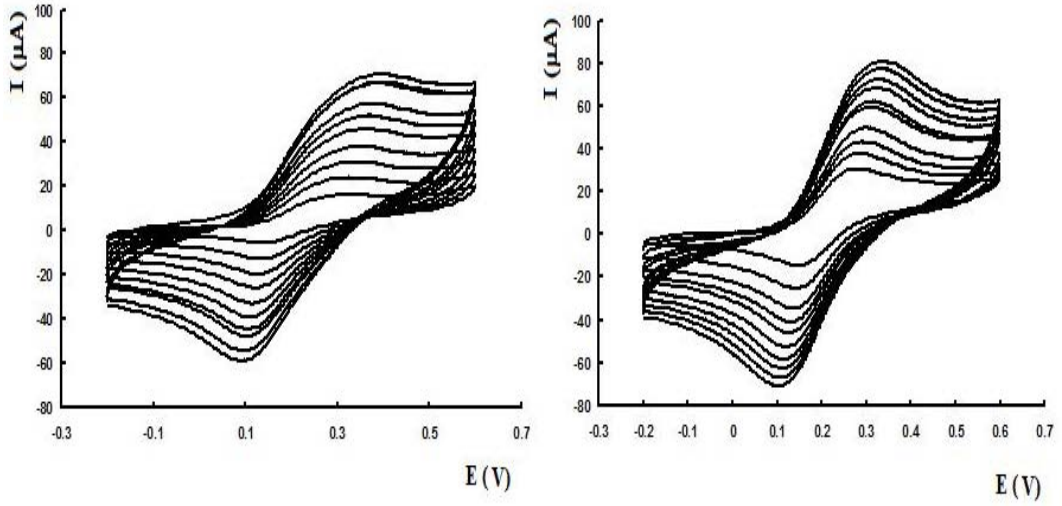
	CHIT/G. oxydans		***CHIT-CNT/G. oxydans***	
Substrat	**Akım ($\mu A/cm^2$)**	**% Geri Kazanım**	**Akım ($\mu A/cm^2$)**	**% Geri Kazanım**
Glc (0,2 mM)	**0,405**	**-**	**0,491**	**-**
EtOH(0,2 mM)	0,260	-	0,353	-
Glc+EtOH	**0,627±0,030**	**94**	**0,917±0,068**	**96**
Gal (0,2 mM)	-	-	-	-
Glc+Gal	**0,407±0,006**	**100**	**0,496±0,011**	**101**
Man (0,2 mM)	-	-	-	-
Glc+Man	**0,411±0,012**	**101**	**0,508±0,014**	**103**
Fru (0,2 mM)	-	-	-	-
Glc+Fru	**0,416±0,015**	**103**	**0,497±0,013**	**101**
Xyl (0,2 mM)	-	-	-	-
Glc+Xyl	**0,412±0,012**	**102**	**0,517±0,015**	**105**
GlcNAc (0,2 mM)	-	-	-	-
Glukoz+ GlcNAc	**0,401±0,0017**	**99**	**0,511±0,013**	**104**
Lac (0,2 mM)	-	-	-	-
Glc+Lac	**0,4±0,011**	**99**	**0,515±0,013**	**105**
Suc(0,2 mM)	-	-	-	-
Glc+Suc	**0,412±0,005**	**102**	**0,508±0,008**	**103**
Mal (0,2 mM)	-	-	-	-
Glc+Mal	**0,408±0,007**	**101**	**0,501±0,008**	**102**
Cel (0,2 mM)	-	-	-	-
Glc+Cel	**0,404±0,008**	**100**	**0,509±0,012**	**104**

*Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3).

3.8 CHIT-CNT ile Modifiye Elektrotların Elektrokimyasal Karakterizasyonu ile İlgili Çalışmalar

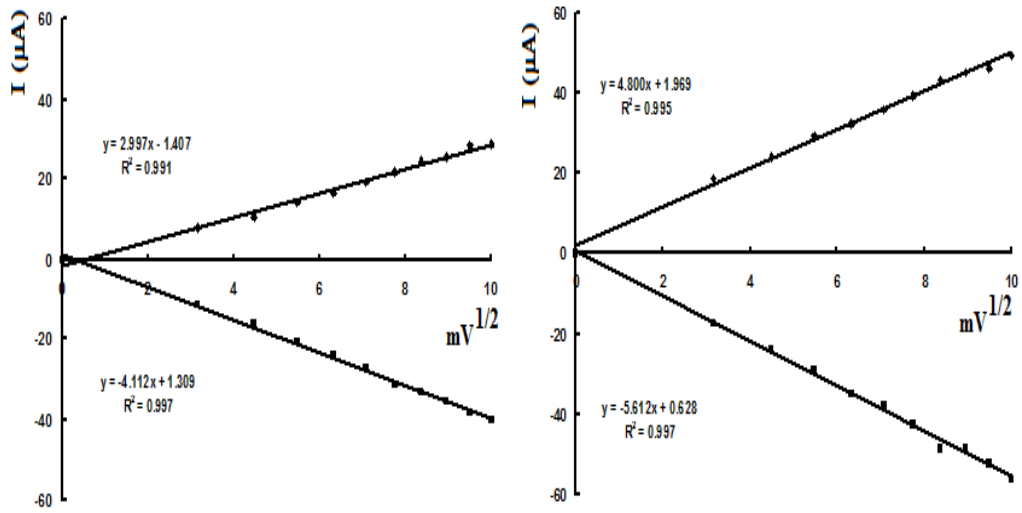
Bu bölümde CHIT ve CHIT-CNT ile modifiye edilen grafit elektrotlara biyolojik moleküller immobilize edilmeksizin CNT varlığının Yüzeyin elektrokimyasal aktivitesine katkısı incelenmiştir. -200 ile 600 mV arasında $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ için yapılan döngüsel voltammetrik ölçümler elektrokimyasal

özelliğinin test edilmesi için faydalı olmuştur. CNT ile modifiye edilmeyen sistemde $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ oksidasyon pik potansiyeli +370 mV civarında iken (Şekil 3.72A) CNT ile modifiye sistem için 300 mV civarında (Şekil 3.72B) olduğu görülmüştür.



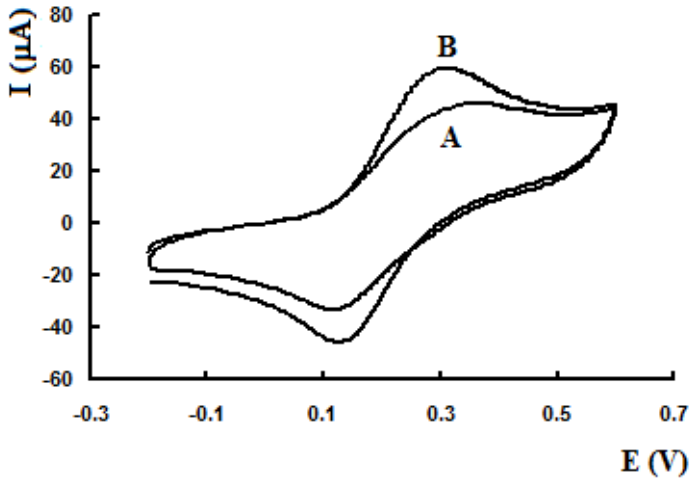
Şekil 3.72. Farklı tarama hızlarında CHIT (A) ve CHIT-CNT (B) ile modifiye edilen elektrotların döngüsel voltammogramları [pH 7.0, 50 mM sodyum fosfat tamponu; 30 ^{o}C; $Fe(CN)_6]^{4-/3-}$: 5 mM].

CHIT ve CHIT-CNT modifiye elektrotların her ikisi ile yapılan ölçümlerde tarama hızı 10–100 mV arasında değiştirilerek tarama hızının pik akımına etkisi incelenmiştir ve Şekil 3.73'de görüldüğü gibi CNT ile modifiye sistem için daha yüksek değerler bulunmuştur. Ayrıca yarı tersinir elektrot prosesi gözlenmiştir.



Şekil 3.73. CHIT (A) ve CHIT-CNT (B) için tarama hızı ile anodik ve katodik pik akımları arasındaki ilişki [pH 7.0, 50 mM sodyum fosfat tamponu; 30 ^{o}C; $Fe(CN)_6]^{4-/3-}$: 5 mM].

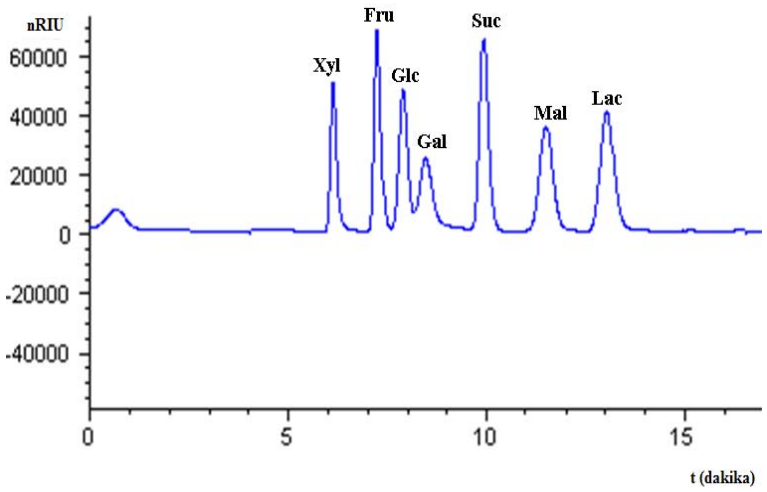
Bir diğer çalışmada CHIT ve CHIT-CNT ile modifiye elektrotlarla 50 mV/sn tarama hızında yapılan döngüsel voltammetrik ölçümlerde CNT varlığının pik akımına etkisi Şekil 3.74'de verilmiştir. Anodik ve katodik pik potansiyelleri arasındaki fark CHIT ile modifiye elektrot için 480 mV iken CHIT-CNT için 415 mV olarak hesaplanmıştır ve biyokompozite CNT ilavesi $[Fe(CN)_6]^{4-}$ iyonlarının oksidasyonunda pozitif katalitik etkiye neden olmuştur.



Şekil 3.74. CHIT (A) ve CHIT-CNT (B) ile modifiye edilen elektrotların döngüsel voltammogramları [pH 7,0, 50 mM sodyum fosfat tamponu; 30 ^{o}C; $Fe(CN)_6]^{4-/3-}$: 5 mM].

3.9 HPLC Sonrası Dedektör Olarak Kullanıma İlişkin Sonuçlar

Yayınlanan çalışmalara bakıldığında, şekerlerin HPLC ile ayrımı sonrasında dedektör olarak uzun yıllardır RI ve son zamanlarda ışık saçılım (light scattering; LS) dedektörlerinin kullanıldığını görmekteyiz. RI dedektörünü kullanarak yaptığımız çalışmalar sonrasında şekerlerin analizine yönelik olarak elde edilen kromatogramı Şekil 3.75'de görmekteyiz. HPLC ile ayırım sonrasında kolondan sırasıyla ksiloz, fruktoz, glukoz, galaktoz, sükroz, maltoz, laktoz elüe olmaktadır. Sellobioz ve mannoz ise diğer monosakkaritlerle birlikte kolondan çıktıklarıiçin çalışma koşullarında RI dedektör ile analizlenememiştir. Her bir karbohidratın analizi 0,025-0,5 mM konsantrasyon aralığında yapılmıştır. Daha yüksek konsantrasyonlarda analiz mümkün değildir, çünkü kullanılan kolonun boyu bunun için yeterli gelmemektedir. Tablo 3.26'de her bir karbohidratın tayini için elde edilen doğrusal grafiklerin denklemleri ve kolondan çıkış zamanları özetlenmiştir.



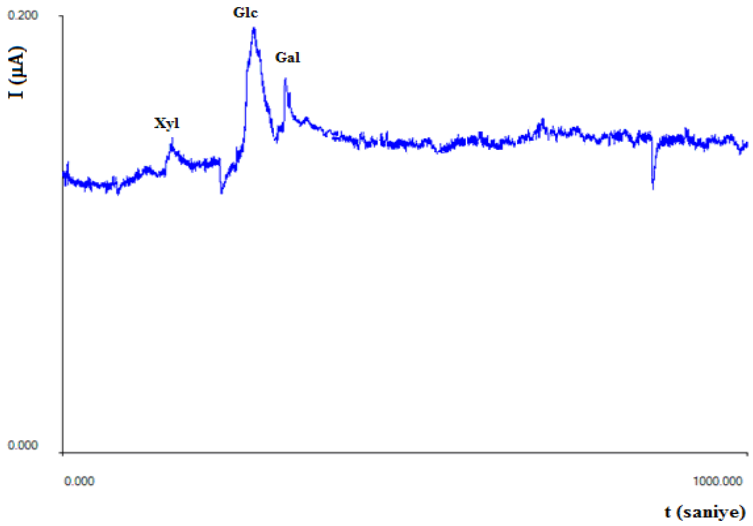
Şekil 3.75. Karbohidratların RID ile analizine yönelik kromatogram [Karbohidratların konsantrasyonları 0,5 mM; Kolon: NH_2 inertsil; akış hızı: 1,0 ml/dakika; 35 ^oC; Mobil faz: asetonitril: Su 3:1 (v/v)].

Tablo 3.26. HPLC-RID kullanılarak analizlenen karbohidratlar.

Karbohidrat	Kolondan çıkış süresi (dak.)	Denklem	R^2
Xyl	6,416	y=1133595x-12126	0,989
Fru	7,529	y=1689920x-35841	0,996
Glc	8,186	y=1339360x-28575	0,995
Gal	8,755	y=779665x-13978	0,989
Suc	10,218	y=2097318x-61077	0,996
Mal	11,796	y=1741204x-39328	0,984
Lac	13,351	y=2189980x-36338	0,990

x; karbohidrat konsantrasyonunu (mM), y; ise refraktif indeks ünite (nRIU) olarak tanımlanır.

RID ile yapılan çalışmalar tamamlandıktan sonra dizayn edilen akış hücresi ve PyOx biyosensörlerinin HPLC sonrası dedektör olarak kullanımı araştırılmıştır. CPE/PyOx hem de CNT/CPE/PyOx biyosensörleri ile 0,025-0,5 mM konsantrasyon aralığında glukoz, galaktoz ve ksiloz analizi yapılmıştır. Elde edilen kromatogram Şekil 3.76'de verilmiştir. Tablo 3.27'de her bir karbohidratın doğrusal tayini için elde edilen grafik denklemleri ve kolondan çıkış zamanları özetlenmiştir.



Şekil 3.76. PyOx biyosensörlerinin kolon sonrası dedektör olarak kullanımına ilişkin kromatogram [Karbohidratların konsantrasyonları 0,1 mM; Kolon: NH_2 inertsil; akış hızı: 1,0 ml/dakika; 35 ^oC; Mobil faz: asetonitril:su 3:1 (v/v)].

Tablo 3.27. PyOx biyosensörlerinin dedektör olarak kullanımıyla analizlenen karbohidratlar.

Karbohidrat	Kolondan çıkış süresi (dak.)	CPE/PyOx		CNT/CPE/PyOx	
		Denklem	R^2	Denklem	R^2
Xyl	6,37	y=0,482x+0,147	0,989	y=0,724x+0,125	0,993
Glc	8,20	y=3,436x+0,031	0,988	y=4,405x-0,004	0,980
Gal	11,95	y=1,072x+0,001	0,993	y=1,269x+0,146	0,993

x; karbohidrat konsantrasyonunu (mM), y; ise akım yoğunluğu ($\mu A/cm^2$) olarak tanımlanır.

3.9.1 Örnek uygulama

RI ve PyOx dedektörleri ile karbohidratların analizi için doğrusal grafikler oluşturulduktan sonra gazlı içecek ve bal gibi çeşitli içeceklerde glukoz analizi yapılmıştır. PyOx biyosensörleri ile fruktoz ve sükroz analizi yapılamadığı için örneklerdeki bu karbohidratların miktarı belirlenememiştir. PyOx ve RI dedektör ile elde edilen sonuçlar Tablo 3.28'te verilmiştir.

Tablo 3.28. PyOx ve RI dedektör ile örneklerde glukoz analizi.

Örnek	Glukoz (g/100 ml)		
	HPLC-RID	**CP/PyOx**	**CNT/CP/PyOx**
Gazlı içecek	2,05±0,03	1,95±0,09	2,01±0,06
Bal	47,48±0,45	45,87±0,08	51,16±1,28

*Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir (n:3).

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Karbohidratlar faklı alanlarda büyük öneme sahip moleküllerdir. Glukoz; diyabet hastalığının belirlenmesi ve izlenmesinde, fermentasyon teknolojisinde, içecek ve yiyecek endüstrisinde önemli bir monosakkarittir. Maltoz bira endüstrisinde analizi önemli olan bir molekülken, laktoz sütün yapısındaki bir karbohidrattır. Analizleri birçok alan için önemli olan karbohidratlar spektrofotometrik, fluorometrik ya da kromatografik tekniklerle tayin edilebilirler. Ancak bu tekniklerin pahalı olmaları, örneklerin ön işlemlere tabi tutulması gerekliliği ya da zaman alıcı olmaları gibi bazı dezavantajları vardır. Ancak biyosensörler bu yöntemlere alternatif olabilecek sistemlerdir, ayrıca minyatürizasyona uygun olmalarından dolayı birçok önemli molekülün tayininde önem kazanmaktadırlar.

Bu tez projesi kapsamında karbohidratların tayini amacıyla farklı enzimatik ve mikrobiyal biyosensörler geliştirilmiştir. PyOx biyosensörleri karbon pasta elektrotlar kullanılarak hazırlanmıştır. Ölçümler PyOx katalizli reaksiyon sonrasında oluşan H_2O_2'nin +900 mV'da izlenmesini temel almaktadır. Optimizasyon çalışmaları sonrasında glukoz için doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik ve stabilite çalışmaları yapılmış ve diğer karbohidratlar için biyosensör cevabı incelenmiştir. Şarap örneklerindeki glukoz miktarı bu sistemle belirlenmiştir.

Hidrolaz sınıfı enzimler ve PyOx ile hazırlanan çiftli bi-enzimatik biyosensörlerle farklı disakkaritlerin analizi hedeflenmiştir. AG/PyOx, BG/PyOx ve β-gal/PyOx enzimleri ile hazırlanan biyosensörlerde CHIT immobilizasyon matriksi olarak kullanılmıştır. Hidrolaz sınıfı enzimin disakkariti parçalanmasından sonra açığa çıkan monosakkaritler PyOx ile okside edilmiştir. Oksidasyon sırasında harcanan O_2'nin -700 mV'da izlenmesi ölçümlerde temel alınmıştır. Biyosensörlerin hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonu tamamlandıktan sonra AG/PyOx ile maltoz için, BG/PyOx ile sellobioz için, β-gal/PyOx ile laktoz için doğrusal tayin aralığı belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik ve substrat spesifikliği çalışmaları sonrasında birada maltoz, bakteriyel büyüme ortamında sellobioz ve sütte laktoz tayini amacıyla hazırlanan biyosensörler kullanılmıştır.

Mikrobiyal biyosensörlerin hazırlanmasında *P. putida, P. fluorescens ve G. oxydans* hücreleri biyomateryal olarak kullanılmış ve bu hücreler CHIT

vasıtasıyla immobilize edilmişlerdir. Hazırlanan mikrobiyal biyosensörlerde ölçümün temel prensibi hücrelerin biyolojik aktivitesinin izlenmesidir. Tümü aerobik olan bu hücrelerin ortama glukozun eklenmesiyle O_2'nin tüketimi başlamaktadır ve akımdaki farklanma -700 mV'da takip edilebilmektedir. Hücre miktarının, glutaraldehid ve CHIT miktarının optimizasyonu sonrasında çalışma koşullarının optimizasyonu tamamlanmıştır. Glukoz için doğrusal tayin aralığı belirlenmiş ve tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca farklı karbohidratlar için biyosensör cevabı test edilmiştir. Mikrobiyal biyosensörler, hücrelerin adaptasyonu sonrasında toksik moleküllerin analizi için kullanılabilirler. Hücrelerle modifiye edilen elektrotlar ayrıca BOD ölçümlerinde ve mikrobiyal yakıt hücrelerinde kullanım olanağı bulabilirler.

Yapılan çalışmalarda bir diğer amaç karbon nanotüplerin biyosensör cevabına etkisinin incelenmesidir. CNTler nanomateryallerin en fazla uygulama alanı bulan türüdür. CNTler keşfedilmelerinden sonra birçok alanda önemli bir konu haline gelmiştir. CNTlerin geniş kullanım olanaklarını sınırlayan en önemli etmen bunların çözünürlükleridir. CNTler (biyo)analitik denemelerde uygulanmadan önce ilk olarak çözünür ürünlere dönüştürülmelidir. Çeşitli materyaller bu amaçla kullanılabilir. Bu çalışma kapsamında CNT'ler mineral yağı ve doğal bir polimer olan CHIT içinde hazırlanmıştır. PyOx, CNT ve grafit tozunun mineral yağı içinde belirli oranlarda karıştırılması sonrasında CNT/CPE/PyOx biyosensörlerinin analitik karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir ve biyokompozite CNT eklenmesinin biysensör cevabında artışa neden olduğu görülmüştür. CHIT-CNT çözeltisi ise AG/PyOx, BG/PyOx ve β-gal/PyOx enzimatik biyosensörleri ile mikrobiyal biyosensörlerin hazırlanmasında immobilizasyon matriksi olarak kullanılmıştır. CNT varlığının biyosensör cevabına etkisi incelendiğinde artışın PyOx kadar yüksek olmadığı belirlenmiştir. Bunun sebebi çalışılan potansiyeldir, eğer uygun bir medyatör kullanılarak ölçümler yapılırsa CNTlerin akım değerlerinde artışa neden olacağı açıktır. Ayrıca mikrobiyal hücrelerin CNT yüzeyinde adsorbse edilmelerinden dolayı mikrobiyal biyosensörlerde elektrot yüzeyindeki hücre sayısın arttığı ve bunun stabilitede önemli olduğu görülmüştür.

Tablo 3.29 ve Tablo 3.30'da geliştirilen enzim sensörleri ve mikrobiyal biyosensörlere ilişkin optimizasyon ve karakterizasyon sonuçları özetlenerek verilmiştir.

Tablo 3.29. Enzim elektrotlarının **s**onuçların genel gösterimi.

Parametre	**Biyosensör tipi**			
	CP/PyOx	**AG/PyOX**	**BG/PyOx**	**β-gal/PyOx**
Susbtrat	Glc	Mal	Cel	Lac
Elektrot	CP	GE	GE	GE
Cevap süresi	50 sn	60 sn	90 sn	35 sn
Enzim miktarı (U)	6U	AG: 0,6 PyOx: 9 U	BG: 0,6 PyOx: 6 U	β-gal: 0,6 PyOx: 6 U
Optimum pH	7,5	6,0	6,0	6,5
Tampon	Fosfat	Fosfat	Fosfat	Fosfat
Optimum sıcaklık (^{o}C)	35	35	35	35
Çalışma potansiyeli (mV)	+900	-700	-700	-700
Doğrusal tayin aralığı	0,5–30 mM (y=0,120x+0,116)	0,25-2,0 mM (y=0,844x+0,029)	0,1-2,0 mM (y=1,228x+0,10)	0,05-1,0 mM (y=3,719x+0,257)
CNT etkisi	0,2–30 mM (y=0,429x+0,536)	0,25-2,0 mM (y=0,882x+0,063)	0,1-2,0 mM (y=1,462x+0,183)	0,05-1,0 mM (y=3,865x-0,028)
Tekrarlanabilirlik	SS: ±0,06 mM % VK: %2,5	SS: ±0,051 mM % VK: % 4,4	SS: ±0,009 mM % VK: % 0,8	SS: ±0.002 mM % VK: % 1
Stabilite	7 saat sonunda % 7 aktivite kaybı	4,5 saat sonunda % 15 aktivite kaybı	5 saat sonunda % 16 aktivite kaybı	5,5 saat sonunda % 4 aktivite kaybı

Tablo 3.30. Mikrobiyal biyosensörlerin sonuçların genel gösterimi.

Parametre	Biyosensör tipi		
	P. putida	***P. fluorescens***	***G. oxydans***
Susbtrat	Glc	Glc	Glc
Elektrot	GE	GE	GE
Cevap süresi	50 sn	30 sn	40 sn
Hücre miktarı	$0,72\times10^{9}$	$1,07\times10^{9}$	30×10^{9}
Optimum pH	6,0	6,0	7,0
Tampon	Fosfat	Fosfat	Fosfat
Optimum sıcaklık (ºC)	30	30	30
Çalışma potansiyeli	-700	-700	-700
Doğrusal tayin aralığı	0,5-2,0 mM (y=0,652x-0,10)	0,1-1,0 mM (y=1,840x+0,166)	0,05-1,0 mM (y=1,160x+0,151)
CNT etkisi	0,5-2,0 mM (y=0,749x+0,017)	0,1-1,0 mM (y=2,245x+0,223)	0,05-1,0 mM (y=1,261x+0,197)
Tekrarlanabilirlik	SS: ±0.021 mM % VK: % 2,9	SS: ±0,013 mM % VK: % 2,9	SS: ±0.013 mM % VK: % 2,9
Stabilite	3 saat sonunda % 15 aktivite kaybı	4 saat sonunda % 19 aktivite kaybı	5 saat sonunda % 24 aktivite kaybı

KAYNAKLAR DİZİNİ

Agui L., Manso J., Yanez-Sedeno P., Pingarron, J.M., 2006, Amperometric biosensor for hypoxanthine based on immobilized xanthine oxidase on nanocrystal gold-carbon paste electrodes, *Sensor Actuat. B- Chem*., 113: 272-280.

Ajayan P. M and Zhou, O. Z., 2001, Applications of carbon nanotubes, In *Carbon nanotubes: Topics in applied physics* M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus and Ph. Avouris (Eds.), Springer, New York, USA, 80: 381–425.

Akin, M., Yuksel, M. Geyik C., Odaci, D., Bluma, A., Höpfner, T. Beutel, S., Scheper, T., Timur, S., 2010, Alcohol biosensing by polyamidoamine (PAMAM)/cysteamine/alcohol oxidase-modified gold electrode, *Biotechnol. Prog.*, DOI: 10.1002/bp.372.

Akyilmaz E., Dinckaya E., 2005, An amperometric microbial biosensor development based on *C. tropicalis* yeast cells for sensitive ethanol determination, *Biosens. Bioelectron*., 20: 1263-1269.

Akyılmaz, E., Sezgintürk, M. K., Dinçkaya, E., 2003, A novel biosensor based on urate oxidase-peroxidase coupled enzyme system for uric acid determination in urine, *Talanta*, 61: 73-79.

Akyilmaz, E. and Yorganci, E., 2007, Construction of an amperometric pyruvate oxidase enzyme electrode for determination of pyruvate and phosphate, *Electrochim. Acta*, 52: 7972-7977.

Al, S., EI, R., Fitzpatrick, P. F, Wild, J. R., 1997, A tryptophan-2-monooxygenase based amperometric biosensor for L-tryptophan determination: use of a competitive inhibitor as a tool for selectivity increase, *Biosens. Bioelectron.* 12: 363–371.

Alacam, S., Timur, S., Telefoncu A., 2007, A novel biosensor based on l-homocysteine desulfhydrase enzyme immobilized in eggshell membrane, *J. Mol. Catal. B- Enzym*, 49: 55-60.

Altug C. and Dinckaya E., 2007, Kreatin ve kreatinin tayinlerine yönelik enzim temelli hibrit biyosensörlerin geliştirilmesi, Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Amarita, F., Fernandez ,C. R., Alkorta, F., 1997, Hybrid biosensors to estimate lactose in milk, *Anal. Chim. Acta*, 349: 153-158.

Amin, G. A., Talhi, A. A., 2007, Production of L-glutamic acid by immobilized cell reactor of the bacterium Corynebacterium glutamicum entrapped into carrageenan gel beads, *World Appl. Sci. J.*, 2: 62–67.

Andrievsky, G., Klochkov, V., and Derevyanchenko, L., 2005, Is the C60 fullerene molecule toxic? *Fuller. Nanotub. Car. N.*, 13: 363–376.

Antiochia, R. and Gorton, L., 2007, Development of a carbon nanotube paste electrode osmium polymer-mediated biosensor for determination of glucose in alcoholic beverages, *Biosens. Bioelectron.*,, 22: 2611-2617.

Artolozaga M. J., Kubatova E., Volc J., Kalisz H. M., 1997, Pyranose 2-oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*-further biochemical characterization, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47: 508–514.

Aulenta, F., Hayes, W., Rannard, S., 2003, Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices, *Eur. Polym. J.*, 39: 1741–1771.

Baena, J. R., Gallego, M., Valcarcel, M., 2002, Fullerenes in the analytical sciences, TRAC-*Trend. Anal. Chem.*, 21: 187–198.

Balasubramanian, K. and Burghard, M., 2006, Biosensors based on carbon nanotubes, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385: 452–468.

Baldwin, R. P., 1999, Electrochemical determination of carbohydrates: Enzyme electrodes and amperometric detection in liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 19: 69–81.

Banerjee, S. and Wong, S. S., 2002, Structural characterization, optical properties, and improved solubility of carbon nanotubes functionalized with Wilkinson's catalyst, *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 8940-8948.

Bannwarth, M., Heckmann-Pohl, D., Bastian, S., Giffhorn, F., Schulz, G. E., 2006, Reaction geometry and thermostable variant of pyranose 2-oxidase from the white-rot fungus *Peniophora sp*., *Biochemistry*, 45: 6587–6595.

Bannwarth, M., Bastian, S., Heckmann-Pohl, D., Giffhorn, F., Schulz, G. E., 2004, Crystal structure of Pyranose2-Oxidase from the white-rot fungus Peniophora sp., *Biochemistry*, 43: 11683–11690.

Boas, U., Heegaard, P. M. H. 2004, Dendrimers in drug research, *Chem. Soc. Rev*., 33: 43–63.

Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X., Gardan, L. 2000, The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision, *Agronomie*, 20: 51–63.

Brown K. R., Fox A. P., Natan M. J., 1996, Morphology-dependent electrochemistry of cytochrome *c* at Au colloid-modified SnO_2 electrodes, *J. Am. Chem. Soc.*, 118: 1154-1157.

Bullen, R. A., Arnot, T. C., Lakeman, J. B., Walsh, F. C., 2006, Biofuel cells and their development, *Biosens. Bioelectron.*, 21: 2015–2045.

Cabalkova, J., Zidkova, J., Pribyla, L., Chmelik, J., 2004, Determination of carbohydrates in juices by capillary electrophoresis, high-performance liquid chromatography, and matrix-assisted laser desorption/ionization-time offlight-mass spectrometry, *Electrophoresis*, 25: 487–493

Cai H., Shang C., Hsing I.M., 2004, Sequence-specific electrochemical recognition of multiple species using nanoparticle labels, *Anal. Chim. Acta*, 523: 61-68.

Cassidy, M. B., Lee, H. and Trevors, J. T., 1996, Environmental applications of immobilized microbial cells: a review, *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 16: 79-101.

Cattaneo, M. V., Luong, J. H. T., 2004, Monitoring glutamine in animal cell cultures using a chemiluminescence fiber optic biosensor, *Biotechnol. Bioeng.*, 41: 659 – 665.

Chandrasekaran, S. and Lalithakumari, D., Plasmid-assisted morpholine degradation by *Pseudomonas fluorescens* CAS 102, *World J. Microbiol. Biot.*, 14: 7-10.

Chang, A. C., J. B. Gillespie, M. B. Tabacco, 2001, Enhanced detection of live bacteria using a dendrimer thin film in an optical biosensor, *Anal. Chem.*, 73: 467-470.

Chang, M. Y., Kao, H. C., Juang, R. S., 2008, Thermal inactivation and reactivity of β-glucosidase immobilized on chitosan–clay composite, *Int. J. Biol. Macromol.*, 43: 48–53.

Chaniotakis, N., 2007, Fullerene-based Electrochemical Detection Methods for Biosensing, In: Nanomaterials for biosensors, C. Kumar (Ed.) WILEY-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, Weinheim, 101-122.

Chee, G. J., Nomura, Y., Ikebukuro, K., Karube, I., 2005, Development of photocatalytic biosensor for the evaluation of biochemical oxygen demand, *Biosens. Bioelectron.*, 21: 67–73.

Chen H., Wang Y., Wang Y., Dong S., Wang E., 2006a, One-step preparation and characterization of PDDA-protected gold nanoparticles, *Polymer*, 47: 763-766.

Chen J., Yan F., Tan F., Ju H., 2006b, Gold nanoparticles doped three-dimensional sol-gel matrix for amperometric human chorionic gonadotrophin immunosensor, *Electroanal.*, 18: 1696-1702.

Cloninger, M. J., 2002, Biological applications of dendrimers, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6: 742–748.

Corkery, D. M., O'Connor, K. E., Buckley, C. M., Dobson, A. D. W., 2006, Ethylbenzene degradation by *Pseudomonas fluorescens* strain CA-4, *FEMS Microbiol. Lett.*, 124: 23–27.

Cortacero-Ramirez, S., Hernainz-Bermudez de Castro, M., Segura-Carretero, A., Cruces-Blanco, C., Fernandez-Gutierrez, A., 2003, Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods, *TRAC-Trend Anal. Chem.*, 22: 440-455.

Cosnier, S., and Mailley, P., 2008, Recent advances in DNA sensors, *Analyst*, 133: 984–991.

Cubukcu, M., Timur, S., and Anik, U., 2007, Examination of performance of glassy carbon paste electrode modified with gold nanoparticle and xanthine oxidase for xanthine and hypoxanthine detection, *Talanta*, 74: 434–439.

Cummings, E. A., Mailley, P., Linquette-Mailley, S., Eggins, B. R., McAdams, E. T. and McFadden, S., 1998, **A**mperometric carbon paste biosensor based on plant tissue for the determination of total flavanol content in beers, *Analyst*, 123: 1975–1980.

Dai, H., Hafner, J. H., Rinzler, A. G., Colbert, D. T., Smalley, R. E., 1996, Nanotubes as nanoprobes in scanning probe microscopy, *Nature*, 384: 147-150.

Dan D., Xiaoxing X., Shengfu W., Aidong Z., 2007, Reagentless amperometric carbohydrate antigen 19-9 immunosensor based on direct electrochemistry of immobilized horseradish peroxidase, *Talanta*, 71: 1257-1262.

Daniel, G., Volc, J., Kubatova, E., 1994, Pyranose oxidase, a major source of H_2O_2 during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Oudemansiella mucida*, *Appl. Environ. Microb.*, 60: 2524-253.

Danneel, H. J., Rossner, E., Zeeck, A., Giffhorn, F., 1993, Purification and characterization of a pyranose oxidase from the basidiomycete *Peniophora gigantea* and chemical analyses of its reaction products, *Eur. J. Biochem.*, 214: 795–802.

Davis, F. and Higson, S. P. J., 2007, Biofuel cells-Recent advances and applications, *Biosens. Bioelectron.*, 22: 1224–1235.

Deo, Y. M., Gaucher, G. M., 2004a, Semicontinuous and continuous production of penicillin-G by *Penicillium chrysogenum* cells immobilized in carragenan beads, *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 285–295.

Deo, R. P. and Wang, J., 2004b, Electrochemical detection of carbohydrates at carbon-nanotube modified glassy-carbon electrodes, *Electrochem. Commun.*, 6: 284-287.

Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., Prust, C., 2002, Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60: 233–242.

Dequaire, M., Degrand, C., Limoges, B., 2000, An electrochemical metalloimmunoassay based on a colloidal gold label, *Anal. Chem.*, 72: 5521-5528.

Dhanawansa, R., Faridmoayer, A., van der Merwe, G., Li, Y. X., Scaman, C. H., 2002, Overexpression, purification and partial characterization of *Saccharomyces cerevisiae* processing alpha glucosidase I, *Glycobiology*, 12: 229-234.

Diculescu, V. C., Paquim, A. M. C. and Brett, A. M. O., 2005, Electrochemical DNA sensors for detection of DNA damage, *Sensors*, 5: 377-393.

Dodziuk, H., Ejchart, A., Anczewski, W., Ueda, H., Krinichnaya, E., Dolgonos, G., Kutner, W., 2003, Water solubilization, determination of the number of different types of single-wall carbon nanotubes and their partial separation with respect to diameters by complexation with n-cyclodextrin, *Chem. Commun.*, 986-987.

Drummond, T. G., Hill, M. G., Baton, J. K., 2003, Electrochemical DNA sensors, *Nat. Biotechnol.*, 21: 1192-1199.

D'Souza, S.F., 2001, Microbial biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, 16: 337–353.

Du, D., Liu, S., Chen, J., Ju, H., Lian, H., Li, J., 2005, Colloidal gold nanoparticle modified carbon paste interface for studies of tumor cell adhesion and viability, *Biomaterials*, 26: 6487-6495.

Du, Y., Luo, X. L., Xu, J. J., Chen, H. Y., 2006, A simple method to fabricate a chitosan-gold nanoparticles film and its application in glucose biosensor, *Bioelectrochem.*, 71: 44-49.

Du, Z., Li, H., Gu, T., 2007, A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for waste water treatment and bioenergy, *Biotechnol. Adv.*, 25: 464-482.

Duong H. D., Rhee J. I., 2007, Use of CdSe/ZnS core-shell quantum dots as energy transfer donors in sensing glucose, *Talanta*, 73: 899-905.

Dzyadevych, S. V., Arkhypova, V. N., Soldatkin, A. P., El'skaya, A. V., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., 2008, Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future, *ITBM-RBM*, 29: 171–180.

Fernandez, J. M. C., Pereiro, R. and Medel, A. S., 2006, The use of luminescent quantum dots for optical sensing, *TrAC Trend. Anal. Chem.*, 25: 207-218.

Fernando K. A. S., Lin, Y., Sun, Y. P., 2004, High aqueous solubility of functionalized single-walled carbon nanotubes, *Langmuir*, 20: 4777-4778.

Filho, O. F. and Vieira I. C., 2000, L-Ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of Zucchini (*Cucurbita pepo*), *J. Braz. Chem. Soc*., 11: 412-418.

Filho, O. F., Lupetti, K. O., Vieira, I. C., 2001, Chronoamperometric determination of paracetamol using an avocado tissue (*Persea americana*) biosensor, *Talanta*, 55: 685–692.

Flahaut, E., Laurent, C., and Peigney, A., 2005, Catalytic CVD synthesis of double and triple-walled carbon nanotubes by the control of the catalyst preparation, *Carbon*, 43: 375-383.

Florence, A. T., 2005, Dendrimers: a versatile targeting platform, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 57: 2104–2105.

Froehling, P. E., 2001, Dendrimers and dyes-A review, *Dyes Pigments*, 48: 187-195.

Galian, R. E., Guardia M., 2009, The use of quantum dots inorganic chemistry, TRAC *Trend. Anal. Chem.*, 28: 279-291.

Garcia, M. E., Baker, L. A., Crooks, R. M., 1999, Preparation and characterization of dendrimer−gold colloid nanocomposites, *Anal. Chem.*, 71: 256-258.

Gatgens, C., Degner, U., Bringer-Meyer, S., Herrmann, U., 2007, Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76: 553–559.

Ge, F., Zhang, X. E., Zhang, Z. P., Zhang, X. M., 1998a, Simultaneous determination of maltose and printed glucose using a screen-electrode system, *Biosens. Bioelectron.*, 13: 333-339.

Ge, F., Zhang, X. E., Zhang, Z. P., Zhang, X. M., 1998b, Potassium ferricyanide mediated disposable biosensor for determination of maltose and glucose, *Anal. Lett.*, 31: 383-394.

Gerion, D., Chen, F. Q., Kannan, B., Fu, A. H., Parak, W.J., Chen, D.J., Majumdar, A., Alivisatos, A.P., 2003, Room-temperature single-nucleotide polymorphism and multiallele DNA detection using fluorescent nanocrystals and microarrays, *Anal. Chem.* 75: 4766–4772.

Giffhorn, F., 2000, Fungal pyranose oxidases: occurance, properties and biotechnical applications in carbohydrate chemistry, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54: 727-740.

Gilmore, K. J., Moulton, S. E., Wallace, G. G., 2007, Incorporation of carbon nanotubes in to the biomedical polymer poly(styrene-b-isobutylene-b-styrene), *Carbon*, 45: 402–410.

Giridhar, R. N. and Srivastava, A. K., 2002, Productivity ımprovement in L-sorbose biosynthesis by fedbatch cultivation of *Gluconobacter oxydans*, *J. Biosci. Bioeng.*, 94: 34-38.

Gomez, J. M., Romero, M. D., Fernandez, T. M., Garcia, 2009, Immobilization and enzymatic activity of β-glucosidase on mesoporous SBA-15 silica, *S., J. Porous Mater,*. DOI 10.1007.

Göktuğ, T., Sezginturk, M. K., Dinckaya, E., 2005, Glucose oxidase-β-galactosidase hybrid biosensor based on glassy carbon electrode modified with mercury for lactose determination, *Anal. Chim. Acta*, 55: 151–156.

Grobe, K. J. and Stewart, P. S., 2000, Characterization of glutaraldehyde efficacy against bacterial biofilm, Corrosion, 124: Houston, TX: NACE International, Paper No. 124.

Gu H., Yu A., Chen H., 2001, Direct electron transfer and characterization of hemoglobin immobilized on a Au colloid–cysteamine-modified gold electrode, *J. Electroanal. Chem*., 516: 119-126.

Guo, S., Wang, E., 2007, Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles, *Anal. Chim. Acta*, 598: 181-192.

Gupta, A. K. and Gauta, S. P., 1993, Purification and properties of an extracellular α-glucosidase from the thermophilic fungus *Malbranchea sulfurea*, *J. Gen. Microbiol.*, 139: 963-967.

Gupta, A., Singh, V. K., Qazi, G. N., Kumar, A., 2001, *Gluconobacter oxydans:* Its biotechnological applications, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 3: 445-456.

Güngör, B. and Pazarlıoğlu N. 2007, 2,4-Dikolorofenoksiasetik asitin immobilize *Pseudomonas putida* ile yıkımının incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Ege Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Halada, P., Leitner, C., Sedmera, P., Haltrich, D., Volc, J., 2003, Identification of the covalent flavin adenine dinucleotide-binding region in pyranose2-oxidase from *Trametes multicolor*, *Anal. Biochem.*, 314: 235–242.

Hallberg, B. M., Leitner, C., Haltrich, D., Divne, C., 2004, Crystal Structure of the 270 kDa homotetrameric lignin-degrading enzyme pyranose 2-oxidase, *J. Mol. Biol.*, 341: 781–796.

Hahn, S., Mergenthaler, S., Zimmermann, B., Holzgreve, W., 2005, Nucleic acid based biosensors: The desires of the user, *Bioelectrochem.*, 67: 151–154.

He, Z., Angenent, L. T., 2006, Application of bacterial biocathodes in microbial fuel cells, *Electroanal*., 18: 2009–2015.

Heckmann-Pohl, D. M., Bastian, S., Altmeier, S., Antes, I., 2006, Improvement of the fungal enzyme pyranose 2-oxidase using protein engineering, *J.f Biotechnol.*, 124: 26–40.

Herrikhuyzen, J. V., Janssen, R. A. J., Meijer, E. W., Meskers, S. C. J., Schenning, A. P. H. J., The template approach was necessary since OPV-functionalized gold nanoparticles alone tend to aggregate into spherical structures, 2006, *J. Am. Chem. Soc*., 128: 686-687.

Hikuma, M., Takeda, M., Matsuoka, H. And Karube, I., 1995, Reagentless enzyme-based sensor using a gas-permeable membrane for determination of alcohols, *Anal. Chim. Acta*, 306: 209–215.

Hoshino, A., Fujioka, K., Manabe, N., Yamaya, S., Goto, Y., Yasuhara, M., Yamamoto, K., 2005, Simultaneous multicolor detection system of the single-molecular microbial antigen with total internal reflection fluorescence microscopy, *Microbiol. Immunol*., 49: 461-470.

Huang, W., Lin, Y., Taylor, S., Gaillard, J., Rao, A.M., Sun, Y. P., 2002, Sonication-assisted functionalization and solubilization of carbon nanotubes, *Nano Lett.*, 2: 231-234.

Huang W., Fernando S., Allard L. F., Sun Y. P., 2003, Solubilization of single-walled carbon nanotubes with diamine-terminated oligomeric poly(ethylene glycol) in different functionalization reactions, *Nano Lett.*, 3: 565-568.

Huang, H., Yuan, Q., Yang, X. 2004, Preparation and characterization of metal–chitosan nanocomposites, *Colloid Surface B.*, 39: 31–37.

Huang, Y. and Wu, F., 2006, Plant Tissue-based chemiluminescence biosensor for ethanol, *Anal. Sci.*, 22: 969-969.

Hussain I., Graham S., Wang Z.X., Tan B., Sherrington D.C., Rannard S.P., Cooper A.I., Brust M., 2005, Size-controlled synthesis of near-monodisperse gold nanoparticles in the 1–4 nm range using polymeric stabilizers, *J. Am. Chem. Soc.*, 127: 16398-16399.

Ikeda T., Kato K., Maeda M., Tatsumi H., Kano K., Matsushita K., 1997, Electrocatalytic properties of *Acetobacter aceti* cells immobilized on electrodes for the quinone-mediated oxidation of ethanol, *J. Electroanal. Chem.*, 430: 197-204.

Inoue, K., 2000, Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers, *Prog. Polym. Sci.*, 25: 453-571.

Ivanov, A. R., Nazimov, I. V., Lobazov, A. P., Popkovich, G. B., 2000, Direct determination of amino acids and carbohydrates by high performance capillary electrophoresis with refractometric detection, *J. Chromatogr. A*, 894: 253–257.

Izumi Y., Furuya Y., Yamada H., 1990, Purification and properties of pyranose oxidase from basidiomycetous fungus no. 52, *Agric. Biol. Chem.*, 54: 1393-1399.

Jahnel, J. B., Ilieva, P., Frimmel, F. H., 1998, HPAE-PAD–a sensitive method for the determination of carbohydrates, *Fresenius J Anal Chem*, 360: 827–829.

Janssen F. W., Ruelius H. W., 1975, Pyranose oxidase from *Polyporus obtusus*, *Methods Enzymol.*, 41: 170-173.

Jayakumar, R., Prabaharan, M., Reis, R.L., Mano, J.F., 2005, Graft copolymerized chitosan—present status and applications, *Carbohydrate Polym.*, 62: 142–158.

Jena, B. K. and Raj, C. R., 2007, Amperometric L-Lactate biosensor based on gold nanoparticles, *Electroanal.*, 19: 816–822.

Jenkins R. L., Wilson, E. M., Angus, R. A., Howell, W. M., Kirk, M., Moore, R., Nance, M., Brown, A., 2004, Production of androgens by microbial transformation of progesterone in vitro: a model for androgen production in rivers receiving paper mill effluent, *Environ. Health Perspect*., 112: 1508–1511.

Jewrajka S.K., Chatterjee U., 2006, Block copolymer mediated synthesis of amphiphilic gold nanoparticles in water and an aqueous tetrahydrofuran medium: An approach for the preparation of polymer-gold nanocomposites, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.,* 44: 1841-1854.

Jia J., Wang B., Wu A., Cheng G., Li Z., Dong S., 2002, A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol−gel network, *Anal. Chem*., 74: 2217-2223.

Jiang, X., Li, D., Xu, X., Ying, Y., Li, Y., Ye, Z., Wang, J., 2008, Immunosensors for detection of pesticide residues, *Biosens. Bioelectron.*, 23: 1577–1587.

Jianrong, C., Yuqing, M., Nongyue, H., Xiaohua, W., Sijiao, L., 2004, Nanotechnology and biosensors, *Nanotechnol. Adv.*, 22: 505–518.

Jo, J. H., Sung Lee, D., Park, D., Park, J. M., 2008, Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment proces, *Bioresource Technol.*, 99: 6666-6672.

Journet C., Maser W.K, Bernier P., Loiseau A., Lamy de la M., Chapelle S., 1997, Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique, *Nature*, 388: 756-758.

Kabilan, S., Marshall, A. J., Sartain, F. K., Lee, M. C., Hussain, A., Yang, X., Blyth, J., Karangu, N., James, K., Zeng, J., Smith, D., Domschke, A., Lowe, C. R., 2005, Holographic glucose sensors, *Biosens. Bioelectron.*, 20: 1602–1610.

Kahn M. G. C., Banerjee S., Wong S. S., 2002, Solubilization of oxidized single-walled carbon nanotubes in organic and aqueous solvents through organic derivatization, *Nano Lett*., 2: 1215-1218.

Kapoor, M., Nair, L. M., Kuhad, R. C., 2008, Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora, Biochem. Eng. J.,* 38: 88–97.

Karmali, A. and Oliveira, P., 1999, Glucose 1- and 2- oxidases from fungal strains: isolation and production of monoclonal antibodies, *J. Biotechnol.*, 69: 151–162.

Kartal, F., Kılınç, A., Timur, S., 2007, Lipase biosensor for tributyrin and pesticide detection, *Int. J. Environ. An. Ch.,* 87: 715-722.

Katrlik, J., Vostiar, I., Sefcovicova, J., Tkac, J., Mastihuba, V., Valach, M., Stefuca, V., Gemeiner, P., 2007, A novel microbial biosensor based on cells of *Gluconobacter oxydans* for the selective determination of 1,3-propanediol in the presence of glycerol and its application to bioprocess monitoring, *Anal. Bioanal. Chem.*, 388: 287–295.

Karube, l. and Nakanishi, K., 1994, Microbial biosensors for process and environmental control, *IEEE Eng. Med. Biol.*, 13: 364-374.

Kerman, K., Saito, M., Morita, Y., Takamura, Y., Ozsoz, M., Tamiya, E., 2004, Electrochemical coding of single-nucleotide polymorphsims by monobase-modified gold nanoparticles, *Anal. Chem.*, 76: 1877-1884.

Kirgoz, U. A., Odaci, D., Timur, S., Merkoci, A., Alegret, S., Besun, N., Telefoncu, A., 2006a, A biosensor based on graphite epoxy composite electrode for aspartame and ethanol detection, *Anal. Chim. Acta*, 570: 165–169.

Kirgoz, Ü. A., Odaci, D., Timur, S., Merkoçi, A., Pazarlıoğlu, N., Telefoncu, A., Alegret, S., 2006b, Graphite epoxy composite electrodes modified with bacterial cells, *Bioelectrochem.,* 69: 128–131.

Kirgoz, U. A., Timur, S., Odaci, D., Perez, B., Alegret, S., Merkoçi, A., 2007,Carbon nanotube composite as novel platform for microbial biosensor, *Electroanal.*,19: 893–898.

Kim J.H., Lee T.R., 2004, Thermo- and pH-responsive hydrogel coated gold nanoparticles, *Chem. Mater.*, 16: 3647-3651.

Koenig, A., Zaborosch, C., Muscat, A., Vorlop, K.D., Spener, F., 1996, Microbial sensors for naphthalene using *Sphingomonas sp.* B1 or *Pseudomonas fluorescens* WW4, *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 45: 844–850.

Koker, T. H., Mozuch, M. D., Cullen, D., Gaskell, J., Kertsen, P. J., 2004, Isolation and purification of pyranose2-oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* and Characterization of gene structure and regulation, *Appl. Environ. Microb.*, 70: 5794–5800.

Kotik, M., Kobanova, M., Marenova, H., Kyslik, P., 2004, High-level expression of a fungal pyranose oxidase in high cell-density fed-batch cultivations of *Escherichia coli* using lactose as inducer, *Protein Expres. Purif.,* 36: 61–69.

Kozan, J. V. B., Silva, R. P., Serrano, S. H. P., Lima, A. W. O., Angnes, L., 2007, Biosensing hydrogen peroxide utilizing carbon paste electrodes containing peroxidases naturally immobilized on coconut (*Cocus nucifera L.)* fibers, *Anal. Chim. Acta,* 59: 1200–1207.

Krajewska, B., 2005, Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials, *Sep. Purif. Technol.*, 41: 305–312.

Kujawa, M., Ebner, H., Leitner, C., Hallberg, B. M., Prongjit, M., Sucharitakul, J., Ludwig, R., Rudsander, U., Peterbauer, C., Chaiyen, P., Haltrich, D., Divne, C., 2006, Structural basis for substrate binding and regioselective oxidation of monosaccharides at C3 by pyranose-2-oxidase, *J. Biol. Chem.*, 281: 35104–35115.

Lan, D., Li, B. and Zhang, Z. 2008, Chemiluminescence flow biosensor for glucose based on gold nanoparticle-enhanced activities of glucose oxidase and horseradish peroxidase, *Biosens. Bioelectron.*, 24: 940–944.

Lanyon, Y. H., Marrazz, G., Tothill, I. E., Macsini, M., 2005, Benzene analysis in work place air using an FIA-based bacterial biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, 20: 2089–2096.

Lanyon, Y. H., Tothill, I. E., Macsini, M., 2006, An amperometric bacterial biosensor based on gold screen-printed electrodes for the detection of benzene, *Anal. Lett.*, 39: 1669–1681.

Lapenaite, I., Kurtinaitiene, B., Razumiene, J., Laurinavicius, V., Marcinkeviciene, L., Bachmatova, I., Meskys, R., Ramanavicius, A., 2005, Properties and analytical application of PQQ-dependent glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter* sp33., *Anal. Chim. Acta*, 549: 140–150.

Lee, S. A., Choi, Y., Jung, S. H. and Kim, S., 2002, Effect of initial carbon sources on the electrochemical detection of glucose by *Gluconobacter oxydans*, *Bioelectrochem.*, 57: 173–178.

Lee, E., 2006, An integrated system of microcantilever arrays with carbon nanotube tips or imaging, sensing, and 3D nanomanipulation: Design and control, *Sens. Actuat. A*, 134: 286-295.

Lee, C. H., Wang, S. C., Yuan, C. J., Wen, M. F., Chang, K. S., 2007, Comparison of amperometric biosensors fabricated by palladium sputtering, palladium electrodeposition and Nafion/carbonnanotube casting on screen-printed carbon electrodes, *Biosens. Bioelectron.*, 22: 877-884.

Lei, Y., Chen, W., Mulchandani, A., 2006, Microbial biosensors, *Anal. Chim. Acta*, 568: 200-210.

Lei, Y., Mulchandani, P., Chen, W., Mulchandani, A., 2005, Direct determination of p-nitrophenyl substituent organophosphorus nevre agents using a recombinant *Pseudomonas putida* JS444-modified Clark oxygen electrode, *J. Agric. Food Chem.*, 53: 524−527.

Leitner, C., Mayr, P., Riva, S., Volc, J., Kulbe, K. D., Nidetzky, B., Haltrich, D., 2001a, Enzymatic redox isomerization of 1,6-disaccharides by pyranose oxidase and NADH-dependent aldose reductase, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 11: 407–414.

Leitner, C., Volc, J., Haltrich, D., 2001b, Purification and characterization of pyranose oxidase from the white rot fungus *Trametes multicolor, Appl. Environ. Microb.,* 67: 3636–364.

Li, A., Yang, F., Ma, Y., Yang, X., 2007, Electrochemical impedance detection of DNA hybridization based on dendrimer modified electrode, *Biosens. Bioelectron.,* 22: 1716–1722.

Li, N. B. and Kwaka J., 2007, A penicillamine biosensor based on tyrosinase ımmobilizedon nano-Au/PAMAM dendrimer modified gold electrode, *Electroanal.,* 19: 2428-2436.

Li, G., Liaoa, J. M., Hua, G. Q., Maa, N. Z., Wub, P. J., 2005, Study of carbon nanotube modified biosensor for monitoring total cholesterol in blood, *Biosens. Bioelectron.,* 20: 2140–2144.

Li, Q., Zhang, J., Yan, H., He, M. and Liu, Z., 2004, Thionine-mediated chemistry of carbon nanotubes, *Carbon*, 42: 287-291.

Liden, H., Volc, J., Marko-Varga, G., Gorton, L., 1998, Pyranose oxidase modified carbon paste electrodes for monosaccharide determination, *Electroanal.,* 10: 223–230.

Lin Y., Lu F., Tu Y., Ren Z., 2004a, Glucose biosensors based on carbon nanotube nanoelectrode ensembles, *Nano Lett.,* 2: 191-195.

Lin, Y., Yantasee, W.; Lu, F.; Wang, J.; Musameh, M.; Tu, Y.; Ren, Z., 2004b, Biosensors based on carbon nanotubes, In: Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, Markel Dekker Inc., New York.

Liu, G., Riechers, S. L., Melen, M. C., Lin, Y, 2005a, Sensitive electrochemical detection of enzymatically generated thiocholine at carbon nanotube modified glassy carbon electrode, *Electrochem. Commun.,* 7: 1163–1169.

Liu, Z. M., Yang, Y., Wang, H., Liu, Y. L., Shen, G. L., Yu, R. Q., 2005b, A hydrogen peroxide biosensor based on nano-Au/PAMAM

dendrimer/cystamine modified gold electrode, *Sensor Actuat. B-Chem.,* 106: 394-400.

Liu, J., Tang, X. Chen, J.H. Xin, 2005c, Decoration of carbon nanotubes with chitosan, *Carbon,* 43: 3178–3180.

Liu, S. and Ju, H., 2003, Electrocatalysis via direct electrochemistry of myoglobin ımmobilized on colloidal gold nanoparticles, *Electroanal.,* 15: 1488-1493.

Liu, Y., Yin, F., Long, Y., Zhang, Z., Yao, S., 2003, Study of the immobilization of alcohol dehydrogenase on Au-colloid modified gold electrode by piezoelectric quartz crystal sensor, cyclic voltammetry, and electrochemical impedance techniques, *J. Colloids Interf. Sci.,* 258: 75-81.

Liu, Y., 2008, Electrochemical detection of prostate-specific antigen based on gold colloids/alumina derived sol-gel film, *Thin Solid Films,* 516: 1803-1808.

Liu, Y., Qu, X., Guo, H., Chen, H., Liu, B., Dong, S., 2006a, Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes–chitosan composite, *Biosens. Bioelectron.*, 21: 2195–2201.

Liu, Z., Liu, J., Shen, G., Yu, R. 2006b, A reagentless tyrosinase biosensor based on 1,6-hexanedithiol and nano-Au self-assembled monolayers. *Electroanal.,* 18: 1572–1577.

Liu Y., Qin Z., Wu X., Jiang H., 2006c, Immune-biosensor for aflatoxin B_1 based bio-electrocatalytic reaction on microcom b-type electrode, *Biochem. Eng. J.,* 32: 211-217.

Liu, G. and Lin, Y., 2006, Amperometric glucose biosensor based on self-assembling glucose oxidase on carbon nanotubes, *Electrochem. Commun.,* 8: 251-256.

Lobanov, A. V., Borisov, I. A., Gordon, S. H., Grene, R. V., Leathers, T. D., Reshetilov, A. N., 2001, Analysis of ethanol–glucose mixtures

by two microbial sensors: application of chemometrics and artificial neural Networks for data processing, *Biosens. Bioelectron.*, 16: 1001–1007.

Losada, J., Zamora, M., Garcia Armada, P., Cuadrado, I., Alonso, B., Casado, C. M., 2006, Bienzyme sensors based on novel polymethylferrocenyl dendrimers, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385: 1209–1217.

Luo, X., Killard, A. J., Morrin, A., Smyth, M. R., 2006, Enhancement of a conducting polymer-based biosensor using carbon nanotube-doped polyaniline, *Anal. Chim. Acta*, 575: 39–44.

Luong, J. H. T., Hrapovic, S., Wang, D., Bensebaa, F., Simard, B., 2004, Solubilization of multiwall carbon nanotubes by 3-aminopropyltriethoxysilane towards the fabrication of electrochemical biosensors with promoted electron transfer, *Electroanal.*, 16: 132-139.

Luppa P. B., Sokoll, L. J., Chan, D. W., 2001, Immunosensors-principles and applications to clinical chemistry, *Clin. Chim. Acta*, 314: 1-26.

Lusta, K. A. and Reshetilov, A.N., 1998, Physiological and biochemical features of *Gluconobacter oxydans* and prospects of their use in biotechnology and biosensor systems, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 34: 307–320.

Machida Y., Nakanishi T., 1984, Purification and properties of pyranose oxidase from *Coriolus versicolor*, *Agric. Biol. Chem*., 48: 2463-2470.

Male, K. B., Hrapovic, S., Liu, Y., Wang, D., Luong, J. H. T., 2004, Electrochemical detection of carbohydrates using copper nanoparticles and carbon nanotubes, *Anal. Chim. Acta*, 516: 35-41.

Manso, J., Mena, M. L., Sedeno, P. Y. and Pingarron J. M., 2008, Alcohol dehydrogenase amperometric biosensor based on a colloidal gold–carbon nanotubes composite electrode, *Electrochim. Acta*, 53: 4007-4012.

Maresova, H., Vecerek, B., Hradska, M., Libessart, N., Becka, S., Saniez, M. H., Kyslik, P., 2005, Expression of the pyranose-2-oxidase from *Trametes pubescens* in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme, *J. Biotechnol.*, 120: 387–395.

Maresova, H., Palyzov, A., Kyslik, P., 2007, The C-terminal region controls correct folding of genus *Trametes* pyranose-2-oxidases, *J. Biotechnol.*, 130: 229–235.

Mathebe, N. G. R., Morrin, A. and Iwuoha, E. I., 2004, Electrochemistry and scanning electron microscopy of polyaniline/peroxidase based biosensor, *Talanta*, 64: 115-120.

Matsusaka, K., Chiba, S., Shimomura, T., 1977, Purification and substrate specificity of brewer's yeast alpha-glucosidase, *Agric. Biol. Chem.*, 41: 1917-1923.

McMahon, A. M., Doyle, E. M., O'Connor, K. E., 2005, Detection and quantification of 4-substituted phenols a comparison of mushroom tyrosinase and cell extracts of *Pseudomonas putida* F6, *Enzyme Microb. Tech.*, 36: 808–812.

Mei, Y., Ran, L., Ying, X., Yuan, Z., Xin, S., 2007, A sequential injection analysis/chemiluminescent planttissue-based biosensor system for the determination of diamine, *Biosens. Bioelectron.*, 22: 871–876.

Merkoçi, A., 2007, Nanobiomaterials in electroanalysis, *Electroanal.*, 19: 739-731.

Merkoçi, A., Pumera, M., Llopis, X., Perez, B., del Vale, M., Alegret S., 2005a, New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes, *TRAC Trend Anal. Chem.*, 24: 826-838.

Merkoçi, A., Aldavert, M., Marin, S.and Alegret S., 2005b, New materials for electrochemical sensing V: Nanoparticles for DNA labeling, *TRAC Trend Anal. Chem.*, 24: 341-349.

Mikeladze, E., Collins, A., Sukhacheva, M., Netrusov, A., Csöregi, E., 2002, Characterization of a glutamate biosensor based on a novel glutamate oxidase ıntegrated into a redox hydrogel, *Electroanal.*, 14: 1052-1059.

Mikkelsen, S. R., 1996, Electrochemical biosensors for DNA sequence detection, *Electronal.*, 8: 15-19.

Miller, G. L. 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, 31: 426-428.

Minteer, S. D., Liaw, B. Y., Cooney, M. J., 2007, Enzyme-based biofuel cells, *Curr. Opin. Biotech.*, 18: 228–234.

Molinari, F., Aragozzini, F., Cabral, J. M. S. and Prazeres, D. M. F., 1996, Continuous production and in situ extraction of isovaleraldehyde in a membrane bioreactor, *Prog. Biotechnol.*, 11: 538-545.

Molinari, F., Villa, R., Manzoni, M. and Aragozzini, F., 1995. Aldehyde production by alcohol oxidation with *Gluconobacter oxydans*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43: 983-994.

Mulchandani, P., Lei, Y., Chen, W., Wang, J., Mulchandani, A., 2002, Microbial biosensor for p-nitrophenol using *Moraxella sp., Anal. Chim. Acta*, 470: 79-86.

Mulchandani, A., Mulchandani, P., Kaneva, I., Chen, W., 1998, Biosensor for direct determination of organophosphate nevre agents using recombinant *Escherichia coli* with surface-expressed organophophorous hydrolase, Potentiometric microbial electrode, *Anal. Chem.,* 70: 4140–4145.

Muynck, C. D., Pereira, C. S. S., Naessens, M., Parmentier, S., Soetaert, W., Vandamme, E. J., 2007, The genus *Gluconobacter Oxydans*: comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 27: 147–171.

Navratil, M., Tkac, J., Svitel, J., Danielsson, B., Sturdik, E., 2001, Monitoring of the bioconversion of glycerol to dihydroxyacetone with immobilized *Gluconobacter oxydans* cell using thermometric flow injection analysis, *Process Biochem.*, 36: 1045–1052.

Newman, J. D. and Turner, A. P. F., 2004, Biosensors for Monitoring Glucose, In: Sensors in Medicine and Health Care, P. A. Öberg, T. Togawa, and F. A. Spelman (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim.

Nishimura, I., Okada, K., Koyama, Y., 1996, Cloning and expression of pyranose oxidase cDNA from *Coriolus versicolor* in *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.*, 52: 11-20.

Nizamuddin, S., Sridevi, A. and Narasimha, G., 2008, Production of β-galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation, *Afr. J. Biotechnol.*, 7: 1096-1100.

Note, C., Koetz, J., Wattebled, L., Laschewsky, A., 2007, Effect of a new hydrophobically modified polyampholyte on the formation of inverse microemulsions and the preparation of gold nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.*, 308: 162-169.

Odaci, D., Timur, S. Telefoncu, A., 2004, Immobilized jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tissue electrode for phenol detection, *Artif.l Cell Blood Sub*., 32: 315–323.

Odaci, D., Timur, S., Pazarlioglu, N., Montereali, M. R., Vastarella, W., Pilloton, R., Telefoncu, A., 2007, Determination of phenolic acids using *Trametes versicolor* laccase, *Talanta*, 71: 312–317.

Odaci, D., Kayahan, S. K., Timur, S., Toppare, L., 2008, Use of a thiophene-based conducting polymer in microbial biosensing, *Electrochim. Acta*, 53: 4104–4108.

Odaci, D., Gacal, B. N., Gacal, B., Timur, S., Yagci, Y., 2009a, Fluorescence sensing of glucose using glucose oxidase modified by PVA-pyrene prepared via “Click” chemistry, *Biomacromolecules*, 10: 2928–2934.

Odaci, D., Sezgintürk, M. K., Timur, S., Pazarlioglu, N., Pilloton, R., Dinçkaya, E., Telefoncu, A., 2009b, *Pseudomonas putida* based amperometric biosensors for 2,4-D detection, *Prep. Biochem. Biotech.*, 39: 11–19.

Okochi, M., Mima, K., Miyata, M., Shinozaki, Y., Haraguchi, S., Fujisawa, M., Kaneko, M., Masukata, T., Matsunaga, T., 2004, Development of an automated water toxicity biosensor using *Thiobacillus ferrooxidans* for monitoring cyanides in natural water for a water filtering plant, *Biotechnol. Bioeng.*, 87: 905-911.

O'Leary, N. D., O'Connor, K. E., Duetz, W. and Dobson, A. D. W., 2001, Transcriptional regulation of styrene degradation in *Pseudomonas putida* CA-3, *Microbiology*, 147: 973-979.

Ozdemir, C., Yeni, F., Odaci, D., Timur, S., 2010, Electrochemical glucose biosensing by pyranose oxidase immobilized in gold nanoparticle-polyaniline/AgCl/gelatin nanocomposite matrix, *Food Chem.*, 119: 380–385.

Ozsoz, M., Erdem, A., Kerman K., Ozkan, D., Tugrul, B., Topcuoglu, N., Erken, H., Taylan, M., 2003, Electrochemical genosensor based on coloidal gold nanoparticules for the detection of inherrited diseases using disposable pencil graphite electrodes, *Anal. Chem.*, 75: 2181-2187.

Palecek, E., 2009, Fifty years of nucleic acid electrochemistry, *Electroanal.*, 21: 239–251.

Paradise, M., Goswami, T., 2007, Carbon nanotubes-Production and industrial applications, *Mater. Design*, 28: 1477–1489.

Park, S. M., Park, H. H., Lim, W. K., Shin, H. J., 2003, A new variant activator involved in the degradation of phenolic compounds from a strain of *Pseudomonas putida*, *J. Biotechnol.*, 103: 227-236.

Pasco, N., Baronian, K., Jeffries, C., Hay, J., 2000, Biochemical mediator demand, a novel rapid alternative for measuring biochemical oxygen demand, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53: 613-618.

Pathak, S., Choi, S. K., Arnheim, N., Thompson, M. E., 2001, Hydroxylated quantum dots as luminescent probes for *in situ* hybridization, *J. Am. Chem. Soc.*, 123: 4103-4104.

Penicaud, A., Poulin, P., Dere, A., Anglaret, E., Petit, P., 2005, Spontaneous dissolution of a single-wall carbon nanotube salt, *J. Am. Chem. Soc.*, 127: 8-9.

Pickup, J. C., Hussain, F., Evans, N. D., Rolinski, O. J., Birch, D. J. S., 2005, Fluorescence-based glucose sensors, *Biosens. Bioelectron.*, 20: 2555–2565.

Pingarron, J. M., Sedeno, P. Y., Cortes, A. G., 2008, Gold nanoparticle based electrochemical biosensors, *Electrochim. Acta*, 53: 5848-5866.

Pison, U., Welte, T., Giersig, M., Groneberg, D. A., 2006, Nanomedicine for respiratory diseases, *Eur. J. Pharmacol.*, 533: 341–350.

Plaga, A., Stümpfel, J. and Fiedler, H. P., 1989, Determination of carbohydrates in fermentation processes by high-performance liquid chromatography, *Appl. Microbiol. Biot.*, 32: 45-49.

Planeix, J. M., Coustel, N., Coq, B., Brotons, V., Kumbhar, P. S., Dutartre, R., 1994, Application of carbon nanotubes as supports in heterogeneous catalysis, *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 7935-7936.

Pompeo, F. and Resasco, D. E., 2002, Water solubilization of single-walled carbon nanotubes by functionalization with glucosamine, *Nano Lett.*, 2: 369-373.

Prashanth, K. V. H. and Tharanathan, R. N., 2007, Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—An overview, *Trends Food Sci. Tech.*, 18: 117–131.

Prodromidis, M. I., 2010, Impedimetric immunosensors—A review, *Electrochim. Acta*, DOI:10.1016/j.electacta.2009.01.081.

Pumera, M., Merkoçi, A., Alegret, S., 2006, Carbon nanotube-epoxy composites for electrochemical sensing, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 113: 617-622.

Qazi, G. N., Parshad, R., Verma, V., Chopra, C. L., Buse, R., Trager, M. and Onken, L., 1991, Diketogluconate fermentation by *Gluconobacter oxydans, Enzyme Microb. Technol*., 13: 504-507.

Qian, L. and Yang, X., 2006,Composite film of carbon nanotubes and chitosan for preparation of amperometric hydrogen peroxide biosensor, *Talanta*, 68: 721-727.

Rajasekar, S., Rajasekar, R., Narasimhan, K. C., 2000, Acetobacter peroxydans based electrochemical biosensor for hydrogen peroxide, *Bull. Electrochem.*, 16: 25-28.

Raudkivi, K., Tutt, M., Talpsep, E., Kikas, T., 2008, *Pseudomonas putida P67.2* and *Pseudomonas flourescens P75* based microbial sensors for biochemical oxygen demand (BOD) measurements in phenolic waste waters of oil shale industry, *Oil Shale*, 25: 376–386.

Reshetilov, A. N., Iliasov, P. V., Filonov, A. E., Gayazov, R. R., Kosheleva, I. A. and Boronin, A. M., 1997a, *Pseudomonas putida* as a receptor element of microbial sensor for naphthalene detection, *Process Biochem.*, 32: 487-493.

Reshetilov, A. N., Iliasov, P. V., Donova, M. V., Dovbnya, D. V., Boronin, A. M., Leathers, T. D., Grene, R. V., 1997b, Evaluation of a *Gluconobacter oxydans* whole cell biosensor for amperometric detection of xylose, *Biosens. Bioelectron.*, 12: 241-247.

Reshetilov, A. N., Lobanov, A. V., Morozova, N. O., Gordon, S. H., Greene, R. V. and Leathers, T. D., 1998a, Detection of ethanol in a two component glucose/ethanol mixture using a nonselective microbial sensor and a glucose enzyme electrode, *Biosens. Bioelectron.*, 13: 787–793.

Reshetilov, A. N., Donova, M. V., Dovbnya, D. V., Il'yasov, P. V., Boronin, M., Leasers, T. and Green, R., 1998b, Membrane-bound dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans*: sensors for measuring sugars, alcohols, and polyoles., *Bull. Exp. Biol. Med.*, 126: 702–704.

Reshetilov, A. N., Trotsenko, J. A., Morozova, N. O., Iliasov, P. V., Ashin, V. V., 2001, Characteristics of *Gluconobacter oxydans* B-1280 and *Pichia methanolica* MN4 cell based biosensors for detection of ethanol, *Process Biochem.*, 36: 1015–1020.

Reshetilov, A., Alferov, S., Tomashevskaya, L., Ponamorevac, O., 2006, Testing of bacteria *Gluconobacter oxydans* and electron transport mediators composition for application in biofuel cell, *Electroanal.*, 18: 2030–2034.

Richardson, S. and Gorton L., 2003, Characterisation of the substituent distribution in starch and cellulose derivatives, *Anal. Chim. Acta,* 497: 27–65.

Rinaudo M., 2006, Chitin and chitosan: properties and applications, *Polym. Sci.,* 31: 603–632.

Rivas, G. A., Pedano, M. L., Ferreyra, N. F., 2005, Electrochemical biosensors for sequence-specific DNA detection, *Anal. Lett.*, 38: 2653–2703.

Romero, M. R., Garay, F., Baruzzi, A. M., 2008, Design and optimization of a lactate amperometric biosensor based on lactate oxidase cross-linked with polymeric matrixes, *Sensor Actuat. B- Chem.*, 131: 590-595.

Ros, T. D., Spalluto, G., Prato, M., 2001, Biological applications of fullerene derivatives: a brief overview, *Croat. Chem. Acta*, 74: 743-755.

Rouillon, R., Sole, M., Carpentier, R., Marty, J. L., 1995, Immobilization of thylokoids in polyvinylalcohol for the detection of herbicides, *Sensor Actuat.*, 27: 477–479.

Roy, S, Vedala, H, Choi, W., 2006, Vertically aligned carbon nanotube probes formonitoring blood cholesterol, *Nanotechnology*, 17: 14–18.

Rubianes, M. D., Rivas, G. A., 2003, Carbon nanotubes paste electrode, *Electrochem. Commun.,* 5: 689-694.

Rubianes, M. D., Rivas, G. A., 2005, Enzymatic biosensors based on carbon nanotubes paste electrodes, *Electroanal.*, 17: 73-78.

Rungsrisuriyachai, K., Gadda, G., 2009, A pH switch affects the steady-state kinetic mechanism of pyranose2-oxidase from *Trametes ochracea*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 483: 10–15.

Sadler, K., Tam J. P., 2002, Peptide dendrimers: applications and synthesis, *Rev. Mol. Biotechnol.*, 90: 195-229.

Saito S., 1997, Carbon nanotubes for next-generation electronics devices, *Science*, 278: 77-78.

Sarkar, S., Seenivasan, S., Premkumar, R., 2009, Biodegradation of propiconazole by *Pseudomonas putida* isolated from tea rhizosphere, *Plant Soil Environ.*, 55: 196–201.

Sarma, K., Vatsyayan, P., Goswami, P., Minteer, S. D., 2009, Recent advances in material science for developing enzyme electrodes, *Biosens. Bioelectron.*, 24: 2313-2322.

Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D., Branduardi, P., 2008, Microbial production of organic acids: expanding the markets, *Trends Biotechnol.*, 26: 100–108.

Saurina, J., Hernandez-Cassou, S., Alegret S., Fabregas, E., 1999, Amperometric determination of lysine using a lysine oxidase biosensor based on rigid-conducting composites, *Biosens. Bioelectron.*, 14: 211-220.

Schafer, A., Bieg, S., Huwig, A., Kohring, G. W., Giffhorn, F., 1996, purification by immunoaffinity chromatography, characterization, and structural analysis of a thermostable pyranose oxidase from the white rot fungus *Phlebiopsis gigantea*, *Appl. Environ. Microb.*, 62: 2586–2592.

Schmidt, A., Standfuss, G. C., Bilitewski, U., 1996, Microbial biosensor for free fatty acids using an oxygen electrode based on thick film technology, *Biosens. Bioelectron.*, 11: 1139–1145.

Sedeno, P. Y. and Pingarron, J. M., 2005, Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382: 884–886

Sefcovicova, J., Vikartovska, A., Patoprsty, V., Magdolen, P., Katrlik, J., Tkac, J., Gemeiner, P., 2009, Off-line FIA monitoring of D-sorbitol consumption during L-sorbose production using a sorbitol biosensor, *Anal. Chim. Acta,* 644: 68–71.

Sekin, Y. ve Karagözlü, N., 2004, Gıda mikrobiyolojisi; Gıda endüstrisi için temel esaslar ve uygulamalar, Literatür Yayıncılık Ltd., İstanbul, 358 s.

Seto, H., Kawakita, H., Ohto, K., Harada, H., Inoue, K., 2008, Novel carbonyl-group-containing dextran synthesis by pyranose-2-oxidase and dextransucrase, *Carbohyd. Res.*, 343: 2417–2421.

Sezgintürk, M. K., Dinçkaya, E., 2004, An amperometric inhibitor biosensor for the determination of reduced glutathione (GSH) without any derivatization in some plants, *Biosens. Bioelectron.*, 19: 835–841.

Sezgintürk, M. K. and Dinçkaya, E., 2007, β-galaktozidaz aktivitesinin belirlenmesinde biyosensör temelli ölçüm sistemlerinin geliştirilmesi, Doktora tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Sharma, S. K., Sehgal, N., Kumar, A., 2003, Biomolecules for development of biosensor and their applications, *Curr. Appl. Phys.*, 3: 307-316.

Sharma, S. K., Singhal, R., Malhotra, B. D., Sehgal, N., Kumar, A., 2004, Lactose biosensor based on Langmuir–Blodgett films of poly(3-hexylthiophene), *Biosens. Bioelectron.*, 20: 651–657.

Shi, H., Yang, Y., Huang, J., Zhao, Z., Xu, X., Anzai, J., Osa, T. and Chen, Q., 2006, Amperometric choline biosensors prepared by layer-by-layer deposition of choline oxidase on the Prussian blue-modified platinum electrode, *Talanta*, 70: 852-858.

Shin, K. S., Youn, H. D., Han, Y. H., Kang, S. O., Hah, Y. C., 1993, Purification and characterisation of D-glucose oxidase from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Eur. J. Biochem.*, 215: 747-752.

Shleev, S., Kasmi, A. E., Ruzgas, T. and Gorton, L., 2004, Direct heterogeneous electron transfer reactions of bilirubin oxidase at a spectrographic graphite electrode, *Electrochem. Commun.*, 6: 934-939.

Shulga, O., Kirchhoff, J. R., 2007, An acetylcholinesterase enzyme electrode stabilized by an electrodeposited gold nanoparticle layer, *Electrochem. Commun.*, 9: 935-940.

Singh, R. S., Saini, G. K., Kennedy, J. F., 2008, Pullulan: microbial sources, production and applications, *Carbohyd. Polym.*, 73: 515-531.

Skladal, P., 1997, Advances in electrochemical immunosensors, *Electroanal.*, 9: 737-745.

Snejdarkova, M., Svobodova, L., Nikolelis, D. P., Wang, J., Hianik, T., 2003, Acetylcholine biosensor based on dendrimer layers for pesticides detection, *Electroanal.*, 15: 1185-1191.

Soga, T. and Serwe, M., 2000, Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection, *Food Chem.*, 69: 339-344.

Soldatkin, A. P., Volotovsky, V., Elskaya, A. V., Jaffrezic-Renault, N. and Martelet, C., 2000, Improvement of urease based biosensor characteristics using additional layers of charged polymers, *Anal. Chim. Acta*, 403: 25-29.

Song, Z., Huang, J. D., Wu, B. Y., Shi, H. B., Anzai, J. I., Chen, Q. , 2006, Amperometric aqueous sol–gel biosensor for low-potential stablecholine detection at multi-wall carbon nanotube modified platinum electrode, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 115: 626–633.

Spadiut, O., Pisanelli, I., Maischberger, T., Peterbauer, C., Gorton, L., Chaiyen, P., Haltrich, D., 2009, Engineering of pyranose 2-oxidase: Improvement for biofuel cell and food applications through semi-rational protein design, *J. Biotechnol.*, 139: 250–257.

Star, A., Stoddart, J. F., Steuerman, D., Diehl, M., Boukai, A., Wong, E. W., Yang, X., Chung, S. W., Choi, H., Heath, J. R., 2001, Preparation and properties of polymer-wrapped single-walled carbon nanotubes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40: 1721-1725.

Stein, K. and Hain J. U., 1995, Catalase biosensor for the determination of hydrogen peroxide, fluoride and cyanide, *Microchim. Acta*, 118: 93-101.

Subrahmanyam, S., Kodandapani, N., Shanmugam, K., Moovarkumuthalvan, K., Jeyakumar, D., Subramanian, T. V., 2001, Development of a sensor for acetic acid based on *Fusarium solani, Electroanal.*, 13: 1275-1278.

Sugisawa, T., Ojima, S., Matzinger, P. K., and Hoshino, T. 1995. Isolation and characterization of a new vitamin-C producing enzyme (L-gulono-gamma-Lactone-dehydrogenase) of bacterial origin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59: 190-196.

Sukyai, P., Rezic, T., Lorenza, C., Mueangtooma, K., Lorenze, W., Haltrich, D., Ludwig, R., 2008, Comparing soluble and co-immobilized catalysts for 2-ketoaldose production by pyranose 2-oxidase and auxiliary enzymes, *J. Biotechnol.*, 135: 281–290.

Sun X., Dong S., Wang E., 2004, One-step synthesis and characterization of polyelectrolyte-protected gold nanoparticles through a thermal process, *Polymer*, 45: 2181-2184.

Sun X., Jiang X., Dong S., Wang E., 2003, One-step synthesis and size control of dendrimer-protected gold nanoparticles: a heat-treatment-based strategy, *Macromol. Rapid Commun.*, 24: 1024-1028.

Supronowicz, P. R., Ajayan, P. M., Ullmann, K. R., Arulanandam, B. P., Metzger, D. W., Bizios R., 2002, Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblaststo alternating current stimulation, *J. Biomed. Mater. Res.*, 59: 499-506.

Svitel, J. and Sturdik, E., 1994, D-Galactose transformation to D-galactonic acid by *Gluconobacter oxydans, J. Biotechnol.*, 37: 85-88.

Svitel, J. and Sturdik, E., 1995, n-Propanol conversion to propionic acid by *Gluconobacter oxydans, Enz. Microb. Technol*., 17: 546-550.

Svitel, J., Curilla, O. and Tkac, J., 1998, Microbial cell-based biosensor for sensing glucose, sucrose or lactose, *Biotech. Appl. Biochem.*, 27: 153–158.

Svitel, J., Tkac, J., Vostiar, I., Navratil, M., Stefuca, V., Bucko, M., Gemeiner, P., 2006, *Gluconobacter* in biosensors: applications of whole cells and enzymes isolated from gluconobacter and acetobacter to biosensor construction, *Biotechnol. Lett.*, 28: 2003–2010.

Takakura, Y. and Kuwata, S., 2003, Purification, characterization, and molecular cloning of a pyranose oxidase from the fruit body of the Basidiomycete, *Tricholoma matsutake*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67: 2598–2607.

Tang, D., Yuan, R., Chai, Y., Zhang, L., Zhong, X., Liu, Y., Dai, J., 2005, Preparation and application on a kind of immobilization method of anti-diphtheria for potentiometric immunosensor modified colloidal Au and polyvinyl butyral as matrixes, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 104: 199-206.

Tang H., Chen J.H., Nie L.H., Kuang Y.F., Yao S.Z., 2007, A label-free electrochemical immunoassay for carcinoembryonic antigen (CEA) based on gold nanoparticles (AuNPs) and nonconductive polymer film, *Biosens. Bioelectron.*, 22: 1061-1067.

Tansil, N. C. and Gao, Z., 2006, Nanoparticles in biomolecular detection, *Nanotoday*, 1: 28–37.

Tasca, F., Timur, S., Ludwig, R., Haltrich, D., Volc, J., Antiochia, R., 2007, Amperometric biosensors for detection of sugars based on the electrical wiring of different pyranose oxidases and pyranose dehydrogenases with osmium redox polymer on graphite electrodes, *Electroanal.*, 19: 294–302.

Teles, F. R. R. and Fonseca, L. P., 2008, Trends in DNA biosensors, *Talanta*, 77: 606–623.

Teranishi T., Kiyokawa I., Miyake M., 1998, Synthesis of monodisperse gold nanoparticles using linear polymers as protective agents, *Adv. Mater.*, 10: 596-599.

Tessema, M., Larsson, T., Buttler, T., Csiiregi, E., Ruzgas, T., Nordling, M., Lindquist, S. E., Petterssone, G., Gorton, L., 1997, Simultaneous amperometric determination of some mono-, di-, and oligosaccharides in flow injection and liquid chromatography using two working enzyme electrodes with different selectivity, *Anal. Chim. Acta*, 349: 179-188.

Thompson, B. C., Moulton, S. E., Gilmore, K. J., Higgins, M. J., Whitten, P. G., Wallace, G. G., 2009, Carbon nanotube biogels, *Carbon*, 47: 1282-1291.

Timur, S., Pazarlıoğlu, N., Pilloton, R., Telefoncu, A., 2003, Detection of phenolic compounds by thick film sensors based on *Pseudomonas putida*, *Talanta*, 61: 87-93.

Timur, S., Della Seta, L., Pazarlıoğlu, N., Pilloton, R., Telefoncu, A. 2004, Screen printed graphite biosensors based on bacterial cells, *Process Biochem.,* 39: 1325-1329.

Timur, S., Haghighi, B., Tkac, J., Pazarlıoğlu, N., Telefoncu, A., Gorton, L., 2006a, Electrical wiring of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* with osmium redox polymers, *Bioelectrochem.*, 71: 215–222.

Timur, S., Yigzaw, Y., Gorton, L., 2006b, Electrical wiring of pyranose oxidase with osmium redox polymers, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 113: 684–691.

Timur, S., Odaci, D., Dincer, A., Zihnioglu, F., Telefoncu, A., Gorton, L., 2007a, Sulfhydryl oxidase modified composite electrode for the detection of reduced thiolic compounds, *Sensor Actuators B-Chem.*, 125: 234–239.

Timur, S., Anik, U., Odaci, D., Gorton, L., 2007b, Development of a microbial biosensor based on carbon nanotube (CNT) modified electrodes, *Electrochem. Commun.*, 9: 1810–1815.

Timur, S., Odaci, D., Dinçer, A., Zihnioglu, F., Telefoncu, A., 2008, Biosensing approach for glutathione detection using glutathione reductase and sulfhydryl oxidase bienzymatic system, *Talanta*, 74: 1492–1497.

Tkac, J., Gemeiner, P., Sturdik, E., 1999, Rapid and sensitive galactose oxidase-peroxidase biosensor for galactose detection with prolonged stability, *Biotechnol. Tech.,* 13: 931–936.

Tkac, J., Gemeiner, P., Svitel, J., Benikovsky, T., Sturdik, E., Vala, V., Petrus, L., Hrabarova, E., 2000, Determination of total sugars in lignocellulose hydrolysate by a mediated *Gluconobacter oxydans* biosensor, *Anal. Chim. Acta*, 420: 1–7.

Tkac, J., Vostiar, I., Sturdik, E., Gemeiner, P., Mastihuba, V., Annus, J., 2001. Fructose biosensor based on D-fructose dehydrogenase immobilised on aferrocene-embedded cellulose acetate membrane, *Anal. Chim. Acta*, 439: 39–46.

Tkac, J., Vostiar, I., Gemeiner, P., Sturdik, E., 2002, Monitoring of ethanol during fermentation using a microbial biosensor with enhanced selectivity, *Bioelectrochem.*, 56: 127–129.

Tkac, J., Vostiar, I., Gorton, L., Gemeiner, P., Sturdik, E., 2003, Improved selectivity of microbial biosensor using membrane coating. Application to the analysis of ethanol during fermentation, *Biosens. Bioelectron.*, 18: 1125–1134.

Tkac, J., Stefuca, V., Gemenier, P., 2005, Biosensors with immobilised microbial cells using amperometric and thermal detection principles, In: Applications of Cell Immobilisation Biotechnology, V. Nedoviç, R. Willaert (Eds.), Springer, New York, USA.

Tkac, J. and Ruzgas, T., 2006, Dispersion of single walled carbon nanotubes. Comparison of different dispersing strategies for preparation of modified electrodes toward hydrogen peroxide detection, *Electrochem. Commun.*, 8: 899-903.

Tkac, J., Whittaker, J. W., Ruzgas, T., 2007, The use of single walled carbon nanotubes dispersed in a chitosan matrix for preparation of a galactose biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, 22: 1820–1824.

Tkac, J., Svitel, J., Vostiar, I., Navratil, M., Gemeiner, P., 2009, Membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter* sp.: Interfacial electrochemistry and direct bioelectrocatalysis, *Bioelectrochem.*, 76: 53-62.

Trogl, J., Ripp, S., Kuncova, G., Sayler, G. S., Churava, A., Parik, P., Demnerova, K., Halova, J., Kubicova, L., 2005, Selectivity of whole cell optical biosensor with immobilized bioreporter *Pseudomonas fluorescens* HK44, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 107: 98–103.

Trojanowicz, M., 2006, Analytical applications of carbon nanotubes: a review, *TRAC Trend Anal. Chem.*, 25: 480-489.

Trojanowicz, M., Szewczynska, M., 2005, Biosensing in high-performance chemical separations, *TRAC Trend Anal. Chem.*, 24: 92-106.

Tsai, Y., Li, S. C., Liao ,S. W., 2006, Electrodeposition of polypyrrole–multiwalled carbon nanotube–glucose oxidase nanobiocomposite film for the detection of glucose, *Biosens. Bioelectron.*, 22: 495-500.

Tuncagil, S., Odaci, D., Varis, S., Timur, S., Toppare, L., 2009a, Electrochemical polymerization of 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1-H-pyrrole as a novel immobilization platform for microbial sensing, *Bioelectrochem.,* 76: 169–174.

Tuncagil, S., Odaci, D., Yildiz, E., Timur, S., Toppare L., 2009b, Design of a microbial sensor using conducting polymer of 4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrole-1-l)benzenamine, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 137: 42-47.

Upadhyayula, V. K. K., Deng, S., Mitchell, M. C., Smith, G. B., Nair, V. K., Ghoshroy, S., 2008, Adsorption kinetics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on single-walled carbon nanotube aggregates, *Water Sci. Technol.*, 58: 179-184.

Valach, M., Katrlik, J., Sturdik, E., Gemeiner, P., 2009, *Gluconobacte*r biosensor designed for flow injection analysis Application in ethanol fermentation off-line monitoring, *Sensor Actuat. B- Chem.*, 138: 581-586.

Van Griethuysen, E., Flaschel, E., Renken, A., 1985, The influence of the ion content of whey on the pH-activity profile of the β-galactosidase from *Aspergillus oryzae, J. Chem. Technol. Biot.*, 35: 129-138.

Van Hove, M. A., 2006, From surface science to nanotechnology, *Catal. Today*, 113: 133-140.

Velasco-Garcia, M. N., Mottram, T., 2003, Biosensor technology addresing agriculturel problems, *Biosyst. Eng.*, 84: 1-12.

Vianello, F., Stefani, A., Di Paolo, M. L., Rigo, A., Lui, A., Margesin, B., Zen, M., Scarpa, M. and Soncini, G., 1996, Potentiometric detection of formaldehyde in air by an aldehyde dehydrogenase FET, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 37: 49-54.

Volc, J., Leitner, C., Sedmera, P., Halada, P., Haltrich, D., 1999, Enzymatic formation of dicarbonyl sugars: C-2 oxidation of 1→6 disaccarides gentibiose, isomaltose, and mellibiose by pyranose 2-oxidase from Trametes multicolor, *J. Carbohydr. Chem.* 18: 999–1007.

Volc, J., Denisova, N. P, Nerud, F., Musilek, V., 1985, Glucose-2-oxidase activity in mycelial cultures of basidiomyctes. *Folia Microbiol.*, 30: 141-147.

Vostiar, I., Ferapontova, E. E., Gorton, L., 2004, Electrical‘‘wiring’’of viable *Gluconobacter oxydans* cells with a flexible osmium-redox polyelectrolyte, *Electrochem. Commun.*, 6: 621–626.

Wan, D. C., Fu Q., Huang J. L., 2006, Synthesis of amphiphilic hyperbranched polyglycerol polymers and their application as template for size control of gold nanoparticles, *J. Appl. Polym. Sci.*, 101: 509-514.

Wang, J., 2005a, Carbon nanotube based electrochemical biosensors: A Review, *Electroanal.*, 17: 7–14.

Wang, J., 2005b, Nanomaterials-based electrochemical biosensors, *Analyst*, 130: 421–426.

Wang, J., Liu, G., Jan, M., 2004a, Ultrasensitive electrical biosensing of proteins and DNA: carbon-nanotube derived amplification of the recognition and transduction events, *J. Am. Chem. Soc*., 126: 3010-3011.

Wang, M., Wang, L., Wang G., Ji, X., Bai, Y., Li, T., Gong, S., Li, J., 2004b, Application of impedance spectroscopy for monitoring colloid Au-enhanced antibody immobilization and antibody-antigen reactions, *Biosens. Bioelectron*., 19: 575-582.

Wang, C., Guo, Z. X., Fu, S., Wu, W., Zhu, D., 2004c, Polymers containing fullerene or carbon nanotube structures, *Prog. Polym. Sci.*, 29: 1079–1141.

Wang, S. G., Zhang, Q., Wang, R., Yona S. F., 2003a, A novel multi-walled carbon nanotube-based biosensor for glucose detection, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 311: 572–576.

Wang, J., Musameh, M., Lin, Y., 2003b, Solubilization of carbon nanotubes by nafion toward the preparation of amperometric biosensors, *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 2408–2409.

Wang, S. G., Zhang, Q., Wang, R., Yoon, S. F, 2003c, A novel multi-walled carbon nanotube-based biosensor for glucose detection, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 311: 572-576.

Wang, W. K. and Cao, L. M., 2001, Transformation of carbon nanotubes to diamond at high pressure and high temperature. *Russ. Phys. J.*, 44: 178–82.

Wang, S., Xie, F., Liu, G., 2009, Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme proteins on SWCNTs-CTAB modified electrodes, *Talanta*, 77: 1343-1350.

Warsinke, A., Benkert, A., Scheller, F. W., 2000, Electrochemical immunoassays, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366: 622–634.

Wei, Y. and Ding, M. Y., 2000, Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection, *J. Chromatogr. A*, 904: 113–117.

Willner, I., Willner B., Katz E., 2007, Biomolecule-nanoparticle hybrid system for bioelectronic applications, *Bioelectrochem.*, 70: 2-11.

Wilson, I. D., 2003, Handbook of analytical separations, Elsevier, New York, 22p.

Wu, X. Y., et al., 2003, Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots, *Nat. Biotechnol.*, 21: 41-46.

Xu, L., Zhu, Y., Tang, L., Yang, X., Li, C., 2007, Biosensor based on self-assembling glucose oxidase and dendrimer-encapsulated Pt nanoparticles on carbon nanotubes for glucose detection, *Electroanal.*, 19: 717–722.

Yamamoto, K., Nakayama, A., Yamamoto, Y., Tabata, S., 2004, Val216 decides the substrate specificity of α-glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.*, 271: 3414–3420.

Yan, F., Chen, J., Ju, H., 2007, Immobilization and electrochemical behavior of gold nanoparticles modified leukemia K562 cells and application in drug sensitivity test, *Electrochem. Commun.*, 9: 293-298.

Yang, J., Yang, T., Feng, Y., Jiao, K., 2007, A DNA electrochemical sensor based on nanogold-modified poly-2,6-pyridinedicarboxylic acid film and detection of PAT gene fragment, *Anal. Biochem.*, 365: 24-30.

Yang, M., Yang, Y., Liu, Y., Shen, G., Yu, R., 2006, Platinum nanoparticles-doped sol–gel/carbon nanotubes composite electrochemical sensors and biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, 21: 1125–1131.

Yao, Z., Kane, C. L., Dekker, C., 2000, High-field electrical transport in single-wall carbon nanotubes, *Phys. Rev. Lett.*, 84: 2941-2944.

Yao, D. S., Cao, H., Wen, S., Liu, D. L., Bai, Y., Zheng, W. J., 2006, A novel biosensor for sterigmatocystin constructed by multi-walled carbon nanotubes (MWNT) modified with aflatoxin–detoxifizyme (ADTZ), *Bioelectrochem.*, 68: 126-133.

Yao, Y. and Shiu, K. K., 2007, Electron transfer properties of different carbon nanotube materials and their use in glucose biosensors, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387: 303–309.

Yao Y. L. , Zhang, D., Xia, X. H., 2004, Study on deposition mechanism of Pt nanoparticles on carbon nanotube, *Chin. J. Inorg. Chem.*, 20: 531-535.

Yeni, F. ve Timur S, 2008, *Pseudomonas fluorescens* hücrelerini temel alan I.ve II. nesil biyosensörlerin geliştirilmesi ve karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Yeni, F., Odaci, D., Timur, S., 2008, Use of eggshell membrane as an immobilization platform in microbial sensing, *Anal. Lett.*, 41: 2743–2758.

Zhang, M., Smith, A., Gorski, W., 2004, Carbon nanotube-chitosan system for electrochemical sensing based on dehydrogenase enzymes, *Anal. Chem.*, **76**: 5045-5050.

Zhang, T., Tian, B., Kong, J., Yang, P., Liu, B., 2003, A sensitive mediator-free tyrosinase biosensor based on an inorganic–organic hybrid titania sol–gel matrix, *Anal. Chim. Acta*, 489: 199-206.

Zhao, H. and Ju H., 2006, Multilayer membranes for glucose biosensing via layer-by-layer assembly of multiwall carbon nanotubes and glucose oxidase, *Anal. Biochem.*, 350: 138-144.

Zheng, P. W., Jiang, X. W., Zhang, X., Zhang, W.Q., Shi, L. Q., 2006, Formation of gold@polymer core–shell particles and gold particle clusters on a template of thermoresponsive and pH-responsive coordination triblock copolymer, *Langmuir*, 22: 9393-9396.

Zhu, L., Li, Y., Zhu, G., 2004, A novel renewable plant tissue-based electrochemiluminescent biosensor for glycolic acid, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 98: 115–121.

Zhuo, Y., Yuan, R., Chai, Y., Tang, D., Zhang, Y., Wang, N., Li, W., Zhu, Q., 2005, A reagentless amperometric immunosensor based on gold

nanoparticles/thionine/nafion-membrane-modified gold electrode for determination of α-1-fetoprotein, *Electrochem. Commun.,* 7: 355-360.

Zylstra, G. J. and Gibson, D. T., 1989, Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the todC1C2BADE genes and their expression in *Escherichia coli, J. Biol. Chem.,* 264: 14940-14946.

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı **:** Dilek ODACI

Doğum tarihi, yeri :28.07.1980- İzmir

Medeni hali **:**Bekâr

Uyruğu **:**T.C

Adres **:**Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü

35100 Bornova/İZMİR

Tel **:**0 232 3438624

E-mail **:**dilek.odaci@ege.edu.tr

Eğitim Durumu:

OKUL	DERECE	YIL
İzmir Kız Lisesi, İzmir	Lise	1994-1997
Ege Üniversitesi, İzmir	Yabancı Dil Eğitimi	1997-1998
Ege Üniversitesi, İzmir	Lisans (Biyokimya)	1998-2002
Ege Üniversitesi, İzmir	Yüksek Lisans (Biyokimya)	2002-2004
Ege Üniversitesi, İzmir	Doktora (Biyokimya)	2004-Devam Ediyor

İş Durumu:

GÖREV YERİ	GÖREV	YIL
Ege Üniversitesi, İzmir	Araş. Gör.	2004-Devam Ediyor

Kazanılan Burslar:

12/08/2008-10/09/2008 (30 gün), TÜBİTAK projesi destekli (108T293), Leibniz Üniversitesi Hannover/ALMANYA.

14/06/2008-02/07/2008 (19 gün), University of Applied Sciences Jena/ALMANYA.

03/10/2007-06/10/2007 (6 gün), TÜBİTAK Yurtdışı bilimsel etkinliklere katılma desteği, Birla Institute of Technology and Science (BITS)-Pilani, Goa/HİNDİSTAN.

Ocak 2006-Ocak 2007 (12 ay), TÜBİTAK Projesi, Proje No:104T453 (Projede burslu öğrenci).

14/02/2005-16/04/2005 (62 gün), ENEA Araştırma Merkezi, Roma/İTALYA.

Kazanılan Ödüller:

Poster Ödülü, The 7th Workshop on Biosensors and Bioanalytical μ-Techniques in Environmental and Clinical Analysis (10–14 Eylül 2006, Kuşadası-Aydın/TÜRKİYE)

Bilimsel Makaleler:

1. E. Ilker MEDINE, **Dilek ODACI,** Bahadir N. GACAL, Burcin GACAL, Serhan SAKARYA, Perihan UNAK, Suna TIMUR, Yusuf YAGCI, A New Approach for *in vitro* Imaging of Breast Cancer Cells by Anti-Metadherin Targeted PVA-Pyrene, Macromolecular Bioscience, Kabul edildi.

2. **Dilek ODACI**, Azmi TELEFONCU, Suna TİMUR, Maltose biosensing based on co-immobilization of α-glucosidase and pyranose oxidase, Bioelectrochemistry, Kabul edildi.

3. Mehriban AKIN, Merve YUKSEL, Caner GEYIK, **Dilek ODACI,** Arne BLUMA, Tim HÖPFNER, Sascha BEUTEL, Thomas SCHEPER, Suna TIMUR, Alcohol Biosensing by Polyamidoamine

(PAMAM)/Cysteamine/Alcohol Oxidase Modified Gold Electrode, Biotechnology Progress, Kabul edildi.

4. Caglar OZDEMIR, Fatma YENI, **Dilek ODACI,** Suna TIMUR, Electrochemical Glucose Biosensing by Pyranose Oxidase Immobilized in Gold nanoparticle-Polyaniline/AgCl/Gelatin Nanocomposite matrix, Food Chemistry, 119 (2010) 380–385.

5. **Dilek ODACI,** Bahadir N. GACAL, Burcin GACAL, Suna TİMUR, Yusuf YAGCİ, Fluorescence Sensing of Glucose Using Glucose Oxidase Modified by PVA-Pyrene Prepared via "Click" Chemistry, Biomacromolecules, 10 (2009) 2928–2934.

6. Mustafa UYGUN, Muhammet U. KAHVECİ, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Yusuf YAGCI, *In Situ* Synthesis of Acrylamide Hydrogels Containing Silver Nanoparticles by Photoinduced Processes and Their Antibacterial Properties, Macromolecular Chemistry and Physics, 210 (2009) 1867–1875.

7. Sevinc TUNCAGIL, **Dilek ODACI,** Serhat VARIS, Suna TIMUR, Levent TOPPARE, Elektrochemical polymerization of 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1 *H*-pyrrole as a novel immobilization platform for microbial sensing, Bioelectrochemistry, 76 (2009) 169-174.

8. **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, A microbial biosensor based on bacterial cells immobilized on chitosan matrix. Bioelectrochemistry 75 (2009) 77–82.

9. **Dilek ODACI,** Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK, Suna TİMUR, Nurdan PAZARLIOĞLU, Erhan DİNÇKAYA, Azmi TELEFONCU, Roberto PİLLOTON, *Pseudomonas putida* Based Amperometric Biosensors for 2,4-D Detection. Preparative Biochemistry and Biotechnology 39 (2009) 11–19.

10. Sevinc TUNCAGIL, **Dilek ODACI,** Ersin YILDIZ, Suna TIMUR, Levent TOPPARE, Design of a microbial sensor using conducting polymer of 4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrole-1-l) benzenamine. Sensors And Actuators B 137 (2009) 42–47.

11. Fatma YENI, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Use of eggshell membrane as an immobilization platform in microbial biosensing, *Analytical Letters* 41 (2008) 2743–2758.

12. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, Bacterial Sensors Based on Chitosan Matrices, *Sensors And Actuators B: Chemical* 134 (2008) 89-94**.**

13. Dilek ODACI, Azmi TELEFONCU, Suna TİMUR, Pyranose Oxidase Biosensor based on carbon nanotube (CNT) modified carbon paste electrodes, *Sensors And Actuators B: Chemical* 132 (1) (2008) 159-165.

14. Idris YAZGAN, Tuba AYDIN, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Use of pyranose oxidase enzyme in inhibitor biosensing, *Analytical Letters* 41 (2008) 2088-2096.

15. Dilek ODACI, Senem KIRALP KAYAHAN, Suna TIMUR, Levent TOPPARE, Use of a Thiophene-based Conducting Polymer in Microbial Biosensing, *Electrochimica Acta* 53 (2008) 4104-4108.

16. Suna TİMUR, **Dilek ODACI,** Ayse DİNCER, Figen ZİHNİOĞLU, Azmi TELEFONCU, Biosensing approach for glutathione detection using glutathione reductase and sulfhydryl oxidase bienzymatic system, *Talanta* 74 (2008) 1492-1497.

17. Sadık TEKSOY, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, A new bienzymatic biosensor based on butyrylcholine esterase-sulfhydryl oxidase enzymes, *Analytical Letters* 40 (2007) 2840–2850.

18. Suna TIMUR, **Dilek ODACI**, Ayse DINCER, Figen ZIHNIOGLU, Azmi TELEFONCU, Lo GORTON, Sulfhydryl oxidase modified composite electrode for the detection of reduced thiolic compounds, *Sensors And Actuators B: Chemical* 125 (2007) 234-239.

19. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Nurdan PAZARLIOGLU, Maria Rita MONTEREALI, Walter VASTARELLA, Roberto PILLOTON, Azmi TELEFONCU, Determination Of Phenolic Acids Using *Trametes versicolor* Laccase, *Talanta* 71 (2007) 312-317.

20. Suna TIMUR, Ülkü ANIK KIRGÖZ, **Dilek ODACI**, Lo GORTON, Development of a Microbial Biosensor Based on Carbon Nanotube (CNT) Modified Electrodes, *Electrochemistry Communications* 9 (2007) 1810-1815.

21. Ülkü ANIK KIRGOZ, Suna TIMUR, **Dilek ODACI,** Briza PÉREZ, Salvador ALEGRET, Arben MERKOÇI, Carbon nanotube composite as novel platform for microbial biosensor, *Electroanalysis* 19 (2007) 893-898.

22. Dilek ODACI, Suna TIMUR, Nurdan PAZARLIOGLU, Ülkü ANIK KIRGOZ, Azmi TELEFONCU, The Effect Of Mediators On Laccase Biosensor Response In Paracetamol Detection, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 45 (2006) 23-28.

23. Ülkü ANIK KIRGÖZ, **Dilek ODACI**, Suna TIMUR, Arben MERKOCİ, Salvador ALEGRET, Nurgün BESUN, Azmi TELEFONCU, A Biosensor Based On Graphite Epoxy Composite Electrode For Aspartame And Ethanol Detection, *Analytica Chimica Acta* 570 (2006) 165-169.

24. Ülkü Anık KIRGOZ, **Dilek ODACI**, Suna TİMUR, Arben MERKOCİ, Nurdan PAZARLIOGLU, Azmi TELEFONCU, Salvador ALEGRET, Graphite epoxy composite electrodes based on bacterial cells, *Bioelectrochemistry* 69 (2006) 128-131.

25. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, Carboxyl Esterase-Alcohol Oxidase based biosensor for aspartame determination, *Food Chemistry* 84 (2004) 493-496.

26. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, Immobilized Jerusalem artichoke *(Helianthus tuberosus)* tissue electrode for phenol detection, *Artificial Cells, Blood Substitues And Immobilization Biotechnology* 32 (2) (2004) 315-323.

Uluslararası Kongreler:

1. Dilek ODACI, Nimet YILDIRIM, Suna TİMUR, 6-(Ferrocenyl)hexanethiol/gold nanoparticle based surfaces in glucose biosensing,

8th International Electrochemistry Meeting in Turkey, 8-11 October 2009, Antalya/TURKIYE (SÖZLÜ SUNUM).

2. Fulya EKİZ, Caner GEYİK, Sevinç TUNÇAĞIL, Merve YÜKSEL, Çaglar ÖZDEMİR, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Levent TOPPARE, Amperometric glucose biosensing via pyranose oxidase biosensor modified with conducting polymer of 4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrole-1-l) benzenamine, 8th International Electrochemistry Meeting in Turkey, 8-11 October 2009, Antalya/TURKIYE.

3. Sevinç TUNÇAĞIL, Çağlar ÖZDEMİR, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Levent TOPPARE, Gold nanoparticle effect on a novel conducting polymer based amperometric glucose biosensor, 8th International Electrochemistry Meeting in Turkey, 8-11 October 2009, Antalya/TURKIYE.

4. Dilek ODACI, Bahadir N. GACAL, Burcin GACAL, Suna TİMUR, Yusuf YAGCI, Fluorescence sensing of glucose using glucose oxidase modified by PVA-pyrene prepared via 'Click Chemistry', 8th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering APME'09, 4-7 October, 2009, Dresden/GERMANY.

5. Mustafa UYGUN, Muhammet U. KAHVECİ, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Yusuf YAGCI, In situ synthesis of acrylamide hydrogels containing silver nanoparticles by photoinduced processes and their antibacterial properties, 8th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering APME'09, 4-7 October, 2009, Dresden/GERMANY.

6. Sevinc TUNCAGIL, Caglar OZDEMİR, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Levent TOPPARE, Gold nanoparticle effect on conducting poly(4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1h-pyrrol-1-yl)benzenamine) biosensor, 8th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering APME'09, 4-7 October, 2009, Dresden/GERMANY.

7. Dilek ODACI, Kay DORNBUCSH, Karl-Heinz FELLER, Suna TIMUR, Use of micro-structured devices in enzyme activity screening and glucose detection, International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends (BIOTECH METU 2009), 27-30 September 2009, Ankara/TURKIYE.

8. Sevinc TUNCAGIL, **Dilek ODACI,** Serhat VARIS, Suna TIMUR, Levent TOPPARE, A Novel Immobilization Platform For Microbial Biosensing, International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends (BIOTECH METU 2009), 27-30 September 2009, Ankara/TURKIYE.

9. Dilek ODACI, Nimet YILDIRIM, Suna TİMUR, Use of 6-(Ferrocenyl)Hexaneyhiol and gold nanoparticles in mediated glucose biosensing, International Conference on Nanomaterials and Nanosystems (Nanomats2009), 10-13 August 2009, Istanbul/TURKIYE (SÖZLÜ SUNUM).

10. Mehriban AKIN, Merve YÜKSEL, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Modified gold arrays by dendrimeric stryctures for multilex biosensing of glucose and ethanol, Conference on Nanomaterials and Nanosystems (Nanomats2009), 10-13 August 2009, Istanbul/TURKIYE.

11. Murat KARADAG, Sinem SUNGUR, Caner GEYİK, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Effects of gold nanoparticles on the response of 6-ferrocenyl- 1-hexanethiol mediated and polyamidoamine modified glucose oxidase biosensor, Conference on Nanomaterials and Nanosystems (Nanomats2009), 10-13 August 2009, Istanbul/TURKIYE.

12. Çağlar ÖZDEMİR, Fatma YENİ, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Electrochemical glucose biosensing by pyranose oxidase immobilized in Au-Nanoparticle/AgCl@Polyaniline-gelatin hybrid material, International Enzyme Engineering Symposium IEES'08, 1-5 October 2008, Kuşadası-Aydın/TURKIYE.

13. Fatma YENI, **Dilek ODACI,** Suna TIMUR, L-Amino acid oxidase biosensor based on PAMAM Dendrimer/Cysteamine modified gold electrode, International Enzyme Engineering Symposium IEES'08, 1-5 October 2008, Kuşadası-Aydın/TURKIYE.

14. Dilek ODACI, Çağlar ÖZDEMİR, Fatma YENİ, Suna TIMUR, Glucose biosensing by pyranose oxidase biosensor modified with nanoparticles, International Enzyme Engineering Symposium IEES'08, 1-5 October 2008, Kuşadası-Aydın/TURKIYE.

15. Dilek ODACI, Ayşe DİNÇER, Suna TİMUR, Figen ZİHNİOĞLU, Use of lipoxygenase biosensor as an electrochemical biodetector for caffeic acid,

International Enzyme Engineering Symposium IEES'08, 1-5 October 2008, Kuşadası-Aydın/TURKIYE.

16. Alper AKKAYA, **Dilek ODACI**, Çiğdem UÇAR, Emre ERDEN, Nurdan PAZARLIOĞLU, Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, Pyranose oxidase (P2O) produced from agricultural residues by T. versicolor and use in biosensing systems. International Enzyme Engineering Symposium IEES'08, 1-5 October 2008, Kuşadası-Aydın/TURKIYE.

17. Gizem YILMAZ, Ömer HABİB, **Dilek ODACI,** Roberto PİLLOTON, Suna TİMUR, Screen printed biosensors based on pyranose oxidase entrapped in sol-gel/chitosan gold nanocomposite matrix for glucose monitoring, 14th Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED 2008), 3-7 May 2008, Muğla/TURKIYE.

18. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, The Use Of Chitosan Matrix For The Preparation Of Microbial Sensors, The 8th Workshop on Biosensors and Bioanalytical μ-Techniques in Environmental and Clinical Analysis, 3-6 October 2007, Goa/INDIAN (SÖZLÜ SUNUM).

19. Suna TİMUR, **Dilek ODACI**, Ayşe DİNÇER, Figen ZİHNİOĞLU, Azmi TELEFONCU, Lo GORTON: Sulfhydryl Oxidase Modified Composite Electrode For The Detection Of Thiolic Compounds, The 8th Workshop on Biosensors and Bioanalytical μ-Techniques in Environmental and Clinical Analysis, 3-6 October 2007, Goa/INDIAN (SÖZLÜ SUNUM).

20. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, Enzyme sensors based on carbon nanotube modified electrodes for glucose and cellobiose analysis, NanoTR III (Nanoscience Nanotechnology Nanobiotechnology Nanomedicine Conference), 11-14 June 2007, Ankara/TURKIYE (SÖZLÜ SUNUM).

21. Dilek ODACI, Ülkü ANIK, Suna TİMUR, A mediator-type nanocomposite biosensor based on bacterial cells, Nanostructured Materials In Electrochemistry: Biosciences And Molecular Electronics Applications, 1-4 May 2007, Dublin/IRLAND.

22. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Figen ZİHNİOĞLU, Azmi TELEFONCU, Lo GORTON, Sulfhydryl Oxidase Biosensor: Optimization And Characterization, The 7th Workshop on Biosensors and Bioanalytical μ-Techniques in Environmental and Clinical Analysis, 10-14 September 2006, Kuşadası-Aydın/TURKIYE.

23. Sadık TEKSOY, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, A New Bienzymatic Biosensor Based On Cholinesterase-Sulfhydryl Oxidase Enzymes, The 7th Workshop on Biosensors and Bioanalytical μ-Techniques in Environmental and Clinical Analysis, 10-14 September 2006, Kuşadası-Aydın/TURKIYE.

24. Ayşe DİNÇER, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Figen ZİHNİOĞLU, Azmi TELEFONCU, Lo GORTON**,** Application Of Sulphydryl Oxidase Biosensor As An Electrochemical Detector For Thiolic Compounds, The 7th Workshop on Biosensors and Bioanalytical μ-Techniques in Environmental and Clinical Analysis, 10-14 September 2006, Kuşadası-Aydın/TURKIYE.

25. Ebru KOCADAĞ KOCAZORBAZ, Sevil ZENCİR, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, Lipoxygenase Based Biosensor For Caffeic Acid Determination, The 7th Workshop on Biosensors and Bioanalytical μ-Techniques in Environmental and Clinical Analysis, 10-14 September 2006, Kuşadası-Aydın/TURKIYE.

26. Alper AKKAYA, **Dilek ODACI,** Nurdan PAZARLIOĞLU, Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, Fungal Pyranose Oxidase (P2O): Application In Biosensing Systems, The 7th Workshop on Biosensors and Bioanalytical μ-Techniques in Environmental and Clinical Analysis, 10-14 September 2006, Kuşadası-Aydın/TURKIYE.

27. Meliha ÇUBUKÇU, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Ülkü ANIK KIRGÖZ, Preparation of carbon nanotube (CNT) based xanthine biosensor, The 7th Workshop on Biosensors and Bioanalytical μ-Techniques in Environmental and Clinical Analysis, 10-14 September 2006, Kuşadası-Aydın/TURKIYE.

28. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, Pyranose oxidase biosensor based on carbon nanotube (CNT) modified electrodes,

NANOMAT 2006-International Workshop on Nanostructured Materials, 21-23 June 2006, Antalya/TURKIYE.

29. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Ülkü Anık KIRGÖZ, Arben MERKOÇİ, Salvador ALEGRET, Nurgün BEŞÜN, Azmi TELEFONCU, Carbon nanotube epoxy composite electrodes modified with bacterial cells, NANOMAT 2006-International Workshop on Nanostructured Materials, 21-23 June 2006, Antalya/TURKIYE.

30. Suna TİMUR, **Dilek ODACI**, Ülkü A. KIRGÖZ, Lo GORTON, Azmi TELEFONCU, Development of Microbial Biosensor Based on Carbon Nanotube (CNT) Modified Electrode. ESEAC 2006-11th International conference on Electroanalysis, 11-15 June 2006, Bordeaux/FRANCE.

31. Dilek ODACI, Ülkü ANIK KIRGÖZ, Suna TİMUR, Arben MERKOÇI, Salvador ALEGRET, Nurgün BEŞÜN, Azmi TELEFONCU, A Biosensor Based On Graphite Epoxy Composite Electrode (GECE) For Aspartame And Ethanol Detection. ESEAC 2006-11th International conference on Electroanalysis, 11-15 June 2006, Bordeaux/FRANCE.

32. Suna TİMUR, Ülkü Anık KIRGÖZ, **Dilek ODACI**, Nurdan PAZARLIOĞLU, Azmi TELEFONCU, Development of Microbial Biosensor Based on Carbon Nanotube (CNT) Modified Electrodes, NANOTR II Nanotechnology And Nanoscience, 3-5 May 2006, Ankara/TURKIYE.

33. Lo GORTON, Suna TİMUR, **Dilek ODACI**, Nurdan PAZARLIOĞLU, Azmi TELEFONCU, A microbial sensor based on *Pseudomonas putida* wired with an osmium-redox polymer, 56th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Electrochemistry for the next generation, 25-30 September 2005, Busan/KOREA.

34. Suna TİMUR, **Dilek ODACI**, Nurdan PAZARLIOĞLU, Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK, Roberto PILLOTON, Erhan DİNÇKAYA, Azmi TELEFONCU, A biosensor based on *Trametes versicolor* laccase for xenobiotic detection, BIOELECTROCHEMISTRY-2005 (XVIII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics), 19-24 June 2005, Coimbra/PORTUGAL.

35. Suna TİMUR, **Dilek ODACI**, Nurdan PAZARLIOĞLU, Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK, Roberto PILLOTON, Erhan DİNÇKAYA, Azmi TELEFONCU, Screen printed microbial biosensor for 2,4-D detection, BIOELECTROCHEMISTRY-2005 (XVIII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics), 19-24 June 2005, Coimbra/PORTUGAL.

36. Ülkü Anık KIRGÖZ, **Dilek ODACI**, Suna TİMUR, Arben MERKOÇİ, Nurdan PAZARLIOĞLU, Azmi TELEFONCU, Salvador ALEGRET, Graphite epoxy composite electrodes based on bacterial cells, BIOELECTROCHEMISTRY-2005 (XVIII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics), 19-24 June 2005, Coimbra/PORTUGAL.

37. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, Tissue based biosensor for pyrogallol detection, BIOMED 2004 11th International Biomedical Science and Technology Days-Biosensor Symposium, 24-25 June 2004, Ankara/TURKIYE.

38. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Nurdan PAZARLIOĞLU, Azmi TELEFONCU Biosensor development for ferulic acid detection, BIOMED 2004 11th International Biomedical Science and Technology Days-Biosensor Symposium, 24-25 June 2004, Ankara/TURKIYE.

39. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, Biosensor for aspartame determination, 13th Balkan Biochemical and Biophysical Days & Meeting on Metabolic Disorders, 12-15 October 2003, Kuşadası-Aydın/TURKIYE.

40. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, Biosensor based on *Helianthus tuberosus* tissue for phenol detection, 13th Balkan Biochemical and Biophysical Days & Meeting on Metabolic Disorders, 12-15 October 2003, Kuşadası- Aydın/TURKIYE.

41. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK, Erol AKYILMAZ, Erhan DİNÇKAYA, Azmi TELEFONCU, Amperometric biosensor for hypoxanthine detection, 13th Balkan Biochemical and Biophysical Days & Meeting on Metabolic Disorders, 12-15 October 2003, Kuşadası-Aydın/TURKIYE.

Ulusal Kongreler:

1. **Dilek ODACI,** Azmi TELEFONCU, Suna TİMUR, Karbon nanotüpler ile modifiye edilmiş kitosan temelli mikrobiyal biyosensörlerin hazırlanması ve karakterizasyonu, 16-20 Haziran 2009, SİVAS (SÖZLÜ SUNUM).

2. Suna TİMUR, **Dilek ODACI,** Mikrosistem teknolojisinin, biyokatalitik aktivitenin belirlenmesi ve biyoanalizlerde kullanılabilirliklerine yönelik uygulamaları, 16-20 Haziran 2009, SİVAS (SÖZLÜ SUNUM).

3. Caner GEYİK, Mehriban AKIN, Merve YÜKSEL, Çağlar ÖZDEMİR, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Alkol oksidaz biyosensörünün hazırlanması ve akışa enjeksiyon analize (FIA) yönelik uygulamaları, 16-20 Haziran 2009, SİVAS (SÖZLÜ SUNUM).

4. Çağlar ÖZDEMİR, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Farklı nanomalzemeler ile glukoz biyosensörlerinin hazırlanması, 16-20 Haziran 2009, SİVAS (SÖZLÜ SUNUM).

5. Merve YÜKSEL, Mehriban AKIN, Caner GEYİK, Çağlar ÖZDEMİR, Dilek GELEN, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Poliamidoamin (PAMAM)/sisteamin modifiye altın elektrodu temel alan alkol oksidaz biyosensörü ve karakterizasyonu, 16-20 Haziran 2009, SİVAS.

6. Dilek GELEN, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Atomik güç mikroskobu (AFM) ile biyosensör uygulamalarına yönelik dendrimerik yapılar ve biyolojik moleküllerle modifiye altın yüzeylerin karakterizasyonu, 23. Ulusal Kimya Kongresi, 16-20 Haziran 2009, SİVAS.

7. Sinem SUNGUR, Murat KARADAĞ, Caner GEYİK, Çağlar ÖZDEMİR, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, 6-(ferrosenil)hegzantiyol ve PAMAM (Poliamidoamin) dendrimerleriyle modifiye ikinci nesil glukoz oksidaz (GOX) biyosensörü, 16-20 Haziran 2009, SİVAS.

8. Nimet YILDIRIM, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Elektrokimyasal Kuartz Kristal Mikrobalans (EQCM) sisteminin biyosensör uygulamalarında kullanımı, 16-20 Haziran 2009, SİVAS.

9. Nimet YILDIRIM, **Dilek ODACI**, Gülsiye ÖZTÜRK, Serap ALP, Yavuz ERGUN, Karl-Heinz FELLER, Kay DORNBUSCH, Suna TİMUR, Sol-gel tabanlı floresans glukoz array'lerinin hazırlanması ve uygulamaları, 14. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, - 20-24 Mayıs 2009, İZMİR (SÖZLÜ SUNUM).

10. Dilek ODACI, Çağlar ÖZDEMİR, Fatma YENİ, Suna TİMUR, Glukoz analizine yönelik piranoz oksidaz ve nanopartikül ile modifiye ince film sensörlerin geliştirilmesi, 13. Biyomedikal Mühendisliği Toplantısı (BIOMUT 2008), 29-31 Mayıs 2008, ANKARA (SÖZLÜ SUNUM).

11. Sevinç TUNÇAĞIL, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Levent TOPPARE, 4-(2,5-di(tiyofen-2-yl)-1H-pirol-1-l) benzenamin iletken polimerinin mikrobiyal sensör platformu olarak kullanımı, 13. Biyomedikal Mühendisliği Toplantısı (BIOMUT 2008), 29-31 Mayıs 2008, ANKARA (SÖZLÜ SUNUM).

12. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, Laktoz tayinine yönelik nanokompozit eletrotların hazırlanması, XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (Biyoteknoloji 2007), 28-31 Ekim 2007, ANTALYA (SÖZLÜ SUNUM).

13. Baran GÜLSÜNOĞLU, Çağlar ÖZDEMİR, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Selektif kafeik asit tayinine yönelik karbon nanotüpler (CNT) ile modifiye enzim elektrotlarının hazırlanması, XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (Biyoteknoloji 2007), 28-31 Ekim 2007, ANTALYA.

14. Çağlar ÖZDEMİR, Baran GÜLSÜNOĞLU, **Dilek ODACI,** Walter VASTARELLA, Roberto PILLOTON, Suna TİMUR, Karbohidrat analizine yönelik ince film biyosensörler, XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (Biyoteknoloji 2007), 28-31 Ekim 2007, ANTALYA.

15. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Ülkü ANIK, Medyatör temelli nanokompozit mikrobiyal biyosensörler, XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi (Biyoteknoloji 2007), 28-31 Ekim 2007, ANTALYA (SÖZLÜ SUNUM).

16. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, Maltoz tayinine yönelik karbon nanotüpler ile modifiye edilmiş bienzimatik biyosensör

sistemi, XXI. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos 2007, MALATYA (SÖZLÜ SUNUM).

17. Fatma YENİ, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Yumurta kabuğu membranında immobilize edilen *Pseudomonas fluorescens* hücrelerini temel alan bir mikrobiyal sensör geliştirilmesi, XXI. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos 2007, MALATYA.

18. İdris YAZGAN, Tuba AYDIN, **Dilek ODACI,** Suna TİMUR, Piranoz oksidaz enziminin etanol ve glutatiyon analizinde inhibitör temelli biyosensör olarak kullanımı, XXI. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos 2007, MALATYA.

19. Suna TİMUR, **Dilek ODACI,** Ayşe DİNÇER, Figen ZİHNİOĞLU, Azmi TELEFONCU, Lo GORTON, Sülfidril oksidaz biyosensörünün glutatiyon analizinde elektrokimyasal dedektör olarak kullanımının araştırılması, XXI. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos 2007, MALATYA.

20. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, Karbon nanotüp modifiye karbon pasta elektrodu temel alan piranoz oksidaz biyosensörü geliştirilmesi ve karakterizasyonu, III. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 5-7 Temmuz 2006, ÇANAKKALE.

21. Dilek ODACI, Yıldız Deniz ÜNAL, Suna TİMUR, Nurdan PAZARLIOĞLU, Azmi TELEFONCU, Fenolik asitlerin tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi, XIX. Ulusal Kimya Kongresi, 30 Eylül- 4 Ekim 2005, Kuşadası-AYDIN.

22. Dilek ODACI, Suna TİMUR, Azmi TELEFONCU, Kitosan-jelatin matriksi temel alan lipoksigenaz biyosensörü ile esansiyel yağ asitlerinin tayini, XVI. Ulusal Kimya Kongresi, 10-13 Eylül 2002, KONYA.

Kurslar ve Sempozyumlar:

1. Bilim ve Teknoloji İnsan Kaynakları Stratejisi Sekizinci Çalıştayı, TÜBİTAK Gebze Yerleşkesi-TÜSSİDE, 23-25 Kasım 2008, Gebze/KOCAELİ.

2. Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu, Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu (EBİLTET) 7 Mart 2008, İZMİR.

3. Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri Çalıştayı, İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü 25 Ağustos 2007, MALATYA.

4. Laboratuar Güvenliği Sempozyumu, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Eğitim Laboratuvarı (AREL) 18 Mayıs 2007, İZMİR.

5. Kanser Biyokimyası Sempozyumu, Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu (EBİLTET) 2 Mart 2007, İZMİR.

6. Temel Moleküler Biyolojik Yöntemler Kursu, Türk Biyokimya Derneği İzmir Şubesi 14-16 Şubat 2007, İZMİR.

Görev Alınan Projeler:

1. Suna TİMUR (Yürütücü), Azmi TELEFONCU, Erhan DİNÇKAYA, Erol AKYILMAZ, Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK, Bazı Gıda Ürünlerinin Tazelik Kontrolleri İçin Ksantin Oksidaz Temelli Biyosensörlerin Geliştirilmesi (Ege Üniv. Araştırma Fonu Projesi: 2002 FEN 005), 2005, Öğrenci.

2. Suna TİMUR (Yürütücü), Azmi TELEFONCU, Erhan DİNÇKAYA, Roberto PILLOTON, Nurdan PAZARLIOĞLU, Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK, Dilek ODACI, Amadeo MASCI, Screen Printed Microbial Sensors: Fenolik Bileşiklerin Biyodedeksiyonu (TÜBİTAK ve Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR-İtalya) Ortaklı Uluslararası Araştırma Projesi, TBAG-U/52 (102T136)), 2005, Araştırmacı.

3. Suna TİMUR (Yürütücü), Azmi TELEFONCU, Erhan DİNÇKAYA, Roberto PILLOTON, Nurdan PAZARLIOĞLU, Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK, Dilek ODACI, Amadeo MASCI, Screen Printed Mikrobiyal Sensörler: Fenolik Bileşiklerin Biyodedeksiyonu (EBİLTEM Projesi: 03 BİL 008), 2006, Araştırmacı.

4. Suna TİMUR (Yürütücü), Azmi TELEFONCU, Figen ZİHNİOĞLU, Lo GORTON, Roberto PİLLOTON, Dilek ODACI, Ayşe DİNÇER, Glutatiyon

Biyoalgılama Sistemlerinin Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve Oksidatif Stres Belirteci Olarak Kullanımları (TÜBİTAK Projesi: 104 T 453), 2007, Araştırmacı.

5. Suna TİMUR (Yürütücü), Azmi TELEFONCU, Figen ZİHNİOĞLU, Lo GORTON, Dilek ODACI, Glutatiyon Biyoalgılama Sistemlerinin Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve Oksidatif Stres Belirteci Olarak Kullanımları (EBİLTEM Projesi: 2007 BİL 010), 2007, Araştırmacı.

6. Azmi TELEFONCU (Yürütücü), Burcu OKUTUCU, Dilek ODACI, Leptin Reseptör Gen Polimorfizlerinin Tip II Diabet ile İlişkisi (Ege Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi: 2004 FEN 010), 2007, Araştırmacı.

7. Dilek ODACI, Suna TİMUR (Yürütücü), Azmi TELEFONCU, Karbohidrat analizine yönelik biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi, karakterizasyon ve uygulamaları (Ege Üniv. Araştırma Fonu Projesi: 2006 FEN 002, Doktora Tez projesi), Devam ediyor, Araştırmacı.

8. Suna TİMUR (Yürütücü), Azmi TELEFONCU, Nurdan PAZARLIOĞLU, Ülkü ANIK, Roberto PİLLOTON, Dilek ODACI, Meliha ÇUBUKÇU, Biyomikroelektronik sistemlerin hazırlanması ve uygulamaları TÜBİTAK ve İtalya Ortaklı Uluslararası Araştırma Projesi, TBAG-U/191 (106 T 755)), 2009, Araştırmacı.

10. Suna TİMUR (Yürütücü), Azmi TELEFONCU, Nurdan PAZARLIOĞLU, Ülkü ANIK, Roberto PILLOTON, Dilek ODACI, Meliha ÇUBUKÇU, Biyomikroelektronik sistemlerin hazırlanması ve uygulamaları, EBİLTEM Projesi: 2008 BİL 005, 2009, Araştırmacı.

11. Suna TİMUR (Yürütücü), Azmi TELEFONCU, Sascha BEUTEL, Thomas SCHEPER, Multitester-development for cell analysis (Çoklu analiz sistemlerinin geliştirilmesi ve hücre analizinde uygulanabilirliklerinin incelenmesi), TÜBİTAK ve Almanya Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover ortaklı araştırma projesi: 108 T 293, Devam ediyor, Öğrenci.

12. Dilek GELEN, Mehriban AKIN, Dilek ODACI, Suna TİMUR, Farklı Örneklerde Alkol Ve Karbohidratın Aynı Anda Analizine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi Ve Karakterizasyonu, TÜBİTAK 2209 ÜNİVERSİTE

ÖĞRENCİLERİ YURT İÇİ/YURT DIŞI ARAŞTIRMA PROJELERİ DESTEKLEME PROGRAMI, 2009, II. Danışman.

13. Baran GÜLSÜNOĞLU, Dilek ODACI, Suna TİMUR, Kafeik Asidin Selektif Tayinine Yönelik Nanopartikül Temelli Biyosensör Geliştirilmesi, TÜBİTAK 2209 ÜNİVERSİTE ÖĞRENCİLERİ YURT İÇİ/YURT DIŞI ARAŞTIRMA PROJELERİ DESTEKLEME PROGRAMI, 2008, II. Danışman.

14. Çağlar ÖZDEMİR, Dilek ODACI, Suna TİMUR, Karbohidrat Analizine Yönelik İnce Film Elektrotları Temel Alan Biyosensörlerin Hazırlanması Ve Karakterizasyonları, TÜBİTAK 2209 ÜNİVERSİTE ÖĞRENCİLERİ YURT İÇİ/YURT DIŞI ARAŞTIRMA PROJELERİ DESTEKLEME PROGRAMI, 2008, II. Danışman.

Düzenlenen Bilimsel Toplantılarda Alınan Görevler:

"XIX. Ulusal Kimya Kongresi" Kimya ve Biyokimya Kongresi, 30 Eylül- 4 Ekim 2005, Kuşadası-AYDIN (Organizasyon komitesi [Bildiri tasnifi ve program komitesi]).

"The 7th Workshop on Biosensors and Bioanalytical μ-Techniques in Environmental and Clinical Analysis", 10-14 Eylül 2006, Kuşadası-Aydın/TURKIYE (Organizasyon komitesi [Teknik Birim]).

"International Enzyme Engineering Symposium IEES'08", 1-5 Ekim 2008, Kuşadası-Aydın/TURKIYE (Organizasyon komitesi [Teknik Birim]).

Verilen seminerler:

Nanomateryaller ve biyoanalitik uygulamaları, Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Merkezi EBİLTET Topluluğu, 14 Aralık 2007.

Karbon nanotüp temelli glukoz biyosensörleri hazırlanması ve karakterizasyonları, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 6 Nisan 2007.

Nanokompozit materyaller ve uygulamaları, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 24 Mart 2006.

Karbohidrat analizine yönelik biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi, karakterizasyon ve uygulamaları, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 21 Aralık 2005.

Pirogallol tayinine yönelik doku biyosensörü hazırlanması ve karakterizasyonu, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 26 Aralık 2003.