

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ALJİNAT-CuO-GOD TEMELLİ AMPEROMETRİK GLUKOZ  
BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ VE ELEKTROKİMYASAL  
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**Vuslat BÜK**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2014**

**Her hakkı saklıdır**

## **ETİK**

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

Tarih

Vuslat BÜK

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ALJİNAT-CuO-GOD TEMELLİ AMPEROMETRİK GLUKOZ BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ VE ELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Vuslat BÜK

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

Bu tez çalışmasında, glukozun amperometrik tayinine yönelik CuO (bakır II oksit) nanopartikülleri ile modifiye aljinat filme immobilize edilmiş GOD (glukoz oksidaz) biyosensörü geliştirilmiştir. Bu nedenle öncelikle immobilizasyonu etkileyecek aljinat miktarı, GOD konsantrasyonu, NHS/EDC çapraz bağlayıcı molar oranı, CuO miktarı ve pH gibi parametrelerin optimizasyonu sağlanmıştır. Geliştirilen biyosensörün yüzey karakterizasyonu Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyonun başarısı FT-IR (Fourier Transform Infrared Spektroskopisi) analizi ile irdelenmiştir. EIS (Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi) ve CV (Döngüsel voltametri) ile immobilizasyon basamakları çalışılmış ve biyosensörün elektrokimyası incelenmiştir. Döngüsel voltametri kullanılarak farklı tarama hızlarında yapılan çalışmalarda CuO nanopartiküllerin ve redoks probunun etkisi araştırılmıştır.  $k_s$  ve  $\alpha$  değerleri hesaplanarak bu etki sayısal olarak açıklanmıştır. Aljinat-CuO-GOD elektrot ile 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında yapılan kalibrasyon çalışmasında iki lineer aralık belirlenmiştir. Küçük lineer aralık 0.04 mM – 0.003 M aralığında ve duyarlılığı  $(30.443 \pm 0.250) \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  şeklindedir. Algılama limiti 1.6  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (S/N=3). Büyük lineer aralık için glukoz konsantrasyonu 0.004 M-0.035 M arasında ve duyarlılığı  $(7.205 \pm 0.063) \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  olarak hesaplanmıştır. Ayrıca biyosensörün kullanılabilirliği araştırılmıştır ve geliştirilen biyosensör ile 15. gün sonunda alınan ölçümde kalan aktivite %78 olarak belirlenmiştir. Biyosensör, konsantrasyonları hastaneye belirlenen 3 farklı konsantrasyondaki insan kan serumlarında denenmiştir ve elde edilen veriler hastane değerleri ile kıyaslanmıştır.

**Ağustos 2014, 110 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Aljinat, CuO Nanopartikülleri, Glukoz Oksidaz, İmpedans Spektroskopisi, Döngüsel Voltametri, Amperometri, Biyosensörler.

## ABSTRACT

Master Thesis

### DEVELOPMENT OF THE AMPEROMETRIC GLUCOSE BIOSENSOR BASED ON ALGINATE-CuO-GOD AND INVESTIGATION OF ELECTROCHEMICAL PROPERTIES

Vuslat BUK

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

In this thesis, the biosensor based on immobilization of Glucose oxidase (GOD) on copper II oxide (CuO)-modified alginate film was developed for amperometric detection of glucose. For this purpose, the first study based on optimization of parameters such as amount of alginate, concentration of GOD, molar ratio of NHS/EDC crosslinking couple, amount of CuO and pH, that affected the immobilization procedure were studied. Surface characterization of the developed biosensor was determined by using Scanning Electron Microscope (SEM). The success of the immobilization process was investigated by using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). Each immobilization step was studied by using Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) and Cyclic Voltammetry (CV) techniques, and the electrochemistry of the biosensor were examined. The effect of CuO nanoparticles and redox probe were investigated by using CV at different scan rates. This affect was explained by calculating  $k_s$  and  $\alpha$  values. The calibration curve of alginate-CuO-GOD electrode in the presence of 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  consisted of two linear range. The smaller linear range was between 0.04 mM - 0.003 M and the sensitivity of  $(30.443 \pm 0.250) \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ . Detection limit of the biosensor was 1.6  $\mu\text{M}$  (S/N=3). The higher linear range was between 0.004 M – 0.035 M and the sensitivity of  $(7.205 \pm 0.063) \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ . The stability of the biosensor also studied and after 15 days the retained activity was 78%, compared with the first day. The biosensor was examined with three real serum samples with different concentrations which were determined by hospital and the results were compared by calculating recovery%.

**August 2014, 110 pages**

**Key Words:** Alginate, CuO nanoparticles, Glucose Oxidase, Impedance Spectroscopy, Cyclic Voltammetry, Amperometry, Biosensors.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince hem bilimsel anlamda hem de sosyal anlamda desteğini ve ilgisini esirgemeyen, deneyimleriyle bana yol gösteren ve bana her konuda öncülük eden çok değerli danışman hocam Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Emel EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı).

Çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimlerinden sık sık yararlandığım çok değerli hocam Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Kaan Cebesoy EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı).

Çalışmalarım sırasında güzel ve eğlenceli anılar biriktirmeme vesile olan ve maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Osman ERBİLİR, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim elemanları Araş. Gör. Hatice ERCAN ve Araş. Gör. Gözde AYDOĞDU'ya,

Çalışmalarım boyunca aynı laboratuvarı paylaştığım çalışma arkadaşlarım Utku KARAKAYA ve Burak DERKUŞ'a

Hayatım boyunca her koşulda beni destekleyen ve cesaretlendiren canım annem Fatoş BÜK, canım babam Mustafa BÜK ve birtanecik kardeşim Çağatay BÜK'e maddi manevi desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Vuslat BÜK

Ankara, Ağustos 2014

# İÇİNDEKİLER

## TEZ ONAYI SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Elektrokimya .....	4
2.1.1 Elektrokimyasal tepkimeler .....	4
2.1.1.1 Elektriksel çift tabaka.....	4
2.1.2 Döngüsel Voltametri (CV).....	7
2.1.3 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) .....	10
2.1.4 Amperometri .....	14
2.2 Biyosensörler .....	16
2.2.1 Biyolojik sinyale göre biyosensörlerin sınıflandırılması.....	18
2.2.1.1 Enzim temelli biyosensörler .....	19
2.2.1.2 İmmüno-sensörler .....	20
2.2.1.3 Genosensörler .....	20
2.2.1.4 Hücre temelli biyosensörler.....	21
2.2.1.5 Biyomimetik sensörler (Aptasensörler).....	22
2.2.2 Transdüserlere göre biyosensörlerin sınıflandırılması .....	23
2.2.2.1 Elektrokimyasal biyosensörler.....	23
2.2.2.2 Optik temelli biyosensörler .....	26
2.2.2.3 Piezoelektrik temelli biyosensörler .....	27
2.2.2.4 Kalorimetrik biyosensörler .....	27
2.2.3 Biyolojik Materyallerin İmmobilizasyonu.....	28
2.2.3.1.Fiziksel adsorpsiyon .....	29
2.2.3.2 Kovalent bağlama .....	29
2.2.3.3 Çapraz bağlama .....	30
2.2.3.4 Affinite yöntemi.....	30
2.2.3.5 Tutuklama yöntemi.....	31

<b>2.3 Çalışmada Kullanılan Biyomolekül, Taşıyıcı Sistem, Nanopartikül ve Çapraz Bağlayıcılar</b> .....	31
<b>2.3.1 <i>Aspergillus niger</i> kaynaklı Glukoz oksidaz enzimi</b> .....	31
<b>2.3.1.1 Glukoz oksidaz enziminin genel özellikleri</b> .....	31
<b>2.3.1.2 Substrat spesifikliğı</b> .....	33
<b>2.3.1.3 Yükseltgenme yarı-reaksiyonu</b> .....	34
<b>2.3.2 Aljinat</b> .....	36
<b>2.3.3 NHS/EDC Çapraz Bağlayıcıları ve reaksiyonları</b> .....	40
<b>2.3.4 CuO nanopartiküller</b> .....	42
<b>3. KAYNAK ARAŞTIRMASI ve ÇALIŞMANIN AMACI</b> .....	43
<b>4. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	49
<b>4.1 Materyaller</b> .....	49
<b>4.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler</b> .....	49
<b>4.1.2 Kullanılan cihazlar</b> .....	49
<b>4.1.3 Kullanılan elektrotlar</b> .....	50
<b>4.1.4 Kullanılan çözeltiler</b> .....	50
<b>4.2 Yöntem</b> .....	51
<b>4.2.1 İmmobilizasyon jelinin hazırlanması</b> .....	51
<b>4.2.2 İmmobilize elektrotların hazırlanması</b> .....	52
<b>4.2.3 SEM mikrograflarının alınması</b> .....	52
<b>4.2.4 FT-IR spektrumlarının alınması</b> .....	52
<b>4.2.5 Amperometrik yöntem ve optimizasyon çalışması</b> .....	52
<b>4.2.5.1 Polimer optimizasyonu</b> .....	53
<b>4.2.5.2 GOD optimizasyonu</b> .....	53
<b>4.2.5.3 Çapraz bağlayıcı optimizasyonu</b> .....	53
<b>4.2.5.4 CuO nanopartikül optimizasyonu</b> .....	54
<b>4.2.5.5 pH optimizasyonu</b> .....	54
<b>4.2.6 Aljinat-CuO-GOD biyosensörün tekrar üretilebilirliğı</b> .....	54
<b>4.2.7 Aljinat-CuO-GOD biyosensörün kullanım süresi</b> .....	55
<b>4.2.8 Biyosensörün elektrokimyasal davranışı</b> .....	55
<b>4.2.9 Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi</b> .....	55
<b>4.2.10 Geliştirilen biyosensörün insan kan serumunda denenmesi</b> .....	55
<b>5. ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	57
<b>5.1 Karakterizasyon Çalışmaları</b> .....	57
<b>5.1.1 SEM mikrograflarının değerlendirilmesi</b> .....	57
<b>5.1.2 FT-IR spektrumlarının değerlendirilmesi</b> .....	58
<b>5.2 Optimizasyon Çalışmaları</b> .....	59

5.2.1 Aljinat miktarının biyosensör cevabına etkisi.....	59
5.2.2 GOD konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi .....	60
5.2.3 NHS/EDC çapraz bağlayıcı molar oranının biyosensör cevabına etkisi.....	62
5.2.4 CuO nanopartikül miktarının biyosensör cevabına etkisi .....	63
5.2.5 pH değişiminin biyosensör cevabına etkisi .....	64
5.3 Tekrar Üretilirlik.....	65
5.4 Aljinat-CuO-GOD Biyosensörün Kullanım Süresi.....	66
5.5 Girişim Yapan Türlerin Aljinat-CuO-GOD Biyosensör Cevabına Etkisi .....	67
5.6 Geliştirilen Biyosensörün Elektrokimyasal Davranışı.....	69
5.6.1 Döngüsel voltametri (CV).....	69
5.6.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) .....	71
5.6.3 Tarama hızı çalışması .....	73
5.6.3.1 Aljinat-CuO-GOD elektrodun $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ varlığında tarama hızı çalışması .....	73
5.6.3.2 Aljinat-CuO-GOD elektrodun $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ yokluğunda tarama hızı çalışması ...	76
5.6.3.3 Aljinat- GOD elektrodun $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ varlığında tarama hızı çalışması .....	78
5.7 Kalibrasyon Grafikleri .....	80
5.7.1 Aljinat-CuO-GOD elektrodun 0.1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ varlığında farklı glukoz konsantrasyonlarına cevabı .....	80
5.7.2 Aljinat-CuO-GOD elektrodun $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ kullanılmadan farklı glukoz konsantrasyonlarına cevabı .....	82
5.7.3 Aljinat-GOD elektrodun 0.1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ varlığında farklı glukoz konsantrasyonlarına cevabı .....	84
5.7.4 Lineweaver-Burk grafiği .....	85
5.8 Geliştirilen Aljinat-CuO-GOD Biyosensörün 0.1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ Varlığında ve Yokluğunda Amperometrik Olarak İnsan Kan Serumuna İle Denenmesi.....	87
6. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	90
KAYNAKLAR .....	97
ÖZGEÇMİŞ.....	110

## SİMGELER DİZİNİ

Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş klorür
Au	Altın
C	Konsantrasyon
C	Karbon
C	Kapasitans
C <sub>d1</sub>	Çift tabaka kapasitansı
cm <sup>2</sup>	Santimetre kare
CuO	Bakır (II) oksit
D	Difüzyon katsayısı
E	Potansiyel
F	Faraday
Fe	Demir
Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-/3</sup>	Potasyum ferrosiyaniür ve potasyum ferrisiyaniür
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
I	Akım
J	Akım yoğunluğu
KCl	Potasyum klorür
k <sub>m</sub>	Michaelis-Menten Sabiti
k <sub>s</sub>	Elektron-Transfer Sabiti
L	Litre
ln	Doğal Logaritma
mmol L <sup>-1</sup>	Milimolar
mmol	Milimol
N	Azot
NaCl	Sodyum klorür
NHS	N-hidroksisüksinimit
O <sub>2</sub>	Moleküler Oksijen
Pt	Platin
R	Gaz Sabiti
R	Direnç
R <sub>ct</sub>	Yük transfer direnci
R <sub>p</sub>	Polarizasyon direnci
R <sub>s</sub>	Çözelti direnci

s	Saniye
T	Sıcaklık
t	Süre
U	Ünite
V	Volt
Z	İmpedans
Zn	Çinko
$\mu$ A	Mikroamper
$\mu$ M	Mikromolar
$\mu$ mol	Mikromol
$\alpha$ s	Elektron-Transfer Katsayısı
$\Delta\phi$	Potansiyel düşüşü
$\omega$	Açısal frekans
$\Omega$	Ohm

#### **Kısaltmalar**

BDM	<i>Bochris, Devanathan ve Muller</i> modeli
BSA	Bovin Serum Albumin
CV	Döngüsel Voltametri
DNA	Deoksiribonükleik Asit
E.C	Enzim Komisyonu
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit
EEC	Elektriksel Eşdeğer Devre
EIS	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
FAD	Flavin Adenin Dinükleotit
FT-IR	Fourier Transform Infrared (Kızılötesi) Spektroskopisi
GC	Camsı karbon
Glu	Glukoz
GOD	Glukoz oksidaz
His	Histidin
IHP	İç Helmholtz Tabakası
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
OHP	Dış Helmholtz Tabakası
RSD	Relatif Standart Sapma
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SH	Tiyol grubu

ssDNA  
w

Tek zincir Deoksiribonükleik Asit  
Su

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Helmholtz modelinin şematik gösterimi ve elektrot ile çözelti arayüzeyinde potansiyel düşüşü .....	5
Şekil 2.2 Gouy-Chapman modelinin şematik gösterimi ve elektrot ile çözelti arayüzeyinde potansiyel düşüşü .....	5
Şekil 2.3 Gouy-Chapman-Stern modelinin şematik gösterimi ve elektrot ile çözelti arayüzeyinde potansiyel düşüşü .....	6
Şekil 2.4 BDM modelinin şematik gösterimi ve elektrot ile çözelti arayüzeyinde potansiyel düşüşü .....	7
Şekil 2.5 Dönüşümlü voltametri potansiyel taramasının zamanla değişimi.....	8
Şekil 2.6 Çıplak Au elektrot, G-dsDNA-SH/Au biyoelektrodun ve ssDNA-SH/Au elektrodun CV voltamogramları. Tarama hızı: $20\text{Vs}^{-1}$ . Çözelti ortamı: PBS içinde $40\mu\text{M}$ MB .....	10
Şekil 2.7 İmpedimetrik sisteme uygulanan sinüsoidal uyarı.....	11
Şekil 2.8.a Negatif yüklü elektrikleştirilmiş elektrodun arayüzü ve karşıt katyonların yüzey boyunca dizilimi ve her arayüz bileşenine karşılık gelen elektriksel devre elemanları. b. Arayüz için ideal Randles elektriksel eşdeğer devresi.....	12
Şekil 2.9.Nyquist grafiği.....	13
Şekil 2.10.Kronoamperometrik uyarı ve cevap .....	16
Şekil 2.11 Biyosensörün şematik gösterimi.....	17
Şekil 2.12 Biyosensör katagorileri.....	18
Şekil 2.13 Çeşitli biyolojik sinyal mekanizmaları ile biyo-algılamanın şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.14 İmmobilizasyon yöntemleri .....	28
Şekil 2.15.Glukoz oksidaz enziminin reaksiyonu.....	32
Şekil 2.16.Glukoz oksidaz enziminin tersiyer yapısı .....	32
Şekil 2.17 Yükseltgenmiş enzimin substratsız aktif bölgesi ve enzim-FAD <sub>ox</sub> -β-D-glukoz kompleksi (Wohlfahrt vd. 1999) .....	34
Şekil 2.18 β-D-glukozun yükseltgenme yarı reaksiyonu için önerilen mekanizmalar .....	35
Şekil 2.19 β-D-glukozun yükseltgenme yarı reaksiyonu için geliştirilen mekanizmanın şematik gösterimi .....	36
Şekil 2.20 Laminara digitata .....	37
Şekil 2.21 Kahverengi su yosunundan elde edilen aljinatın monomerleri ve yapısı.....	38
Şekil 2.22 Aljinat jel yapısı ve $\text{Ca}^{2+}$ iyonu çapraz bağlama modeli.....	38
Şekil 2.23 Aljinatın olası bağlanma formları (a) GG/GG bağlanma formu, (b) MG/MG bağlanma formu, ve (c) GG/MG bağlanma formu .....	39
Şekil 2.24 EDC ve DCC'nin kimyasal yapıları .....	40
Şekil 2.25 EDC çapraz bağlama reaksiyonu.....	41
Şekil 2.26 NHS/EDC çapraz bağlama reaksiyonu.....	41

Şekil 5.1.a. Aljinat, b. Aljinat-CuO, C. Aljinat-CuO-GOD filmlerinin SEM mikrografları.....	57
Şekil 5.2. FT-IR spektrumları; a. aljinat, b. CuO, c. GOD immobilize aljinat film, d. aljinat-CuO nanokompozit, e. GOD immobilize aljinat-CuO film. ....	58
Şekil 5.3 Aljinat miktarının biyosensör cevabına etkisi.....	60
Şekil 5.4 GOD konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi.....	61
Şekil 5.5 NHS/EDC molar oranının biyosensör cevabına etkisi.....	62
Şekil 5.6 CuO nanopartikül miktarının biyosensör cevabına etkisi.....	63
Şekil 5.7 pH değişiminin biyosensör cevabına etkisi.....	64
Şekil 5.8 Aljinat-CuO-GOD elektrodun tekrar üretilebilirlik grafiği .....	65
Şekil 5.9 Aljinat-CuO-GOD biyosensörün kullanım süresi.....	67
Şekil 5.10 Girişim etkisi .....	68
Şekil 5.11 Biyosensörün dönüşümlü voltamogramı .....	70
Şekil 5.12 Biyosensörün impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği .....	72
Şekil 5.13 Aljinat-CuO-GOD elektrodun değişen tarama hızına karşı elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının lineer grafiği (5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ varlığında) .....	73
Şekil 5.14 Aljinat-CuO-GOD elektrot için tarama hızının doğal logaritmasına (ln v) karşı pik potansiyelleri (Epa, Epc) grafiği (5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ varlığında) .....	75
Şekil 5.15 Aljinat-CuO-GOD elektrodun değişen tarama hızına karşı elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının lineer grafiği (5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ yokluğunda).....	76
Şekil 5.16 Aljinat-CuO-GOD elektrot için tarama hızının doğal logaritmasına (ln v) karşı pik potansiyelleri (Epa, Epc) grafiği (5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ yokluğunda).....	77
Şekil 5.17 Aljinat- GOD elektrodun değişen tarama hızına karşı elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının lineer grafiği (5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ varlığında) .....	78
Şekil 5.18 Aljinat-GOD elektrot için tarama hızının doğal logaritmasına (ln v) karşı pik potansiyelleri (Epa, Epc) grafiği (5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ varlığında) .....	79
Şekil 5.19 Aljinat-CuO-GOD elektrot için; A. Kalibrasyon grafiği, B. Büyük lineer aralık grafiği (0.1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ varlığında).....	80
Şekil 5.20 Aljinat-CuO-GOD elektrot için küçük lineer aralık grafiği (0.1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ varlığında).....	81
Şekil 5.21 Aljinat-CuO-GOD elektrot için; A. Kalibrasyon grafiği, B. Büyük lineer aralık grafiği ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ yokluğunda).....	82
Şekil 5.22 Aljinat-CuO-GOD elektrot için küçük lineer aralık grafiği ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ yokluğunda).....	83
Şekil 5.23 Aljinat-GOD elektrodun kalibrasyon grafiği (0.1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ varlığında).....	84
Şekil 5.24 Aljinat-GOD elektrot için lineer aralık grafiği (0.1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ varlığında) .....	85

Şekil 5.25 Aljinat-CuO-GOD elektrodun Lineweaver-Burk grafiği (0.1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$ varlığında) .....	86
Şekil 5.26 Aljinat-CuO-GOD elektrodun Lineweaver-Burk grafiği (0.1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$ yokluğunda).....	86
Şekil 5.27 Aljinat-GOD elektrodun Lineweaver-Burk grafiği (0.1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$ varlığında) .....	87
Şekil 5.28 Aljinat-CuO-GOD elektrotla redoks probu kullanılarak elde edilen değerler ile hastane değerlerinin uyumluluğu .....	89
Şekil 5.29 Aljinat-CuO-GOD elektrotla redoks probu kullanılmadan elde edilen değerler ile hastane değerlerinin uyumluluğu .....	89

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Yükseltgenme yarı-reaksiyonunda elektron-verici substratlar .....	33
Çizelge 5.1 Girişim etkisinin incelenmesi (0.05 M, pH 6.5 fosfat tamponu, 0.1 mM [Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>4-/3-</sup> ] varlığında) .....	68
Çizelge 5.2 Serum çalışması .....	88

## 1. GİRİŞ

Vücutta bulunan patojenik ve fizyolojik moleküllerin yüksek hassasiyet ve seçicilik ile saptanabilmesi hastalıkların erken tanı ve tedavisine olanak sağlar. Erken tanı ve teşhis hastalıkla mücadelede başarı şansını arttırabilir, hastalığın ileri safhalarında ortaya çıkabilecek hasta bakımı maliyetlerini düşürmek için kullanılabilir. Bununla birlikte, yaygın klinik uygulamalarına rağmen bu tekniklerin birçok potansiyel sınırlamaları vardır. Örneğin, birçok erken tanı cihazı geç cevap süresine sahiptir. Ayrıca bazı ölçümler pahalıdır ve her yıl sağlık hizmetleri endüstrisine milyonlarca dolara mal olmaktadır. Bu nedenle, daha etkili ve güvenilir algılama ve belirleme teknolojileri geliştirmeye her zaman ihtiyaç vardır ve olacaktır.

Biyosensörler genellikle hedef molekülleri ya da makro molekülleri biyolojik olarak tanımlamak için kullanılan analitik cihazlar olarak tanımlanırlar. Biyosensörler, bu tanıları algılanabilir bir çıkış sinyaline çeviren fizikokimyasal bir dönüştürücüye (transdüser) bağlıdırlar. Biyosensörler tipik olarak 3 bileşenden oluşur. (1) enzimler, antikorlar, DNA gibi biyobileşenleri kapsayan biyoreseptör kısmı ; (2) biyolojik veya biyokimyasal reaksiyon sonucu elde edilen sinyal veya cevabı belirlenebilir elektriksel sinyale dönüştüren transdüser kısmı; ve (3) çıktının uygun bir formatta görüntüsünü içeren sinyal işleme sistemi. Bu kombinasyonun amacı çeşitli araştırma ve teknoloji alanlarındaki analitik amaçlar için biyolojik algılamanın hassasiyetini ve seçiciliğini kullanabilmektir.

Biyoreseptör ya da biyolojik tanımlama elementi bir biyosensörün önemli bir ayırt edici özelliğidir. Biyoreseptör sensörün tanımlama sistemi ile hedef analiti uzlaştırır. Özellikle bir biyoreseptörün, farklı bir molekülün girişimini önlemek için sepesifik hedef analite karşı hassas ve seçici olması çok önemlidir. Genellikle biyosensörler kullandıkları biyolojik sinyalleme mekanizmalarına göre sınıflandırılabilirler. Biyosensörler tarafından kullanılan biyolojik sinyalleme mekanizmalarına göre enzimatik biyosensörler, immünosensörler, genosensörler, hücre temelli biyosensörler ve biyomimetik sensörler olmak üzere beş ana sınıfa ayrılabilirler. Kullanılan transdüserlere göre ise elektrokimyasal (amperometrik, impedimetrik, potansiyometrik,

kondüktometrik vb.), piezoelektrik, kalorimetrik ve optik biyosensörler olarak ayrılırlar.

Diabetes mellitus, dünya çapında yaygın bir sağlık problemidir. İnsülin eksikliğinin (hiperglisemi) bir sonucu olan bu metabolik bozukluk kan glukoz konsantrasyonunun normal aralığının (4.4 mM - 6.6 mM) üstünde olması şeklinde gözlenir. Diyabet kalp hastalığı, böbrek yetmezliği, sinir hasarı, körlük ve yaraların geç iyileşmesi hatta iyileşmemesi gibi yüksek risk içeren birçok komplikasyonu da beraberinde getirmektedir. Dünyada ölüm ve sakatlık ile sonuçlanan en yaygın hastalıklardan biri olarak bilinmektedir.

Diyabetin teşhis ve takibi kan glukoz düzeyinin günlük olarak düzenli ölçülmesini esas kılmıştır. Bu amaca hizmet etmek için çok çeşitli glukoz biyosensörleri geliştirilmiştir ve bunların %85'i biyosensör piyasasında ki yerlerini almıştır. Bu kadar büyük bir markete sahip olması glukozu yeni geliştirilen görüntüleme tasarımları için model yapmıştır. Elektrokimyasal glukoz oksidaz (GOD) temelli biyosensör çalışmaları glukoz ölçümü için kolay kullanımlı, daha ucuz, daha duyarlı ve algılama limiti daha düşük biyosensör geliştirilmesinde en çok çalışılan konulardan biridir.

1962 yılında Clark ve Lyons'un Cincinnati Çocuk Hastanesinde glukoz biyosensörün ilk tasarımını geliştirmelerinden bu yana çok çeşitli yöntem ve yenilikler glukoz biyosensörü alanında uygulanmıştır. Birinci nesil glukoz biyosensörleri glukoz oksidazın glukozu glukonolaktona yükseltirken moleküler oksijeni kullanmasına ve oluşan hidrojen peroksitin algılanması esasına dayanmaktadır. Hidrojen peroksitin belirli bir polarizasyon voltajında oksijene yükseltgenmesi şeklinde uygulanmaktadır. İkinci nesil biyosensörlerde enzimin aktif bölgesi ve elektrot arasında gerçekleşen elektron aktarımına ivme kazandırmak için fizyolojik olmayan ferrosen, ve türevleri, ferri siyanit, prussian-mavisi gibi medyatörler kullanılmıştır. Ancak eksiklikler devam etmiştir ve bu nedenle glukoz oksidazın aktif bölgesi ile elektrot arasında direkt bir elektron transferi sağlanması konusuna yönelim artmıştır. Bu amaç için iletken polimerler ve çok çeşitli nanopartiküller ve TTF-TCNQ (tetratiafulvalen-tetrasiyanoquinobimetan) gibi iletken organik tuzlar kullanılmıştır. Ancak hala elektron

aktarımının iyileştirilmesine yönelik yapılan çalışmalarda büyük eksiklikler bulunmaktadır.

Nanoteknolojinin dahil olduğu biyosensör sistemleri yeni bir akım olan nanobiyosensörleri oluşturmuştur. Nanomateryallerin yüzey alanını arttırmaları, elektron aktarımını desteklemeleri, girişim etkisini azaltmaları enzim immobilizasyonu için uygun çevre yaratmaları, enzim aktivitesini iyileştirici yönde olumlu katkıları gibi eşsiz özellikleri onları ilgi çekici yapmaktadır. Metal/metal-oksit nanopartiküllerin elektrokimyasal sensör yapımında kullanımına yönelik çalışmalar oldukça umut verici sonuçlar sergilemiştir. Manyetik nanomateryaller güçlü manyetik özellikleri, yüksek ayırma etkinliği, geniş yüzey alanı, doğa dostu olmaları ve zehirli olmamaları gibi özellikleriyle ilgi çekmektedir. Dışarıdan uygulanan bir manyetik alana yönlendirilmeleriyle ayrılmaları sağlanabilmektedir. Biyosensör sistemlerine entegre edildiklerinde bu özelliklerinden faydalanılarak manyetik-kontrollü biyoelektrokimyasal sistemlerin oluşturulabilmesi mümkündür. Karbon nanotüpler (CNT) nanoteknolojinin en yaygın çalışılan yapılarından biridir. Çelikten 100 kat daha güçlü olmaları, saf elmadan daha iyi termal özellikler göstermeleri, bakıra benzer iletkenlik göstermeleri ve yüksek akımları taşıyabilmeleri onları oldukça önemli bir sınıf haline getirmektedir. Grafitin elektriksel özellikleri ile nanotüpün fiziksel özelliklerinin kombinasyonu karbon nanotüplere çok etkili elektriksel özellikler kazandırmıştır.

Bu tez çalışmasında glukozun tayinine yönelik CuO nanopartikülleri ile modifiye edilmiş aljinat filme immobilize-GOD biyosensörü geliştirilmiş ve elektrokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Öncelikle geliştirilecek olan sensörün immobilizasyon için önemli olan aljinat, CuO miktarları, NHS/EDC çapraz bağlayıcı molar oranları, GOD konsantrasyonu ve çalışma ortamının pH'sı gibi parametreleri optimize edilmiştir. Geliştirilen biyosensörün yüzey karakterizasyonu SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu) görüntüleri ile çalışılmıştır ve immobilizasyonun başarısı FT-IR (Fourier Transform Infrared (Kızılötesi) Spektroskopisi) spektrumları ile açıklanmıştır. Geliştirilen biyosensörün kalibrasyon grafikleri çizilerek algılama limiti ve duyarlılığı belirlenmiştir. Ayrıca biyosensörün ömrü ve tekrarlanabilirliği çalışılmıştır. En son insan kan serumu ile çalışılarak elde edilen veriler hastane verileri ile kıyaslanmıştır.

## **2. KURAMSAL TEMELLER**

### **2.1 Elektrokimya**

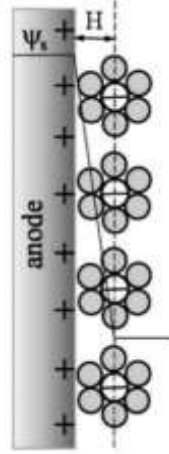
#### **2.1.1 Elektrokimyasal Tepkimeler**

Metal ile çözelti arasında elektron aktarımına dayanan reaksiyonlara elektrokimyasal reaksiyonlar adı verilmektedir. Elektron aktarımı metal yüzeyine sıfır mesafede gerçekleşmemekte, arayüzey adı verilen bölgede aktarım sağlanmaktadır. Çözeltide bulunan iyon/moleküllerin tepkimeye girebilmesi için arayüzeyde adsorplanması gerekir ve bu iyon/moleküller elektrot potansiyeli ve elektrodun katalitik özelliğine bağlı olarak anodik ya da katodik olayları gerçekleştirir.

##### **2.1.1.1 Elektriksel çift tabaka**

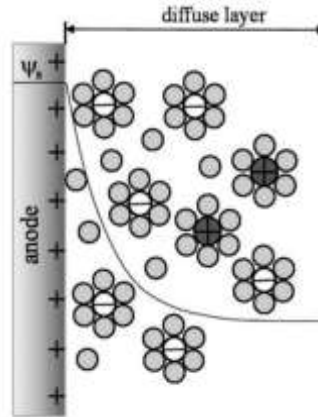
Elektriksel çift tabaka için ilk modeli Helmholtz 1879 yılında geliştirmiştir. Helmholtz bu modeli, metal elektrot yüzeyinde iyonların tek tabaka halinde adsorplanabilmesi şeklinde basit bir kondansatör olarak tanımladı.

Bu modele göre, elektrot ve çözeltideki iyonlar arasında sadece solvasyon tabakası vardır ve dolayısıyla iyonlar elektrotta solvasyon kabukları tarafından sınırlanan bir mesafeye kadar yaklaşabilirler. Böylece iyonların yeniden düzenlenmesiyle oluşan potansiyel düşüşü lineerdir. Bu durum sadece elektrot yüzeyi ile tek tabaka arasındaki bölgede (Dış Helmholtz Tabakası-OHP) gözlenir.



Şekil 2.1 Helmholtz modelinin şematik gösterimi ve elektrot ile çözelti arayüzeyinde potansiyel düşüşü

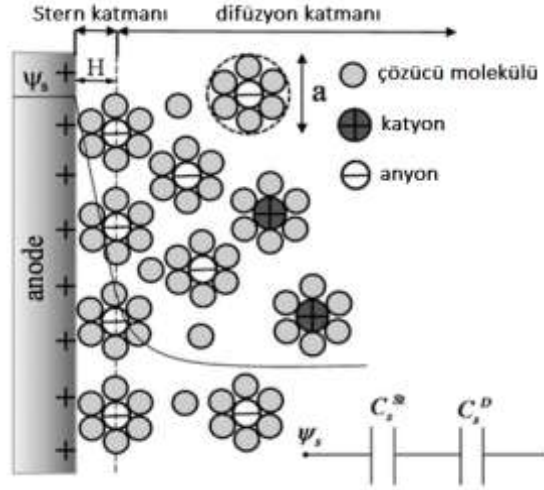
1910 yılında Gouy-Chapman; Helmholtz modelini geliştirerek açıklamışlardır. Bu modele göre, çözeltideki iyonların Brown hareketlerinden dolayı serbestçe dolaşmaları OHP için uygun değildir. Böylece elektrot ile iyon arasında oluşan elektrostatik etkileşim çözeltiden tanecik yüzeyine doğru zıt yüklü dengeleyici iyonların adsorpsiyonundan dolayı etkisiz hale gelir ve yük difüzyon tabakasına dağılır. Bu nedenle potansiyel üstel olarak azalır ve OHP değil elektrot yüzeyine yakın bölgelerde gerçekleşir.



Şekil 2.2 Gouy-Chapman modelinin şematik gösterimi ve elektrot ile çözelti arayüzeyinde potansiyel düşüşü

1924 yılında Stern çözelti içinde iyonların su molekülleri ile çevrili olması nedeniyle elektrot yüzeyine aslında o kadarla yaklaşamadıklarını dolayısıyla Gouy-Chapman

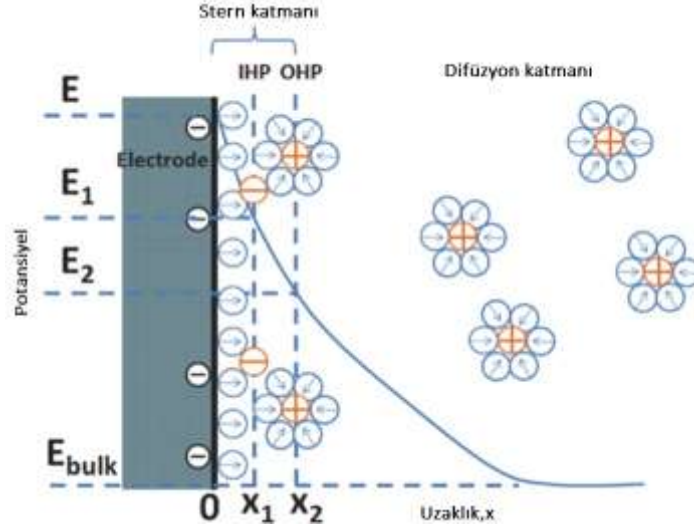
modelindeki gibi yüksek bir potansiyel düşüşün OHP-elektrot yüzeyi arasında meydana gelemeyeceğini açıklamıştır (Gouy-Chapman-Stern modeli).



Şekil 2.3 Gouy-Chapman-Stern modelinin şematik gösterimi ve elektrot ile çözelti arayüzeyinde potansiyel düşüşü

1947 yılında Grahame Stern'in modelindeki çözünen iyonlara karşı çözünemeyen iyonların elektrot yüzeyine daha fazla yaklaşabildiğini göstermiştir. Böylece elektrota doğrudan ulaşan iyonlar spesifik olarak adsorplanırlar. Bu adsorpsiyon tabakasına İç Helmholtz Tabakası (IHP) denir.

1963 yılında Bochrıs, Devanathan ve Muller BDM modelini geliştirmişlerdir. Elektrot yüzeyine yakın su moleküllerinin dipolleri bu yakınlık nedeniyle sabitlenmiştir ve oldukça sıralı dizilmişlerdir. Bu model elektriksel çift tabakayı tanımlayan günümüzün modelidir.

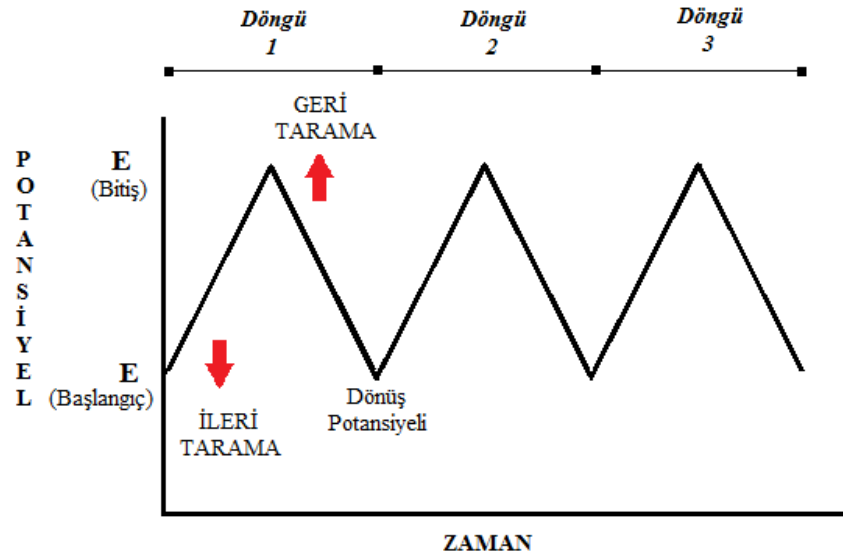


Şekil 2.4 BDM modelinin şematik gösterimi ve elektrot ile çözelti arayüzeyinde potansiyel düşüşü

### 2.1.2 Döngüsel Voltametri (CV)

Voltametrik deneyler 3-elektrot sisteminde - çalışma, karşıt ve referans elektrot - gerçekleştirilir. Çalışma elektrodu zamanla potansiyeli değiştirilen elektrottur. Platin elektrot, grafit, karbon pasta elektrot, altın elektrot ve camsı karbon elektrot en yaygın kullanılan çalışma elektrotlarıdır. Referans elektrot potansiyeli sürekli sabit kalan elektrottur. Genelde gümüş/gümüş klorür ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) veya doymuş kalomel elektrot (SCE) kullanılır. Karşıt elektrot olarak genellikle platin tel veya levha elektrot kullanılmaktadır.

Dönüşümlü voltametricde potansiyel zamanla doğrusal olarak değiştirilir (Şekil 2.5). Potansiyel taraması başlangıç ve bitiş potansiyeli arasında yapılırsa metoda doğrusal taramalı voltametri (LSV) denir. Ancak aynı tarama hızıyla başlangıç potansiyeli yönüne göre ters yönde tarama yapılırsa metoda dönüşümlü voltametri (CV) denir. İleri taramada indirgenme reaksiyonu gerçekleşmiş ise ters tarama da yükseltgenme reaksiyonu gerçekleşmektedir.



Şekil 2.5 Dönüşümlü voltametri potansiyel taramasının zamanla değişimi

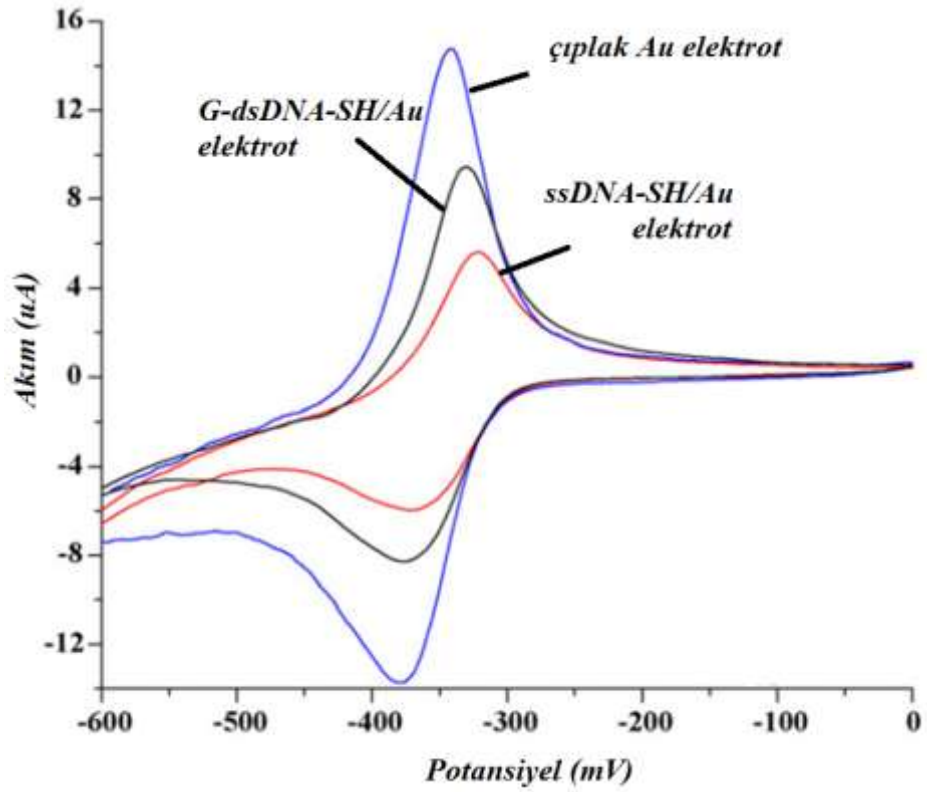
CV çalışmasında elde edilen pik; akım büyüklüğü, elektronegatif maddenin konsantrasyonu, transfer edilen elektron sayısı, elektrodun yüzey alanı ve difüzyon katsayısı ile değişir. Bu yöntemde çalışma elektroduna uygulanan potansiyel elektroaktif maddenin yükseltgenme potansiyeline ulaştığında yükseltgenme başlar (ve maddenin indirgenme potansiyeline ulaştığında indirgenme başlar). Potansiyel arttıkça maddenin yükseltgenme hızı artar ve dolayısıyla akımda hızlı bir artış gözlenir. Bu esnada çalışma elektrodu çevresinde difüzyon ile madde aktarımı başlar. Yükseltgenme hızı yeterince arttığında akım elektrot yüzeyine difüzyon ile gelen madde miktarından etkilenir. Sürekli olarak difüzyon katmanı kalınlaştığı için zamanla difüzyon hızı ve akım azalmaya başlar.

CV voltamogramlarının detaylı olarak incelenmesi sistemin hangi potansiyelde yükseltgendiği, reaksiyonun tersinir olup olmadığı ve tepkimede yer alan türlerin yüzeye tutunup tutunmadığı konularında açıklamalar sunmaktadır. Değişik tarama hızlarında yapılan çalışmalarda indirgenme ve yükseltgenme ürünlerinin kararlılıkları belirlenebilmektedir. Ayrıca ileri yönde tarama ile kinetik veriler hesaplanabilmektedir.

Ayrıca dönüşümlü voltametri ile modifiye edilmiş elektrotlarla yapılan çalışmalarda çözelti ortamında bulunan elektroaktif türlerin modifiye yüzeydeki davranışları

incelenmektedir. Bu teknik modifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği, yüzeyin iletken olup olmadığı, yüzeye bağlı grupların çalışma potansiyelinde yükseltgenip indirgenmesi, duyarlılığı ve seçiciliği açıklayabilmektedir.

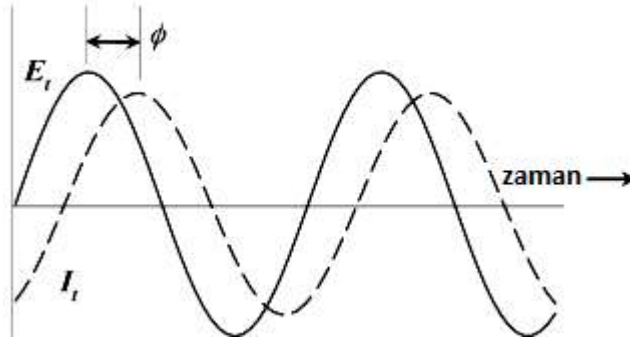
Bu yöntemde çeşitli redoks problemlerinin elektrokimyasal özellikleri kullanılır. Redoks problemleri tersinir olarak indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonunu çok hızlı elektron transferi ile gerçekleştirmektedirler. En çok kullanılan redoks problemleri; ferri/ferro sistemi, metilen mavisi, ferrosen'dir. Çalışma öncelikle konsantrasyonu belli olan redoks problemlerinin bulunduğu çözelti içerisinde modifiye edilmemiş temiz çalışma elektrodu ile belirlenen potansiyel aralığında gerçekleştirilir. Sonrasında aynı parametreler modifiye edilmiş elektroda da uygulanarak CV alınır. Elde edilen voltamogramlar gerçekleştirilen modifikasyon hakkında elektrokimyasal açıdan detaylı bilgi vermektedir. Patel ve arkadaşları (2010); menenjitte neden olan gram negatif bakteri *Neisseria meningitidis*'in DNA probe temelli elektrokimyasal bir genosensör geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmada 23 bazdan oluşan 5'-tiyol uç etiketli tek zincirli DNA probe (ssDNA-SH) altın elektrot yüzeyine ve cam kaplanmış altın (Au) elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir ve CV çalışmalarında redoks probe olarak metilen mavisi kullanılmıştır. Çıplak altın elektrotun yükseltgenme piki (14.76  $\mu$ A); ssDNA-SH/Au modifiye elektrodun yükseltgenme pikinden daha yüksektir. Elde edilen bu sonuç DNA probe'nun elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize edildiğini kanıtlamıştır. Çıplak altın elektrodun yüksek piki elektrot ile metilen mavisi arasında gerçekleşen hızlı ve etkili elektron aktarımı ile ilişkilendirilmiştir. G-dsDNA-SH/Au modifiye elektrodun ssDNA-SH/Au modifiye elektroda göre daha yüksek pik vermesi ise ssDNA-SH/Au modifiye yüzeyde eşleşmemiş azotlu bazların (Guanin gibi) metilen mavisi ile olan güçlü ilişkisinden kaynaklandığı şeklinde açıklanmıştır. Çünkü ssDNA sınırlı sayıda azotlu baz içerirken, genomik DNA oldukça uzun hibridleşmemiş ssDNA'dan oluşmaktadır ki bu sayısının azotlu baz demektir. Dolayısıyla metilen mavisi ile olan etkileşim daha fazladır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Çıplak Au elektrot, G-dsDNA-SH/Au biyoelektrodun ve ssDNA-SH/Au elektrodun CV voltamogramları. Tarama hızı:  $20\text{Vs}^{-1}$ . Çözelti ortamı: PBS içinde  $40\mu\text{M}$  MB

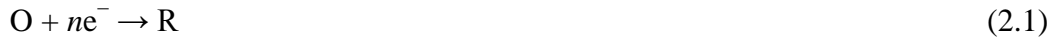
### 2.1.3 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)

EIS yönteminde metal yüzeye küçük genlikli alternatif akım uygulanarak metal direnci ve yüzey yapısı incelenmektedir. Elektrokimyasal hücrelerde çift tabakanın kalınlığı uygulanan potansiyel ile orantılıdır ve bu kapasitans değeri alternatif akım spektroskopisi (AC-Impedance Spectroscopy) ile ölçülebilmektedir. Bu teknikle elektrokimyasal hücreye sinüsoidal sinyal pertubasyonları uygulanmakta ve bu süreçte elde edilen farklı elektrokimyasal değişimlere karşı elde edilen akım değeri belirlenmektedir (Şekil 2.7). EIS frekans düzleminde elektriksel bilgiler veren karakterizasyon tekniğidir.

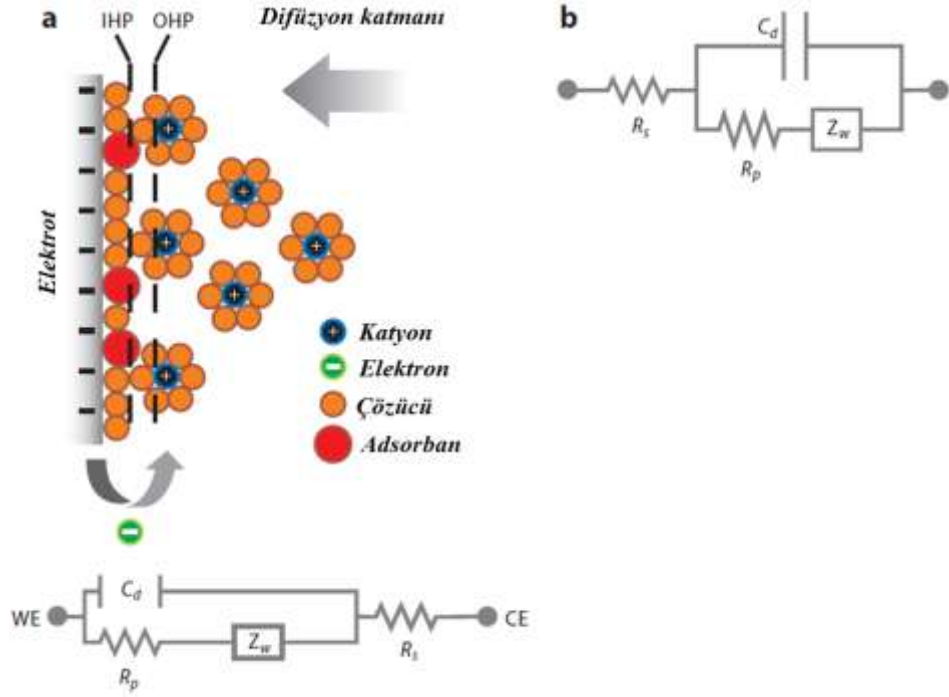


Şekil 2.7 İmpedimetrik sisteme uygulanan sinüsoidal uyarı

Elektrokimyasal bir reaksiyondan dolayı, elektrikleştirilmiş arayüzeyden geçen akım her zaman faradik olmayan bileşenler içerir.



Eşitlikte; n transfer edilen elektron sayısı, O yükseltgen ve R üründür (indirgen). Şekil 2.8 a'da elektrikleştirilmiş arayüze doğru oluşan elektron transferi gösterilmiştir. Yük transferi faradik ve faradik olmayan bileşenlere neden olmaktadır. Faradik bileşen bir reaksiyon yoluyla arayüze doğru polarizasyon direnci denilen ( $R_p$ ) aktivasyon bariyerini ve bununla beraber dengesiz çözelti direncini ( $R_s$ ) aşarak gerçekleşen elektron transferinden kaynaklanmaktadır (McDonald, 2006). Faradik olmayan akım çift tabaka kapasitörün ( $C_d$ ) yüklü hale gelmesinin bir sonucudur. Arayüzde yük aktarımı başladığında, reaktant ve ürünün kütle aktarımı elektron transfer oranının belirlenmesinde rol oynar. Frekans bağımlı kütle aktarımı başka bir impedans sınıfı olan Warburg impedansını ( $Z_w$ ) oluşturur. Şekil 2.8 a'da her bir devre bileşeni her bir arayüz bileşenine denk gelmektedir. İlk kez Randles (Randles, 1947) tarafından açıklanan elektriksel eşdeğer devre (EEC) şekil 2.8 b'de gösterilmiştir. Bu model hem yüksek-frekans bileşenlerini ( $R_s$  gibi) hem de düşük-frekans bileşenlerini ( $Z_w$  gibi) gözler önüne sermektedir. EEC'lerin soldan sağa düzenlemesi oldukça önemlidir, çünkü impedans verisi normal olarak bu şekilde görüntülenir. Ayrıca polarizasyon direnci denilen ( $R_p$ ) herhangi bir potansiyeldeki aktivasyon bariyeri, standart (veya formal) elektrot potansiyelinde yük-transfer direnci ( $R_{ct}$ )'ne dönüşür.

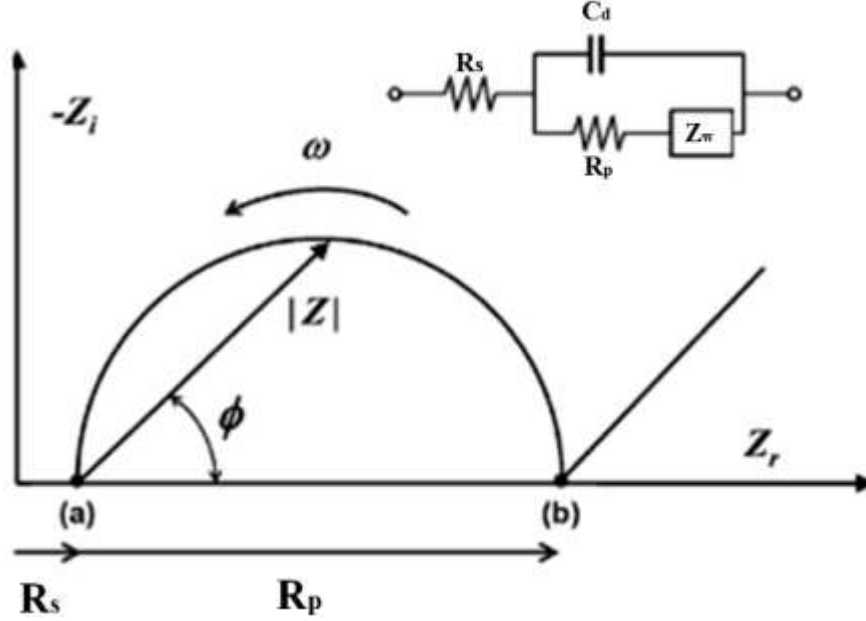


Şekil 2.8.a. Negatif yüklü elektrikleştirilmiş elektrodun arayüzü ve karşıt katyonların yüzey boyunca dizilimi ve her arayüz bileşenine karşılık gelen elektriksel devre elemanları. b. Arayüz için ideal Randles elektriksel eşdeğer devresi

Kapasitif akımları ortadan kaldırmak ya da minimal düzeyde tutmak için elektrokimyacılar normal ve diferansiyel puls voltametri gibi teknikleri geliştirmektedirler (Bard ve Faulkner, 2001). Bu teknikler gereklidir çünkü lineer dalga veya döngüsel voltametri, kronoamperometri ve kronopotansiyometri çalışmalarından elde edilen kısa süreli sinyaller deney koşullarına bağlı olarak çift tabaka yüklülüğünden etkilenmektedir. Şekil 2.8’de görüldüğü gibi yük-transfer reaksiyonunun yer aldığı çevre, reaksiyon boyunca alınan tek bir empedans datası ile ilişkili tüm parametreleri etkilemektedir. Bu nedenle diğer yöntemlerin tamamlayıcısı olarak EIS çalışması mutlaka yapılmalı ve arayüzey bu şekilde detaylandırılmalıdır.

İmpedimetrik verilerin gösterilmesinde en çok sanal impedansın gerçek impedansa karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen Nyquist grafiği kullanılmaktadır (Şekil 2.9). Yapılan impedimetrik ölçümde öncelikle yüksek frekans (düşük enerji) pertürbasyonları uygulanır ve çözelti direnci ( $R_s$ ) ölçülür. Daha sonra frekans azalır (enerji artar) ve tarama elektrot yüzeyine doğru kayar. En fazla direnç bu kısımda olduğundan kapasitif

direnç sanal impedans kısmında en üst değerde gözlenir. Frekans en düşük (enerji en yüksek) halini aldığıında elektromanyetik dalgalar elektrot içerisine girerek difüzyon olarak bilinen grafikteki doğrusal kısmı oluştururlar.



Şekil 2.9.Nyquist grafiği

Arayüzeyde frekans-bağımlı impedans  $Z(\omega)$ , oldukça kompleks bir anlatıma sahiptir;

$$Z(\omega) = R_s + \frac{R_p + \sigma \omega^{-1/2}}{\sigma \omega^{-1/2} (Cd + 1)^2 + \omega^2 C_d^2 (R_p + \sigma \omega^{-1/2})^2} + j \frac{[\omega C_d R_p + \sigma \omega^{-1/2} + \sigma \omega^{-1/2} C_d \sigma \omega^{-1/2} + 1]}{C_d \sigma \omega^{-1/2} + 1 + \omega^2 C_d^2 (R_p + \sigma \omega^{-1/2})^2} \quad (2.2)$$

Eşitlikte;  $\omega = 2\pi f$ , f frekansdır, j (-1)<sup>1/2</sup> 'dir, ve

$$\sigma, = \frac{RT}{2n^2 F^2 A} \frac{1}{D_o^{1/2} C_o x, t} + \frac{1}{D_R^{1/2} C_R x, t} \quad (2.3)$$

Eşitlikte; A elektrot alanı,  $C_s$  elektrot yüzeyine t zamanda x uzaklıkta bulunan türlerin konsantrasyonudur.

Eşitlik 2.2 basitleştirilirse;

$$Z(\omega) = R_s + \frac{R_p}{1 + \omega^2 R_p^2 C_d^2} - j \frac{\omega R_p^2 C_d}{1 + \omega^2 R_p^2 C_d^2} = Z'(\omega) - jZ''(\omega) \quad (2.4)$$

Yüksek frekanslarda ( $\omega \rightarrow \infty$ ). Düşük frekanslarda ( $\omega \rightarrow 0$ ). Böylece;

$$Z(\omega) = R_s + R_p + \sigma \omega^{-1/2} - j(\sigma \omega^{-1/2} + 2\sigma^2 C_d) \quad (2.5)$$

formülü elde edilir.

Warburg impedansı  $\sigma$  ile aşağıdaki eşitlikle ilişkilendirilmiş olunur;

$$Z_W = \frac{2}{\omega} \sigma^{1/2} \quad (2.6)$$

Böylece, eşitlik 2.4 yarıçapı  $R_p/2$  olan,  $R_s$ 'nin yüksek-frekansta ve  $(R_s + R_p)$ 'nin düşük frekansta  $Z'(\omega)$  aksisinden kestiği bir yarım daireyi açıklamaktadır (Park ve Yoo, 2003; Chang ve Park, 2010).

#### 2.1.4 Amperometri

Amperometrik çalışmalar sabit potansiyel altında gerçekleştirilmektedir. Çözelti içine daldırılan çalışma elektroduna sabit bir potansiyel uygulandığında sistemin termodinamik dengesi bozulur ve çözeltide bulunan tayini yapılacak bileşik elektrot

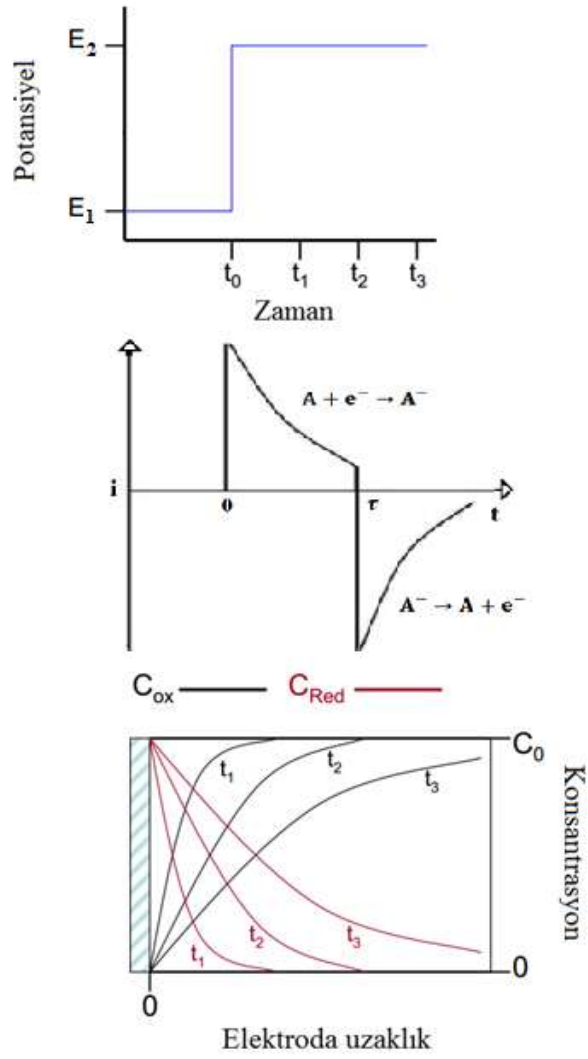
yüzeyinde buna tepki olarak yükseltgenir veya indirgenir. Oluşan akım amperometrinin ölçüm esasını meydana getirmektedir.

Durgun bir çözeltide çalışma elektrodu ve karşıt elektrot arasında sabit bir potansiyel uygulandığında elektrokimyasal reaksiyon için zamanın karekökü ile azalan bir akım elde edilir. Bu teknik kronoamperometri adını alır. Herhangi bir t zamanında elektroda uygulanan potansiyel birdenbire başlangıç potansiyeline düşürülürse, t süresi içinde elektrot tepkimesi ile oluşan ürünün geri yükseltgenmesi nedeniyle anodik akım oluşur. Bu teknik geri çevirmeli kronoamperometri adını alır.

Bu teknikte akım-zaman ilişkisi Cottrell eşitliği ile verilir,

$$i_{s,k} = nFAC_y \frac{D_Y^{1/2}}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad (2.7)$$

Eşitlikte;  $i$  faradik akımı,  $n$  elektron sayısını,  $F$  Faraday sabitini,  $D$  difüzyon katsayısını,  $C$  konsantrasyonu,  $t$  zamanı temsil etmektedir (Bard ve Faulkner 2001).



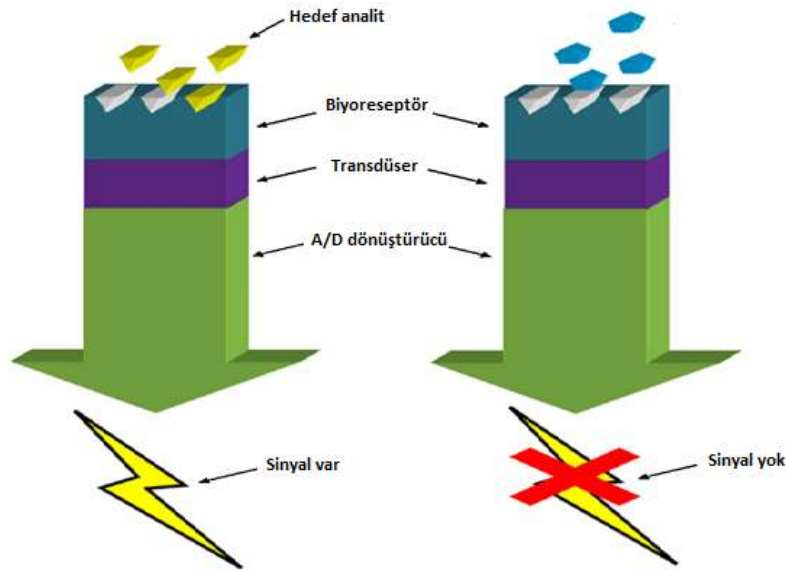
Şekil 2.10 Kronoamperometrik uyarı ve cevap

## 2.2 Biyosensörler

Son yıllarda, biyosensör cihazlarını oluşturabilmek için ihtiyaç duyulan yöntem ve materyallerde birçok önemli teknolojik gelişme sağlanmıştır. Clark'ın ilk oksijen elektrot sensörünü keşfinden bu yana modern biyosensörün hassasiyetinde, seçiciliğinde ve sinyal amplifikasyonunda birçok gelişme olmuştur. 1999 yılında IUPAC biyosensörü “biyolojik bir tanı elementi kullanarak kantitatif ya da yarı-kantitatif analitik bilgi sağlayabilen, reseptör ve dönüştürücünün başlı başına entegre olduğu bir cihazdır” şeklinde tanımlamıştır (Thevenot vd. 1999). Yani temelde bir biyosensör spesifik bir biyo-analiti saptamaya yarayan biyolojik ya da biyolojik olarak türemiş tanı elementi içeren, ve sonuçta oluşan biyolojik bir sinyali elektriksel bir sinyale dönüştürmeye

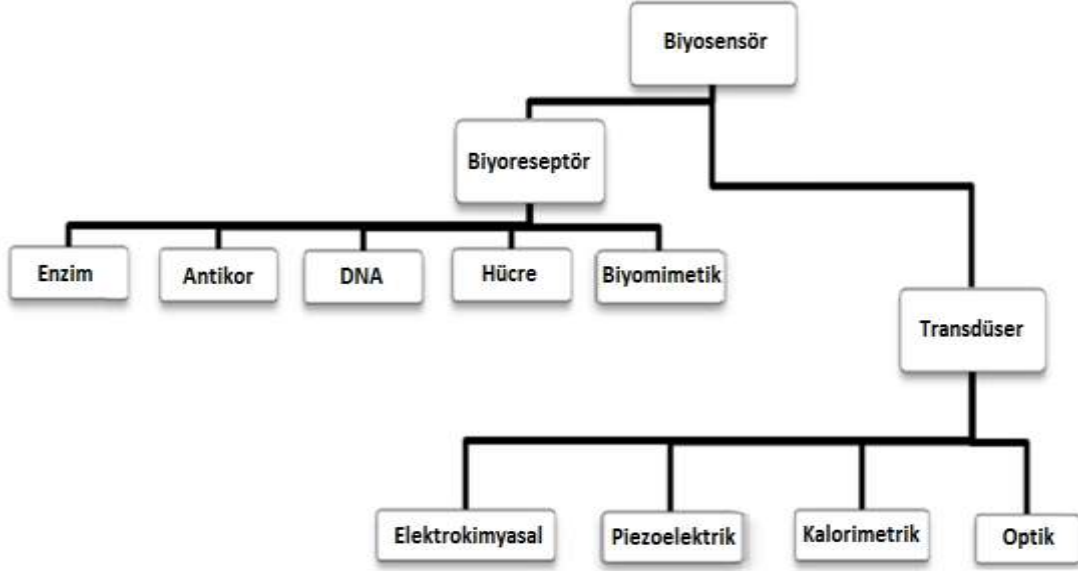
yarayan dönüştürücü ile entegre analitik bir cihazdır (Perumal ve Hashim 2014). Biyosensörün amacı analit hakkında hızlı, gerçek zamanlı, kesin ve güvenilir bilgi sağlamaktır. Biyosensörlerin tıp, tarım, gıda, güvenlik, biyoişlem, çevresel ve endüstriyel bir çok alanda oldukça önemli analitik bir rol oynayacağı öngörülmüştür (Luong vd. 2008).

Bir biyosensör, biyoreseptör, dönüştürücü ve sinyal işleme sistemi olmak üzere 3 ana bileşenden oluşur (Şekil 2.11). Biyolojik tanımlama elementi ya da biyoreseptör genellikle spesifik hedef analiti saptayabilen immobilize biyokomponenttir .Bu biyokomponentler çoğunlukla antikorlar, nükleik asitler, enzimler ve hücrelerden oluşmaktadır. Analit ile biyoreseptör arasındaki reaksiyon ürün oluşumu, ısı açığa çıkması, elektronların akışı ve pH ya da kütle değişimi gibi kimyasal değişimlere yol açar. Bu biyokimyasal sinyal elektriksel sinyale transdüser tarafından dönüştürülür. En sonunda elektrik sinyali güçlendirilip mikroelektroniklere ve bilgi işleyiciye gönderilir. Sonuç olarak dijital bir görüntü, yazılı bir çıktı ya da optik bir değişim gibi ölçülebilir bir sinyal üretilmiştir (Perumal ve Hashim 2014).



Şekil 2.11 Biyosensörün şematik gösterimi

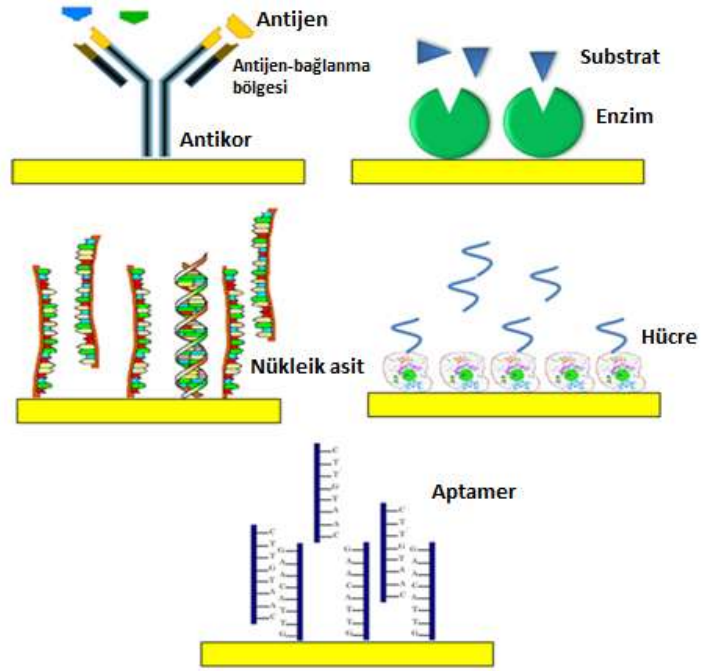
Biyosensörler kullandıkları biyolojik sinyalleme mekanizmalarına ve kullandıkları sinyal dönüştürme tiplerine göre sınıflandırılabilirler. Şekil 2.12 biyosensörlerin farklı kategorilerini göstermektedir.



Şekil 2.12 Biyosensör katagorileri

### 2.2.1 Biyolojik sinyale göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyoreseptör biyosensörün en önemli ayırt edici özelliğidir. Biyoreseptör sensörün tanımlama sistemi ile hedef analiti uzlaştırır. Bu nedenle biyoreseptörün hedef analite karşı hassas ve seçici olması çok önemlidir (Perumal ve Hashim 2014). Biyosensörler kullandıkları biyolojik sinyalleme mekanizmalarına göre 5 ana kısımda sınıflandırılabilirler (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Çeşitli biyolojik sinyal mekanizmaları ile biyo-algılamanın şematik gösterimi

### 2.2.1.1 Enzim temelli biyosensörler

İlk biyosensör 1962’de Clark ve Lyons tarafından açıklanan enzim temelli glukoz tayinine yönelik geliştirilen amperometrik biyosensördür. Enzimler substratlarını spesifik olarak tanıyan ve dönüşümlerini katalizleyen çok verimli biyokatalizörlerdir. Bu eşsiz özellikler enzimleri analitik cihazların gelişmesinde çok önemli araçlar haline getirmiştir. Enzim temelli biyosensörler transdüser bir biyokatalizör içeren algılama katmanıyla derinlemesine bağlıdır. Çalışma prensibi spesifik tanımlamaya yani katalitik olay ve bağlama kapasitesine dayalıdır. Enzimlerin spesifik katalitik reaksiyonları çok düşük algılama limitleri sağlamaktadır. Bu yüksek özellikli enzim – substrat etkileşimleri enzim temelli biyosensörlerin temelini oluşturmaktadır. Enzimler substrat konsantrasyonu, sıcaklık, inhibitör ve pH gibi faktörden etkilenebilir. Enzim bazlı biyosensörlerin algılama limitinin detaylandırılmasında Michaelis–Menten denklemi kullanılmaktadır. Glucose oxidase (GOD) temelli biyosensörler literatürlerde en çok yer alan enzim bazlı biyosensörlerdir. Bununla birlikte, son çalışmalar enzim bazlı biyosensörlerin kolesterolün tayininde, gıda ve çevre denetiminde, ağır metallerin ve zirai ilaçların tayininde de kullanılabildiğini göstermiştir (Perumal ve Hashim 2014)

### **2.2.1.2 İmmünosensörler**

İmmüno-teşhis ihtimalinin kapılarını açan ilk antikor temelli biyosensör 1950'lerde açıklanmıştır. Bundan sonra tıbbi teşhis için antijen-antikor'dan oluşan biyosensörlerin geliştirilmesi için ciddi gayretler gösterilmiştir (Orazio 2011). Bir antikor iki ağır zincir (H) ve iki hafif zincirden (L) oluşan "Y" şeklinde bir immüoglobüldür (Ig). Her zincirinin sabit ve değişken bir parçası vardır. Değişken kısım antijene özgüdür ve uyumlu bir antijene bağlanarak hayli spesifik ve seçici olmaktadır. Dolayısıyla immünosensör antikorun uyumlu antijen ile bağlanma kabiliyeti sonucu oldukça spesifik, durağan ve çok yönlü olur. İmmünosensörlerde kullanılan iki tip tanımlama metodu vardır; optik ve elektrokimyasal. Elektrokimyasal yöntemler hızlı, basit ve ekonomik algılama olanağı sağlar. Ramírez ve çalışma arkadaşları 1999 yılında hızlı algılama, yüksek hassasiyet ve spesifikliğin önemli olduğu klinik kimya, besin kalitesi ve çevre izleme gibi konularda immünosensörlerin önemli bir rol oynadığını söylemiştir. Bakteri ve patojenlerin algılaması için geliştirilen immünosensörler nokta analizleri (point-of-care) olarak adlandırılan ölçüm testlerinde uygulanabilir olması nedeniyle büyük ilgi kazanmıştır (Perumal ve Hashim 2014). Yapılan çalışmalar immünosensörlerin kanser/tümör teşhisine yönelik geniş çaplı araştırıldığını göstermektedir. Geleneksel tanılama metodları hassasiyet, seçicilik ve zaman harcama konularında zayıf olduğundan tümör spesifik immünosensörler kanserin erken safhalarında tanılama aracı olarak ümit verici hale gelmektedir (Ushaa vd. 2011).

### **2.2.1.3 Genosensörler**

Biyosensör uygulamalarında nükleik asit dizisi kullanımı ilk olarak 1953'ün başlarında ortaya atılmıştır ve yapılan çalışmalarla hala gelişmeye devam etmektedir (Liu vd. 2012). Çift sarmal DNA (dsDNA) zincirini oluşturan iki tek sarmal DNA (ssDNA) zinciri arasındaki spesifik affinite reaksiyonu nükleik asitlerin biyolojik tanımlama elementi olarak kullanıldığı DNA biyosensörlerinin (genosensörler) temelini oluşturmaktadır. DNA biyosensörlerinin geliştirilmesi elektroforetik ayrımların eşleşmesi ve radyo izotropik gibi oldukça maliyetli, tehlikeli ve zaman alan geleneksel metodları neredeyse geride bırakmıştır (Perumal ve Hashim 2014). DNA

biyosensörlerin çalışma prensibi dsDNA oluşturmak için iki tek sarmal nükleik asit dizisi arasında stabil bir hidrojen bağı oluşturan komplementer ssDNA'nın tanımlanmasına dayalıdır. Bu nedenle hedef baz dizisinin komplementeri olan ssDNA immobilize formda prob olarak kullanılmaktadır. Hedefin proba maruz kalması ile dsDNA oluşturmak üzere komplementer ssDNA hibritleşir ve bu da transdüserin sinyali elektriksel sinyale dönüştürmesine olanak sağlayan biyokimyasal reaksiyonun oluşmasını sağlar. Yapılan çalışmalar, algılama yüzeyine ssDNA'nın immobilizasyonunun yapılabilmesi için için tiyol ya da biotin gibi bağlayıcılara gereksinim duyulabileceğini göstermiştir. (Cagnin vd. 2009, Lazerges vd. 2012). DNA'nın önemli bir özelliği, DNA ligandlarının ters bağlanma sonucu denatüre olabilmesi ve tampon iyon konsantrasyonunun kontrolü ile rejenere olabilmesidir. DNA biyosensörleri, kompleks bir karışımdaki tek bir molekül türünün varlığını ölçebilme özelliğine sahiptir (Perumal ve Hashim 2014).

#### **2.2.1.4 Hücre temelli biyosensörler**

Hücre temelli biyosensörler biyospesifik algı elementi olarak canlı hücre kullanan biyosensör çeşididir. Canlı hücrenin intrasellüler ve extrasellüler microçevre koşullarını, fizyolojik parametrelerini algılama kabiliyetine dayanmaktadır. Sonuçta stimulus ve hücre arasındaki etkileşime cevap üretmektedir. Bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalar spesifik molekülleri ya da tüm çevresel durumları algılamak için kullanılabilir. Dahası, hücrelerde bulunan proteinler spesifik bir analitin algılamasında biyoreseptör olarak kullanılabilir. Aslında, canlı hücre bazlı biyosensörler, diğer canlılardan ekstrakte edilmiş materyaller içeren biyosensör tipleri ile karşılaştırıldığında eşsizdir. Hücre temelli biyosensörlerin birçok artısı ve eksisi bulunmaktadır. Bu biyosensörün algılama limiti hücrenin canlılığını sürdürebildiği doğal çevre koşulları tarafından belirlenmektedir. Ancak en büyük kısıtlama sterilizasyon, yaşam süresi ve biyouyumluluk gibi çok çeşitli koşullara bağlı olan hücre stabilitesidir. Hücre bazlı sensörün başarısını etkileyen diğer bir konu seçiciliktir. Bütün bir hücrenin multireseptör davranışı mikrobiyal sensörün zayıf seçiciliğe sahip olmasına neden olmaktadır. Bu zayıflıklara rağmen, enzim bazlı biyosensörlere göre avantajları olduğundan dolayı hücre bazlı biyosensörler hala araştırmacılar tarafından tercih

edilmektedir. Hücre bazlı biyosensörler enzim bazlı biyosensörlere göre çözünen madde inhibisyonuna karşı daha az hassastır, optimum pH ve sıcaklığın altında daha toleranslıdır, fakat bu koşullar hücrenin ölme ihtimali nedeniyle dar bir aralığı aşmamalıdır. Enzim bazlı biyosensörlere göre daha uzun bir yaşam süresi beklenebilir ve aktif hücrelerin izole edilmeye ihtiyacı olmadığı için daha ucuzdur (Perumal ve Hashim, 2014). Yapılan çalışmalar hücre bazlı biyosensörlerin, medikal tanılama (hastalık teşhisi gibi), çevresel analizler, besin kalite kontrolü, kimyasal-farmasotik endüstri ve ilaç algılama gibi alanlar için ortaya çıkan bir araç olduğunu göstermektedir. Shinde ve arkadaşları (2012) hücre bazlı biyosensörlerin etkili karakteristiklerinden dolayı, nano-tanı alanında yükselen ( gözde ) bir araştırma alanı olduğunu öngörmüştür.

### **2.2.1.5 Biyomimetik sensörler (Aptasensörler)**

Biyomimetik sensörler doğal bir biyosensörün fonksiyonunu taklit eden yapay ya da sentetik bir biyosensördür. Bunlar biyokomponent olarak aptamerleri kullanan aptasensörlerdir. Aptamerler ilk olarak 1990'ların başlarında yapay nükleik asit ligandları olarak tanımlanmıştır. Aptamerler böylelikle nükleik asit problemleri ile kimyasal olarak ilişkilendirilmiş ancak daha çok antikolar gibi davranmış ve diğer biyolojik tanı komponentlerine kıyasla şaşırtıcı şekilde çok yönlülük göstermiştir. Aptamerler, amino asitleri, oligosakkaritleri, peptidleri ve proteinleri tanımak için tasarlanan yapay nükleik asit zincirleridir. Bir aptamer, antikor bazlı biyosensörlere göre yüksek bağlanma verimi, hayvanların kullanılmasını engelleme ve daha küçük ve daha az kompleks olmaları gibi birkaç avantaja sahiptir. Ancak aptamerlere nükleik asitlerin yapısal pleomorfik ve kimyasal açıdan basitlik gibi özelliklerinin kazandırılması karşılaşılan zorluklardandır. Bu durum analiz verimini düşürmekte ve üretim maliyetini yükseltmektedir. Daha sonra bu sınırlamaların üstesinden gelebilmek için aptamerin karakterizasyonu ve optimizasyonu konuları oldukça çalışılmıştır Yüksek spesifiklik, küçük boyut, modifikasyon ve immobilizasyon çok yönlülüğü, rejenerasyon olabilmeleri ve hedef analitin bağlanmasıyla gerçekleşen konformasyonel değişim gibi aptamer özelliklerinden çok çeşitli bio-algılama formatlarını optimize etme konusunda başarıyla faydalanılmıştır (Perumal ve Hashim, 2014). Aptamer temelli biyosensörler geniş bir alanda çeşitli şekillerde kullanılmıştır. Son dönemlerde biyomimetik sensörlerde klinik

uygulama için nitelikli gelişmeler olmuştur. Bunlar patojen, virüs ve bulaşıcı hastalıkların teşhisi için klinik tanıyı içermektedir (Strehlitz vd. 2008, Torres vd. 2009, Wang vd. 2012, Weng vd. 2012).

## **2.2.2 Transdüser göre biyosensörlerin sınıflandırılması**

Transdüser biyosensörün sinyal algılama işleminde önemli rol oynayan bir bileşenidir ve fiziksel, biyolojik, kimyasal olayları yüksek hassasiyet ve düşük ölçüm bozunumu ile elektriksel bir sinyale dönüştüren cihaz olarak tanımlanabilir (Perumal ve Hashim 2014). Geçmişten günümüze geliştirilmiş birçok transdüser metodu bulunmaktadır.

### **2.2.2.1 Elektrokimyasal biyosensörler**

Dönüştürücü materyali olarak bir elektrot kullanılan elektrokimyasal biyosensörler sensörlerin önemli bir alt sınıfını temsil etmektedir. IUPAC'in 1999'daki tanımlamasına göre, elektrokimyasal biyosensör, bir elektrokimyasal dönüştürücü materyali ile doğrudan uzamsal temas halinde olan bir biyoreseptör kullanarak spesifik kantitatif ya da yarı-kantitatif analitik bilgi sağlayabilen bağımsız entegre bir cihazdır (Thevenot vd. 1999). Elektrokimyasal biyosensörler indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları sonucu oluşan akımı ölçerler. Üretilen akım mevcut elektroaktif türlerin konsantrasyonu veya üretim/tüketim oranı ile ilişkilendirilebilir. Sonuçta oluşan elektriksel sinyal hedef ve analit arasındaki tanımlama işlemi ile ilgilidir ve analit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Wang ve arkadaşları (2008) elektrokimyasal immunosensörlerin klinik analizlerdeki popülaritesinin gitgide arttığını söylemiştir ve bu durum gelişen sensör dizaynlarına bağlı olarak ilerlemektedir. Benzer olarak, Belluzo ve arkadaşları (2008) elektrokimyasal immunosensörlerin mevcut laboratuvar metodlarına kıyasla ümit verici bir metod olduğunu ortaya koymuştur. Wang (2006) klinik tanılamada elektrokimyasal biyosensörü yeni seviyelere getiren point-of-care kanser teşhisi için elektrokimyasal-temelli cihazların kullanımını derlemiştir. Daha sonra, tüm çalışmalar elektrokimyasal biyosensörlerin hız, basitlik, düşük maliyet, yüksek hassasiyet ve nispeten basit enstrümantasyon gibi avantajları olduğunu ortaya koymuştur (Grieshaber vd. 2008, Mono vd. 2012). Elektrokimyasal biyosensörler, biyotanımlama olayı sırasında

saptanan elektrokimyasal değişimlerin türüne bağlı olarak amperometrik, potansiyometrik, impedimetrik ve kondüktometrik olarak dört kategoriye ayrılırlar.

Amperometrik sensörler sabit bir potansiyelde analit konsantrasyonuna bağlı olarak elektroaktif türün yükseltgenme veya indirgenme reaksiyonu sonucu oluşan akımı, zamanın bir fonksiyonu olarak ölçme esasına dayanmaktadır. Amperometrik yöntemlerde genellikle çalışma elektrodu olarak altın(Au), karbon (C) veya platin (Pt) elektrotlar kullanılmaktadır. Referans elektrot genellikle sabit potansiyeli olan ve çalışma elektrodunun potansiyelini kontrol eden gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) elektrottur. Karşıt elektrot ise akım akışının ölçülmesi amacıyla kullanılmaktadır (Wang vd. 2008). Bu yöntemde ilgili türlerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde akım yoğunluklarından yararlanılmaktadır.

Potansiyometrik biyosensörler analitik bilginin elde edilmesi iyon-seçici elektrot (ISE) ve iyon-seçimli alan etkin transistör (ISFET) kullanımına bağlıdır. Potansiyometrik sensör ilk olarak 1969 yılında üre tayinine yönelik enzimatik biyosensör olarak tanımlanmıştır (Perumal ve Hashim 2014). Bu tür biyosensörlerde analitik sinyalin oluşturulması tanı prosesinin potansiyel sinyaline dönüştürülmesi ile gerçekleşmektedir. Bu yöntem; tanı işleminden değişken potential elde etmek için indikatör elektrot ve sabit yarı-hücre potansiyelini sağlamada gerekli olan referans elektrot (genellikle Ag/AgCl) olmak üzere iki elektrot sistemini içermektedir. Potansiyometrik transdüserin çalışma prensibi elektrokimyasal hücrede elektrottan sıfır ya da ihmal edilebilir ölçüde akım geçerken tanı prosesi süresinde indikatör ve referans elektrot arasında biriken potansiyel farkına dayanmaktadır. Çalışma elektrodunun potansiyeline bağlı olarak Nernst eşitkiğinden derişim doğrudan hesaplanabilmektedir

Kondüktometrik biyosensörlerde analitik bilgi iyonik türlerin konsantrasyonundaki değişimi sonucu çeşitlilik gösteren elektrolit iletkenliğinin ölçümü ile elde edilir. Yani elektrolit çözeltinin elektrotlar arasında elektrik akımı iletebilme yeteneğinin bir ölçüsüdür. Kondüktometrik cihaz belirli bir mesafe yada nanokablo gibi araç ile birbirinden ayrılmış iki elektrottan oluşmaktadır. Literatürde yer alan bir çok çalışma kondüktometrik yöntemin enzimlerle olan ilişkisini açıklamaktadır ki enzimatik

reaksiyon sonucu iki elektrot arasındaki çözeltinin iyonik gücü ve böylece iletkenlik değişmektedir. İletkenlik ölçümü için elektroda alternatif akım uygulanmaktadır ve sonuçta iyonik kompozisyon değişmektedir. Bu değişim ohmmetre ile ölçülebilen iletkenliği sağlamaktadır. Kondüktometrik cihazların ana avantajları, referans elektroda gerek duymamaları pahalı olamamaları ve direkt elektrik cevabı ihtimali olmasıdır (Grieshaber vd. 2008, Lee vd. 2012). Ancak kondüktometrik transdüser ölçümü ilave bir özelliktir bu yüzden de diğer elektrokimyasal metodlara göre daha az hassastır ve fazlasıyla tampon kapasitesinin cevabına bağlıdır (Perumal ve Hashim 2014).

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) temelli transdüksiyon yöntemi son yıllarda biyoreseptör dönüştürücüleri arasında oldukça popüler hale gelmiştir. Bu yöntemin avantajı oldukça düşük algılama limitlerinin gözlenmesine olanak tanınmasıdır. Bu yöntem etiketsiz veya reaktifsiz algılama sağlayabildiğinden gerçek zamanlı tayinler için oldukça uygundur (Perumal ve Hashim 2014, Pejic vd. 2006). EIS ölçümünde, elektroda kontrollü alternatif potansiyel uygulanır ve numune üzerinden akan akım belirlenir. Numuneden kaynaklanan elektriksel impedans voltajın akıma oranı olarak hesaplanır. Elektriksel impedans ölçümünün sonucu hem büyüklük hem de fazdır; kompleks bir sayı. Herhangi bir zamanla değişen potansiyel uygulandığında akım uygulanan voltajla aynı fazda olabilir (dirençli davranış) ya da farklı fazda olabilir (kapasitif davranış). EIS 3 elektrot sisteminden, bir potentiostat ve bir frekans yanıt analizöründen (FRA) oluşur. Bu üç elektrot; akımın ölçülmesini sağlayan çalışma elektrodu, hücreye akım sağlayan karşıt elektrot ve voltaj ölçümü için referans elektrotur. Potentiostat elektroda voltaj sağlamak için yüksek giriş impedans sağlayıcı gibi görev yapar . Frekans yanıt analizörü impedans ölçümünde uyarıcı dalga şeklinin tedarik edilmesi ve uygun, yüksek hassasiyette geniş band metodunun sağlanmasını kapsamaktadır (Perumal ve Hashim 2014). İmpedans spektroskopisi kanser/tümör hücrelerinin, virüslerin, bakterilerin ve patojenlerin algılanmasında birçok araştırma grubu tarafından büyük ölçüde kullanılmıştır (Bayouhd vd. 2008, Diouani vd. 2008, Kukol vd. 2008, Hong vd. 2012, Ohno vd. 2012, Nquyen vd. 2012).

### 2.2.2.2 Optik temelli biyosensörler

Optik biyosensörler gıda güvenliği, güvenlik, canlı bilimi, çevre izleme de dahil olmak üzere çok sayıda önemli alana dahil edilmektedir. Transdüserin bu metodu, absorpsiyon, floresans, fosforesans, Raman, SERS, refraksiyon ve dispersiyon spektroskopisi gibi çok farklı spectroscopy çeşitleri ile biyosensörün birçok sınıfında kullanılmıştır (Perumal ve Hashim 2014). Bu dönüştürücü metodları hedef-analit etkileşiminin farklı özelliklerini ölçme yeteneğine sahiptir. Optik biyosensörler, label-free, gerçek zamanlı ve paralel algı sağlama kabiliyetine sahiptir (Fan vd. 2008). Optik lifler ile birleşmiş yüzey plasmon rezonansı (SPR) ya da floresans, optik biyosensör uygulamaları içinde en popüler metoddur.

Yüzey plasmon rezonans (SPR) temelli biyosensörler, biyoreseptör ile analit etkileştiğinde gerçekleşen değişimleri teşhis edebilmek için yüzey plazmon dalgalarını (electromagnetic wave) kullanırlar. Prensipite, SPR biyosensör herhangi bir değişikliğe maruz kaldığında reaksiyonu ölçmek ya da gözlemlemek için kullanılan reaktif indekste değişimlere neden olur. Bu tip değişimler yüzey plazmon dalgalarının yayılım sabitinde çeşitlilik yaratır ve bu çeşitlilik bir değer oluşturmak için ölçülür. Protein, antikor-antijen, nükleik asitler ve enzimler gibi çeşitli biyotanımlama elementleri, SPR biyosensörleri ile birleştirilmiştir (Perumal ve Hashim 2014, Park vd. 2009) Bugüne kadar, SPR temel biyolojik çalışmalarda, sağlık bilimi araştırmalarında, klinik tanılamada ve çevresel ve tarımsal izlemede geniş olarak kullanılmıştır (Perumal ve Hashim 2014).

Optik lif temelli biyosensörler birkaç ana bileşenden oluşmaktadır; bir ışık kaynağı, immobilize biyotanı elementi, ışığı iletmek için kullanılan ve substrat gibi davranan bir optik lif ve çıkış ışığının ölçümünü alan spektrofotometre gibi bir dedektör. Optik lifin yüzeyinde biyoreseptör ile analitin etkileşimi optik özelliklerde değişimler meydana getirmektedir. Işık kaynağı, biyotanı olayının olduğu optik liften geçirilir. Aynı ya da farklı bir lif çıkış ışığını algılayıcıya doğru yönlendirmek için kullanılır. Optik fiber bazlı biyosensörler elektrokimyasal ve diğer yöntemlere göre daha yüksek hassasiyetleri, güvenilirlikleri, elektromanyetik müdahaleden bağımsız (çünkü referans

elektroda ihtiyaç yoktur) ve gerçek zamanlı izlemeye uygun olmaları gibi avantajlara sahiptir. Ve minyatürizasyon için oldukça uygundurlar. Ancak, biyotanı elementinin zayıf kararlılığı ve ortam ışığına karşı hassasiyet gibi birkaç eksiklik bulunmaktadır (Perumal ve Hashim 2014).

### **2.2.2.3 Piezoelektrik temelli biyosensörler**

İlk olarak 1880'de Curie kardeşler tarafından keşfedilen piezoelektrik, merkezi-olmayan kristal yada ya da benzer bir yapının mekanik ve elektriksel sistemleri arasındaki lineer etkileşim olarak açıklanabilir. Piezoelektrik biyosensörü kristal osilatör gibi çalışmaktadır. Bu nedenle, piezoelektrik biyosensörün transdüseri kuartz gibi piezoelektrik bir materyalden yapılmıştır. Frekans mutlak bir akım değeri üreten bir dış elektriksel sinyal tarafından kontrol edilir ve biyoreseptör analit ile etkileştiğinde, bu etkileşim akım okumasında değişimler üreten bir frekans kaymasına sebep olur. Bu durum analitin kütlesi ile ilişkilidir. Çünkü kristal yüzeyinde toplanan analitin kütle ölçümü esasına göre çalışan gravimetrik bir cihazdır. Kütle birikimiyle oluşan rezonans farkı belirlenerek ölçüm yapılmaktadır (Perumal ve Hashim 2014).

### **2.2.2.4 Kalorimetrik biyosensörler**

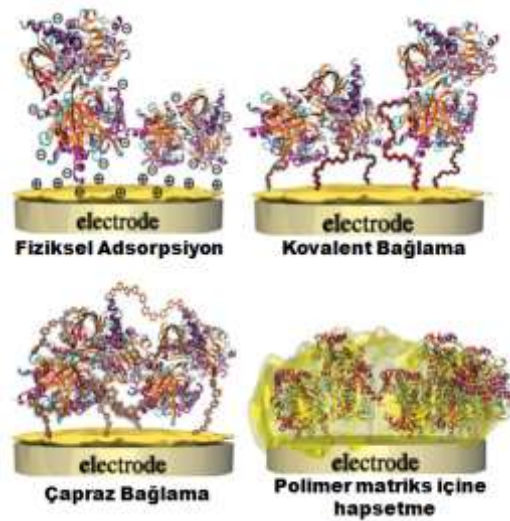
Hemen hemen tüm kimyasal ve biyolojik reaksiyonlar ısı değişimi içerir. Bundan dolayı, tüm biyokimyasal reaksiyonlar sonucu ısı üretimi veya absorpsiyonu kalorimetrik biyosensörlerin doğmasına katkı sağlamıştır. Kalorimetrik prensip, biyotanı elementi ve analit arasındaki reaksiyon sonucu oluşan sıcaklık değişimlerinin ölçümünü içerir. Bu sıcaklık değişimi, harcanmış reaktiflerin ya da oluşmuş ürünlerin konsantrasyonu ile ilişkilendirilmektedir (Xie vd. 1999). Kalorimetrik biyosensörler kolayca minyatürize edilebilir ve duyarlılığı artırmak için kolayca mikroakışkanlar ile entegre edilebilirler (Zhang ve Tadigadapa 2004). Kalorimetrik cihazda, ısı değişimi ya termistör (genellikle metal oksit) ya da termofil (genellikle seramik yarıiletken) ile ölçülmektedir. Yapılan çalışmalar, bu tekniğin DNA hibritleşmesini hızlıca algılayabildiğini göstermiştir (Paul vd. 2010, Xi vd. 2010).

### 2.2.3 Biyolojik Materyallerin İmmobilizasyonu

Biyosensörlerin karakteristik özelliklerinin geliştirilmesi ve korunması için dikkat edilmesi gereken en önemli husus biyolojik materyalin immobilizasyonudur. İmmobilize biyosensörler biyomateryal salınımını kontrol edebilmekte, materyalin stabilitesini koruyabilmekte, biyosensörün kullanım süresi ve cevap süresi üzerine olumlu etkiler oluşturabilmekte ve en önemlisi biyosensörün tekrarlanabilirliğini oldukça iyi koşullarda sağlayabilmektedir.

1950 yılında ilk enzim immobilizasyonunun açıklanmasıyla başlayan bu yeni oluşum zamanla daha da geliştirilmiş ve farklı metodlar oluşturulmuştur. Yapılan tüm çalışmalarda her zaman öncelikli hedef biyomolekülün aktivitesini ve doğal konformasyonunu korumak olmuştur. Fiziksel adsorpsiyon, kovalent bağlama, fiziksel hapsetme, Langmiur-Blodgett filmler, kendiliğinden-birleşme (self-assembly) ve afinite metodları en yaygın çalışılan immobilizasyon yöntemleri arasındadır.

Biyolojik materyallerin bir elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde immobilize edilmesi fiziksel veya kimyasal yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Şekil 2.14'de immobilizasyon yöntemleri için bazı görsel örnekler verilmiştir.



Şekil 2.14 İmmobilizasyon yöntemleri

İletici ve elektrot yüzeyinin yapısına, biyoreseptörlerin kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna bağlı olarak farklı birçok immobilizasyon yöntemi kullanılmaktadır. Enzimler için uygulanan immobilizasyon yöntemleri, protein yapısındaki biyoreseptörler için de uygulanabilmektedir.

### **2.2.3.1 Fiziksel adsorpsiyon**

Fiziksel adsorpsiyon en kolay, ucuz ve denatürasyon etkisi en az olan immobilizasyon yöntemidir. Bu prosedür enzimin katı destek materyali yada elektrot yüzeyinde birikmesi şeklindedir. İlave bir reaktife, farklı işlem basamaklarına ve aktivite enzim modifikasyonuna gerek duymamaktadır. Ancak bağlanma kuvvetlerinin zayıf olması nedeniyle immobilize enzim pH, sıcaklık, çözücü ve iyonik şiddet değişimlerinden kolaylıkla etkilenmektedir. Ve bu yöntemin enzim aktivitesinin artırıcı ve raf ömrünü destekleyici yönde katkıları olmamaktadır (Gerard vd. 2002, Andreescu ve Sadık 2004, Andreescu ve Marty 2006).

### **2.2.3.2 Kovalent bağlama**

Biyomoleküllerin kovalent olarak taşıyıcı matrikse bağlanmaları 2 aşamadan oluşmaktadır. İlk adım biyomolekülün etkili bir şekilde kimyasal olarak bağlanmasını sağlayacak uygun ortamın oluşturulması için bağlanılacak materyalin aktivasyonunun sağlanmasıdır. Aktivasyon genellikle bifonksiyonel gruplar ya da uzatıcı kollarla sağlanmaktadır. Bu amaçla glüteraldehit, karbodiimid/süksinimid, kendiliğinden oluşan tek katmanlar ya da çok katmanlar (SAM- self-assembly monolayers/multilayers) ve aminopropiltrietoksisilan çok sıklıkla kullanılmaktadır. İkinci adımda ise kimyasal olarak aktive edilmiş yüzeye biyomateryalin bağlanması sağlanmaktadır. Bu yöntemde kullanılan destek materyalinin materyal türü ve yüzey karakteristikleri önemli rol oynamaktadır. Kovalent bağlama tekniği biyomateryalin kararlılığını artırmak yönünde önemli bir avantaja sahip olabilmektedir ancak bunun için dikkat edilmesi gereken en önemli nokta biyomolekülün aktivitesi için gereken gruplar üzerinden bağlanmanın gerçekleşmemesidir ve sterik engel oluşumu ile bu grupların önüne geçilmemesidir. Bu yöntem pH, sıcaklık, iyonik şiddet değişikliklerine karşı daha dayanıklıdır. SAM lerin

kullanıldığı kovalent bağlama teknikleri enzimlerin oryantasyon ve 3-boyutlu yönlendirilmelerini sağlamaktadır. Bu nedenle spesifik fonksiyonel grupların dahil edildiği SAM lerin oluşturulması ve redoks aktif enzimler ile elektrot yüzeyi arasında iletişim aracı olarak kullanılması oldukça önemli çalışmalar arasındadır (Scouten vd. 1995, Gooding ve Hibbert 1999, Fink vd. 2000, Thevenot vd. 2001, Chaki ve Vijayamohanan 2002).

### **2.2.3.3 Çapraz bağlama**

Çapraz bağlama yöntemi, bir ya da daha fazla fonksiyonel gruplar kullanılarak taşıyıcı ile biyomolekül arasında kovalent bağlanma esasına dayanır. Bu yöntemde biyomolekül kuvvetli bir şekilde bağlandığından desorpsiyon ihtimali oldukça düşüktür.

Bu yöntem ile biyomolekül immobilizasyonu farklı şekillerde yapılabilmektedir. Biyomolekül sadece bifonksiyonel reaktif ile aktive edilerek kovalent bağlanabilir. Biyomolekül ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ilavesiyle çapraz bağlanabilir. Biyomolekül bifonksiyonel reaktiflerce aktive edilmiş materyale immobilize edilebilir (Telefoncu 1999).

### **2.2.3.4 Affinite yöntemi**

Yapılan çalışmaların temeli biyolojik materyallerle çalışıldığından her zaman 3-boyutlu yapının oryantasyonu/kontrolü temeline dayanmaktadır. Böylece aktivitenin korunması ve sürdürülmesi hedeflenmektedir. Bu nedenle yapılan çalışmalarda uygulanan farklı bir trend aktif destek ve proteinin spesifik bir grubu arasında (biyo)afinite bağları oluşturmaktır. Eğer biyomolekülde doğal olarak bu tür spesifik gruplar bulunmuyorsa, biyomolekülün oldukça spesifik bir bölgesinde aktiviteyi etkilemeden bu gruplar tasarlanabilmektedir. Selüloz-selüloz bağlanma bölgesi taşıyan enzimler, histidin taşıyan enzimler için metal iyon immobilize edilmiş matriksler, spesifik enzimler için monoklonal/poliklonal antikolar ve lektin-glikoenzim taşıyan oligosakkaritler bazı özel afinite etkileşimlerine örnek olarak verilebilmektedir. Bu yöntem matriksin tekrar

kullanımı ve enzim stabilitesi için oldukça uygundur. Biyomolekülün farklı desteklerde oryantasyonunun kontrolü rahatlıkla sağlanabilmektedir (Andreescu vd. 2006).

### **2.2.3.5 Tutuklama yöntemi**

Enzim immobilizasyonu için en ideal metotlardan biri de inert bir materyal içerisinde hapsetme metodudur (elektropolimerize monomerler, sol-jel matriksler gibi). Daha ılımlı koşullarda gerçekleşmesi, tek adımlı bir süreç olması, düşük maliyet ve enkapsüle enzimin yüksek stabilitesi gibi avantajları yöntemi öne çıkarmaktadır. Tutuklamanın sınırlamaları ise substrat ve/veya ürünün aşması gereken difüzyon bariyerinde açığa çıkmaktadır. Uzun cevap süresi, gözenek büyüklüğünün kontrolündeki zorluklar ve olası mümkün enzim salınımı yöntemin en büyük dezavantajlarıdır.

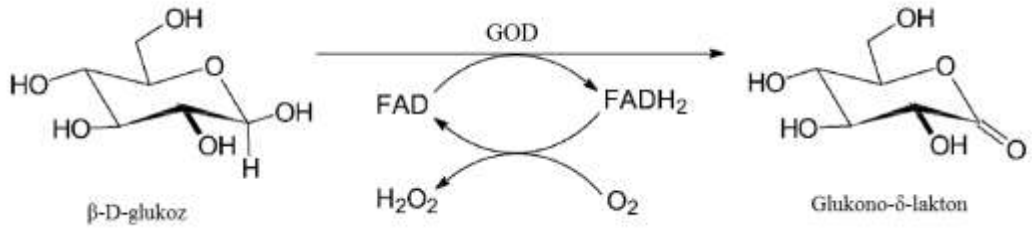
Enkapsülleme yönteminde kullanılan materyallere örnek olarak; fotopolimerize polimerler, kimyasal olarak büyüyen polimerler (aljinat, lateks, vb.), elektrokimyasal olarak büyüyen polimerler ( polipirol, polianilin, politiyofen, vb.), ve sol-jel matriksler verilebilir (Scouten vd. 1995, Andreescu vd. 2008).

## **2.3 Çalışmada Kullanılan Biyomolekül, Taşıyıcı Sistem, Nanopartikül ve Çapraz Bağlayıcılar**

### **2.3.1 *Aspergillus niger* kaynaklı Glukoz oksidaz enzimi**

#### **2.3.1.1 Glukoz oksidaz enziminin genel özellikleri**

Glukoz oksidaz ( $\beta$ -D-glukoz:oksijen 1-oksiredüktaz, E.C 1.1.3.4)  $\beta$ -D-glukozun, moleküler oksijen varlığında glukono- $\delta$ -laktone yükseltgenmesini katalizlemektedir.



Şekil 2.15.Glukoz oksidaz enziminin reaksiyonu

Enzimin aktivitesi ilk olarak *Aspergillus Niger* ekstralarında Müller tarafından (1928) açıklanmıştır ve bu mantar küfünden izole edilmiştir (Pazur vd. 1965, Swoboda ve Massey, 1965). GOD flavin içeren bir glikoproteindir. Bu enzim her birinin molekül ağırlığı yaklaşık 80,000 Dalton olan iki özdeş alt ünitelerden oluşan bir homodimerdir. Bu alt ünitelerin birbirinden ayrılması ancak denatürasyon koşullarında ve koenzim FAD'ın da ayrılmasıyla mümkündür. (Jones vd. 1982, Gouda vd. 2003). Molekül ağırlığının %10-16 kadarı yüksek-mannoz tipi karbonhidrattan oluşmaktadır (Pazur vd. 1965, Hayashi ve Nakamura 1981) Karbonhidrat kısımlar N- ya da O-glikozidik bağ ile proteine bağlanmıştır (Takegawa vd. 1989, Takegawa vd. 1991).



Şekil 2.16.Glukoz oksidaz enziminin tersiyer yapısı

GOD'ın her bir alt ünitesi non-kovalent olarak bağlı bir molekül koenzim FAD taşımaktadır ki FAD katalizlerde redoks taşıyıcısı gibi davranmaktadır (Gibson vd. 1964). GOD'ın primer yapısı belirlenmiştir; her alt ünitenin tek bir polipeptit zinciri 583

aminoasit kalıntısı içermektedir (Kriechbaum vd. 1989, Frederick vd. 1990). Enzimin kristal yapısı 2.3 Å rezolüsyonda çözülmüştür (Hecht vd.1993, Kalisz vd.1990).

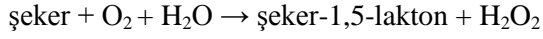
### 2.3.1.2 Substrat spesifikliği

Glukoz oksidazın indirgenme yarı-reaksiyonundaki elektron vericileri grubu için substrat spesifikliği çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Yükseltgenme yarı-reaksiyonunda elektron-verici substratlar

Substrat	Glukoza göre <sup>a</sup> %	Kaynaklar
β-D-glukoz	100	Adams vd. 1960, Gibson vd. 1964, Pazur ve Kleppe 1964, Swoboda ve Massey 1965, Tsuge vd. 1975, Leskovac vd. 2005.
2-deoksi-D-glukoz	25-30	Pazur ve Kleppe 1964, Swoboda ve Massey 1965, Leskovac vd. 2005.
4-O-metil-D-glukoz	15	Pazur ve Kleppe 1964
6-deoksi-D-glukoz	10	Pazur ve Kleppe 1964
4-deoksi-D-glukoz	2	Pazur ve Kleppe 1964
2-deoksi-6-flor-D-glukoz	1.85	Leskovac vd. 2005.
3,6-metil-D-glukoz	1.85	Leskovac vd. 2005.
4,6-dimetil-D-Glukoz	1.22	Leskovac vd. 2005.
3-deoksi-D-glukoz	1	Pazur ve Kleppe 1964
6-O-metil-D-glukoz	1	Pazur ve Kleppe 1964
α-D-glukoz	0.64	Pazur ve Kleppe 1964, Leskovac vd. 2005.
Mannoz	0.2,1	Pazur ve Kleppe 1964, Swoboda ve Massey 1965, Leskovac vd. 2005.
Altroz	0.16	Pazur ve Kleppe 1964, Leskovac vd. 2005.
Galaktoz	0.08	Pazur ve Kleppe 1964, Swoboda ve Massey 1965, Leskovac vd. 2005.
Ksiloz	0.03	Pazur ve Kleppe 1964, Swoboda ve Massey 1965, Leskovac vd. 2005.
İdoz	0.02	Pazur ve Kleppe 1964, Leskovac vd. 2005.

Her durumda, moleküler oksijen elektron alıcısıdır indirgen yarı reaksiyonunda:

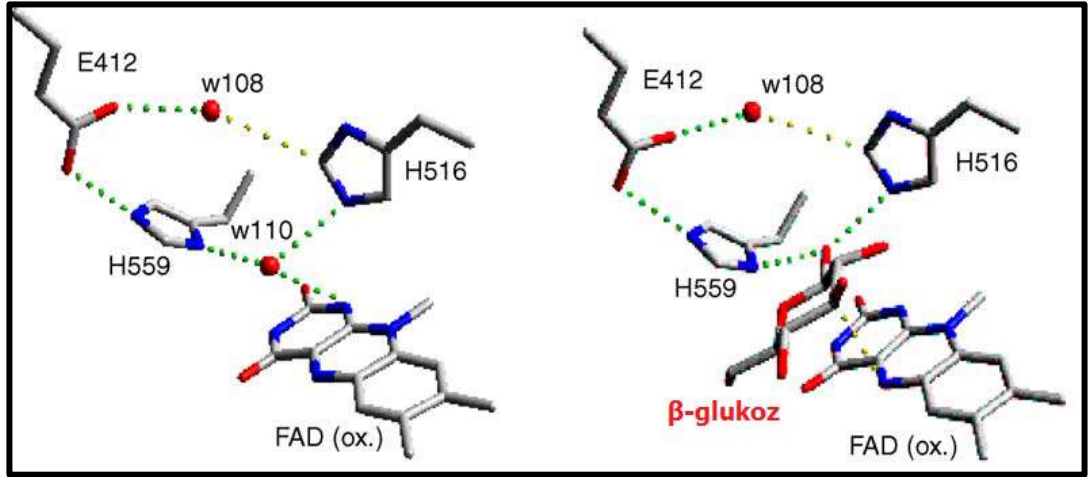


<sup>a</sup> yüzde olarak glukozu göre aktivite

Çizelge 2.1’de anlaşıldığı gibi çok sayıda şeker ve D-glukoz türevi glukoz oksidaz için potansiyel substrat konumundadır. Bunlara ek olarak literatürde dihidroksiaseton, gliseraldehit, fenaçil alkol ve furoin gibi  $\alpha$ -hidroksikarbonil bileşikleri de glukoz oksidaz için glukoz analogu gibi davranan substratlar olarak yer almaktadırlar (Chan ve Bruice 1977 ).

### 2.3.1.3 Yükseltgenme yarı-reaksiyonu

Glukoz oksidazın tersiyer yapısı ile yapılan kristallografik çalışmalar kanıtlamıştır ki: aktif bölgedeki flavin sistemine ulaşım derin bir çukur yolu ile sağlanmaktadır ve koenzim FAD bu çukurun en dibinde yer almaktadır (Hecht vd. 1993 ). Katalitik reaksiyonun merkezi FAD’ın izoalloksazin halkasının N5 pozisyonudur (Gibson vd. 1964), (Şekil 2.17).



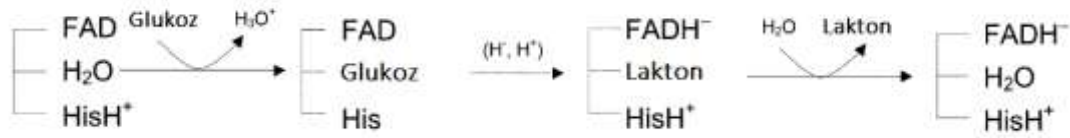
Şekil 2.17 Yükseltgenmiş enzim aktif bölgesi ve enzim-FAD<sub>ox</sub>-β-D-glukoz kompleksi (Wohlfahrt vd. 1999)

Bu reaksiyon merkezi ile yakın olan sadece 3 adet amino asit yan zinciri vardır; Glutamik asitin yan zinciri Glu412, ve iki histidin kalıntısının yan zincirleri His516 ve



pozisyonundan FAD'ın N5 pozisyonuna doğrudan hidrür transferi olduğuna karar verilmiştir (Bright ve Appleby 1969). Glukozdan pozitif bir yükün uzaklaştırılması glukozun C1 inden izoalloksazine halkasına hidrür transferi olduğunu kanıtlamaktadır (Gibson vd. 1964, Bright ve Appleby, 1969, Hecht vd. 1993). İzoalloksazin halkasının N5'ine yapılan hidrür transferi N1 çevresinde negatif yük etkisi yaratacaktır. pH 5.6 da glukoz oksidaz ile yapılan NMR çalışmaları oksijen varlığında indirgenmiş koenzimin bu negatif yük yoğunluğunu kanıtlamıştır (Sanner vd. 1991).

Mekanizma şekil 2.19'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.19 β-D-glukozun yükseltgenme yarı reaksiyonu için geliştirilen mekanizmanın şematik gösterimi

Serbest yükseltgenmiş enzimin su molekülü (w110) ile glukoz yer değiştirmiştir ve su molekülü ayrılırken His516'nın N3'ünden bir protonunu koparmıştır. Ardında aynı zamanlı olarak bir protonun His516'ya ve hidrür anyonunun FAD'a transferi glukozu glukonolaktone yükseltir. Son olarak laktol su molekülü ile yer değiştirerek aktif bölgeyi terk eder. His516 protonlanmış ve koenzim FADH<sup>-</sup> formunu alır.

His559 korunamazken His516 oksijen-tüketen oksidazların primer yapılarında kesinlikle korunmaktadır (Su ve Klinman, 1999). Bu durum His516'nın katalizde genetik olarak yetkilendirilmiş çok önemli bir rolü olduğunu kanıtlamaktadır.

### 2.3.2 Aljinat

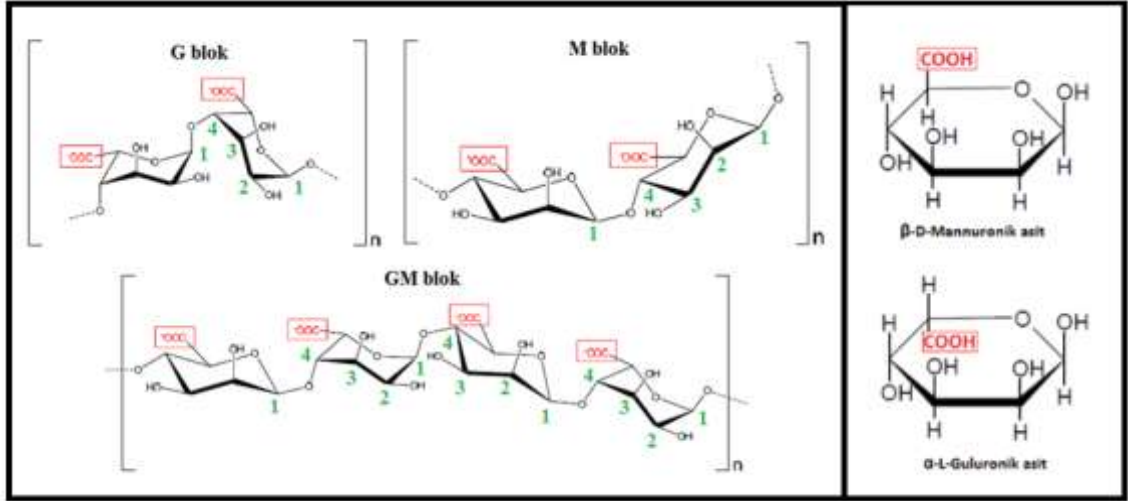
Aljinat ilk olarak 1881 yılında E.C.C. Stanford tarafından keşfedilmiştir. Bu doğal kopolimerin ticari olarak ulaşılabilir olanları genelde *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum*, ve *Macrocystis pyrifera* gibi

türleri içeren kahverengi su yosunundan (*Phaeophyceae*) ekstrakte edilmektedir (Lee ve Mooney 2012 ). *Ascophyllum nodosum*'un kuru ağırlığının 22-30%, *Laminaria digitata*'nın %25-44, *Laminaria hyperborea* yapraklarının %17-33 ve kökünün %25-30 kadarı aljinattır. Aljinatın bu türlerin dokularındaki temel işlevinin, dokulara dayanıklılık ve elastikiyet vermek olduğu düşünülmektedir (Qin 2008).



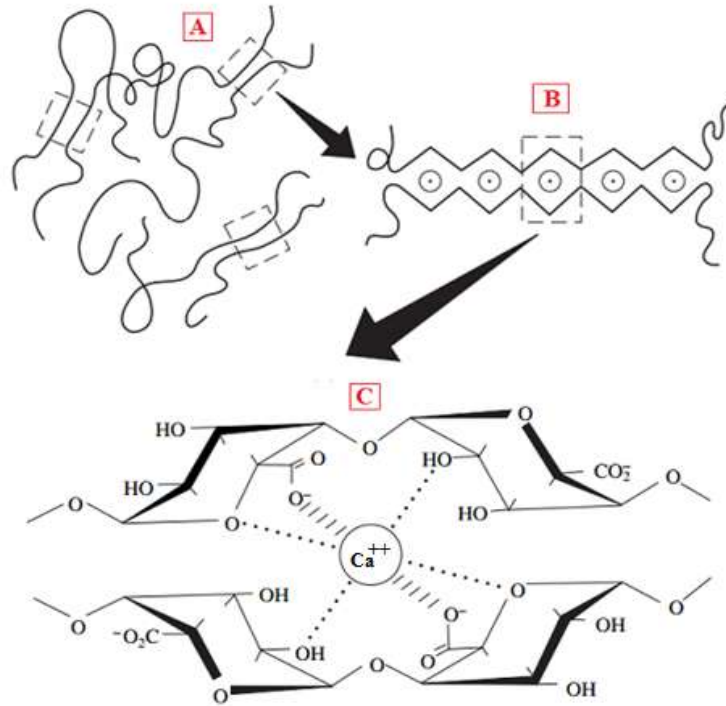
Şekil 2.20 Laminara digitata

Aljinat uygun fiziksel ve kimyasal özellikleri ile (mikro) partiküller ve jel oluşturmalarından ve biyoyumluluklarında dolayı yara iyileşmesi, ilaç salımı, *in vitro* hücre kültürü ve doku mühendisliği gibi çok çeşitli biyomedikal alanda kullanılmaktadır. Aljinat (1→4) glikozidik bağ ile bağlı β-D-mannuronik asit (M) ve C5 epimeri α-L-gluronik asit (G) den oluşan dallanmamış bir polisakkarittir. (Stanford, 1881). Genel bir ifadeyle; M ünite, G ünite ve MG ünite dizilerinden oluşan blokların bir karışımıdır. Yapısındaki monomerlerin miktarları ve dizilişdeki dağılımları ekstrakte edildiği kaynağa göre çeşitlilik göstermektedir (Rowley vd. 1999, Pawar ve Edgar 2012).



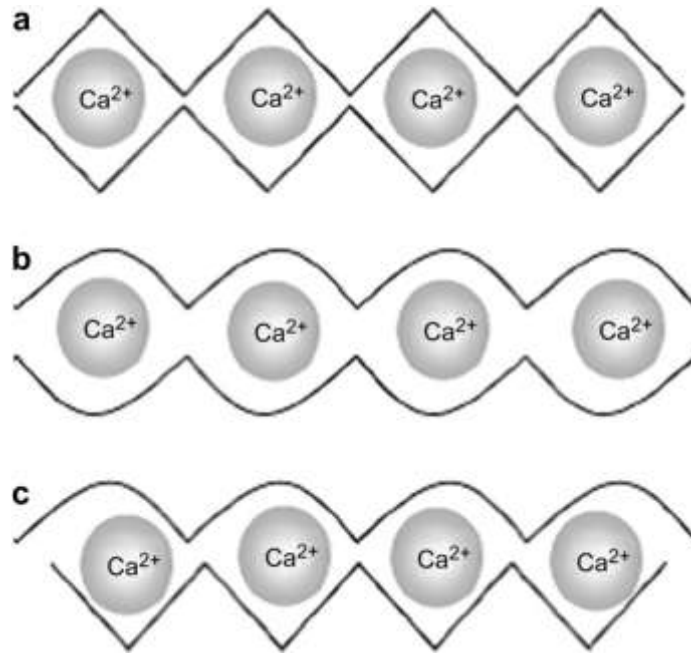
Şekil 2.21 Kahverengi su yosunundan elde edilen aljinatın monomerleri ve yapısı

Aljinatın en önemli özelliği suda çözünmeyen jel formunu alabilmesidir (Bierhalz vd. 2014). Uygun koşullar altında bağlanma zonlarının polimerin tekrarlı gluronik asit dizilerine katılmasıyla jelleşme gerçekleşmektedir (Khotimchenko vd. 2001). Bu jellerin su tutma kapasiteleri %95'in üzerinde olabilmektedir.



Şekil 2.22 Aljinat jel yapısı ve  $Ca^{2+}$  iyonu çapraz bağlama modeli

Aljinat jellerin oluşturulmasında en yaygın kullanılan yöntem iki değerlikli katyonlarla iyonik çapraz bağlama metodudur. Jelleşme kalsiyum gibi iki değerlikli katyonun çoğunlukla poliglukonik asit dizilerindeki karboksil grubu ile iyonik bağ yapmasına ya da kalsiyum iyonlarının her polimer zincirindeki karboksil ve hidroksil grupları ile şelat oluşturmasına dayandırılmaktadır. Böylece “yumurta kutusu (egg-box)” adı verilen yapıyı oluşturan aljinat sıkı ve güçlü bir jel formunu almaktadır. Yumurta kutusu modelinin karakteristik olarak poliglukonik asit zincirleri arasında olduğu ancak polimannuronik asit dizilerinde buna benzer bir form aldığı düşünülmektedir. Aljinatın 2 değerlikli iyonlara afinitesi  $Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn$  şeklinde azalmaktadır. Ancak  $Ca^{2+}$  aljinat jel oluşumunu indüklemek için en çok kullanılan katyondur. Ca-aljinat jeller için mümkün olduğu düşünülen 3 adet birleşme tipi şekil 2.23’de gösterilmiştir (Pawar ve Edgar 2012).



Şekil 2.23 Aljinatın olası bağlanma formları

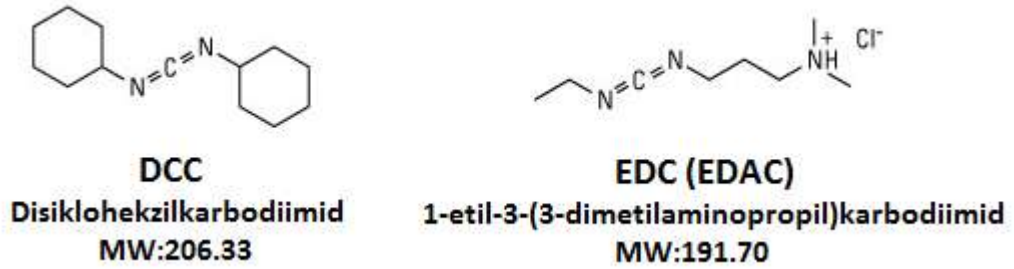
a. GG/GG bağlanma formu, b. MG/MG bağlanma formu, ve c. GG/MG bağlanma formu

Her zincir diğer zincirlerle de aynı şekilde bir araya gelerek 3-boyutlu jel ağını meydana getirirler. G içeriği fazla olan aljinat jeller daha güçlü, daha katı, daha kırılğan ve daha gözenekli jellerdir. Ayrıca yüksek miktardaki G varlığı sıvı transferine de

sınırlama getirmektedir. M konsantrasyonu fazla aljinat jeller ise daha elastik ve daha zayıf jellerdir (Paques vd. 2014).

### 2.3.3 NHS/EDC Çapraz Bağlayıcıları ve reaksiyonları

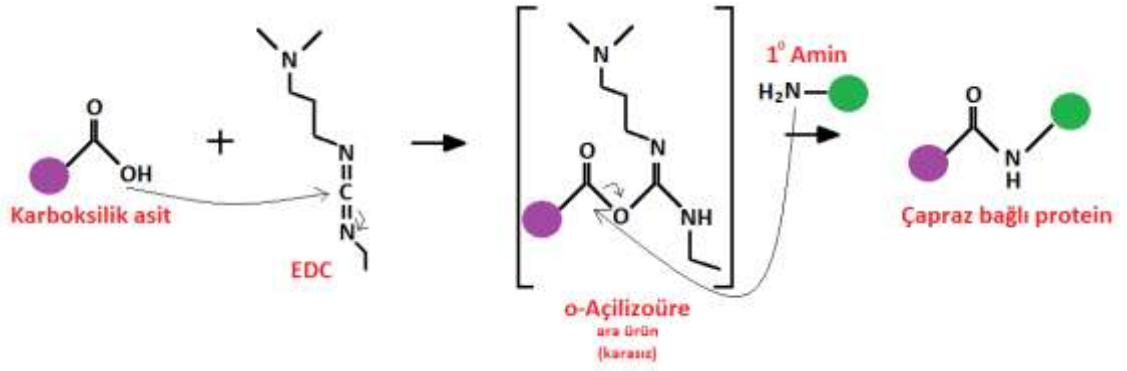
Karbodiimid bileşikleri karboksilik asitleri etiketlemek ya da çapraz bağlamak için oldukça popüler ve çok yönlü metodlar sağlamaktadır (Sheehan ve Hlaoka 1956, Love vd. 2005, Liu vd. 2013). Rahatlıkla ulaşılabilir ve en çok kullanılan karbodiimidler sulu ortamda çapraz bağlamalar için suda çözünen EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid) ve sulu olmayan organik sentezler için suda çözünmeyen DCC(disikloheksilkarbodiimid)'dir.



Şekil 2.24 EDC ve DCC'nin kimyasal yapıları

Karbodiimidler, primer aminlerle amid bağı oluşumuyla direkt reaksiyonun gerçekleşmesi için karboksil gruplarını aktive ederler. Kimyasal yapılarının herhangi bir bölümü kojüğe moleküller arasında oluşan bağı bir parçası olarak kalmamaktadır.

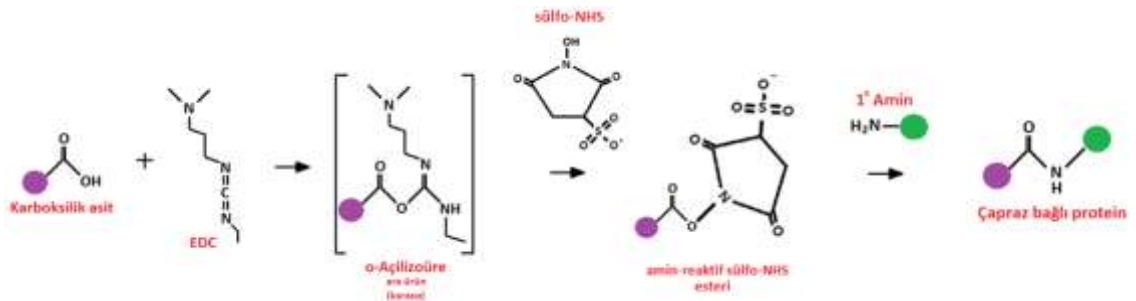
Sıfır-mesafeli (zero-length) çapraz bağlama ajani olarak bilinen EDC karboksilik asit grupları ile *O*-açilizoüre aktif araürünü oluşturmak üzere reaksiyona girer. Oluşan bu araürün primer amin grubunun nükleofilik atağı ile kolaylıkla yer değiştirmektedir. Böylece primer amin ile orijinal karboksil grubu arasında amid bağı oluşurken, EDC yan ürünü olan üre türevi salınır. *O*-açilizoüre araürünün sulu çözeltide kararsızdır (Nakajima ve Ikada 1995).



Şekil 2.25 EDC çapraz bağlama reaksiyonu

EDC çapraz bağlama prosedürü asidik koşullarda çok daha etkilidir ve ortamda dışardan gelen extra bir karboksil yada amin grubu olmamalıdır. Fosfat tamponları pH 7.2 koşullarına kadar reaksiyon kimyası için uygundur, ancak etkinliğin az olması durumunda reaksiyon çözeltisinde EDC miktarını artırmak azalan etkinliği kompanse edebilmektedir.

N-hidroksisüksinimid (NHS) veya onun suda-çözünür analogu (sülfo-NHS) etkinliği artırmak ve amin-reaktif ara ürün oluşturmak için sıklıkla EDC çapraz bağlama sistemine dahil edilmektedir. Çünkü *O*-açilizoüre araürünü primer aminle etkileşebilmesinin yanı sıra hidrolize de uğrayabilmektedir. NHS'in de dahil olduğu sistemde oluşan NHS ester ara ürünü *O*-açilizoüre ara ürününden daha kararlıdır. Böylece primer aminlerin daha etkili bir şekilde konjuge olmasına olanak tanımaktadır (Sehgal ve Vijay 1994, Patel vd. 1997, Cabrita vd. 2005, Ligaj vd. 2006).



Şekil 2.26 NHS/EDC çapraz bağlama reaksiyonu

### 2.3.4 CuO nanopartiküller

Nanomalzemelerin özel ve önemli bir sınıfı olan nanoyapılı geçiş metal oksitleri (MO), çok çeşitli yeni, fonksiyonel ve akıllı materyallerin geliştirilmesinde neredeyse ön koşul haline gelmiştir. Eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle sadece temel bilimsel araştırmalarda değil aynı zamanda çok çeşitli pratik uygulamalarda da kullanılmaktadır. Bu fiziksel ve kimyasal özellikler nanoyapının ölçüsü, şekli, kompozisyonu ve yapısı ile ilişkilidir. MOler nanoboyuta indirgendiklerinde, en dikkat çeken özellikleri olan yüzey-hacim oranında ki olağanüstü artış ve yüzey enerjisindeki önemli değişim bir anda ortaya çıkmaktadır (Chen vd. 2007, Park vd. 2007, Zheng vd. 2011).

Bakır (II) oksit (CuO) dar bir band aralığına (1.2 eV) sahip p-tipi yarı-iletken olması ve çok çeşitli yüksek-sıcaklık süperiletkenleri ile manyetik direnç materyallerinin temelini oluşturması gibi ilginç özelliklerinden dolayı geçiş metal oksitleriyle yapılan çalışmalar içerisinde en göze çarpan konudur (Zheng vd. 2000, MacDonald 2001, Anandan ve Yang 2007, Liu vd 2007, Vaseem vd. 2008, Singh ve Ali 2010, Li vd. 2012, Filipic ve Cvelbar 2012). CuO nanoyapıları geniş yüzey alanı ve potansiyel boyut etkileri üstün fiziksel ve kimyasal özellikler sunarak mikro ve bulk yapıları ile aralarındaki farkı sergilerler. Bu nanoyapılar çok çeşitli alanlarda umut verici uygulamalarından dolayı geniş ölçüde araştırma konularına dahil edilen ve edilmekte olan materyallerdir. CuO nanoyapılara, yüksek kapasite, güvenilirlik ve doğa dostu olmaları sebebiyle, yeni-nesil şarj edilebilir lityum-iyon bataryaları (LIBs) için elektrot materyali gözüyle bakılmaktadır (Song vd. 2011). Ayrıca yüksek güneş absorbanı, düşük termal emittansı, iyi elektriksel özellikleri ve yüksek taşıma konsantrasyonu gibi özellikleri nedeniyle güneş hücresi üretiminde de oldukça umut vaat eden materyallerdir (Kislyuk ve Dimitriev 2008). Ve dahası bu nanomateriyaller; gaz sensörleri (Choi ve Jang 2010), biyosensörler (Rahman vd. 2010), nanoakışkanlar (Zhou vd. 2010), fotodedektörler (Wang vd. 2011), alan emisyonu (EMs) (Rossi vd. 2007), süperkapasitörler (Zhang vd. 2011), inorganik kirliliklerin uzaklaştırılması (Ali 2012, Yu vd. 2012), fotokataliz (Liu vd. 2012) gibi daha bir çok farklı alanda kullanılmaktadırlar.

### 3. KAYNAK ARAŞTIRMASI ve ÇALIŞMANIN AMACI

Tasviri vd. (2011) amin-fonksiyonel TiO<sub>2</sub> kaplanmış karbon nanotüplerden (CNT) oluşan nano-kompoziti GOD absorplamak için kullandıkları çalışmada geliştirdikleri materyali camı karbon elektrot (GCE) üzerine sabitleyerek yeni bir glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Amperometrik çalışma koşulları 0.1 M PB, pH 7.4 olarak ve çalışma potansiyeli -0.35 V olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada k<sub>s</sub> değerini 3.5 s<sup>-1</sup> olarak belirlemişlerdir. Geliştirilen biyosensör için cevap süresini 3 s ve lineer aralığı 1.8 – 266 µM olarak belirledikleri biyosensörün algılama limitinin 0.44 µM ve duyarlılığının 0.007 µA µM<sup>-1</sup> olduğunu kaydetmişlerdir. Geliştirdikleri GOD/NH<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>-CNT/GC biyosensörün K<sub>m</sub> değerini 8.59 mM hesaplamışlardır. Stabilite çalışmalarını döngüsel voltametri kullanarak gerçekleştirmişler ve 100 mV s<sup>-1</sup> tarama hızında aldıkları 100 döngüden sonra GOD/NH<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>-CNT/GC biyosensörün başlangıç aktivitesinin %3.3'ünü kaybettiğini belirtmişlerdir. Girişim etkisi çalışmasında 0.1 mM glukoz cevabına ürik asit, askorbik asit ve asetaminofenin etkisini araştırmışlar ve sonuçta biyosensörün glukozu yüksek seçicilik gösterdiğini söylemişlerdir.

Periasamy vd. (2011) GOD'ı jelatin-çok duvarlı karbon nanotüp (GCNT) modifiye GCE'a glutraldehit yoluyla kovalent bağlama metodunu kullanarak immobilize etmişlerdir. Elektrokimyasal ölçümleri 0.05 M PB, pH 7 ortamında almışlardır. Geliştirdikleri biyosensörün k<sub>s</sub> değerini 1.08 s<sup>-1</sup> olarak hesaplamışlardır. -0.44 V sabit potansiyelde aldıkları amperometrik ölçümler sonucunda lineer aralığı 6.3 - 20.09 mM ve duyarlılığı 2.47 µA mM<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup> şeklinde belirlemişlerdir. Yaptıkları stabilite çalışmasında 2 hafta sonunda aldıkları ölçümde elde ettikleri akım yoğunluğu ilk ölçümle kıyaslandığında biyosensörün %96.37 oranında aktivitesini koruduğunu ve devam eden 2 haftada da önemli bir azalmanın olmadığını söylemişlerdir. Yaptıkları girişim çalışmasında hücreye 5 mM glukoz ilave ederek aldıkları amperometrik ölçümün devamında sırasıyla 0.5 mM askorbik asit, ürik asit, asetaminofen, pirüvat ve laktat ilave etmişler ve GCNT/GOD biyosensörün glukozu yüksek seçicilik gösterdiğini söylemişlerdir.

Shi ve Ma (2010) hem çapraz bağlama hem de daldırıp kaplama metodunu kullanarak yeni bir biyosensör hazırlamışlardır. Bu amaçla üçgenel olarak sentezlenen Ag nanopartikülleri GOD, kitosan ve glutaraldehit ile karıştırmışlar ve çapraz bağlama metodunu uygulamışlardır. Ardından Pt elektrodun karışıma daldırılıp oda sıcaklığında kurutmuşlardır. Çalışma koşullarını 0.1 M PB pH 7 ve çalışma potansiyelini +0.60 V olarak belirlemişlerdir. Geliştirdikleri CHIT/GOD-AgTNPs/Pt biyosensörün lineer aralığını  $3 \times 10^{-6} - 3 \times 10^{-3}$  M, algılama limitini  $1 \times 10^{-6}$  M ve duyarlılığını  $67,17 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$  olarak belirlemişlerdir. Km değerini 2.35 mM olarak hesaplamışlardır. Yaptıkları stabilite çalışmasında 1 ay sonunda biyosensörün başlangıçtaki akım yoğunluğunun %85'ini koruduğunu söylemişlerdir.

Luque vd. (2005) GOD ve CuO modifiye karbon pasta elektrot (CuO-GOD-CPE) geliştirerek yeni bir amperometrik glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Çalışma koşullarını 0.05 M PB, pH 7.4 ve çalışma potansiyelini -0.100 V şeklinde belirlemişlerdir. Geliştirdikleri biyosensörün algılama limitini  $2.0 \times 10^{-5}$  M ve duyarlılığını  $2.94 \times 10^4 \text{ nA M}^{-1}$  olarak belirlemişlerdir. Geliştirdikleri biyosensörün Km değerini  $7.8 \times 10^{-3}$  M olarak belirlemişlerdir. Girişim etkisi çalışmasında  $5.0 \times 10^{-3}$  M glukoz ilavesinin ardından  $9.1 \times 10^{-5}$  M asetaminofen,  $1.5 \times 10^{-4}$  M askorbik asit ve  $8.3 \times 10^{-4}$  M ürik asit ilaveleriyle çalışmış ve girişim etkisi gözlenmediğini söylemişlerdir. Stabilite çalışmasında biyosensörün 120 gün sonra verdiği cevapta değişim gözlenmediğini söylemişler ve data vermemişlerdir.

Yu vd. (2014) elektrokimyasal metodlarla enzimatik reaksiyonun incelenebileceği nanokanallı-enzim sistemi geliştirmişlerdir. Gözenekli anodik alümina (PAA) membranın nanokanallarının iç duvarına GOD'ın kovalent olarak bağlandığı bu model sistemin kanallarının sonuna Au disk elektrot bağlamışlardır ve böylece enzimatik reaksiyon sonucu oluşan  $\text{H}_2\text{O}_2$  ürününü tayin edebilmişlerdir. Çalışma koşullarını 2 mM PB pH 7.0 ve çalışma potansiyelini +0.7 V olarak belirlemişlerdir. Geliştirilen sistemin lineer aralığını 0.005 mM - 2 mM olarak belirlemişlerdir ve  $K_m$  değerini 0.4 mM olarak hesaplamışlardır.

Kamyabi ve çalışma arkadaşları (2013) ultra-minyatürize edilebilir yeni bir glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. GOD'ı poli(2,6-diaminopiridin)/çok-duvarlı karbon nanotüp/camsı karbon elektrot (poli(2,6-DP)/MWNT/GCE) yüzeyine immobilize etmişlerdir. Çalışma koşullarını 0.1 M PB pH 7.4 olarak belirlemişlerdir. Geliştirilen biyosensör için iki lineer aralık belirlemişlerdir; 0.42 – 89 µM ve 0.9 – 8.0 µM (R<sup>2</sup> 0.95). Algılama limitini 0.13 µM olarak belirlemişlerdir. Km değerini 0.20 mM olarak hesaplamışlardır. Stabilite çalışmasında biyosensörün 10 gün sonra kalan aktivitesini %93 olarak belirlemişlerdir. Biyosensörün tekrar üretilebilirlik çalışmasında 8 elektrot hazırlamışlardır ve relatif standart sapmasını %7.6 hesaplamışlardır. Serum çalışmasında elde ettikleri sonuçları spektrofotometre sonuçları ile kıyaslamışlardır ve sonuçların çok yakın olduğunu söylemişlerdir.

Chu vd. (2012) NiO ile doplanmış ZnO nanoyollarla modifiye Pt elektrot yüzeyine GOD immobilizasyonu yaparak yeni bir amperometrik glukoz biyosensör tasarlamışlardır. Çalışma koşullarını 0.01 M PB pH 7.0 ve çalışma potansiyelini +0.39 V olarak belirlemişlerdir. Geliştirilen biyosensörün lineer aralığını 0.5 – 8 mM, algılama limitini  $2.5 \times 10^{-6}$  M ve duyarlılığını  $61.78 \mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$  şeklinde belirlemişlerdir. Km değerini 7.4 mM hesaplamışlardır. Biyosensörün tekrar üretilebilirliği için yaptıkları çalışmada 20 elektrot hazırlamışlar ve % relatif standart sapmayı %3.05 olarak hesaplamışlardır. Stabilite çalışmasında geliştirilen biyosensör için 1 ay sonunda cevabın değişmediğini söylemişlerdir ve data belirtmemişlerdir. Girişim etkisini araştırmak için hücreye 1.5 mM glukoz ilavesinden sonra 0.5 mM üre, askorbik asit, ve L-sistein eklemişler girişim etkisinin olmadığını söylemişlerdir.

Nakabaysahi vd. (2005) dipolar rutenyum(II) amin kompleksi içeren  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5(\text{L}^+)]^{3+}$  (L+: pridinyum iyonu) farklı bir çok piridinyum iyonlarının medyatör etkisini glukozun oksidasyonu üzerine voltametrik olarak incelemişlerdir. Çalışma koşullarını 0.1 M PB pH 7.0 olarak belirlemişlerdir.yapılan çalışmadan elde edilen ks değerleri osmiyum türlerinin ks değerleri ile kıyaslanmış ve elde edilen sonuçlar ışığında grup bu türlerin amperometrik glukoz biyosensörleri için uygun olduğunu söylemiştir. Bu rutenyum(II) komplekslerinin Ag/AgCl'ye karşı 0.10- 0.18 V'da uygun redoks potansiyellerine ve yüksek ks değerlerine sahip olduklarını belirtmiştir.

Ozoemena ve Nyokong (2006) amperometrik enzim elektrot için yeni bir redoks medyatörü olan kobalt(II)ftalosiyanın–kobalt(II)tetra(5-fenoksi-10,15,20-trifenilforfirin) pentamerini camı elektrot yüzeyinin modifikasyonunda kullanmışlar ve sonra bu yüzeye GOD ve sığır serum albünini (BSA) gluteraldehit ile çapraz bağlayarak immobilize etmişler ve yüzeyi nafyon ile kaplamışlardır. Çalışma koşullarını 0.1 M PB pH 7.0 ve çalışma potansiyelini +0.4 V olarak belirlemişlerdir. geliştirdikleri biyosensörün lineer aralığı 11 mM'a kadar çıkmıştır. Algılama limitini 10 µM ve duyarlılığı 24.20 nA/mM olarak belirlemişlerdir. Km değerini 14.91 mM olarak hesaplamışlardır. Geliştirdikleri biyoasensörün stabilitesini 2 hafta koruduğunu belirtmişlerdir. Girişim etkisinin araştırılmasında okzalik asit dışında askorbik asit ve ürik asitin girişim etkisi fazla olduğunu gözlemlemişlerdir ve bu nedenle aynı sensörü ekstra 2.5 µl %0.5'lik nafyon ile kaplayarak girişimi tekrar çalışmışlar ve türlerin etkisini yok ettiklerini belirtmişlerdir.

Şenel vd. (2013) ferrosen çekirdekli asimetrik PAMAM dendrimerleri kullandıkları yeni bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu amaç için öncelikle farklı jenerasyon(G1, G2 ve G3) PAMAM dendrimerleri (amin terminal) sentezlemişler ve 3-merkaptopropiyonik asit ile yüzeyini modifiye ettikleri altın elektrot (COOH grupları oluşturulmuş) yüzeyine bağlamışlardır. Bu işlemi gerçekleştirirken carbodiimid kimyasından yararlanmak için EDC kullanmışlardır. Ardından dendrimer-fonksiyonel elektrot yüzeyine GOD yine carbodiimid yolu ile immobilize edilmiştir. Şenel ve arkadaşları çalışma koşullarını 10 mM PB pH 7.5 ve çalışma potansiyelini +0.25 V olarak belirlemişler. Geliştirdikleri biyosensörlerle yaptıkları elektrokimyasal çalışmalar sonucu jenerasyon arttıkça biyosensör duyarlılığında arttığını gözlemlemişlerdir. Geliştirilen biyosensörün linner aralığını 1 – 22 mM, algılama limitini 0.48 mM ve duyarlılığını 32.7 µA/mM olarak belirlemişler ve Km değerini 19.86 mM olarak hesaplamışlardır. Stabilitate çalışmasında biyosensörün 20 gün sonunda aktivitesinin %90'ını koruduğunu söylemişlerdir. Girişim çalışmasında 1 mM askorbik asit, ürik asit ve asetaminofen varlığında 1 mM glukozun cevabını incelemişler ve ihmal edilebilir bir girişim etkisinden bahsetmişlerdir.

Nenkova vd. (2010) silika jel (SG) ve çok duvarlı karbon nanotüplerin (MWCNTs) poliakrilonitril (PAN) polimeri içine hapsedildiği yeni bir nanokompozite GOD

enziminin gluteraldehit ile çapraz bağlanması sonucu oluşturulan yeni bir amperometrik glukoz biyosensörü tasarlamışlardır. Öncelikle nanokompozitin karışımının optimum parametrelerini çalışmışlardır. Silika jel miktarının, nanotüp miktarının ve enzim konsantrasyonunun biyosensör üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışma koşullarını 0.1 M PB pH 6.2 ve çalışma potansiyelini +0.6 V olarak belirlemişlerdir. geliştirdikleri biyosensörün lineer aralığını 5  $\mu$ M – 2 mM, algılama limitini 1  $\mu$ M ve duyarlılığını 16.5  $\mu$ A/mM olarak kaydetmişlerdir. Km değerini 13.9 mM hesaplamışlardır. Girişim etkisinin araştırılmasında sadece askorbik asiti kullanmışlardır. 0.5 mM glukozun cevabına askorbik asitin etkisini çalışmışlar ve 0.2mM civarında bir girişim etkisi olduğunu kaydetmişlerdir. Biyosensörün tekrar üretilebilirlik çalışmasında 5 elektrot hazırlayarak % relatif standart sapmayı %4.5 olarak hesaplamışlardır. Stabilitate çalışmasında biyosensörün 15 gün sonunda aktivitesinin %89'unu koruduğunu kaydetmişlerdir.

Karbonhidrat metabolizmasının en önemli endokrin bozukluğu olan Diabetes Mellitus, kalp hastalıklarına, böbrek yetmezliğine, körlüğe sıklıkla neden olmaktadır ve dünya çapında ölüm ile sakatlıklara neden olduğu bilinmektedir. Glukoz seviyesindeki bozukluklar diyabetlilerde komplikasyonlara yol açmaktadır. Bu metabolik bozukluk kan glukoz konsantrasyonlarının 80-120 mg/dL (4.4 - 6.6 mM) olan normal aralığından daha yüksek ya da daha alçak olması şeklinde yansır. Bu nedenle, seçici, yüksek duyarlılıkta, hızlı ve düşük maliyetli tekniklerin geliştirilmesi glukoz belirlenmesinde oldukça önemlidir.

Bu tez çalışmasının en önemli amacı kan glukoz ölçümüne dayalı hassasiyeti yüksek, algılama limiti düşük, az maliyetli enzimatik bir biyosensör geliştirmektir. Bu nedenle aljinat matris CuO nanopartikülleri ile modifiye edilerek yüzey alanı artırılmış ve GOD immobilizasyonu için uygun koşullar sağlanmıştır. Biyosensörün optimizasyonu amperometrik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her immobilizasyon basamağı elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve döngüsel voltametri ile çalışılmıştır. Farklı tarama hızlarında yapılan CV çalışmaları ile biyosensörün elektrokimyası detaylandırılmıştır. Farklı glukoz konsantrasyonlarına karşı amperometrik olarak alınan ölçümlerden elde edilen akımlar grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon eğrileri elde

edilmiştir ve bu grafikler kullanılarak insan kan serum örneklerinin bilinen konsantrasyonları çalışılmıştır. Elde edilen değerler hastane değerleri ile kıyaslanmıştır.

## 4. MATERYAL ve YÖNTEM

### 4.1 Materyaller

#### 4.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarda kullanılan Glukoz Oksidaz(E.C.1.1.3.4 GOD), aljinat, copper (II) oxide (CuO), N-hidroksisüksinimit (NHS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit (EDC), sodyum klorür (NaCl), asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH), potasyum klorür (KCl), glukoz, potasyum ferrosiyaniür ve potasyum ferrisiyaniür (Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-/3-</sup>), D-Phenylalanine, askorbik asit, ürik asit Sigma (St Louis, MO, USA)'dan; sodyum hidrojen fosfat dihidrat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) ve disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O) Merck'den temin edilmiştir.

#### 4.1.2 Kullanılan cihazlar

Yapılan çalışmalarda elektrokimyasal ölçümler "Gamry Instrument Impendace Analyzer- Framework Version 5.50 software" kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Deneylede çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan de-iyonize su direnci  $\geq 18.2 M\Omega$  cm olan MilliPore Simplicity ünitesinden sağlanmıştır.

Çözeltilerin hazırlanmasında, hücre içine çözeltilerin ilave edilmesinde ve immobilizasyon prosesinde eppendorf marka mikro pipetler kullanılmıştır.

Çözeltilerin karıştırılmasında Wisestir MSH-20 marka manyetik karıştırıcı/ısıtıcı kullanıldı.

Deneyleler esnasında yapılan karışırtmalar Boeco V1 Plus marka Vortex kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan katı kimyasallar hassas terazide tartılmıştır.

Hazırlanan tamponların pH ları Hanna HI 221 marka pH metre ile ayarlanmıştır.

#### 4.1.3 Kullanılan elektrotlar

Elektrokimyasal hücre sisteminde karşıt, çalışma ve referans elektrotları kullanılmıştır. Karşıt ve çalışma elektrotları yüzey alanları  $1 \text{ cm}^2$  olan platin levhadır. Kullanılan referans elektrot Luggin kapiler içinde Ag/AgCl elektrotudur.

Her immobilizasyon öncesi Pt levha elektrotlar  $0,05 \mu\text{m}$  alümina ile ayna parlaklığına ulaşana dek temizlenmiştir. Ardından; elektrokimyasal temizlikleri için  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ ) çözeltisinde  $100 \text{ mVs}^{-1}$  tarama hızında  $0,3$  ile  $+1,2 \text{ V}$  arası dönüşümlü voltametrileri alınmıştır. Son olarak elektrotların pH'ı  $6,5$  olan fosfat tamponunda  $100 \text{ mVs}^{-1}$  tarama hızında  $-0,5$  ile  $+0,5 \text{ V}$  arası dönüşümlü voltametrileri alınarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Kullanılan tüm Pt levha elektrotların temizliği bu şekilde yapılmıştır.

#### 4.1.4 Kullanılan çözeltiler

$0,1 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve  $0,1 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  çözeltileri uygun miktarda tartılan katıların deiyonize suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Fosfat tamponu ( $0,05 \text{ M}$ , pH  $6,5$ ) bu çözeltiler kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan fosfat çözeltilerini istenilen pH'lara ayarlarken  $0,10 \text{ M NaOH}$  ve  $0,10 \text{ M H}_3\text{PO}_4$  çözeltileri kullanılmıştır.

Glukoz oksidaz enzimi (GOD) ana stok çözeltisi  $50000 \text{ U} / 5000 \mu\text{L}$  olacak şekilde deiyonize suda hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok GOD çözeltisinden ( $50000 \text{ U} / 5000 \mu\text{L}$ ) 2. stok çözelti ( $2500 \text{ U} / 1125 \mu\text{L}$ ) olacak şekilde hazırlanmış ve buzdolabında  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. İmmobilizasyon jeli hazırlanması aşamasında uygun hacimde stok çözeltilerden alınarak kullanılmıştır.

Çapraz bağlayıcıların stokları NHS ( $2 \text{ M}$ ) ve EDC ( $1 \text{ M}$ ) hazırlanmış ve gereken miktarlarda kullanılmıştır.

Aljinat %1'lik stok çözelti halinde hazırlanmış ve kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan stok glukoz çözeltisi (2 M), glukozun de-iyonize suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti, kullanılmadan önce, bir gece glukozun mutarotasyonu için +4 °C'de bekletilmiştir. Farklı derişimlerdeki glukoz çözeltileri hazırlanan stok çözeltilerden uygun şekilde seyreltilerek kullanılmıştır.

Elektrokimyasal ölçümlerde hücre ortamında kullanılmak üzere  $[K_4(FeCN_6)]$  (0.5 M),  $[K_3(FeCN_6)]$  (0.5 M) ve KCl (1 M) stok çözeltileri hazırlanmış ve deneylerde uygun miktarlarda kullanılmıştır.

Girişim çalışmasında kullanılmak üzere ürik asit ( $0.1 \times 10^{-2}$  M), askorbik asit ( $0.1 \times 10^{-2}$  M), asetamidofenol ( $0.1 \times 10^{-2}$  M), ve fenilalanin ( $0.1 \times 10^{-2}$  M) stok çözeltileri hazırlanmış ve hücreye hesaplanan miktarlarda eklenmiştir.

## **4.2 Yöntem**

### **4.2.1 İmmobilizasyon jelinin hazırlanması**

Aljinat çözeltileri (15 µL, %1) eppendorf tüplere alınarak GOD (10U) ilave edilmiş ve vortekslenerek homojenizasyonları sağlanmıştır. Hemen ardından çapraz bağlayıcılar eklenmiş ve tekrar vortekslenerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Nanopartikül içeren eden çalışmalarda immobilizasyon jellinin hazırlığı aşamasında önce nanopartiküller istenilen miktarda tartılarak eppendorf tüplere aktarılmış ve ardından uygun hacimde aljinat ilave edilerek vortekslenmiştir. Hazırlanan homojen karışımlara GOD eklenip tekrar vortekslenmiştir ve son olarak çapraz bağlayıcılarında ortama ilave edilip vortekslenmesiyle immobilizasyon jelleri hazırlanmıştır.

#### **4.2.2 İmmobilize elektrotların hazırlanması**

İmmobilizasyon jeli hazırlandıktan sonra, Pt elektrotun her bir yüzeyinde 25 µL olacak şekilde iki yüzeyine toplam 50 µL immobilizasyon jeli damlatılmıştır ve bir 1 gece kurumaya bırakılmıştır. Her çalışmadan önce kullanılacak olan elektrotlar fosfat tamponu (0.05 M, pH 6.5) ile 3 kez yıkanmıştır.

#### **4.2.3 SEM mikrograflarının alınması**

Aljinat, aljinat-CuO, ve aljinat-CuO-GOD filmlerinin morfolojileri SEM ile görüntülenmiş, GOD immobilizasyonunun başarısı ve CuO'nun etkisi incelenmiştir. SEM mikrografları, UNAM'da alınmıştır.

#### **4.2.4 FT-IR spektrumlarının alınması**

Aljinat, CuO, aljinat-CuO, aljinat-GOD ve aljinat-CuO-GOD filmlerin FT-IR spektrumları alınmış ve GOD immobilizasyonunun başarısı incelenmiştir. FT-IR spektrumları Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümünde alınmıştır.

#### **4.2.5 Amperometrik yöntem ve optimizasyon çalışması**

Aljinat-CuO-GOD biyosensörünün geliştirilmesinde değişik parametrelerin optimizasyonları yapılmıştır. Bu amaçla aljinat miktarı, GOD konsantrasyonu, NHS/EDC çapraz bağlayıcılarının molar oranı, CuO nanopartikül miktarı ve pH optimize edilmiştir. Hazırlanan elektrotların amperometrik ölçümleri fosfat tamponunda (0.05M pH 6.5) +0.65V sabit potansiyelde gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın başlangıcında kararlı-hal akımı (steady-state current) elde edilene kadar beklenmiştir. Ardından hücre ortamına 40 mM glukoz ilave edilmiş ve elde edilen akım yoğunlukları grafiğe geçirilmiştir.

#### **4.2.5.1 Polimer optimizasyonu**

İmmobilizasyon şartlarının optimize edilmesinde ilk olarak farklı polimer oranları denenmiştir.

En uygun aljinat konsantrasyonunu tespit edebilmek için  $0.5 \times 10^{-4} - 4.0 \times 10^{-4}$  g aralığında aljinat miktarları denenmiştir. Çalışmada GOD konsantrasyonu (10 U), NHS/EDC molar oranı (0.28) ve CuO nanopartikül miktarı (0.0002 g) sabit tutulmuştur.

Alınan amperometrik ölçümlerden elde edilen akım yoğunlukları, polimer miktarına karşı grafiğe geçirilmiş ve optimum aljinat miktarı belirlenmiştir.

#### **4.2.5.2 GOD optimizasyonu**

GOD enziminin optimizasyonunda 1 - 50 U aralığında GOD konsantrasyonları denenmiştir. Aljinat miktarı ( $1.5 \times 10^{-4}$  g), NHS/EDC molar oranı (0.28) ve CuO nanopartikül miktarı (0.0002 g) sabit tutulmuştur.

Amperometrik ölçümlerden elde edilen akım yoğunlukları, GOD konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiş ve optimum GOD konsantrasyonu belirlenmiştir.

#### **4.2.5.3 Çapraz bağlayıcı optimizasyonu**

Çapraz bağlayıcı optimizasyonu çalışmasında aljinat miktarı ( $1.5 \times 10^{-4}$  g), GOD konsantrasyonu (10 U) ve CuO nanopartikül miktarı (0.0002 g) sabit tutularak 0.15 – 0.65 aralığında NHS/EDC molar oranları denenmiş ve en uygun NHS/EDC molar oranı alınan amperometrik ölçümler sonucu belirlenmiştir.

#### 4.2.5.4 CuO nanopartikül optimizasyonu

CuO nanopartikül optimizasyonu amacıyla aljinat miktarı ( $1.5 \times 10^{-4}$  g), GOD konsantrasyonu (10 U) ve NHS/EDC çapraz bağlayıcı molar oranı (0.28) sabit tutularak 0.0001 – 0.0005 g aralığında CuO nanopartikül miktarları denenmiştir.

Alınan amperometrik ölçümlerden elde edilen akım yoğunlukları, CuO nanopartikül miktarına karşı grafiğe geçirilmiş ve en yüksek amperometrik yanıtın alındığı CuO nanopartikül miktarı optimum olarak belirlenmiştir.

#### 4.2.5.5 pH optimizasyonu

Uygun pH'nın belirlenmesi için 0,05 M pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 olacak şekilde tamponlar hazırlanmıştır. pH 4.5-6.0 aralığında asetat tamponu, pH 6.5-8.0 aralığında fosfat tamponu kullanılmıştır.

Hazırlanan tamponlarda alınan amperometrik ölçümler sonucu en yüksek amperometrik yanıtın alındığı pH optimum çalışma pH'ı olarak belirlenmiştir.

#### 4.2.6 Aljinat-CuO-GOD biyosensörün tekrar üretilebilirliği

Aljinat-CuO-GOD biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin araştırılması için 6 elektrot hazırlanmıştır. Her elektrotla 40 mM glukozu karşı +0.65 V'da 3 ayrı amperometrik ölçüm alınmıştır ve 3 ayrı cevabın % relatif standart sapması hesaplanarak grafiğe geçirilmiştir. Ayrıca 6 elektrot içinde % relatif standart sapma hesaplanmıştır. Relatif standart sapma aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$RSD = \frac{\text{standart sapma}}{\text{ortalama değer}} \times 100\%$$

#### **4.2.7 Aljinat-CuO-GOD biyosensörün kullanım süresi**

Aljinat-CuO-GOD biyosensörün kullanım süresinin araştırılması için 3 elektrot hazırlanmıştır. 15 gün boyunca her gün hazırlanan elektrotlarla 40 mM glukozu karşı +0.65 V'da amperometrik ölçüm alınmıştır. Elde edilen akım yoğunlukları değerlendirilerek geliştirilen biyosensörün kullanım süresi belirlenmiştir.

#### **4.2.8 Biyosensörün elektrokimyasal davranışı**

Geliştirilen biyosensör ile elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ve döngüsel voltametry (CV) çalışmaları yapılmıştır. Biyosensörün her immobilizasyon aşaması için ayrı immobilize elektrotlar hazırlanarak impedans ve CV'ler alınmıştır. Elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilerek yorumlanmıştır. Ayrıca Aljinat-CuO-GOD ve Aljinat-GOD biyosensörler ile tarama hızı (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 ve 500 mVs<sup>-1</sup>) çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen grafiklerden  $k_s$  ve  $\alpha$  değerleri hesaplanarak literatür ile kıyaslanmıştır.

#### **4.2.9 Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi**

Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi amacıyla Aljinat-GOD-CuO ve Aljinat-GOD biyosensörlerde farklı derişimlerde hazırlanan glukoz çözeltilerin +0.65 V'da ölçümleri alınmıştır. Elde edilen akım yoğunlukları glukoz derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir. Oluşturulan grafiklerden algılama limitleri (LOD), lineer aralıkları ve duyarlılıkları belirlenmiştir. Michaelis-Menten grafiklerinden yararlanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir.  $K_m$  değerleri her biyosensör için hesaplanarak elde edilen sayısal değerler literatür ile kıyaslanmıştır. Bu çalışma esnasında elektrotlar kullanılmadıkları sürelerde pH 6.5 fosfat tamponunda buzdolabında +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### **4.2.10 Geliştirilen biyosensörün insan kan serumunda denenmesi**

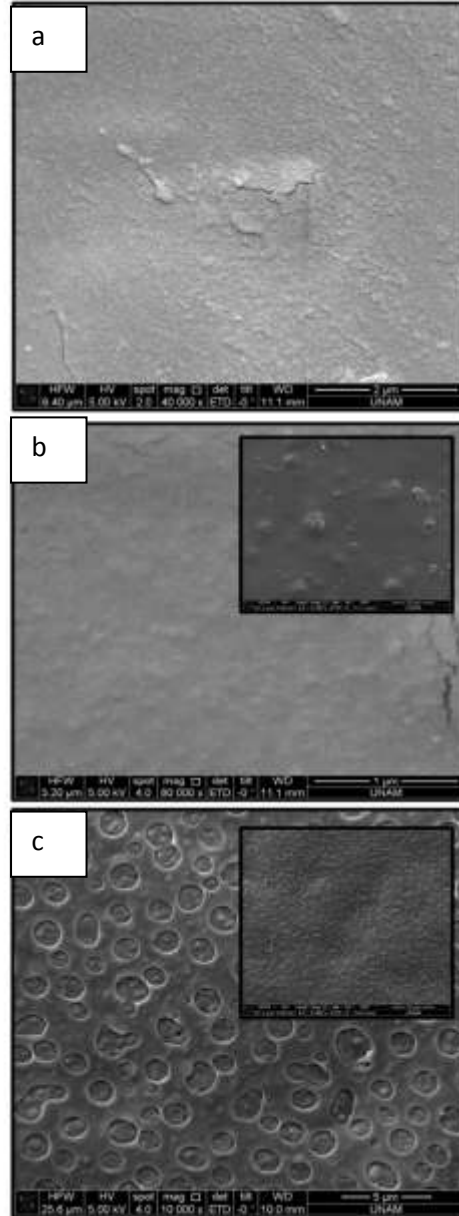
Aljinat-CuO-GOD biyosensör ile insan kan serumuna glukoz tayini yapmak amacıyla Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden farklı derişimlerde glukoz içeren 3 adet serum

örneği temin edilmiştir. Serum örnekleri herhangi bir ön işlemeden geçirilmeden Aljinat-CuO-GOD biyosensör ile hücre ortamda  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varken ve yokken çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar hastane değerleri ile kıyaslanmıştır. Her bir serum örneği ile 3 ölçüm alınmıştır ve bu ölçümlerin yüzde relatif standart sapmaları hesaplanmıştır.

## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1 Karakterizasyon Çalışmaları

#### 5.1.1 SEM mikrograflarının değerlendirilmesi

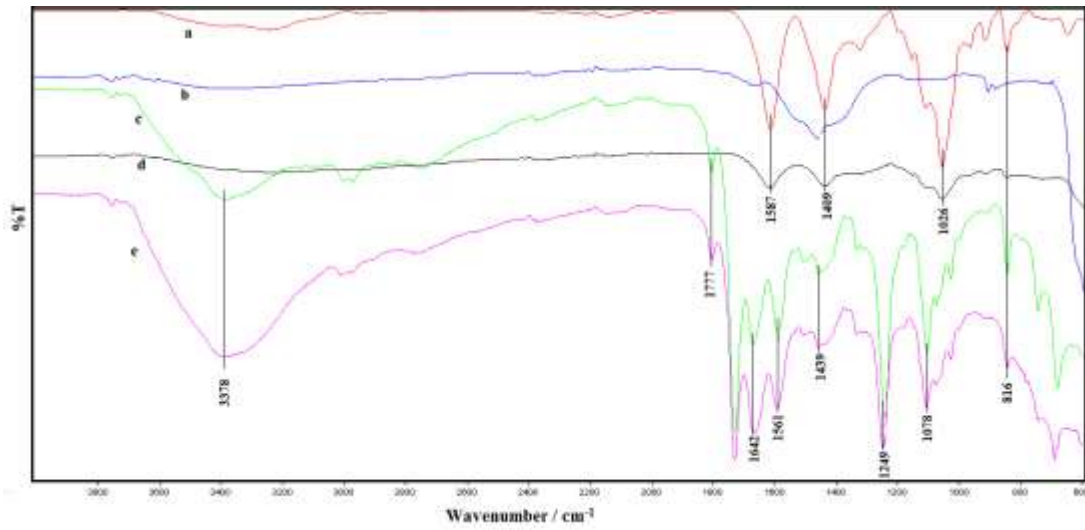


Şekil 5.1.a. Aljinat, b. Aljinat-CuO, c. Aljinat-CuO-GOD filmlerinin SEM mikrografları

Biyosensörün tasarımı aşamasında immobilizasyon prosesinin her katmanının morfolojilerinin incelenmesi amacıyla; aljinat, aljinat-CuO ve aljinat-CuO-GOD filmlerinin SEM mikrografları alınmıştır.

Şekil 5.1.a'da aljinat filmin SEM mikrografı gösterilmiştir. SEM görüntüsünden de anlaşıldığı gibi aljinat oldukça düzgün bir yüzey filmi oluşturmuştur. Aljinat filme CuO ilave edilmesiyle (Şekil 5.1.b) yüzey alanı oldukça artmıştır ve GOD immobilizasyonu için uygun bir film oluşturduğu açıkça görülmüştür. Aljinat-CuO filme GOD immobilizasyonu şekil 5.1.c'de görülmektedir. Şekilden de görülebileceği gibi GOD enziminin Aljinat-CuO filme immobilizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

### 5.1.2 FT-IR spektrumlarının değerlendirilmesi



Şekil 5.2 FT-IR spektrumları; a. aljinat, b. CuO, c. GOD immobilize aljinat film, d. aljinat-CuO nanokompozit, e. GOD immobilize aljinat-CuO film

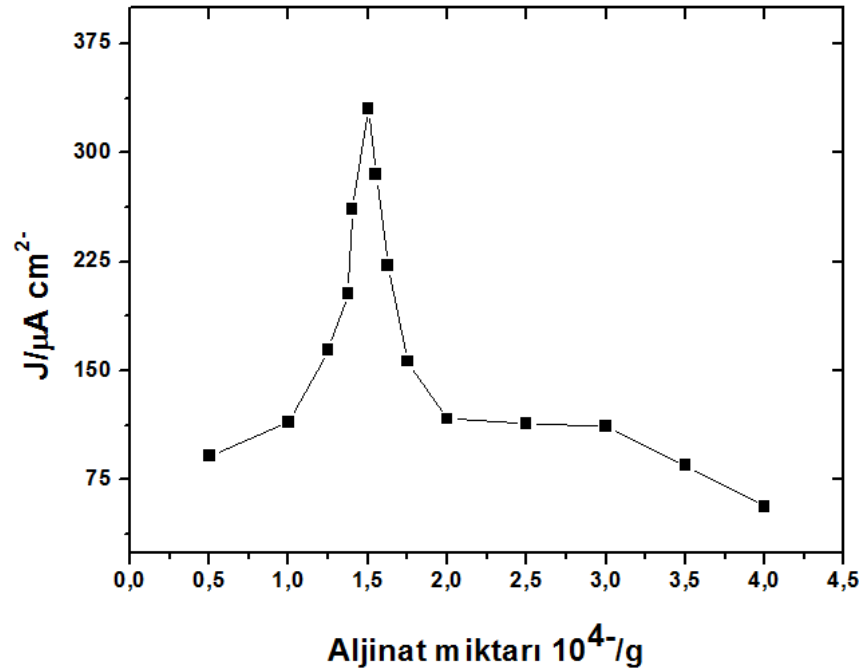
GOD immobilizasyonunun başarısını kanıtlamak amacıyla aljinat, CuO, aljinat-CuO, aljinat-GOD ve aljinat-CuO-GOD filmlerin FT-IR spektrumları alınmıştır. Elde edilen spektrumlar şekil 5.2'de gösterilmiştir. Aljinatın spektrumunda ( Şekil 5.2.a)  $1587\text{ cm}^{-1}$ ,  $1409\text{ cm}^{-1}$  ve  $1026\text{ cm}^{-1}$  de belirgin bandlar gözlenmiştir.  $1587\text{ cm}^{-1}$ 'deki band karboksilat grubunun asimetrik gerilmesine,  $1409\text{ cm}^{-1}$ 'deki band karboksilat gruplarının simetrik gerilme titreşimlerine ve  $1026\text{ cm}^{-1}$ 'deki band piranoz halkasının C-O gerilme

titreşimine aittir (Leal vd. 2008, Derkuş vd. 2014). CuO nanopartiküllerinin (Şekil 5.2.b) inert metalik özelliklerinden dolayı spesifik bir band vermemeleri nedeniyle aynı absorpsiyon bandları aljinat-CuO nanokompozitin spektrumunda da gözlenmiştir (Şekil 5.2.d). GOD immobilizasyonu sonucunda amit bağı oluşumu ile aljinat ve aljinat-CuO filmlerin spektrumlarındaki olası değişim gözlenmiştir. Literatürde, serbest GOD'un karakteristik bandları  $1624\text{ cm}^{-1}$  ve  $1537\text{ cm}^{-1}$  olarak verilmiştir.  $1642\text{ cm}^{-1}$ 'deki band, amit I, peptit bağı gruplarının C-O gerilme titreşimlerine aittir.  $1561\text{ cm}^{-1}$ 'deki band, amid II, polipeptit zincirlerinin N-H düzlem-içi eğilmesine ve C-N gerilmesine aittir (Yang vd. 2012). Elde edilen bandlar literatürdeki örneklerle benzerdir.

## **5.2 Optimizasyon Çalışmaları**

### **5.2.1 Aljinat miktarının biyosensör cevabına etkisi**

GOD enziminin immobilizasyonu için en uygun koşulların oluşturulması için ilk olarak aljinat optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla GOD konsantrasyonu (10 U), NHS/EDC çapraz bağlayıcılarının molar oranı (0.28) ve CuO nanopartikül miktarı (0.0002 g) sabit tutularak farklı oranlarda aljinat miktarları ( $0.5 \times 10^{-4}$  –  $4 \times 10^{-4}$  g) ile çalışılmıştır. Optimizasyon grafiği şekil 5.3'de gösterilmiştir.



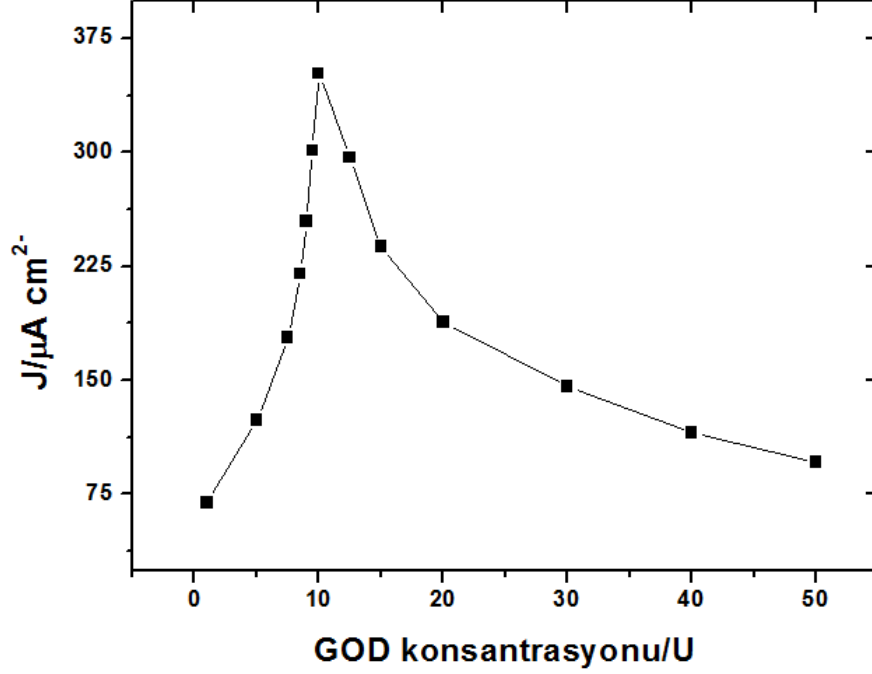
Şekil 5.3 Aljinat miktarının biyosensör cevabına etkisi

Yapılan çalışmada  $0,5 \times 10^{-4} - 4 \times 10^{-4}$  g aralığında aljinat, NHS/EDC molar oranı (0.28), GOD (10 U) ve 0.0002 g CuO içeren elektrotlar hazırlanarak bir gece buzdolabında bekletilmiştir. +0,65 V'da 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında amperometrik ölçümlerden elde edilen akım yoğunluklarına karşı çizilen optimizasyon grafiğinden GOD immobilizasyonu için en uygun taşıyıcı miktarı olarak  $1,5 \times 10^{-4}$  g belirlenmiştir. Bu değer in altında ve üstünde akım yoğunluklarındaki düşüş aljinatın gözenek yapısındaki değişimlerden kaynaklanmaktadır. Yüksek aljinat miktarları, bulk kütle olarak yığılma ve gözenek boyutunda küçülmeye neden olmuş böylece substrat-ürün giriş-çıkışında kısıtlama dolayısı ile akım yoğunluğunda düşüşe neden olmuştur (Sungur vd. 2004, Emregül 2005, Yu vd. 2014). Düşük aljinat miktarlarında ise hazırlanan biyosensörlerin mekanik olarak dayanıksız oldukları gözlenmiştir. Ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

### 5.2.2 GOD konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Aljinat-CuO-GOD biyosensörünün enzim optimizasyonu çalışmalarında değişik aralıklarda GOD konsantrasyonları (1 - 50 U) çalışılmıştır. Bu amaçla aljinat miktarı

( $1.5 \times 10^{-4}$  g), NHS/EDC molar oranı (0.28) ve CuO nanopartikül miktarı (0.0002 g) sabit tutulmuştur. GOD konsantrasyon grafiği şekil 5.4’de gösterilmiştir.

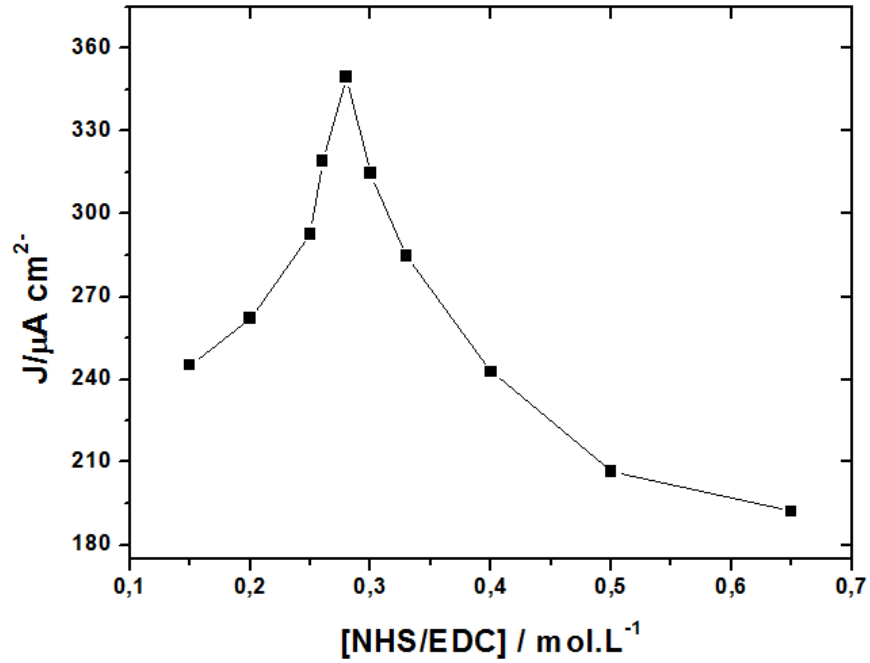


Şekil 5.4 GOD konsantrasyonunun biyosensör cevabına etkisi

Yapılan çalışmada 1U - 50U aralığında hazırlanan elektrotlar bir gece buzdolabında bekletildikten sonra +0.65 V’da 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında amperometrik ölçümler alınmıştır. Akım yoğunlukları enzim konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.4). Optimum enzim konsantrasyonunun (10 U) altında ve üstünde akım yoğunluklarında düşüş gözlenmiştir. Bu durum; artan enzim konsantrasyonu ile enzimler arasında oluşan enzim-enzim çapraz bağlanmaları ve optimum taşıyıcı sistemine aşırı enzim yüklemesi sonucu gözeneklerdeki tıkanma nedeniyle elektron difüzyonunun engellenmesi şeklinde açıklanabilir. Çok fazla enzim yüklenmesi halinde enzimlerin çok sık istiflenmesi söz konusudur böylece enzimin katalitik aktivite göstereceği uygun 3D yapı bozulabilmektedir ve bu sonuç azalan akım yoğunluğu şeklinde gözlenmektedir (Yu vd. 2014).

### 5.2.3 NHS/EDC çapraz bağlayıcı molar oranının biyosensör cevabına etkisi

Çalışmada optimum çapraz bağlayıcı miktarının belirlenmesi amacıyla aljinat miktarı ( $1.5 \times 10^{-4}$  g), GOD konsantrasyonu (10 U) ve CuO nanopartikül miktarı (0.0002 g) sabit tutularak 0.15 – 0.65 aralığında NHS/EDC molar oranları ile hazırlanan elektrotlar bir gece buzdolabında bekletilmiştir. Ardından +0.65 V'da 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında alınan amperometrik ölçümlerden elde edilen akım yoğunlukları çapraz bağlayıcı oranlarına karşı grafiğe geçirilmiştir. NHS/EDC molar oranı optimizasyon grafiği şekil 5.5'de gösterilmiştir.



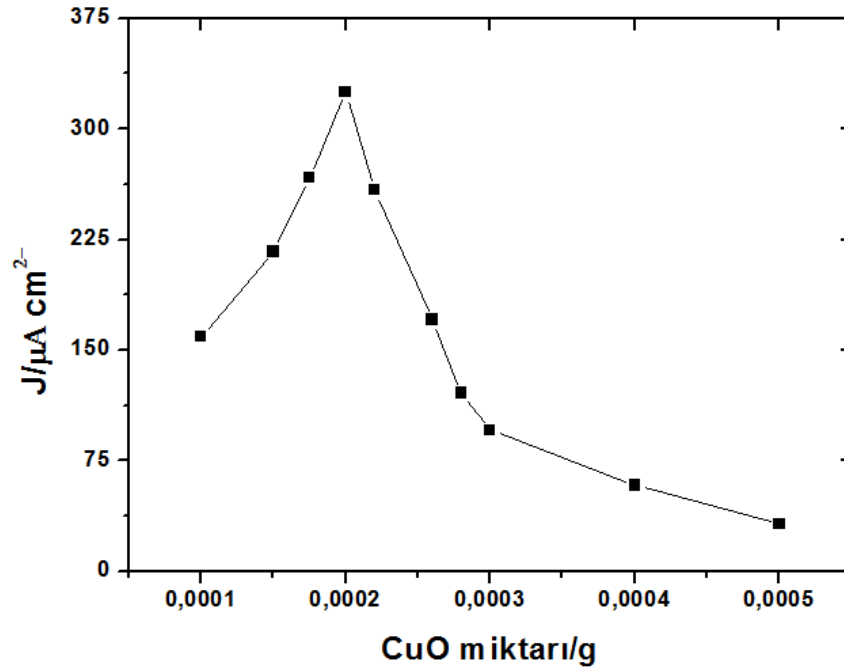
Şekil 5.5 NHS/EDC molar oranının biyosensör cevabına etkisi

Elde edilen grafikten optimum çapraz bağlayıcı oranı 0.28 olarak belirlenmiştir. Molar orandaki artış ile GOD'ın aljinata bağlanması artmıştır. Optimum değer üzerinde, gözlenen akım yoğunluğundaki düşüş; çapraz bağlayıcı konsantrasyonundaki artışla polimerin daha sıkı bir form alması ve dolayısıyla elektron aktarımında azalmaya sebep olmasının sonucudur. Oluşan bu sıkı form polimerin gözeneklerinde daralmaya, polimerin şişme kapasitesinde azalmaya neden olarak enzim aktif merkezi ve substratın bir araya gelmesini de engellemektedir. Ayrıca çapraz bağlayıcı konsantrasyonundaki

artış enzim inaktivasyonuna neden olmaktadır (Sungur vd. 2004, Emregül 2005, Yu vd. 2014).

#### 5.2.4 CuO nanopartikül miktarının biyosensör cevabına etkisi

Yüzey alanını artırarak GOD immobilizasyonunu geliştirmek ve elektron transfer hızını arttırıp daha düşük tayin sınırı elde etmek amacıyla CuO nanopartiküller kullanılmıştır. Bu amaca yönelik olarak kullanılacak olan CuO nanopartikül miktarı optimize edilmiştir. Nanopartikül optimizasyon grafiği şekil 5.6'de gösterilmiştir.

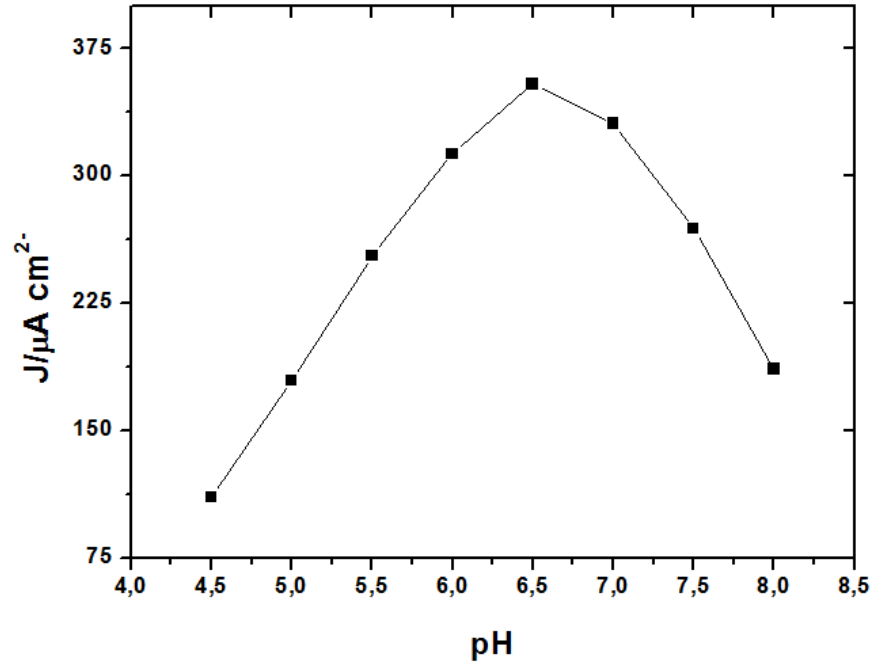


Şekil 5.6 CuO nanopartikül miktarının biyosensör cevabına etkisi

Yapılan çalışmada aljinat miktarı ( $1.5 \times 10^{-4}$  g), GOD konsantrasyonu (10 U) ve NHS/EDC çapraz bağlayıcı molar oranı (0.28) sabit tutularak 0.0001 - 0.0005g aralığında CuO ilavesi ile aljinat-CuO-GOD biyosensörleri elde edilmiştir. Bir gece buzdolabında bekletildikten sonra +0.65 V 'da 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  varlığında alınan amperometrik ölçümlerden elde edilen akım yoğunlukları nanopartikül miktarına karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafikten optimum nanopartikül miktarı 0.0002 g olarak belirlenmiştir.

Nanopartiküller polimer filmin yüzey alanını artırarak enzim immobilizasyonunda başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Düşük nanopartikül miktarlarında (0.0001 - 0.0002g) sinyal artışı yüzey alanının artmasına bağlı olarak GOD immobilizasyonunu artırırken, nanopartikül miktarının ileri artışı ( 0.0002g üzeri) film yüzeyinin nanopartiküller ile kaplamasına dolayısı ile elektron aktarımının azalmasına neden olmaktadır.

### 5.2.5 pH değişiminin biyosensör cevabına etkisi



Şekil 5.7 pH değişiminin biyosensör cevabına etkisi

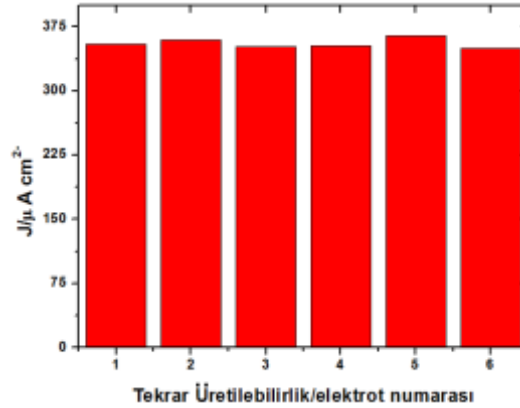
Elektrokimyasal ve enzimatik reaksiyonlarda enzimin aktivitesini sürdürebilmesi için ortamın pH'sı oldukça önemlidir. Enzim yapısının kararlılığı pH değişimlerinden etkilenmektedir. Bu nedenle enzimatik biyosensörün çalışılacağı ortamın pH'sının belirlenmesi amacıyla 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0 pH değerlerine sahip 0,05 M tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Her tampon çözelti ile amperometrik ölçümler alınarak elde edilen akım yoğunlukları pH'a karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.7).

Optimum pH'da GOD uygun tersiyer yapısından dolayı en yüksek katalitik aktivitesini göstermektedir. Daha düşük ve yüksek pH değerlerinde enzim aktivitesi hidrojensel

bağları, pi-pi istiflenmesi, disülfit köprüleri ve elektrostatik etkileşimlerin sebep olduğu aktif merkez yapısındaki değişimlerden olumsuz etkilenmektedir (Fatoni vd. 2013). Literatürde serbest GOD enzimi için optimum pH 4 ve 7 arasında olmakla beraber 5.5 olarak belirlenmiştir (Bankar vd. 2009). Yapılan çalışmada geliştirilen GOD temelli biyosensör için optimum çalışma ortamı pH'sı 6.5 olarak belirlenmiştir.

### 5.3 Tekrar Üretilebilirlik

Aljinat-CuO-GOD elektrodun tekrar üretilebilirliğinin araştırılması amacıyla 6 adet immobilize elektrot hazırlanmıştır. Hazırlanan elektrotlar bir gece buzdolabında bekletildikten sonra 40 mM glukoz ilavesi ile 0,1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında amperometrik ölçümler alınmıştır. Her ölçüm 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen akım yoğunlukları her bir elektrot için grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.8).



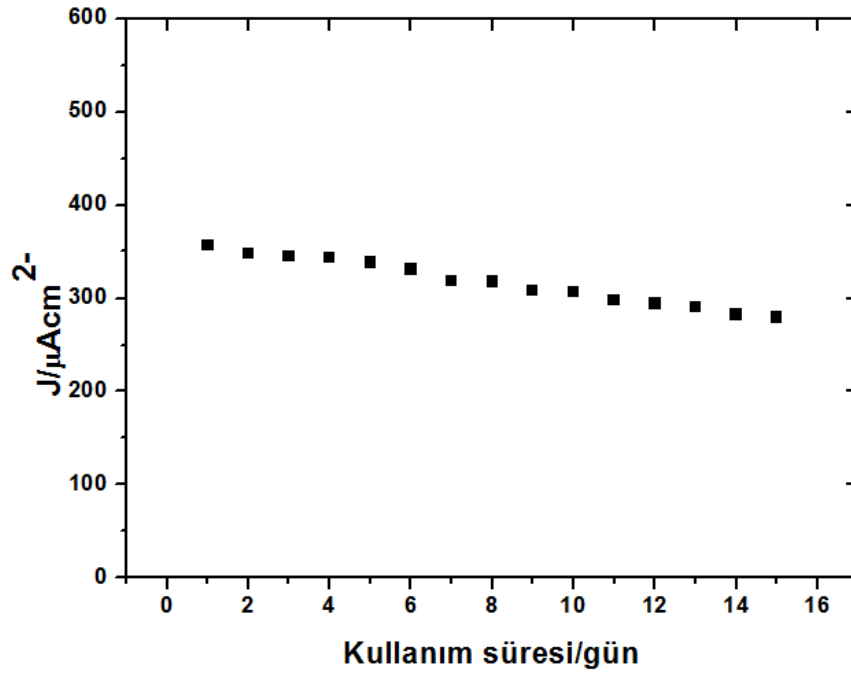
Şekil 5.8 Aljinat-CuO-GOD elektrodun tekrar üretilebilirlik grafiği

Yapılan çalışmada her elektrot için akım yoğunluklarının % relatif standart sapma değeri hesaplanmıştır. Son olarak 6 elektrot için % relatif standart sapma hesaplanmıştır. Elde edilen akım yoğunlukları sırasıyla;  $354.60 \pm 2.96 \mu\text{A cm}^{-2}$  (%RSD=0.84),  $358.47 \pm 1.67 \mu\text{A cm}^{-2}$  (%RSD=0.47),  $351.52 \pm 1.20 \mu\text{A cm}^{-2}$  (%RSD=0.34),  $353.31 \pm 1.69 \mu\text{A cm}^{-2}$  (%RSD=0.48),  $356.92 \pm 1.42 \mu\text{A cm}^{-2}$  (%RSD=0.39),  $349.48 \pm 1.77 \mu\text{A cm}^{-2}$  (%RSD=0.51) şeklindedir.

6 elektrot için % relatif standart sapma 0.94 ( $354.05 \pm 3.34 \mu\text{A cm}^{-2}$ ) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin oldukça başarılı olduğunu kanıtlamaktadır.

#### **5.4 Aljinat-CuO-GOD Biyosensörün Kullanım Süresi**

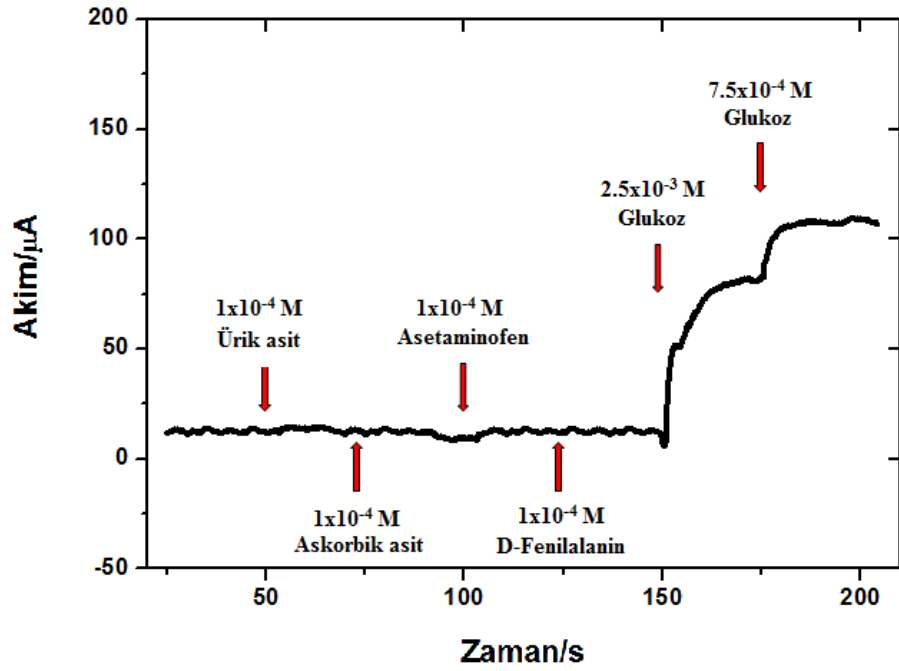
Aljinat-CuO-GOD elektrodun kullanım süresinin araştırılması amacıyla yapılan çalışmada 3 elektrot hazırlanmış ve bu elektrotlarla 15 gün boyunca hergün 40 mM glukoz ilave edilerek 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında +0.65 V'da birer amperometrik ölçüm alınmıştır. Her kullanım sonrası elektrotlar pH 6.5 fosfat tamponu ile yıkanarak buzdolabında +4 °C'de muhafaza edilmişlerdir. Yapılan çalışmada elde edilen akım yoğunluklarının ortalamaları günlere karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.9) ve amperometrik yanıtlardaki azalma değerlendirilerek kullanım süresi belirlenmiştir. Geliştirilen biyosensör 2, 4, 6 ve 10. günlerde alınan ölçümlerde ilk güne oranla aktivitesinin, sırasıyla %98, %97, %93 ve %86'sını korumuştur. 15. günde alınan ölçümde biyosensörün kalan aktivitesi %78 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki CuO nanopartiküller yüzey alanını artırarak GOD enziminin aljinata immobilize edilmesi için oldukça uygun bir ortam sağlamakla beraber mekanik dayanıklılığı da artırmışlardır. Böylece immobilize enzim aktivitesini uzun süre korumuştur.



Şekil 5.9 Aljinat-CuO-GOD biyosensörün kullanım süresi

### 5.5 Girişim Yapan Türlerin Aljinat-CuO-GOD Biyosensör Cevabına Etkisi

Geliştirilen aljinat-CuO-GOD biyosensöre kanda bulunabilen ürik asit, askorbik asit, asetaminofen, ve fenilalenin gibi türlerin girişim etkisi araştırılmıştır. Amperometrik ölçümlerde hazırlanan aljinat-CuO-GOD biyosensörlerin kararlı-hal akımına ulaşması için beklenmiş ardından hücre içi konsantrasyonları  $1 \times 10^{-4}$  M olacak şekilde sırasıyla ürik asit, askorbik asit, asetaminofen, ve fenilalenin eklenmiştir. Şekil 5.10'da görüldüğü gibi eklenen türler geliştirilen biyosensörde kaydadeğer bir akım yoğunluğu oluşturmamışlardır. Çalışmada ilave edilen glukoz konsantrasyonundan elde edilen akım yoğunluğu kalibrasyon eğrisiyle kıyaslanmıştır ve girişim yapan türlerin glukoz cevabına etkisi %3.20 ve %2.70 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.10 Girişim etkisi

Ayrıca hücre içinde 2.5 mM glukoz konsantrasyonu sağlandıktan sonra hücreye girişim yapan türlerin ilave edilmesinin ardından elde edilen akım yoğunluklarından % girişim değerleri hesaplanmıştır.

Çizelge 5.1 Girişim etkisinin incelenmesi (0.05 M, pH 6.5 fosfat tamponu, 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında)

Girişim etkisi araştırılan elektroaktif bileşen	Hücre içi konsantrasyonu (M)	Girişim (%)
Ürik asit	$1 \times 10^{-4}$	4,8
Askorbik asit	$1 \times 10^{-4}$	2,37
Asetaminofen	$1 \times 10^{-4}$	3,42
Fenilalanin	$1 \times 10^{-4}$	5,1

%Girişim hesaplamaları aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\%girişim = \frac{I_{glukoz} - I_x}{I_{glukoz}} \times 100\%$$

Eşitlikte;  $I_{glukoz}$ , aljinat-CuO-GOD elektrotla 2.5mM glukoz varlığında elde edilen akım yoğunludur.  $I_x$ , girişim yapan türün amperometrik ölçüm sonucu oluşturduğu akım yoğunluğudur.

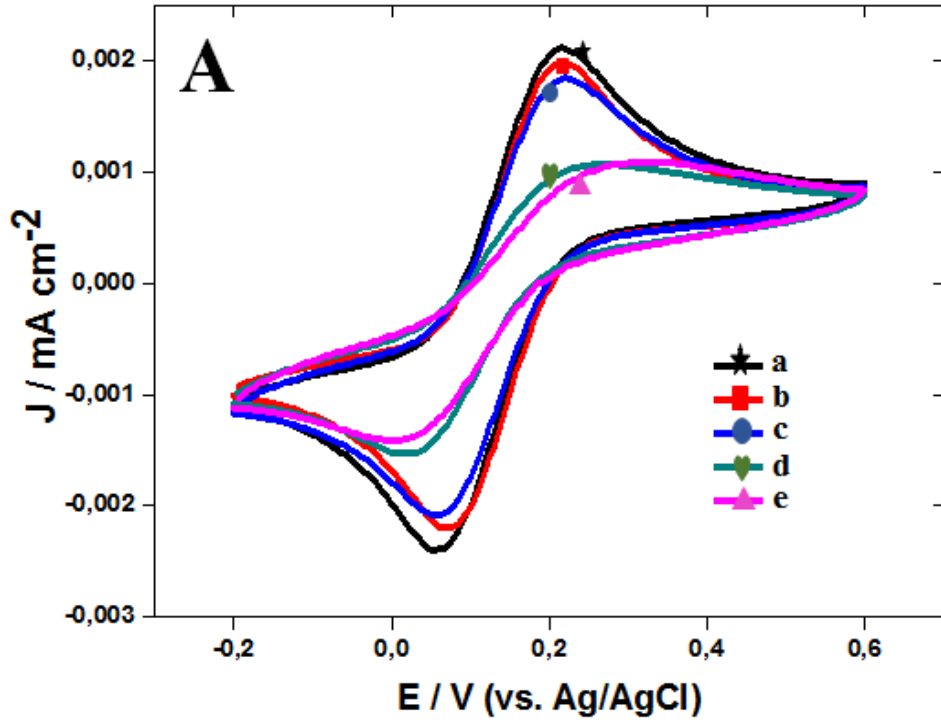
Hesaplanan veriler çizelgede verilmiştir. Elde edilen veriler girişim etkisi yapabilecek olan ürik asit, askorbik asit, asetaminofen, ve fenilalenin gibi türlerin önemli sayılabilecek bir girişim etkisi olmadığını göstermiştir.

## 5.6 Geliştirilen Biyosensörün Elektrokimyasal Davranışı

### 5.6.1 Döngüsel voltametri (CV)

Biyosensörün arayüz kinetik bariyerinin incelenmesi amacıyla ferrosiyanür sisteminin döngüsel voltametrisinin çalışılması oldukça detaylı sonuçlar vermektedir. Elektron transferinin kinetik olarak engellenmesi artan kalınlıkla ve bariyerin azalan kusurlu yoğunluğu ile artar (Yu vd. 2010). Bu nedenle biyosensörün her immobilizasyon basamağında elektrokimyasal davranışları gözlemlemek için döngüsel voltametri kullanılmıştır. CV'ler 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında alınmıştır. Yapılan çalışmada tarama hızı  $100 \text{ mV s}^{-1}$ 'dir.

Şekil 5.11'da çıplak Pt elektrodun (a), aljinat-CuO nanokompozit kaplı elektrodun (b), aljinat modifiye Pt elektrodun (c), aljinat-CuO-GOD film kaplı elektrodun (d) ve aljinat-GOD film kaplı elektrodun (e) dönüşümlü voltamogramları verilmiştir.



Şekil 5.11 Biyosensörün dönüşümlü voltamogramı

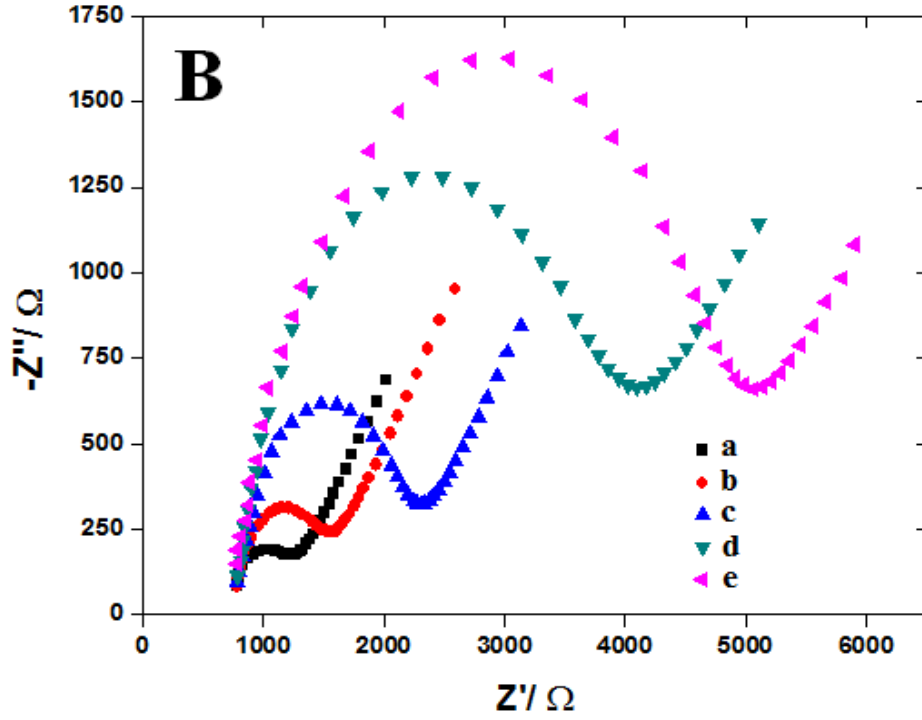
Çıplak Pt elektrottan geçen akım yoğunluğu yaklaşık olarak  $0.0021 \text{ mA.cm}^{-2}$  iken aynı elektrot aljinat ile modifiye edildiğinde elde edilen akım yoğunluğu  $0.0018$  değerine inmiştir. Bu azalma aljinatın başarılı bir şekilde elektrot yüzeyine immobilize edildiğini kanıtlamaktadır. Ancak azalmanın sayısal değerinin fazla olmaması hala çözelti ile elektrot yüzeyi arasında bir miktar elektron aktarımı olduğunu göstermektedir. Aljinat film CuO nanopartiküllerle modifiye edildiğinde elektrottan geçen yük yoğunluğunda artış gözlenmiştir. Bu durum nanopartiküllerin elektron aktarımını desteklediğini göstermektedir. Aljinat filme GOD enzimi immobilize edildiğinde elektrottan geçen yük yoğunluğu oldukça azalmıştır. Elektron aktarımında meydana gelen bu azalma GOD'un aljinat filme başarılı bir şekilde homojen olarak immobilize edildiğini ve sonuçta GOD'un varlığında ekstra bir direnç oluştuğunu kanıtlamaktadır. GOD immobilize aljinat film CuO nanopartikülleri ile modifiye edildiğinde elektron aktarımındaki artış nanopartiküllerin elektron aktarımını desteklediklerini ve yüzey alanını artırarak GOD immobilizasyonu için uygun bir çevre yarattıklarını göstermektedir. Dönüşümlü voltametriden elde edilen sonuçlar şekil 5.1'de gösterilen SEM mikrograflarını ve şekil 5.2 de gösterilen FT-IR spektrumlarını destekler yöndedir.

Anaodik ve katodik pik potansiyelleri kullanılarak hesaplanan formal potansiyeller ( $E'_0 = (E_{p,a} + E_{p,c})/2$ ) aljinat ve aljinat-GOD elektrotlar için sırasıyla 142 mV ve 137 mV olarak hesaplanmıştır. CuO ilave edildiğinde aljinat-GOD elektrodun voltametrik pik akımı artmış ve formal potansiyeli azalmıştır (119 mV). Hesaplanan pik ayrımları ( $\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c}$ ) aljinat ve aljinat-GOD elektrotlar için sırasıyla 144 mV ve 234 mV'dur. CuO ilavesiyle aljinat ve aljinat-GOD film elektrotların voltametrik pik değeri artarken, pik ayrımları azalmıştır, sırasıyla 129 mV ve 179 mV. Azalan pik ayrımı nanobiyokompozit modifiye elektrotta hızlı elektron transferinin meydana geldiğinin bir göstergesidir (Zuo vd. 2008, Palanisamy vd. 2014).

### 5.6.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS)

EIS modifiye elektrot yüzeylerinin karakteristiklerinin incelenmesi için oldukça uygun elektrokimyasal bir yöntemdir. Bu nedenle biyosensörün her immobilizasyon basamağında yüzey karakteristiklerini gözlemlemek için Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi kullanılmıştır. EIS'ler 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  varlığında alınmıştır.

Şekil 5.12'da çıplak Pt elektrodun (a), aljinat-CuO nanokompozit kaplı elektrodun (b), aljinat modifiye Pt elektrodun (c), aljinat-CuO-GOD film kaplı elektrodun (d) ve aljinat-GOD film kaplı elektrodun (e) impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği verilmiştir.



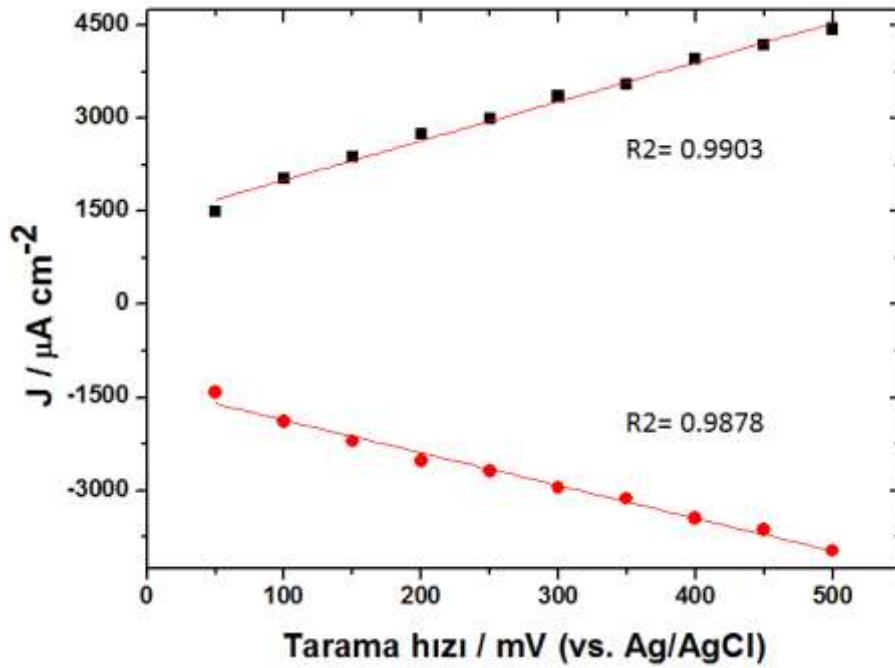
Şekil 5.12 Biyosensörün impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği

Pt elektrodun yüzeyi aljinat ile kaplandıktan sonra yük transfer direnci  $1632 \Omega$ 'dan  $1735 \Omega$ 'a artmıştır. Bu artış aljinatın elektrot yüzeyini kapladığını ve yalıtkan etkisini göstermektedir. Aljinat filmin CuO nanopartiküllerle modifiye edilmesiyle yük transfer direnci  $1735 \Omega$ 'den  $1685 \Omega$ 'e düşmüştür. Bu durum nanopartiküllerin yüzey alanını arttırması ve elektron transferini desteklemesini kanıtlamaktadır. Aljinat-GOD filmin Pt elektrot yüzeyine immobilizasyonu ile yük transfer direnci  $1735 \Omega$ 'den  $2204 \Omega$ 'e yükselmiştir. Bu artış GOD'ın elektrot yüzeyinde harici bir bariyer oluşturarak direnci artırdığını ve başarılı bir şekilde elektrot yüzeyine immobilize edildiğini açıkça göstermektedir. Aljinat-GOD film CuO nanopartiküllerle modifiye edildiğinde ise nanopartiküllerin yüzey alanı arttırıcı ve elektron transferini destekleyici özelliklerinden dolayı yük transfer direncinde bir azalma görülmüştür ( $1994 \Omega$ ). Elde edilen veriler SEM görüntüleri, FT-IR spektrumları ve CV voltamogramları ile birebir örtüşmektedir.

### 5.6.3 Tarama hızı çalışması

Tarama hızı çalışmasında 3 farklı sistemle çalışılmıştır. CV'ler aljinat-CuO-GOD elektrotla 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında ve yokluğunda; aljinat- GOD elektrotla 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında 0.1 M KCl içerisinde 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 ve 500  $\text{mVs}^{-1}$  şeklinde farklı tarama hızlarında alınmıştır.

#### 5.6.3.1 Aljinat-CuO-GOD elektrodun $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$ varlığında tarama hızı çalışması



Şekil 5.13 Aljinat-CuO-GOD elektrodun değişen tarama hızına karşı elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının lineer grafiği (5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında)

Şekil 5.13'den açıkça anlaşıldığı gibi redoks pik akımları artan tarama hızı ile doğrusal olarak artmaktadır. Anodik pik için;  $I_{p_a}/\mu\text{A} = (1375.333 \pm 68.656) + (6.322 \pm 0.221)\text{v/mV s}^{-1}$ , eğim;  $(6.322 \pm 0.221) \mu\text{A (V s}^{-1})^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Katodik pik için;  $I_{p_c}/\mu\text{A} = - (1335.6 \pm 64.441) - (5.277 \pm 0.208)\text{v/mV s}^{-1}$ , eğim;  $-(5.277 \pm 0.208) \mu\text{A (V s}^{-1})^{-1}$  olarak belirlenmiştir.

GOD'ın elektron-transfer sabiti ( $k_s$ ) ve elektron-transfer katsayısı ( $\alpha_s$ ) Laviron teorisine göre hesaplanmıştır (Laviron 1979):

$$E_{pc} = E^0 + \frac{RT}{\alpha s n F} - \frac{RT}{\alpha s n F} \ln v$$

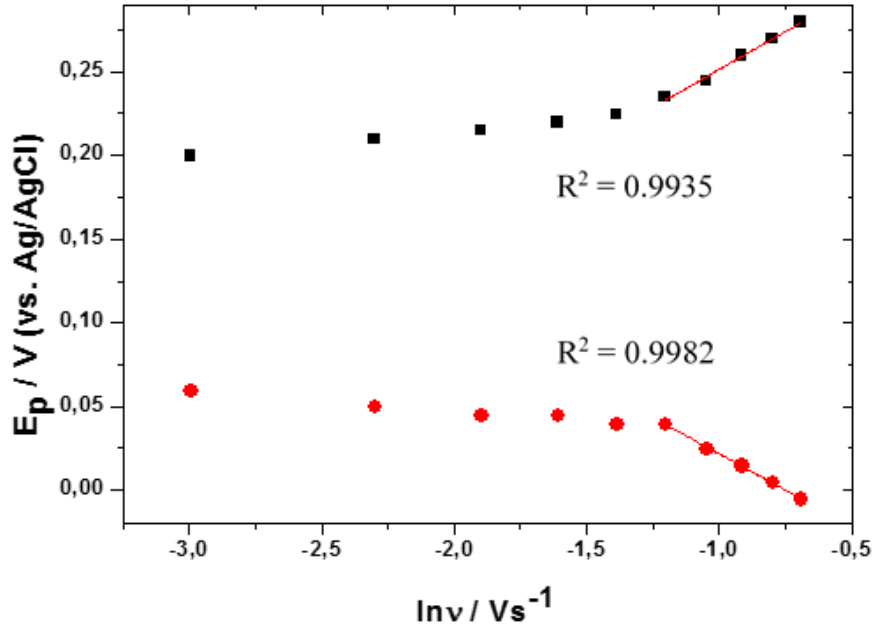
$$E_{pa} = E^0 + \frac{RT}{(1 - \alpha s) n F} - \frac{RT}{(1 - \alpha s) n F} \ln v$$

Denklemdede; n elektron sayısı, R gaz sabiti (R=8.314 Jmol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>), T sıcaklık (T= 298 K) ve F Faraday sabitidir (F= 96493 C mol<sup>-1</sup>).

Tarama hızı çalışmalarından elde edilen E<sub>pa</sub> ve E<sub>pc</sub> değerleri tarama hızlarının doğal logaritma (ln) değerlerine karşı grafiğe geçirildiğinde yüksek tarama hızı değerlerinde sırasıyla eğimleri RT/(1-α)nF ve -RT/αnF olan iki doğrusal eğri elde edilir (Şekil 5.14).

Laviron teorisine göre elektrotların kinetik parametreleri anodik ve katodik pik potansiyellerine bağlı olarak potansiyel tarama hızından hesaplanabilir. Eğer nΔE<sub>p</sub>>200 mV ise, heterojen elektron-transfer oranı sabiti (k<sub>s</sub>) Laviron'un aşağıdaki eşitliğinden hesaplanmaktadır (Song vd. 2012):

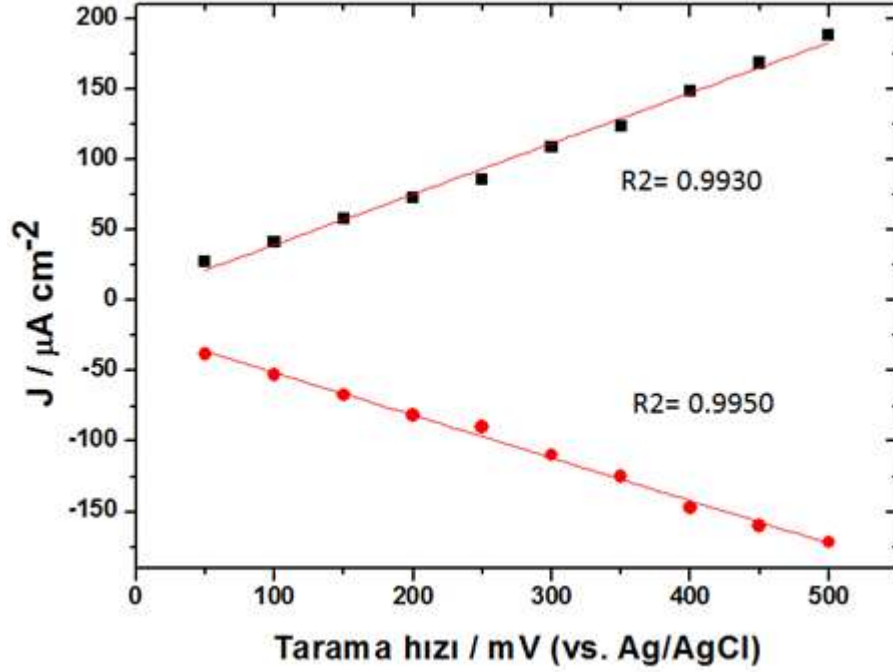
$$k_s = \frac{\alpha n F v}{RT}$$



Şekil 5.14 Aljinat-CuO-GOD elektrot için tarama hızının doğal logaritmasına ( $\ln v$ ) karşı pik potansiyelleri ( $E_{pa}$ ,  $E_{pc}$ ) grafiği (5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında)

Elde edilen doğrusal grafiğin denklemi anodik pik için;  $E_{pa}/V = (0.342 \pm 0.004) + (0.090 \pm 0.042) \ln v/Vs^{-1}$  ve eğimi  $(0.090 \pm 0.042) V (Vs^{-1})^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Katodik pik için;  $E_{pc}/V = -(0.065 \pm 0.002) - (0.086 \pm 0.021) \ln v/Vs^{-1}$  ve eğimi  $-(0.086 \pm 0.021) V (Vs^{-1})^{-1}$  şeklindedir. Böylece; aljinat-CuO-GOD elektrot için 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında yapılan tarama hızı çalışmasından  $k_s$  ve  $\alpha$  değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen değerler;  $k_{sa} = 6.675 s^{-1}$ ,  $\alpha_a = 0.857$  ve  $k_{sc} = 1.161 s^{-1}$ ,  $\alpha_c = 0.149$  şeklindedir. Sonuçlar göstermektedir ki CuO nanopartikülleri ile modifiye edilen aljinat matris GOD enziminin redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında elektrot transferini desteklemekte ve  $k_s$  değerini sayısal olarak artırmaktadır. Bu durum nanopartiküllerin yüzey alanını artırıcı özelliğinin ve elektron transferini desteklemelerinin bir sonucudur (Kang vd. 2009, Emregül vd. 2013). Elde edilen veriler literatürle kıyaslandığında;  $k_{sa} = 6.675 s^{-1}$  değeri GOD-grafen-kitosan modifiye elektrot için hesaplanan  $k_{sa} = 2.83 s^{-1}$ 'den (Kang vd. 2009) ve kafes-benzeri PbS nanoyapıya immobilize GOD biyosensörü için hesaplanan  $k_{sa} = 2.85 s^{-1}$ 'den (Li vd. 2014) büyüktür.

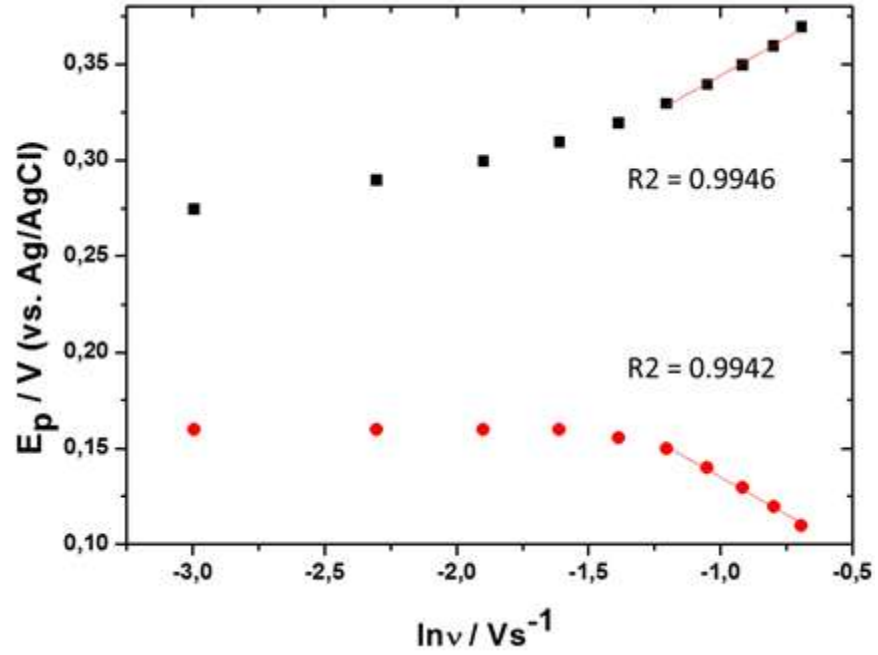
### 5.6.3.2 Aljinat-CuO-GOD elektrodun $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$ yokluğunda tarama hızı çalışması



Şekil 5.15 Aljinat-CuO-GOD elektrodun değişen tarama hızına karşı elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının lineer grafiği (5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  yokluğunda)

Aljinat-CuO-GOD elektrodun tarama hızı çalışması 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  kullanılmadan çalışılmıştır ve elde edilen pik akımları tarama hızına karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.15). Anodik pik için grafikten elde edilen denklem;  $I_{p_a}/\mu\text{A} = (3.684 \pm 3.316) + (0.359 \pm 0.011)v/\text{mV s}^{-1}$  ve eğim;  $(0.359 \pm 0.011) \mu\text{A (V s}^{-1})^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Katodik pik için grafikten elde edilen denklem;  $I_{p_c}/\mu\text{A} = -(20.827 \pm 2.359) - (0.303 \pm 0.008)v/\text{mV s}^{-1}$  ve eğim;  $-(0.303 \pm 0.008) \mu\text{A (V s}^{-1})^{-1}$  olarak hesaplanmıştır.

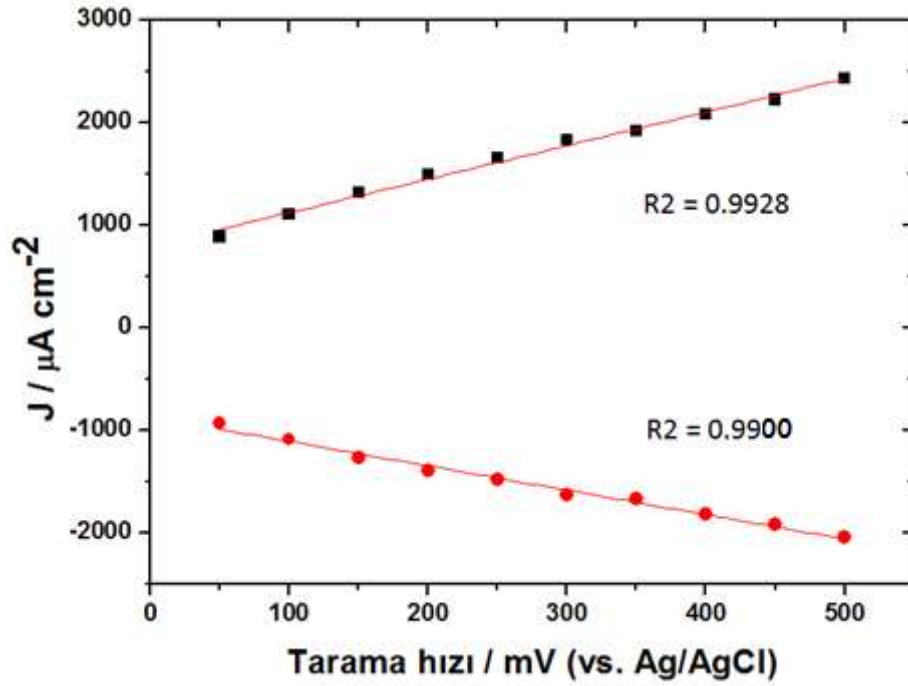
Aljinat-CuO-GOD elektrodun  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  kullanılmadan çalışılan tarama hızı verilerinden elde edilen  $E_{pa}$  ve  $E_{pc}$  değerleri tarama hızlarının doğal logaritma ( $\ln$ ) değerlerine karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.16).



Şekil 5.16 Aljinat-CuO-GOD elektrot için tarama hızının doğal logaritmasına ( $\ln v$ ) karşı pik potansiyelleri ( $E_{pa}$ ,  $E_{pc}$ ) grafiği (5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  yokluğunda)

Elde edilen doğrusal grafiğin denklemi anodik pik için;  $E_{pa}/V = (0.422 \pm 0.003) + (0.078 \pm 0.003) \ln v / \text{Vs}^{-1}$  ve eğimi  $(0.078 \pm 0.003) \text{ V} (\text{Vs}^{-1})^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Katodik pik için;  $E_{pc}/V = (0.057 \pm 0.003) - (0.078 \pm 0.003) \ln v / \text{Vs}^{-1}$  ve eğimi  $-(0.078 \pm 0.003) \text{ V} (\text{Vs}^{-1})^{-1}$  şeklindedir. Böylece; aljinat-CuO-GOD elektrot için  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  kullanılmadan yapılan tarama hızı çalışmasından  $k_s$  ve  $\alpha$  değerleri hesaplanmıştır;  $k_{sa} = 6.512 \text{ s}^{-1}$ ,  $\alpha_a = 0.836$  ve  $k_{sc} = 1.285 \text{ s}^{-1}$ ,  $\alpha_c = 0.165$ .

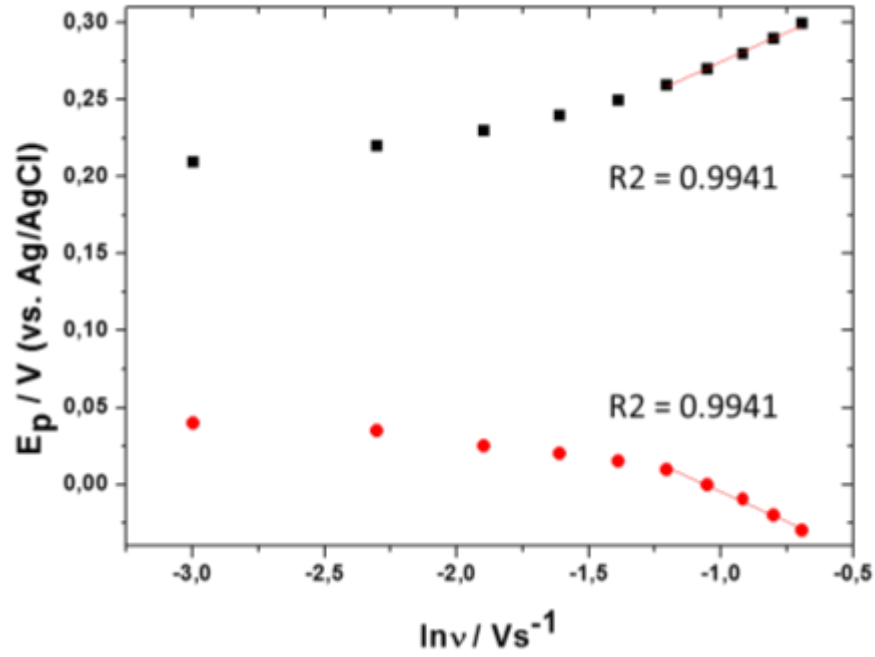
### 5.6.3.3 Aljinat- GOD elektrodun $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$ varlığında tarama hızı çalışması



Şekil 5.17 Aljinat- GOD elektrodun değişen tarama hızına karşı elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının lineer grafiği (5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında)

Aljinat-GOD elektrodun tarama hızı çalışması 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  kullanılarak çalışılmıştır ve elde edilen pik akımları tarama hızına karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.17). Anodik pik için grafikten elde edilen denklem;  $I_{p_a}/\mu\text{A} = (795.8 \pm 30.587) + (3.278 \pm 0.097)v/\text{mV s}^{-1}$  ve eğim;  $(3.278 \pm 0.097) \mu\text{A (V s}^{-1})^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Anodik pik için grafikten elde edilen denklem;  $I_{p_c}/\mu\text{A} = - (871.867 \pm 26.275) - (2.381 \pm 0.08)v/\text{mV s}^{-1}$  ve eğim;  $-(2.381 \pm 0.08) \mu\text{A (V s}^{-1})^{-1}$  olarak hesaplanmıştır.

Aljinat-GOD elektrodun  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  kullanılarak çalışılan tarama hızı verilerinden elde edilen  $E_{pa}$  ve  $E_{pc}$  değerleri tarama hızlarının doğal logaritma ( $\ln$ ) değerlerine karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.18).



Şekil 5.18 Aljinat-GOD elektrot için tarama hızının doğal logaritmasına ( $\ln v$ ) karşı pik potansiyelleri ( $E_{pa}$ ,  $E_{pc}$ ) grafiği (5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında)

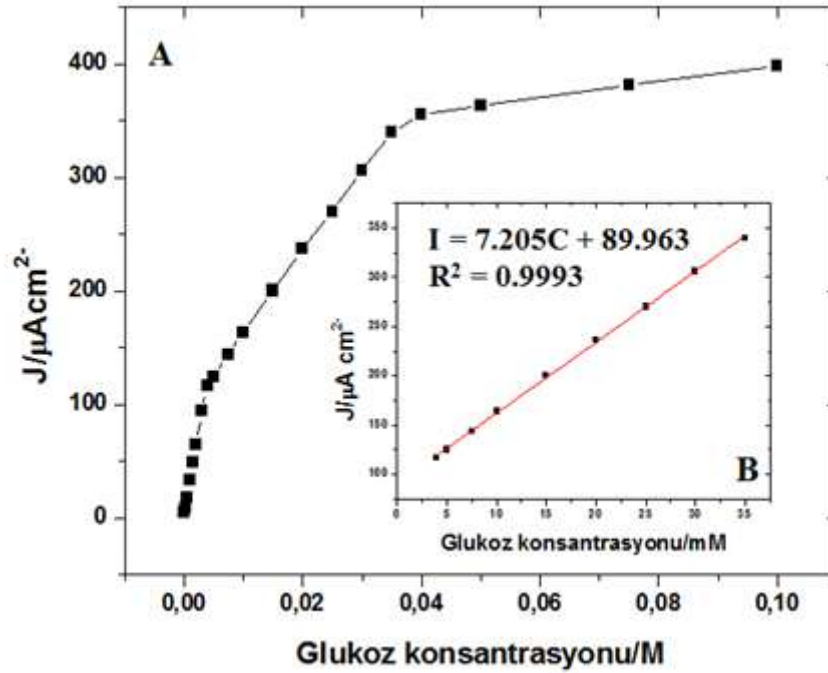
Elde edilen doğrusal grafiğin denklemi anodik pik için;  $E_{pa}/V = (0.352 \pm 0.003) + (0.078 \pm 0.003) \ln v/Vs^{-1}$  ve eğimi  $(0.078 \pm 0.003) V (Vs^{-1})^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Katodik pik için;  $E_{pc}/V = - (0.083 \pm 0.003) - (0.078 \pm 0.003) \ln v/Vs^{-1}$  ve eğimi  $-(0.078 \pm 0.003) V (Vs^{-1})^{-1}$  şeklindedir. Böylece; aljinat- GOD elektrot için  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  kullanılmadan yapılan tarama hızı çalışmasından  $k_s$  ve  $\alpha$  değerleri hesaplanmıştır;  $k_{sa} = 6.504 s^{-1}$ ,  $\alpha_a = 0.835$  ve  $k_{sc} = 1.285 s^{-1}$ ,  $\alpha_c = 0.165$ .

Elde edilen veriler kıyaslandığında CuO nanopartikül içeren çalışmalarda elde edilen  $k_s$  değerleri daha yüksektir. Bu nanopartiküllerin hem yüzey alanını artırıcı hem elektron transferini destekleyici hem de hazırlanan biyosensörde GOD immobilizasyonu için için biyoyumlu bir çevre oluşturması gibi eşsiz özelliklerinden kaynaklanmaktadır.

## 5.7 Kalibrasyon Grafikleri

Yapılan çalışmada farklı glukoz konsantrasyonları kullanılarak amperometrik ölçümler alınmıştır. Bu ölçümler 3 farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Aljinat-CuO-GOD elektrot ile 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında ve yokluğunda; ve Aljinat-GOD elektrot ile 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında +0.65 V'da çalışmalar yapılarak kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Nanopartiküllerin ve medyatörün algılama limitine etkisi araştırılmıştır.

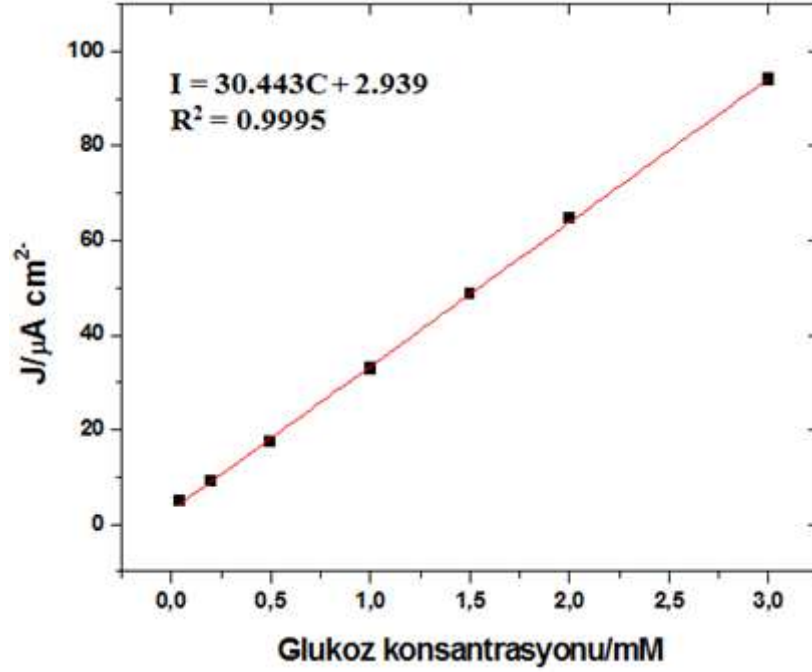
### 5.7.1 Aljinat-CuO-GOD elektrodun 0.1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$ varlığında farklı glukoz konsantrasyonlarına cevabı



Şekil 5.19 Aljinat-CuO-GOD elektrot için; A. Kalibrasyon grafiği, B. Büyük lineer aralık grafiği (0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında)

Şekil 5.19 - 5.20'de aljinat-CuO-GOD elektrodun 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında alınan amperometrik ölçümlerinden oluşturulan kalibrasyon grafiği ve belirlenen lineer aralıkların grafikleri verilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiğinden iki adet lineer aralık göstermiştir. Büyük lineer aralık için glukoz konsantrasyonu 0.004 M-0.035 M

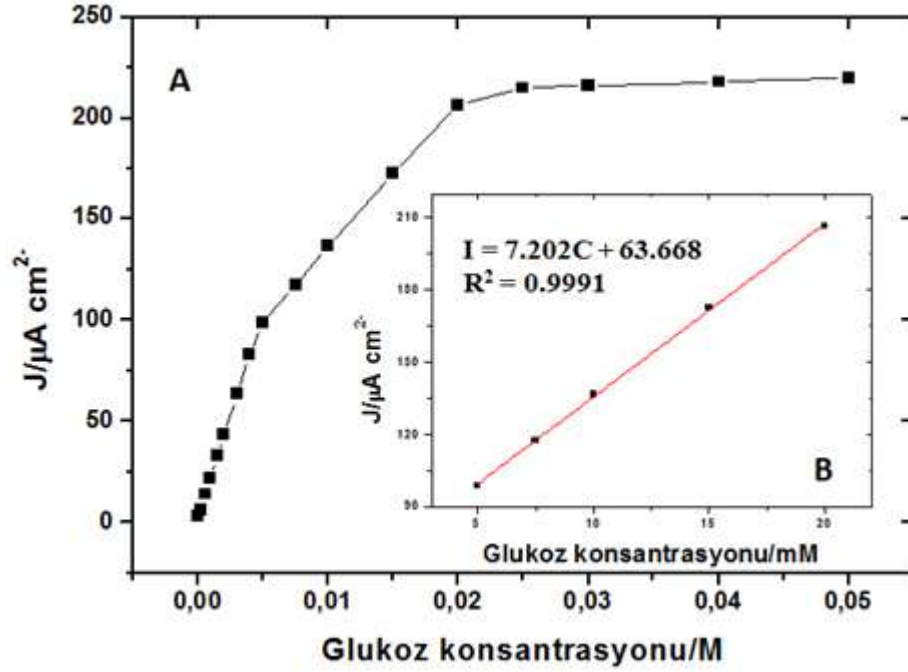
arasındadır (Şekil 5.19.b). Duyarlılığı  $(7.205 \pm 0.063) \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.20 Aljinat-CuO-GOD elektrot için küçük lineer aralık grafiği (0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında)

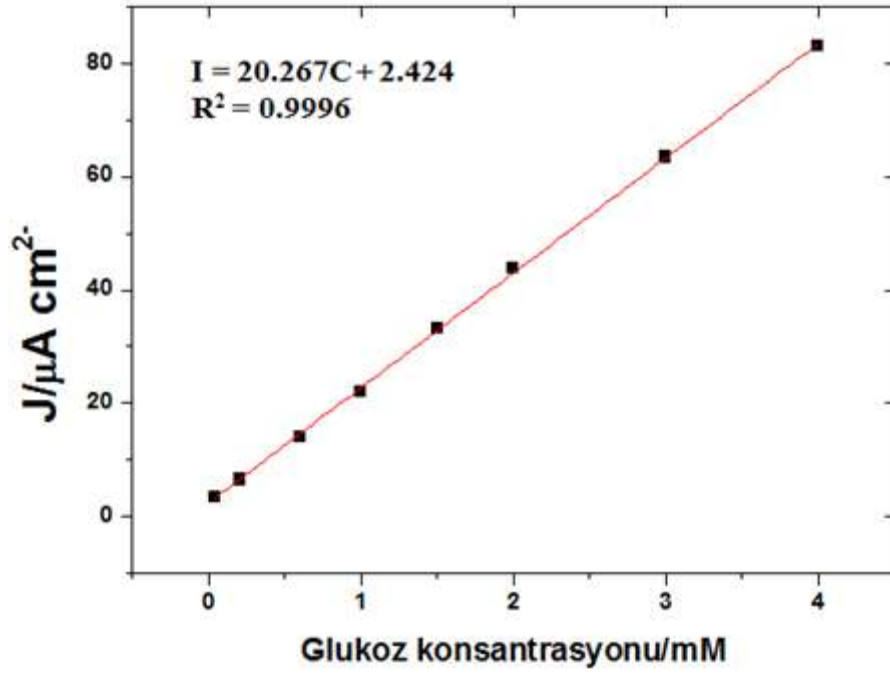
Küçük lineer aralık için glukoz konsantrasyonu 0.04 mM - 0.003 M aralığında belirlenmiştir ve  $(30.443 \pm 0.250) \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  olarak hesaplanan oldukça yüksek bir duyarlılığa sahiptir. Geliştirilen biyosensör ve yöntem için belirlenen algılama limiti 1.6  $\mu\text{M}$  olup, oldukça düşük bir değerdir (S/N=3).

### 5.7.2 Aljinat-CuO-GOD elektrodun $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$ kullanılmadan farklı glukoz konsantrasyonlarına cevabı



Şekil 5.21 Aljinat-CuO-GOD elektrot için; A. Kalibrasyon grafiği, B. Büyük lineer aralık grafiği ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  yokluğunda)

Şekil 5.21 ve 5.22’de aljinat-CuO-GOD elektrodun  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  kullanılmadan alınan amperometrik ölçümlerinden oluşturulan kalibrasyon grafiği ve belirlenen lineer aralıkların grafikleri verilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiğinden iki adet lineer aralık göstermiştir. Büyük lineer aralık için glukoz konsantrasyonu 0.005 M-0.02 M arasındadır (Şekil 5.21.B). Duyarlılığı  $(7.202 \pm 0.106) \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  olarak hesaplanmıştır.



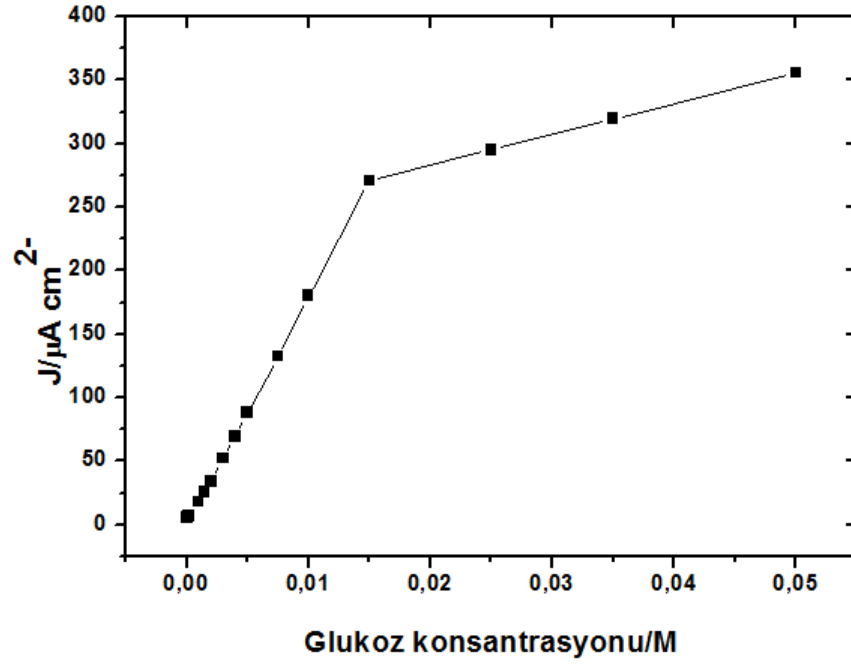
Şekil 5.22 Aljinat-CuO-GOD elektrot için küçük lineer aralık grafiği ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  yokluğunda)

Küçük lineer aralık için glukoz konsantrasyonu 0.04 mM-0.004 M aralığında belirlenmiştir ve  $(20.267 \pm 0.138) \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  olarak hesaplanan oldukça yüksek bir duyarlılığa sahiptir. Geliştirilen biyosensör ve yöntem için belirlenen algılama limiti 8  $\mu\text{M}$  şeklinde oldukça düşük bir değerdir (S/N=3).

Elde edilen sonuçlar kıyaslandığında; düşük lineer aralık için duyarlılıkta ve algılama limitinde medyatörlü çalışmaya oranla düşüş gözlenmiştir. Redoks probu yapılan çalışmalarda amplifikasyonu sağlayarak elde edilen akım değerlerinin kesinliğini arttırmaktadır. Dolayısıyla GOD enzimi ile glukoz arasında gerçekleşen reaksiyon sonucu açığa çıkan elektronların elektrota iletilmesinde  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  sistemi oldukça iyi bir aracı olduğunu kanıtlamıştır.

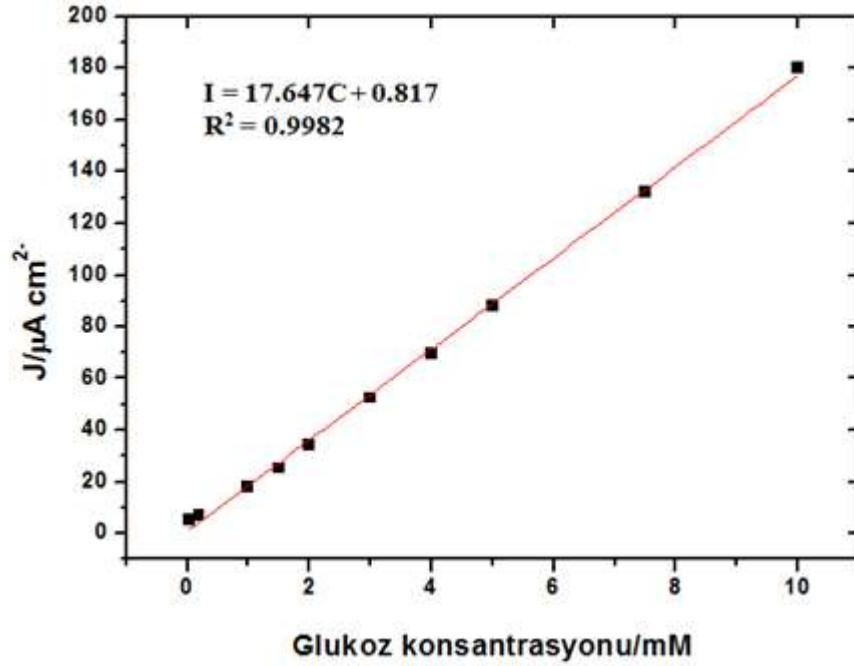
### 5.7.3 Aljinat-GOD elektrodun 0.1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$ varlığında farklı glukoz konsantrasyonlarına cevabı

Şekil 5.23'da aljinat- GOD elektrodun 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$  varlığında alınan amperometrik ölçümlerinden oluşturulan kalibrasyon grafiği ve şekil 5.24'de belirlenen lineer aralık grafiği verilmiştir.



Şekil 5.23 Aljinat-GOD elektrodun kalibrasyon grafiği (0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$  varlığında)

Belirlenen lineer aralık için glukoz konsantrasyonu 0.04 mM-0.01 M arasındadır. Duyarlılığı  $(17.647 \pm 0.243) \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$  olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen biyosensör ve yöntem için belirlenen algılama limiti 1.6  $\mu\text{M}$  şeklinde oldukça düşük bir değerdir (S/N=3).



Şekil 5.24 Aljinat-GOD elektrot için lineer aralık grafiği (0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-3-}]$  varlığında)

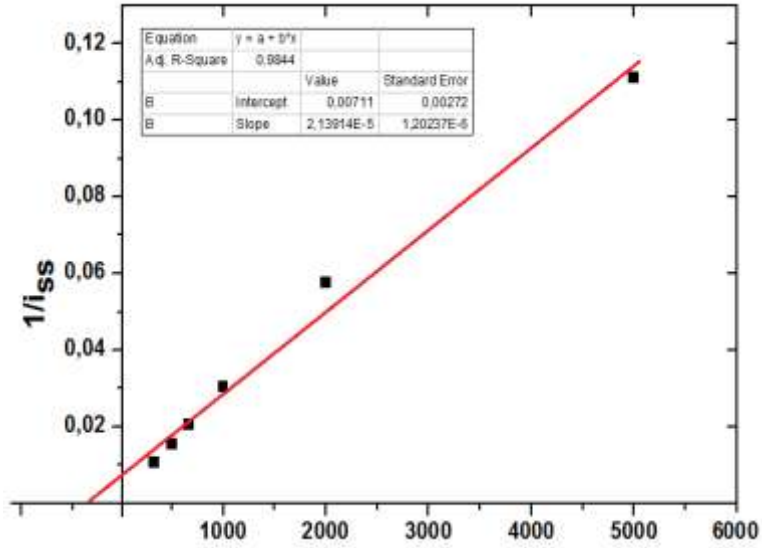
Elde edilen sonuçlar kıyaslandığında CuO nanopartiküllerin biyosensör duyarlılığını artırıcı etkisi açıkça görülmektedir. Enzim immobilizasyonunda en önemli faktörlerden biri enzim redoks merkezinin immobilizasyon sürecinde bu işlemde olumsuz etkilenmemesidir. Yapılan çalışmada nanopartiküllerin yüzey alanını artırarak geliştirilen biyosensörde GOD'ın immobilizasyonu ve aktivitesi için uygun ortamı sağladıkları açıkça görülmektedir. Ayrıca elektron aktarımına olumlu etkisi de biyosensörün hem duyarlılığını artırmış hem de algılama limitinde düşüşü sağlamıştır.

#### 5.7.4 Lineweaver-Burk grafiği

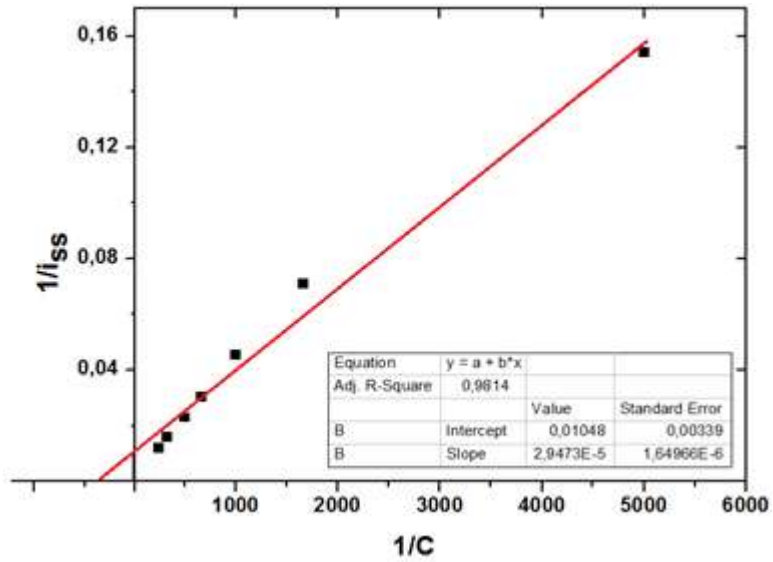
Michaelis-Menten sabiti ( $K_m^{app}$ ), enzimatik afinitenin bir kanıtıdır ve Lineweaver-Burk eşitliğinden hesaplanır;

$$\frac{1}{i_{ss}} = \frac{K_m^{app}}{i_{max}} \frac{1}{C} + \frac{1}{i_{max}}$$

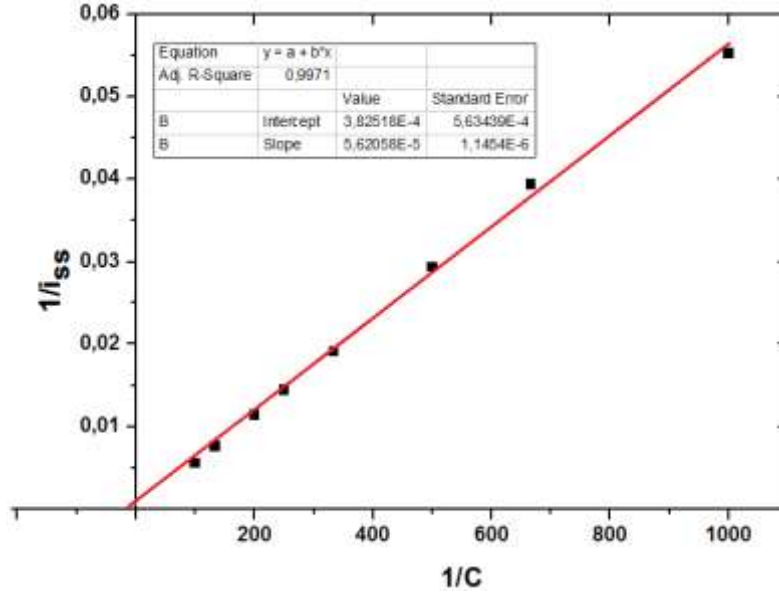
Denklemden  $i_{ss}$  substrat ilavesinden sonra elde edilen kararlı-hal akımını,  $i_{max}$  doygun substrat konsantrasyonunda ölçülen maksimum akımı ve  $C$  substrat konsantrasyonunu ifade etmektedir. Akım yoğunluğunun tersi ( $1/i_{ss}$ ), substrat konsantrasyonunun tersi ( $1/C$ )'ne karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim  $K_m^{app}/i_{max}$  değerini verir.



Şekil 5.25 Aljinat-CuO-GOD elektrodun Lineweaver-Burk grafiği (0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-3-}]$  varlığında)



Şekil 5.26 Aljinat-CuO-GOD elektrodun Lineweaver-Burk grafiği (0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-3-}]$  yokluğunda)



Şekil 5.27 Aljinat-GOD elektrodun Lineweaver-Burk grafiği (0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında)

Elde edilen grafiklerin denklemlerinden  $K_m$  değerleri hesaplanmıştır. Lineweaver-Burk grafiğinden Aljinat-CuO-GOD elektrodun (0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında), Aljinat-CuO-GOD elektrodun ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  yokluğunda) ve Aljinat-GOD elektrodun (0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında) belirlenen  $K_m$  değerleri sırasıyla 2.82 mM, 2.86 mM ve 0.15 M'dir. Azalan  $K_m$  değeri enzimin substrat ilgisinin arttığına bir kanıttır. Elde edilen değerler kıyaslandığında redoks probu varlığında CuO modifiye elektrot için hesaplanan 2.82 mM  $K_m$  değeri en düşük olmaktadır. Literatür ile kıyaslandığında; bu değer ince nanosheets'lerle bütünleştirilmiş çiçek-şekilli CuO nano yapılı temeline dayandırılan sensör için hesaplanan 8.7 mM  $K_m$  değerinden (Umar vd. 2009) ve çok katmanlı kitosan-altın nanopartikül temelli sensör için hesaplanan 10.5 mM  $K_m$  değerinden (Wu vd. 2007) oldukça küçüktür.

### 5.8 Geliştirilen Aljinat-CuO-GOD Biyosensörün 0.1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$ Varlığında ve Yokluğunda Amperometrik Olarak İnsan Kan Serumu İle Denenmesi

Serum çalışması amacıyla Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden 3 farklı konsantrasyonda kan serumu alınmıştır. Alınan serumların hücre içi konsantrasyonları çalışılacak kalibrasyon grafiğinin lineer aralığında kalacak şekilde seyreltilmiştir. İki adet Aljinat-CuO-GOD elektrot hazırlanmış ve konsantrasyonu ayarlanan serumlarla

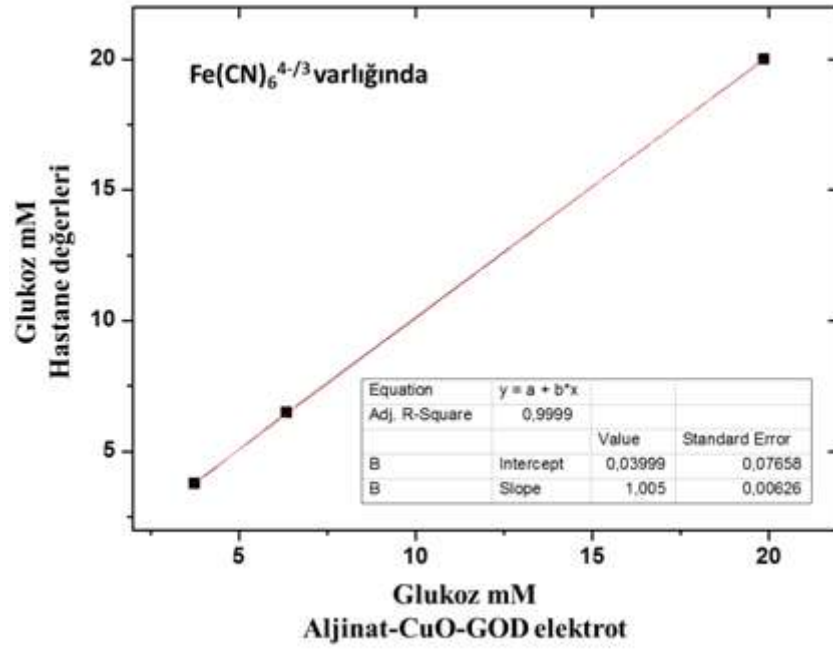
0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında ve yokluğunda amperometrik ölçüm alınmıştır. Her serum numunesiyle alınan ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen akım yoğunlukları belirlenerek her kalibrasyon grafiğinin denkleminde karşılık gelen konsantrasyonlar hesaplanmış ve hastane sonuçlarıyla kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 5.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 5.2 Serum çalışması

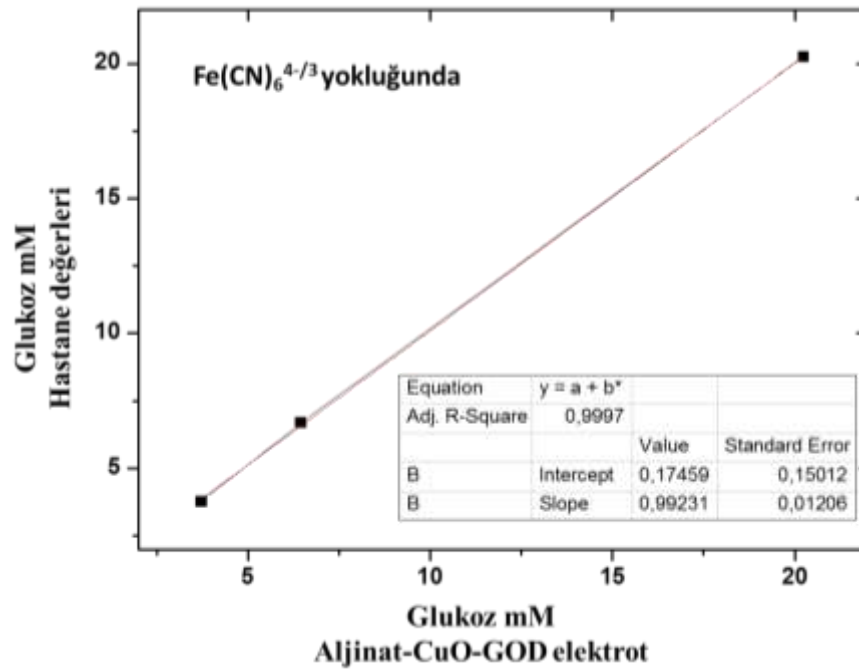
Numune	Hastane sonucu	Biyosensör sonucu * (mM)		RSD (%)		Relatif hata (%)		Kazanım (%)	
		a	b	a	b	a	b	a	b
1	3,77	3.76 ± 0.02	3,72 ± 0.15	0,53	4,03	0,27	0,03	99,7	98,7
2	6,49	6,36 ± 0.14	6,45 ± 0.14	2,18	2,17	2,00	0,62	97,9	99,4
3	20,00	19,87 ± 0,46	20,24 ± 0.19	2,3	0,94	0,65	1,2	99,4	101

\* Değerler 3 ölçümün ortalamasıdır.  
a Aljinat-CuO-GOD elektrot ile 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında alınan ölçümler  
b Aljinat-CuO-GOD elektrot ile  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  kullanılmadan alınan ölçümler

Hazırlanan aljinat-CuO-GOD elektrotla redoks probu varken ve yokken alınan amperometrik ölçümlerden elde edilen glukoz konsantrasyonları, hastane verilerine karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil. 28 ve Şekil. 29). Her iki biyosensör sisteminden elde edilen veriler ile hastane verilerinin uyumlu olduğu ve değerlerin birbirine çok yakın olduğu gözlenmiştir. Elde edilen grafiklerin regresyon katsayıları 0.9999 ve 0.9997 olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.28 Aljinat-CuO-GOD elektrotla redoks probu kullanılarak elde edilen değerler ile hastane değerlerinin uyumluluğu



Şekil 5.29 Aljinat-CuO-GOD elektrotla redoks probu kullanılmadan elde edilen değerler ile hastane değerlerinin uyumluluğu

## 6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada glukoz tayini için spesifik, duyarlı, hızlı ve kolay sonuç verecek GOD biyosensörünün geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaca yönelik olarak, GOD immobilizasyonu için aljinat ve CuO nanopartikülleri ile modifiye edilmiş aljinat matrisleri kullanılmıştır. GOD enziminin taşıyıcı matrislere immobilizasyonu NHS/EDC çapraz bağlayıcıları ile sağlanmıştır.

Tez çalışmasında öncelikle biyosensörün geliştirilmesine yönelik optimizasyon çalışmaları yapılarak her parametre için optimum değerler belirlenmiş ve uygun çalışma koşulları amperometrik ölçümler ile araştırılmıştır. Bu çalışma kapsamında; taşıyıcı matrisin miktarı, enzim konsantrasyonu, çapraz bağlayıcıların oranı, nanopartikül miktarı optimize edilmiştir. Çalışma için optimum pH belirlenmiştir. Optimum koşullar sağlandıktan sonra aljinat, aljinat-CuO, ve aljinat-CuO-GOD filmlerin SEM görüntüleri alınarak yüzey morfolojileri fiziksel olarak incelenmiştir. GOD immobilizasyonunun başarısı FT-IR spektrumları çalışılarak kanıtlanmıştır. Daha sonra EIS ve CV ile immobilizasyon basamakları çalışılmış ve biyosensörün elektrokimyası incelenmiştir. Döngüsel voltametri kullanılarak yapılan tarama hızı çalışmalarında CuO nanopartiküllerin ve redoks probunun etkisi çalışılmıştır.  $k_s$  ve  $\alpha$  değerleri hesaplanarak bu etki sayısal olarak açıklanmıştır. Yine aynı şekilde nanopartikül ve redoks probunun kalibrasyon eğrisine etkisini araştırmak üzere amperometrik çalışmalar yapılmış ve  $K_m$  değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen kalibrasyon grafiklerinden algılama limiti belirlenmiştir. Geliştirilen biyosensör çeşitli türlerin girişim etkisi araştırıldıktan sonra, konsantrasyonu hastane tarafından belirlenen insan kan serumlarında denenmiştir. Son olarak tekrar üretilebilirlik ve kullanım süresi gibi parametreler çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır.

Öncelikle taşıyıcı matrisin optimum miktarının belirlenmesi için farklı miktarlarda aljinat matris içeren ( $0.5 \times 10^{-4} - 4 \times 10^{-4}$  g) elektrotlar hazırlanmıştır. Yapılan çalışmada GOD immobilizasyonu için en uygun taşıyıcı miktarı olarak  $1.5 \times 10^{-4}$  g belirlenmiştir. Düşük miktarda aljinat içeren filmlerde GOD enzimi için yeterli bağlanma kapasitesi sağlanamadığından düşük amperometrik yanıtlar alınmıştır.

Yüksek miktarda ise aljinatın oluşturduğu yığın kütle yeterli şişme kapasitesi gösterememiştir. Sonuçta gözenek boyutlarında küçülmeye sebep olan bu yığılma difüzyonu engelleyerek düşük sinyal alımına sebep olmuştur (Sungur vd. 2004, Emregül 2005 ). Yapılan literatür taramasında aljinatın %0.2 oranında (Derkus vd 2013),  $0.6 \times 10^{-4}$  g (Ionescu vd. 2005) ve  $2 \times 10^{-4}$  g (Qin vd. 2012) kullanıldığı çalışmalara rastlanmıştır. Literatürde Aljinat-CuO-GOD temelli biyosensör çalışmasına rastlanmamıştır.

GOD enzim konsantrasyonunun optimize edilmesi amacıyla 1 – 50 U aralığında enzim içeren elektrotlar hazırlanmıştır ve yapılan çalışmada optimum enzim konsantrasyonu 10U olarak belirlenmiştir. Enzim konsantrasyonunun artmasıyla taşıyıcı matriksde yığılma olmakta ve dolayısıyla tıkanan gözenekler difüzyonu engelleyerek amperometrik yanıtı düşürmektedir. Ayrıca enzimin bu kadar sık istiflenmesi konformasyonel bozukluklara neden olarak enzim aktivitesinde kayba neden olmaktadır. Literatürde  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  (Zhang vd. 2013), 18U (Lang vd. 2014), ve 5U (Kong vd. 2009) şeklinde GOD konsantrasyonlarını kullanılan çalışmalar bulunmaktadır.

GOD enziminin taşıyıcı matriks olan aljinata kovalent çapraz bağlı olarak optimum koşullarda immobilize edilebilmesi için 0.15 – 0.65 aralığında NHS/EDC molar oranları ile elektrotlar hazırlanmıştır. Alınan amperometrik ölçümler sonucu optimum çapraz bağlayıcı oranı 0.28 olarak belirlenmiştir. Düşük çapraz bağlayıcı oranlarında aljinat hem uygun formu alamadığından mekanik olarak dayanıksız filmler oluşmuştur hem de gözenek boyutlarının genişlemesinden dolayı film içerisinde substrat ve ürün birikmesi gerçekleşmiştir. Yüksek çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında ise aljinat oldukça rijit bir form alarak sıkı gözenekler oluşturmuş ve elektron aktarımını engellemiştir. Literatürde NHS/EDC çapraz bağlayıcı molar oranınının 0.2 (Lanzelotto vd. 2014), 1 (Liu vd. 2013) ve 2.5 (Shervedani ve Hatefi-Mehrjardi 2007) olduğu çalışmalar bulunmaktadır.

Geliştirilen biyosensörün immobilizasyon parametrelerinin optimizasyonu için son çalışma olarak CuO nanopartikül miktarı çalışılmıştır. Yapılan çalışmada 0.0001 - 0.0005 g aralığında farklı CuO nanopartikül miktarları içeren elektrotlar hazırlanmıştır. Amperometrik veriler sonucu optimum miktar 0.0002 g olarak belirlenmiştir. Düşük miktarda nanopartikül miktarı içeren elektrotlarda yüzey alanı yeteri kadar artmadığından düşük sinyaller alınmıştır ve nanopartikül miktarının artmasıyla polimer yüzeyinin tamamen kaplanması sonucu elektron transferi engellenmiştir. Literatürde  $5 \times 10^{-5}$  g Pt-CuO/rGO karışımının (Dhara vd. 2014) ve  $2.3 \times 10^{-5}$  g CuO nanopartiküllerinin (Yang vd. 2011) kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır.

GOD enzim aktivitesinin korunması için ortamın pH'sı oldukça önemlidir. Bu nedenle 4.5 - 8.0 pH aralığında hazırlanan tampon çözeltilerde optimize elektrotlar ile ölçüm alınmıştır. Yapılan çalışmada geliştirilen GOD temelli biyosensör için optimum çalışma ortamı pH'sı 6.5 olarak belirlenmiştir. Yapılan literatür taramasında; pH 6.2 (Nenkova vd. 2010), pH 7.4 (Xue vd. 2014) ve pH 7.5 (Şenel ve Nergiz. 2012) ortamında yapılan çalışmalara rastlanmıştır.

Geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin araştırılması amacıyla 6 adet elektrot hazırlanmıştır. Her bir elektrotla 3 kez amperometrik ölçüm alınmıştır ve elde edilen akım yoğunluklarının yakınlığı araştırılmıştır. 6 elektrot için % relatif standart sapma 0.94 ( $354.05 \pm 3.34 \mu\text{A cm}^{-2}$ ) olarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin oldukça iyi olduğunu göstermektedir. CuO nanopartikülleri ile modifiye aljinat GOD enziminin immobilizasyonu için oldukça kararlı ve homojen bir yapı sunmuştur. Bu sonuç elde edilen SEM görüntüleri ile de desteklenmektedir.

Geliştirilen biyosensörün kullanım süresinin belirlenmesi amacıyla 3 elektrot hazırlanmıştır ve 15 gün boyunca birer ölçüm alınmıştır. Geliştirilen biyosensör 2, 4, 6 ve 10. günlerde alınan ölçümlerde ilk güne oranla aktivitesinin, sırasıyla %98, %97, %93 ve %86'sını korumuştur. 15. günde alınan ölçümde biyosensörün kalan aktivitesi %78 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmalarda aljinatın oldukça kararlı bir matriks oluşturduğu ve nanopartiküllerle oldukça iyi bir nanokompozit oluşturduğu

anlaşılmıştır. Böylece GOD aktivitesi için uygun bir çevre sağlamıştır. Literatürde 1 ay sonunda kalan aktivitesi %14,6 (Guadalupe de Jesus vd. 2013), %80 (Wang vd. 2011) ve 1 hafta sonunda kalan aktivitesi % 85 (Nasri ve Shams 2013)olarak hesaplanan glukoz oksidaz biyosensörleri bulunmaktadır.

Aljinat-CuO-GOD elektrodun glukozu karşı cevabına serumda bulunabilecek ürik asit, askorbik asit,vs. gibi çeşitli elektroaktif türlerin etkisi incelenmiştir. Hesaplanan girişim etkileri ürik asit, askorbik asit, asetaminofen ve fenilalenin için sırasıyla %4.8, %2.37, %3.42 ve %5.1 şeklinde hesaplanmıştır. Hücre içerisinde girişim etkisi yapan türler varken glukoz cevabına yönelik girişim etkisi ise %3.2 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler geliştirilen biyosensörün algılama limitinden küçük akımlara tekabül ettiğinden girişim etkisinin önemsiz olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışma nanopartiküllerin girişim etkisini önemli ölçüde inhibe edebilme yeteneğini sergilemiştir (Cherevko ve Chung 2010). Literatürde yapılan bazı çalışmalarda girişim yapan türlerin etkileri incelendiğinde önemli bir etkileri olmadığı gözlenmiştir (Zhao vd. 2002, Liu vd. 2009, Fang vd. 2010).

Geliştirilen biyosensörün her immobilizasyon basamağı için ayrı elektrotlar hazırlanarak CV ve EIS çalışmaları yapılmış ve elektrokimyasal karakteristikleri araştırılmıştır. Çıplak Pt elektrot, aljinat modifiye elektrot, aljinat-CuO nanokompozit film ile kaplı elektrot, GOD immobilize aljinat elektrot ve GOD immobilize aljinat-CuO nanokompozit film kaplı elektrot bu amaç için hazırlanan elektrotlardır. Yapılan CV çalışmasından elde edilen voltamogramlar kullanılarak formal potansiyelleri ve pik ayrımları hesaplanmıştır. Formal potansiyeller aljinat ve aljinat-GOD elektrotlar için sırasıyla 142 mV ve 137 mV olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan pik ayrımları ise sırasıyla 144 mV ve 234 mV'dur. Aljinat-CuO-GOD elektrodun voltametrik pik değeri artarken, nanopartikül ilavesiyle hızlı elektron transferinin bir sonucu olarak pik ayrımı azalmıştır (179 mV). Aljinat-CuO-GOD elektrodun formal potansiyeli 119 mV olarak hesaplanmıştır. Ayrıca CV voltamogramları elektrotlardan geçen akım yoğunluklarına göre yorumlanmıştır. Çıplak Pt elektrottan geçen akım yoğunluğu yaklaşık olarak  $0.0021 \text{ mA.cm}^{-2}$  iken aynı elektrot aljinat ile modifiye edildiğinde elde edilen akım yoğunluğu  $0.0018$  değerine inmiştir. Bu azalma aljinatın başarılı bir şekilde elektrot

yüzeyine immobilize edildiğini kanıtlamaktadır. Aljinat matrikse GOD immobilize edildiğinde akım yoğunluğu dahada azalmıştır. Elektron aktarımında meydana gelen bu azalma GOD'ın aljinat filme başarılı bir şekilde homojen olarak immobilize edildiğini ve sonuçta GOD'ın varlığında ekstra bir direnç oluştuğunu kanıtlamaktadır. Bu ifade SEM görüntüleri ile desteklenmiştir. Elektrotlar CuO nanopartikülleri ile modifiye edildiğinde elektron aktarımındaki artış nanopartiküllerin elektron aktarımını desteklediklerini ve yüzey alanını artırarak GOD immobilizasyonu için uygun bir çevre yarattıklarını göstermiştir. Bu yorumlar EIS çalışması ile desteklenmiştir. Yapılan çalışma literatürdekilerle uyumludur (Liu vd. 2010, Palanisamy vd. 2014, Deng vd. 2009, Benvenuto vd. 2009).

Geliştirilen biyosensörle yapılan tarama hızı çalışmaları üç farklı sistemle gözlenmiştir. CV'ler aljinat-CuO-GOD elektrotla 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında ve yokluğunda; aljinat-GOD elektrotla 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında 0.1 M KCl içerisinde 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 ve 500  $\text{mVs}^{-1}$  şeklinde farklı tarama hızlarında alınmıştır. Elde edilen anodik ve katodik pikler tarama hızına karşı grafiğe geçirilmiştir. Redoks pik akımlarının artan tarama hızı ile doğrusal olarak arttığı gözlenmiştir. Aljinat-CuO-GOD elektrotla 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında yapılan çalışmadan elde edilen veriler; anodik pik için;  $I_{p_a}/\mu\text{A} = (1375.333 \pm 68.656) + (6.322 \pm 0.221)\text{v/mV s}^{-1}$ , eğim;  $(6.322 \pm 0.221) \mu\text{A (V s}^{-1})^{-1}$  ve katodik pik için;  $I_{p_c}/\mu\text{A} = -(1335.6 \pm 64.441) - (5.277 \pm 0.208)\text{v/mV s}^{-1}$ , eğim;  $-(5.277 \pm 0.208) \mu\text{A (V s}^{-1})^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Aljinat-CuO-GOD elektrotla 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  kullanılmadan yapılan çalışmadan elde edilen veriler; anodik pik için;  $I_{p_a}/\mu\text{A} = (3.684 \pm 3.316) + (0.359 \pm 0.011)\text{v/mV s}^{-1}$ , eğim;  $(0.359 \pm 0.011) \mu\text{A (V s}^{-1})^{-1}$  ve katodik pik için;  $I_{p_c}/\mu\text{A} = -(20.827 \pm 2.359) - (0.303 \pm 0.008)\text{v/mV s}^{-1}$  ve eğim;  $-(0.303 \pm 0.008) \mu\text{A (V s}^{-1})^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Aljinat- GOD elektrotla 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında yapılan çalışmadan elde edilen veriler; anodik pik için  $I_{p_a}/\mu\text{A} = (795.8 \pm 30.587) + (3.278 \pm 0.097)\text{v/mV s}^{-1}$ , eğim;  $(3.278 \pm 0.097) \mu\text{A (V s}^{-1})^{-1}$  ve katodik pik için;  $I_{p_c}/\mu\text{A} = -(871.867 \pm 26.275) - (2.381 \pm 0.08)\text{v/mV s}^{-1}$  ve eğim;  $-(2.381 \pm 0.08) \mu\text{A (V s}^{-1})^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Çalışmanın devamında tarama hızı çalışmalarından elde edilen  $E_{pa}$  ve  $E_{pc}$  değerleri tarama hızlarının doğal logaritma (ln) değerlerine karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafiğin doğrusal eğrilerinin eğimleri hesaplanarak her grafik için  $k_s$  ve  $\alpha$  değerleri

belirlenmiştir (Laviron teori). Aljinat-CuO-GOD elektrot için 5 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$  varlığında yapılan çalışma için hesaplanan değerler;  $k_{sa}= 6.675 \text{ s}^{-1}$ ,  $\alpha_a= 0.857$  ve  $k_{sc}= 1.161 \text{ s}^{-1}$ ,  $\alpha_c= 0.149$  şeklindedir. CuO nanopartiküllerinin yüzey alanını artırması ve GOD enziminin etkin immobilizasyonu için aljinatla uyumlu bir matris oluşturması sayesinde geliştirilen biyosensörün elektrokimyasal açıdan oldukça önemli sonuçlar verdiği görülmüştür. Redoks probunun elektron transferinde oldukça etkili bir rol oynayarak ivme kazandırdığı açıkça görülmektedir. Elektron transferini destekleyen bu sistem sayesinde elde edilen  $6.675 \text{ s}^{-1}$   $k_s$  değeri literatürle kıyaslanmıştır.  $k_s$  değeri bizim çalışmamızdan daha düşük olarak hesaplanan;  $4.8 \text{ s}^{-1}$  (Unnikrishnan vd. 2013),  $3.02 \text{ s}^{-1}$  (Mani vd. 2013) gibi ve daha iyi olarak hesaplanan  $8.59 \text{ s}^{-1}$  (Luo vd. 2012) ve  $11.22 \text{ s}^{-1}$  (Palanisamy vd. 2014) gibi çalışmalar literatürde bulunmaktadır.

Yapılan çalışmada Aljinat-CuO-GOD elektrot ile 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$  varlığında ve yokluğunda; ve Aljinat-GOD elektrot ile 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$  varlığında +0.65V'da farklı glukoz konsantrasyonları denenerek kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin lineer aralıkları, duyarlılıkları ve biyosensörün her çalışmada algılama limiti belirlenmiştir. Aljinat-CuO-GOD elektrot ile 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$  varlığında yapılan çalışmada iki lineer aralık belirlenmiştir. Küçük lineer aralık 0.04 mM – 0.003 M aralığında ve duyarlılığı  $(30.443 \pm 0.250) \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  şeklindedir. Algılama limiti 1.6  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (S/N=3). Aljinat-CuO-GOD elektrot ile 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$  kullanılmadan yapılan çalışmada iki lineer aralık belirlenmiştir. Küçük lineer aralık 0.004 mM - 0.004 M aralığında ve duyarlılığı  $(20.267 \pm 0.138) \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  şeklindedir. Algılama limiti 8  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir (S/N=3). Aljinat-GOD elektrot ile 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4/3-}]$  varlığında yapılan çalışmada 0.04 mM - 0.01 M aralığı lineer aralık olarak belirlenmiştir. Duyarlılığı  $(17.647 \pm 0.243) \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  şeklinde hesaplanmış ve algılama limiti 1.6  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır. Yapılan literatür taramasında +0.7 V'da lineer aralığı 0.001-1 mM, duyarlılığı  $31.2 \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  ve algılama limiti 0.2  $\mu\text{M}$  olan (Zeng vd 2011), +0.55 V'da lineer aralığı 0.0005-5 mM, duyarlılığı  $30 \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  ve algılama limiti 0.5  $\mu\text{M}$  olan (Hrapovic vd. 2004), +0.7 V'da lineer aralığı 0.005-8 mM, duyarlılığı  $6.7 \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  ve algılama limiti 2  $\mu\text{M}$  olan (Zhou vd. 2007), +0.6 V'da lineer aralığı 0.005-3 mM, duyarlılığı  $0.5 \mu\text{A mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  ve algılama limiti 6.8  $\mu\text{M}$  olan (Shan vd. 2006) çok çeşitli çalışmalar

bulunmaktadır. Yapılan çalışmanın devamında her kalibrasyon eğrisinden Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir ve  $K_m$  değerleri hesaplanmıştır. Aljinat-CuO-GOD elektrot ile 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında ve yokluğunda ve Aljinat- GOD elektrot ile 0.1 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}]$  varlığında yapılan çalışmalar için belirlenen  $K_m$  değerleri sırasıyla; 2.82 mM, 2.86 mM ve 0.15 M'dir. Literatürde  $K_m$  değerleri 9.34 mM (Zhou vd. 2005), 11.9 mM (Xue vd. 2001), 0.18 mM (Arslan vd. 2011) olan çalışmalara rastlanmıştır.

Son olarak geliştirilen aljinat-CuO-GOD biyosensör hastanece belirlenen 3 farklı konsantrasyondaki insan kan serumlarında denenmiştir. Elde edilen veriler hastane değerleri ile kıyaslanmış elde edilen verilerin % relatif standart sapmaları ve % verimleri hesaplanmıştır.

## KAYNAKLAR

- Adams, E.C., Mast, R.L. and Free, A. H. 1960. Specificity of glucose oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 91, 230–234.
- Ali, I. 2012. New generation adsorbents for water treatment. *Chem Rev*, 112, 5073–91.
- Anandan, S. and Yang, S. 2007. Emergent methods to synthesize and characterize semiconductor CuO nanoparticles with various morphologies—an overview. *J Exp Nanosci*, 2, 23–56.
- Andrescu, S., Bucur, B. and Marty, J.-L. 2006. Affinity immobilization of tagged enzymes. In *Immobilization of Enzymes and Cells*, Second edition (J.M. Guisan, ed.). Series: *Methods in Biotechnology*. Humana Press (ISBN 1-58829-290-8) pp. 97–106.
- Andrescu, S. and Marty, J.-L. 2006. Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications. *Biomol. Eng.*, 23, 1–15.
- Andrescu, S., Njagi, J. and Ispas, C. 2008. Chapter 7-Nanostructured materials for enzyme immobilization and biosensors. *The New Frontiers of Organic and Composite Nanotechnology*, pp. 355-394.
- Andrescu, S. and Sadik, O.A. 2004. Trends and challenges in biochemical sensors for clinical and environmental monitoring. *Pure Appl. Chem.*, 76, 861.
- Arslan, F., Ustabaş, S. and Arslan, H. 2011. An Amperometric Biosensor for Glucose Determination Prepared from Glucose Oxidase Immobilized in Polyaniline-Polyvinylsulfonate Film. *Sensors*, 11; 8152–8163.
- Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S. and Ananthanarayan, L. 2009. Glucose oxidase –An overview. *Biotechnology Advances*, 27; 489–501.
- Bard, A. J. and Faulkner, L. R. 2001. *Electrochemical Methods Fundamentals and applications*. Wiley& Sons. Inc., Newyork, 589-594.
- Bard, A.J. and Faulkner, L.R. 2001. Polarography and pulse voltammetry. In *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 261–304. New York: Wiley.
- Bayoudh, S., Othmane, A., Ponsonnet, L. and Ben, H. 2008. Electrical detection and characterization of bacterial adhesion using electrochemical impedance spectroscopy-based flow chamber. *Colloids Surf., A* 318, 291–300.
- Belluzo, M.S., Ribone, M.É. and Lagier, C.M. 2008. Assembling amperometric biosensors for clinical diagnostics. *Sensors*, 8, 1366–1399.

- Benvenuto, P., Kafi, A.K.M. and Chen, A. 2009. High performance glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase onto modified titania nanotube arrays. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 627; 76–81.
- Bierhalz, A.C.K., da Silva, M.A., Braga, M.E.M., Sousa, H.J.C. and Kieckbusch, T.G. 2014. Effect of calcium and/or barium crosslinking on the physical and antimicrobial properties of natamycin-loaded alginate films. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 494-501.
- Bright, H.J. and Appleby, M. 1969. The pH dependence of the individual steps in the glucose oxidase reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 244, 3625–3634.
- Cabrita, J.F., Abrantes, L.M. and Viana, A.S. 2005. N-Hydroxysuccinimide-terminated self-assembled monolayers on gold for biomolecules immobilisation. *Electrochimica Acta*, 50, 2117.
- Cagnin, S., Caraballo, M., Guiducci, C., Martini, P., Ross, M., Santaana, M., Danley, D., West, T. and Lanfranchi, G. 2009. Overview of electrochemical DNA biosensors: new approaches to detect the expression of life. *Sensors*, 9, 3122–3148.
- Chaki, N.K. and Vijayamohanan, K. 2002. Self-assembled monolayers as tunable platform for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.*, 17, 1–12.
- Chan, T.W. and Bruce, T.C. 1977. One and two electron transfer reactions of glucose oxidase. *Journal of the American Chemical Society*, 99, 2387–2389.
- Chang, B.-Y. and Park, S.-M. 2010. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 3, 207–29.
- Chen, X. and Mao, S. 2007. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chem Rev*, 107, 2891–959.
- Cherevko, S. and Chung, C.-H. 2010. The porous CuO electrode fabricated by hydrogen bubble evolution and its application to highly sensitive non-enzymatic glucose detection. *Talanta*, 80; 1371–1377.
- Choi, K.J. and Jang, H.W. 2010. One-dimensional oxide nanostructures as gas-sensing materials: review and issues. *Sensors*, 10, 4083–99.
- Chu, X., Zhu, X., Dong, Y., Chen, T., Ye, M. and Sun, W. 2012. An amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on the platinum electrode modified with NiO doped ZnO nanorods. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 676, 20–26
- De Jesus, C.G., Lima, D., Santos, V., Wohnrath, K. and Pessôa, C.A. 2013. Glucose biosensor based on the highly efficient immobilization of glucose oxidase on layer-by-layer films of silsesquioxane polyelectrolyte. *Sensors and Actuators B*, 186, 44–51.

- Deng, S., Jian, G., Lei, J., Hu, Z. and Ju, H. 2009. A glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on nitrogen-doped carbon nanotubes. *Biosensors and Bioelectronics*, 25; 373–377.
- Derkus, B., Emregul, E., Emregul, K.C. and Yucesan, C. 2014. Alginate and alginate-titanium dioxide nanocomposite as electrode materials for anti-myelin basic protein immunosensing. *Sensors and Actuators B*, 192; 294–302.
- Dhara, K., Stanley, J., Ramachandran, T., Nair, B.G. and Satheesh Babu, T.G. 2014. Pt-CuO nanoparticles decorated reduced graphene oxide for the fabrication of highly sensitive non-enzymatic disposable glucose sensor. *Sensors and Actuators B*, 195, 197–205.
- Diouani, M.F., Helali, S., Hafaid, I., Hassen, W.M., Snoussi, M.A. and Ghram, A. 2008. Miniaturized biosensor for avian influenza virus detection. *Mater. Sci. Eng., C* 28, 580–583.
- Emregül, E. 2005. Development of a new biosensor for superoxide radicals. *Anal. Bioanal. Chem.*, 383; 947-954.
- Emregul, E., Kocabay, O., Derkus, B., Yumak, T., Emregul, K.C., Sinag, A. and Polat, K. 2013. A novel carboxymethylcellulose–gelatin–titanium dioxide–superoxide dismutase biosensor; electrochemical properties of carboxymethylcellulose–gelatin–titanium dioxide–superoxide dismutase. *Bioelectrochemistry*, 90; 8–17.
- Fan, X., White, I.M., Shopova, S.I., Zhu, H., Suter, J.D. and Sun, Y. 2008. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. *Anal. Chim. Acta*, 620, 8–26.
- Fang, B., Zhang, C., Wang, G., Wang, M. and Ji, Y. 2010. A glucose oxidase immobilization platform for glucose biosensor using ZnO hollow nanospheres. *Sensors and Actuators: B*, 155; 304-310.
- Fatoni, A., Numnuam, A., Kanatharana, P., Limbut, W., Thammakhet, C. and Thavarungkul, P. 2013. A highly stable oxygen-independent glucose biosensor based on a chitosan-albumin cryogel incorporated with carbon nanotubes and ferrocene. *Sensors and Actuators B*, 185; 725–734.
- Filipic, G. and Cvelbar, U. 2012. Copper oxide nanowires: a review of growth. *Nanotechnology*, 23, 194001.
- Fink, S., van Veggel, F.C.J.M. and Reinhoudt, D.N. 2000. Sensor functionalities in self-assembled monolayers. *Adv. Mater.*, 12, 1315–1328.
- Gerard, M., Chaubey, A. and Malhotra, B.D. 2002. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 5, 345.
- Gibson, Q.H., Swoboda, B.E.P. and Massey, V. 1964. Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 3927–3934.

- Gooding, J.J. and Hibbert, D.B. 1999. The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes. *Trends Anal. Chem.*, 18, 525.
- Gouda, M.D., Singh, S.A., Appu Rao, A.G., Thakur, M.S. and Karanth, N.G. 2003. Thermal inactivation of glucose oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 24324–24333.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voros, J. and Reimhult, E. 2008. Electrochemical biosensors – sensor principles and architectures. *Sensors*, 8, 1400–1458.
- Hayashi, S. and Nakamura, S. 1981. Multiple forms of glucose oxidase with different carbohydrate compositions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 657, 40–51.
- Hecht, H.J., Kalisz, H.M., Hendle, J., Schmid, R.D. and Schomburg, D. 1993. Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 °Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 229, 153–172.
- Hong, J., Lan, K. and Jang, L. 2012. Chemical electrical characteristics analysis of various cancer cells using a microfluidic device based on single-cell impedance measurement. *Sens. Actuators B: Chem.*, 173, 927–934.
- Hrapovic, S., Liu, Y., Male, K.B. and Luong, J.H.T. 2004. *Analytical Chemistry*, 76; 1083–1088.
- Ionescu, R.E., Abu-Rabeah, K., Cosnier, S. and Marks, R.S. 2005. Improved enzyme retention from an electropolymerized polypyrrole-alginate matrix in the development of biosensors *Electrochemistry Communications*, 7; 1277–1282.
- Jones, M.N., Manley, P. and Wilkinson, A. 1982. The dissociation of glucose oxidase by sodium n-dodecyl sulphate. *Biochemical Journal*, 203, 285–291.
- Kalisz, H.M., Hecht, H.J., Schomburg, D. and Schmid, R.D. 1990. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a deglycosylated glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Journal of Molecular Biology*, 213, 207–209.
- Kamyabi, M.A., Hajari, N., Turner, A.P.F. and Tiwari, A. 2013. A high-performance glucose biosensor using covalently immobilised glucose oxidase on a poly(2,6-diaminopyridine)/carbon nanotube electrode. *Talanta*, 116, 801–808.
- Kang, X., Wang, J., Wu, H., Aksay, I.A., Liu, J. and Lin, Y. 2009. Glucose Oxidase–graphene-chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 25; 901–905.
- Khotimchenko, Y.S., Kovalev, V.V., Savchenko, O.V. and Ziganshina, O.A. 2001. Physical–Chemical Properties, Physiological Activity, and Usage of Alginates, the Polysaccharides of Brown Algae. *Russian Journal of Marine Biology*, 27, 53–S64.

- Kislyuk, V.V. and Dimitriev, O.P. 2008. Nanorods and nanotubes for solar cells. *J Nanosci Nanotechnol*, 8, 131–48.
- Kong, T., Chen, Y., Ye, Y., Zhang, K., Wang, Z. and Wang, X. 2009. An amperometric glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on the ZnO nanotubes. *Sensors and Actuators B*, 138; 344–350.
- Kukol, A., Li, P., Estrela, P., Ko-ferrigno, P. and Migliorato, P. 2008. Label-free electrical detection of DNA hybridization for the example of influenza virus gene sequences. *Anal. Biochem.*, 374, 143–153.
- Lang, Q., Yin, L., Shi, J., Li, L., Xia, L. and Liu, A. 2014. Co-immobilization of glucoamylase and glucose oxidase for electrochemical sequential enzyme electrode for starch biosensor and biofuel cell. *Biosensors and Bioelectronics*, 51; 58–163.
- Lanzellotto, C., Favero, G., Antonelli, M.L., Tortolini, C., Cannistraro, S., Coppari, E. and Mazzei, F. 2014. Nanostructured enzymatic biosensor based on fullerene and gold nanoparticles: Preparation, characterization and analytical applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 55, 430–437.
- Laviron, E. 1979. General expression of the linear potential sweep voltammograms in the case of diffusionless electrochemical systems, *J. Electroanal. Chem*, 101; 19–28.
- Lazerges, M., Perrot, H., Rabehagaso, N. and Compère, C. 2012. Thiol- and biotin-labeled probes for oligonucleotide quartz crystal microbalance biosensors of microalga alexandrium minutum. *Biosensors*, 2, 245–254.
- Leal, D., Matsuhira, B., Rossi, M. and Caruso, F. 2008. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. *Carbohydrate Research*, 343; 308–316.
- Lee, I., Luo, X., Huang, J., Cui, X.T. and Yun, M. 2012. Detection of cardiac biomarkers using single polyaniline nanowire-based conductometric biosensors. *Biosensors*, 2, 205–220.
- Lee, K.Y. and Mooney, D.J. 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37, 106– 126.
- Leskovac, V., Trivic, S., Wohlfahrt, G., Kandrac, J. and Pericin, D. 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
- Li, J., Tang, Y., Yang, J., Yang, Z., Zhang, Y. and Hu, X. 2014. Cage-like PbS nanostructure for the construction of novel glucose electrochemical biosensor. *Sensors and Actuators B*, 190; 549– 554.

- Li, Y., Yang, X.Y., Feng, Y., Yuan, Z.Y. and Su, B.L. 2012. One-dimensional metal oxide nanotubes, nanowires, nanoribbons, and nanorods: synthesis, characterizations, properties and applications. *Crit Rev Solid State Mater Sci*, 37, 1–74.
- Ligaj, M., Jasnowska, J., Musiał, W.G. and Filipiak, M. 2006. Covalent attachment of singlestranded DNA to carbon paste electrode modified by activated carboxyl groups. *Electrochimica Acta*, 51, 5193.
- Liu, A., Wang, K., Weng, S., Lei, Y., Lin, L., Chen, W., Lin, X. and Chen, Y. 2012. Development of electrochemical DNA biosensors. *Trends Anal. Chem.*, 37, 101–111.
- Liu, J., Jin, J., Deng, Z., Huang, S.-Z., Hu, Z.-Y. and Wang, L. 2012. Tailoring CuO nanostructures for enhanced photocatalytic property. *J Colloid Interface Sci*, 384, 1–9.
- Liu, L., Deng, D., Xing, Y., Li, S., Yuan, B., Chen, J. and Xia, N. 2013. Activity analysis of the carbodiimide-mediated amine coupling reaction on self-assembled monolayers by cyclic voltametry. *Electrochimica Acta*, 89, 616– 622
- Liu, X., Hu, Q., Wu, Q., Zhang, W., Fang, Z. and Xie, Q. 2009. Aligned ZnO nanorods: A useful film to fabricate amperometric glucose biosensor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74; 154-158.
- Liu, X., Zeng, X., Mai, N., Liu, Y., Kong, B., Li, Y., Wei, W. and Luo, S. 2010. Amperometric glucose biosensor with remarkable acid stability based on glucose oxidase entrapped in colloidal gold-modified carbon ionic liquid electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 25; 2675–2679.
- Liu, Y., Chu, Y., Zhuo, Y., Li, M., Li, L. and Dong, L. 2007. Anion-controlled construction of CuO honeycombs and flowerlike assemblies on copper foils. *Cryst Growth Des*, 7, 467–70.
- Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G. and Whitesides, G.M. 2005 Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews*, 105, 1103.
- Luong, J.H.T., Male, K.B. and Glennon, J.D. 2008. Biosensor technology: technology push versus market pull. *Biotechnol. Adv.*, 26, 492–500.
- Luque, G.L., Rodriguez, M.C. and Rivas, G.A. 2005. Glucose biosensors based on the immobilization of copper oxide and glucose oxidase within a carbon paste matrix. *Talanta*, 66, 467–471.
- Macdonald, D.D. 2006. Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochim.Acta*, 51, 1376–88.

- MacDonald, A.H. 2001. Superconductivity: Copper oxides get charged up. *Nature*, 414, 409–10.
- Mono, R., Stred, M. and Sturd, E. 2012. Application of electrochemical biosensors in clinical diagnosis. *J. Clin. Lab. Anal.*, 34, 22–34.
- Müller, D. 1928. Oxidation von Glukose mit Extrakten aus *Aspegillus niger*. *Biochemische Zeitschrift*, 199.
- Nakabayashi, Y., Hirosaki, Y. and Yamauchi, O. 2006. Dipolar ruthenium(II) ammine complexes as electron transfer mediators of amperometric glucose sensors. *Bioelectrochemistry*, 69, 216–222.
- Nakajima, N. and Ikada, Y. 1995 Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjugate Chemistry*, 6, 123.
- Nasri, Z. and Shams, E. 2013. A glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized onto glassy carbon electrode modified with nitrophenyl diazonium salt. *Electrochimica Acta*, 112; 640–647.
- Nelson, D.L. and Cox M.M. 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. Palme yayıncılık, Ankara, 244-247.
- Nenkova, R., Ivanova, D., Vladimirova, J. and Godjevargova, T. 2010. New amperometric glucose biosensor based on cross-linking of glucose oxidase on silica gel/multiwalled carbon nanotubes/polyacrylonitrile nanocomposite film. *Sensors and Actuators B*, 148; 59–65.
- Nguyen, B.T., Peh, A.E., Chee, C.Y., Fink, K., Chow, V.T., Ng, M.M. and Toh, C.S. 2012. Electrochemical impedance spectroscopy characterization of nanoporous alumina dengue virus biosensor. *Bioelectrochemistry*, 88, 15–21.
- Ohno, R., Ohnuki, H., Wang, H., Yokoyama, T., Endo, H., Tsuya, and Izumi, M. 2012. Electrochemical impedance spectroscopy biosensor with interdigitated electrode for detection of human immunoglobulin A. *Biosens. Bioelectron.*, 40, 422–426.
- Orazio, P.D. 2011. Biosensors in clinical chemistry – 2011 update. *Clin. Chim. Acta*, 412, 1749–1761.
- Ozoemena, K.I. and Nyokong, T. 2006. Novel amperometric glucose biosensor based on an ether-linked cobalt(II) phthalocyanine–cobalt(II) tetraphenylporphyrin pentamer as a redox mediator. *Electrochimica Acta*, 51, 5131–5136.
- Palanisamy, S., Cheemalapati, S. and Chen, S.-M. 2014. Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase dispersed in multiwalled carbon nanotubes/graphene oxide hybrid biocomposite. *Materials Science and Engineering C*, 34; 207–213.

- Paques, J.P., van der Linden, E., van Rijn, C.J.M. and Sagis, L.M.C. 2014. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, 163–171.
- Park, J., Joo, J., Kwon, S.G., Jang, Y. and Hyeon, T. 2007. Synthesis of monodisperse spherical nanocrystals. *Angew Chem Int Ed*, 46, 4630–60.
- Park, S.M. and Yoo, J.S. 2003. Electrochemical impedance spectroscopy for better electrochemical measurements. *Anal. Chem.*, 75, 455–81.
- Park, T.J., Hyun, M.S., Lee, H.J., Lee, S.Y. and Ko, S. 2009. A self-assembled fusion protein-based surface plasmon resonance biosensor for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Talanta*, 79, 295–301.
- Patel, M.K., Solanki, P.R., Kumar, A., Khare, S., Gupta, S. and Malhotra, B.D. 2010. Electrochemical DNA sensor for *Neisseria meningitidis* detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 2586–2591.
- Patel, N., Davies, M.C., Hartshorne, M., Heaton, R.J., Roberts, C.J., Tendler, S.J.B. and Williams, P.M. 1997. Immobilization of protein molecules onto homogeneous and mixed carboxylate-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir*, 13, 6485.
- Paul, P., Hossain, M., Yadav, R.C. and Kumar, G.S. 2010. Biophysical studies on the base specificity and energetics of the DNA interaction of photoactive dye thionine: spectroscopic and calorimetric approach. *Biophys. Chem.*, 148, 93–103.
- Pawar, S.N. and Edgar, K.J. 2012. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 33, 3279–3305.
- Pazur, J.H., Kleppe, K. and Cepure, A. 1965. A glycoprotein structure for glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 111, 351–357.
- Pejcic, B. and Marco, R.D. 2006. Impedance spectroscopy: over 35 years of electrochemical sensor optimization. *Electrochim. Acta*, 51, 6217–6229.
- Periasamy, A.P., Chang, Y.-J. and Chen, S.-M. 2011. Amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized on gelatin-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 80, 114–120.
- Perumal, V. and Hashim U. 2014. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of applied biomedicine*, 12, 1–15.
- Qin, C., Chen, C., Xie, Q., Wang, L., He, X., Huang, Y., Zhou, Y., Xie, F., Yang, D. and Yao, S. 2012. Amperometric enzyme electrodes of glucose and lactate based on poly(diallyldimethylammonium)-alginate-metal ion-enzyme biocomposites. *Analytica Chimica Acta*, 720, 49–56.

- Qin, Y. 2008. Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management. *Polymer International*, 57, 171–180.
- Rahman, M.M., Saleh, Ahammad, A.J., Jin, J.-H., Ahn, S.J. and Lee, J.-J. 2010. A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides. *Sensors*, 10, 4855–86.
- Ramírez, N.B., Salgado, A.M. and Valdman, B. 2009. The evolution and development of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives. *Brazilian J. Chem. Eng.*, 26, 227–249.
- Randles, J.E.B. 1947. Kinetics of rapid electrode reactions. *Discuss. Faraday Soc.*, 1, 11–19.
- Rossi, C., Zhang, K., Esteve, D., Alphonse, P., Tailhades, P. and Vahlas, C. 2007. Nanoenergetic materials for MEMS: a review. *J Microelectromech Syst*, 16, 919–31.
- Rowley, J.A., Madlambayan, G. and Mooney, D.J. 1999. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 20, 45-53.
- Sanner, C., Macheroux, P., Ruterjans, H., Muller, F. and Bacher, A. 1991. <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C NMR investigations of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry*, 796, 663–672.
- Scouten, W.H., Luong, J.H.T. and Brown, R.S. 1995. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensors design. *Tibtech.*, 13, 178–185.
- Sehgal, D. and Vijay, I.K. 1994. A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. *Analytical Biochemistry*, 218, 87.
- Şenel, M. and Nergiz, C. 2012. Novel amperometric glucose biosensor based on covalent immobilization of glucose oxidase on poly(pyrrole propylic acid)/Au nanocomposite. *Current Applied Physics*, 12; 1118-1124.
- Şenel, M., Nergiz, C. and Çevik, E. 2013. Novel reagentless glucose biosensor based on ferrocene cored asymmetric PAMAM dendrimers. *Sensors and Actuators B*, 176, 299-306.
- Shan, D., He, Y., Wang, S., Xue, H. and Zheng, H. 2006. A porous poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) film-based glucose biosensor constructed by electrochemical entrapment. *Analytical Biochemistry*, 356; 215–221.
- Sheehan, J.C. and Hlaoka, J.J. 1956. The use of water-soluble and basic carbodiimides in peptide synthesis. *Journal of Organic Chemistry*, 21, 439.

- Shervedani, R.K. and Hatefi-Mehrjardi, A. 2007. Electrochemical characterization of directly immobilized glucose oxidase on gold mercaptosuccinic anhydride self-assembled monolayer. *Sensors and Actuators B*, 126, 415–423.
- Shi, W. and Ma, Z. 2010. Amperometric glucose biosensor based on a triangular silver nanoprisms/chitosan composite film as immobilization matrix. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 1098–1103.
- Shinde, S.B., Fernandes, C.B. and Patravale, V.B. 2012. Recent trends in in-vitro nanodiagnosics for detection of pathogens. *J. Control. Release*, 159, 164–180.
- Singh, D.P. and Ali, N. 2010. Synthesis of TiO<sub>2</sub> and CuO nanotubes and nanowires. *Sci Adv Mater*, 2, 295–335.
- Song, M.-K., Park, S., Alamgir, F.M., Cho, J. and Liu, M. 2011. Nanostructured electrodes for lithium-ion and lithium-air batteries: the latest developments, challenges, and perspectives. *Mater Sci Eng R Rep*, 72, 203–52.
- Song, Y., Wan, L., Wang, Y., Zhao, S., Hou, H. and Wang, L. 2012. Electron transfer and electrocatalytics of cytochrome c and horseradish peroxidase on DNA modified electrode. *Bioelectrochemistry*, 85; 29–35.
- Stanford, E.C.C. 1881. Improvements in the manufacture of useful products from seaweeds. *British Patent*, 142 .
- Strehlitz, B., Nikolaus, N. and Stoltenburg, R. 2008. Protein detection with aptamer biosensors. *Sensors*, 8, 4296–4307.
- Sungur, S., Emregül, E., Günendi, G. and Numanoğlu, Y. 2004. New glucose biosensor based on glucose oxidase-immobilized gelatin film coated electrodes. *J Biomater. Appl.*, 18(4); 265.
- Swoboda, B.E.P. and Massey, V. 1965. Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Journal of Biological Chemistry*, 240, 2209–2215.
- Takegawa, K., Fujiwara, K., Iwahara, S., Yamamoto, K. and Tochikura, T. 1989. Effect of deglycosylation of N-linked sugar chains on glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry and Cell Biology*, 67, 460–464.
- Takegawa, K., Kondo, A., Iwamoto, H., Fujiwara, K., Hosokawa, Y. and Kato, I. 1991. Novel oligomannose-type sugar chains derived from glucose oxidase of *Aspergillus niger*. *Journal of Biochemistry International*, 25, 181–190.
- Tasviri, M., Rafiee-Pour, H.-A., Ghourchian, H. and Gholami, M.R. 2011. Amine functionalized TiO<sub>2</sub> coated on carbon nanotube as a nanomaterial for direct electrochemistry of glucose oxidase and glucose biosensing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, 206–210.

- Telefoncu, A. 1999. Enzimoloji, Ege Üniversitesi, İzmir, Bölüm 9, İmmobilize enzimler, pp. 193-243.
- Thévenot, D.R., Toth, K. and Durst, R.A. 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.*, 16, 121–131.
- Torres-Chavolla, E. and Alocilja, E.C. 2009. Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens. *Biosens. Bioelectron.*, 24, 3175–3182.
- Tsuge, H., Natsuaki, O. and Ohashi, K. 1975. Purification, properties, and molecular features of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 78, 835–843.
- Umar, A., Rahman, M.M., Al-Hajry, A. and Hahn, Y.-B. 2009. Enzymatic glucose biosensor based on flower-shaped copper oxide nanostructures composed of thin nanosheets. *Electrochemistry Communications*, 11; 278–281.
- Unnikrishnan, B., Palanisamy, S. and Chen, S.-M. 2013. A simple electrochemical approach to fabricate a glucose biosensor based on graphene–glucose oxidase biocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*, 39; 70–75.
- Ushaa, S.M., Nagar, N.I. and Rao, G.M. 2011. Design and analysis of nanowire sensor array for prostate cancer detection. *Int. J. Nano Biomater.*, 3, 239–255.
- Vaseem, M., Umar, A., Kim, S.H. and Hahn, Y.-B. 2008. Low-temperature synthesis of flower-shaped CuO nanostructures by solution process: formation mechanism and structural properties. *J Phys Chem C*, 112, 5729–35.
- Wang, C., Chen, S., Xiang, Y., Li, W., Zhong, X., Che, X. and Li, J. 2011. Glucose biosensor based on the highly efficient immobilization of glucose oxidase on Prussian blue-gold nanocomposite films. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69; 1–7.
- Wang, J. 2006. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosens. Bioelectron.*, 21, 1887–1892.
- Wang, S.B., Hsiao, C.H., Chang, S.J., Lam, K.T., Wen, K.H. and Hung, S.C. 2011. A CuO nanowire infrared photodetector. *Sensor Actuat A: Phys*, 171, 207–11.
- Wang, Y., Xu, H., Zhang, J., and Li, G. 2008. Electrochemical sensors for clinic analysis. *Sensors*, 8, 2043–2081.
- Wang, Y.X., Ye, Z.Z., Si, C.Y. and Ying, Y.B. 2012. Application of aptamer based biosensors for detection of pathogenic microorganisms. *Chin. J. Anal. Chem.*, 40, 634–642.
- Weng, C.H., Huang, C.J. and Lee, G.B. 2012. Screening of aptamers on microfluidic systems for clinical applications. *Sensors*, 12, 9514–9529.

- Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H.M. and Hecht, H.-J. 1999. 1.8 and 1.9 °Å Resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modeling substrate complexes. *Acta Crystallographica Section D*, 55, 969–977.
- Wu, B.-Y., Hou, S.-H., Yin, F., Li, J., Zhao, Z.-X., Huang, J.-D. and Chen, Q. 2007. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayer films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 22; 838–844.
- Xi, H., Kumar, S., Dosen-Micovic, L. and Arya, D.P. 2010. Calorimetric and spectroscopic studies of aminoglycoside binding to AT-rich DNA triple helices. *Biochimie*, 92, 514–529.
- Xie, B., Ramanathan, K. and Danielsson, B. 1999. Principles of enzyme thermistor systems: applications to biomedical and other measurements. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 64,1–33.
- Xue, K., Zhou, S., Shi, H., Feng, X., Xin, H. and Song, W. 2014 (In Press, Accepted Manuscript) A novel amperometric glucose biosensor based on ternary gold nanoparticles/polypyrrole/reduced graphene oxide nanocomposite. *Sensors and Actuators B*.
- Yang, M., He, J., Hu, X., Yan, C., Cheng, Z., Zhao, Y. and Zuo, G. 2011. Copper oxide nanoparticle sensors for hydrogen cyanide detection: Unprecedented selectivity and sensitivity. *Sensors and Actuators B*, 155, 692–698.
- Yang, Z., Huang, X., Zhang, R., Li, J., Xu, Q. and Hu, X. 2012. Novel urchin-like In<sub>2</sub>O<sub>3</sub>–chitosan modified electrode for direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing. *Electrochimica Acta*, 70; 325–330.
- Yu, C., Zhou, X. and Gu, H. 2010. Immobilization, direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin on colloidal silver nanoparticles-chitosan film. *Electrochimica Acta*, 55; 8738–8743.
- Yu, J., Zhang, Y. and Liu, S. 2014. Enzymatic reactivity of glucose oxidase confined in nanochannels. *Biosensors and Bioelectronics*, 55, 307–312.
- Yu, X.-Y., Xu, R.-X., Gao, C., Luo, T., Jia, Y. and Liu, J.-H. 2012. Novel 3D hierarchical cotton-candy-like CuO: surfactant-free solvothermal synthesis and application in As(III) removal. *ACS Appl Mater Interfaces*, 4, 1954–62.
- Zeng, Q., Cheng, J.-S., Liu, X.-F., Bai, H.-T. and Jiang, J.-H. 2011. Palladium nanoparticle/chitosan-grafted graphene nanocomposites for construction of a glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 26; 3456–3463.
- Zhang, J., Wang, C., Chen, S., Yuan, D. and Zhong, X. 2013. Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase–lectin biospecific interaction *Enzyme and Microbial Technology* 52; 134–140.

- Zhang, X., Shi, W., Zhu, J., Kharista, D., Zhao, W. and Lalia, B. 2011. High-power and high-energy-density flexible pseudocapacitor electrodes made from porous CuO nanobelts and single-walled carbon nanotubes. *ACS Nano*, 5, 2013–9.
- Zhang, Y. and Tadigadapa, S. 2004. Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels. *Biosens. Bioelectron.*, 19, 1733–1743.
- Zhao, Z.W., Chen, X.J., Tay, B.K., Chen, J.S., Han, Z.J. and Khor, K.A. 2007. A novel amperometric biosensor based on ZnO:Co nanoclusters for biosensing glucose. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 135-139.
- Zheng, H., Ou, J.Z., Strano, M.S., Kaner, R.B., Mitchell, A. and Kalantar-zadeh, K. 2011. Nanostructured tungsten oxide – properties, synthesis, and applications. *Adv Funct Mater*, 21, 2175–96.
- Zheng, X., Xu, C., Tomokiyo, Y., Tanaka, E., Yamada, H. and Soejima, Y. 2000. Observation of charge stripes in cupric oxide. *Phys Rev Lett*, 85, 5170–3.
- Zhou, H., Chen, H., Luo, S., Chen, J., Wei, W. and Kuang, Y. 2005. Glucose biosensor based on platinum microparticles dispersed in nano-fibrous polyaniline. *Biosensors and Bioelectronics*, 20; 1305–1311.
- Zhou, L.P., Wang, B.X., Peng, X.F., Du, X.Z. and Yang, Y.P. 2010. On the specific heat capacity of CuO nanofluid. *Adv Mech Eng*, 2010, 1–4.
- Zhou, Q., Xie, Q., Fu, Y., Su, Z., Jia, X. and Yao, S. 2007. *Journal of Physical Chemistry B*, 111; 11276-11284.
- Zuo, S., Teng, Y., Yuan, H. and Lan, M. 2008. Direct electrochemistry of glucose oxidase on screen-printed electrodes through one-step enzyme immobilization process with silica sol–gel/polyvinyl alcohol hybrid film. *Sensors and Actuators B*, 133; 555–560.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Vuslat BÜK

Doğum Yeri : Bergama

Doğum Tarihi : 03.12.1985

Medeni hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

### **Eğitim Durumu**

Lise : Ayten Kemal Akınal Anadolu Lisesi (2003)

Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2011)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya  
Anabilim Dalı (Eylül 2011- Eylül 2014)

### **Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl**

İstanbul Kemerburgaz Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2013-