



**FERROSEN TAKILI 4-AMİNOANTİPİREN İLE MODİFİYE EDİLMİŞ
YENİ BİR GLUKOZ BİYOSENSÖRÜ HAZIRLANMASI**

Aşkın ERBAŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Aşkın ERBAŞ

27/01/ 2023

FERROSEN TAKILI 4-AMİNOANTİPİREN İLE MODİFİYE EDİLMİŞ YENİ BİR GLUKOZ BİYOSENSÖRÜ HAZIRLANMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Aşkın ERBAŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2023

ÖZET

Bu çalışmada, glukoz tayini için N-ferroseniliden-4-aminoantipiren (4AA-Fc) ile modifiye edilmiş yeni bir enzim biyosensörü geliştirildi. Bu amaçla, 4AA-Fc ile modifiye edilmiş karbon pasta yüzeyine glukoz oksidaz enzimi çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edildi. Glukoz tayini, hazırlanan enzim elektrotun yüzeyinde gerçekleşen enzimatik tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksidin +0,4 V 'da yükseltgenmesi esasına dayanılarak yapıldı. Glukoz tayinine pH ve sıcaklığın etkisi araştırıldı ve optimum parametreler sırası ile 8 ve 60 °C olarak bulundu. $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M doğrusal çalışma aralığı olarak belirlendi. Ayrıca enzim elektrotun tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrü tayin edildi. Olabilecek girişimlerin hazırlanan biyosensör cevabı üzerine etkileri incelenerek, biyosensör meyve suyunda glukoz ölçümü için test edildi.

Bilim Kodu : 20104
Anahtar Kelimeler : Glukoz, Ferrosen takılı 4-Aminoantipiren, Biyosensör
Sayfa Adedi : 79
Danışman : Prof. Dr. Fatma ARSLAN

PREPARATION OF A NOVEL GLUCOSE BIOSENSOR MODIFIED WITH
FERROCENE-ATTACHED 4-AMINOANTIPYRENE

(M. Sc. Thesis)

Aşkın ERBAŞ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2023

ABSTRACT

In this study, a new enzyme biosensor modified with N-ferrocenyldiene-4-aminoantipyrene (4AA-Fc) was developed for glucose determination. For this purpose, glucose oxidase enzyme was immobilized to the carbon paste surface modified with 4AA-Fc by crosslinking method. Glucose determination was performed on the basis of oxidation of hydrogen peroxide formed as a result of the enzymatic reaction taking place on the surface of the prepared enzyme electrode at +0.4 V. The effect of pH and temperature on glucose determination was investigated and the optimum parameters were found to be pH=8 and 60 °C, respectively. The linear working range of 1.0×10^{-7} - 1.0×10^{-6} M was determined. In addition, the operational stability and storage stability of the enzyme electrode were determined. The effects of possible interventions on the prepared biosensor response were examined and the biosensor was tested for glucose determination in fruit juice.

Science Code : 20104

Key Words : Glucose, ferrocene-attached 4-Aminoantipyrene, biosensor

Page Number : 79

Supervisor : Prof. Dr. Fatma ARSLAN

TEŞEKKÜR

Üniversite hayatım boyunca değil her zaman benim yanımda olan, daima bilgi ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutan, yanına ne zaman gitsem bana zaman ayırıp sabırla sorunlarımı çözen, o sevecen davranışlarıyla güler yüzünü benden hiçbir zaman esirgemeyen çok kıymetli, değerli danışman hocam Prof. Dr. Fatma ARSLAN'a çok teşekkür ederek ellerinden öpüyorum. Tüm çalışmalarım da her daim yanımda olan, her saat her dakika her saniye sorularıma cevap veren, o üstün bilgilerini bana aktaran ve sürekli motive eden kıymetli hocam Arş. Gör. Onur Can BODUR'a teşekkür ederim. Yüksek lisansım boyunca ve hayatımın her alanında arkamda dağ gibi duran, inşaatta çalışarak beni bu zamana getiren babam Sencar ERBAŞ'a, desteğiyle her sorunuma koşan, ben ağladığımda ağlayan annem Naciye ERBAŞ'a, canımın yarısı askerde olan kardeşim Erkan ERBAŞ'a benim her zaman iyi yerlere gelmemi canı gönülden isteyen rahmetli dayım Erdoğan DANACI ve anneannem Şemsi DANACI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Son olarak benim daima yanımda olan her derdimi dinleyip çözen nişanlım Sezer KÜÇÜK'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Glukozun Tanımı ve Glukoz Tayininin Önemi.....	3
2.2. Glukoz Tayin Yöntemleri	5
2.2.1. Kanda glukoz tayini	5
2.3. Enzimlerin Tanımı.....	6
2.3.1. Glukoz Oksidaz Enzimi (GOD)	7
2.3.2. Glukoz Oksidaz Enziminin (GOD) genel özellikleri.....	8
2.3.3. Glukoz Oksidaz Enziminin (GOD) reaksiyon mekanizması.....	9
2.3.4. Glukoz Oksidaz Enziminin (GOD) kullanım alanları.....	13
2.4. Biyosensörler.....	13
2.4.1. Biyosensörlerin yapısı.....	15
2.4.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması	16
2.4.3. Biyosensörlerin çalışma alanları	17
2.5. Biyosensörün Performans Faktörleri	18
2.5.1. Seçicilik.....	18

	Sayfa
2.5.2. Kullanım ömrü	18
2.5.3. Kararlılık	18
2.5.4. Tekrarlanabilirlik.....	19
2.5.5. Yüksek duyarlılık	19
2.5.6. Hızlı cevap zamanı	19
2.5.7. Yeterli düzeyde tayin sınırı	19
2.5.8. Geniş ölçüm aralığı	20
2.5.9. Basitlik ve ucuzluk.....	20
2.6. Enzim Esaslı Biyosensörler	21
2.7. Amperometrik Enzim Biyosensörleri	22
2.8. Biyosensörlerde İmmobilizasyon	23
2.8.1 Kovalent bağlama.....	24
2.8.2 Çapraz bağlama	27
2.8.3 Tutuklama	29
2.8.4 Adsorpsiyon	29
2.9. İmmobilize Enzimlerin Serbest Enzimlere Göre Üstünlükleri	30
2.10. Karbon Pasta Elektrotlar	31
2.11. Kaynak Araştırması.....	33
3. DENEYSEL KISIM	37
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler	37
3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	39
3.3.1. Elektrokimyasal analiz cihazı	39
3.3.2. Hücre ve elektrotlar	39

	Sayfa
3.3.3. Mikro pipet	40
3.3.4. pH metre	40
3.3.5. Su banyosu	40
3.3.6. Saf su elde etmek için cihaz	40
3.4. Glukoz Biyosensörünün Hazırlanması ve En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi.....	40
3.4.1. Çalışma elektrotun hazırlanması: Karbon pasta elektrot (CPE), Modifiye karbon pasta elektrot (MCPE) hazırlanması	41
3.4.2. Karbon pasta elektrotun (CPE) sabit akıma getirilmesi	43
3.4.3. CPE ve MCPE'nin H ₂ O ₂ duyarlılığının belirlenmesi	44
3.4.4. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi	45
3.4.5. MCPE'nin H ₂ O ₂ duyarlılığına 4AA-Fc miktarının belirlenmesi	45
3.4.6. MCPE'ye Glukoz Oksidaz enziminin immobilizasyonu	46
3.4.7. Glutaraldehit miktarının belirlenmesi	47
3.4.8. Glukoz biyosensörünün en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi	48
3.4.9. Glukoz tayinine girişim yapan türlerin incelenmesi	50
3.4.10. Gerçek numunede (meyve suyu) glukoz tayini	52
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	53
4.1. CPE ve MCPE'nin H ₂ O ₂ 'ye Duyarlılığının Belirlenmesi	54
4.2. Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi	55
4.3. 4AA-Fc Miktarının Belirlenmesi	56
4.4. Glutaraldehit Miktarının Belirlenmesi	57
4.5. Optimum pH	60
4.6. Optimum sıcaklık	61
4.7. Substrat Derişiminin Etkisi	62

	Sayfa
4.8. Enzim Elektrotun Tekrar Kullanılabilirliği.....	63
4.9. Raf Ömrünün Belirlenmesi.....	64
4.10. Glukoz Tayinine Girişim Yapan Türlerin Etkisi.....	65
4.11. Gerçek numunede glukoz tayini.....	66
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ	79

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. 1970-1992 dönemleri arasında biyosensörlerin tarihsel ilerleyişi	14
Çizelge 2.2. Çeşitli enzim immobilizasyon yöntemleri	24
Çizelge 2.3. Çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması	30
Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler	37
Çizelge 5.1. Çalışma sonuçlarının literatür ile karşılaştırılması	68

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Glukozun molekül yapısı	3
Şekil 2.2. Glukozun kristal formları	4
Şekil 2.3. Glukozun oksijen molekülü ile kimyasal tepkimesi	8
Şekil 2.4. GOD protein kısmı” *” ile gösterilen kısım enzim aktif yapısıdır	9
Şekil 2.5. İndirgenme yarı tepkimesi	10
Şekil 2.6. Yükseltgenme yarı tepkimesi	10
Şekil 2.7. Glukoz oksidazın aktif merkezindeki amino asit kalıntıları ve FAD	11
Şekil 2.8. GOD enziminin yapısındaki FAD	11
Şekil 2.9. Glukozun glukoz oksidaz enzimiyle tepkimesi	12
Şekil 2.10. Biyosensör sistemlerinin çeşitli alanlarla etkileşimi.....	15
Şekil 2.11. Biyosensörlerin yapısı	15
Şekil 2.12. Biyosensörlerin bileşenleri	16
Şekil 2.13. Biyosensörlerin sınıflandırılması.....	16
Şekil 2.14. Biyosensörlerin uygulama alanları	17
Şekil 2.15. Biyosensörlerin performansını etkileyen faktörler	20
Şekil 2.16. Enzim biyosensörlerinin genel görünümü	21
Şekil 2.17. Enzim esaslı biyosensörlerin gelişmesi	22
Şekil 2.18. Enzim esaslı biyosensörlerin çalışma şeması	22
Şekil 2.19. Bir amperometrik biyosensörün şematik gösterimi	23
Şekil 2.20. Kovalent immobilizasyon	25
Şekil 2.21. Enzim immobilizasyonunda kullanılan maddelerde(taşıyıcı) bulunan reaktif gruplar ve reaksiyona girdikleri aminoasitlerin fonksiyonel grupları.....	26
Şekil 2.22. Enzim molekülleri arası çapraz bağlanma	27

Şekil	Sayfa
Şekil 2.23. Bazı çapraz bağlayıcıların formülleri	28
Şekil 2.24. Enzim molekülünün glutaraldehit ile çapraz bağlanması	28
Şekil 2.25. Enzim molekülünün jel içinde veya polimer matrikste tutuklanması	29
Şekil 2.26. Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyon	30
Şekil 2.27. Karbon bazlı malzeme örnekleri.....	32
Şekil 2.28. Grafit molekülünün yapısı	32
Şekil 2.29. Grafit tozunun elektrot gövdesine doldurulması	33
Şekil 3.1. Teflondan yapılan karbon pasta elektrot.....	40
Şekil 3.2. MCPE hazırlanması ve çalışma hücresi şeması.....	42
Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan Schiff bazları a-) 4AA-Fc (N-ferroseniliden-4-aminoantipiren) b-) 4AA-5F3MSA (5-floro-3-metilsalisiliden-4-aminoantipiren) c-) 4AA-3C5FSA (5-floro-3-kloro-4-aminoantipiren) d-) 4AA-5FSAA (5-florosalisiliden-4-aminoantipiren) e-) 4AA-SA (Salisiliden-4- aminoantipiren)	43
Şekil 3.4. Çalışma hücresi şeması.....	44
Şekil 3.5. 4AA-Fc Miktar çalışma elektrotları.....	46
Şekil 3.6. Elektrot yüzeyine enzim immobilizasyonu	47
Şekil 4.1. Glukoz tayini için reaksiyon şeması	53
Şekil 4.2. 4AA-Fc (N-ferroseniliden-4-aminoantipiren)	54
Şekil 4.3. CPE ve MCPE'nin H ₂ O ₂ 'ye duyarlılığının belirlenmesi.....	55
Şekil 4.4. MCPE'nin H ₂ O ₂ 'ye duyarlılığına çalışma potansiyelinin etkisi.....	56
Şekil 4.5. 4AA-Fc Miktarının belirlenmesi	57
Şekil 4.6. Biyosensörün glukoz duyarlılığına glutaraldehit miktarının etkisi	59
Şekil 4.7. Biyosensörün glukoz duyarlılığına pH'nın etkisi	60
Şekil 4.8. Biyosensörün glukoz duyarlılığına sıcaklığın etkisi.....	61
Şekil 4.9. Biyosensörün amperometrik cevap akımına glukoz derişiminin etkisi.....	62

Şekil	Sayfa
Şekil 4.10. Glukoz biyosensörü için kalibrasyon grafiği	63
Şekil 4.11. Biyosensörün amperometrik cevap akımına derişiminin etkisi, Lineweaver-Burk grafiği.....	63
Şekil 4.12. Tekrar kullanılabilirlik.....	64
Şekil 4.13. Depolama kararlılığı	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda verilmiştir.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
mg	Miligram
g	Gram
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
M	Molar derişim
mM	Milimolar derişim
μM	Mikromolar derişim
V	Volt
μA	Mikroamper
nA	Nanoamper
Δi	Akım farkı
R²	Lineer regresyon katsayısı
s	Saniye
dk	Dakika

Kısaltmalar**Açıklamalar**

AA	Askorbik Asit
BSA	Bovin serum albümin
CPE	Karbon pasta elektrot
EC	Enzim Kodu
GOD	Glukoz oksidaz
GC	Gaz kromatografisi
I_{max}	Maksimum akım farkı
IUB	Uluslararası Biyokimya Birliği
K_m	Michaelis-Menten sabiti
LOD	Gözlenebilme sınır tayini
LC	Sıvı kromatografisi
MCPE	Modifiye karbon pasta elektrot
RSD	Yüzde bağlı standart sapma
UA	Ürik asit
4AA-Fc	N-ferroseniliden-4-aminoantipiren
4AA-5F3MSA	5-floro-3-metilsalisiliden-4-aminoantipiren
4AA-3C5FSA	5-floro-3-kloro-4-aminoantipiren
4AA-5FSAA	5-florosalisiliden-4-aminoantipiren
4AA-SA	Salisiliden-4-aminoantipiren

1. GİRİŞ

Glukoz karbon, hidrojen ve oksijen atomundan oluşmuş, erime noktası 146 °C olan bir monosakkarittir. Glukoz daha çok merkezi sinir sisteminin en büyük bölümü olan beyin için enerji kaynağı olmakla beraber, çok az veya hiç mitokondrisi olmayan hücrelerin ihtiyaç duydukları bir enerji kaynağıdır (Olsan,1991).

Glukoz oksidaz enziminde (EC 1.1.3.4) prostetik grup olarak FAD (flavin adenin dinükleotid) bulunur. Glukoz oksidaz enzimi glukozun moleküler oksijen ile yükseltgenip glukono- δ -lakton (glukono-1,5-lakton) ve hidrojen peroksidin (H_2O_2) olduğu reaksiyonu katalizler. Lakton sulu ortamda herhangi bir enzime ihtiyaç duymaksızın hidroliz olarak glukonik aside dönüşür (Arslan ve diğerleri, 2011).

Glukoz tayini; gıda işlemleri, klinik, biyolojik ve kimyasal örneklerde oldukça önemlidir. Örneğin obezite günümüzde birçok ülkede en önemli sağlık sorunu olarak yer almaktadır. Obeziteye bağlı olarak şeker hastalarının sayısında da artış söz konusudur. Kan glukoz değerinin hızlı, düşük maliyetli ve pratik bir şekilde tayin edilmesi önem arz etmektedir. Şeker hastalığının izlenmesi ve tıbbi teşhisi amacıyla glukoz tayinleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Deri altı dokularında glukoz derişimini sürekli bir değerlendirmeye tabi tutabilmek ve kandaki glukoz seviyesini belirleyebilmek amacıyla duyarlı, seçici, güvenilir ve düşük maliyetli glukoz sensörü üretimi giderek artmaktadır (Arslan ve diğerleri, 2011; Fitzpatrick, 2015).

Biyosensörler çabuk yanıt verebilme özelliğine sahip, basit bir şekilde çok az miktarlarda olsa dahi örnek tespitinin yapılabildiği pahalı olmayan cihazlardır (Bodur, 2019). Bu sebeple biyosensörlerin hastalıkların hızlı teşhis edilmesinde ve tedavisinde kullanımı çok fazladır (Keskin ve Arslan, 2020).

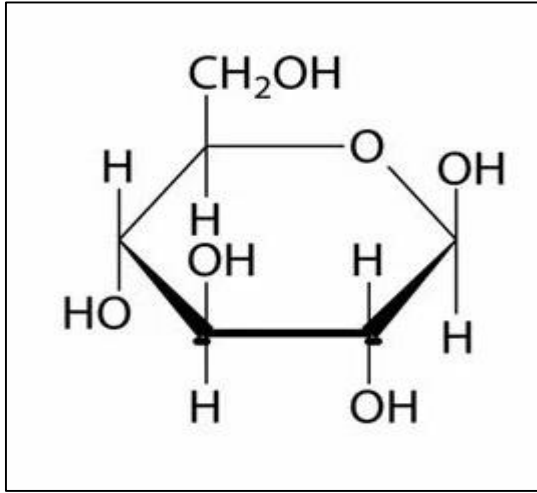
Glukoz oksidaza dayanan enzim esaslı amperometrik biyosensör, faaliyeti ve karmaşık olmayan yapısıyla hastalık teşhisinde ümit verici bir sistem olarak kabul edilmektedir (Arslan ve Arslan, 2011).

Bu tez çalışmamızda; karbon pasta elektrot ilk defa N-ferroseniliden-4-aminoantipiren (4AA-Fc) Schiff bazı ile modifiye edilerek glukoz biyosensörü hazırlandı. Böylece glukozun tayini için Schiff bazı ile enzim esaslı yeni bir glukoz biyosensörü elde edildi. Enzimatik tepkimeler sonucunda sıklıkla meydana gelen hidrojen peroksite (H_2O_2) duyarlı modifiye karbon pasta elektrot (MCPE) hazırlanması hedeflendi. Bu hedefle, 5 farklı madde (N-ferroseniliden-4-aminoantipiren, Salisiliden-4-aminoantipiren, 5-floro-3-metilsalisiliden-4-aminoantipiren, 5-floro-3-kloro-4-aminoantipiren, 5 florosalisiliden-4-aminoantipiren) karbon pasta elektrotu modifiye etmek için kullanıldı. Daha sonra glukoz oksidaz enzimi modifiye edilen karbon pasta elektrot yüzeyine çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edildi. Tasarlanan biyosensörün; amperometrik cevabına 4AA-Fc (N-ferroseniliden-4-aminoantipiren) miktarının, çalışma potansiyeli değerinin ve substrat derişiminin etkisi araştırıldı. Hazırlanan biyosensör ile glukoz tayini; enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan H_2O_2 'in anodik akımlarının ölçülmesi esasına dayanılarak yapıldı. Literatür araştırması yapıldığında 4AA-Fc (N-ferroseniliden-4-aminoantipiren) ve glukoz oksidaz enzimiyle hazırlanan bir glukoz biyosensörünün bulunmadığı tespit edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glukozun Tanımı ve Glukoz Tayininin Önemi

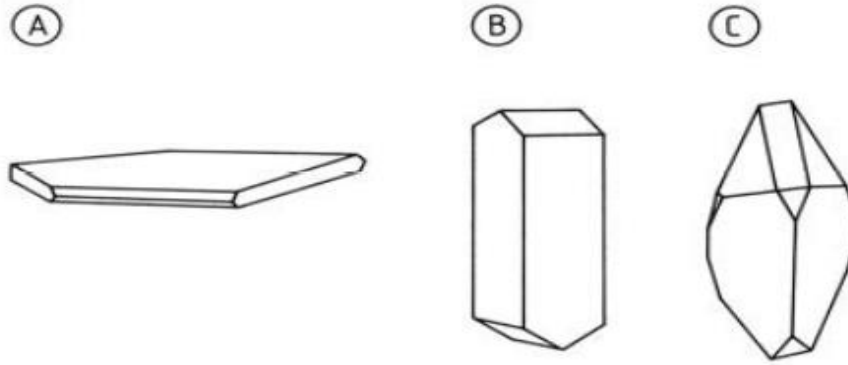
Glukozun, kimyasal formülü $C_6H_{12}O_6$ şeklinde olup molekül yapısı Şekil 2.1.'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Glukozun molekül yapısı

Glukoz, vücuttaki bütün hücrelerde ve en önemlisi vücudun enerji metabolizmasında aktif rol alan bir karbohidrattır. Doğada bolca bulunan D-glukoz çoğu meyve sularında var olan altı karbonlu bir şekerdir (Olsan, 1991).

19. Yüzyılın sonlarına doğru, glukozun genel yapısı Emil tarafından aydınlatıldı. Altı tane karbon atomu moleküle düz zincir olarak bağlanmaktadır. D-glukozun üç kristal şekilde bulunduğu belirtilmektedir (Şekil 2.2). Bunlar susuz halde olan α ve β formlarıdır. Her iki şekilde ortorombik iken α -D-glukoz monoklinik yapıdadır (Dean, 1974). Sulu çözeltide D-glukoz α ve β formunun bir karışımı halinde bulunur. Yaklaşık olarak % 62 β ve % 38 α şeklindedir (Pigman ve diğerleri, 1972).



Şekil 2.2. Glukozun Kristal Formları (Newkirk,1924, Dean, 1974) A) α - Mono hidrat B) α - Susuz; C) β - Susuz

Glukoz vücudumuzda ki metabolik olaylarda ara ürün olarak aktif görev yapar. Özellikle beyin ve hücreler için bir enerji kaynağı olmakla beraber hücre solunumu glukoz ile başlamaktadır. Bitkilerde fotosentezde ki önemi büyüktür. Bu önemli molekülün tayini, kandaki glukoz değerlerine göre oluşan hastalıkların tespit edilmesi için gereklidir (Atan, 2013).

Glukoz insan yaşamında çok önemli bir rol alarak, merkezi sinir sisteminin hücre dışı sıvısındaki derişimini, beyin enerjisi ve sinaptik iletim ile yakından bağlantılı olan beyin aktivitesini kontrol etmektedir (Yang ve diğerleri, 2014).

Günümüz dünyasında, modern insanların yeme alışkanlıkları farklılaşıyor ve gün geçtikçe günlük yapılan diyetle giderek fazla miktarda işlenmiş gıda ekleniyor. Ama ödenmesi gereken bedel çok sinsi bir sağlık sorunu olan bozulmuş glukoz toleransı ve diabetes mellitustur (Šebeková, ve diğerleri, 2007). Diabetes mellitus, çağdaş dünyada en sık rastlanan ve maliyeti büyük olan hastalıklardan biridir. Bu hastalık, retinopati, nefropati, kalp hastalığı, ayak ülserleri ve alt ekstremitte amputasyonlarının kışkırtıcı etkisidir (Karagollu ve diğerleri, 2013). Kandaki glukoz derişiminin tespiti diabetes mellitusun erken tanısında ve tedavisinde anahtar faktördür (Guo ve diğerleri, 2011).

Diabetes mellitusun kontrol edilememesi insani, ekonomik ve küresel zorluklara yol açacaktır. Bu sebeple kan, gıdalar ve ilaçlar gibi çeşitli maddelerde glukoz derişiminin tayin edilebilmesi amacıyla hızlı, güvenilir ve kararlı yöntemler geliştirmenin aşırı aciliyeti vardır (Baghayeri ve diğerleri, 2020).

2.2. Glukoz Tayin Yöntemleri

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) son bilgilendirmesine göre 2000 yılında dünya genelinde yaklaşık 171 milyon insanın diyabet hastası olduğu ve bu sayının 2030 yılında 366 milyona kadar çıkacağını söylemiştir. Bu durumun sebebi hareketsiz bir yaşam şekli ile beslenme bozukluklarının birleşmesidir. Glukoz enerji metabolizmasında aktif rolü olan bir karbohidrattır. Böylece kandaki glukoz miktarının tespiti ve HbA1c düzeyinin tayin edilmesi diyabet hastalığı için çok önemlidir. Diyabet hastalarının günlük kandaki glukoz seviyesini ölçmeleri, glukozu en çok analiz edilen analit yapmıştır (Çolak ve Arslan, 2011). Glukozun tayini biyokimya, klinik kimya, gıda ürünleri ve fermentasyonda önemi fazladır. Kırılma indisi, UV ve kolorimetri gibi eskiden beri kullanılmakta olan karbohidrat tayin yöntemleri düşük duyarlılığa sahiptir (Nogueira, 2005). Elektroforezde veya kromatografik yöntemlerde yer alan dedektöre bağlı olarak kompleks matrislerde tayin çalışmaları basit değildir. Bunun sebebi çok sayıda sinyal algılanması ya da bazı analitler için tayin sınırlarının uygun olmamasıdır. Bu durumda kullanılan analitlerin çeşitlendirilmesi gerekmektedir, ancak bu durumu ortadan kaldıracabilecek enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar ve nükleik asitlerin biyobileşen olarak kullanıldığı biyosensör tasarımlarıdır (Baldwin, 1999; Telefoncu, 2011). Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde, tüm biyosensör pazarının % 85'ini glukoz biyosensörü oluşturmaktadır. Biyosensörler çok büyük pazarlama alanına sahip olduğundan dolayı farklı tipte uygulama alanları için çeşitli glukoz biyosensörleri geliştirilmiştir (Çolak ve Arslan, 2011).

2.2.1. Kanda glukoz tayini

Kanda bulunan glukoz miktarının normal değer aralığı içinde olup olmadığını tespit etmek, hiperglisemi, hipoglisemi ve diyabet gibi glukozla ilgili hastalıkların araştırılması, erken teşhis için oldukça önemlidir. Kanda glukoz tayini kolorimetrik ve enzimatik olarak iki farklı yöntemle yapılmaktadır. Kolorimetrik yöntemler yükseltgenme indirgenme tepkimeleri (Modifiye Somogyi-Nelson Metodu) ve Ortotoluidin Metodu olmak üzere iki farklı şekildedir. Yükseltgenme indirgenme tepkimelerinde glukozun indirgenme özelliğinden faydalanılmıştır. Ortotoluidin Metodu ise rengin şiddetine bağlı olarak geliştirilmiştir. Enzimatik yöntem ise Glukoz Oksidaz Metodu ve Hekzokinaz Metodu (Enzimatik Ultraviyole) olmak üzere iki şekildedir (Şavk, 2019).

Bu yöntemlerin ışığından yola çıkılarak geliştirilen ve son yıllarda popülerliği yükselen bir diğer yöntem ise biyosensörlerdir.

Modifiye Somogyi-Nelson Metodu

Bu yöntemde glukoz tayini yapılacak olan kan, serum ya da plazma içinde mevcut olan glukozun yanında indirgeyici olarak bulunan proteinlerin çöktürülerek ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu işlem için çinko hidroksit kullanılarak bir sonraki adımda numune bazik bakır çözeltisiyle ısıtılmaktadır. Böylece Cu^{+2} iyonları glukozu yükseltgeyerek Cu^{+} iyonları oluşmaktadır. Aynı zamanda elde edilen bakır miktarına eşit miktarda arsenomolibdat indirgenmektedir. Cu^{+} ile arsenomolibdat tepkimesi sonucu meydana gelen renk değişimi kolorimetrik olarak ölçülerek glukoz tayini gerçekleştirilir (Atan, 2013).

Glukoz oksidaz (Fermco Test) Metodu

Bu yöntemde glukoz tayini yapılacak olan kan, serum ya da plazma içinde mevcut olan glukoz, GOD enziminin enzimatik kataliz tepkimesiyle moleküler oksijen tarafından glukonik asit ve H_2O_2 'ye yükseltgenir. H_2O_2 kromojen peroksidaz enziminin etkisiyle oksitlenerek H_2SO_4 etkisiyle kalıcı kırmızı renk oluşturur. Kimyasal tepkimse sonrasında meydana gelen renk değişimi kolorimetrik olarak ölçülerek ve glukoz tayini gerçekleştirilir (Atan, 2013).

2.3. Enzimlerin Tanımı

Enzimler, birden fazla gerçekleşen biyokimyasal tepkimelerde katalizör görevi yaparak canlı yapıdaki metabolik sürecin meydana gelmesini sağlarlar (Bancroft, 1990).

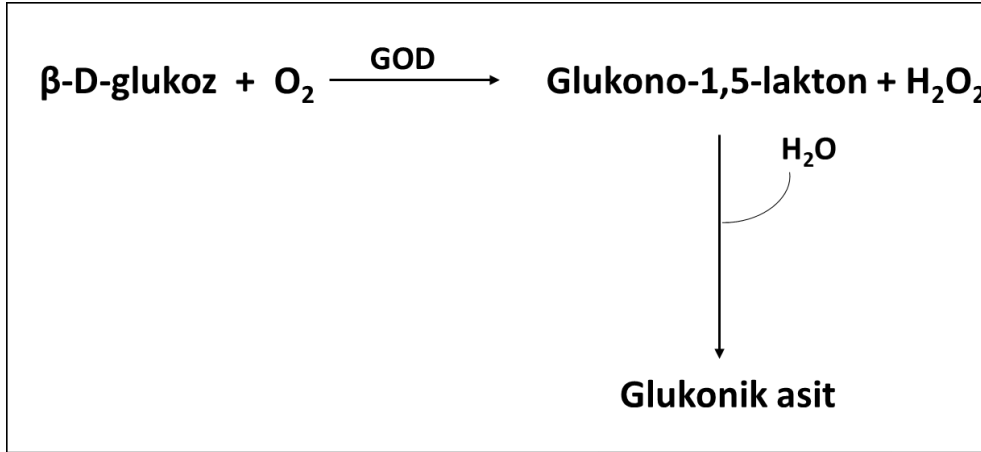
Enzimler yüksek molekül kütlesine sahip protein yapılı maddelerdir. Aktif protein birbirinden farklı iyonize yapılı grupları barındırır. Bu protein yapılı maddeler bağımsız bir şekilde bulunabilir. Ayrıca özel hücre yapılarına (desmoenzim) bağlanmış halde ya da sitoplazmada çözülebilir formda olabilir. Enzimatik tepkimenin başlaması için bir kofaktör gerekmektedir. Çoğunlukla kullanılan

kofaktörler magnezyum, mangan aktivatörleri, metal iyonları, koenzim olan maddelerden nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) gibi maddelerdir (Ketani ve diğerleri, 2015).

Enzimler biyokatalizör olmalarıyla canlı yapıların yaşamsal süreci için vazgeçilmezdir. Canlı metabolizmasında, beslenmede, enerji ihtiyacında ve yaşamsal aktivite için sayısız kimyasal tepkimede yer alır. Biyokatalizörler ile daha kolay çalışabilmek ve enzimatik tepkimelerin özelliklerine göre 1961 yılında Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB), Enzim Komisyonu (EC) denilen uluslararası bir komisyon kurdu. Yapılan isimlendirme enzimin ana sınıfını, alt sınıfını, alt alt sınıfını ve substrat sınıfını göstermektedir. Bu Enzim Komisyonu, oksidoredüktazlar (EC1), transferazlar (EC2), hidrolazlar (EC3), liyazlar (EC4), izomerazlar (EC5) ve ligazlar (EC6) şeklinde 6 ana sınıfa ayırdı. Bu altı ana gruba 2018 yılı ağustos ayında translokazlar (EC7) denilen yeni bir grup eklenerek toplam grup sayısı yediye yükseldi (Tao ve diğerleri, 2020).

2.3.1. Glukoz Oksidaz Enzimi (GOD)

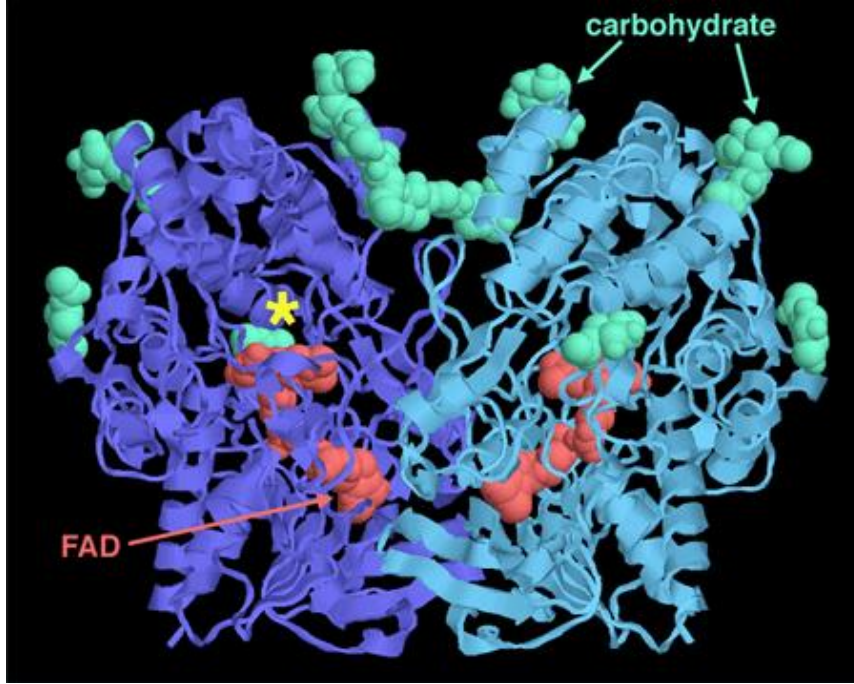
Glukoz oksidaz (GOD) enzimi ilk defa 1904 yılında Maksimow tarafından *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinden elde edilmiştir (Dai ve diğerleri, 2002; Clark, 2006). Müller 1928 de enzimin oksidatif etkisinin olduğunu açıklayarak, enzim saflaştırıldığında bünyesinde var olan sarı rengin yapısında bulundurduğu prostetik gruptan (FAD, flavin adenin dinükleotid) kaynaklandığını söylemiştir. 1948 de Keilin ve Hartree yükseltgenmenin prostetik grup tarafından sağlandığını ve enzimin açığa çıkan H_2O_2 ile antimikrobiyal aktivite göstererek antibiyotik olarak davranış gösterdiğini öne sürmüşlerdir (Atan, 2013). Enzimin ticari üretimine ilk defa 1952 yılında başlanmıştır. Enzim *Penicillium notatum* ve *Penicillium glaucum* kaynaklarından üretilirken şimdi ise *A.niger* veya *Penicillium amagasakienese* kaynakları kullanılmaktadır (Özyılmaz, 2015). Glukoz oksidaz enzimi, β -D-glukoz' un D-glukono-1,5-lakton ve H_2O_2 ' ye yükseltgenmesini katalizlemektedir. D-glukono-1,5-laktonda glukonik asite hidroliz olmaktadır (Wolhfarht ve diğerleri, 2005). Kimyasal tepkime Şekil 2.3 'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Glukozun oksijen molekülü ile kimyasal tepkimesi

2.3.2. Glukoz Oksidaz Enzimi (GOD) Genel Özellikleri

Glukoz oksidaz (GOD) molekül ağırlığı 160 kDa olan ve özdeş iki alt kısımdan oluşan dimerik yapıda bir proteindir (İçli, 2008). Farklı kaynaklardan saflaştırılan enzim farklı kimyasal özelliklere sahiptir. *Penicillium* kaynaklı olan enzim 4 alt kısımdan oluşmuştur. Kendi aralarında disülfüt köprüsü olan iki çift alt kısım bir araya gelerek dördüncü yapıyı oluşturur. *A. Niger* kaynaklı enzim özdeş iki alt kısımdan oluşur. Bu özdeş kısımlar birbirine disülfid köprüleriyle bağlanmıştır (Özyılmaz, 2005). Yapıdaki monomerlerin her biri 583 amino asit kalıntısından oluşmuş tek bir polipeptid zinciri içerir. Yapıdaki monomerleri tuz köprüsü ve hidrojen bağları ile birleştirirler (Wolhfarht ve diğerleri, 2004, Haouz ve diğerleri, 2001). Glukoz oksidaz (GOD), yapısında yaklaşık olarak % 74 protein, %16 nötral şeker ve %2 amino şekeri bulunmaktadır. Yapıda var olan karbohidratın % 80'ini mannoz oluşturur (İçli, 2008). Karbohidrat molekülü N ya da O-glikozit şeklinde proteine bağlanmaktadır (Wolhfarht, 2005). Yapıda var olan karbohidrat molekülü tamamen yapıdan uzaklaştırılsa bile enzim aktivitesinde herhangi bir etkilenme olamamakla beraber termal stabilite azalmaktadır. Ag^+ , Cu^+ ve Hg^+ enzimin başlıca inhibitörleridir (Özyılmaz, 2005).



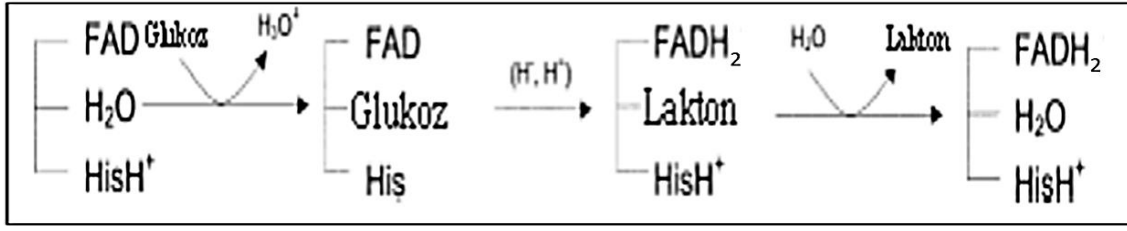
Şekil 2.4. GOD protein kısmı “*” ile gösterilen kısım enzimin aktif kısmıdır (İçli, 2008).

2.3.3. Glukoz Oksidaz Enzimi (GOD) Reaksiyon Mekanizması

A. *Niger* kaynaklı glukoz oksidazın biyokimyasal tepkime mekanizması Bentley (1963) tarafından basitçe açıklanmıştır. Bright ve Porter (1975) ile Willson ve Turner (1992) tarafından ise ayrıntılı bir şekilde ortaya konmuştur. Önceki zamandan bugüne enzimin fonksiyonu ve yapısı hakkındaki bilgilerde önemli farklılıklar olmuştur. Yapılan X-Ray çalışmalarında 2,3 Å çözünürlükte olan GOD kristal yapısı çözülmüş ve birbirinden farklı substratlarla biyokimyasal tepkime mekanizmasında büyük gelişim olmuştur (Wolhfarht ve diğerleri, 2005). Biyokimyasal tepkime flavoenzimin ilk olarak indirgenip daha sonra da yükseltgenmesinden meydana gelmiştir. Mekanizma iki basamaklıdır.

İndirgenme yarı reaksiyonu

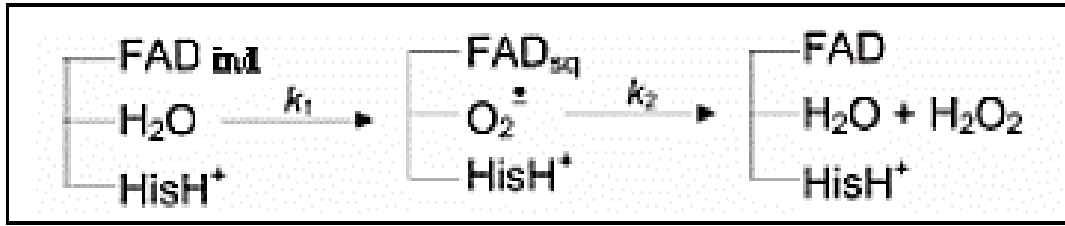
İndirgenme yarı basamağında enzimdeki bir su molekülü glukoz ile yer değiştirerek aktif merkezde var olan His516' nın N3 protonu da su molekülüyle beraber yapıdan ayrılır. Böylece His516' ya bir protonun ve bir hidrürün FAD' e eş zamanlı aktarılmasıyla glukoz glukolaktona dönüşür. Su ile lakton yer değiştirerek yapıdan ayrılırken FADH₂ ve protonlanmış His516 meydana gelmektedir. (Wolhfarht ve diğerleri, 2005). Şekil 2.5'de kimyasal tepkime gösterilmiştir.



Şekil 2.5. İndirgenme yarı tepkimesi (İçli, 2008).

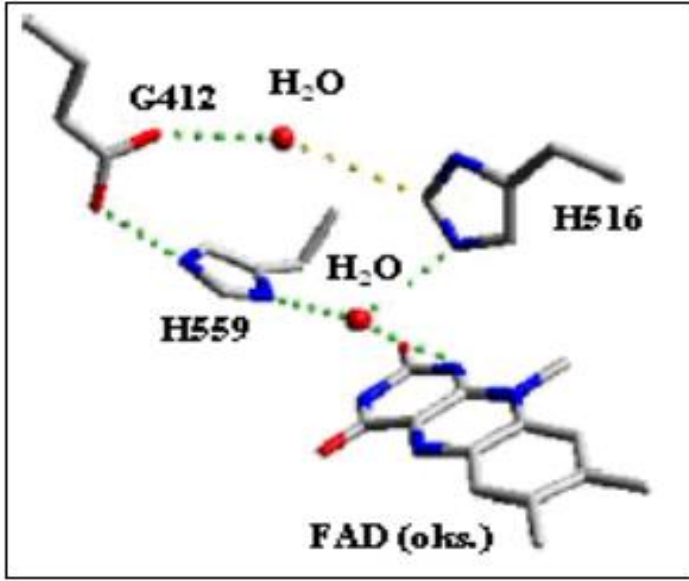
Yükseltgenme yarı basamağı

Moleküler oksijen ile su molekülü yer değiştirerek indirgenmiş enzim-oksijen kompleksi (bir negatif yüklü flavin ve iki azotu da protonlanmış His516 ve His559) oluşmaktadır (Wolhfarht ve diğerleri, 2005). İndirgenmiş koenzim FADH₂, oksijen molekülüyle H₂O₂'ye indirgenip, tekrardan FAD' e yükseltgenmektedir. Şekil 2.6'da kimyasal tepkime gösterilmiştir.

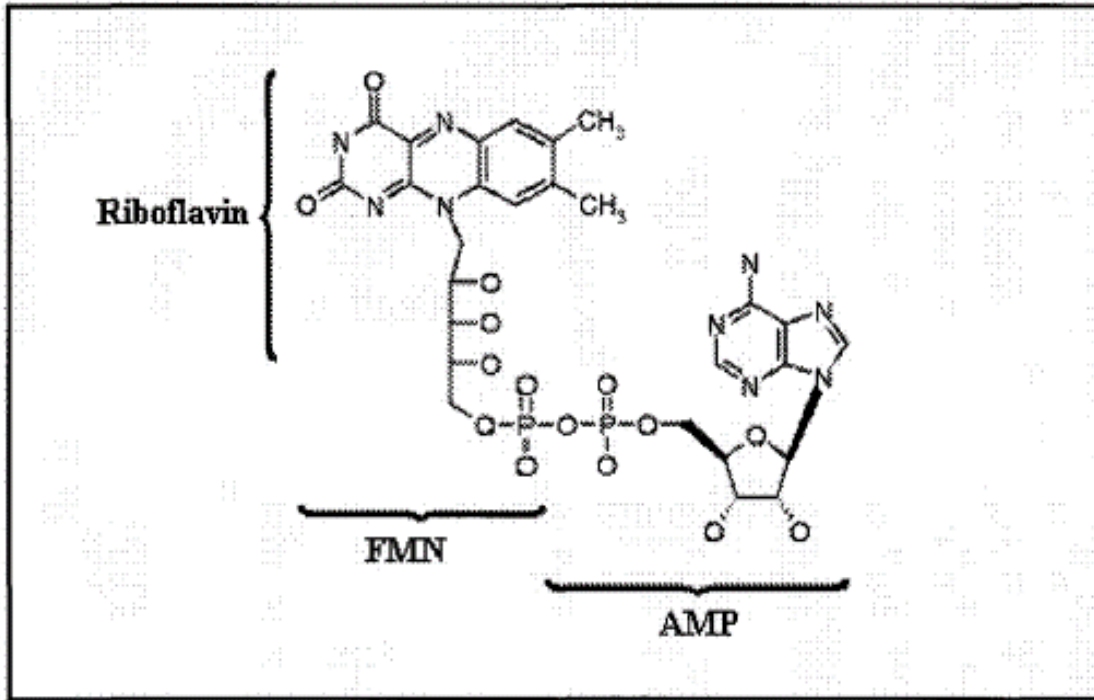


Şekil 2.6. Yükseltgenme yarı tepkimesi (İçli, 2008).

Şekil 2.7 'de glukoz oksidazın aktif merkezindeki amino asit kalıntıları ve FAD' ın pozisyonu, Şekil 2.8 'de GOD enziminin yapısında bulunan FAD grubu gösterilmiştir.



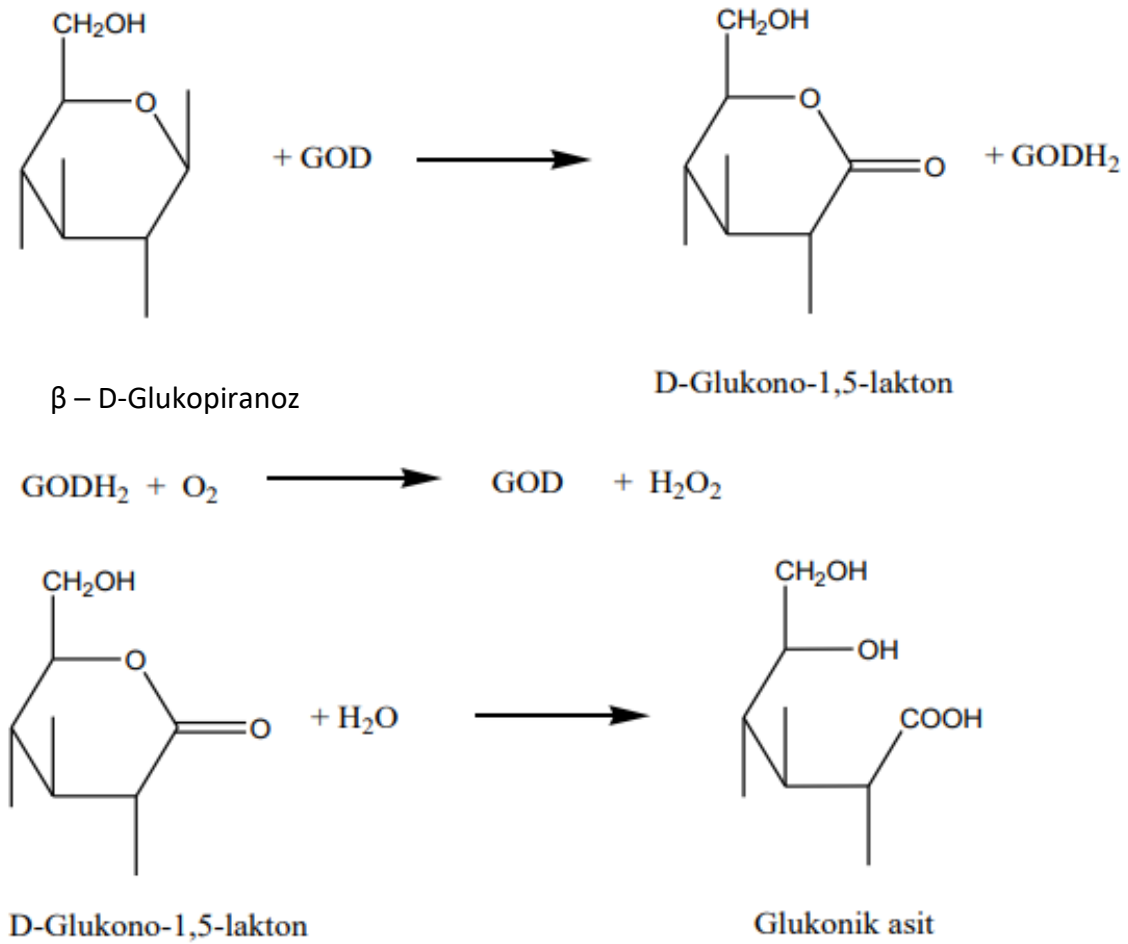
Şekil 2.7. Glukoz oksidazın aktif merkezindeki amino asit kalıntıları ve FAD'ın pozisyonu (İçli, 2008).



Şekil 2.8. GOD enziminin yapısında bulunan FAD grubu (Özyılmaz, 2005).

Elektron alıcı olan FAD glukozu yükseltgeyerek hemen sonra oksijen molekülünü indirgeyerek hidrojen peroksit'e dönüştürüp kendini de yeniden oksitlemiş olur. Sonuç olarak Şekil 2.9'da enzimin glukozu glukonik aside oksitlediği biyokimyasal tepkime görülmektedir. İndirgenme yarı basamağında glukoz 2 proton ve elektronu enzime transfer

ederek glukolaktona dönüşmekte, yükseltgenme yarı basamağında ise enzim oksijen molekülüyle yükseltgenmekte ve tepkime sonucunda hidrojen peroksit oluşmaktadır. Biyokimyasal tepkimenin mekanizması tam anlamıyla anlaşılamamış olup aktif merkezde mevcut olan Glu412, His516 ve His559 amino asit artıkları biyokimyasal tepkimeye yer aldığı görülmektedir. Enzim kinetiğiyle ilgili yapılan çalışmalar deprotonasyon işleminin düşük pH'da olabileceğini ortaya koymuştur (Weibel, 1971).



Şekil 2.9. Glukozun glukoz oksidaz enzimiyle tepkimesi (Özyılmaz, 2005).

2.3.4. Glukoz Oksidaz Enziminin (GOD) Kullanım Alanları

Katalizlediği biyokimyasal tepkimeler göz önüne alındığında bu enzim hidrojen peroksit üretiminde ayrıca bir karışımda veya çözelti içinde bulunan glukoz ve oksijenin uzaklaştırılmasında örneğin yumurta beyazından glukozun uzaklaştırılmasında, diş hekimliğinde laktoperoksidaz (LPOD) ile birlikte kullanımda, tıp alanında, glukonik asit ve glukonat üretiminde, düşük alkollü şarap üretiminde kullanılmaktadır. Bu farklı amaçların yanında kan, idrar gibi biyolojik sıvılarda glukoz miktarının tespit edilmesi amacıyla biyosensör ve enzim elektrotu tasarımında oldukça önem arz etmektedir. Ayrıca meşrubatlar, şekerlemeler ve içerisinde direkt olarak glukoz bulunan gıdalarda şeker miktarının belirlenmesi amacıyla da biyosensör yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır (Petuccioli ve diğerleri, 1999; Rodriguez ve diğerleri, 2004). Glukoz oksidaz glukonik asit üretiminde de kullanılmaktadır. Glukonik asit glukozun aerobik fermentasyonu ile elde edilebileceği gibi glukoz oksidaz enzimiyle enzimatik şekilde üretilmektedir (Bao ve diğerleri, 2001). Glukonik asit, yiyeceklerde beyazlatıcı görevi yapar. Deterjanlara su sertliğini azaltıcı olarak eklenir (Betancor ve diğerleri, 2006; Eryomin ve diğerleri, 2006; Rauf ve diğerleri, 2006). GOD, yiyecek ve içeceklerde bulunan artık glukozu ve oksijeni uzaklaştırmada kullanılarak gıdaların raf ömrünün uzatılmasını sağlar (Karmali ve diğerleri, 2004; Eryomin ve diğerleri, 2006; Rauf ve diğerleri, 2006; Mislovicova ve diğerleri, 2007).

2.4. Biyosensörler

Canlılar yaşamlarını devam ettirebilmek amacıyla bulundukları ortamda meydana gelen ortam koşullarını algılayarak kısa sürede adapte olmaları gerekmektedir. Ortaya sunulan bu davranışlardan hareketle, dış çevreden gelebilecek tehlikelere karşı koruyucu bir duvar oluşturmak için genellikle enzim, hücre, doku, antikor, DNA, vb. biyolojik maddelerin etkili olduğu doğal sensörleri tercih ederler (Gümüşderelioğlu ve diğerleri, 2013). İşte bu yüzden canlı sistemlerde bulunan algılama yeteneğinden yola çıkarak bilim insanları biyosensörleri geliştirmişlerdir. Biyosensör sistemleri hassas ve ayırt edici analitik sinyaller üreterek biyolojik algılamayı sağlayan yapılardan meydana gelmiş analitik cihazlar olarak bilinmektedir (Moon ve diğerleri, 2018). Biyosensörler analitik kimya, biyokimya, biyoloji vb. alanlarda yaygın kullanımı olan cihazlardır (Şekil 2.10). Biyosensörler, nitel ve nicel analizlerde kullanılan ve farklı özellikteki kimyasal maddelere

karşı verilen biyolojik yanıtların optik, ısı, elektrik gibi sinyallere dönüştürülmesini sağlar (Tüylek, 2017). Böylelikle biyolojik yapıların üst düzey duyarlılıkla yanıt vermesi, mikroelektronik alanında keşfedilen gelişmeleri artırmıştır. Bu nedenle biyosensör üretim hızına yetişmek oldukça zahmetlidir. Bu sensör üretimindeki hızlı gelişme sayesinde çok sayıda çeşitli biyosensör sistemleri üretilmeye başlanmıştır (Tüylek, 2021). Çizelge 2.1 ‘de 1970–1992 dönemleri arasında biyosensörlerin tarihsel ilerleyişi gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. 1970–1992 dönemleri arasında biyosensörlerin tarihsel ilerleyişi (Özdemir, 2019).

1970	Bergveld tarafından iyona duyarlı alan etkili transistörün (ISFET) keşfi (Bergveld, 1970)
1975	Lubbers ve Opitz tarafından karbon dioksit ve oksijen tespiti için fiber optik biyosensör (Vestergaard vd., 2015)
1975	YSI tarafından glikoz tespiti için ilk ticari biyosensör (Yoo vd., 2010)
1975	Suzuki vd. Tarafından 1975 İlk mikrobe tabanlı immünosensör. (Suzuki vd.,1975)
1982	Schultz tarafından glikoz tespiti için fiber-optik biyosensör (Schultz, 1982)
1983	Liedberg vd. Tarafından 1983 Yüzey plazmon rezonansı (SPR) immünosensörü. (Liedberg vd., 1983)
1984	1984 İlk aracılı amperometrik biyosensör: glikoz oksidazında glikoz tespiti için kullanılan ferrosen (Cass vd.,1983)
1990	Pharmacia Biacore tarafından 1990 SPR tabanlı biyosensör (Vestergaard vd., 2015)
1992	i-STAT tarafından elde edilen el kan biyosensörü (Vestergaard vd., 2015)

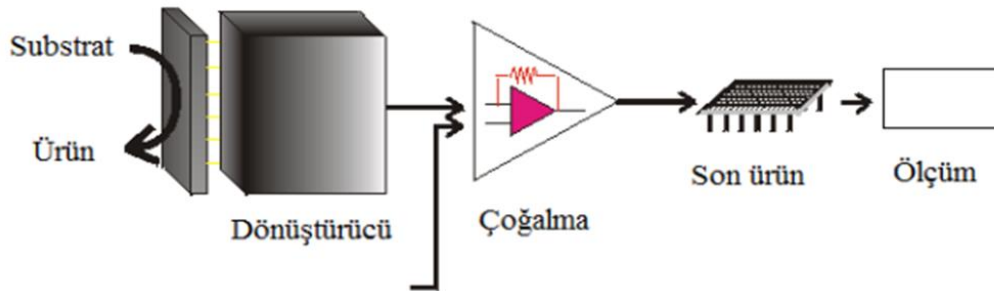
2.4.1. Biyosensörlerin yapısı

Biyosensörler, biyobileşenler (reseptör) ile fiziksel bileşenlerin aynı ortamda buluşmasıyla oluşurlar. Biyomoleküler yapıya sahip olan reseptörlere biyoreseptör denilmektedir. Biyoreseptörler, analiti algılayabilme yeteneğine sahiptir. Biyosensör sistemlerinin hızla gelişmesinde kilit bileşen olan biyoreseptörler, analizi yapılacak reaktif ile seçici olarak etkileşimde bulunan duyarlılığı yüksek bir yapıdır (Scott ve diğerleri, 2012). Genel

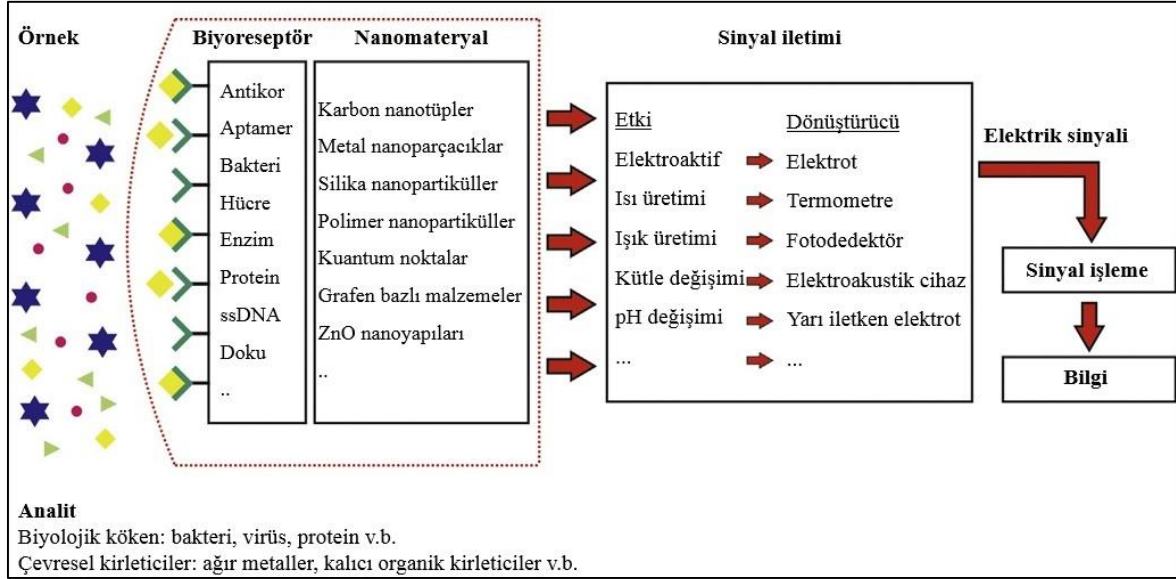
anlamda, bir biyosensör sistemi biyolojik, kimyasal ya da biyokimyasal sinyali ölçerek işlenebilir özellikte elektrik sinyaline çevirmektedir. Elde edilen bu elektriksel sinyal dönüştürücü yardımıyla akım, potansiyel, sıcaklık değişimi, ışığın absorpsiyonu, ya da elektrokimyasal, termal, optik olarak ya da piezoelektrik anlamda kütle artışıyla ölçülebilir forma dönüştürülür (Şekil 2.11) (Atan, 2013) . Daha sonra sonuçlar dijital ortama aktarılır. Bir biyosensör sistemindeki çalışılan adımlar için veri tabanı, veri temini ve kontrolü, modelleme, ağ bağlantısı ve kablosuz iletişim gibi çeşitli birimlere gereksinim vardır. Biyoalgılama materyalleri dönüştürücülere bağlanırken etkin sabitleme yöntemi kullanılmaktadır (Tüylek, 2022). Gerçekleşen biyokimyasal tepkimeden hareketle uygun dönüştürücüler kullanılır. Dönüştürücüler sistemde kullanılan elektrotlar amperometrik ve potansiyometrik ölçme yöntemlerinde yer almaktadır (Tüylek, 2017). Şekil 2.12’de biyosensörlerin bileşenleri gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Biyosensör sistemlerinin çeşitli alanlarla etkileşimi (Tüylek, 2022).



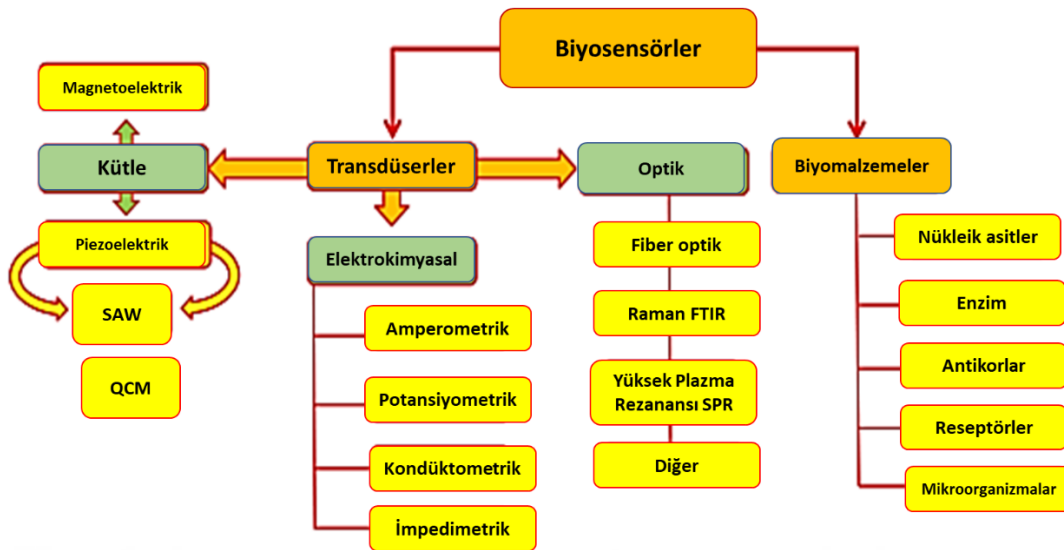
Şekil 2.11. Biyosensörlerin yapısı (Bulut, 2011).



Şekil 2.12. Biyosensörlerin bileşenleri (Di Pietrantonio ve diğerleri, 2019).

2.4.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler, biyolojik malzemeler veya dönüştürücü (transdüser) elemanlarına göre 2 gruba ayrılabilir (Şekil 2.13). Biyolojik malzemeler nükleik asitler, enzimler, antikorlar, reseptörler ve mikroorganizmaları kapsar. Transdüser elemanları, algılama esaslı fizikokimyasal değişime bağlıdır. Başlıca Transdüser biyosensörler kütle bazlı biyosensörler, elektrokimyasal biyosensörler ve optik biyosensörler olarak sınıflandırılmaktadır (Şavk, 2019).



Şekil 2.13. Biyosensörlerin sınıflandırılması (Şavk, 2019).

2.4.3. Biyosensörlerin çalışma alanları

Biyosensörler; biyomedikal alan, proses kontrolü, biyoreaktör kontrol, gıda üretim ve analizi, tarla tarımı, bağ-bahçe tarımı ve veterinerlik, bakteriyel ve viral tanı, endüstriyel atık su kontrolü, çevre koruma ve kirlilik kontrolü, maden ve işletmelerinde toksik gaz analizlerinde ve askeri uygulamalarda çok önemli rol oynarlar (Şekil 2.14). Dünyadan bugüne kadar 180’den fazla çeşitli madde için biyosensör hazırlanmış olup sadece yaklaşık 25’i ticari olarak üretilmektedir. İlaçların vücuttaki seviyelerinin ayarlanması ve kontrolünde kullanılması yakın bir gelecekte biyosensörler tarafından gerçekleştirilebileceği öngörülmüştür. Buna en önemli örnek *Yapay Pankreas* çalışmalarıdır. Bu çalışmanın dışında biyo süreçlerin nükleik asit seviyesinde izlenebilmesi, ilaçların reseptörlere olan etkisi, transmitter-reseptör etkileşimi biyosensörlerin gelecekteki önemli tıbbi uygulama alanları arasında gösterilecektir (Kökbaş ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.14. Biyosensörlerin uygulama alanları (Şavk, 2019).

2.5. Biyosensörün Performans Faktörleri

Bir biyosensörlerin sahip olduğu statik ve dinamik özellikler ve bu özelliklerin optimize edilmesi biyosensörün performansını önemli ölçüde etkilemektedir (Şekil 2.15).

2.5.1. Seçicilik

Hazırlanan enzim elektrotunun karmaşık bir ortamda yani çeşitli katkı maddelerini ve kirletici maddeleri içeren bir örnekte tek şekilde analitik bir ölçüm cihazı olarak analitin tespit edilebilmesini sağlar. Seçiciliğin güçlü olmadığı durumlarda oluşabilecek problemler elektrotun kullanımını zorlaştırıcı etki göstermektedir (Şavk, 2019). Seçicilik ilk defa Nicolsky tarafından bir denklem ile açıklanmıştır. Denklem, bir elektrotun ölçümü yapılacak X iyonu ve tüm girişim yapan diğer iyonlara verdiği yanıtı göstermektedir. Hazırlanan enzim elektrotun çeşitli iyonik türlere olan duyarlılığı seçicilik katsayısı ile açıklanabilmektedir. Seçicilik katsayısı arttıkça hazırlanan enzim elektrotun ölçümü yapılacak olan X iyonuna olan duyarlılığı azalmaktadır (Atan, 2013).

2.5.2. Kullanım ömrü

Enzim kullanıldığı zamanlarda enzim aktivitesinin yarattığı etki yani bu aktivitenin azalması kullanım ömrünü etkileyen en önemli faktör olmaktadır (Bal, 2012).

2.5.3. Kararlılık

Bu performans faktörü hazırlanan enzim elektrotun uzun yıllar kullanılabilirliği hakkında bilgi vermektedir. Eğer hazırlanan biyosensör uzun yıllar kullanılabiliriyorsa bu durum çok fazla madde analizi ve çalışma demektir. Böylece enzim elektrotun maliyeti oldukça düşük olmakla beraber çok avantajlıdır. Çalışma ortamında yeterli koşullar ayarlandığında düşük sıcaklıklarda çalışılması biyosensörün ömrünü uzatmaktadır. Böylece kullanılmadığı durumlarda +4 °C da saklanması kullanım ömrünü artırıcı etki yapacaktır (Atan, 2013).

2.5.4. Tekrarlanabilirlik

Biyosensörün birden fazla tekrarlanan deneysel çalışmalar sonucunda aynı cevap akımlarını verebilme yeteneği tekrarlanabilirlik etkisi olarak bilinmektedir. Tekrarlanabilirliğin belirlenmesi işleminde aynı örnekle peş peşe alınan ölçüm sonucundan alınan cevap akımlarından yola çıkarak standart sapma ve korelasyon katsayısının hesaplanmasıyla elde edilen sonuca göre belirlenmektedir. Bu sonucun iyi olması iyi bir biyosensörün hazırlandığının göstergesidir (Şavk, 2019).

2.5.5. Yüksek duyarlılık

Enzimler sadece belirli maddelere karşı duyarlıdırlar. Yani enzimler substratlarına spesifik etki göstermektedir. Bu nedenle enzim elektrot yüzeyine immobilize edilmiş olan enzim oldukça duyarlı olmalıdır. Duyarlılık, akım-konsantrasyon eğrisinin eğimiyle doğru orantılıdır (Ustabaş, 2010).

2.5.6. Hızlı cevap zamanı

Amperometrik çalışmalarda analizi yapılacak maddeyi çalışma hücreğine ilave etmeden önce denge akımının sabit değeri okunmalı ve kaydedilmelidir. Daha sonra analizi yapılacak madde çalışma hücreğine ilave edilince cevap akımı okunarak kaydedilir ve böylece ilk ilaveden sonra denge akımına kadar geçen süre cevap zamanıdır (Ustabaş, 2010). Cevap akımının hızlı olması istenmektedir (Atan, 2013).

2.5.7. Yeterli düzeyde tayin sınırı

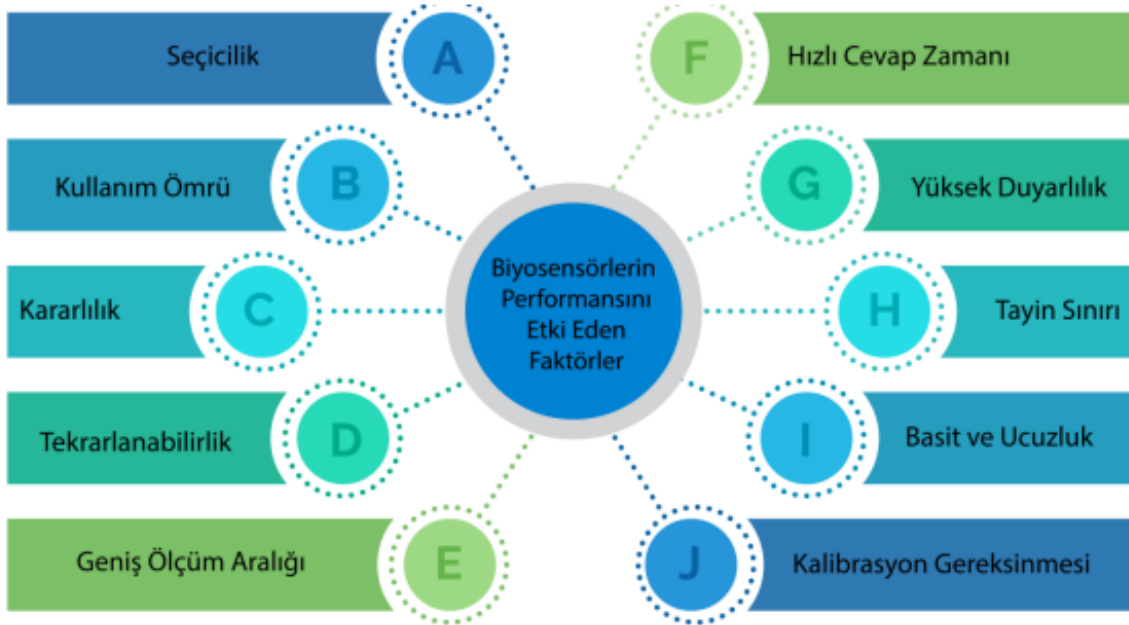
Substrat derişimi-biyosensör cevap akımı arasındaki ilişkinin gösterildiği kalibrasyon grafiğinde bu ilişkinin doğrusal olduğu derişimi aralığı doğrusal çalışma aralığı olarak belirtilir. Elde edilen grafiğin en alt sınırı; tayin sınırı olarak belirtilmektedir. Tayin sınırının belirlenmesinde analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki miktarı büyük önem taşımaktadır (Atan, 2013).

2.5.8. Geniş ölçüm aralığı

Biyosensörün cevabından elde edilen cevap akımı-derişimi grafiğinde çizilen eğrinin lineer olduğu bölge çalışma aralığıdır. Bütün biyosensör çalışmalarında belirli bir derişime çıkıldıktan sonra cevap akımı-derişimi eğrilerinde lineerlikten sapma görülmektedir. Lineerlikten sapmanın nedeni yanıt olarak okunan akım değerlerindeki değişimin azalmasından kaynaklanır (Ustabaş, 2010). İdeal hazırlanan bir biyosensörün geniş doğrusal ölçüm aralığına ve düşük gözlenebilme sınırına ulaşmasının gerekli olduğu savunulur (Şavk, 2019).

2.5.9. Basitlik ve ucuzluk

Enzim elektrotların her daim kullanımı kolay, hazırlanışı basit ve maliyetinin düşük olması hedeflenmiştir (Bal, 2012).



Şekil 2.15. Biyosensörlerin performansını etkileyen faktörler (Şavk, 2019).

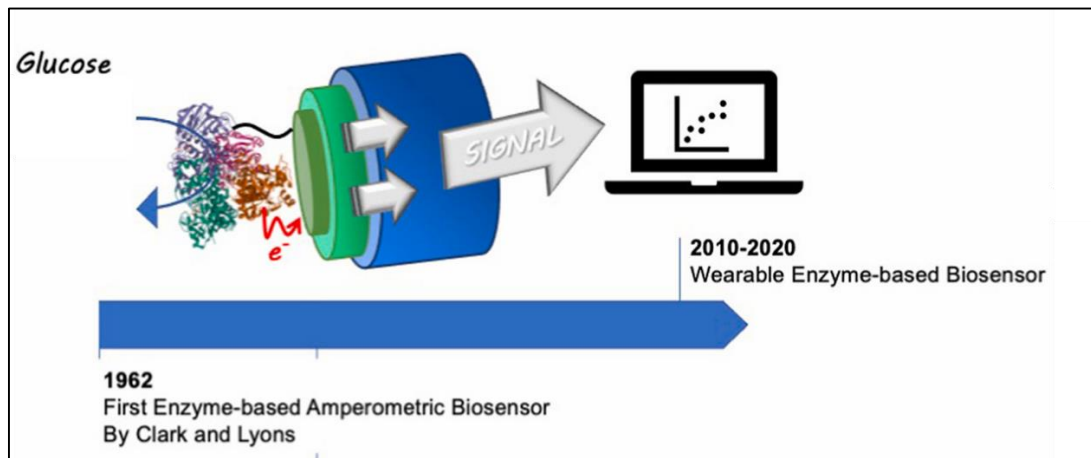
2.6. Enzim Esaslı Biyosensörler

Amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde popüler olarak kullanılan kilit madde enzim elektrotlardır (Tüylek, 2017). Düünden bugüne biyosensör pazarına bakıldığında bu alandaki ilk biyosensör çalışması hiç kuşkusuz enzim sensörleridir (Turna, 2006) (Şekil

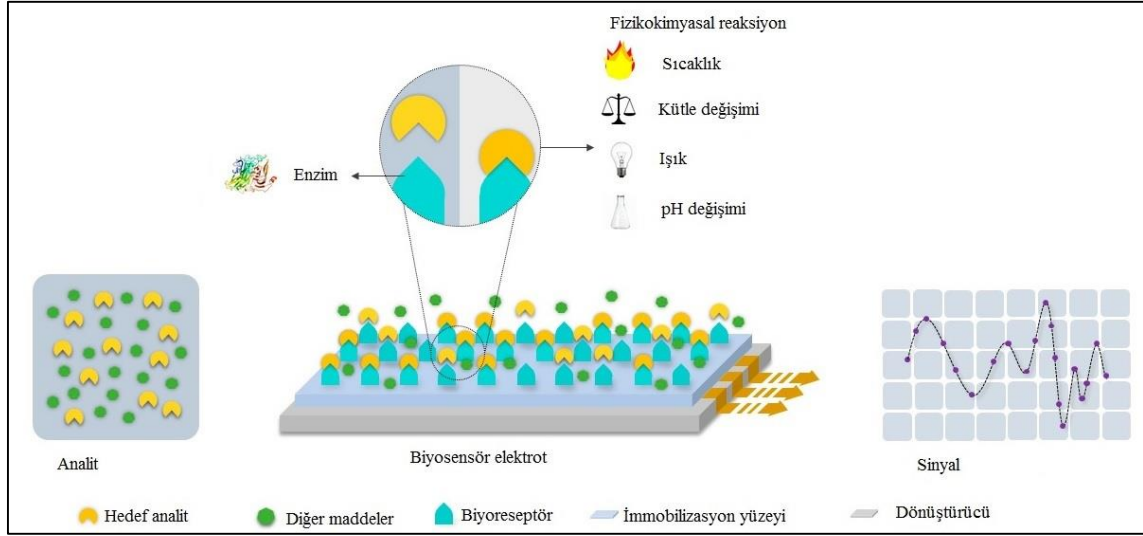
2.17). Günümüzde, milyarlarca insan, göz önüne alındığında enzim bazlı biyosensörler büyük ilgi odağıdır. Enzim bazlı biyosensörler, uzaktan tıp ve *yerinde* analiz için güçlü araçları temsil etmektedir (Bollella, 2022). Enzim esaslı biyosensörler, hızlı, özgül, hassasiyeti yüksek, maliyeti oldukça düşük, çevrimiçi ve/veya gerçek zamanlı algılama olanaklarını içermekle beraber; peroksidazlar, oksidoredüktazlar, amino oksidazlar ve polifenol oksidazlar bu sensör sistemlerini tasarlamada en çok kullanılan enzim çeşitleridir (Pérez ve diğerleri, 2019). Enzim esaslı sensörler, biyoaktif tabaka, transdüser ve ölçüm sisteminden meydana gelmektedir (Şekil 2.18). Enzim bazlı sensörleri diğer sensörlerden ayıran özellik biyoaktif tabaka üzerinde biyomolekül olarak enzimin mevcut olmasıdır (Tüylek, 2017) (Şekil 2.16). Elektrokimyasal esaslı enzim sensörleri; amperometrik enzim sensörleri (birinci nesil, ikinci nesil, üçüncü nesil), potansiyometrik enzim sensörleri (proton duyarlı, amonyak duyarlı, karbondioksit duyarlı, diğer iyon duyarlı), yarı iletkenleri esas alan enzim sensörleri olarak gruplandırılabilir (Bal, 2012).



Şekil 2.16. Enzim biyosensörlerin genel görünümü (Tüylek, 2017).



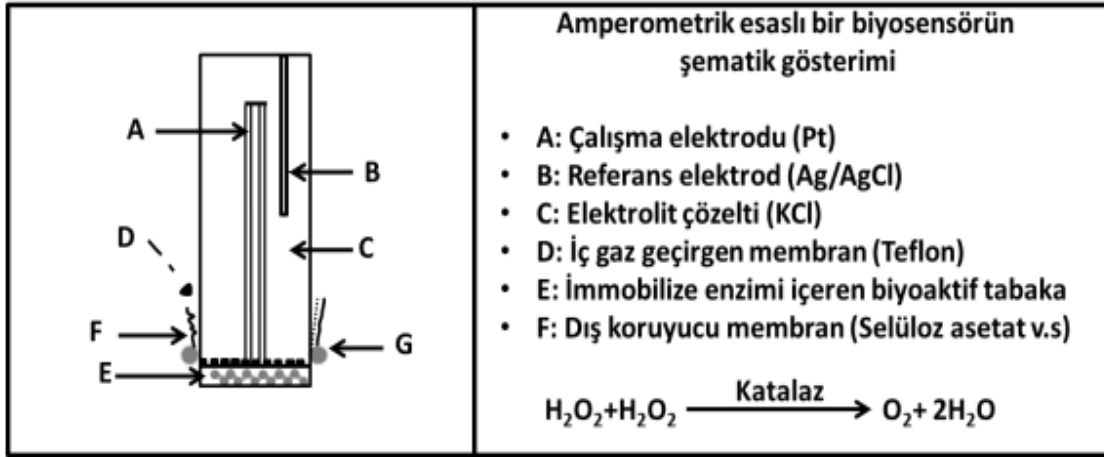
Şekil 2.17. Enzim esaslı biyosensörlerin gelişmesi (Bollella, 2022).



Şekil 2.18. Enzim esaslı biyosensörlerin çalışma şeması (Campaña, 2019).

2.7. Amperometrik enzim biyosensörleri

Elektrokimyasal biyosensörler arasında en fazla tercih edilen amperometrik enzim temelli biyosensörlerdir. Çalışma prensibi kullanılan substratın yükseltgenmesi ya da indirgenmesiyle okunan akımdaki farklılığa dayanır (Polatoğlu, 2018) (Şekil 2.19). Okunan cevap akımının büyüklüğü kullanılan türlerin çözeltide bulunan derişimiyle orantılı bir şekilde ya artmakta ya da azalmaktadır (Towseef ve diğerleri, 2013). Amperometrik biyosensörlerde enzimin biyokimyasal tepkimesi ile O_2 ve H_2O_2 'nin farklı miktarlardaki nicel analizleri çalışılmaktadır (Coşkun, 2021). Amperometrik çalışmalarda çoğunlukla çalışma elektrotu olarak altın (Au), karbon (C) veya platin (Pt) elektrotlar, referans elektrot sabit potansiyelde olan ayrıca çalışma elektrotunun potansiyelini kontrol altında tutan gümüş/gümüş klorür ($Ag/AgCl$) elektrottur. Karşıt elektrot ise akışın ölçülmesinden sorumludur (Bük ve diğerleri, 2017). İlk defa enzim bazlı amperometrik biyosensörler 1960'larda Clark ve Lyons tarafından başlatılmıştır (Bollella, 2022). Bu nedenle günümüzde en yaygın amperometrik biyosensör sistemlerinde Clark Oksijen elektrotu kullanılmaktadır (Şavk, 2019).

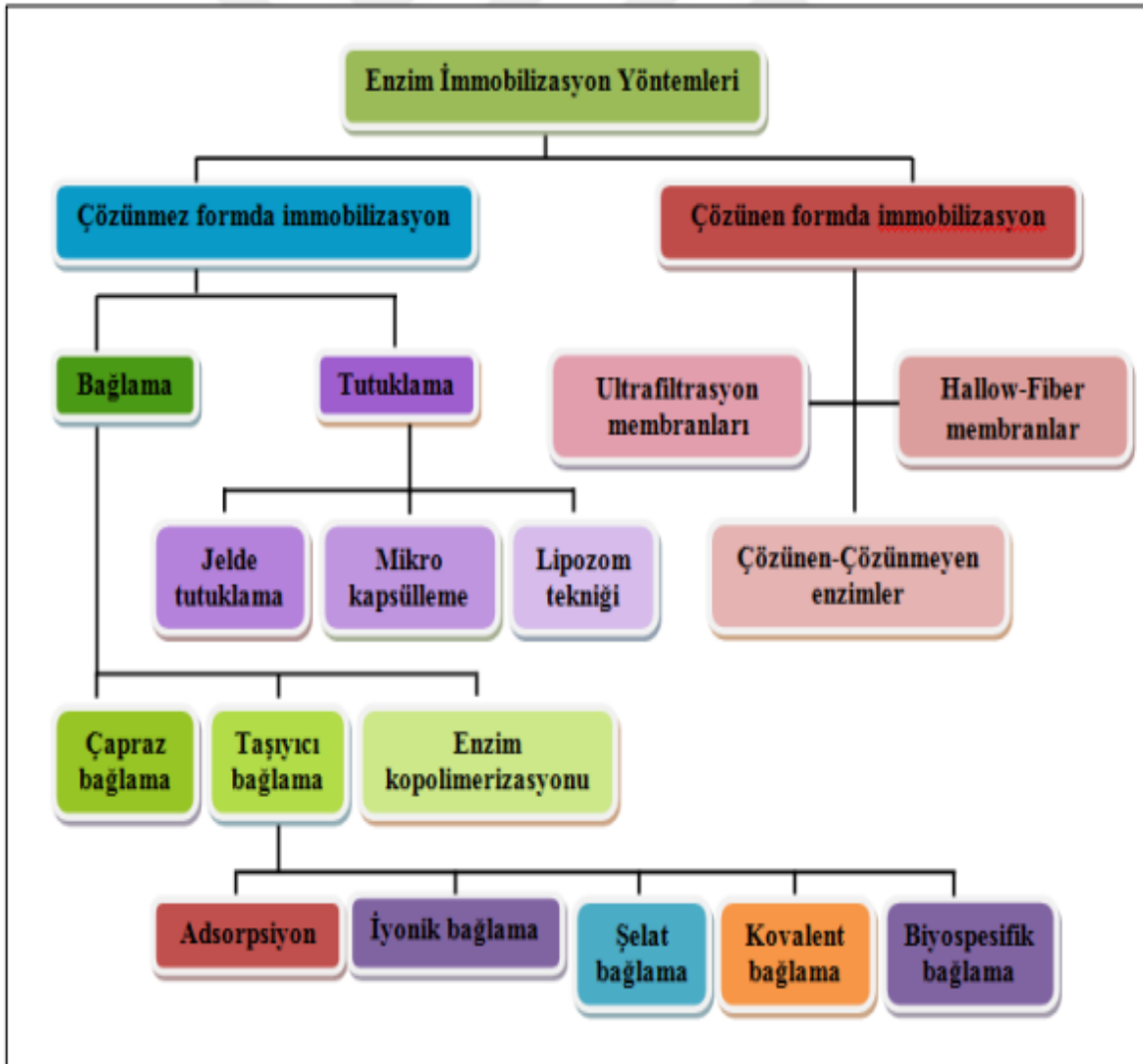


Şekil 2.19. Bir amperometrik biyosensörün şematik gösterimi (Şavk, 2019).

2.8. Biyosensörlerde İmmobilizasyon

Enzimler suda çözünebilen protein yapılı moleküllerdir. Biyokimyasal tepkimeler sulu ortamda gerçekleşmektedir. Bu durum enzimin istenilen zamanda deney ortamından alınmasını zorlaştırır. Deneysel ortama inhibitör madde ilave edilerek reaksiyon durdurulabilmektedir. Ancak çalışma da inhibitör maddeden gelen bir kirlilik olacaktır ve bu kirliliğin yok edilmesi maliyeti yükseltecektir. Bu problemin ortadan kaldırılması için enzim immobilizasyonu için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (İçli, 2008) (Çizelge 2.2). İmmobilizasyonun kelime anlamı hareketi sınırlandırmadır. Gerçekten hareketleri sınırlandırılan enzimler immobilize enzimlerdir. Enzim moleküllerinin, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmasıyla immobilizasyonu gerçekleştirilir. İmmobilizasyonunda doğal veya yapay organik ve inorganik materyal seçilmelidir. İlk defa enzim immobilizasyonu 1950 yılında yapılmıştır (Turna, 2006).

Çizelge 2.2. Çeşitli enzim immobilizasyon yöntemleri (Bodur, 2019).

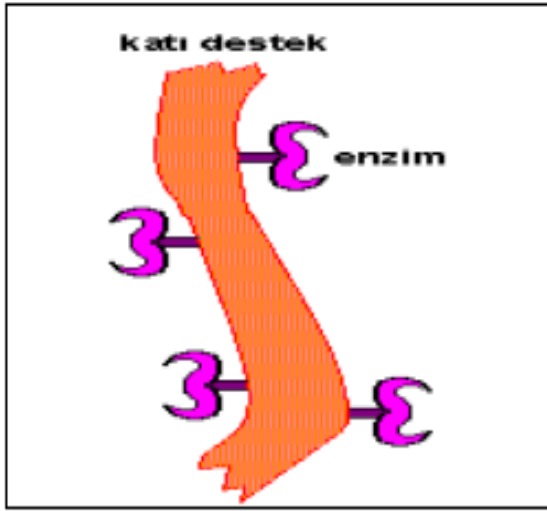


2.8.1. Kovalent bağlama

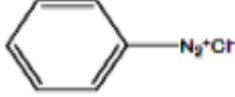
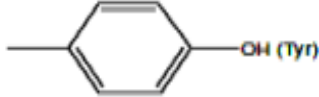
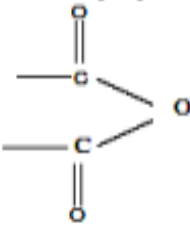
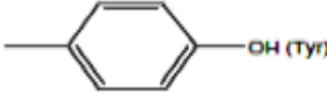
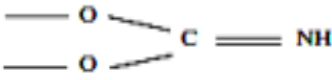
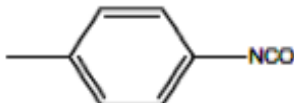
Bu yöntemde enzim taşıyıcıya sulu ortam içerisinde kovalent olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanma da en hassas kriter bağlanmanın enzim aktif merkezi için zorlayıcı gruplar tarafından olamaması ve bağlanma esnasında sterik etkiden kaynaklı bu zorlayıcı grupların etkilenmesidir (Şekil 2.20). Bağlanma olayı enzim molekülündeki amino asitlerde mevcut olan fonksiyonel gruplar aracılığıyla gerçekleştirilir (Özdemir, 2010). Kovalent immobilizasyon, reseptörlerin yüzeylere geri dönüşümsüz bağlanmasını sağlar, ancak reseptörlerin biyolojik aktivitelerini ve analitleri çözeltiden bağlama yeteneklerini etkileyebilecek rastgele bir oryantasyonuna yol açar. Kovalent immobilizasyon, özellikle bağlanma adımı sırasında pahalı ve düşük konsantrasyonlu reseptör çözeltilerinin

kullanılması gerektiğinde zaman alabilir. Mikroakışkan çiplerde yapılan tahliller için reseptörlerin geri dönüşümsüz immobilizasyonu için sıklıkla kullanılır (Salva ve diğerleri, 2021).

Enzim immobilizasyonunda kullanılan maddelerde (taşıyıcı) bulunan reaktif gruplar ve reaksiyona girdikleri amino asitlerin fonksiyonel grupları Şekil 2.21’ de gösterilmiştir.



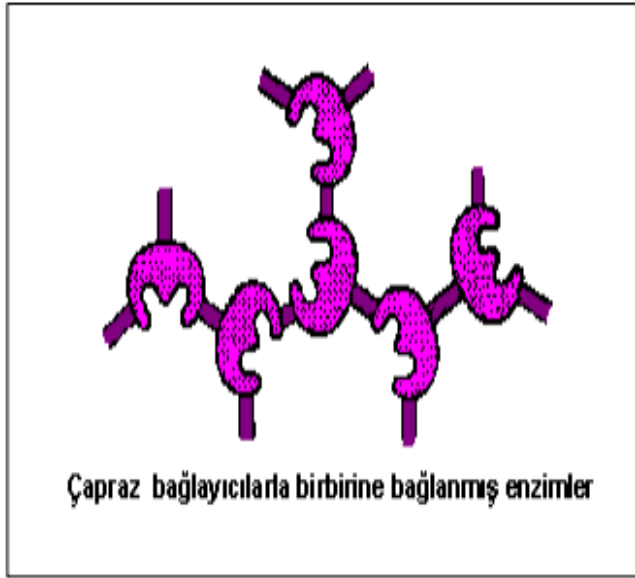
Şekil 2.20. Kovalent immobilizasyon (İçli, 2008).

Taşıyıcının reaktif grubu	Enzimdeki fonksiyonel grup ve ilgili amino asit
 Diazonyum tuzu	— NH ₂ (Lys, N-Terminal) — SH(Cys)  — OH (Tyr)
— R — NCS izotiyosiyanat  Asit anhidrit	— NH ₂ (Lys, N-Terminal) — NH ₂ (Lys, N-Terminal)
CH ₂ CON ₃ Açıl azid	— NH ₂ (Lys, N-Terminal) — SH(Cys)  — OH (Tyr)
 imidokarbonat	— NH ₂ (Lys, N-Terminal)
 izosiyanat	— NH ₂ (Lys, N-Terminal)
— CH ₂ COCl Açıl klorür	— NH ₂ (Lys, N-Terminal)

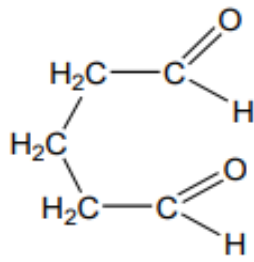
Şekil 2.21. Enzim immobilizasyonunda kullanılan maddelerde (taşıyıcı) bulunan reaktif gruplar ve reaksiyona girdikleri amino asitlerin fonksiyonel grupları (Atan, 2013).

2.8.2. Çapraz bağlama

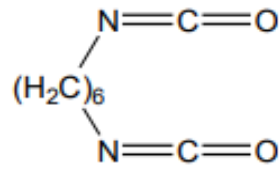
Enzimlerin endüstriyel düzeyde uygulanması genellikle katı destekler üzerinde immobilizasyonlarını gerektirir (Şekil 2.22). Bu nedenle, immobilizasyonu stabilizasyona bağlamak çok uygun görünmektedir (Alonso ve diğerleri, 2005). Kimyasal ve iyonik çapraz bağlayıcılar gibi çeşitli çapraz bağlama ajanları vardır (Şekil 2.23). Bu çapraz bağlayıcılar, kovalent, iyonik ve hidrojen bağları dahil olmak üzere farklı etkileşimler yoluyla polimerik bir zinciri diğer zincirlere bağlayabilir. İyi bir çapraz bağlama ajanı hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermez. Glutaraldehit (GA), polimerlerin amin veya hidroksil gruplarıyla etkileşime girebilen kimyasal bir çapraz bağlayıcıdır (Şekil 2.24). Bulunduğu ortamdaki konsantrasyonu %2-5 (w/w) olmalıdır (Atan, 2013). Bununla birlikte, GA'nın reaksiyona girmemiş aldehit grupları canlı hücreler için toksiktir ve vücutta yoğun inflamasyona yol açabilir (Doustdar ve diğerleri, 2022).



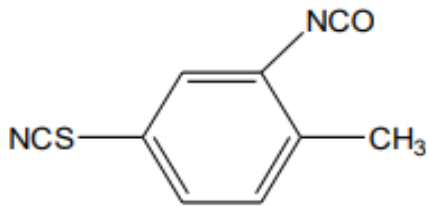
Şekil 2.22. Enzim molekülleri arası çapraz bağlama (İçli, 2008).



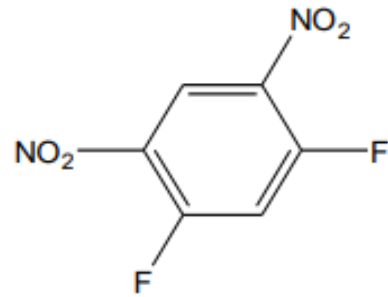
Glutaraldehit



Hekzametilendiizosiyanat

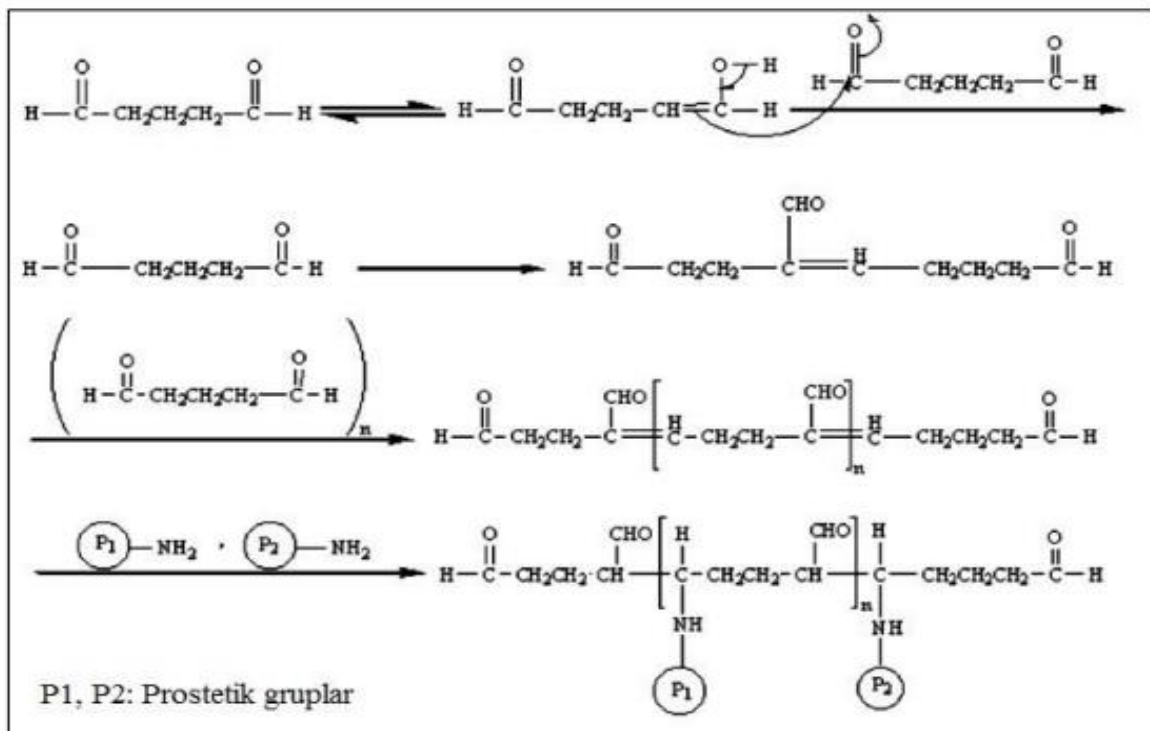


2-Izosiyanato-4-izotiyosiyanato-toluen



1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen

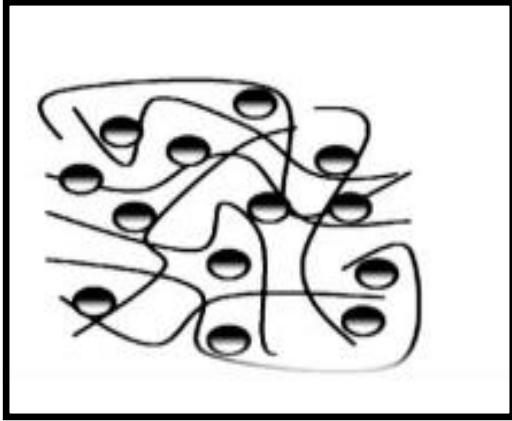
Şekil 2.23. Bazı çapraz bağlayıcıların formülleri (Bal, 2012).



Şekil 2.24. Enzim molekülünün glutaraldehit ile çapraz bağlanması (Koçak, 2020).

2.8.3. Tutuklama

Biyoreseptörün bir zar ya da tabaka (matriks) içerisinde hapsedilmesi yöntemidir. Bu yöntem enzimler dışında hücre ve organeller, antikorlar için de kullanılmaktadır. Enzim yapıları polimer jel matrikste tutuklanabilmektedir (Şekil 2.25). Tasarlanan ilk enzim elektrotunda glukoz oksidaz (GOD) poliakrilamid jelinde tutuklama ile sabitlenmiştir. Ayrıca bir başka geliştirilen üreaz elektrotunda üreaz enzimi elektrot yüzeyinde diyaliz zarı ile sarılarak tutuklanmıştır. Nisasta, poliakrilamid, silikon lastiği, polivinil klorür ve polivinil alkol bu yöntemde oldukça tercih edilen film veya matrikslerdir (Atan, 2013). Tutuklama işlemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama immobilizasyonundan apayrı bir yerdedir. Çünkü bu işlemde enzim yapısı fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamıştır (Özdemir, 2010).



Şekil 2.25. Enzim molekülünün jel içinde veya polimer matrikste tutuklanması (Atan, 2013).

2.8.4. Adsorpsiyon

Kovalent olmayan bağlanma, çok eski ve en basit uygulanabilen immobilizasyon yöntemidir (Şekil 2.26). Suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılır ve aşırısı yıkanarak kimyasal çalışma ortamından giderilir. Enzim taşıyıcı üzerine sabitlenmesin de etkin etkileşim türü Van der Waals kuvvetleridir. Geçmişten günümüze oldukça tercih edilen adsorbanlar kollajen, polimetrik aromatik reçineler, selüloz, silikajel, 10 hidroksiapatit, polistiren, polivinil klorür ve silikadır (Özyılmaz, 2005).



Şekil 2.26. Adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyon (İçli, 2008).

Çizelge 2.3. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması (Bodur, 2019).

Özellik	Fiziksel Absorpsiyon	Çapraz Bağlama	Kovalent Bağlama	Tutuklama
Hazırlama	Kolay	Zor	Zor	Zor
Bağlanma Gücü	Zayıf	Kuvvetli	Kuvvetli	Kuvvetli
Enzim Aktivitesi	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek
Tekrar Kullanılabilirliği	Mümkün	İmkansız	Nadiren	İmkansız
Maliyeti	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek
Kararlılık	Düşük	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Uygulanabilirlik	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek

2.9. İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri

Enzim moleküllerinin, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmasıyla immobilizasyonu gerçekleştirilir. İmmobilize enzimlerin serbest enzimlere göre üstünlükleri aşağıda sıralanmıştır.

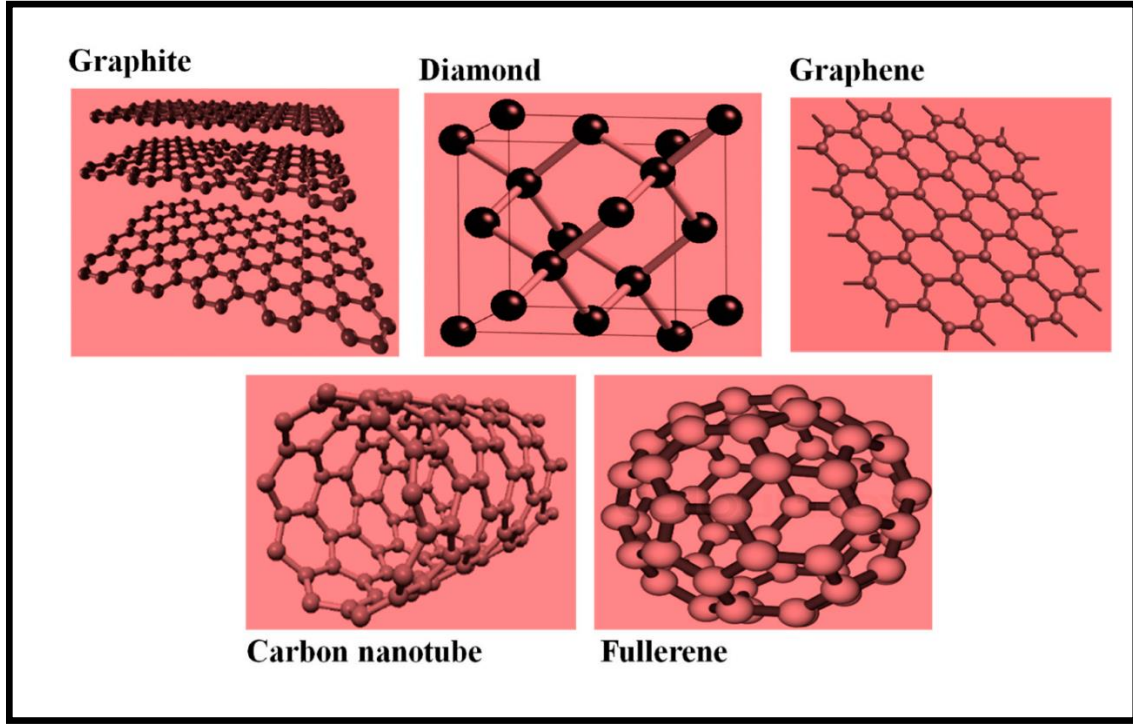
- Kimyasal tekime ortamından basitçe ayrıştırılır.
- pH, sıcaklık gibi ortam koşullarına karşı yüksek dayanıklılık sağlar.
- Çoklu tekrarlar ve uzun vadeli kullanımda aktif olarak kullanılır.
- Peş peşe gerçekleştirilecek çalışmalarda popüler bir kullanıma sahiptir.
- Oldukça yüksek kararlılığa sahiptir.

- Çalışma ortamında ki ürün oluşumunu kontrol altına alır.
- Çalışılacak enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azalır.
- Bazı durumlarda serbest haldeki enzimlerden daha yüksek aktiviteye sahiptir (Bodur, 2019).

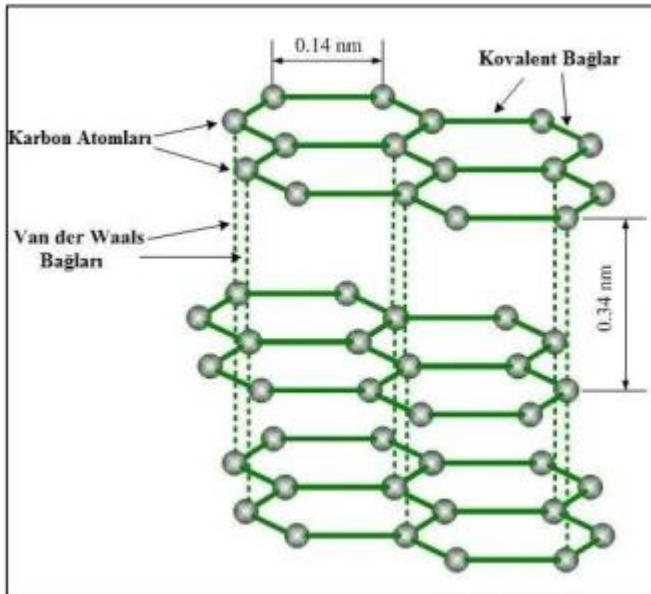
2.10. Karbon Pasta Elektrotlar

Günümüzde oldukça fazla bir kullanıma sahip olan elektrotlar arasında en çok tercih edilen karbon pasta elektrotlardır. Yapısında birçok özellik bulunduran elektrot ticari camısı karbon elektrotlardır. Ancak maliyetinin yüksek boyutta olması karbon pasta elektrotlara ihtiyacı doğurmaktadır. Bununla beraber çeşitli birçok elektrot bulunmaktadır. Bunlar karbon nanotüpler, kompozit elektrotlar ve bizmut, altın, gümüş, platin gibi metal elektrotlardır. Elektrot yapımında kullanılan elementlerden altın, platin ve karbon, kimyasal ve mekanik özelliklerinden dolayı kararlılıkları çok yüksektir.

Karbonun iyi bir elektrot malzemesi olmasının en büyük nedeni, geniş bir yükseltgenme potansiyel aralığı, düşük elektriksel direnç, düşük artık akım, tekrarlanabilir yüzey yapısı ve sulu ortamda hem indirgenme hem yükseltgenme bölgesinde geniş bir çalışma aralığı sağlamasıdır. Bununla birlikte birçok karbon türü elektrot malzemesi olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.27). Yaygın olarak kullanılan malzemeler; yüksek düzenlilikte pirolitik grafit (HOPG), tek kristalli grafit, gömme karbon, lif karbon, karbon siyahı, camısı veya seramik karbon ve toz grafittir. Tercih edilen tür toz haline getirilmiş grafittir (Şekil 2.28). Sebebi grafit tozunun yüksek saflığa, düşük soğurma kapasitesine ve mikron boyutlarda partiküller bulundurmasıdır.



Şekil 2.27. Karbon bazlı nanomalzeme örnekleri



Şekil 2.28. Grafit molekül yapısı (Bodur, 2019).

Karbon pasta elektrotu oluşturan diğer malzeme bağlayıcı sıvılardır. Kullanılan sıvı yüksek viskozite, hidrofilik, uçucu olmayan, organik çözücülere dayanıklı olan ve topaklanmaya engel olmayan bir sıvı olmalıdır. Mineral yağı olarak belirtilen nujol en çok tercih edilendir. Ayrıca organofosfat sıvılar, elektrolitik sıvılar veya silikon yağı da pasta bağlayıcı sıvı olarak kullanılabilir. Pasta elektrot grafit tozunun nujol ile karılıp

elektrotun gövdesine sıkıca doldurulmasıyla hazırlanmaktadır (Şekil 2.29). Elektrik iletkenliği için ise iletken tel bulunmaktadır (Polatoğlu, 2018).



Şekil 2.29. Grafit tozunun elektrot gövdesine doldurulması (Bodur, 2019).

2.11. Kaynak Araştırması

Izadyar ve arkadaşları 2022 yılında, mısırdan türetilen ikili enzim ile glukozu ölçmek için kolay, hızlı ve uygun maliyetli yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bitki tarafından üretilen mangan peroksidaz ve glukoz oksidaz enzimleri kullanılarak modifiye enzim elektrotu hazırlayıp glukozu tespit etmek için kullanmışlardır. Modifiye elektrotun çalışma aralığı $20,0 \mu\text{M} - 15,0 \text{ mM}$ derişimleri arasındadır. Deneylerde, karşıt elektrot olarak bir platin tel, çalışma elektrotu olarak 5 mm çapında bir altın elektrot ve referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrotları kullanılmıştır. Modifiye edilen altın elektrot yüzeyindeki glukozun oksidasyonu, 0,1 M fosfat tamponunda (pH 7,0) amperometrik olarak ölçülmüştür. Çalışma potansiyelini 0,84 V olarak belirlemişlerdir, tayin alt sınırı $2,9 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Biyosensörün tekrarlanabilirliği de incelenmiştir. Biyosensörün, askorbik asit ve sitrik asit gibi maddelere karşı girişimi araştırılmıştır. Biyosensörün tekrarlanabilirliğinin yüksek oranda olduğu, hassas ve seçici olduğu tespit edilmiştir (Izadyar ve diğerleri, 2022).

Jędrzak ve arkadaşları 2018 yılında, silika/lignin (SiO/Lig) hibrid materyaline dayalı enzim biyosensörü hazırlamışlardır. Glukoz oksidazın (GOx) yüzeyinde biyohibrid SiO/Lig adsorpsiyon yoluyla immobilize edilmiştir. Bu sistem, tek duvarlı karbon nanotüpler / platin nanopartiküller desteğiyle bir araya getirilmiştir. Ferrosen redoks aracılı GOx-SiO/Lig bazlı karbon pasta elektrotu hazırlamışlardır. Referans elektrot olarak Ag/AgCl karşıt elektrot olarak Pt tel kullanılmıştır. GOx-SiO/Lig/CPE, voltametri (CV) ve kromoamperometri teknikleri kullanılmıştır. Hidrojen peroksitin elektrooksidasyonu ve

elektroredüksiyonu ile ilgili anodik ve katodik akımlar gözlenerek oksidasyon akımı +0,3 V olarak belirlenmiştir. pH 7,0 biyosensör çalışması için en uygun olarak belirlenmiştir. Glukoz algılama hassasiyeti 0,78 mM olarak elde edilmiştir. 145 μ M'lik bir algılama sınırı (LOD) ile 0,5-9 mM'lik doğrusal bir tepki aralığı belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik RSD % 0,49 olarak hesaplanmıştır. L-askorbik, ürik asit ve L-sistein gibi yaygın girişim türleri glukoz tespitinde incelenmiştir (Jędrzak ve diğerleri, 2018).

Kausaite ve arkadaşları 2020 yılında, poli(1,10-fenantren-5,6-dion), poli(pirrol-2-karboksilik asit) (PPCA), altın nanopartiküller (AuNP) ve glukoz oksidaz (GOx)'dan oluşan nanobiyokompozite dayalı yeni bir amperometrik glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Bu amaçla, adsorbe edilmiş 1,10-fenantropolin-5,6-dion (PD) içeren grafit çubuk elektrotu, pirrol-2-karboksilik asit (PCA) ve kolloidal AuNP içeren bir tampon çözeltisi ile doldurulmuş elektrokimyasal hücreye daldırılmıştır. Çalışmada kovalent immobilizasyon ile yapılmıştır. Biyosensörün doğrusal aralığı 0,2-150,0 mM arasında olup, tespit sınırı 0,08 mM olarak belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik RSD %4,22 ve depolama ömrü için ise 14 gün boyunca başlangıç aktivitesinin sadece % 3,98'ini kaybettiği gözlemlenmiştir (Kausaite ve diğerleri, 2020).

Khumngern ve arkadaşları 2021 yılında, yeni bir glukoz oksidaz enzim biyosensörü hazırlamak için bir politiramin tabakası (AuNP'ler / Pty) üzerinde adsorbe edilen altın nanopartiküller üzerine glukoz oksidaza (GOD) çapraz bağlama ile immobilize edilerek hazırlanmıştır. Biyosensörü üretmek için Prusya mavisi (PB) modifiye edilmiş karbon elektrot üzerine kaplanmıştır. Biyosensörün yanıtı, indirgeme akımı boyunca bir Ag referans elektrotu kullanılarak -0,10 V potansiyelde ölçülmüştür. Optimize edilmiş deneysel koşullar altında, geliştirilen biyosensör 1,0 μ M-1,0 mM glukoz derişimi aralığında doğrusallık ve 1,0 μ M algılama sınırı göstermiştir. Michaelis Menten sabiti (K_m) 0,21 mM olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen biyosensör, 374 enjeksiyon üzerinde kullanım, 3 hafta boyunca uzun süreli kullanım, iyi tekrarlanabilirlik (RSD =% 1,9-4,3) ve yüksek seçicilik sergilemiştir (Khumngern ve arkadaşları, 2021).

Yang ve arkadaşları 2014 yılında, gümüş nanoküpler (AgNC) ve kitosan ile yaban turpu peroksidaz ve glukoz oksidaz enzimlerine dayanan bir amperometrik glukoz biyosensörü üretmişlerdir. Elde edilen biyosensörün performansını incelemek ve optimize etmek için sıklık voltametri (CV) ve amperometrik ölçümleri kullanılmıştır. Böylece, 0,6977 μ M'da

bir tespit sınırı ile 10 μM - 1,5 mM derişim aralığında glukozun ölçümü yapılmıştır. Ölçümler için 6,0 – 8,5 arasında bir pH değeri aralığı incelenmiştir. Biyosensörün raf ömrü 9 gün boyunca incelendikten sonra aktivitenin % 93 korunduğu ve iki hafta sonra da yaklaşık aktivitenin % 70 oranda korunduğu tespit edilmiştir (Yang ve diğerleri, 2014).

Baghayeri ve arkadaşları 2020 yılında, modifiye camı karbon elektrotunun tiyol ile manyetik nanopartiküller kullanılarak glukozun amperometrik tespiti için yeni bir sensör geliştirmişlerdir. ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SH}$) substratı, AgNP'lerin nanokompozit filmi ile modifiye edilmiştir. Çalışma potansiyeli 0,67 V, doğrusal çalışma aralığı 0,06-1000 μM arasındadır. Tespit sınırı, sinyal gürültü oranına göre 15 nM elde edilmiştir. Elektrotun tekrarlanabilirliğinde RSD = % 4,5'lik bir standart sapma elde edilmiştir (Baghayeri ve diğerleri, 2020).

Karagollu ve arkadaşları 2013 yılında, glukoz oksidaz immobilize enzim elektrotlarının hazırlanması ve glukozun amperometrik tespiti için yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu amaçla, farklı konfigürasyonlara sahip iki enzim elektrotu (A ve B elektrotları) hazırlamışlardır. Enzim elektrot yüzeyine kovalent bağlanma ile glukoz oksidazın (GOD) immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Glukozun amperometrik tayinleri pH 7,0'da gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar +0.4 V'luk sabit bir potansiyelde yapılmıştır (Karagollu ve diğerleri, 2013).

Cano ve arkadaşları 2008 yılında, glukoz tayini için PVC / TTF-TCNQ kompozit elektrot tabanlı basit ve etkili bir amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Glukoz oksidaz glutaraldehit ile çapraz bağlanarak immobilize edilmiştir. Glukoz tayini için doğrusal aralık 0,1 mM - 8,0 mM arasında ve elde edilen algılama sınırları $8,5 \times 10^{-6}$ olarak bulunmuştur, pH 7,4 değerinde çalışılmıştır. Çalışma potansiyeli +0,15 V olarak belirlenmiştir. $K_m = 9,0 \pm 0,5$ mM olarak hesaplanmıştır. Biyosensörün tekrarlanabilirliği, beş ardışık belirleme için RSD %1,2 olarak tespit edilmiştir (Cano ve diğerleri, 2008).

Singh ve arkadaşları 2009 yılında, polipirol (PPy) bazlı amperometrik glukoz biyosensörü geliştirmişlerdir. Bu amaçla glukoz oksidaz (GOD), PPy matrisinde, platin çalışma elektrotu üzerine, Ag/AgCl'ye karşı pirolün elektrokimyasal oksidasyonu ile immobilize edilmiştir. Çalışma potansiyeli +0,55 V olduğu belirlenmiştir. Biyosensör, 0,2–1,0 mM

doğrusal çalışma aralığına ve 5 günlük aktivite korunumuna sahiptir (Singh ve diğerleri, 2009).

Zor ve arkadaşları 2014 yılında, glukoz oksidazının karbon nanotüpler (CNT'ler) ve 1,10-fenantropolin-5,6-dion (PD) modifiye grafit elektrotlar üzerine immobilizasyonu ile glukoz tayini için amperometrik yeni bir biyosensör üretmiştir. Biyosensör, oksijen varlığında 0-50,0 mM glukoz derişimde doğrusal çalışma aralığına sahiptir. LOD 5,4 - LOQ 16,2 olarak hesaplanmıştır. Ürik asidin elektrot için girişim etkisi incelendiğinde, belli bir derişime kadar girişim etkisi gözlenmemiştir (Zor ve diğerleri, 2014).

Garjonyte ve arkadaşları 2000 yılında, elektrokimyasal olarak biriken bir polianilin (PA) tabakasında Prusya Mavisi modifiye edilmiş bir platin elektrot üzerinde glukoz oksidazın immobilizasyonu ile amperometrik glukoz biyosensörü hazırlanmıştır. Hazırlanan elektrot, pH 7,3'te, 0,6 V'luk bir çalışma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir (Garjonyte ve diğerleri, 2000).

Liu ve arkadaşları 2022 yılında, glukozu analit olarak kullanarak, bir diş fırçası üzerinde amperometrik bir biyosensörün başarılı bir şekilde geliştirilmesini ilk kez tasarlamışlardır. Diş fırçası sensörü, çalışma elektrotu olarak karbon grafit ve referans elektrotu olarak Ag/AgCl kullanılmıştır, ardından çalışma elektrotu üzerinde glukoz oksidazın immobilizasyonu yapılmıştır. Biyosensör, 0,18 mM ile 5,22 mM arasında değişen derişimde çalışma aralığına ve 5 dakikadan kısa algılama süresi göstermiştir böylece algılama sınırı 5,0 μ M olarak hesaplanmıştır. Çalışma potansiyeli 0,6 V olarak belirlenmiştir. Biyosensör 7 gün boyunca aktivitesini korumuştur (Liu ve diğerleri, 2022).

Popov ve arkadaşları 2021 yılında, amperometrik glukoz biyosensörü geliştirmek için polianilin (PANI), nafion ve glukoz oksidaz ile kombinasyon halinde indirgenmiş grafen oksit (rGO) kullanmışlardır. PANI nanoyapılarının ve rGO, nafion ve GOD'un dağılımı ile önceden modifiye edilmiş bir grafit elektrotu çalışma elektrotu olarak kullanılmıştır. Optimum pH 6,0 olarak belirlenmiştir. Çalışma +0,3 V potansiyelde gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen glukoz biyosensörü, geniş bir doğrusal aralık (0,5-50 mM), düşük algılama sınırı (0,089 mM), iyi seçicilik, tekrarlanabilirlik ve stabilite ile karakterize edilmiştir (Popov ve diğerleri, 2021).

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada süresince deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin adları ve temin edildiği firmalar Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Temin Edildiği Üretici Firma
Grafit tozu	Merck
Mineral yağ (nujol)	Sigma
Glukoz ($C_6H_{12}O_6$)	Merck
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Merck
Monosodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)	Merck
Glisin ($C_2H_5NO_2$)	Sigma
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Asetik asit (CH_3COOH)	Merck
Glutaraldehit ($C_5H_8O_2$)	Aldrich
Sığır serum albümin (BSA)	Sigma
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich
Glukoz oksidaz enzimi (Aspergillus niger'den saflaştırılmıştır)	Sigma
Ürik Asit ($C_5H_4N_4O_3$)	Sigma
Askorbik Asit ($C_6H_8O_6$)	Sigma
Parasetamol (Asetaminofen, $C_8H_9O_2N$)	Fluka
Üre (C_2H_4O)	Sigma
Sodyum asetat ($C_2H_3NaO_2$)	Aldrich
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Merck

3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler

Glukoz oksidaz enzimi çözeltisi: Aktivitesi 10000 ünite/mg olan glukoz oksidaz enziminden (Aspergillus niger'den saflaştırılmış) belli miktarda tartıldı ve toplam hacim 10,0 mL olacak şekilde saf su ile seyreltildi. Her biri 1 mL lik çözeltiler halinde eppendorfa alındı (1000,0 ünite/mL). Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında, uzun süre kullanılmadığı durumlarda ise derin dondurucuda saklandı.

Glukoz çözeltisi: Katı halde bulunan glukozdan gereken miktarda tartıldı ve fosfat tamponu içinde çözüldü. 100 ml $1,0 \times 10^{-3}$ M, $1,0 \times 10^{-2}$ M, $1,0 \times 10^{-1}$ M üç farklı stok çözelti

hazırlandı. Stok çözeltiden gerekli miktarlarda seyreltilerek uygun derişimlerde glukoz çözeltileri hazırlandı. Mutarotasyondan dolayı bir gece önceden hazırlanması gerekmektedir.

Fosfat tamponu: Derişimi 0,1 M pH değeri 6,0; 7,0; 8,0 olan fosfat tamponu çözeltileri hazırlamak için disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) ve monosodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) uygun miktarda tartıldı ve saf su içinde çözüldü. Çözeltilerin pH ayarlaması derişimi 0,1 M NaOH yardımı ile yapıldı. Tampon çözeltiler kullanılmadığı zamanlarda +4 °C’de buzdolabında bekletildi.

Glisin tamponu: pH değeri 9,0 olan tampon çözeltinin hazırlanmasında katı glisin uygun miktarda tartıldı ve saf su içinde çözüldü. Çözeltinin pH ayarlaması derişimi 0,1 M NaOH yardımı ile yapıldı. Tampon çözelti kullanılmadığı zamanlarda +4 °C’de buzdolabında bekletildi.

Asetik asit- sodyum asetat tamponu: pH değeri 5,0 olan tampon çözeltinin hazırlanmasında sodyum asetat uygun miktarda tartıldı ve saf su içinde çözüldü. Çözeltinin pH ayarlaması derişimi 0,1 M CH_3COOH yardımı ile yapıldı. Tampon çözelti kullanılmadığı zamanlarda +4 °C’de buzdolabında bekletildi.

Hidrojen peroksit çözeltisi: %35,0’luk hidrojen peroksit çözeltisinden uygun miktarda alınarak iki farklı derişimde 0,01 M ve 0,1 M’ lık stok çözeltiler hazırlandı. Bu stok çözeltilerden seyreltme yapılarak istenilen derişimlerde hidrojen peroksit çözeltileri hazırlandı.

Glutaraldehit çözeltisi: %25’lik glutaraldehit çözeltisi önce %5,0’lik glutaraldehit çözeltisine seyreltili. Sonra %5,0’lik glutaraldehit çözeltisinden %2,5’luk glutaraldehit çözeltisi seyreltilip hazırlandı, çözelti +4 °C’de buzdolabında saklandı.

Askorbik asit çözeltisi: Katı askorbik asitten gereken miktarda tartılıp tampon içinde çözümlenerek askorbik asit çözeltisi hazırlandı, çözelti +4 °C’de buzdolabında saklandı.

Ürik asit çözeltisi: Katı ürik asitten gereken miktarda tartılıp tampon içinde çözümlenerek ürik asit çözeltisi hazırlandı, çözelti +4 °C’de buzdolabında saklandı.

Parasetamol çözeltisi: Katı parasetamolden gereken miktar tampon çözelti içerisinde çözülerek parasetamol çözeltisi hazırlandı, çözelti +4 °C’de buzdolabında saklandı.

Üre çözeltisi: Katı üreden gereken miktar tampon çözelti içerisinde çözülerek üre çözeltisi hazırlandı, çözelti +4 °C’de buzdolabında saklandı.

Sodyum hidroksit çözeltisi: Derişimi 0,1 M olan sodyum hidroksit çözeltisinin hazırlanması için katı sodyum hidroksitten uygun miktarda tartıldı ve saf su içinde çözüldü.

3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

3.3.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

Tez çalışmasındaki bütün elektrokimyasal deneyler bilgisayar bağlantılı şekilde çalışan CHI firmasının 1230-A modeli elektrokimyasal analiz cihazı kullanılarak yapıldı.

3.3.2. Hücre ve elektrotlar

Amperometrik ölçüm işlemleri, üç elektrotlu elektrokimyasal hücre kullanılarak yapıldı. Bu üç elektrottan çalışma elektrotu olarak 0,3 cm çapındaki karbon pasta elektrot Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Referans elektrot olarak BAS RE-5B numaralı Ag/AgCl elektrot ve karşıt elektrot olarak MW-1032 numaralı platin tel kullanıldı. Çalışma elektrotu yapılan deneylerden sonra deneyin ilerleme basamaklarına göre saf suda ya da tampon çözelti içerisinde +4 °C’de buzdolabında bekletildi.



Şekil 3.1. Teflondan yapılmış karbon pasta elektrot

3.3.3. Mikro pipet

Brand marka $\pm 0,05$ μL hassasiyeti olan mikro pipetler 10 μL - 1000 μL çözeltilerin hücre içerisine eklenmesinde ve gereken tüm çözeltilerin hazırlanmasında kullanıldı.

3.3.4. pH metre

Tüm deneyler süresince hazırlanan tampon çözeltilerin pH'ı ORION 720A pH metre ile ölçüldü.

3.3.5. Su Banyosu

Sıcaklık çalışmalarında ısıtma işlemi ve su döngüsü bulunan termostatlı Grant GD120 su banyosu kullanıldı.

3.3.6. Saf su elde etmek için cihaz

Tüm çalışma süresince kullanılan çözeltiler, GFL marka saf su cihazından alınan saf su ile hazırlanıp kullanılmıştır.

3.4. Glukoz Biyosensörünün Hazırlanması ve En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında Prof. Dr. Nurşen SARI ve Araş. Gör. Selin Su DİKİM tarafından sentezlenen 5 farklı, 4-aminoantipiren içeren Schiff bazları ile modifiye karbon pasta elektrotlar hazırlayarak glukoz biyosensörü tasarımında kullanıldı.

Deneysel çalışmada yapılan işlemler;

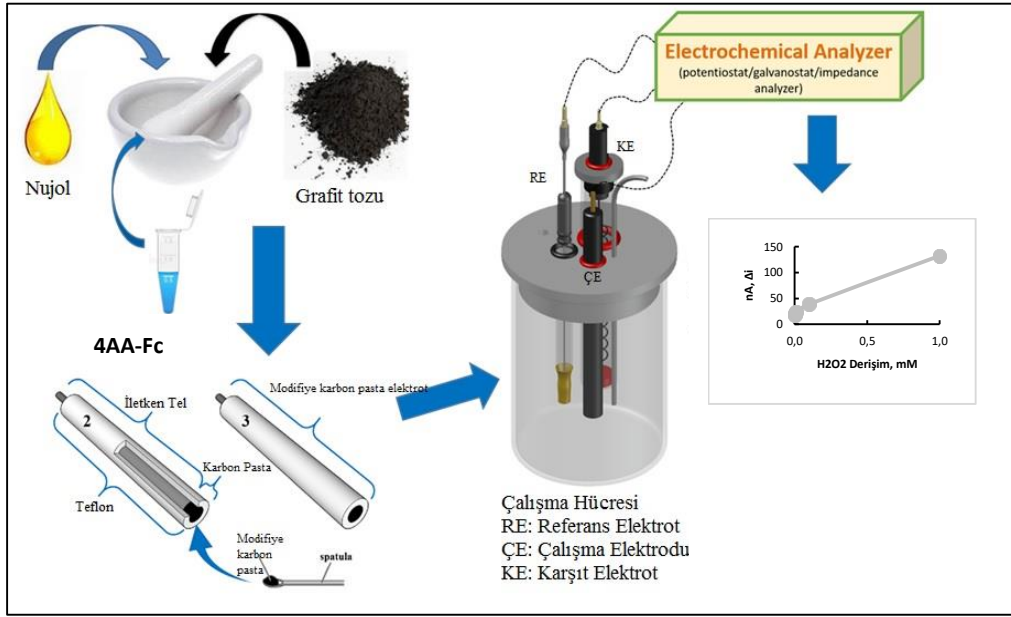
- 1) Sentezlenmiş (N-ferroseniliden-4-aminoantipiren, Salisiliden-4-aminoantipiren, 5-floro-3-metilsalisiliden-4-aminoantipiren, 5-floro-3-kloro-4-aminoantipiren, 5-florosalisiliden-4-aminoantipiren) maddeleri ile modifiye karbon pasta elektrotlar hazırlandı.
- 2) Literatürlerde genellikle glukoz biyosensörlerinin prensibi, glukoz ile glukoz oksidaz enzimi arasındaki tepkime sonucu açığa çıkan H_2O_2 'nin yükseltgenme akımlarının ölçülmesi esasına dayandırılmıştır. Bu prensip esas alınarak hazırlanan 5 modifiye karbon pasta elektrotun hidrojen perokside duyarlılıkları tespit edildi.

- 3) Modifiye elektrotlardan H_2O_2 'ye en duyarlı olanlar seçilerek glukoz biyosensörü tasarımında kullanıldı.
- 4) Seçilen modifiye karbon pasta elektrot ile H_2O_2 'in anodik akımlarının ölçüldüğü en iyi potansiyel ve en iyi miktar optimizasyonu yapıldı.
- 5) Optimize edilen modifiye karbon pasta elektrota glukoz oksidaz enzimi immobilize edilerek biyosensör hazırlandı.
- 6) Biyosensörün glukoz duyarlılığına immobilizasyon işlemlerinde kullanılan glutaraldehit miktarının etkisi incelendi.
- 7) Biyosensörün en iyi çalışma pH'ı ve sıcaklığı belirlendi.
- 8) Hazırlanan biyosensörün glukoz cevabına substrat derişiminin etkisi ve kalibrasyon grafiğı belirlendi.
- 9) Son olarak biyosensörün performansını etkileyen faktörlerden olan tekrarlanabilirlik, girişim etkileri, raf ömrü ve gerçek numune çalışmaları yapıldı.

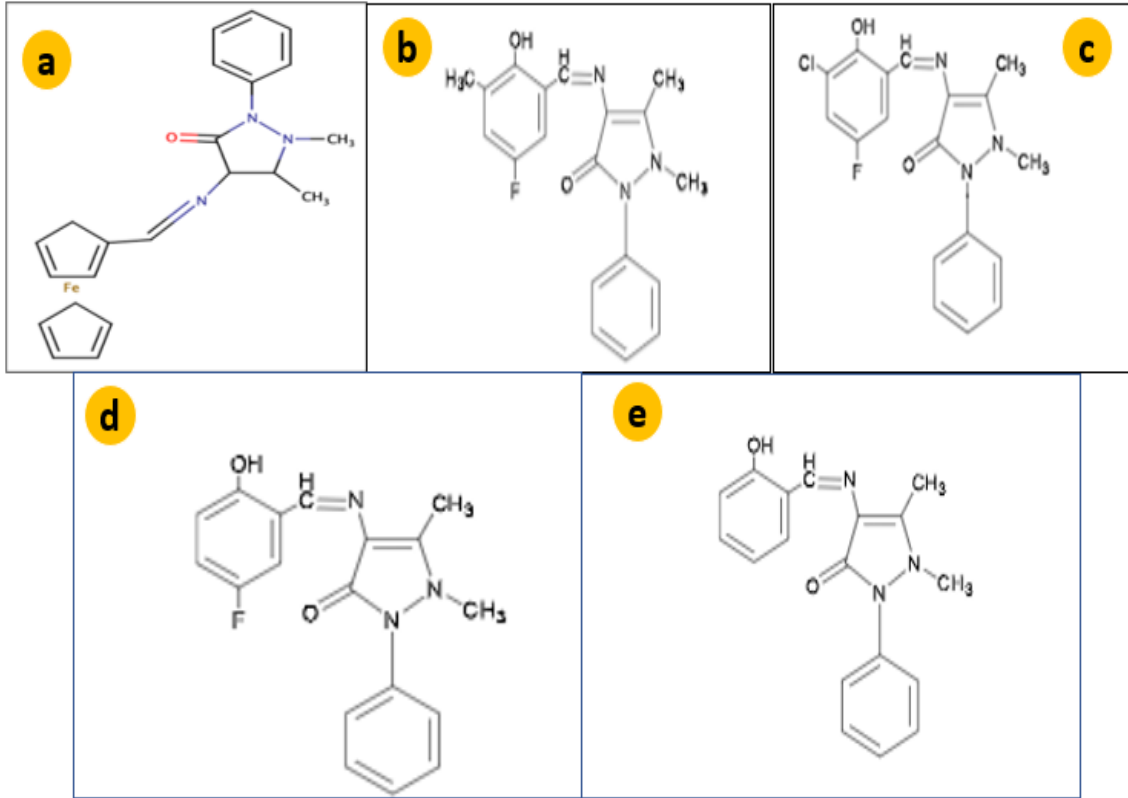
3.4.1. Çalışma elektrotunun hazırlanması: Karbon pasta elektrot (CPE) ve modifiye karbon pasta elektrot (MCPE) hazırlanması

Çalışılacak karbon pasta elektrot (CPE) saf su ile iyice temizlendi. Elektrotun hazırlanması için 62,5 mg grafit tozu hassas terazi ile tartıldı. Uygun bir saat camı üzerine alındı. Saat camı üzerinde bulunan grafit tozunun üzerine bir arada tutma özelliğı olan mineral yağdan (nujol) 20 μ L mikro pipet yardımıyla alınarak damlatıldı. Böylece grafit tozu ve mineral yağ uygun bir kıvam alana kadar birbiriyle iyice yoğuruldu. İstenilen kıvamda olan grafit tozu ve mineral yağ karışımı saf su ile iyice temiz hale getirilen karbon pasta elektrot içerisindeki boşluğı dolduruldu. Doldurma işlemi yapılırken madde kaybı olmamasına önemle dikkat edildi (Şekil 3.2). Doldurma işleminin ardından karbon pasta elektrotun yüzeyi pürüzsüz hale getirildi. Bu işlem için özel bir ped kullanıldı. Hazırlanan CPE saf su ile yıkandı ve kullanıma hazır hale getirilmiş oldu.

Modifiye karbon pasta elektrot hazırlanmasında ise; yukarıda verilen CPE'nin hazırlanması işleminden farklı olarak, hazırlanan karbon pasta (grafit tozu + nujol) üzerine uygun miktar Schiff bazı eklenip istenilen kıvamı alana kadar yoğurulması ve elektrot içine doldurulması ile yapıldı. MCPE tüm deneysel süreçte bu şekilde hazırlanıp kullanıldı. Bu tez çalışmasında modifiye işlemi için kullanılan Schiff bazları Şekil 3.3' gösterilmektedir.



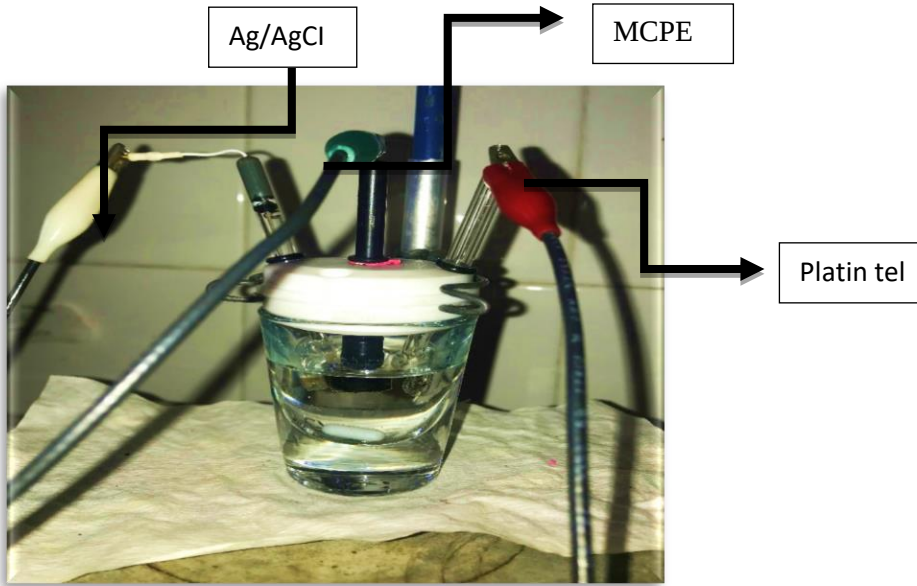
Şekil 3.2. MCPE hazırlanması ve çalışma hücresi şeması



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan Schiff bazları a-) 4AA-Fc (N-ferroseniliden-4-aminoantipiren) b-) 4AA-5F3MSA (5-floro-3-metilsalisiliden-4-aminoantipiren) c-) 4AA-3C5FSA (5-floro-3-kloro-4-aminoantipiren) d-) 4AA-5FSAA (5 florosalisiliden-4-aminoantipiren) e-) 4AA-SA (Salisiliden-4-aminoantipiren)

3.4.2. Karbon pasta elektrotun sabit akıma getirilmesi

Elektrokimyasal hücre içerisine pH'ı 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu ilave edildi. Üzerine 1M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. Deneysel çalışmamızda kullanacağımız MCPE, karşıt elektrot (Pt tel) ve referans elektrotumuz olan (Ag/AgCl) elektrot çalışma hücresi içerisine yerleştirildi (Şekil 3.4). Çalışılacak potansiyelde elektrot akımı sabitlenene kadar bir süre bekletildi. Sabitlenme olduğu anda akım değeri denge akımı olarak kaydedildi. Tüm çalışmalar boyunca bu işlem yapıldı.



Şekil 3.4. Çalışma Hücresi

3.4.3. CPE ve MCPE' lerin H_2O_2 duyarlılığının belirlenmesi

Elde edilen CPE ve MCPE'nin H_2O_2 ' ye olan duyarlılığının karşılaştırılması standart H_2O_2 çözeltileri ile yapıldı. CPE ve MCPE elektrotlarının H_2O_2 'ye duyarlılığının belirlenmesi, H_2O_2 'nin artan anodik akımlarının ölçülmesin esasına dayanmaktadır. Bu ölçümlerde amperometrik yöntem kullanılmıştır. Çalışma hücresi içerisine pH'ı 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tamponu çözeltisi, 1M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. CPE ve MCPE +0,7 V potansiyelde sabit akıma getirildikten sonra denge akımı kaydedildi. Çalışılan hücre içine H_2O_2 derişimi $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M aralığında olacak şekilde eklendi. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 1dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değerleri kaydedildi. Her bir ekleme sonrası ölçülen akım değerleri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerlerinin hesabı yapıldı. Artan derişimlerde H_2O_2 eklemelerine karşı artan akım farkı değerleri grafiğe geçirildi. Aynı işlem 5 farklı madde (N-ferroseniliden-4-aminoantipiren, Salisiliden-4-aminoantipiren, 5-floro-3-metilsalisiliden-4-aminoantipiren, 5-floro-3-kloro-4-aminoantipiren, 5-florosalisiliden-4-aminoantipiren) için de yapıldı ve elde edilen akım farkı değerleri grafiğe geçirilerek CPE ve MCPE'nin grafikleri karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucu duyarlılık cevap akımı CPE'den daha büyük olan 4AA-Fc (N-ferroseniliden-4-aminoantipiren) olduğu belirlendi. Bundan sonraki çalışmalarda 4AA-Fc içeren MCPE kullanıldı.

3.4.4. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Bu MCPE için en uygun çalışma potansiyelinin belirlenmesi amacıyla, farklı potansiyelerde (+0,7 V, +0,6 V, +0,5 V, +0,4 V) H_2O_2 'nin anodik akımları ölçüldü. Çalışma hücresi içerisine pH'ı 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. MCPE çalışılan potansiyelde sabit akıma getirilip denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içine H_2O_2 'nin derişimi $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M aralığında olacak şekilde çözelti eklemeleri yapıldı. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 1dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değerleri kaydedildi. Her bir ekleme sonrası ölçülen akım değerleri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerleri hesaplandı. Artan derişimlerde H_2O_2 eklemelerine karşı artan akım farkı değerleri grafiğe geçirildi. Bu işlemler çalışılan tüm potansiyeller için tekrar edildi ve en uygun çalışma potansiyel belirlenmiş oldu.

3.4.5. MCPE'nin H_2O_2 duyarlılığına 4AA-Fc miktarının belirlenmesi

Elektrotlar fark miktarlarda (1,5 mg, 2,5 mg, 3,5 mg) 4AA-Fc eklenerek hazırlandı (Şekil 3.5). Çalışma hücresi içerisine pH'ı 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. MCPE çalışılan potansiyelde sabit akıma getirilip denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içine H_2O_2 'nin derişimi $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M aralığında olacak şekilde çözelti eklemeleri yapıldı. MCPE belirlenen çalışma potansiyelinde (+0,4 V) sabit akıma getiriliktten sonra denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içine H_2O_2 'nin derişimi $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M aralığında olacak şekilde çözelti eklemeleri yapıldı. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 1dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değerleri kaydedildi. Her bir ekleme sonrası ölçülen akım değerleri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerlerinin hesabı yapıldı. Artan derişimlerde H_2O_2 eklemelerine karşı artan akım farkı değerleri grafiğe geçirildi. Bu işlemler sırasıyla çalışılan tüm miktarlar için tekrar edildi ve en uygun çalışılacak miktar belirlenmiş oldu.



Şekil 3.5. 4AA-Fc Miktar çalışma elektrotları

3.4.6. MCPE' ye glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu

Glukoz oksidaz enziminin MCPE' ye çapraz bağlama yöntemiyle immobilizasyonu yapıldı. Bu çalışma için 2,0 mg sığır serum albümin (BSA), 50 μL pH 7 fosfat tampon çözelti, 50 μL glukoz oksidaz enzimi (1000 ünite/ml) ve 30 μL glutaraldehit içeren bir karışım hazırlandı. Hazırlanan karışım, daha önceden hazırlanmış olan modifiye karbon pasta elektrot yüzeyinin her tarafına eşit miktarda dağılacak şekilde mikro pipetle damlatıldı ve oda sıcaklığında kurutulmaya bırakıldı (Şekil 3.6). Elektrot kuruduktan sonra saf su ile yıkandı. Enzim elektrot kullanılmadığı zamanlarda fosfat tamponu içerisinde +4 °C' de buzdolabında bekletildi. Bu şekilde hazırlanan elektrotun glukozu duyarlılığı incelendi. Bunun için MCPE belirlenen çalışma potansiyelinde (+0,4V) sabit akıma getiriliktikten sonra denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M aralığında olacak şekilde çözelti eklemeleri yapıldı. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Enzimatik tepkime sonrasında oluşan H_2O_2 'nin anodik akımı 200 saniye sonra ölçüldü. Artan derişimlerde glukoz çözeltileri eklemelerine karşı artan akım farkı değerleri grafiğe geçirildi. Glukoz oksijen ile glukoz oksidaz enzimi varlığında; $\text{Glukoz} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Glukonik asit} + \text{H}_2\text{O}_2$ tepkimesini vermektedir.



Şekil 3.6. Elektrot yüzeyine enzim immobilizasyonu

3.4.7. Glutaraldehit miktarının belirlenmesi

Glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonunda çapraz bağlamak için kullanılan glutaraldehitin etkisini incelemek amacıyla 2,0 mg sığır serum albümin (BSA), 50 μL pH 7 fosfat tampon çözelti, 50 μL glukoz oksidaz enzimi ve sırasıyla farklı miktarlarda (20, 30, 40 μL) glutaraldehit içeren karışımlar hazırlandı. Hazırlanan karışım, daha önceden hazırlanmış olan modifiye karbon pasta elektrot yüzeyinin her tarafına eşit miktarda dağılacak şekilde mikro pipetle damlatıldı ve oda sıcaklığında kurutulmaya bırakıldı. Elektrot kurduktan sonra saf su ile yıkandı. Bunun için MCPE belirlenen çalışma potansiyelinde (+0,4V) sabit akıma getiriliktten sonra denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M aralığında olacak şekilde çözelti eklemeleri yapıldı. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değerleri kaydedildi. Artan derişimlerde glukoz çözeltileri eklemelerine karşı artan akım farkı değerleri grafiğe geçirildi. Böylece en uygun çalışılacak glutaraldehit miktarı belirlenmiş oldu.

3.4.8. Glukoz biyosensörünün en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi

pH etkisi

Hazırlanan glukoz biyosensörünün amperometrik cevap akımına pH etkisinin incelenmesi için 5 farklı pH'a sahip tampon çözeltiler hazırlandı. pH 5,0 için asetik asit sodyum asetat tampon çözeltisi ($\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$); 6,0; 7,0; 8,0 için fosfat tampon çözeltisi ($\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{NaH}_2\text{PO}_4$); 9,0 için glisin tampon çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu tampon çözeltiler ile aynı pH' da olacak şekilde derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olan glukoz çözeltileri hazırlandı. Böylece glukoz biyosensörü belirlenen çalışma potansiyelinde (+0,4V) sabit akıma getirilip ve denge akımı kaydedilmiş oldu. Sonra çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde çözelti eklemesi yapıldı. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Ekleme sonrası ölçülen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerinin hesabı yapıldı. Bu işlem 5 farklı pH değerindeki (5,0-6,0-7,0-8,0-9,0) bütün tampon çözeltileri için tekrarlandı. Akım farkı (Δi) değerleri ve pH değerleri grafiğe geçirildi. Akım değerleri karşılaştırılarak en uygun pH değeri belirlendi.

Sıcaklık etkisi

Hazırlanan glukoz biyosensörünün cevap akımına sıcaklık etkisinin incelenmesi için çalışma hücresi içerisine pH'ı 8,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. MCPE çalışılan potansiyelde (+0,4V) sabit akıma getirilip denge akımı kaydedildi. Hazırlanan biyosensör için Grant GD 120 termostatl dolaşım su banyosu kullanıldı. Çalışma hücresindeki çözeltinin sıcaklığı 20 °C'ye ayarlandı. Sonra çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde çözelti eklemesi yapıldı. Ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Ekleme sonrası ölçülen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerinin hesabı yapıldı. Yapılan tüm deneysel basamaklar 20, 30, 40, 50, 60, 70 °C sıcaklıkları için de tekrarlandı. Akım farkı (Δi) değerleri ve sıcaklık değerleri grafiğe geçirildi. Akım değerleri karşılaştırılarak en uygun immobilize enzim elektrotun en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık tespit edildi. Ancak deneysel çalışmalar oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Substrat derişiminin etkisi

Hazırlanan glukoz biyosensörünün cevap akımına substrat derişiminin etkisini incelemek için çalışma hücresi içerisine pH'ı 8,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. MCPE çalışılan potansiyelde (+0,4V) sabit akıma getirilip denge akımı kaydedildi. Sonra çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M olacak şekilde glukoz çözeltileri eklendi. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Eklemeler sonrası ölçülen akım değerleri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerlerinin hesabı yapıldı. Akım farkı (Δi) değerleri ve glukoz derişimleri grafiğe geçirildi (Michaelis-Menten eğrisi). Bu grafikten yola çıkılarak glukoz tayini için kullanılabilirlik doğrusal çalışma aralığı tespit edildi. Daha sonra Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Lineweaver-Burk grafiğinden de $K_{m(göz)}$ ve $I_{maks(göz)}$ değerleri belirlenmiş oldu.

Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

Hazırlanan glukoz biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi için, çalışma hücresi içerisine pH'ı 8,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. MCPE çalışılan potansiyelde(+0,4V) sabit akıma getirilip denge akımı kaydedildi. Sonra çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde glukoz çözeltileri eklendi. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Eklemeler sonrası ölçülen akım değerleri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerlerinin hesabı yapıldı. Bu çalışma 15 kez tekrar edildi. Akım farkı (Δi) değerleri ve ölçüm sayısı grafiğe geçirildi.

Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Hazırlanan glukoz biyosensörünün raf ömrünün incelenmesi için, çalışma hücresi içerisine pH'ı 8,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. MCPE çalışılan potansiyelde(+0,4V) sabit akıma getirilip denge akımı kaydedildi. Sonra çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde glukoz çözeltileri eklendi. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla

15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Ekleme sonrası ölçülen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerinin hesabı yapıldı. Yapılan deneysel çalışma farklı aralıklarla (1-3-5-15. gün) tekrar edildi. Akım farkı (Δi) değerleri ve çalışma yapılan gün sayısı grafiğe geçirildi. Böylece hazırlanan glukoz biyosensörünün raf ömrü tespit edilmiş oldu.

3.4.9. Glukoz tayinine girişim yapan türlerin incelenmesi

Hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine gerçek numunede bulunan ve girişim etkisi yapabilecek farklı maddelerden ürik asit, parasetamol (asetaminofen), üre ve askorbik asidin etkileri incelendi. Bu farklı maddeler ve derişimleri şu şekilde; askorbik asit ($1,0 \times 10^{-4}$ M), ürik asit ($3,0 \times 10^{-4}$ M), parasetamol ($1,0 \times 10^{-4}$ M) ve üre ($2,5 \times 10^{-3}$ M) sıralanabilir.

Askorbik asidin girişim etkisinin incelenmesi

Çalışma hücresi içerisine pH'ı 8,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. MCPE çalışılan potansiyelde (+0,4V) sabit akıma getirilip denge akımı kaydedildi. Sonra çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde glukoz çözeltisi eklendi. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Ekleme sonrası ölçülen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerinin hesabı yapıldı. Aynı çalışma hücresi içerisine hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde askorbik asit ilave edildi. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Ekleme sonrası ölçülen akım değeri glukozun cevap akımından çıkarılarak askorbik asidin neden olduğu cevap akımının hesabı yapıldı. Bu akım farkı ile glukoz tayinine askorbik asidin yüzde ne kadar girişimi olduğu hesap edildi.

Parasetamolün girişim etkisinin incelenmesi

Çalışma hücresi içerisine pH'ı 8,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. MCPE çalışılan potansiyelde (+0,4V) sabit akıma getirilip denge akımı kaydedildi. Sonra çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde glukoz çözeltisi eklendi. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Ekleme sonrası ölçülen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerinin hesabı yapıldı. Aynı çalışma hücresi içerisine hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde parasetamol ilave edildi. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Ekleme sonrası ölçülen akım değeri glukozun cevap akımından çıkarılarak parasetamolün neden olduğu cevap akımının hesabı yapıldı. Bu akım farkı ile glukoz tayinine parasetamolün yüzde ne kadar girişimi olduğu hesap edildi.

Ürik asidin girişim etkisinin incelenmesi

Çalışma hücresi içerisine pH'ı 8,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. MCPE çalışılan potansiyelde (+0,4V) sabit akıma getirilip denge akımı kaydedildi. Sonra çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde glukoz çözeltisi eklendi. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Ekleme sonrası ölçülen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerinin hesabı yapıldı. Aynı çalışma hücresi içerisine hücre içi derişimi $3,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde ürik asit ilave edildi. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Ekleme sonrası ölçülen akım değeri glukozun cevap akımından çıkarılarak ürik asidin neden olduğu cevap akımının hesabı yapıldı. Bu akım farkı ile glukoz tayinine ürik asidin yüzde ne kadar girişimi olduğu hesap edildi.

Ürenin girişim etkisinin incelenmesi

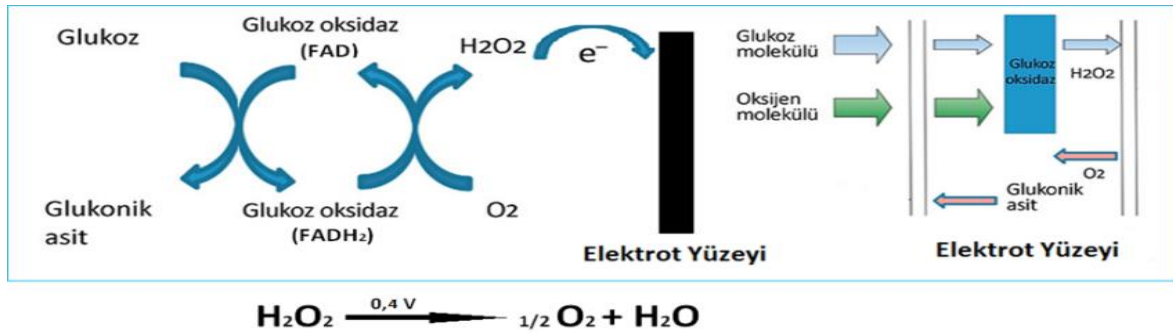
Çalışma hücresi içerisine pH'ı 8,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. MCPE çalışılan potansiyelde (+0,4V) sabit akıma getirilip denge akımı kaydedildi. Sonra çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde glukoz çözeltisi eklendi. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Ekleme sonrası ölçülen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerinin hesabı yapıldı. Aynı çalışma hücresi içerisine hücre içi derişimi $2,5 \times 10^{-3}$ M olacak şekilde üre ilave edildi. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Ekleme sonrası ölçülen akım değeri glukozun cevap akımından çıkarılarak ürenin neden olduğu cevap akımının hesabı yapıldı. Bu akım farkı ile glukoz tayinine ürenin yüzde ne kadar girişimi olduğu hesap edildi.

3.4.10. Gerçek numunede (meyve suyu) glukoz tayini

Biyosensörün gerçek örneklerle uygulanabilirliğini belirlenmek için LC/MS ve GC/MS yöntemleri kullanılarak içeriğindeki glukoz miktarı tespit edilen meyve suyu örneği referans olarak kullanıldı (Walker ve diğerleri, 2014). Bu amaçla, biyosensör +0,4 V potansiyelde, pH 8,0 tampon çözeltisinde, 25 °C'de dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Daha sonra biyosensörün doğrusal çalışma aralığına denk gelen, hücre içi glukoz derişimi $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M arasında olacak şekilde 4 farklı derişim eklenerek bir kalibrasyon grafiği elde edildi. Çalışma hücresi içerisine, 10^6 kat seyreltme olacak şekilde meyve suyu örneği ilave edilerek akım değişimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Bu işlem 3 kere tekrar edildi. Böylece elde edilen akım değerlerinden, kalibrasyon grafiği yardımı ile, glukoz derişimi hesaplandı.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, glukozun tayini için Schiff bazı ile enzim esaslı yeni bir glukoz biyosensörü geliştirildi. Bunun için ilk önce, enzimatik tepkimeler sonucunda meydana gelen hidrojen peroksit (H_2O_2) duyarlı modifiye karbon pasta elektrot (MCPE) hazırlandı. 4AA-Fc karbon pasta elektrotu modifiye etmek için kullanıldı. Daha sonra glukoz oksidaz enzimi modifiye edilen karbon pasta elektrot yüzeyine çapraz bağlama yöntemi ile immobilize edildi. Glukoz oksijen ile etkileştiğinde ve glukoz oksidaz enziminin etkisiyle glukonik asit ve H_2O_2 açığa çıkmaktadır. Enzimatik tepkime sonucu açığa çıkan H_2O_2 elektrot yüzeyinde yükseltgenmektedir. Böylece glukozun tayini H_2O_2 'in +0,4 V' da anodik akımının ölçülmesiyle yapıldı (Şekil 4.1) (Bodur, 2019).



Şekil 4.1. Glukoz tayini için reaksiyon şeması

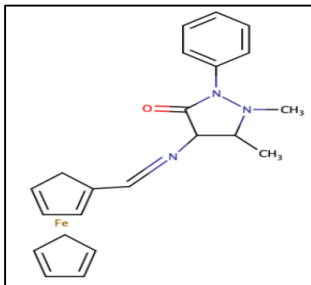
MCPE yüzeyinde immobilize edilmiş glukoz oksidaz enzimi ile glukoz arasında biyokimyasal bir tepkime gerçekleşmektedir. İlk olarak glukoz oksijen molekülü ile glukonik asit oluşturur. Glukoz oksidazın prostetik grubu olan FAD, elektron alıp $FADH_2$ 'ye indirgenir. Enzim içindeki $FADH_2$, kimyasal tepkimeyi tersinir kılmak için çözelti içerisindeki oksijene elektronlarını verip yükseltgenmektedir. Böylece enzim ilk haline geri döner. Oksijen molekülü de elektronları alıp H_2O_2 'e indirgenmektedir. Enzimatik tepkime sonucu açığa çıkan H_2O_2 elektrot yüzeyinde yükseltgenmektedir. Böylece glukozun tayini H_2O_2 'in +0,4V'da anodik akımının ölçülmesiyle yapılabilmektedir.

Tasarlanan biyosensörün; amperometrik cevabına 4AA-Fc (N-ferroseniliden-4-aminoantipiren) miktarının, çalışma potansiyeli değerinin ve substrat derişiminin etkisi amperometrik i-t yöntemi ile belirlendi. Biyosensörün performansını etkileyen faktörler

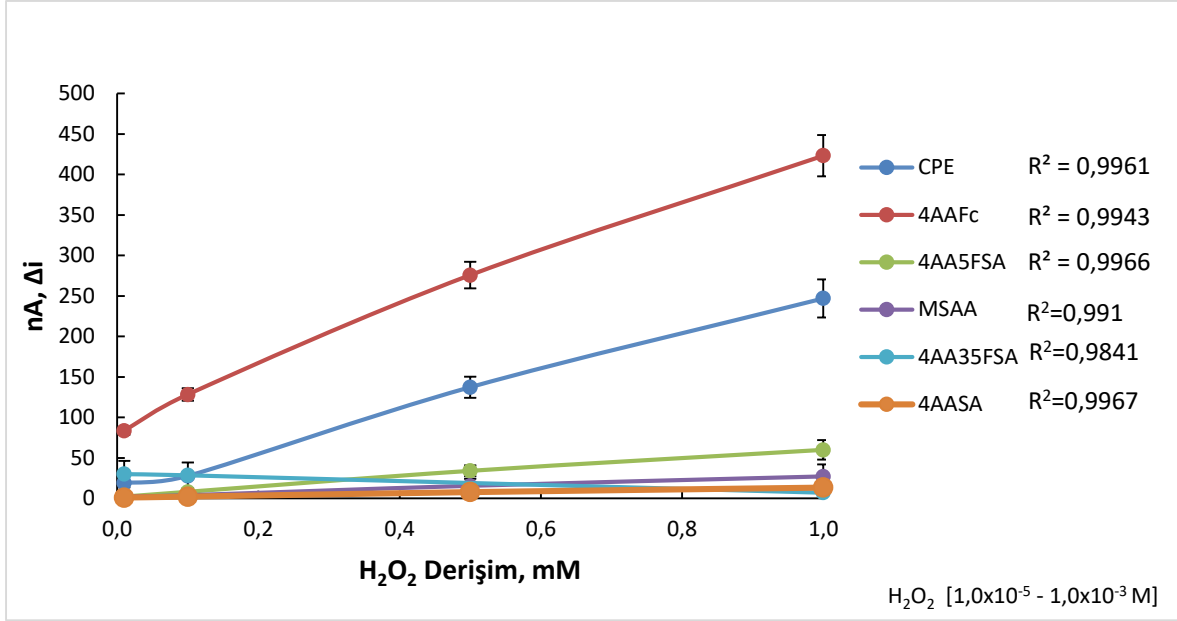
olan tekrarlanabilirlik, raf ömrü, girişim etkisi, pH, sıcaklık, substrat derişiminin etkisi parametreleri incelendi.

4.1. CPE ve MCPE' nin H₂O₂'ye Duyarlılığının Belirlenmesi

Karbon pasta elektrot ve modifiye karbon pasta elektrotun H₂O₂'ye duyarlılığının belirlenmesi çalışma hücresi içindeki H₂O₂'nin oluşturduğu yükseltgenme (anodik) cevap akımının karşılaştırılmasıyla belirlendi. CPE ve MCPE (4AA-Fc) +0,7 V potansiyelde sabit akıma getirilerek, denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içindeki H₂O₂'nin derişimi 1,0x10⁻⁷- 1,0x10⁻³ M aralığında olacak şekilde eklemeler yapıldı. Her bir ekleme sonrası ölçülen akım değerleri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerlerinin hesabı yapıldı. Artan derişimlerde H₂O₂ eklemelerine karşı artan akım farkı değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.3). Grafik incelendiğinde 5 farklı madde (N-ferroseniliden-4-aminoantipiren, Salisiliden-4-aminoantipiren, 5-floro-3-metilsalisiliden-4-aminoantipiren, 5-floro-3-kloro-4-aminoantipiren, 5-florosalisiliden-4-aminoantipiren) karbon pasta elektrotu modifiye etmek için kullanılmıştı. En iyi cevap akımı 4AA-Fc (N-ferroseniliden-4-aminoantipiren) (Şekil 4.2) maddesi olarak belirlendi. MCPE' de elde edilen cevap akımının CPE' de elde edilen cevap akımından yaklaşık olarak 2 kat daha fazla olduğu görüldü. Bundan sonraki çalışmalarda 4AA-Fc ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot kullanıldı. Glukoz biyosensörünün tasarımı bu madde ile yapıldı. 4AA-Fc maddesinde ferrosen yapısı vardır. Ferrosen elektron aktarımını kolaylaştırdığından dolayı diğer Schiff bazlarından daha yüksek cevap akımları oluşturduğu düşünülmektedir.



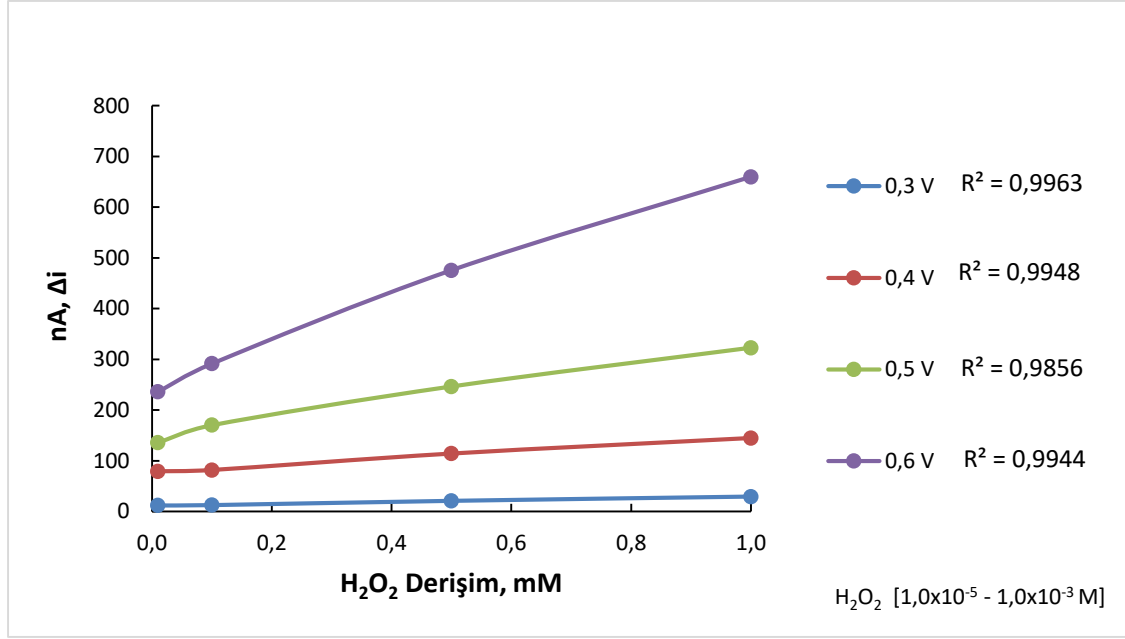
Şekil 4.2. 4AA-Fc (N-ferroseniliden-4-aminoantipiren)



Şekil 4.3. CPE ve MCPE' nin H_2O_2 'ye duyarlılığının belirlenmesi

4.2. Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi

Modifiye karbon pasta elektrotun H_2O_2 'ye duyarlılığının belirlenmesi için farklı çalışma potansiyellerinde (+0,7V, +0,6V, +0,5V, +0,4V, +0,3V) anodik akımlar ölçüldü. H_2O_2 derişimine karşı ölçülen akım farkı (Δi) değerleri grafiğe geçirildi. Şekil 4.4 incelendiğinde potansiyel arttıkça hidrojen peroksidin anodik akımlarının da arttığı görülmektedir. Yüksek potansiyellerde çalışmak gerçek örneklerde çalışırken girişim problemi yarattığı literatürde belirtilmektedir (Ustabaş, 2010). O nedenle doğrusallığı iyi olan +0,4 V çalışma potansiyeli olarak seçildi. +0,3V da ki doğrunun da korelasyon katsayısı iyiydi ama düşük akımlar gösterdiğinden dolayı bu potansiyel çalışma potansiyeli olarak seçilmedi.

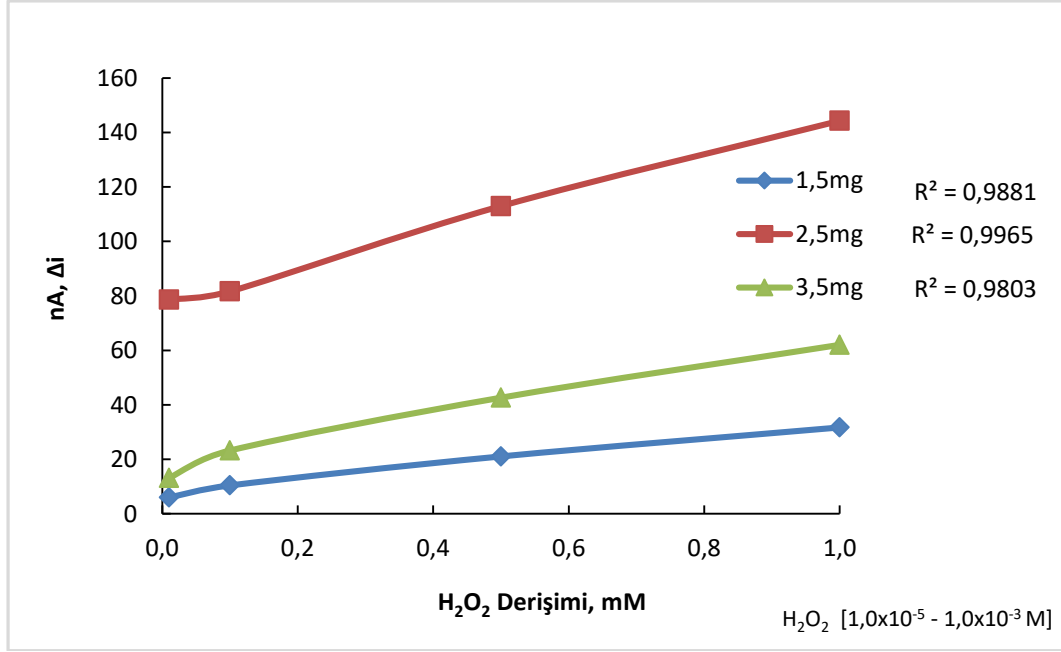


Şekil 4.4. MCPE' nin H₂O₂'ye duyarlılığına çalışma potansiyelinin etkisi

4.3. 4AA-Fc Miktarının Belirlenmesi

Hazırlanan modifiye karbon pasta elektrotta kullanılan 4AA-Fc (N-ferroseniliden-4-aminoantipiren) miktarının glukozu duyarlılığı incelendi. Elektrot farklı miktarlarda (1,5 mg, 2,5 mg, 3,5 mg) 4AA-Fc eklenerek hazırlandı. Çalışma hücresi içerisine pH'ı 7,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. MCPE çalışılan potansiyelde sabit akıma getirilip denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içine H₂O₂'nin derişimi 1,0x10⁻⁷- 1,0x10⁻³ M aralığında olacak şekilde çözelti eklemeleri yapıldı. MCPE belirlenen çalışma potansiyelinde (+0,4V) sabit akıma getiriliktten sonra denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içine H₂O₂'nin derişimi 1,0x10⁻⁷- 1,0x10⁻³ M aralığında olacak şekilde çözelti eklemeleri yapıldı. Artan derişimlerde H₂O₂ eklemelerine karşı artan akım farkı değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.5).

Şekil 4.5' de ki grafik incelendiğinde 4AA-Fc miktarı artırıldığında hazırlanan elektrotun 1,5 mg'dan 2,5 mg'a artırıldığında cevap akımlarının yükseldiği 3,5 mg'a çıkarıldığında ise cevap akımlarının azaldığı görülmektedir. 3,5 mg 4AA-Fc kullanıldığında hazırlanan karbon pasta elektrotun mekanik kararlılığının iyi olmadığı, yüzeyden pasta parçalarının ayrıldığı gözlemlendi. Bu nedenle 2,5 mg 4AA-Fc miktarını optimum alınarak bundan sonraki çalışmalarda bu değer kullanıldı.



Şekil 4.5. 4AA-Fc miktarının belirlenmesi

4.4. Glutaraldehit Miktarının Belirlenmesi

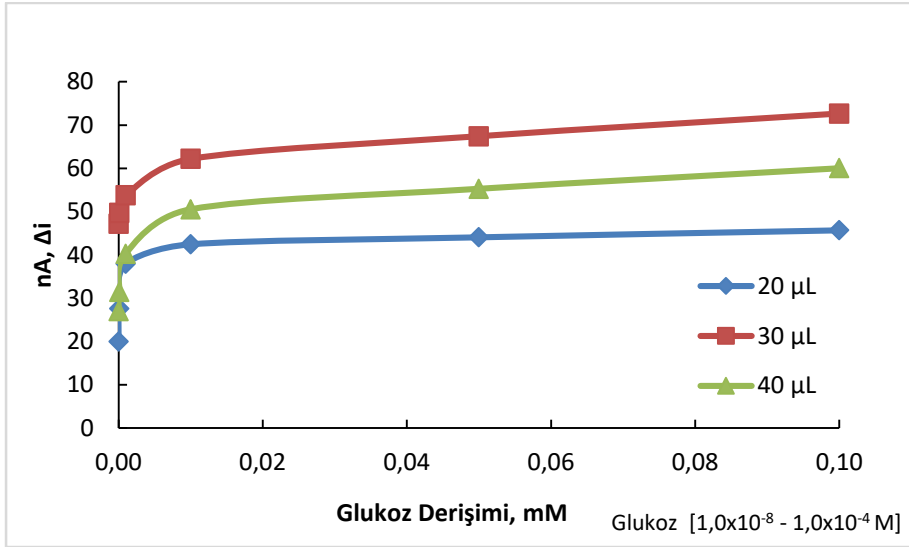
Enzim immobilizasyon yöntemleri arasında çapraz bağlama yöntemi, biyokatalitik esaslı biyosensörlerin hazırlanması sırasında en çok kullanılan yöntem olarak kabul edilmiştir. Bu yöntemin uygulanması oldukça kolaydır. Kopolimerizasyon şeklinde de ifade edilen çapraz bağlama yöntemi, matris veya desteğin olmadığı bir yöntemdir (Jun, 2019).

Bu yöntemde glutaraldehit, bisdiazobenzidin, heksametilen diizosiyanat gibi iki veya çok fonksiyonlu reaktifler tarafından enzim molekülleri arasında çapraz bağlantılar yapılmaktadır. Genel olarak, immobilizasyon işlemindeki ilk basamak enzimi çökeltmedir. Böylece enzimin fiziksel kümesi elde edilir. Bu küme daha sağlam bir yapı oluşturmak amacıyla fonksiyonlu reaktif olan glutaraldehit ile çapraz bağlanmaktadır (Jegannathan, 2008). Glutaraldehit (CHO-CH₂CH₂CH₂-CHO), birçok protein çapraz bağlama ajanı arasında yüksek reaktiviteye sahip ve düşük maliyeti olmasıyla çok fazla kullanıma sahiptir (Okuda, 1991). Monoaldehit (formaldehit), iki veya altı karbon atomu (glioksal, malonaldehit, süksinaldehit, glutaraldehit ve adipaldehit) içeren dialdehitlerle çapraz bağlama çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda en yüksek reaktivitenin beş karbonda elde edildiği tespit edilmiştir. Bu yüzden en etkili protein çapraz bağlama ajanı glutaraldehittir (Bowes, 1968). Enzim yapısında var olan amin gruplarıyla kimyasal reaksiyona girerek çapraz bağlanmayı yapmaktadır (Nimni, 1987). Çapraz bağlama

yöntemiyle suda çözünmeyecek enzim türevlerinin elde edilebilmesinde, kullanılan enzim ve glutaraldehit derişimlerine dikkat edilmelidir. Düşük derişimler kullanıldığında, glutaraldehit fonksiyonel grupları aynı enzimle kimyasal tepkimeye girme isteğı artmaktadır. Böylece enzim molekülleri arasında, aynı anda oluşabilecek istenmeyen molekül içi yapılarla etkileşmesini engellemek amacıyla koşullar titizlikle seçilmelidir. (Broun, 1976; Bano, 1980; Grupta, 1993). Düşük glutaraldehit derişimleri enzimin çökmesini sağlamak için gerekli çapraz bağlanmayı oluşturamayıp, daha yüksek derişimlerde ise enzim türevini çözünmeyecek duruma getirmek için su molekülleri dışındakileri bağlayıp sağlam bir yapı oluşturmaktadır (Broun, 1976). Enzim aktivitesi çalışmada kullanılan glutaraldehit derişimiyle ters orantılıdır. Fazla çapraz bağlanma enzim aktif bölgesinin bloke olmasına sebep olmaktadır. Bu durumda enzimin aktivitesi bozulmaktadır (Chui, 1997). Böylece çapraz bağlama yönteminde kullanılacak glutaraldehit miktarının aktiviteye etkisi araştırılmalıdır.

Glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonunda çapraz bağlamak için kullanılan farklı miktarlarda (20, 30, 40 μL) glutaraldehit içeren modifiye karbon pasta elektrot belirlenen çalışma potansiyelinde (+0,4V) sabit akıma getiriliktten sonra denge akımı kaydedildi. Çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M aralığında olacak şekilde çözelti eklemeleri yapıldı. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değerleri kaydedildi. Artan derişimlerde glukoz çözeltileri eklemelerine karşı artan akım farkı değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.6).

Şekil 4.5' de ki grafik incelendiğinde glutaraldehit miktarı 20 μL 'den 30 μL 'ye çıkarıldığında cevap akımı artmaktadır. Fakat glutaraldehit miktarı 30 μL 'den 40 μL 'ye çıkarıldığında ise cevap akımının düştüğü tespit edilmiştir. Buradan çıkarılan sonuç; 20 μL 'de glutaraldehitin miktarı yeterli gelmeyip immobilize işleminde yapıyı bir arada tutmamıştır. 40 μL 'de glutaraldehitin miktarı çok fazla geldiğinden aşırı bir bağlanma söz konusudur. Bu durumda enzimin aktivitesinin azalmasına sebep olmaktadır. Bu çalışmada sonucunda en fazla aktivite 30 μL 'de görülmektedir. Böylece deneysel çalışmada glukoz oksidaz enzimi 30 μL glutaraldehit ile çapraz bağlanmıştır.



Şekil 4.6. Biyosensörün glukoz duyarlılığına glutaraldehit miktarının etkisi

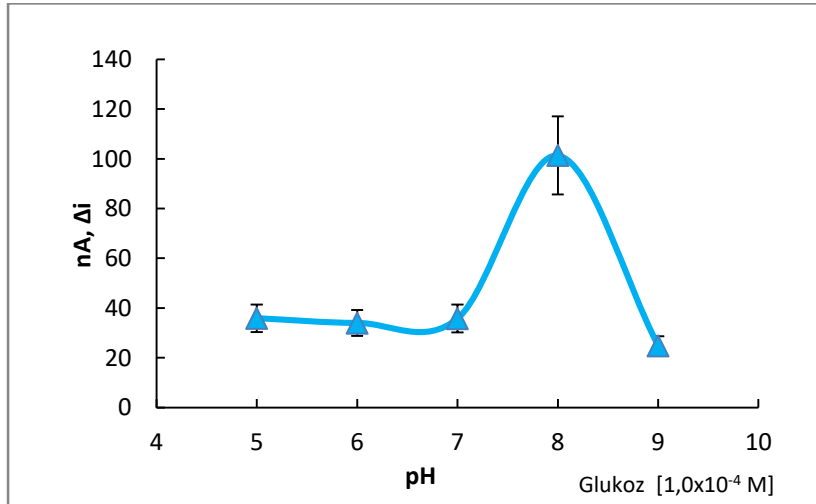
4.5. Optimum pH

Enzim esaslı biyosensörlerin aktivitesi için en önemli faktörlerden olan çalışılacak deney ortamının pH değerinin ne olacağıdır. Çünkü enzimlerin aktivitesi pH dan etkilenecek değişmektedir. Enzimin aktivitesi, enzimin aktif bölgesinde bulunan amino asitlerin iyonlaşmasına bağlıdır. Bu amaçla pH, enzimin aktivitesini korumak için büyük önem teşkil etmektedir (Özdemir, 2014).

Hazırlanan glukoz biyosensörünün amperometrik cevap akımına pH etkisinin incelenmesi için 5 farklı pH'a sahip tampon çözeltiler hazırlandı. pH 5,0 için asetik asit sodyum asetat tampon çözeltisi ($\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$); 6,0; 7,0; 8,0 için fosfat tampon çözeltisi ($\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{NaH}_2\text{PO}_4$); 9,0 için glisin tampon çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu tampon çözeltiler ile aynı pH' da olacak şekilde derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olan glukoz çözeltileri hazırlandı. Böylece glukoz biyosensörü belirlenen çalışma potansiyelinde (+0,4V) sabit akıma getirilip ve denge akımı kaydedilmiş oldu. Sonra çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde çözelti eklemesi yapıldı. Ekleme sonrası ölçülen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerinin hesabı yapıldı. Akım farkı (Δi) değerleri ve pH değerleri grafiğe geçirildi. Şekil 4.7'i incelendiğinde maksimum aktivitenin görüldüğü pH değeri 8,0 olarak görülmektedir. Ortam pH' sına karşı elde edilen cevap akımları pH 8,0 değerine yaklaştıkça artarken pH 8,0'dan uzaklaştıkça düşmektedir. Aktifleşmiş kompleksin basitçe oluşması ve tepkime hızının maksimum

seviyesi için enzim ve glukoz moleküllerinin yapısındaki asidik ve bazik grupların iyonlaşmaları belli bir düzeyde olmalıdır. Aksi halde iyonlaşmada aktifleşmiş kompleks oluşumu zor olacaktır. Bu durumda tepkime hızını azaltacağından cevap akımlarında düşüş meydana geleceğini göstermektedir (Bal, 2012).

Literatürde çeşitli reaktiflerle hazırlanan amperometrik glukoz biyosensörü çalışmalarında bu tez çalışmasıyla uyum gösteren pH değerleri görülmektedir. Enzimin çalışılacak pH değerleri 3-10 arasında değişmektedir (Weibel,1971, Bright,1969). Örneğin; pH 6,8 (Gaikwad ve diğerleri, 2007). 7,4 (Xian ve diğerleri, 2006) 8,0 (Dönmez, 2014) . Literatürler ile bu tez çalışmasında elde edilen pH değeri karşılaştırılmış olup bulunan pH değerinin literatür değerleriyle uyumlu olduğu görülmüştür. Ancak enzimin immobilize edilmesi sırasında kullanılan farklı taşıyıcılar pH'n farklılık göstermesine neden olmaktadır.



Şekil 4.7. Biyosensörün glukoz duyarlılığına pH'ın etkisi

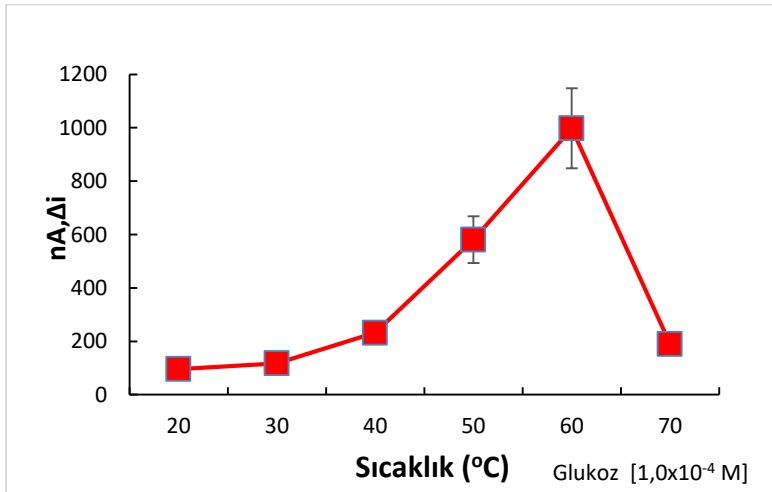
4.6. Optimum Sıcaklık

Enzimin aktivitesi için çalışılan ortamın sıcaklığı büyük önem taşımaktadır. Enzimlerin hızı sıcaklık artmasıyla belli bir değere kadar artış göstermektedir ve çok yüksek bir artışta enzim denatüre olarak aktivite kaybı görülmektedir (Erdem, 2012).

Hazırlanan glukoz biyosensörünün cevap akımına sıcaklık etkisinin incelenmesi için çalışma hücresi içerisine pH'ı 8,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. MCPE çalışılan potansiyelde(+0,4V) sabit akıma

getirilip denge akımı kaydedildi. Hazırlanan biyosensör için Grant GD 120 termostatlđ dolaşımlı su banyosu kullanıldı (Şekil 4.8). Grafik incelendiğinde sıcaklık 20 °C’den 60 °C’ye kadar arttığında akımlarda artma, 60 °C’den sonra ise akımlarda azalma meydana gelmiştir. En yüksek cevap akımı 60 °C gözlenmiştir. Enzimler immobilize olduktan sonra sıcaklığa karşı daha kararlı hale gelmektedir. Bu çalışmada da kullanılan 4AA-Fc enzimin termal kararlılığını artırarak 60 °C gibi bu yüksek sıcaklıkta en yüksek aktivite göstermesine neden olmuştur. Ancak biyosensör çalışmalarının pratik ölçüm yapabilmesi açısından oda koşullarında yapılması uygun bulunmuştur.

Literatür araştırmalarında çeşitli maddelerle hazırlanmış glukoz biyosensörü çalışmalarında optimum sıcaklıklar farklılaşabilmektedir. Glukoz oksidazın çalışma sıcaklığı 30 °C civarında olduğu belirtilmiştir (Chen ve diğerleri, 2006, Shi ve diğerleri, 2009). Xu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 40 °C den daha yüksek sıcaklıklarda akım değerlerinde düşme gözlemlemişlerdir ve sıcaklığı 25 °C olarak almışlardır (Xu ve diğerleri, 2009). Başka bir literatür de ise maksimum sıcaklık değeri 33 °C olarak bulunmuştur (Xian ve diğerleri, 2006).

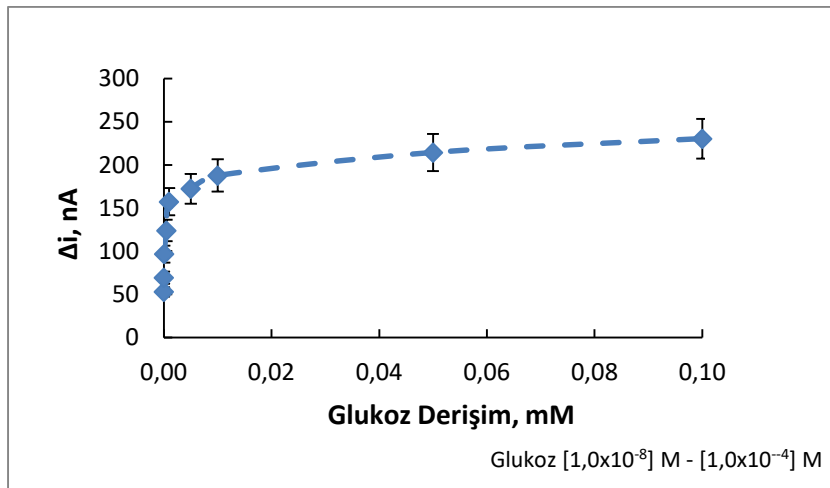


Şekil 4.8. Biyosensörün glukoz duyarlılığına sıcaklığın etkisi

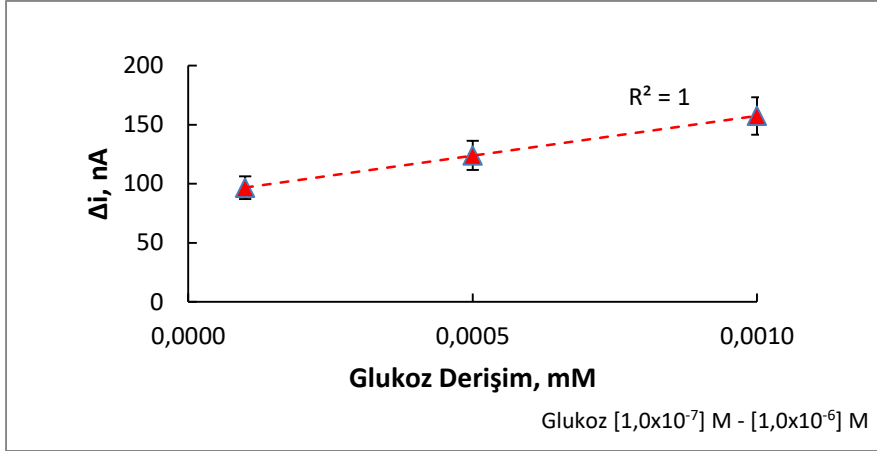
4.7. Substrat Değişiminin Etkisi

Hazırlanan glukoz biyosensörünün cevap akımına substrat değişiminin etkisini incelemek için çalışma hücresi içerisine pH’ı 8,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. MCPE çalışılan potansiyelde(+0,4V) sabit akıma

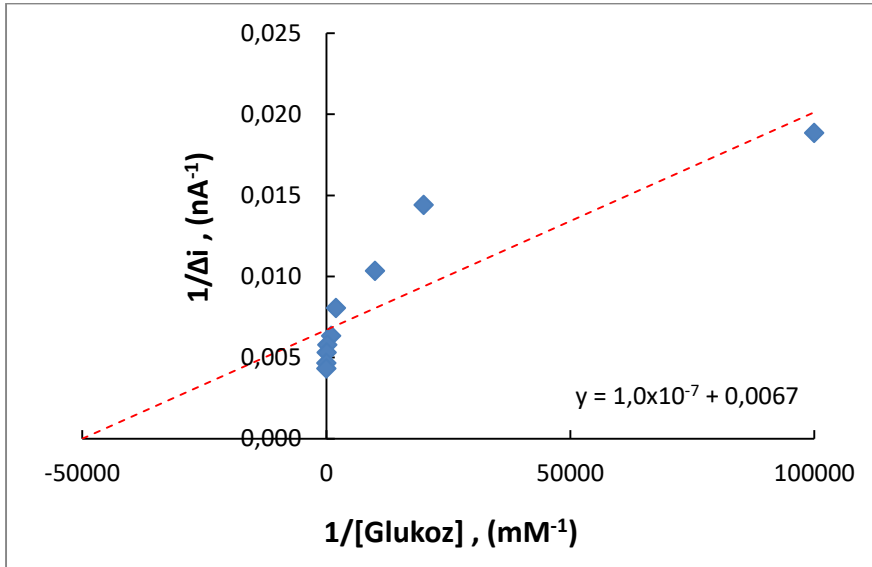
getirilip denge akımı kaydedildi. Sonra çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M olacak şekilde glukoz çözeltileri eklendi. Her ekleme yapıldığında çözeltili manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Eklemeler sonrası ölçülen akım değerleri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerlerinin hesabı yapıldı. Akım farkı (Δi) değerleri ve glukoz derişimleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.9). Grafik incelendiğinde $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M ($R^2 = 1,0$) aralığında doğrusal çalışma aralığı bulunmuş oldu. Böylece alt tayin sınırı da $1,0 \times 10^{-8}$ M olarak hesaplandı. Şekil 4.10'da $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M aralığında doğrusallığın çok iyi olduğu ve bu aralığın kantitatif analizlerde kullanılabileceği öngörülebilir. Enzimlerde K_m (gözlenen) ve I_{maks} sabitlerini tespit etmek amacıyla ($1/\text{glukoz derişimi}$)-($1/\Delta i$) grafiği çizildi (Lineweaver Burk grafiği) (Şekil 4.11). Grafikte eğrinin x eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ değerini gösterir. K_m değeri $1,49 \times 10^{-5}$ mM ($0,0149 \mu\text{M}$) olarak hesaplandı. Grafikte eğrinin y eksenini kestiği nokta ise I_{maks} değeri $0,14925 \mu\text{A/dk}$ ($149,25 \text{ nA/dk}$) olarak hesaplandı. Elde edilen K_m değeri enzimin substrata olan ilgisini ortaya koymaktadır. Glukoz oksidaz enzimi için verilen K_m değerleri 9,34; 18,0 mM' dır (Xue ve diğerleri, 2001, Hosbi ve diğerleri, 2003). GOD için verilen I_{maks} değerleri 26,31; 0,45; mM/dk' dır (Bal, 2012). Literatürdeki değerlerle bu çalışmada bulunan değerler K_m (göz.) ve I_{maks} değerlerinin biraz farklıdır. Bunun sebebi taşıyıcı ortamın farklı olmasıdır.



Şekil 4.9. Biyosensörün amperometrik cevap akımına glukoz derişiminin etkisi



Şekil 4.10. Glukoz biyosensörü için kalibrasyon grafiği

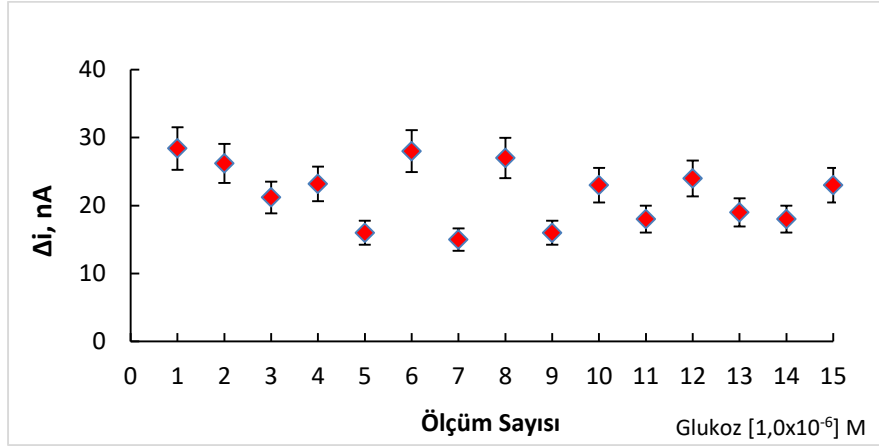


Şekil 4.11. Lineweaver-Burk grafiği

4.8. Enzim elektrotun tekrar kullanılabilirliği

Hazırlanan glukoz biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi için, çalışma hücresi içerisine pH'ı 8,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. MCPE çalışılan potansiyelde(+0,4V) sabit akıma getirilip denge akımı kaydedildi. Sonra çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde glukoz çözeltisi eklendi. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Eklemeler sonrası ölçülen akım değerleri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerlerinin hesabı yapıldı. Bu çalışma 15 kez tekrar edildi Akım farkı (Δi)

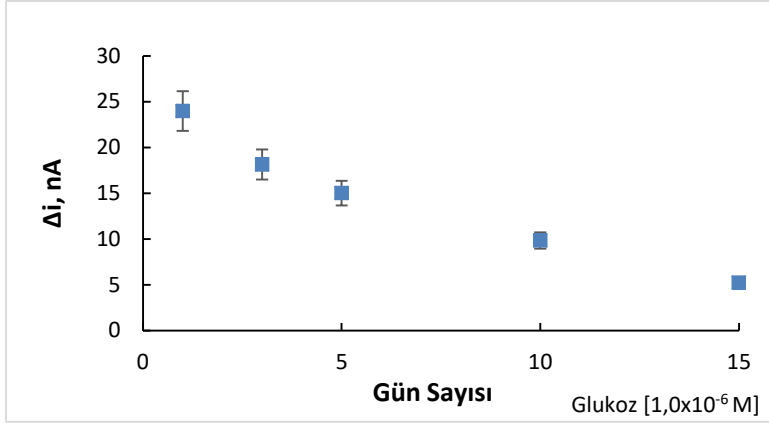
değerleri ve ölçüm sayısı grafiğe geçirildi (Şekil 4.12). Yapılan 15 ölçüm sonunda biyosensörün başlangıç aktivitesinin % 23,48'ini kaybettiği tespit edildi. Elde edilen akım değişimlerinden bağıl standart sapma % 20,63 olarak hesaplandı.



Şekil 4.12. Tekrar kullanılabilirlik

4.9. Raf Ömrünün Belirlenmesi

Hazırlanan glukoz biyosensörünün raf ömrünün incelenmesi için, çalışma hücresi içerisine pH'ı 8,0 olan 0,1 M 9 mL fosfat tampon çözeltisi, 1 M 1 mL NaCl destek elektrolit çözeltisi eklendi. MCPE çalışılan potansiyelde(+0,4V) sabit akıma getirilip denge akımı kaydedildi. Sonra çalışma hücresi içine glukozun derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde glukoz çözeltileri eklendi. Her ekleme yapıldığında çözelti manyetik karıştırıcı yardımıyla 15 dk karıştırıldı. Daha sonra süre 200 saniyeye ayarlanarak ölçülen akım değeri kaydedildi. Ekleme sonrası ölçülen akım değeri denge akımından çıkarılarak akım farkı (Δi) değerinin hesabı yapıldı. Yapılan deneysel çalışma farklı aralıklarla (1-3-5-10-15. gün) tekrar edildi. Akım farkı (Δi) değerleri ve çalışma yapılan gün sayısı grafiğe geçirildi (Şekil 4.13). Biyosensörün 15 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %20,84'ünü koruduğu görüldü.



Şekil 4.13. Depolama kararlılığı

4.10. Glukoz Tayinine Girişim Yapan Türlerin Etkisi

Gerçek numunelerde glukoz tayin edilirken glukoz yanında girişim etkisine ortam oluşturacak çeşitli maddeler bulunur. Bu amaçla gerçek numunede bulunabilecek ve girişim etkisi oluşturacak çeşitli maddelerin glukoz tayini üzerine etkisi incelendi (Çolak, 2014). Bu maddeler ve derişimleri; $3,0 \times 10^{-4}$ M ürik asit ve $1,0 \times 10^{-4}$ M askorbik asit, $1,0 \times 10^{-4}$ M parasetamol (Ustabaş, 2010), $2,5 \times 10^{-3}$ M üre (Dhawan ve diğerleri, 2009) kandaki değerlerine göre belirlenmiştir. Çalışma hücresi içerisine bu maddelerden belirli bir miktar eklendi ve akım değerindeki değişme belirlendi. Glukoz derişimi $1,0 \times 10^{-6}$ M olarak sabit tutuldu. Bu maddelerin 1000 kat seyreltme sonucu girişim etkisi incelendi. Amperometrik biyosensör çalışmalarının gerçek numune analizi basamağı için girişim etkisi büyük önem taşımaktadır. Seyreltme işlemi girişimin etkisini azaltabilir (Park, 2019; Wen ve diğerleri, 2007). Bu işlem girişimi engellemek ya da azaltmak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Bodur, 2019). Çalışmalar sonucunda tespit edilen girişim değerleri;

- * Ürik asit; girişim yok
- * Üre; girişim yok
- * Askorbik asit; %2,33
- * Parasetamol; %4,35 olarak belirlenmiştir.

4.10. Gerçek numunede glukoz tayini

Biyosensörün gerçek örneklerle uygulanabilirliğini belirlenmek için LC/MS ve GC/MS yöntemleri kullanılarak içeriğindeki glukoz miktarı tespit edilen meyve suyu örneği referans olarak kullanıldı (Walker ve diğerleri, 2014). Bu amaçla, biyosensör +0,4 V potansiyelde, pH 8,0 tampon çözeltisinde, 25 °C’de dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Daha sonra biyosensörün doğrusal çalışma aralığına denk gelen, hücre içi glukoz derişimi $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M arasında olacak şekilde 4 farklı derişim eklenerek bir kalibrasyon grafiğı elde edildi. Çalışma hücresi içerisine, 10^6 kat seyreltme olacak şekilde meyve suyu örneğı ilave edilerek akım değışimi ölçüldü ve kaydedildi. Kaydedilen akımdan denge akımı çıkarılarak akım farkı (Δi) hesaplandı. Bu işlem 3 kere tekrar edildi. Böylece elde edilen akım değerlerinden, kalibrasyon grafiğı yardımı ile, glukoz derişimi hesaplandı.

Walker ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada LC/MS ve GC/MS yöntemleri kullanılarak numune alınan meyve suyu markasına ait glukoz içeriğine ait belirlenen miktar ise 45,50 g/L’dir (Walker ve diğerleri, 2014). Çalışmamızda hazırlanan biyosensör ile yapılan ölçümler sonrasında, gerçek numunenin tespiti, doğrusal aralıkta ölçüm alabilmek için, yapılan seyreltme faktörleri de dikkate alınarak kalibrasyon grafiğı yardımı ile $38,43 \pm 2,94$ g/L olarak tespit edilmiştir. Bu da çalışmamızda hazırlanan biyosensörün çalışma performansının gayet iyi olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında 4AA-Fc kullanılarak elde edilen glukoz duyarlı biyosensörünün;

- Doğrusal çalışma aralığı 1×10^{-7} M – 1×10^{-6} M olarak bulunmuştur. Bu aralıktaki hesaplanan $R^2=1$ değerinin çok iyi olduğu böylece bu aralıkta kantitatif analizlerin yüksek hassasiyette yapılabilirliği söylenebilir.
- Hazırlanan biyosensör düşük bir tayin sınırına sahiptir ($1,0 \times 10^{-8}$ M). Düşük tayin sınırı küçük derişimlerdeki madde miktarı tayinine dahi olanak tanınması açısından çok önemlidir. Biyosensörün cevap süresi ise 200 s olarak belirlenmiştir.
- Optimum çalışma pH 8,0 fosfat tamponu olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklık 60° C olarak belirlenmiş olup tüm çalışmalar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.
- Hesaplanan K_m (gözlenen) ve I_{maks} (gözlenen) değerleri sırası ile $1,49 \times 10^{-5}$ mM (0,0149 μ M) ve 0,14925 μ A/dk (149,25 nA/dk) olarak bulundu. Literatürdeki diğer glukoz biyosensörlerine ait K_m değerleri ile kıyaslandığında biyosensörümüze ait değerin daha düşük olduğu görüldü. K_m değerinin küçük olması düşük derişimleri tayin edebilme olanağı sağlar. 4AA-Fc maddesi, enzimin substrata olan ilgisini arttırdığını göstermektedir.
- Tekrarlanabilirlik değerlerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. 15 ölçüm sonrasında aktivitesinin yaklaşık %76,52'sini muhafaza etmiştir. Bu değer literatür değerleri ile kıyaslandığında iyi bir değerdir.
- Depolama kararlılığı (raf ömrü) 15 gün sonunda başlangıç amperometrik cevabının yaklaşık %20,84'ünü koruduğu görülmüştür. Bu değer literatür değerleri ile kıyaslandığında kabul edilebilir bir değerdir.
- Biyosensör çalışmalarında sıkça rastlanan bir sorun olan girişim, bazı maddeler için tamamen ortadan kaldırılmasa da düşük girişim yüzdeleri (Ürik asit; girişim yok, Üre; girişim yok, Askorbik asit; %2,33, Parasetamol; %4,35) elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında hazırlanan glukoz biyosensörünün bu hali ile uygulama alanı bulabileceği, kullanım imkanının olabileceği aynı zamanda geliştirilmeye açık olduğu söylenebilir.

Çizelge 5.1. Çalışma sonuçlarının literatür ile karşılaştırılması

Taşıyıcı	Glukoz tayini metodu	İmmobilizasyon tekniği	Doğrusal aralık	Tayin sınırı	K _m	Opt. pH	Opt. sıcaklık	Raf ömrü	Referans
Nafion	Amperometrik (+0,84 V)	Birden fazla teknik	0,02-15,0 mM	2,9 μ M	-	-	-	-	Izadyar ve diğerleri, 2022)
Slika/lignin, Tek duvarlı nanotüpler	Voltametri, kronoamperometri (+0,3 V)	Adsorpsiyon	0,5-9mM	145 μ M	62 mM (6,2 x10 μ M)	7,0	25 °C	15 gün %82 21 gün %73	Jedrzak ve diğerleri, 2018)
Poli(1,10-fenantren-5,6-dion), poli(pirrol-2-karboksilik asit), altın nanopartiküller	Amperometrik	Kovalent bağlama	0,2-150,0 mM	0,08M m (80 μ M)	-	4,0-9,0	-	14 gün %96	Kausatie ve diğerleri, 2020
Politiramin tabakası	Amperometrik -0,10 V	Çapraz bağlama	1,0 μ M- 1,0 mM	1,0 mM (1x10 ³ μ M)	0,21 mM (210 μ M)	6,0-8,0	-	% 99, 3 hafta %84, 4 hafta	Khumngem ve diğerleri, 2021
Gümüş nanopartiküller ve kitosan	Amperometrik ve siklik voltametri (-0,15V)	Birden fazla teknik	10 μ M-15mM	0,6977 μ M	-	6,0-8,5	25 °C	9 gün % 93 15gün %70	Yang ve diğerleri, 2014
PVC/TTF/TCNQ	Amperometri (+0,15 V)	Çapraz bağlama	0,1-8,0mM	8,5x10 ⁻⁶ M (8,5 μ M)	9,0 mM (9000 μ M)	7,4	25 °C	10 gün %72	Cano ve diğerleri, 2008
Polianilin, nafion, grafen oksit	Amperometrik (+0,3 V)	Birden fazla teknik	0,5-50mM	-	12,0 mM (1,2 x10 ⁴ μ M)	6,0	-	-	Popov ve diğerleri, 2022
4AA-Fc ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot	Amperometrik +0,4 V	Çapraz Bağlama	1,0x10 ⁻⁴ -1,0x10 ⁻³ mM	1,0x10 ⁻⁸ M (0,01 μ M)	0,000149 μ M	8,0	60 °C	15 gün sonunda aktivite % 20,84 kalmıştır	Bu çalışma

KAYNAKLAR

- Akın, D. (2017). *Glukoza duyarlı grafen esaslı yeni bir biyosensör hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 5-13.
- Alegret, S., Dominguez, C. and Munoz, J. (1997). Glucose biosensors based on a reagentless graphite-epoxy screen-printable biocomposite. *Sensors and Actuators*, B(45), 55-62.
- Alonso, N., López-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Mateo, C., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2005). Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sephabeads supports by the glutaraldehyde crosslinking method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 35(1-3), 57-61.
- Arslan, F., Ustabaş, S., & Arslan, H. (2011). An amperometric biosensor for glucose determination prepared from glucose oxidase immobilized in polyaniline-polyvinylsulfonate film. *Sensors*, 11(8), 8152-8163.
- Atan, Ç. (2013). *ZnO nanorod temelli glukoz biyosensörü hazırlanması ve kan serumunda glukoz tayininde kullanılması*. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 6-46.
- Baghayeri, M., Nodehi, M., Amiri, A., Amirzadeh, N., Behazin, R., & Iqbal, M. Z. (2020). Electrode designed with a nanocomposite film of CuO Honeycombs/Ag nanoparticles electrogenerated on a magnetic platform as an amperometric glucose sensor. *Analytica Chimica Acta*, 11(11), 49-59.
- Bal, Ö. (2012). *Biyolojik sıvılardaki glukozun tayini için polipirol filme glukoz oksidaz enziminin immobilizasyonu ile yeni bir biyosensör hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 5-28.
- Bancroft J.D., Stevens A. (1990). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone. (Third Press). New York, 379-413.
- Bano, B. and M. Saleemuddin. (1980). Studies on chemically aggregated trypsin using glutaraldehyde. *Journal Biochemistry. Biophysics*. 1(7), 12–17.
- Baran, T. (2009). *Heterosiklik ve amino asit türevi iki yeni Schiff bazı ligandı ve geçiş metal komplekslerinin sentezi, karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi Rize Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, 5-7.
- Bergveld, P. (1970), Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 1(7), 70–71.
- Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Guisan, J.M., Fernandes-Lafuente, R. (2006), “Preparation of a very Stable Immobilized Biocatalyst of Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger*”, *Journal of Biotechnology*, 121, 284-289.

- Bodur, O. C. (2019). *Alzheimer hastalığının teşhisi için asetilkolin biyosensörünün hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 3-48.
- Bollella, P. (2022). Enzyme-based amperometric biosensors: 60 years later...Quo Vadis?, *Analytica Chimica Acta*, 340-517.
- Bowes, J.H. and C.W. Cater. (1968). The interaction of aldehydes with collagen, *Biochim. Biophys. Acta* 168, 341–352.
- Bright, H. J., & Appleby, M. (1969). The pH dependence of the individual steps in the glucose oxidase reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 244(13), 3625-3634.
- Broun, G.B. (1976). Chemically aggregated enzymes In K. Mosbach *Methods in Enzymology*. New York, Academic Press , 263–280.
- Buk, V., Emregul, E., & Emregul, K. C. (2017). Alginate copper oxide nano-biocomposite as a novel material for amperometric glucose biosensing. *Materials Science and Engineering*, 74, 307-314.
- Bulut, Y., (2011). Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış. 6th *International Advanced Technologies Symposium 16-18 May*, Elazığ, Turkey.
- Campana, A. L., Florez, S. L., Noguera, M. J., Fuentes, O. P., Puentes, P. R., Cruz, J. C., and Osma, J. F. (2019). Enzyme-based electrochemical biosensors for microfluidic platforms to detect pharmaceutical residues in wastewater. *Biosensors*, 9(1), 41.
- Cano, M., Ávila, J. L., Mayén, M., Mena, M. L., Pingarrón, J., & Rodríguez-Amaro, R. (2008). A new, third generation, PVC/TTF–TCNQ composite amperometric biosensor for glucose determination. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 615(1), 69-74.
- Cass, A. E., Davis, G., Francis, G. D., Hill, H. A. O., Aston, W.J., Higgins I. J., (1984). Ferrocenemediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Analytical Chemistry*, 56, 667–671.
- Chen, C., Jiang, Y., Kan, J., (2006). A noninterference polypyrrole glucose biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 639-643.
- Chui, W.K. and L.S. Wan., (1997). Prolonged retention of cross-linked trypsin in calcium alginate microspheres. *Journal Microencapsulation* 14, 51–61.
- Clark, K.G., Johnstone-Robertson, M., Price, B., Harrison, S.T.L., (2006). Location of Glucose Oxidase During Production by *Aspergillus Niger*. *Application. Microbiology Biothcnology*, 70, 72-77

- Coşkun T. (2021). *Enzim temelli yeni amperometrik biyosensörlerin hazırlanması ve karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale On sekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale, 2-12.
- Çolak, Ö. (2014). *Sakkaroz tayini için biyosensör hazırlanması*, Doktora Tezi Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 7-47.
- Dai, G., Li, J., Jiang, L., (2002). Difference in Enzyme Activity and Conformation of Glucose Oxidase before and after Purification. *Colloids and Surfaces Biointerfaces* 24,171-176.
- Dhawan G, Sumana G, Malhotra B., (2009). Recent developments in urea biosensors. *Biochem Eng.*,44(1):42-52.
- Di Pietrantonio, F., Cannatà, D., and Benetti, M. (2019). Biosensor technologies based on nanomaterials. *Functional Nanostructured Interfaces for Environmental and Biomedical Applications*. Amsterdam, Elsevier, 181- 242.
- D'Orazio, P. (2003). Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 334(1-2),41-69.
- Doustdar, F., Olad, A., & Ghorbani, M. (2022). Effect of glutaraldehyde and calcium chloride as different crosslinking agents on the characteristics of chitosan/cellulose nanocrystals scaffold. *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 912-924.
- Dönmez, S., (2014). Preparation of carbon paste electrodes including poly(styrene) attached glycine-Pt(IV) for amperometric detection of glucose. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 149.
- Erdem, C. (2012). *Glukoz tayini için nikel oksit modifiye karbon pasta elektrotların hazırlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 16-35.
- Eryomin, A.N., Semashko, T.V., Mikhailova, R.V., (2006). Immobilization of Extracellular Glucose Oxidase from *Penicillium Funiculosum* on Gels of Aluminum Zinc Hydroxides, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2),138-144.
- Fitzpatrick, D., (2015). Glucose Biosensors. *Implantable Electronic Medical Devices*,37-51
- Gaikwad, P. D., Shirale, D. J., Savale, P. A., Datta, K., Ghosh, P., Pathan, A. J., ... & Shirsat, M. D. (2007). Development of PANI-PVS-GOD electrode by potentiometric method for determination of glucose. *Int. J. Electrochem*, 2, 488-497.
- Garjonyte, R., & Malinauskas, A. (2000). Amperometric glucose biosensors based on Prussian Blue–and polyaniline–glucose oxidase modified electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 15(9-10), 445-451.

- Gupta, N.,(1993). Biocatalyst Desing For Stability and Specificiyt. (516). *Cross-linking techniques application to enzyme and protein stabilization and bioconjugate preparation*. American Chemical Society, Washington, DC, 307–324.
- Gümüşderelioğlu M., Karakeçili Gönen A. (2013). Nanotıp ve Nano Robotlar, *Bilim ve Teknik Dergisi*, 20-21.
- Habermüller, K., Mosbach, M., & Schuhmann, W. (2000). Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. *Fresenius'Jjournal of Analytical Chemistry*, 366(6), 560- 568.
- Arslan, H., Arslan, F., (2011). Polifenol Oksidaz, Yapay Hücreler, Kan İkame Maddeleri ve Biyoteknolojinin Yakalanmasına Dayalı Fenol Tayini İçin Polipirrol-Polivinilsülfonat Kompozit Film Biyosensörünün Hazırlanması, *Artificial Cells Blood Substitütes and Biotechnology*, 39(5), 341-345.
- Haouz, A., Glandieres, J.M., Alpert, B., (2001). Involvement of Protein Dynamics in Enzyme Stability The Case of Glucose Oxidase, *FEBS Letters* , 506, 216-220 .
- Hoshi, T., Saiki, H., and Anzai, J., (2003). Amperometric uric acid sensors based polyelectrolyte multilater films, *Talanta.*, 61, 363-368.
- Izadyar, A., Van, B. N., Rodriguez, A. K., Kaput, E. E., & Seok, I. (2022). A bienzymatic amperometric glucose biosensor based on using a novel recombinant Mn peroxidase from corn and glucose oxidase with a Nafion membrane. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 895, 115-387.
- İçli, N., (2008). *İmmobilize glukoz oksidaz enziminin özellikleri ve enzim aktifliğinin artırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 14-29
- Jędrzak, A., Rębiś, T., Klapiszewski, Ł., Zdarta, J., Milczarek, G., & Jesionowski, T. (2018). Carbon paste electrode based on functional GOx/silica-lignin system to prepare an amperometric glucose biosensor. *Sensors and Actuators*, 256, 176-185.
- Jegannathan, K. R., Abang, S., Poncelet, D., Chan, E. S., & Ravindra, P. (2008). Production of biodiesel using immobilized lipase—a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(4), 253-264.
- Jun, L. Y., Yon, L. S., Mubarak, N. M., Bing, C. H., Pan, S., Danquah, M. K., ... & Khalid, M. (2019). An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(2), 102-961.
- Karagollu, O., Gorur, M., Turkan, A., Sengez, B., Gode, F., & Yilmaz, F. (2013). A novel amperometric glucose biosensor based on poly (glycidyl methacrylate-co-thienylmethacrylate). *Current Applied Physics*, 13(4), 725-730.

- Karmali, A., Teixeira, A., Marcelo Curto, M.J., (2004). Assay for Glucose oxidase from *Aspergillus Niger* and *Penicillium Amagasakiense* by Fourier Transform Infrared Spectroscopy . *Analytical Biochemistry* , 333 , 320-327
- Kausaite-Minkstimiene, A., Glumbokaite, L., Ramanaviciene, A., & Ramanavicius, A. (2020). Reagent-less amperometric glucose biosensor based on nanobiocomposite consisting of poly (1, 10-phenanthroline-5, 6-dione), poly (pyrrole-2-carboxylic acid), gold nanoparticles and glucose oxidase. *Microchemical Journal*, 154,104-665.
- Keskin, M.,Arslan, F. (2020). Biyosensörler. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 1(1-2), 51-60.
- Ketani, M. A., & Akbalık, M. E. (2015). Enzim Histokimya ve Önemi. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2), 50-71.
- Khumngern, S., Jirakunakorn, R., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., & Numnuam, A. (2021). A highly sensitive flow injection amperometric glucose biosensor using a gold nanoparticles/polytyramine/Prussian blue modified screen-printed carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 138, 107-718.
- Koçak, H. (2020). *Bisfenol-A tayini için bir biyosensör hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 18-37.
- Kökbaş, U., Kayrın, L., Tuli,A., (2013). Biyosensörler ve tıpta kullanım alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 22(4), 499-513.
- Li, Y., Liu, X., Yuan, H., & Xiao, D. (2009). Glucose biosensor based on the room-temperature phosphorescence of TiO₂/SiO₂ nanocomposite. *Biosensors and bioelectronics*, 24(12), 3706-3710.
- Liedberg B., Nylander C. (1983). Lunström I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*, 4, 299–304.
- Liu, Y., Yue, W., & Cui, Y. (2022). Development of an Amperometric Biosensor on a Toothbrush for Glucose. *Sensors and Actuators Reports*, 100-133.
- Mislovicova, D., Michalkova, E., Vikartofska, A., (2007). Immobilized Glucose Oxidase o Different Subports for Biotransformation Removal of Glucose fro Oligosaccharide Mixture. *Process Biochemistry*, 42, 704-709.
- Moon, J. M., Thapliyal, N., Hussain, K. K., Goyal, R. N., & Shim, Y. B. (2018). Conducting polymer-based electrochemical biosensors for neurotransmitters review. *Biosensors and Bioelectronics*, 102, 540-552.
- Muhsir, S. (2012). *Yeni bir Schiff bazı ve Cu (II), Ni (II), Co (II) komplekslerinin sentezi ve karakterizasyonu* (Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 1-4.

- Nimni, M.E., D. Cheung, B. Strates, M. Kodama, and K. Sheikh. (1987). Chemically modified collagen: a natural biomaterial for tissue replacement. *Journal Biomedical*. 21,741–771.
- Nogueira, L.C., (2005), Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chemmistry*. 1065, 207-210.
- Okuda, K., I. Urabe, Y. Yamada, and H. Okada. (1991). Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. *Journal Fermentary Bioengineering*. 71,100–105.
- Olsan, A. (1991). Glucose and glucose containing syrups. *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, VCH Publishers, New York, A, 12, 457-475.
- Özdemir, M., Arslan, H., (2014). Choline-sensing carbon paste electrode containing polyaniline (pani)–silicon dioxide composite-modified choline oxidase. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 42(1), 27-31.
- Özyılmaz, G. (2005). *Glukoz oksidaz ve katalazın ayrı ayrı ve birlikte immobilizasyon ve karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana,11-14.
- Park, S. (2019). Improvement of biosensor accuracy using an interference index detection system to minimize the interference effects caused by icterus and hemolysis in blood samples. *Analyst*, 144(17), 5223-5231.
- Pérez, J. A. C., Sosa-Hernández, J. E., Hussain, S. M., Bilal, M., Parra-Saldivar, R., and Iqbal, H. M. N. (2019). Bioinspired biomaterials and enzyme-based biosensors for point-of-care applications with reference to cancer and bio-imaging. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 168-176.
- Petuccioli, M., Federici, F., Bucke, C., Keshavarz, T., (1999). Enhancement of Glucose Oxidase Production by *Penicillium Variabile*, *Enzyme and Microbiyal Technology*, 24, 397-401.
- Polatoğlu, İ. (2018). Elektrokimyasal Biyosensörler için Karbon Pasta Elektrot Tasarımı ve Karakterizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22, 141-148.
- Popov, A., Aukstakojyte, R., Gaidukevic, J., Lisyte, V., Kausaite-Minkstimiene, A., Barkauskas, J., & Ramanaviciene, A. (2021). Reduced graphene oxide and polyaniline nanofibers nanocomposite for the development of an amperometric glucose biosensor. *Sensors*, 21(3), 948.
- Rauf, A., İhsan, A., Akhtar, K., Ghauri, M.A., Rahman, M., Anvar, M.A., Khalid, A.M., (2006). Glucose Oxidase Immobilization on a Novel Cellulose Acetate-Polymethylmetacrylate. *Journal of Biotechnology*, 121, 351-360.
- Rodriguez-Nogales, J.M., (2004). Kinetic Behaviour and Stability of Glucose Oxidase Entrapped in Liposomes, *Journal of Chem.Technol Biotechnology.*, 79, 72-78.

- Salva, M. L., Rocca, M., Niemeyer, C. M., & Delamarche, E. (2021). Methods for immobilizing receptors in microfluidic devices. *A review. Micro and Nano Engineering*, 11, 100085.
- Schenck, F. W. (2007). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. U.S.A.: Wiley-VHC, Hoboken Nj., 384.
- Schultz, J. S. (1982). *Optical sensor of plasma constituents*. U.S.A. 4,344,438 .
- Scott A.M., Jedd D., Wolchok J.D., Old L.J. (2012). Antibody Therapy of Cancer, *Nature Reviews*, 12, 278-287.
- Shi, Q., Wang, P., Jiang, Y., Kan, J., (2009). Glucose biosensor based on polyaniline synthesized in ionic liquid,. *Biocatalysis and Biotransformation*, 27(1),54-59.
- Singh, M., Kathuroju, P. K., & Jampana, N. (2009). Polypyrrole based amperometric glucose biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 143(1), 430-443.
- Sljukia, B., Banks, C.E., Salter, C., Crossiey, A. (1995). Electrochemically polymerized composites of multi walled carbon nanotubes and poly(vinylferrocene) and their use as modified electrodes. *Application to glucose sensing, Analyst*, 131, 670- 677.
- Suzuki S., Takahashi F., Satoh I., Sonobe N. (1975), Ethanol and lactic acid sensors using electrodes coated with dehydrogenase–collagen membranes. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 48,3246–3249.
- Şavk, A. (2019). *Şeker hastalığının erken dönemde tanısına yönelik yeni nesil sensörlerin sentezi, karakterizasyonu ve uygulamaları* , Yüksek Lisans Tezi, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya, 4-16.
- Tao, Z., Dong, B., Teng, Z., and Zhao, Y. (2020). The Classification of Enzymes by Deep Learning. *IEEE Access*, 8, 89802-89811.
- Telefoncu, A. (1999). *Biyosensörlere genel bakış*. Biyosensör Yazokulu,.Aydın, Kuşadası, 111.
- Towseef, W., Amin Q. A., Quadir, N. (2013). Role of Biosensors in Agro-Food Technology. *Asian Journal of Home Science*, 8, 347–352.
- Turna, Ö., (2006). *Aminoasit Biyosensörlerinin Geliştirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun,19-26.
- Tüylek, Z. (2017). Biyosensörler ve nanoteknolojik etkileşim. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2), 71-80.
- Tüylek, Z. (2021). Biyoteknolojide Biyosensör ve Biyoçip Uygulamaları. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4(3), 468-490.

- Ustabaş, S. (2010). *Glukoz tayini için yeni bir biyosensör hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 4-23.
- Pigman, J. Anet in W. Pigman, D. Horton (1972). *The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry*, (2nd). IA, New York: Academic Press, 170.
- Walker, R. W., Dumke, K. A., & Goran, M. I. (2014). Fructose content in popular beverages made with and without high-fructose corn syrup. *Nutrition*, 30(7-8), 928-935.
- Wang, J. (2001). Glucose biosensors: 40 yrs of advances and challenges. *Electroanalysis*, 12, 983-988.
- Wang, J. (2008). In vivo glucose monitoring: Towards 'Sense and Act' feedbackloop individualized medical systems. *Talanta*, 75, 636-641.
- Weibel, M. K., & Bright, H. J. (1971). The glucose oxidase mechanism: interpretation of the pH dependence. *Journal of Biological Chemistry*, 246(9), 2734-2744.
- Wen, G., Zhang, Y., Shuang, S., Dong, C., and Choi, F. (2007). Application biosensor for monitoring of ethanol. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(1), 121-129.
- Wolhfarht, G., Trivic, S., Kandrak, J., Pericin, G., Leskovak, V. (2005). Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger* The Mechanism of Action With Molecular Oxygen, Quinones, and one-Electron Acceptors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37, 731-750.
- Xian, Y., Hu, Y., Liu, F., Xian, Y., Wang, H., Jin, L., (2006). Glucose biosensor based on A nanoparticles-conductive polyaniline nanocomposite. *Biosensors a Bioelectronics*, 21, 1996-2000.
- Xu, L., Zhu, Y., Yang, X., Li, C., (2009). Amperometric biosensor based on carbon nanotubes coated with polyaniline/dendrimer-encapsulated Pt nanoparticles for glucose detection. *Materials Science and Engineering*, 29, 1306-1310.
- Xue, H., Shen, Z., Li, Y. (2001). Polyaniline-polyisoprene composite film based glucose biosensor with high permselectivity. *Synthetic Metals*, 124, 345-349.
- Yang, P., Wang, L., Wu, Q., Chen, Z., & Lin, X. (2014). A method for determination of glucose by an amperometric bienzyme biosensor based on silver nanocube modified Au electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 194, 71-78.
- Yoo, E. H., Lee, S. Y. (2010). Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors. Biosensörs*, 10, 4558-4576.

Zor, E., Oztekin, Y., Ramanaviciene, A., Anusevicius, Z., Bingol, H., Barkauskas, J., ... & Ramanavicius, A. (2014). Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase, 1, 10-phenanthroline-5, 6-dione and carbon nanotubes. *Journal of The Electrochemical Society*, 161(13), H3064.



Gazili olmak ayrıcalıktır