

## ÖZET

### ALKOL TAYİNİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

**AKYILMAZ,Erol**

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı  
Tez Yöneticisi: Prof.Dr.Erhan DİNÇKAYA  
Mayıs 2002,198 sayfa

Etanol, sanayinin hemen her dalında geniş bir kullanım alanına sahip olan ve bunun yanısıra özellikle alkollü içeceklerin günümüzde yaygın kullanımı nedeniyle, adli tıp ve klinik toksikoloji laboratuvarlarında tayinine sıkça ihtiyaç duyulan toksik bir maddedir.

Kromatografi, enzimatik-spektrofotometrik ve kimyasal sensör sistemleri ile etanol tayinleri yapılmakla birlikte bu yöntemlerin bazısı zaman alıcı, bazısı spesifiklikten uzak ve bazısı da oldukça pahalı ekipmanlara ihtiyaç göstermektedir.

Biyosensörler, enzim, hücre, doku gibi biyolojik unsurların uygun bir iletim sistemiyle birleştirilmesiyle oluşan biyoanalitik cihazlardır.Biyosensörlerin, tayin edilecek maddeler için ekonomik, pratik ve spesifik ölçümlere imkan vermesi diğer yöntemlere olan en önemli avantajlarıdır.

Bu çalışmada, alkol tayini için alkol oksidaz (EC 1.1.3.13) ve katalaz (EC 1.11.1.6) temelli enzim biyosensörleri ile *C.tropicalis* maya hücrelerinin kullanıldığı mikrobiyal biyosensörler geliştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda enzim ve hücreler immobilizasyon materyali olarak jelatin, Ca-aljinat ve  $\kappa$ -karrajenan ve çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehid kullanılarak çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyinde immobilize edildi.

Ölçümler, etanol konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak tüketilen oksijenin belirlenmesiyle elde edilen standart grafikler yardımıyla gerçekleştirildi. Geliştirilen biyosensörlerle oldukça duyarlı ve tekrarlanabilirliği yüksek sonuçlar alındı.

Biyosensörlerin optimizasyonu ve karakterizasyonu amacıyla, pH, sıcaklık, tampon sistemi, substrat spesifikliği, tekrarlanabilirlik, termal ve operasyonel kararlılık gibi parametreler incelendi. Herbir biyosensörle etanol için (n=10) ölçüm yapılarak biyosensörlerin standart sapma ve varyasyon katsayıları da hesaplandı.

Çalışmanın son kısmında, jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile bira örneklerinde etanol tayini gerçekleştirilerek, elde edilen sonuçlar enzimatik-spektrofotometrik yöntemle elde edilen verilerle kıyaslandı.

**Anahtar sözcükler:** etanol, biyosensör, mikrobiyal biyosensör, alkol oksidaz, katalaz, *C.tropicalis*

## ABSTRACT

### BIOSENSOR DEVELOPMENT FOR ALCOHOL ANALYSIS

**AKYILMAZ,Erol**

Ph.D in Biochemistry  
Supervisor: Prof.Dr.Erhan DİNÇKAYA  
May 2002, 198 pages

Ethanol has a widespread using in nearly all branch of industry and, in addition, it is a toxic material which is very often in great need of being determined in forensic medicine and clinical toxicology especially as the alcoholic drinks are widely consumed.

Ethanol assays have done by chromatography, enzymatic-spectrophotometric and chemical sensor systems. However, some of these methods are not specific. They are time-consuming and also need very expensive equipments.

Biosensors are defined as an analytical device incorporating a biological sensing element such as enzyme, cell and, tissue with a transducer. In contrast the other methods the most important advantage of the biosensors is to offer specific, economic and portable diagnostics for the target biological substances.

In this study, enzyme biosensors based on alcohol oxidase (EC 1.1.3.13), catalase (EC 1.11.1.6) , and microbial biosensors based on *C.tropicalis* yeast cells, were developed for the determination of ethanol. For this purpose, by using gelatin, Ca-alginate and  $\kappa$ -carrageenan as the immobilization materials and glutaraldehyde which

is cross-linking agent, the enzymes and the microorganisms were immobilized on the surface of dissolved oxygen probe membrane.

Measurements were done by standard curves which were obtained by the determination of consumed oxygen level, related to ethanol concentration. By using the biosensors very sensitive and reproducible results were obtained.

For the optimization and characterization of the biosensors developed some parameters such as pH, temperature, buffer system, substrate specificity, thermal and operational stability, reproducibility etc. were investigated. And also standard deviation and variation coefficient of the biosensors (n=10) were calculated.

Finally, concentration of ethanol in beer samples were determined by using alcohol oxidase biosensor immobilized in gelatin and the results obtained were compared to enzymatic-spectrophotometric ethanol assay method's.

**Keywords:** ethanol, biosensor, microbial sensor, alcohol oxidase, catalase, *C.tropicalis*

## 1. GİRİŞ

Etanol, binlerce yıl önce fermentasyon yolu ile üretilen içeceklerin kullanımıyla o günden bu yana önemli oranda tüketilen bir maddedir.

Yüksüz, küçük ve suda çözünür bir molekül olması yanında zamanla bulunan antiseptik özelliğinden dolayı özellikle tıpta ve ilaç endüstrisinde yer edinmiştir. Bunlara ilave olarak günümüzde dünya petrol rezervlerinin hızla tükenmeye başlamasıyla birlikte özellikle alternatif motor yakıt maddesi olarak kullanılması yönünde ciddi ve oldukça kapsamlı araştırmalarla da gündemdeki yerini almıştır.

Gıda, içki, ilaç, tıp, kozmetik, boya ve otomotiv endüstrisinde kullanımı ve tüketimi giderek artan bir madde olan etanolün alkollü içeceklerde, bileşiminde alkol içeren ilaçlarda ve katkı maddelerinde tayini oldukça büyük bir önem arz etmektedir. Bunun yanısıra gerek alkol toksikasyonu ile benzerlik gösteren bazı rahatsızlıklara ilişkin bulguların beyin travmaları, üremi, diyabet asidozisi gibi durumlarda gözlenen belirtilerle benzerlik göstermesi gerekse kronik alkolizmin komplikasyonlarının önemi, teşhis ve tedavinin doğruluğu açısından etanol tayinini zorunlu kılmaktadır.

Bugün alkolün fizyolojik olumsuz etkilerinin yanı sıra alkollü olarak araç kullanılmasıyla meydana gelen trafik kazaları ve bunların sonuçları alkolün sosyo-ekonomik anlamda da etkilerini açığa çıkarmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı günümüzde alkol tayini yapılması, öneminin yanı sıra bir zorunluluğu da beraberinde getirmektedir.

Günümüzde alkol tayini amacıyla alkol dehidrogenazın (ADH) (EC1.1.1.1) (Kovar *et al.*,1984; Rangel and Toth, 2000) ve alkol oksidazın (AO) (1.1.3.13) kullanıldığı (Dinçkaya *et al.*,1996; Prencipe *et al.*,1987; Mizgunova *et al.*, 1996) enzimatik – spektrofotometrik esaslı yöntemlerin yanısıra yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) (Tagliaro *et al.*,1992; Pellegrino *et al.*, 1999), gaz kromatografisi (GC) (Cho *et al.*,1999; Tangerman, 1997; Varga *et al.*, 1993) ve kolon sıvı kromatografisi (CLC) (Johansson *et al.*, 1993; Liden *et al.*, 1998) gibi kromatografik esaslı yöntemlerden de yararlanılmaktadır.

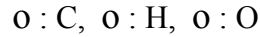
Son yıllarda özellikle biyosensör teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak alkol tayini amacıyla ADH enzimi temelli (Katrlik *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1999; Miertus *et al.*, 1998), AO enzimi temelli (Smyth *et al.*, 1999; Guilbault *et al.*, 1983; Boujtita *et al.*, 2000; Akyılmaz and Dinçkaya, 2000) ve mikrobiyal temelli (Karube *et al.*, 1980; Kitagawa *et al.*, 1987; Reshelitov *et al.*, 2001) biyosensörler geliştirilmiştir.

Alkol tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensörler; spesifik, ekonomik, pratik, girişim etkilerinden mümkün olduğunca uzak ve hemen her laboratuvar şartlarında kullanıma izin verebilen sistemler olduğu için alkol tayininde diğer metodlara nazaran gittikçe artan bir düzeyde kullanım alanı bulmaktadır.

### 1.1 Etanol

Etanol; primer alkollerin bir üyesi olup  $C_2H_5OH$  yapısında suda çözünen renksiz, yüksüz ve küçük bir moleküldür.

Şekil 1.1 Etanolün yapısı



Etanol özellikle alkollü içki endüstrisinde oldukça yoğun bir kullanım alanı bulmakla birlikte, suda ve organik çözünenlerdeki yüksek orandaki çözünürlüğü onun hemen her endüstri dalında yaygın bir şekilde kullanımına imkan sağlamaktadır.

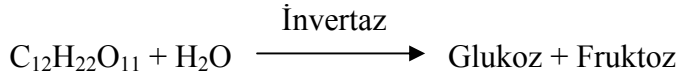
Günümüzde çevre kirliliği, ozon tabakasındaki delinme, iklim değışiklikleri ve küresel ısınmanın etkisi ve bunlara ilave olarak dünya üzerindeki petrol rezervlerinin hızla azalmaya başlaması insanları alternatif enerji ve yakıt arayışına sevk etmiştir. Son yıllarda bu konu üzerine yapılan çalışmalardaki yoğunluğun özellikle etanol üzerinde toplandığını görmekteyiz. Etanol kolay ve ucuz materyallerden elde edilebilmekle birlikte elde edilmesinde kullanılan prosesler bakımından oldukça pahalı üretilen bir materyaldir. Bununla birlikte etanol yakıt maddesi olarak kullanıldığında karbonmonoksit emisyonunda %30, karbondioksit emisyonunda % 6-10 , özellikle ozon tabaksı için tehlike arzeden çeşitli organik bileşiklerin oluşumunda ise % 30 düzeyinde bir azalma gerçekleştiği belirlenmiştir.(Morris and Lorenz, 1995).

### 1.1.1 Etanol sentezi

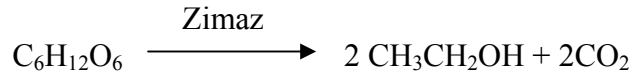
Etanolün endüstriyel sentezi iki farklı yöntem ile yapılmaktadır. Bunlardan birincisi fermentasyon yolu ile sentez ve diğeri de asit katalizli reaksiyon ile sentez yöntemidir.

#### 1.1.1.1 Fermentasyon ile etanol sentezi

Hemen tüm alkollü içkilerin alkolü ve endüstriyel amaçlı alkolün bir kısmı fermentasyon yolu ile elde edilmektedir. Fermentasyon yöntemi ile alkol üretiminde anaerob maya hücreleri kullanılır. Maya hücrelerinin bulunduğu ortama sakkaroz ilave edilir ve daha sonra ortam ısıtma işlemine tabi tutulur. Maya hücreleri içerdikleri invertaz enzimi yardımıyla sakkarozu glukoz ve fruktoza ayrıştırır;

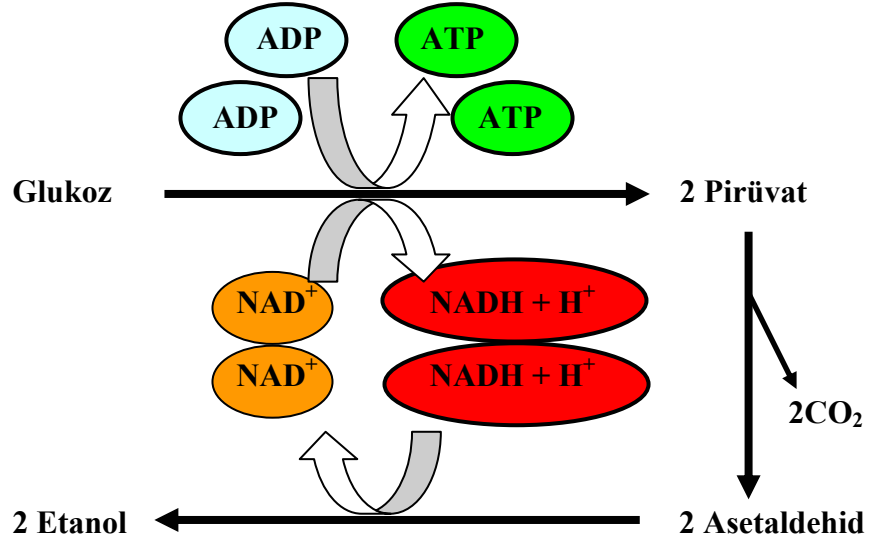


Oluşan glukoz ve fruktoz yine maya hücrelerinde bulunan zimaz enzimi ile etanol ve karbondioksite dönüştürülür.



Fermentasyon yaklaşık üç günlük bir zaman diliminde ve 25-30 °C sıcaklıkta gerçekleşir. Fermentasyon ile % 3 (v/v) ile % 15 (v/v) düzeyinde etanol eldesi mümkün olup daha yüksek konsantrasyonlarda etanol eldesi fermentasyon yolu ile mümkün değildir. Bunun nedeni ; %15'lik (v/v) etanol konsantrasyonundan daha yüksek etanol konsantrasyonunda maya hücrelerinin alkol toksikasyonu ile inaktif olmalarından kaynaklanmaktadır (Cao *et al*,1996; Lee and Huang, 1995).

Mayalarda anaerobik karbohidrat yıkımı pirüvata kadar glikolizdeki reaksiyon adımlarını izler fakat pirüvat, pirüvat dekarboksilaz enzimi tarafından asetaldehide dekarboksillenir. Reaksiyon oksidatif dekarboksilasyonun ilk adımına uygunluk gösterir. Bununla birlikte asetaldehid liponamid grubuna transfer edilmez ve serbest bırakılır. Serbest kalan asetaldehid ise NADH ile ADH tarafından etanole indirgenir ve sonuç olarak bir mol glukoz başına 2 mol ATP kazanılır (Morgan and Scrimgeour, 1994).



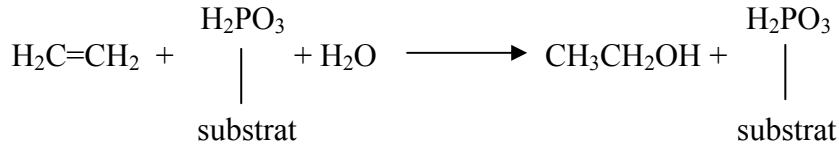
Şekil 1.2 Alkol mayalanması



### 1.1.1.2 Etilen ile etanol sentezi

Endüstriyel olarak etanol sentezinin bir diğer yolu da asit katalizli bir reaksiyon yolu ile etilenden gerçekleştirilir. Asit olarak genellikle sülfürik asit kullanılıp sülfürik asitin kullanımı korunma tedbirleri yanında korozyon ve çevresel bir takım sorunlarında beraberinde getirmektedir.

Son zamanlardaki teknolojik gelişmelere paralel olarak alkol üretimi fosforik asit veya tungstik asit emdirilmiş silika veya zeolit aerajelleri ile yapılmaktadır.



Bu proses yardımıyla etanol üretiminde, etanolün tek adımda gerçekleşen bir reaksiyonla elde ediliyor olması, katalizatörlerin rejenerasyon ile tekrar kullanımı ve korozyon ile çevreye zararlı faktörlerin azaltılmış olması gibi avantajlar mevcuttur. Bu proses ile üretilen etanol daha çok boya, parfüm, temizlik maddeleri ve mürekkep sanayiinde kullanılmaktadır.

## 1.2 Etanol Metabolizması

### 1.2.1 Etanolün absorpsiyonu

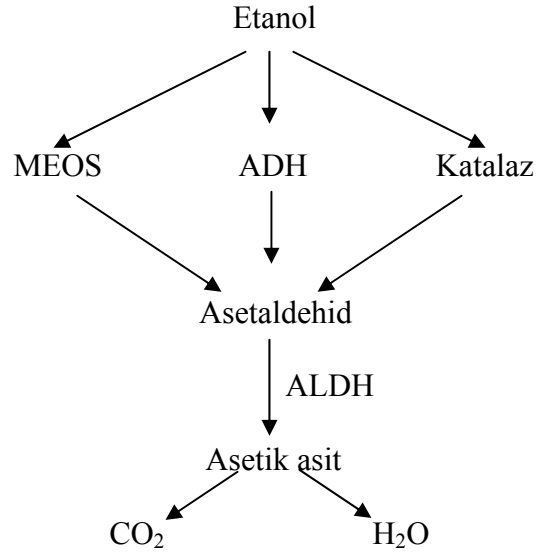
Etanol suda tamamen çözünme özelliğine sahip bir moleküldür. Bu özelliği etanolün, alkollü içecekler vasıtasıyla alınmasından hemen sonra kan yolu ile vücuda yayılmasına sebebiyet verir (Lieber,1994). 50-100 mg/dl'lik bir kan alkol konsantrasyonu toksik etkiye sahiptir. Alkol ihtiva eden kan, beyindeki oldukça önemli biyolojik membranlara kadar ilerler ve vücuttaki birçok biyolojik proses ve organların etkilenmesine ve tahribatına neden olur (Klatsky,1995).

Etanolün biyolojik membranlardan geçişi pasif diffüzyon ile gerçekleşir (Katzung,1998). Etanol ağızdan yemek borusuna oradan mideye ve mideden de ince bağırsağa geçer. Bu geçiş yolu boyunca

etanol hemen her yerde kana absorbe olur, bununla birlikte en fazla absorblandığı yer yaklaşık % 20 lik bir oranla mide ve yine yaklaşık % 80 lik bir oranla ince bağırsaklardır. Alkol alımının artmasıyla birlikte absorbsiyon hızında ve bununla ilişkili olarak kan alkol konsantrasyonunda da artış gerçekleşir (Urbano-Marquez *et al*, 1995) Gastrointestinal yoldan alkol absorbsiyonunda etkili olan çeşitli faktörler vardır. Bunlar; açlık durumu, mide boşluğu, kan akış hızı ve alkolün konsantrasyonudur. Ağız yolu ile alkol alındığında midenin boş olması alkolün fazla absorbsiyonundaki en önemli faktör olup gıda alımı mide boşluğunu azaltır ve dolayısıyla alkol absorbsiyonunu geciktirir. Alınan gıdaların türünün ise alkol absorbsiyonunda herhangi bir etkisi yoktur (Reinus *et al*, 1989).

### 1.2.2 Dağılım ve boşaltım

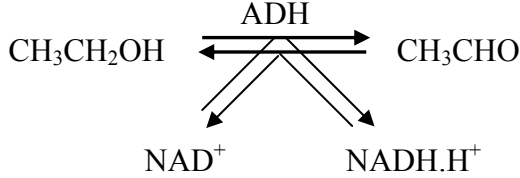
Vücuda alınan alkolün % 90-95 lik kısmı karaciğerde tamamen asetik aside okside olur. Geri kalan kısım ise idrar, nefes ya da ter yolu ile dışarı atılır. Etanolün vücutta temel olarak üç farklı metabolik yolu söz konusudur. Bu yollar; sitozolde yerleşmiş olan alkol dehidrogenaz (ADH) enzim sistemi, endoplazmik retikulumda yer alan mikrozomal etanol oksidasyon sistemi (MEOS) ve peroksizomlarda varolan katalaz enziminin kullanıldığı metabolik yoldur (Buemann and Astrup, 2001)



Şekil 1.3 Etanolün metabolik yıkım yolları

### 1.2.2.1 Alkol dehidrogenaz (ADH) enzim sistemi

Alkol dehidrogenaz (ADH),enzim sisteminin kullanıldığı metabolik yol karaciğerde etanolün % 80 düzeyinde degradasyonunda rol alan en temel metabolik yoldur. ADH aşağıdaki reaksiyon uyarınca etanolü asetaldehide dönüştürür;



ADH'nin 5 farklı geni mevcut olup ADH-2 ve ADH-3 polimorfizm gösterir. Bu genlere sahip kişiler alkol aldıklarında etanolü normalden daha hızlı bir şekilde degradasyona uğratırlar (Ashmarin *et al*, 2000). Özellikle Doğu Asyalı kişilerde bu genlere daha sık bir şekilde rastlanmaktadır.

ADH enzimi ile etanolün degradasyonunda oluşturulan asetaldehid, asetaldehid dehidrogenaz (ALDH) enzimi tarafından toksik etkisi olmayan asetik asite dönüştürülür. ALDH'nin iki majör izoformu mevcut olup bunlardan ALDH-2'nin iki polimorfik formu vardır ve bunlardan biri aktif iken diğeri inaktiftir. Özellikle uzak doğu kökenli insanlar ALDH'nin defektif genine sahip oldukları için alkol aldıklarında metabolizmaları normalden daha yavaş bir şekilde asetaldehidi asetata dönüştürür bu nedenle diğere insanlarla kıyaslama yapıldığında normalde toksik etki yaratmayacak düzeyde alkol aldıklarında bile oldukça ciddi sağlık sorunları ile karşı karşıya kalırlar (Suter *et al.*,1994).

### 1.2.2.2 Mikrozomal etanol oksidasyon sistemi (MEOS)

Vücuda alınan etanolün % 15 - 20'lik bir kısmı endoplazmik retikulumda yerleşmiş olan MEOS sistemince degradasyona uğratılır. MEOS sitokrom P-450'nin bir izoformuna sahiptir (CYP2E1) ve bu sistem tarafından etanolün degradasyonu moleküler oksijen tarafından NADPH'nin oksidasyonu ile ilişkilendirilir. Bir oksijen atomu NADPH'ı

NADP<sup>+</sup>'ye yükseltirken diğer oksijen atomu da etanolün asetaldehide oksidasyonuna katılır , bu iki reaksiyon sonunda her iki oksijen atomu suya indirgenir ve 2 mol su oluşur.

MEOS ile etanol degradasyonu özellikle sürekli alkol kullanmayan kişilerde daha etkin bir rol üstlenir. Bunun yanısıra kronik düzeyde alkol alımlarında mikrozomal etanol konsantrasyonundaki artışla paralel olarak etanolün % 60'lık bir kısmı MEOS ile yıkıma uğratılabilmektedir (Lands, 1995).

### **1.2.2.3 Katalaz enzim sistemi**

Vücuda alınan etanolün yaklaşık %1-2'lik bir kısmı peroksizomlarda yerleşmiş olan katalaz enzimi tarafından dönüşüme uğratılır (Amit *et al.*, 1986). Bu dönüşüm spesifik olmayıp katalaz, vücuda alınan diğer primer alkollerini de aynı şekilde dönüşüme uğratır.

## **1.3 Alkol Tayin Yöntemleri**

Alkol tayini amacıyla uygulanan yöntemleri kromatografik, enzimatik - spektrofotometrik, ve son yıllarda büyük bir aşama kaydetmiş olan biyosensörlere dayalı yöntemler olarak ele almak ve incelemek olasıdır.

### **1.3.1 Kromatografik yöntemler**

Günümüzde alkol tayini amaçlı olarak birçok kromatografik yöntem kullanılmakla birlikte yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC) ve kolon sıvı kromatografisi (CLC) bunların en başında gelen kromatografik yöntemlerdir. Bu kromatografik yöntemler sahip oldukları yüksek düzeydeki duyarlılık ve potansiyel ekipmanları ile oldukça hassas analizlere imkan verebilmektedir. Bununla birlikte, ekipmanların oldukça pahalı olması, aletlerin kullanımının uzmanlık gerektirecek düzeyde dikkat ve itina istemesi ve her laboratuvar şartında uygulanabilirliğinin sınırlı olması gibi faktörler yöntemlerin cazibesini azaltmaktadır.

### **1.3.3.1 Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)**

HPLC klinik kimyada ve klinik toksikoloji laboratuvarlarında alkol tayini amacıyla oldukça sık kullanım alanı bulmaktadır (Tagliaro *et al.*, 1992). HPLC uygulamalarında alkol dehidrogenaz (ADH) ve alkol oksidaz (AO) enzimlerinin de kullanıldığı sistemlerden yararlanılmıştır. Etanol tayini amacıyla ilk HPLC kullanımı kan örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan yöntemde alkol dehidrogenazın katalizlediği reaksiyonda açığa çıkan NADH'ın tespiti esas alınmıştır (Davis *et al.*, 1979).

AO'nun kullanıldığı sistemde kolonda ayrılan alkol immobilize AO tarafından asetaldehide dönüştürülür, oksidasyon bir platin elektrod vasıtasıyla izlenebilmektedir (Tagliaro *et al.*, 1991).

ADH'nin kullanıldığı bir sistemde ise deproteinize edilen alkol örneği ADH-NAD<sup>+</sup> ile zenginleştirilen ortama ilerler, sisteme siklohegzandion katılmasıyla asetaldehidin floresans özellikli bileşiklerinin eldesi ve tespiti yapılır (Pellegrino *et al.*, 1999).

Bir başka HPLC çalışmasında yine ADH-NAD<sup>+</sup> sisteminden yararlanılmıştır. Burada da, etanol asetaldehide dönüştürülürken fenilhidrazin varlığında asetaldehid-fenilhidrazon oluşumu gerçekleşmekte, bu bileşiğin UV absorpsiyonunun tayini ile ters fazlı sıvı kromatografik ayırım yapılmaktadır (Pellegrino *et al.*, 1999).

### **1.3.1.2 Gaz kromatografisi (GC)**

Gaz kromatografisi ile etanol tayini uzun yıllardan beri yapılmakta olup özellikle biyolojik örneklerde etanol tayini amacıyla GC kullanımı otuz yılı aşan bir zaman dilimini işgal etmektedir (Cho *et al.*, 1999).

Doğrudan enjeksiyon ve head-space analizler GC'de başlıca kullanılan tekniklerdir, bununla birlikte head-space analizler kolon ömrü ve enjektör kontaminasyonuna izin vermemesi bakımından daha avantajlı ve tercih edilen tekniktir (Tangermann, 1997).

Cam ve elik kolonların kullanıldığı GC metodlarının yanısıra (Varga *et al.*, 1993) ,kapiler kolonların kullanılmaya başlanmasıyla birlikte GC analizlerinde gerek hassasiyet ve gerekse rezolüsyon açısından önemli avantajlar elde edilmiştir (Macchia *et al.*, 1995).

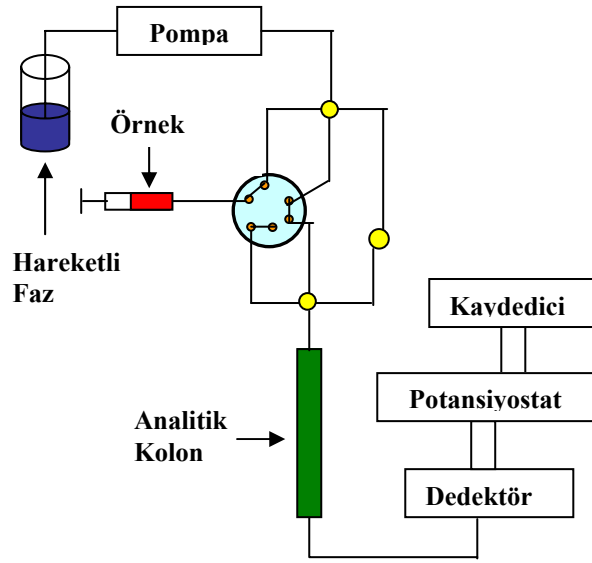
Gaz kromatografisi ile silika poraplot Q kapiler kolonları kullanılarak idrarda etanol tayininin yanısıra (Correa and Pedroso,1997), yine idrar, kan ve serum gibi birtakım fizyolojik sıvılarda hiçbir ön işlem yapılmaksızın doğrudan örneğin enjeksiyonu ile etanol tayinleri de yapılabilir (Tangerman,1997).

### **1.3.1.3 Kolon sıvı kromatografisi (CLC)**

Bu kromatografi tekniğinde alkol tayini için kromatografi sistemiyle entegre olmuş genelde alkol oksidaz ve peroksidaz enzimlerinin inert bir destek materyalinde birlikte immobilize edildiği sensör sistemlerinden yararlanılmaktadır (Marko-Varga,1994).

Hareketli faz olarak tampon çözeltilerinin kullanıldığı bu tür kromatografik sistemlerde, polimer bazlı ayırıcı kolonlarla sıvı kromatografik ayırımlar yapılmakta, ayırım sonrası biyosensör ünitesine gönderilen örnek burada enzimler vasıtasıyla dönüşüme uğratılmakta ve bir kaydedici vasıtasıyla analizler gerçekleştirilmektedir (Johanson *et al.*,1993; Liden *et al.*,1998).

Şekil 1.4'te kolon sıvı kromatografisinin şematize olarak gösterilen çalışma prensibi görülmektedir.



Şekil 1.4 Kolon sıvı kromatografisinin şematik gösterimi (Marko-Varga *et al*,1994)

### 1.3.2 Enzimatik-spektrofotometrik esaslı yöntemler

Enzimatik-spektrofotometrik esaslı alkol tayin yöntemleri genel olarak alkol dehidrogenaz (ADH) ve alkol oksidaz (AO) ile peroksidaz enzimlerinin bir arada iken katalizledikleri renk reaksiyonlarını baz almaktadır.

#### 1.3.2.1 Alkol dehidrogenaz temelli enzimatik-spektrofotometrik yöntemler

Alkol dehidrogenaz (ADH) enzimi metanol dışındaki tüm primer alkolleri dönüşüme uğratar, bununla birlikte reaksiyon çift yönlüdür.



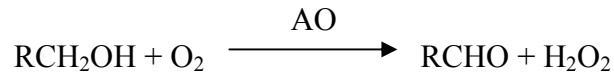
Enzimatik-spektrofotometrik olarak ADH ile alkol tayininde ADH'nin aldehid dehidrogenaz (ALDH) enzimi ile birlikte immobilize edilerek kullanıldığı sistemlerin yanısıra (Jung and Ferard, 1978),  $\text{NAD}^+$  varlığında yine ADH enzimi ile etanolün oksidasyonunu ve nitrozodimetilanilin'in kinondiimine indirgenmesi ve kinondiiminin salisilamid ile etkileşmesi sonucu açığa çıkan mavi indolidin boyar maddesinin absorbansının ölçümüne dayalı oldukça kompleks yöntemler de bulunmaktadır (Kovar *et al.*, 1984).

Alkol tayini için, ADH'nin gözenekli bir camda gliserol dehidrogenaz enzimi ile birlikte immobilize edildiği ve gliserol ile etanolün aynı anda spektrofotometrik olarak tayinine imkan veren akışkan enjeksiyonlu ölçüm sistemleri de mevcuttur (Rangel and Toth, 2000).

ADH temelli enzimatik-spektrofotometrik yöntemler genelde  $\text{NAD}^+$  koenziminin dışarıdan ilavesine, bazan ikinci bir enzime ve oldukça kompleks ve karmaşık reaksiyonlara ihtiyaç göstermesi bakımından dezavantajlara sahiptir ve bu dezavantajlar yöntemin kullanılabilirliğini sınırlandırmaktadır.

### **1.3.2.2 Alkol oksidaz enzimi temelli enzimatik- spektrofotometrik yöntemler**

Alkol oksidaz (AO) enzimi beş karbonlu primer alkollerin tamamını dönüşüme uğratabilmektedir. Reaksiyon ADH enziminin tersine çift yönlü değil tek yönlüdür.



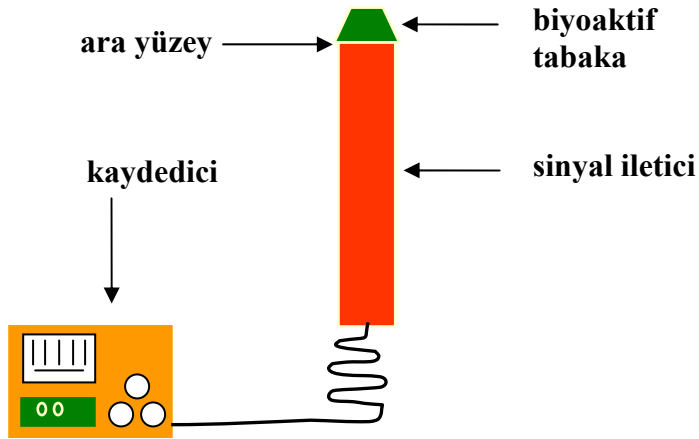
Alkol oksidaz temelli enzimatik-spektrofotometrik alkol tayin yöntemlerinin hemen hepsi reaksiyon sonucu açığa çıkan hidrojen peroksidin peroksidaz enzimi varlığında kromojen maddelerle verdiği renk reaksiyonlarının spektrofotometrik olarak izlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu temel düşünce doğrultusunda AO'nun katalizlediği reaksiyon sonucu açığa çıkan hidrojen peroksidin 4-aminoantipirin ve 3,5-diklorobenzen-sülfonik asit ile peroksidaz varlığında reaksiyona



girmesiyle açığa çıkan kinonimin boyar maddesinin 520 nm de absorbansının ölçümüne dayalı yöntemin yanısıra (Dinçkaya *et al.*,1996), kromojen madde olarak 4-aminofenazon ile kromotropik asitin kullanıldığı (Prencipe *et al.*,1987), 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'nin kullanıldığı (Herzberg and Rogerson,1985) ve hidrojen peroksitin aldehid varlığında p-fenilendiamin ile reaksiyona girmesiyle oluşan ürünün 520 nm. de izlenmesi ile de etanol tayini yapılmıştır (Mizgunova *et al.*,1996).

### 1.3.3 Biyosensör temelli yöntemler

Biyosensörler; enzim,mikroorganizma, doku, organel, hücre gibi biyolojik aktif ya da antikor, antijen veya nükleik asitler gibi reseptör özellikteki materyaller ile elektrokimyasal, magnetik, piezoelektrik, termometrik ya da optik esaslı bir sinyal iletici ve bir kaydedici sistemin entegrasyonu ile oluşan biyoanalitik ölçüm sistemleri olarak tanımlanabilir.

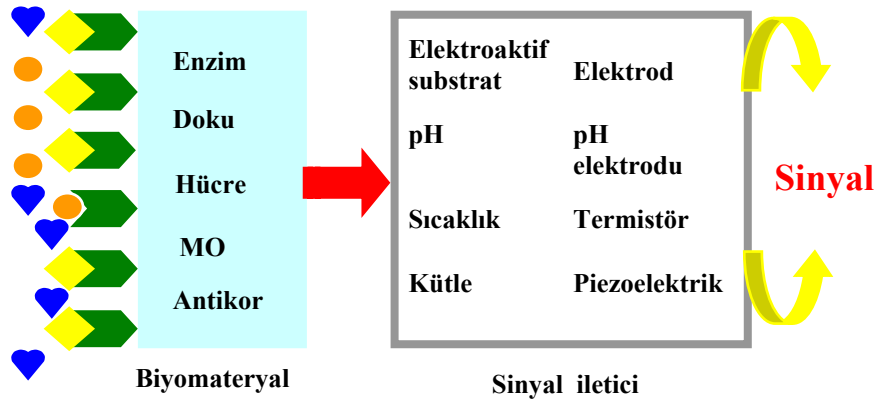


Şekil 1.5 Biyosensörün genel şematik gösterimi

Şekil 1.5'ten de görüleceği gibi biyosensörler; genel anlamda bir biyoaktif tabaka, sinyal iletici sistem ve kaydediciden oluşur. Biyoaktif tabaka; uygun bir sinyal iletim sistemiyle ya da diğer bir deyişle uygun bir sensörle birleştirilen ve analizlenecek maddeyi

tanıma veya spesifik olarak dönüşüme uğratma yeteneğine sahip biyolojik kökenli yapılardır (Dinçkaya, 1997).

Biyosensörlerle yapılan ölçümlerde, belirlenecek olan analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olacak şekilde bir sinyal eldesi sözkonusudur. Bugün biyosensörler çevre, tıp, gıda, proses endüstrisi, kozmetik sanayi, eczacılık ve savunma sistemleri geliştirilmesinde oldukça kapsamlı ve ciddi bir araştırma-geliştirme ve kullanım alanına sahiptir(Habermüller *et al*, 2000; Luong *et al*, 1997; Ayılmaz and Dinçkaya, 2000; Cosnier, 1999)



Şekil.1.6 Biyosensörlerin genel çalışma prensibi

Biyolojik materyallerin spesifikliğinin sinyal ileticilerin ölçüm hassasiyeti ile birleşmesiyle geliştirilen biyosensörlerle doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir düzeyde sonuçlar veren ölçümler yapmak mümkündür.

Çizelge 1.1' de biyoaktif tabakada meydana gelen değişimlerin nasıl bir sinyale dönüştüğü ve bu sinyalin nasıl ölçüldüğüne ilişkin en önemli iletim ve ölçüm sistemlerine ait bilgiler özet halinde verilmiştir .

Çizelge 1.1 Biyosensörlerde kullanılan iletim ve ölçüm sistemleri ve temel bileşenleri ( Dinçkaya, 1999)

---

\* İletim ve ölçüm sistemi

\*\* İlkesi

\*\*\* Temel bileşenleri

---

\* Elektrokimyasal:

-**Amperometrik:** Sabit potansiyelde oluşan akımın ölçümü

\*\* Clark oksijen elektrodu, aracılı enzim elektrodları

\*\*\* C,Pt,Ni,Au,Ag/AgCl,Karbon pasta,elektromediatör vb.

-**Potansiyometrik:** Sabit akımda ve genellikle sıfır akımda potansiyel değişimlerinin ölçümü

\*\* Redoks ve iyon selektif elektrodlar, alan etkili transistörler

\*\*\* Cam,PVC,iyonofor,polimerik enkapsulantlar,silikon vb.

-**Kondüktometrik:** İletkenlik değişimlerinin ölçümü

\*\* Platin ya da Altın elektrodlar

\* Optik:

Optik özelliklerdeki değişimlerin ölçümü (Luminesans, UV/görünür, fiberoptik, kolorimetrik).

\*\* Fotodiyotlar, entegre optik sensörler vb.

\*\*\* Kuartz, cam vb.

\* Akustik:

Akustik özelliklerin ve kütle değişimlerinin ölçümü

\*\* Piezoelektrik kristaller, yüzey akustik dalga cihazları, gravimetrik dedektörler

\*\*\* Kuartz, Si, Au vb.

\*Kalorimetrik:

Sıcaklıklardaki küçük değişimlerin ölçümü

\*\* Termistörler

\*\*\* Metaller, oksitler

---

Alkol tayininin spesifik, hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar verecek düzeyde hemen her laboratuvar şartlarına uyarlanabilen biyosensör sistemleriyle yapılması günümüz şartlarında mümkündür ve geliştirilen biyosensörlerde kullanılan biyomateryallerin genellikle alkol dehidrogenaz, alkol oksidaz ve mikrobiyal temelli oldukları görülmektedir.

### **1.3.3.1 Alkol dehidrogenaz temelli biyosensörler**

Alkol dehidrogenaz (ADH) ,enzimatik- spektrofotometrik alkol tayin yöntemlerine nazaran biyosensör esaslı çalışmalarda daha geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Şekil 1.7 Alkol dehidrogenaz enziminin üç boyutlu yapısı ( Colby *et al.*,1998 )

Etanol tayini amacıyla;  $NAD^+$  koenzimi varlığında ADH'nin o-fenilendiaminin elektropolimerizasyonuna dayalı elektrokatalitik oksidasyonunun etanol konsantrasyonu ile orantılı olacak şekilde izlendiği etanol biyosensörünün yanısıra (Castanon *et al.*,1997) ,yine  $NAD^+$  koenzimi varlığında ADH'nin bir diğer enzim diaforaz ile birlikte immobilize edilerek farklı mediatörler ( organik boyalar, vitamin K, ferrosen, hegzasiyanoferrat(III) ) kullanılmasıyla kompozit bir etanol biyosensörü (Katrlik *et al.*,1998), ADH'nin  $NAD^+$  varlığında sığır serum albumini (BSA) ile karbon pasta içinde immobilizasyonu yolu ile ( Boujtita and El Murr, 1995) , ADH 'in meldola blue (meldola mavisi)

mediatörü ile yine karbon pasta içinde immobilizasyonu ile (Mullor *et al.*,1996), ADH'in mediatör kullanmaksızın karbon pasta içinde immobilizasyonu ile (Boujtita *et al.*,1996), ADH'in BSA ve glutaraldehid kullanılarak modifiye nikelhegzasiyanoferrat mikroband altın elektrodu üzerinde immobilizasyonu ile ( Cai *et al.*,1997 ) , katı bir matriks üzerinde diaforaz ile birlikte BSA kullanılarak immobilizasyonu ile (Miertus *et al.*,1998) ve ince film teknolojisi kullanılarak gaz fazda etanol tayinine imkan veren karbon pasta içinde immobilizasyonu ile hazırlanan ADH biyosensörleri (Park *et al.*,1999) geliştirilmiştir.

### **1.3.3.2 Alkol oksidaz temelli biyosensörler**

Alkol oksidaz (AO) enzimi katalizlediği reaksiyon gereği hem kofaktöre ve hem de genelde mediatörlere ihtiyaç göstermemesi nedeniyle etanol tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesinde çok yoğun bir şekilde kullanım alanı bulmuştur (Guilbault *et al.*,1983; Patel *et al.*, 2001).

Etanol tayini amacıyla; AO'ın ince film teknolojisinden yararlanılarak glutaraldehid ile immobilizasyonuna dayalı (Rüger *et al.*,1991), yine glutaraldehid ile polikarbonat membranda immobilizasyonu yolu ile (Lubrano *et al.*,1991), grafit tozu-epoksi reçinede biokompozit şekline immobilizasyonu ile (Morales *et al.*,1998), kobaltfitalosiyanın ile karbon pasta içinde immobilizasyonu ile (Boujtita *et al.*,2000) sadece alkol oksidaz kullanılarak geliştirilen biyosensörlerin yanısıra, alkol oksidaz ve peroksidaz enzimlerinin birlikte immobilize edilmesiyle geliştirilen biyosensörler de vardır ( Marko-Varga, 1994; Vijayakumar,1996; Matsumoto and Waki,1999; Smyth *et al.*,1999). Bunlara ilave olarak yine esasta alkol oksidazın katalizlediği reaksiyonu baz alacak şekilde etanol tayinine yönelik mantar (*Agaricus bisporus*) doku temelli bir biyosensör de geliştirilmiştir (Akyılmaz and Dinçkaya,2000).

### **1.3.3.3 Mikrobiyal temelli biyosensörler**

Biyosensör geliştirilmesinde en yoğun şekilde kullanılan biyomateryal enzimlerdir. Biyosensör yapımında kullanılan enzimlerin pahalı materyaller olmasının yanısıra bazı saflaştırma proseslerine ve ilave kofaktörlere ihtiyaç göstermesi araştırmacıları alternatif

arayışlarına sevk etmiş ve gerek geniş bir pH ve sıcaklık aralığında çalışabilir olması, gerekse de uzun ömürlü olması yanında ilave kofaktörlere ve pahalı saflaştırma proseslerine gerek duymaması bakımından mikroorganizmaların da kantitatif tayinler amacıyla biyosensör çalışmalarında uygulanabilir olabileceği anlaşılmıştır (D'Souza,2001; Freeman and Lilly, 1998).

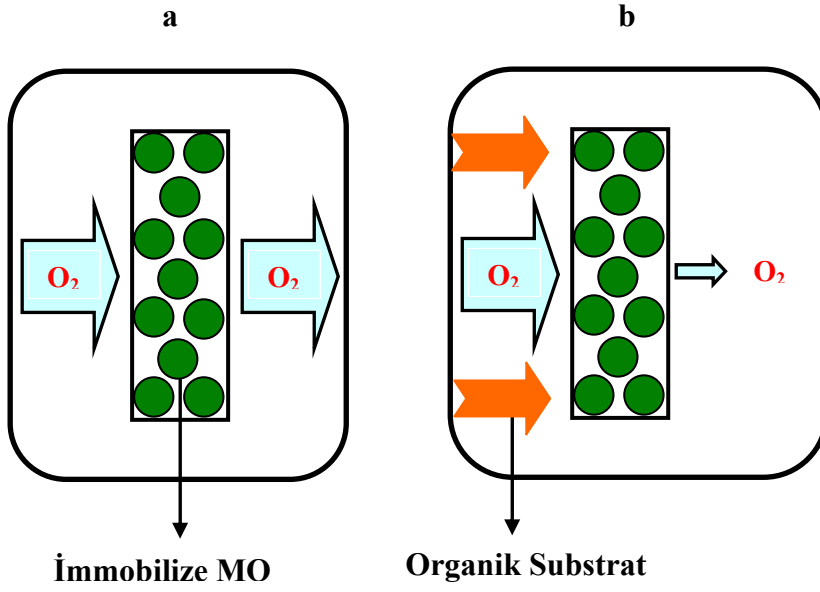
Mikroorganizmaların kullanılmasıyla geliştirilen biyosensörlerle yapılan çalışmalarda alınan umut verici sonuçlar mikroorganizmaların da biyosensör uygulamalarında yoğun bir şekilde kullanımına imkan tanımıştır (Riedel,1989; Svitel, 1998; Gaisford,1991; Heim, 1999; Han *et al.*,2001; Reshelitov *et al.*, 1998).

Çizelge 1.2 Oksijen elektrodu temelli mikrobiyal biyosensörler (Mulchandani and Rogers,1998)

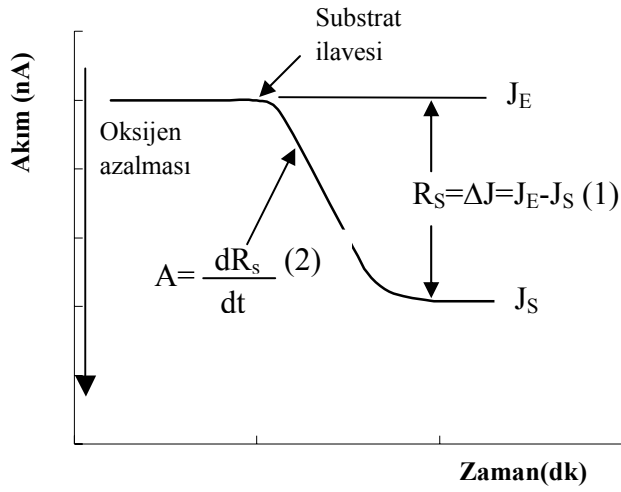
Analit	Mikroorganizma	Ölçüm aralığı (mM)	Cevap zamanı (dk)
Glukoz	<i>S.cerevisiae</i>	0,01-1,0	5-10(s)*
Fruktoz	<i>B.lactofermentum</i>	0,10-1,0	10(s)
Maltoz	<i>B.subtilis</i>	0,05-0,5	0,1(k)**
Asetik asit	<i>T.brassicae</i>	0,08-1,2	8,0(s)
L-glutamik asit	<i>B.subtilis</i>	0,01-0,15	0,1(k)
Aspartame	<i>B.subtilis</i>	0,07-0,6	0,1(k)
Kolesterol	<i>N.erythropolis</i>	0,015-0,13	0,5(k)
L-askorbik asit	<i>E.agglomerans</i>	0,004-0,70	2,5(s)
Kobolamin(B <sub>12</sub> )	<i>E.coli</i>	(5-25).10 <sup>-9</sup>	120(s)
Etanol	<i>T.brassicae</i>	0,05-0,5	10(s)
Metanol	Unidentified bacterium	0,06-0,7	10(s)
NH <sub>3</sub>	Nitrifying bacteria	0,005-2,5	4(s)
NO <sub>2</sub>	Nitrifying bacteria	0,15-5,0	3(s)
CO <sub>2</sub>	<i>Pseudomonas</i>	0,2-5,0	2-3(s)
Ürik asit	<i>A.tennis</i>	0,025-0,5	1(s)
Fosfat	<i>C.vulgaris</i>	8,0-70,0	1(s)

\* Son nokta ölçümü , \*\* Kinetik ölçüm

Şekil 1.8 ve Şekil 1.9'da sırasıyla oksijen elektrodunda mikrobiyal biyosensörün çalışma prensibi ve mikrobiyal biyosensörlerde ölçüm prensibi gösterilmiştir.



Şekil 1.8 Oksijen elektrodunda mikrobiyal biyosensörün çalışma prensibi (**a**:substrat yokken, **b**:substrat varlığında).



Şekil 1.9 Mikrobiyal biyosensörlerde ölçüm prensibi; (1) Son nokta ölçümü, (2) Kinetik ölçüm. (R=Solunum hızı) (Mulchandani and Rogers, 1998).

Şekil 1.8'den de görüldüğü gibi mikrobiyal biyosensörlerde iki temel faktörü baz alarak ölçüm yapmak mümkündür. Bunlar, ortamda substrat yok iken mikroorganizmanın solunum hızıyla doğru orantılı olarak başlangıçta elde edilen akımın; substrat ilavesi ile başlayıp substratın tamamen dönüşüme uğratıldığı ana kadar geçen zaman dilimindeki değişiminin izlendiği son nokta ölçümü ve yine substrat ilavesi ile başlayıp substratın tamamen dönüşümüne kadar ki solunum hızının zamanla değişiminin tespitine dayanan kinetik ölçümlerdir (Mulchandani and Rogers, 1998).

Bu iki yöntem arasında son nokta ölçümleri daha çok tercih edilen ve kullanılan yöntemdir.

Etanol tayini amacıyla mikrobiyal biyosensör geliştirilmesinde farklı mikroorganizma türlerinden yararlanılmıştır. *Trichosporon brassicae* bakterisi etanol tayini amacıyla mikrobiyal biyosensör geliştirilmesinde kullanılan ilk mikroorganizmalardandır (Hikuma *et al.*,1979; Karube *et al.*,1980).

*Acetobacter aceti* bakterisinin kullanıldığı bir diğer çalışmada, mikroorganizmanın içerdiği alkol dehidrogenaz ve aldehid dehidrogenaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlara dayalı olarak etanol tayini gerçekleştirilmiştir (Kitagawa *et al.*,1987).

Metalotropik mutant *Hansenula polymorpha* ve *Pichia pinus* maya hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada pH duyar alan etki transistörü ile etanol ve metanol tayinleri 0,5 mM'lık bir duyarlılıkta yapılabilmektedir (Korpan *et al.*,1992).

Yine mutant *Hansenula polymorpha* maya hücrelerinin kullanımı ile geliştirilen biyosensörle metanol ve etanol tayini gerçekleştirilmiştir (Gonchar *et al.*,1998).

Bunların dışında etanol tayini amacıyla *Gluconobacter suboxydans* bakterisinin (Kitagawa *et al.*,1987; Reshelitov *et al.*,1998) ve *Pichia methanolica* maya hücrelerinin kullanıldığı (Reshelitov *et al.*,2001) mikrobiyal biyosensörler de geliştirilmiştir.



## 1.4 Alkol Tayininde Kullanılan Biyomateryallere Genel Bakış

### 1.4.1 Alkol oksidaz

Alkol oksidaz ( EC 1.1.3.13 ) alifatik alkollerin ve özellikle beş karbona kadarki primer alkollerin moleküler oksijen varlığında oksidasyonunu katalizleyen ve genellikle maya türü mikroorganizmalarca sentezlenen bir enzimdir (Maskevich *et al.*,1997). İlk defa Janssen ve arkadaşlarınca bir *basidiomycete*'de bulunmuştur (Kato *et al.*, 1976).

Şekil 1.10 Alkol oksidaz enziminin üç boyutlu yapısı ( Rodriguez *et al.*,1998)

Enzim, peroksizomal homooligomerik bir flavoprotein olarak bilinir (Ashin and Trotsenko,2000). Enzimin sekiz altbirimide non-kovalent olarak bağlı bir FAD içerir ve altbirimlerin herbiri yaklaşık 74 kD'dur. Alkol oksidaz monomerleri sitozoldeki serbest polizomlarda sentezlenir ve bunların olgun formları peroksizomlara aktarılır (Waterham *et al.*,1997).

Alkol oksidaz ışığa duyarlı bir enzim olup ışık altında aktivitesini büyük oranda kaybetmektedir . Bunun kesin bir nedeni bilinmemekle birlikte ,enzimin moleküler özelliklerinden ya da ışık

uyarımı ile membranda meydana gelen zararlı radikallerin enzim molekülü üzerindeki geri dönüşümsüz etkisinden kaynaklanabileceği görüşleri hakimdir (Dickinson and Wadforth.,1992).

Alkol oksidaz diğer flavoprotein türü enzimlere nazaran sadece oksijen varlığında rejenere olan bir enzim olup püroksidaz olarak bilinmektedir (Geissler *et al.*,1986). Bu özelliği flavoprotein enzimlerle geliştirilen biyosensörlerde uygulanabilen mediatör sistemlerinin bu enzim içinde kullanılmasını imkansız kılmaktadır.

Son yıllarda alkol oksidaz enzimi üzerine yapılan çalışmalarda enzimin FAD yanında FAD 'nin modifiye bir analogu olan mFAD de içerdiği ve mFAD'nin FAD'den farklı olarak ikinci karbon atomundaki hidroksil grubunun stereo pozisyonunun ters olduğu bulunmuştur (Ashin and Trotsenko,1998). mFAD'nin oluşumunun sebebinin bir biyosentezden ziyade alkol oksidazın aktif merkezindeki FAD de kendiliğinden meydana gelen bir modifikasyon olabileceği öne sürülmektedir (Bystrylch *et al*,1991) .

#### **1.4.2 Katalaz**

Katalaz (EC 1.11.1.6) peroksizomlarda yerleşmiş olan ve hücreyi hidrojen peroksitin toksik etkisinden korumak amacıyla bu maddeyi suya ve moleküler oksijene dönüştüren bir enzimdir (Eventoff,1976).

Enzimin katalizlediği reaksiyonun mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte enzim molekülünün tetramer yapıda olduğu, altbirimlerin birbirine benzer ve 220.000 ile 350.000 kD arasında olduğu bilinmektedir.

Şekil 1.11 Katalaz enziminin üç boyutlu yapısı ( Ko *et al.*,1999)

Enzimin herbir monomeri aktif merkezinde bir prostetik grup içerir. Dokulardaki katalaz aktivitesi çeşitlilik gösterir, karaciğer ve böbrekte en yüksek düzeydedir. Enzimin temel olarak katalizlediği reaksiyon yanında vücuda alınan etanolün yaklaşık % 2,0'lik bir kısmının peroksizomlardaki katalaz tarafından degrade edildiği ve özellikle beyin katalaz aktivitesinin etanolün bu degradasyonunda oldukça önemli etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Aragon *et al.*,1991; Hamby-Mason *et al.*,1997).

### 1.4.3 *Candida tropicalis*

*Candida tropicalis* candida grubundaki bir maya hücresi olup insanlar için patolojik etkilere sahip bir mikroorganizmadır. Bununla birlikte endüstride özellikle uzun zincirli dikarboksilik asitlerin, parfüm, polyester ve poliamidlerin üretilmesinde *C.tropicalis* hücrelerinden sıklıkla yararlanılmaktadır (Blandin *et al.*,2000).

*C.tropicalis* hücrelerinden gıda endüstrisinde de ksilozdan ksilitol eldesinde yararlanılmaktadır (Latif and Rajoka,2001). Bu maya türü özellikle peroksizomal enzimlerin üretimi ve bu enzimlere dayalı tayin yöntemleri ve tayin sistemleri geliştirilmesinde oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir (Kanai *et al.*,2000).

### 1.4.4 Jelatin

Jelatin, kollajenin hidroliziyle elde edilen bir proteindir ve karakteristik olarak yapısında yüksek oranda glisin, prolin ve hidroksiprolin amino asitlerini içerir. Bu amino asitler jelatinin üçlü

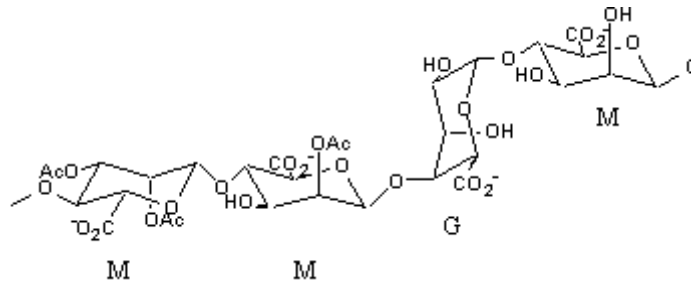
heliks bir yapı oluşturmasında ve jelleşme özelliği kazanmasında oldukça etkilidir ( Rose *et al.*, 1987 ).

Ucuz ve kolay bulunur olması yanında, immobilizasyon materyali olarak kullanılan diğer polisakkaritlerin aksine jel oluşumu için herhangi bir moleküle, iyona, tuza ya da pH ayarlamasına gerek duymaması jelatinin enzim, hücre ve doku immobilizasyonunda sıklıkla tercih edilmesini sağlamaktadır.

Termal ve mekanik kararlılığının artırılması amacıyla immobilizasyonda çoğunlukla çapraz bağlayıcı bir reaktif olan glutaraldehid ile birlikte kullanılır ( Scardi, 1987; Espisito *et al.*, 1995; Bigi *et al.*, 2000).

#### 1.4.5 Aljinat

Aljinat, 1,4- $\beta$ -D-mannuronik asit ve  $\alpha$ -L-guluronik asitten oluşan bir polisakkarittir. Sodyum, amonyum ve diğer alkali metallere suda çözünür tuzları oluşurken  $Ca^{2+}$  gibi divalent katyonlar ile verdiği tuzlar suda çözünmez . Bu özelliği aljinatın suda çözünmez bir immobilizasyon materyali olarak kullanılmasını sağlar (Cosnier *et al.*, 2002).



Şekil 1.12 Aljinatın yapısı

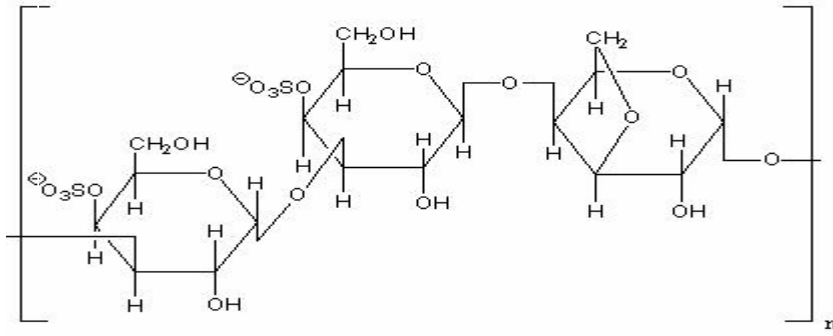
Yapısal ve molekül kütlesi bakımından birbirinden farklı aljinat türleri varolup aljinatın içerdiği L-guluronik asit oranının fazlalığı divalent katyonlarla daha sağlam jel oluşturmasını sağlar. Aljinat immobilizasyon materyali olarak bitki dokusu, enzim ve hücre

immobilizasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır ( Becerra *et al.*,2001; Curtis *et al.*, 1995).

#### 1.4.6 $\kappa$ -karrajenan

$\kappa$ -karrajenan polisakkarit yapısında bir biyopolimer olup yapısında  $\beta$ -D-galaktozülfaat ve 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galaktoz birimleri bulunmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda kendiliğinden oluşan bir katlanma gösterir ve tekrar soğutulduğunda konformasyonel bir değişimle çift heliksli bir yapı oluşturur (Hjerde *et al.*, 1999)

$\kappa$ -karrajenanın çift heliksli bu yapısı bazı spesifik katyonlar varlığında etkileşime girerek agregatlaşır ve jelimsi bir yapı meydana gelir (Michel *et al.*,1997). Karrajenanın bu özelliğinden, gıda (Ramakrishnan and Prud'homme, 2000) ve ilaç sanayiinde (Picker,1999) stabilize ve jel oluşturucu ajan olarak kullanılmasıyla yararlanır.



Şekil 1.13  $\kappa$ -karrajenanın yapısı

$\kappa$ -karrajenan, genelde enzim ve hücre immobilizasyonunda kullanılan bir biyopolimerdir (Campanella *et al.*, 1999; Gardin and Pauss, 2001).

#### 1.4.7 Glutaraldehid

Glutaraldehyd, özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan bifonksiyonel bir reaktiftir.

Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan biyoaktif materyallerin (enzim, hücre, doku, vb.), jelatin, kollajen, kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehyd ile çapraz bağlar oluşturması esasına dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadır ( Guilbault and Kauffmann, 1987; Scouten *et al.*, 1995). Yöntem kolay uygulanabilir olması yanında immobilize sistemin termal ve operasyonel aynı zamanda da depo kararlılığını artırması bakımından tercih edilmektedir.

Mikroorganizmalar için toksik etki göstermesine rağmen biyoaktif sisteme kazandırdığı avantajlardan dolayı % 1,0'in altındaki konsantrasyonlardaki glutaraldehydin kullanılmasıyla hücre immobilizasyonları da gerçekleştirilmektedir ( Hemachander *et al.*, 2001).

## 2. MATERYAL VE METODLAR

### 2.1 Materyal

Çalışmanın deneysel kısımlarında kullanılan araç-gereç ve kimyasallar aşağıda verilmiştir.

#### Araç-Gereçler:

- Hettich Universal 30 RF Model Santrifüj (Almanya)
- Heto Kriyostat (Birkerod-Danimarka)
- YSI Model 57 Oksijenmetre ( A.B.D )
- YSI 5700 Serisinden Çözünmüş Oksijen Probları (A.B.D)
- Pharmacia LKB.Novaspec II Spektrofotometre (İngiltere)
- Gilson P100 ve P1000 Otomatik Pipetleri (Fransa)
- Stuart Scientific, Linear Shaker Bath SBS 35 Su Banyosu (İngiltere)
- Ultrathermostat (Colora-Almanya)
- Bronson Sonic Power Company, Sonifier B-12 ( Danburg/Connecticut-A.B.D)
- Hirayama Hiclave HVE-50 Otoklav (Japonya)
- G-24 Environmental Incubator Shaker (İngiltere)

#### Kimyasallar:

- Amonyum sülfat, Asetik asit, Dipotasyum hidrojen fosfat, Potasyum dihidrojen fosfat, Bakır sülfat, Tris-(hidroksimetil amino metan), Trietanolamin, Maleik asit, Glutaraldehid (%25), Hidroklorik asit, Sodyum hidroksit, L-Askorbik asit, Sitrik asit mono hidrat, Sodyum dihidrojen fosfat, Glisin, Sodyum karbonat,

Glukoz, Metanol, Etanol, Propanol, Bütanol, İzo-propanol, Etilenglikol, Dietilenglikol, Hidrojen peroksit, Kalsiyum klorür, Potasyum klorür ve Sodyum-potasyum tartarat E.Merck (Darmstadt-Almanya) firmasından sağlanmıştır.

- Alkol oksidaz (*C.boydii* 1,3 U/mg katı preparat), Katalaz (Horse liver,2800 U/mg katı preparat), Peroksidaz (Horse radish,116 U/mg katı preparat), Aljinik asit sodyum tuzu, κ-karrajenan, ABTS (2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) ve Sodyum dodesilsülfat Sigma (St.Louis-A.B.D) firmasından sağlanmıştır.

- Liyofilize *C.tropicalis* Suşları JCM ( Japan Collection of Microorganisms, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) (Wake-Shi, Saitama,351-0198-Japonya) tarafından sağlanmıştır.

## 2.2 Metodlar

### 2.2.1 Protein tayini

*C.tropicalis* maya hücrelerinde sentezlenmesi hedeflenen ve intraselüler bir enzim olan alkol oksidaz enziminin protein içeriğinin tayini amacıyla hücrelerin sonifikatörde parçalanması ve enzimin hücre dışına çıkarılması sonrası iki kez yıkama ve santrifüj işlemlerinden sonra modifiye Lowry metodunun kullanılmasıyla (Lowry *et al.*,1951) protein tayini gerçekleştirildi.

#### Reaktif Çözeltileri;

Reaktif I - % 2,0'lik  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   
 Reaktif II - % 2,0'lik K/Na Tartarat  
 Reaktif A - %2,0'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,1 M NaOH içinde)  
 Reaktif B - 1,0 ml Reaktif I ve 1,0 ml Reaktif II alınır Reaktif A ile 100 ml'ye tamamlanır.

Folin Reaktifi - Stok Folin 1:1 oranında distile su ile seyreltilir.

#### Standart Çözeltiler;

1) Stok Sığır Serum Albumin (BSA) – 100 mg'ı 10 ml distile suda çözülür (10 mg/ml).



- 2) Çalışma Standart Çözeltileri : 0,02; 0,05; 0,10; 0,15 ve 0,20 mg/ml olacak şekilde hazırlanır.

Ölçümler aşağıda verilen tabloya uygun olarak gerçekleştirildi.

Çizelge 2.1 Protein Tayini

İşlem Sırası	İşlem
1	Standart çözeltilerin ve bilinmeyen protein örneğinin 0,5 ml'si ve kör için 0,5 ml distile su tüplere pipetlenir.
2	Reaktif B'nin 2,5 ml'si her tüpe ilave edilir ve vortekste karıştırılır. Karışım oda sıcaklığında 10 dk. Beklemeye bırakılır.
3	0,25 ml Folin reaktifi her tüpe eklenir ve tüpler vortekste karıştırılır.
4	Tüpler 30 dk. oda sıcaklığında beklemeye bırakılır.
5	660 nm.de her tüpün köre karşı absorbanası okunur.

### 2.2.2 *C.tropicalis* hücrelerinden alkol oksidazın izolasyonu

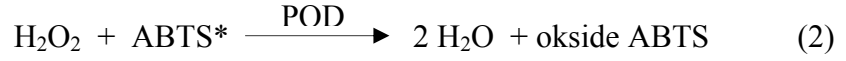
*C.tropicalis* kültür ortamından saat başı alınan hücre örnekleri + 4<sup>0</sup>C'de ve 2500 rpm'de 10 dk. santrifüjlendi. Santrifüj sonrası çöken hücreler pH:7,0 fosfat tamponu ile yıkanarak tekrar santrifüjlendi. Bu şekilde hücrelerin kültür ortamı bileşenlerinden uzaklaştırılması hedeflenmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen hücreler 1,0 ml pH:7,0 fosfat tamponu ile yıkandı ve intraselüler bir enzim olan alkol oksidazın eldesi için hücreler + 4<sup>0</sup>C'de soğuk odada 1 dk. süresince sonifikatör ile sonifikasyona tabi tutuldu.

Sonifikasyon sonrası hücreler + 4<sup>0</sup>C'de ve 5000 rpm'de 10 dk. santrifüjlendi. Bu şekilde saat başı alınan herbir hücre örneğinden elde edilen alkol oksidaz enzim preparatlarında aktivite ve protein tayinleri gerçekleştirildi.

### 2.2.3 Aktivite Tayini

*C.tropicalis* hücrelerinden elde edilen alkol oksidaz (AO) enzim preparatlarında aktivite tayini modifiye alkol oksidaz aktivite tayini prosedürü (Sigma Kalite Kontrol Test Prosedürü, Sigma Ürün No: A0438, A2404, A6941) uyarınca gerçekleştirildi.

Aktivite tayininde izlenen yöntemin prensibi aşağıdaki reaksiyonlara dayanmaktadır;



\*ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)

POD : Peroksidaz

Alkol oksidazın katalizlediği ilk reaksiyonda oksijen varlığında etanolden oluşan hidrojenperoksit ikinci reaksiyonda ABTS ile peroksidaz (POD) varlığında reaksiyona girmekte ve reaksiyon sonunda ABTS'nin okside formu ile 2 mol su açığa çıkmaktadır.

#### **Reaktif Çözeltileri;**

- Reaktif A : Fosfat tamponu ( 100 mM, pH:7,5 )
- Reaktif B : 2,0 mM ABTS ( Fosfat tamponu içinde (pH:7,5;100 mM) ve günlük olarak taze hazırlanır.)
- Reaktif C : % 0,003'lük hidrojenperoksit
- Reaktif D : % 1,0'lik etanol
- Reaktif E : Peroksidaz enzim çözeltisi ( 250 U/ml )
- Reaktif F : Alkol oksidaz enzim çözeltisi ( 1,0 U/ml standartlar için ), ( *C.tropicalis*'ten izole edilen AO preparatları için direkt 0,1 ml alınır )

Çizelge 2.2 Alkol oksidaz enzimi aktivite tayini

Reaktifler	Kör (ml)	Örnek (ml)
Reaktif B ( ABTS )	2,80	2,80
Reaktif E ( POD )	0,01	0,01
405 nm'de absorbans	sabit kalıncaya kadar	beklenir.
Reaktif A ( Tampon )	0,10	–
Reaktif F ( AO )	–	0,10
Reaktif C ( H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	0,01	0,01
405 nm'de absorbans	sabit kalıncaya kadar	beklenir
Reaktif D ( Etanol )	0,10	0,10
Kör ve örneklerin 3dk.	405 nm'de absorbans	artışı izlenir.

**Hesaplamalar;**

$$\text{Unit/ml enzim} = \frac{[\Delta A_{405}(\text{örnek}) - \Delta A_{405}(\text{kör})].3,02.(sf)}{(36,8 \cdot 0,1)}$$

- 3,02 : Toplam tüp hacmi  
(s.f) : Seyrelme faktörü  
36,8 : ABTS için milimolar ekstinksiyon katsayısı  
0,1 : Kullanılan enzim hacmi

Aktivite standart grafiğinin eldesinde 0,302 $\mu$ mol ile 1,510  $\mu$ mol arasında değişen konsantrasyonlardaki etanol standartları kullanıldı.

Her bir standarda ilişkin  $\Delta A_{405}$  değeri ile standartların  $\mu$ mol değerleri arasında çizilen standart grafik yardımı ile hesaplamalar gerçekleştirildi.

**2.2.4 C.tropicalis kültür ortamı**

Mikrobiyal biyosensör geliştirilmesi amacıyla kullanılacak olan liyofilize haldeki *C.tropicalis* hücrelerinin kültür ortamına alınmadan önce 25<sup>0</sup>C'de pH'ı 6,2'ye ayarlı ve içerisinde glukoz(10 g/l), pepton(5 g/l), maya ekstraktı (3 g/l), malt ekstrakt(3 g/l) ve agar (20 g/l) ihtiva

eden YM (Yeast Medium) agarda 24 saat boyunca aktivasyonu gerçekleştirildi . Aktivasyon sonrası aşılama işlemine geçildi. Bu amaç doğrultusunda hücrelerin, 250 ml'lik erlen içerisinde 50 ml olacak şekilde, etanol içermeyen kültür ortamında, 25<sup>0</sup>C'de ve 200 rpm'de kesikli çalkalamalı kültürler halinde 24 saat boyunca inkübasyona bırakılarak üremeleri sağlandı. 24 saatlik süre sonunda fermentasyon ortamına geçildi. Bunun için %2,0'lik aşı ve içerisinde maya ekstraktı (3g/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (3g/l), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (3g/l), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10g/l), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5g/l), CaCl<sub>2</sub> (0,1g/l), pepton (0,5 g/l), glukoz (5g/l), KCl(1g/l) ve sterilize edilen etanolü (30 ml/l) içerecek şekilde kültür ortamının 50 ml'si 250 ml'lik erlene ilave edildi. 25<sup>0</sup>C'de 200 rpm'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

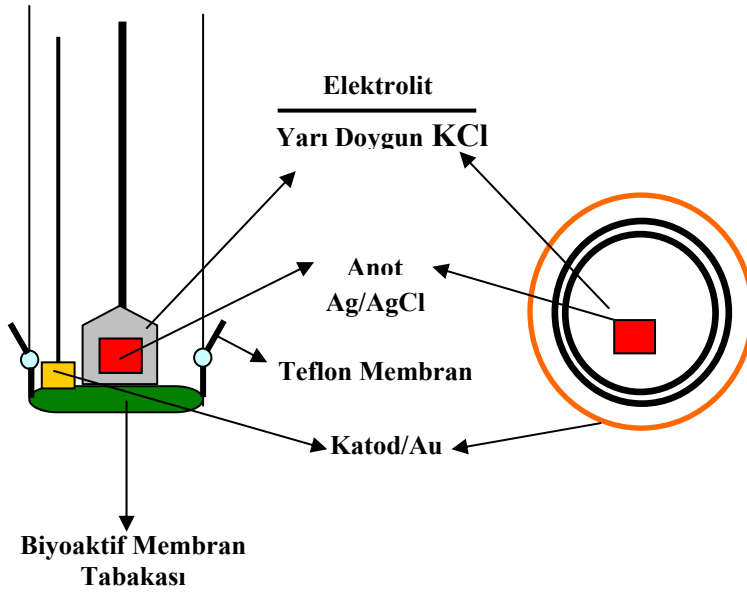
### **2.2.5 *C.tropicalis* büyüme eğrisinin belirlenmesi**

Kültür ortamından başlangıç anında ve bir saat aralıklarla alınan hücre örneklerinde canlı hücre sayımı yapılarak CFU(Colony Forming Unit) değerleri zamana karşı grafiğe geçirildi. Bu şekilde *C.tropicalis* hücrelerinin büyüme eğrisi oluşturuldu. Spesifik üreme hızı sabit ve maksimum olan (Telefoncu, 1995) logaritmik fazdaki hücrelerin kültür ortamından izolasyonu sonrası,hücrelerin alkol oksidaz aktivitesi ve protein tayinleri yapılarak mikrobiyal temelli biyosensör hazırlanması için en uygun hücre örnekleri belirlendi.

### **2.2.6 Çözünmüş oksijen probunun çalışma ilkesi**

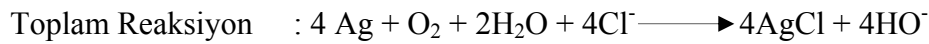
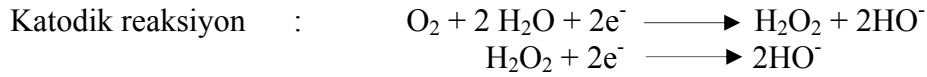
Çözünmüş oksijen problemleri amperometrik esaslı olup katod olarak altın (Au), anot olarak Ag/AgCl (Referans elektrot) ve elektrolit olarak da yarı doygun KCl çözeltisi içerir.

Prob yüzeyi 0,0005" kalınlığında oksijene duyar bir teflon membran ile çevrelenir (Dinçkaya and Telefoncu,1993). Membran, gaz geçirgenliğinin yanı sıra sensörün dış çevreden korunmasına da olanak sağlar bu korunma sayesinde reaksiyon ortamında olabilecek bir takım safsızlıklardan kaynaklanması muhtemel girişim etkileri de minimize edilmiş olmaktadır.

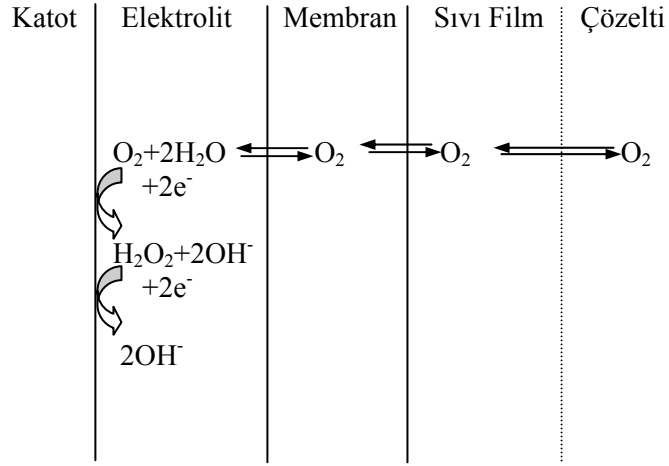


Şekil 2.1 Çözünmüş oksijen probunun şematik gösterimi

Sensöre polarize edici bir voltaj uygulandığında, membranı geçen oksijen katotta bir akım doğuracak şekilde reaksiyon verir. Polarografik esaslı olarak gerçekleşen toplam elektrot reaksiyonlarını aşağıdaki gibi özetlemek mümkündür;



Şekil 2.2’de oksijenin reaksiyon ortamından katoda doğru ilerlerken karşılaştığı difüzyon engelleri görülmektedir.

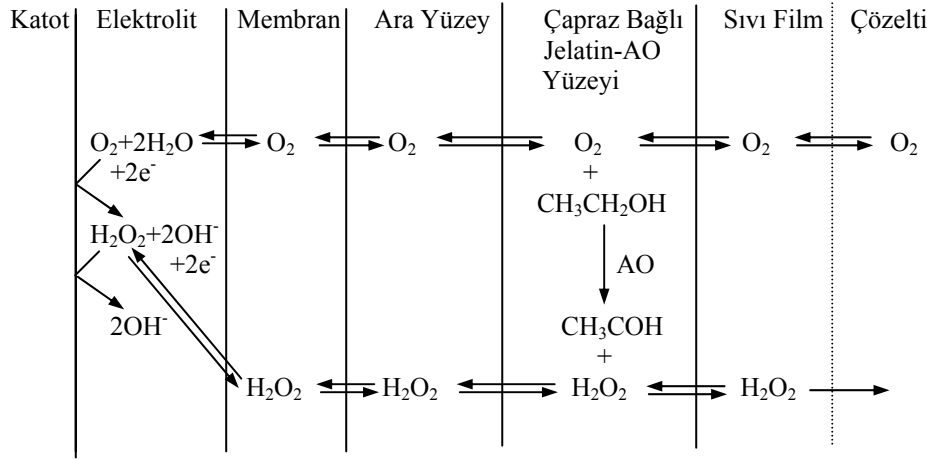


Şekil 2.2 Çözünmüş oksijen probunda oksijenin reaksiyon ortamından katoda ulaşana kadar karşılaştığı difüzyon engellerinin şematik gösterimi

Katoda doğru difüzlenen oksijene etkiyen kuvvet membran dışındaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu ile orantılıdır. Oksijen basıncının artmasıyla membrana doğru difüzlenen oksijen miktarı da artacak ve ortamdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu ile ilişkili olarak daha yüksek düzeyde bir akım elde edilecektir.

### 2.2.7 Alkol tayinine yönelik çözünmüş oksijen probu temelli alkol oksidaz biyosensörünün çalışma ilkesi

Alkol oksidaz enziminin kullanılmasıyla hazırlanan biyosensör ile okunan oksijen konsantrasyonu, prob membranı ile biyoaktif tabaka arasındaki ara yüzey olarak bilinen bölgedeki çözünmüş oksijen konsantrasyonudur.



Şekil 2.3 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörünün kuramsal modeli (Dinçkaya, 1991)

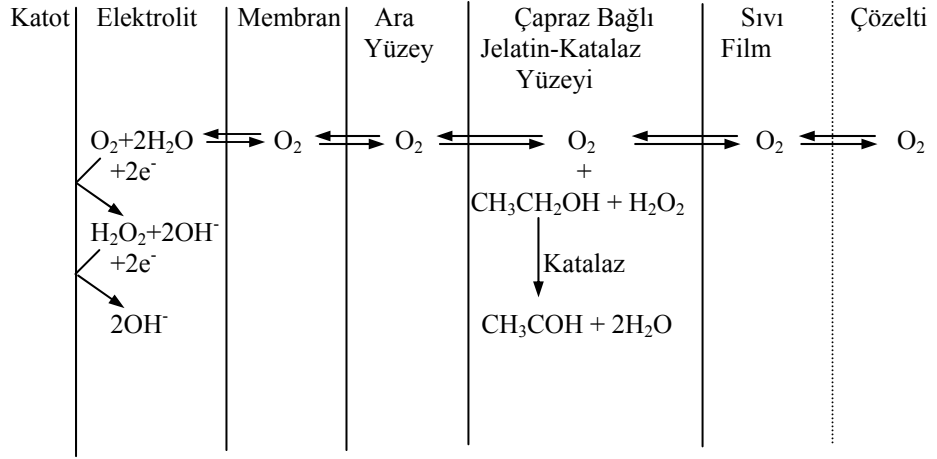
Reaksiyon ortamında substrat yok iken arayüzey oksijen konsantrasyonu oksijenmetreden mg/l olarak belirlenir. Reaksiyon ortamına substrat ilavesi yapıldığında gerçekleşen enzimatik reaksiyon uyarınca alkol oksidaz etanolü hidrojenperoksit ve asetaldehide dönüştürür. Bu durumda katottaki sürekli oksijen indirgenmesi sonucu arayüzeyden proba doğru oksijen difüzyonu devam ederken biyoaktif tabakadan arayüzeye difüzlenen oksijen konsantrasyonunda bir azalma meydana gelir. Bunun sonucu olarak, her iki membranın iç ve dış yüzeylerindeki oksijen basıncında farklılıklar oluşur ve ilave edilen etanol konsantrasyonu ile orantılı olacak şekilde yeni bir denge kurulması kısa bir süre içinde gerçekleşir.

Her iki denge arasındaki çözülmüş oksijen konsantrasyonu farkı oksijenmetrede  $\Delta\text{ÇO}(\text{mg/l})$  olarak tespit edilir. Substrat konsantrasyonu arttıkça biyoaktif tabakada daha fazla oksijen harcanacak ve dolayısıyla arayüzey çözülmüş oksijen konsantrasyonunda daha fazla azalma gözlenecektir. Bu sonuç, oksijenmetrede substrat konsantrasyonunun artışıyla birlikte daha yüksek  $\Delta\text{ÇO}(\text{mg/l})$  değerleri elde edilmesine neden olacaktır.

Bu şekilde elde edilen  $\Delta\text{ÇO}(\text{mg/l})$  değerleri ile etanol standart çözeltilerinin konsantrasyonları arasında çizilen grafiklerden

konsantrasyonu bilinmeyen etanol içeren örneklerin etanol konsantrasyonunun tespiti de yapılabilmektedir.

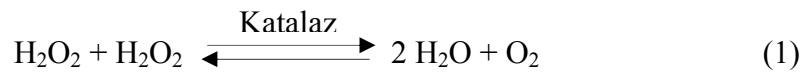
### 2.2.8 Alkol tayinine yönelik çözülmüş oksijen probu temelli katalaz biyosensörünün çalışma ilkesi



Şekil 2.4 Jelatin tabanlı katalaz biyosensörünün kuramsal modeli (Akyılmaz, 1996)

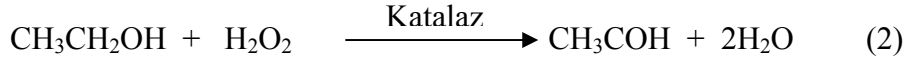
Alkol tayinine yönelik çözülmüş oksijen probu temelli katalaz biyosensörünün çalışma ilkesi alkol oksidaz biyosensörü ile aynı olmakla birlikte burada reaksiyon ortamında hidrojenperoksitin ön ve etanolün de ikinci substrat olarak birbiri ile ilişkili iki reaksiyon adımı katalaz tarafından dönüşüme uğratılması söz konusudur.

Ortama ilk önce ilave edilen hidrojenperoksitin katalaz tarafından su ve oksijene dönüştürülmesi ile arayüzey denge oksijen konsantrasyonunda önce bir artış meydana gelir, bu artış ile birlikte birkaç dakika içinde yeni bir ara yüzey çözülmüş oksijen konsantrasyonu dengesi kurulur.



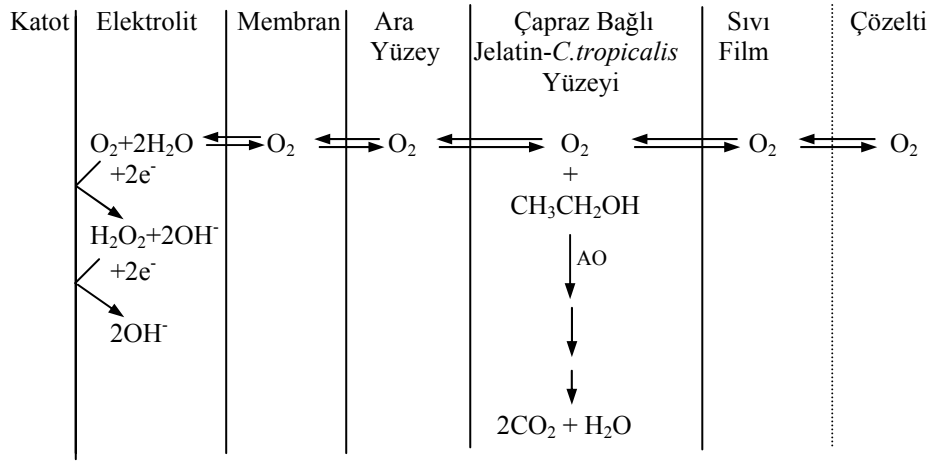
Ortama etanolün ilavesi ile katalaz ( 1 ) nolu reaksiyonun yanısıra,





(2) reaksiyonunu da katalizleyecektir. Bu ilke çerçevesinde ilk biyoaktif tabakada var olan hidrojen peroksitin ikinci reaksiyon ile bir yarışmaya maruz kalması yeni bir dengenin oluşumuna yol açacak ve bu durum etanol konsantrasyonuna bağlı olarak oksijen konsantrasyonunda bir düşme ile sonuçlanacaktır.

### 2.2.9 Alkol tayinine yönelik çözünmüş oksijen probu temelli mikrobiyal biyosensörün çalışma ilkesi



Şekil 2.5 Jelatin tabanlı mikrobiyal biyosensörün kuramsal modeli

*C.tropicalis* temelli mikrobiyal biyosensörle alkol tayininde temel prensip; *C.tropicalis* hücrelerinin ortama substrat ilavesinden önce ve substrat ilavesinden sonraki solunum aktivitesindeki farklılıktan yararlanarak, etanol konsantrasyonu ile orantılı olacak şekilde oluşan ara yüzey oksijen konsantrasyonunun belirlenmesine dayanmaktadır.

Ortamda etanol yok iken hücreler oksijeni sadece solunum amaçlı olarak kullanmaktadır bununla birlikte ortama etanol ilave edildiğinde hücreler bu substratı içerdikleri alkol oksidaz enzimi ile bir

karbon kaynağı olarak metabolize ederler ve bunun sonucu olarak ara yüzey oksijen konsantrasyonunda bir azalma gözlenir.

Ara yüzey çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki azalma ortama substrat olarak ilave edilen etanolün konsantrasyonu ile doğru orantılı olacak şekilde bir artış gösterir. Konsantrasyon artışıyla birlikte hücrelerin metabolizması da artacağı için tüketilen oksijen miktarının artması beklenen ve normal bir sonuç olarak düşünülebilir.

Bu temel düşünce doğrultusunda bilinmeyen örneklerde etanol konsantrasyonu tayini amacıyla, geliştirilen *C.tropicalis* temelli mikrobiyal biyosensör yardımıyla oksijenmetrede ölçülen ara yüzey çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki değişimin  $\Delta\text{CO}$  (mg/l) , etanol konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen standart grafiklerden yararlanıldı.

### **2.3 Alkol Tayinine Yönelik Alkol Oksidaz Temelli Biyosensörlerin Hazırlanması**

Alkol tayinine yönelik olarak jelatin tabanlı alkol oksidaz, katalaz ve mikrobiyal (*C.tropicalis*) temelli biyosensörler hazırlandı.

#### **2.3.1 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinin hazırlanması**

Alkol oksidaz enzimi kullanılarak hazırlanan jelatin tabanlı biyosensörlerin hazırlanmasında izlenen prosedür Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3 Alkol oksidaz enzimi kullanılarak jelatin tabanlı biyosensörlerin hazırlanması

İşlem Sırası	İşlem
1	300 µl alkol oksidaz çöeltisine (1,0 U/ml) (pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde) 10 mg jelatin ilave edilir ve 38 <sup>0</sup> C'de su banyosunda çözünür hale getirilir.
2	Çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyi % 0,5'lik SDS ile (pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde) muamele edilir.
3	Jelatin-alkol oksidaz karışımının 200 µl'si çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyine yayılır.
4	Soğuk odada +4 <sup>0</sup> C'de bir saat süreyle beklemeye bırakılır.
5	Bekleme süresinin sonunda % 0,5'lik glutaraldehid ile (pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde) 4 dk. boyunca muamele edilir.
6	Glutaraldehid muamelesi sonrası biyosensör bidistile su ile pekçok kez yıkanır, daha sonra çalışma sıcaklığı ve tamponunda bekletilir.

Hazırlanan biyosensör ölçümler sonrası bidistile su ile yıkandı ve bir sonraki ölçüme kadar içerisinde az miktarda bidestile su bulunan erlen içinde soğuk odada +4<sup>0</sup>C'de saklandı. Biyosensör erlen içerisindeki bidestile su ile temas etmemekte bununla birlikte jelatin-alkol oksidaz biyoaktif tabakasının kurummasını engellemektedir.

### 2.3.2 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinin hazırlanması

Alkol tayinine yönelik olarak alkol oksidaz kullanılarak geliştirilen jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensörler Çizelge 2.4'de verilen prosedüre uygun olarak hazırlandı.

Çizelge 2.4 Alkol oksidaz enzimi kullanılarak jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensörlerin hazırlanması

İşlem Sırası	İşlem
1	85 mg κ-karrajenan ve 34 mg jelatin 6,8 ml % 0,9'luk NaCl çözeltisi içinde ve 38 <sup>0</sup> C'de su banyosunda çözünür hale getirilir.
2	Çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyi % 0,5'lik SDS ile (pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde) muamele edilir.
3	Jelatin-κ-karrajenan karışımının 200 µl'si 200 µl 2 U/ml'lik alkol oksidaz enzim çözeltisi ile karıştırılır ve karışımın 200 µl'si çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyine yayılır.
4	Soğuk odada +4 <sup>0</sup> C'de bir saat süreyle beklemeye bırakılır.
5	Bekleme süresinin sonunda % 0,5'lik glutaraldehid ile (pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde) 4 dk. boyunca muamele edilir.
6	Glutaraldehid muamelesi sonrası biyosensör 10 dk. 0,3 M KCl çözeltisine daldırılır sonra bidistile su ile yıkanarak çalışma sıcaklığı ve tamponunda bekletilir.

Hazırlanan biyosensör ölçümler sonrası bidistile su ile yıkandı ve bir sonraki ölçüme kadar içerisinde az miktarda bidistile su bulunan erlen içinde soğuk odada +4<sup>0</sup>C'de saklandı. Biyosensör erlen içerisindeki bidistile su ile temas etmemekte bununla birlikte jelatin-κ-karrajenan-alkol oksidaz biyoaktif tabakasının kurumasını engellemektedir.

### 2.3.3 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinin hazırlanması

Alkol oksidaz enzimi kullanarak jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerin hazırlanmasında izlenen prosedür Çizelge 2.5'de verilmiştir.

Çizelge 2.5 Alkol oksidaz enzimi kullanılarak jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerin hazırlanması

İşlem Sırası	İşlem
1	300 µl tampon içerisinde (pH:7,5; 50 mM Tris-HCl tamponu ) % 2,0'lik aljinat, 5,0 mg jelatin ve 2,0 U/ml alkol oksidaz olacak şekilde karışım hazırlanır.
2	Karışım 38 <sup>0</sup> C'de su banyosunda çözünür hale getirilir.
3	Çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyi % 0,5'lik SDS ile (pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde) muamele edilir.
4	Karışımın 200 µl'si çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyine yayılır.
5	Soğuk odada +4 <sup>0</sup> C'de bir saat süreyle beklemeye bırakılır.
6	Bekleme süresinin sonunda % 0,5'lik glutaraldehid ile (pH:7,5; 50 mM Tris-HCl tamponu içinde) 4 dk. boyunca muamele edilir.
7	10 dk. süreyle 0,5 M CaCl <sub>2</sub> çözeltisine (pH:7,5; 50 mM Tris-HCl tamponu içinde) daldırılır daha sonra bidistile su ile yıkanarak çalışma sıcaklığı ve tamponunda bekletilir.

Hazırlanan biyosensör ölçümler sonrası bidistile su ile yıkandı ve bir sonraki ölçüme kadar içerisinde az miktarda bidestile su bulunan erlen içinde soğuk odada +4<sup>0</sup>C'de saklandı.Biyosensör erlen içerisindeki bidestile su ile temas etmemekte bununla birlikte jelatin-Ca-aljinat-alkol oksidaz biyoaktif tabakasının kurumasını engellemektedir.

## 2.4 Alkol Tayinine Yönelik Katalaz Temelli Biyosensörlerin Hazırlanması

### 2.4.1 Jelatin tabanlı katalaz biyosensörlerinin hazırlanması

Çizelge 2.6'da katalaz enzimi kullanılarak jelatin tabanlı biyosensörlerin hazırlanmasına ilişkin prosedür verilmiştir.

Çizelge 2.6 Katalaz enzimi kullanılarak jelatin tabanlı biyosensörlerin hazırlanması

İşlem Sırası	İşlem
1	20 mg jelatin ve 1 mg katalaz 300 µl pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde ve 38 <sup>0</sup> C'de su banyosunda çözünür hale getirilir.
2	Çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyi % 0,5'lik SDS ile (pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde) muamele edilir.
3	Jelatin-katalaz karışımının 200 µl'si çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyine yayılır.
4	Soğuk odada +4 <sup>0</sup> C'de bir saat süreyle beklemeye bırakılır.
5	Bekleme süresinin sonunda % 2,5'luk glutaraldehid ile (pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde) 4 dk. boyunca muamele edilir.
6	Glutaraldehid muamelesi sonrası biyosensör bidistile su ile pekçok kez yıkanır, daha sonra çalışma sıcaklığı ve tamponunda bekletilir.

Çizelge 2.6' daki prosedür izlenerek hazırlanan jelatin tabanlı katalaz biyosensörü ile alkol tayinine yönelik olarak yapılan ölçümler sonrası biyosensör bir sonraki ölçümlere kadar bidistile su içeren erlende ve soğuk odada +4<sup>0</sup>C'de saklandı.

#### 2.4.2 jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörlerinin hazırlanması

Katalaz enzimi kullanılarak alkol tayinine yönelik jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensörlerin hazırlanması Çizelge 2.7'deki prosedüre göre gerçekleştirildi.

Çizelge 2.7 Katalaz enzimi kullanılarak jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensörlerin hazırlanması

İşlem Sırası	İşlem
1	4,0 mg katalaz enzimi (2800 U/mg) 200 µl pH:7,0; 50 mM fosfat tamponu içinde çözünür hale getirilir.
2	85 mg κ-karrajenan ve 34 mg jelatin 6,8 ml % 0,9'luk NaCl çözeltisi içinde ve 38 <sup>0</sup> C'de su banyosunda çözünür hale getirilir
3	Çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyi % 0,5'lik SDS ile (pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde) muamele edilir.
	Jelatin-κ-karrajenan karışımının 200 µl'si 200 µl katalaz enzimi çözeltisi ile karıştırılır ve karışımın 200 µl'si çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyine yayılır.
4	Soğuk odada +4 <sup>0</sup> C'de bir saat süreyle beklemeye bırakılır.
5	Bekleme süresinin sonunda % 2,5'luk glutaraldehid ile (pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde) 4 dk. boyunca muamele edilir.
6	Biyosensör 10 dk. 0,3 M KCl çözeltisine daldırılır sonra bidistile su ile yıkanarak çalışma sıcaklığı ve tamponunda bekletilir.

Hazırlanan biyosensörler kullanılmadığı zaman zarfında enzimlerle hazırlanan diğer tüm biyosensörlerde olduğu gibi bidistile su içeren erlen içerisinde ve +4<sup>0</sup>C'de soğuk odada saklandı.

#### 2.4.3 jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörlerinin hazırlanması

Çizelge 2.8'de katalaz enziminin kullanılmasıyla alkol tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensörün hazırlanma prosedürü gösterilmiştir.

Çizelge 2.8 Katalaz enzimi kullanılarak jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerin hazırlanması

İşlem Sırası	İşlem
1	300 µl tampon içerisinde (Tris-HCl tamponu, pH:7,5; 50 mM) % 2,0'lik aljinat, 5,0 mg jelatin ve 1 mg katalaz enzimi (2800 U/mg) 38 <sup>0</sup> C'de su banyosunda çözünür hale getirilir.
2	Çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyi % 0,5'lik SDS ile (pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde) muamele edilir.
3	Karışımın 200 µl'si çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyine yayılır.
4	Soğuk odada +4 <sup>0</sup> C'de bir saat süreyle beklemeye bırakılır.
5	Bekleme süresinin sonunda % 0,5'lik glutaraldehid ile (pH:7,5; 50 mM Tris-HCl tamponu içinde) 4 dk. boyunca muamele edilir.
6	10 dk. süreyle 0,5 M CaCl <sub>2</sub> çözeltisine (pH:7,5; 50 mM Tris-HCl tamponu içinde) daldırılır daha sonra bidistile su ile yıkanarak çalışma sıcaklığı ve tamponunda bekletilir.

Hazırlanan biyosensör ölçümler sonrası bidistile su ile yıkandı ve bir sonraki ölçüme kadar içerisinde az miktarda bidistile su bulunan erlen içinde soğuk odada +4<sup>0</sup>C'de saklandı. Biyosensör erlen içerisindeki bidistile su ile temas etmemekte bununla birlikte jelatin-Ca-aljinat-katalaz biyoaktif tabakasının kurummasını engellemektedir.

## 2.5 Alkol Tayinine Yönelik *C.tropicalis* Temelli Mikrobiyal Biyosensörlerin Hazırlanması

### 2.5.1 Jelatin tabanlı *C.tropicalis* mikrobiyal biyosensörlerin hazırlanması

Alkol tayinine yönelik olarak jelatin tabanlı mikrobiyal biyosensör geliştirilmesinde; *C.tropicalis* maya hücrelerine ait büyüme eğrisinden elde edilen veriler ve kültür ortamından saat başı alınan hücre örneklerinde yapılan alkol oksidaz aktivite tayinlerinden elde edilen sonuçlardan yararlanıldı ve bu sonuçlar doğrultusunda kültür ortamından 14.saatte alınan hücrelerin kullanılmasına karar verildi.

Biyosensörün hazırlanmasında Çizelge 2.9'daki prosedür izlendi.



Çizelge 2.9 *C.tropicalis* hücreleri kullanılarak jelatin tabanlı biyosensörlerin hazırlanması

İşlem Sırası	İşlem
1	10 mg jelatin ve 10 mg liyofilize <i>C.tropicalis</i> 400 µl pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde ve 38 <sup>0</sup> C'de su banyosunda çözünür hale getirilir.
2	Çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyi % 0,5'lik SDS ile (pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde) muamele edilir.
3	Jelatin- <i>C.tropicalis</i> hücreleri karışımının 200 µl'si çözünmüş oksijen probu membranı yüzeyine yayılır.
4	Soğuk odada +4 <sup>0</sup> C'de bir saat süreyle beklemeye bırakılır.
5	Bekleme süresinin sonunda % 0,1'lik glutaraldehid ile (pH:7,5; 50 mM fosfat tamponu içinde) 4 dk. boyunca muamele edilir.
6	Glutaraldehid muamelesi sonrası biyosensör bidistile su ile pekçok kez yıkanır, daha sonra çalışma sıcaklığı ve tamponunda bekletilir.

Yukarıdaki prosedür gereği hazırlanan mikrobiyal biyosensör ile alkol tayinine yönelik olarak yapılan ölçümler sonrası biyosensör bir sonraki ölçümlere kadar içerisinde fosfat tamponu (pH:7,5; 50 mM) bulunan bir erlene konarak +4<sup>0</sup>C'de soğuk odada saklandı.

Alkol oksidaz ve katalaz enzimleri kullanılarak hazırlanan biyosensörlere nazaran liyofilize *C.tropicalis* hücreleri ile hazırlanan biyosensörün fosfat tamponu içerisinde saklanması nedeni, prob yüzeyinde immobilize edilen *C.tropicalis* hücrelerinin yaşamsal faaliyetlerini minimum düzeyde de olsa devam ettirmeleri içindir.

Mikrobiyal biyosensörlerde göz önünde bulundurulması ve dikkat edilmesi gereken birbiri ile doğrudan ilişkili olan en önemli iki parametreden ilki mikroorganizmanın yaşamsal faaliyetlerini kaybetmemesi, diğeri de bu yaşamsal faaliyetlerin ölçümler dışında minimum düzeyde tutularak biyosensör ömrünün uzun olmasının sağlanmasıdır. Bu şekilde; mikrobiyal biyosensör geliştirilmesinde, logaritmik fazda iken kullanılan mikroorganizmaların bu fazda en uzun sürede kalması ve biyosensörden maksimum düzeyde verim alınması da sağlanmış olur (Mulchandani and Rogers,1998).

## 2.6 Alkol Tayinine Yönelik Alkol Oksidaz Temelli Biyosensörlerde Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonu

Bu çalışmada alkol oksidazın kullanılmasıyla alkol tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensörlerin biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu amacıyla enzim miktarının, jelatin miktarının, glutaraldehid yüzdesinin,κ-karrajenan miktarının ve Ca-aljinat yüzdesinin biyosensör cevabı üzerinde gösterdikleri etkilerin belirlenmesine yönelik denemeler gerçekleştirildi.

### 2.6.1 Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi

Alkol oksidaz enziminin kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörlerin biyoaktif tabaka bileşenlerinden jelatin,κ-karrajenan, aljinat ve glutaraldehid miktarları sabit tutuldu bununla birlikte değişen konsantrasyonlardaki alkol oksidaz enzimi ile biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanarak enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.

#### 2.6.1.1 Jelatin tabanlı biyosensörlerde enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi

5,9 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + **0,089 U/cm<sup>2</sup> AO** + % 0,5 glutaraldehid

5,9 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + **0,177 U/cm<sup>2</sup> AO** + % 0,5 glutaraldehid

5,9 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + **0,354 U/cm<sup>2</sup> AO** + % 0,5 glutaraldehid

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

**2.6.1.2 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensörlerde enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

0,44 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + **0,044 U/cm<sup>2</sup> AO** + % 0,5 glutaraldehid

0,44 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + **0,089 U/cm<sup>2</sup> AO** + % 0,5 glutaraldehid

0,44 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + **0,177 U/cm<sup>2</sup> AO** + % 0,5 glutaraldehid

0,44 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + **0,354 U/cm<sup>2</sup> AO** + % 0,5 glutaraldehid

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

**2.6.1.3 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerde enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 2,0 aljinat + **0,666 U/cm<sup>2</sup> AO** + % 0,5 glutaraldehid

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 2,0 aljinat + **1,330 U/cm<sup>2</sup> AO** + % 0,5 glutaraldehid

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 2,0 aljinat + **2,660 U/cm<sup>2</sup> AO** + % 0,5 glutaraldehid

(Ölçümler; Tris-HCl tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

## 2.6.2 Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi

Alkol tayinine yönelik olarak geliştirilen alkol oksidaz biyosensörlerinde enzim miktarının yanısıra yine biyoaktif tabakanın bileşenlerinden olan  $\kappa$ -karrajenan, aljinat ve glutaraldehid miktarları sabit tutuldu, bununla birlikte değişen jelatin miktarlarında biyosensörler hazırlandı. Hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanarak jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.

### 2.6.2.1 Jelatin tabanlı biyosensörlerde jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi

0,177 U/cm<sup>2</sup> AO + **2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + % 0,5 glutaraldehid

0,177 U/cm<sup>2</sup> AO + **5,90 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + % 0,5 glutaraldehid

0,177 U/cm<sup>2</sup> AO + **11,80 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + % 0,5 glutaraldehid

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

### 2.6.2.2 Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı biyosensörlerde jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi

1,1 mg  $\kappa$ -karrajenan/cm<sup>2</sup> + **0,22 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + 0,177 U/cm<sup>2</sup> AO + % 0,5 glutaraldehid

1,1 m g $\kappa$ -karrajenan/cm<sup>2</sup> + **0,44 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + 0,177 U/cm<sup>2</sup> AO + % 0,5 glutaraldehid

1,1 mg  $\kappa$ -karrajenan/cm<sup>2</sup> + **0,88 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + 0,177 U/cm<sup>2</sup> AO + % 0,5 glutaraldehid

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

### **2.6.2.3 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerde jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

% 2,0 aljinat + 1,33 U/cm<sup>2</sup> AO + **1,48 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** +  
% 0,5 glutaraldehid

% 2,0 aljinat + 1,33 U/cm<sup>2</sup> AO + **2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** +  
% 0,5 glutaraldehid

% 2,0 aljinat + 1,33 U/cm<sup>2</sup> AO + **4,43 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** +  
% 0,5 glutaraldehid

(Ölçümler; Tris-HCl tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

### **2.6.3 Glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

Glutaraldehid, bu tez çalışmasında alkol tayinine yönelik olarak geliştirilen tüm biyosensörlerde biyoaktif materyalin immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı reaktif olarak kullanıldı.

Glutaraldehidin biyosensör cevabı üzerine etkisinin incelendiği bu çalışmada; biyoaktif tabakanın bileşenleri olan alkol oksidaz, jelatin, κ-karrajenan ve aljinat miktarları sabit tutularak değişen oranlarda glutaraldehidin kullanıldığı biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanarak immobilizasyonda çapraz bağlayıcı reaktif olarak kullanılan glutaraldehidin oranının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.

### **2.6.3.1 Jelatin tabanlı biyosensörlerde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

5,9 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 0,177 U/cm<sup>2</sup> AO + % **0,25 glutaraldehid**

5,9 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 0,177 U/cm<sup>2</sup> AO + % **0,50 glutaraldehid**

5,9 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 0,177 U/cm<sup>2</sup> AO + % **1,0 glutaraldehid**

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

### **2.6.3.2 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensörlerde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

0,44 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + 0,177 U/cm<sup>2</sup> AO + % **0,25 glutaraldehid**

0,44 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + 0,177 U/cm<sup>2</sup> AO + % **0,50 glutaraldehid**

0,44 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + 0,177 U/cm<sup>2</sup> AO + % **1,0 glutaraldehid**

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

### **2.6.3.3 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerde glutaraldehid oranının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi**

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 2,0 aljinat + 1,33 U/cm<sup>2</sup> AO +  
**% 0,25 glutaraldehid**

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 2,0 aljinat + 1,33 U/cm<sup>2</sup> AO +  
**% 0,50 glutaraldehid**

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 2,0 aljinat + 1,33 U/cm<sup>2</sup> AO +  
**% 1,0 glutaraldehid**

(Ölçümler; Tris-HCl tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

### **2.6.4 κ-karrajenan miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

Bu çalışmada alkol oksidaz enziminin κ-karrajenan ve jelatinle birlikte kullanılarak immobilize edilmesi ile hazırlanan biyosensörlerde κ-karrajenan miktarının biyosensörler cevabı üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla enzim miktarı, jelatin miktarı ve glutaraldehid oranı sabit tutulurken değişen oranlarda κ-karrajenan kullanıldı.

Değişen oranlarda κ-karrajenan kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanarak κ-karrajenan miktarının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.

#### **2.6.4.1 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensörlerde κ-karrajenan miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

0,44 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + **0,55 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup>** + 0,177 U/cm<sup>2</sup> AO + % 0,5 glutaraldehid

0,44 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + **1,10 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup>** + 0,177 U/cm<sup>2</sup> AO + % 0,5 glutaraldehid

0,44 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + **2,20 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup>** + 0,177 U/cm<sup>2</sup> AO + % 0,5 glutaraldehid

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

#### **2.6.5 Aljinat oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

Jelatin ve aljinatın birlikte kullanılmasıyla hazırlanan alkol oksidaz biyosensörlerinde aljinat yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlendiği bu çalışmada enzim,jelatin ve glutaraldehid miktarları sabit tutulup değişen oranlarda aljinat kullanılarak biyosensörler hazırlandı.

Değişen oranlarda aljinatın kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanarak aljinat miktarının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.



### **2.6.5.1 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerde aljinat oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 1,0 aljinat + 1,33 U/cm<sup>2</sup> AO + % 0,5 glutaraldehid

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 2,0 aljinat + 1,33 U/cm<sup>2</sup> AO + % 0,5 glutaraldehid

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 3,0 aljinat + 1,33 U/cm<sup>2</sup> AO + % 0,5 glutaraldehid

(Ölçümler; Tris-HCl tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

## **2.7 Alkol Tayinine Yönelik Katalaz Temelli Biyosensörlerde Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonu**

### **2.7.1 Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

Katalaz enziminin kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörlerin biyoaktif tabaka bileşenlerinden jelatin,κ-karrajenan, aljinat ve glutaraldehid miktarları sabit tutuldu bununla birlikte değişen konsantrasyonlardaki alkol oksidaz enzimi ile biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanarak enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.

**2.7.1.1 Jelatin tabanlı biyosensörlerde enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

11,8 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + **826 U/cm<sup>2</sup> katalaz** + % 2,5 glutaraldehid

11,8 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + **1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz** + % 2,5 glutaraldehid

11,8 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + **8260 U/cm<sup>2</sup> katalaz** + % 2,5 glutaraldehid

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,0; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

**2.7.1.2 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensörlerde enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

2,21 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + **2477 U/cm<sup>2</sup> katalaz** + % 2,5 glutaraldehid

2,21 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + **4955 U/cm<sup>2</sup> katalaz** + % 2,5 glutaraldehid

2,21 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + **9910 U/cm<sup>2</sup> katalaz** + % 2,5 glutaraldehid

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,0; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

### **2.7.1.3 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerde enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 2,0 aljinat + **1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz** + % 0,5 glutaraldehid

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 2,0 aljinat + **3304 U/cm<sup>2</sup> katalaz** + % 0,5 glutaraldehid

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 2,0 aljinat + **6608 U/cm<sup>2</sup> katalaz** + % 0,5 glutaraldehid

(Ölçümler; Tris-HCl tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

### **2.7.2 Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

Alkol tayinine yönelik olarak geliştirilen katalaz biyosensörlerinde enzim miktarının yanısıra yine biyoaktif tabakanın bileşenlerinden olan κ-karrajenan, aljinat ve glutaraldehid miktarları sabit tutuldu, bununla birlikte değişen jelatin miktarlarında biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanarak jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.

### **2.7.2.1 Jelatin tabanlı biyosensörlerde jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz + **2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + % 2,5 glutaraldehid

1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz + **5,90 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + % 2,5 glutaraldehid

1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz + **11,80 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + % 2,5 glutaraldehid

1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz + **14,75 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + % 2,5 glutaraldehid

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,0; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

### **2.7.2.2 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensörlerde jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + **1,10 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + 4955 U/cm<sup>2</sup> katalaz + % 0,5 glutaraldehid

1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + **2,21 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + 4955 U/cm<sup>2</sup> katalaz + % 0,5 glutaraldehid

1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + **4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + 4955 U/cm<sup>2</sup> katalaz + % 0,5 glutaraldehid

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

### **2.7.2.3 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerde jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

% 2,0 aljinat + 1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz + **1,48 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** +  
% 0,5 glutaraldehid

% 2,0 aljinat + 1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz + **2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** +  
% 0,5 glutaraldehid

% 2,0 aljinat + 1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz + **5,90 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** +  
% 0,5 glutaraldehid

(Ölçümler; Tris-HCl tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

### **2.7.3 Glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

Glutaraldehid, alkol oksidaz ile hazırlanan biyosensörlerde olduğu gibi alkol tayinine yönelik olarak geliştirilen tüm katalaz biyosensörlerinde de biyoaktif materyalin immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı reaktif olarak kullanıldı.

Glutaraldehidin biyosensör cevabı üzerine etkisinin incelendiği bu çalışmada; biyoaktif tabakanın bileşenleri olan katalaz, jelatin, κ-karajenan ve aljinat miktarları sabit tutularak değişen oranlarda glutaraldehidin kullanıldığı biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanarak immobilizasyonda çapraz bağlayıcı reaktif olarak kullanılan glutaraldehidin oranının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.

### **2.7.3.1 Jelatin tabanlı biyosensörlerde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

11,8 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz + % **1,25 glutaraldehid**

11,8 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz + % **2,50 glutaraldehid**

11,8 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz + % **5,0 glutaraldehid**

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,0; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

### **2.7.3.2 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensörlerde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

2,21 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + 4955 U/cm<sup>2</sup> katalaz + % **1,25 glutaraldehid**

2,21 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + 4955 U/cm<sup>2</sup> katalaz + % **2,5 glutaraldehid**

2,21 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> + 4955 U/cm<sup>2</sup> katalaz + % **5,0 glutaraldehid**

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

### **2.7.3.3 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 2,0 aljinat + 1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz +  
**% 0,25 glutaraldehid**

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 2,0 aljinat + 1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz +  
**% 0,50 glutaraldehid**

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 2,0 aljinat + 1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz +  
**% 1,0 glutaraldehid**

(Ölçümler; Tris-HCl tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

### **2.7.4 κ-karrajenan miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

Bu çalışmada katalaz enziminin κ-karrajenan ve jelatinle birlikte kullanılarak immobilize edilmesi ile hazırlanan biyosensörlerde κ-karrajenan miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla enzim miktarı, jelatin miktarı ve glutaraldehid oranı sabit tutulurken değişen oranlarda κ-karrajenan kullanıldı.

Değişen oranlarda κ-karrajenan kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanarak κ-karrajenan miktarının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.

#### **2.7.4.1 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensörlerde κ-karrajenan miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

2,21 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + **0,55 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup>** + 4955 U/cm<sup>2</sup>  
katalaz + % 2,5 glutaraldehid

2,21 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + **1,10 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup>** + 4955 U/cm<sup>2</sup>  
katalaz + % 2,5 glutaraldehid

2,21 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + **2,20 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup>** + 4955 U/cm<sup>2</sup>  
katalaz + % 2,5 glutaraldehid

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,0; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

#### **2.7.5 Aljinat oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

Jelatin ve aljinatın birlikte kullanılmasıyla hazırlanan katalaz biyosensörlerinde aljinat yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlendiği bu çalışmada enzim,jelatin ve glutaraldehid miktarları sabit tutulup değişen oranlarda aljinat kullanılarak biyosensörler hazırlandı.

Değişen oranlarda aljinatın kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanarak aljinat miktarının biyosensörler cevabı üzerine etkileri incelendi.



### **2.7.5.1 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerde aljinat oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 1,0 aljinat + 1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz + % 0,5 glutaraldehid

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 2,0 aljinat + 1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz + % 0,5 glutaraldehid

2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + % 3,0 aljinat + 1652 U/cm<sup>2</sup> katalaz + % 0,5 glutaraldehid

(Ölçümler; Tris-HCl tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:35<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

Geliştirilen biyosensörlerde elektrod yüzey alanı 1,13 cm<sup>2</sup> olup biyoaktif tabaka bileşenleri olan enzimlerin (AO ve katalaz) aktivite değerleri cm<sup>2</sup>'de U (Ünite) olarak , jelatin ve κ-karrajenan miktarları ise cm<sup>2</sup>'de mg olarak verilmiştir.

## **2.8 Alkol Tayinine Yönelik *C.tropicalis* Temelli Biyosensörlerde Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonu**

### **2.8.1 *C.tropicalis* hücre miktarının mikrobiyal biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

Bir maya türü olan liyofilize formdaki *C.tropicalis* hücrelerinin kullanılması ile hazırlanan alkol tayinine yönelik mikrobiyal biyosensörlerde hücre miktarının mikrobiyal biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla jelatin ve glutaraldehid oranları sabit tutulup farklı oranlarda mg kuru hücrenin kullanılmasıyla biyosensörler hazırlandı.

Farklı oranlarda *C.tropicalis* hücrelerinin kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanarak mg kuru hücre miktarının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi.

Geliştirilen mikrobiyal biyosensörlere ilişkin olarak kullanılan jelatin, glutaraldehid ve mikroorganizma oranları aşağıda verilmiştir;

10 mg jelatin + **5,0 mg kuru hücre** + % 0,1 glutaraldehid

10 mg jelatin + **10,0 mg kuru hücre** + % 0,1 glutaraldehid

10 mg jelatin + **20,0 mg kuru hücre** + % 0,1 glutaraldehid

### **2.8.2 Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

Alkol tayinine yönelik olarak geliştirilen *C.tropicalis* temelli biyosensörlerde hücre miktarının yanısıra yine biyoaktif tabakanın bileşenlerinden olan glutaraldehid miktarları sabit tutuldu, bununla birlikte değişen jelatin miktarlarında biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanarak jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine ne gibi etkileri olduğu incelendi

4,42 mg kurukütle/cm<sup>2</sup> + **2,21 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + % 0,1 glutaraldehid

4,42 mg kurukütle/cm<sup>2</sup> + **4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + % 0,1 glutaraldehid

4,42 mg kurukütle/cm<sup>2</sup> + **8,84 mg jelatin/cm<sup>2</sup>** + % 0,1 glutaraldehid

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:30<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

### **2.8.3 Glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi**

Glutaraldehid, alkol oksidaz ve katalaz kullanılarak hazırlanan biyosensörlerde olduğu gibi alkol tayinine yönelik olarak geliştirilen *C.tropicalis* temelli mikrobiyal biyosensörlerde de biyoaktif materyalin immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı reaktif olarak kullanıldı.

Glutaraldehidin biyosensör cevabı üzerine etkisinin incelendiği bu çalışmada; biyoaktif tabakanın bileşenleri olan *C.tropicalis* hücreleri ve jelatin miktarları sabit tutularak değişen oranlarda glutaraldehidin kullanıldığı biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümlerden elde edilen standart grafiklerden yararlanarak immobilizasyonda çapraz bağlayıcı reaktif olarak kullanılan glutaraldehidin oranının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelendi

4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 4,42 mg kurukütle/cm<sup>2</sup> + % **0,05 glutaraldehid**

4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 4,42 mg kurukütle/cm<sup>2</sup> + % **0,10 glutaraldehid**

4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup> + 4,42 mg kurukütle/cm<sup>2</sup> + % **0,20 glutaraldehid**

(Ölçümler; fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM) ve T:30<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi).

Elektrod yüzey alanı 1,13 cm<sup>2</sup> olup geliştirilen mikrobiyal biyosensörlerdeki hücre miktarı (kurukütle) ve jelatin miktarı cm<sup>2</sup>, de mg olarak verilmiştir.

## **2.9 Alkol Tayinine Yönelik Olarak Geliştirilen Farklı Alkol Oksidaz, Katalaz ve Mikrobiyal Biyosensörlerde Çalışma Koşullarının Optimizasyonu**

Alkol tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensörlerde çalışma koşullarının optimizasyonu amacıyla; optimum pH, optimum sıcaklık, en uygun tampon sistemi ve konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlandı.

### **2.9.1 Optimum pH değerlerinin belirlenmesi**

Geliştirilen biyosensörlerin optimum pH değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda kullanılan tampon türleri Çizelge 2.10 'da verilmiştir.

Çizelge 2.10 Geliştirilen biyosensörlerin optimum pH değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda kullanılan tampon türleri

Biyomateryal	İmmobilizasyon Materyali	Tampon Türü	pH Aralığı	Konsantrasyon (mM)
Alkol Oksidaz	Jelatin	Sitrat	4,0-6,0	50
"	"	Fosfat	6,5-8,0	50
"	"	Glisin	8,5-10,0	50
Alkol Oksidaz	Jel.-κ-karrajenan	Asetat	4,0-5,0	50
"	"	Sitrat	5,5-6,5	50
"	"	Fosfat	7,0-8,0	50
"	"	Glisin	8,5-10,0	50
Alkol Oksidaz	Jel.-Ca-aljinat	Asetat	4,0-5,5	50
"	"	Tris-Maleat	6,0-7,0	50
"	"	Tris-HCl	7,5-8,5	50
"	"	Glisin	9,0-10,0	50
Katalaz	Jelatin	Sitrat	4,0-6,0	50
"	"	Fosfat	6,5-8,5	50
"	"	Glisin	9,0-10,0	50
Katalaz	Jel.-κ-karrajenan	Asetat	4,0-5,0	50
"	"	Sitrat	5,5-6,5	50
"	"	Fosfat	7,0-8,0	50
"	"	Glisin	8,5-10,0	50
Katalaz	Jel.-Ca-aljinat	Asetat	4,0-5,5	50
"	"	Tris-Maleat	6,0-7,0	50
"	"	Tris-HCl	7,5-8,5	50
"	"	Glisin	9,0-10,0	50
<i>C.tropicalis</i>	Jelatin	Asetat	4,0-5,0	50
"	"	Sitrat	5,5-6,5	50
"	"	Fosfat	7,0-8,0	50
"	"	Glisin	8,5-10,0	50

(Ölçümler; alkol oksidaz ve katalaz biyosensörleri için T:35<sup>0</sup>C’de, mikrobiyal biyosensör için T:30<sup>0</sup>C’de gerçekleştirildi).

## 2.9.2 Uygun tampon sisteminin belirlenmesi

Biyosensörlerin optimum pH değerlerinin belirlenmesinin ardından her bir biyosensör için optimum pH değerindeki farklı tampon sistemleri kullanılarak biyosensörler için en uygun tampon sistemi belirlendi.

Bu amaç doğrultusunda kullanılan tampon sistemleri Çizelge 2.11’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.11 Geliştirilen biyosensörler için uygun tampon sisteminin belirlenmesi

Biyomateryal	İmmobilizasyon Materyali	Tampon Türü	pH	Konsantrasyon (mM)
Alkol Oksidaz	Jelatin	K-Fosfat	7,5	50
"	"	Na-Fosfat	7,5	50
"	"	Tris-HCl	7,5	50
"	"	Trietanolamin-HCl	7,5	50
Alkol Oksidaz	Jel.-κ-karrajenan	K-Fosfat	7,5	50
"	"	Na-Fosfat	7,5	50
"	"	Tris-HCl	7,5	50
Alkol Oksidaz	Jel.-Ca-aljinat	Tris-HCl	7,5	50
"	"	Tris-Maleat	7,5	50
"	"	Trietanolamin-HCl	7,5	50
Katalaz	Jelatin	K-Fosfat	7,0	50
"	"	Na-Fosfat	7,0	50
"	"	Trietanolamin-HCl	7,0	50
Katalaz	Jel.-κ-karrajenan	K-Fosfat	7,0	50
"	"	Na-Fosfat	7,0	50
"	"	Trietanolamin-HCl	7,0	50
Katalaz	Jel.-Ca-aljinat	Tris-HCl	7,5	50
"	"	Tris-Maleat	7,5	50
"	"	Trietanolamin-HCl	7,5	50
<i>C.tropicalis</i>	Jelatin	K-Fosfat	7,5	50
	"	Na-Fosfat	7,5	50
	"	Tris-HCl	7,5	50

(Ölçümler; alkol oksidaz ve katalaz biyosensörleri için T:35<sup>0</sup>C’de, mikrobiyal biyosensör için T:30<sup>0</sup>C’de gerçekleştirildi).

### 2.9.3 Uygun tampon konsantrasyonunun belirlenmesi

Geliştirilen biyosensörlerin optimum pH değerlerinin ve bu pH değerlerindeki en uygun tampon sistemlerinin belirlenmesi sonrası tampon konsantrasyonlarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin

belirlenmesi amacıyla, hazırlanan biyosensörler için farklı konsantrasyonlarda ki tamponlarla ölçümler gerçekleştirildi.

Bu amaç doğrultusunda kullanılan tampon türleri, pH değerleri ve konsantrasyonları Çizelge 2.12’de verilmiştir.

Çizelge 2.12 Geliştirilen biyosensörler için uygun tampon konsantrasyonunun belirlenmesi

Biyomateryal	İmmobilizasyon Materyali	Tampon Türü	pH	Konsantrasyon (mM)
Alkol Oksidaz	Jelatin	K-Fosfat	7,5	25,50,100,200
"	Jel.-κ-karrajenan	K-Fosfat	7,5	25,50,100
"	Jel.-Ca-aljinat	Tris-HCl	7,5	25,50,100,200
Katalaz	Jelatin	K-Fosfat	7,0	25,50,100,200
"	Jel.-κ-karrajenan	K-Fosfat	7,0	25,50,100
"	Jel.-Ca-aljinat	Tris-HCl	7,5	25,50,100
<i>C.tropicalis</i>	Jelatin	K-Fosfat	7,5	25,50,100

(Ölçümler; alkol oksidaz ve katalaz biyosensörleri için T:35<sup>0</sup>C’de, mikrobiyal biyosensör için T:30<sup>0</sup>C’de gerçekleştirildi).

#### 2.9.4 Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Alkol tayinine yönelik olarak geliştirilen alkol oksidaz, katalaz ve mikrobiyal temelli biyosensörlerde sıcaklığın biyosensör cevabı üzerine etkisini belirlemek amacıyla alkol oksidaz ve katalaz enzimlerinin kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörlerle 15-20-25-30-35-40 ve 45<sup>0</sup>C’lerde, mikrobiyal temelli biyosensörle ise 15-20-25-30-35 ve 40<sup>0</sup>C’lerde ölçümler gerçekleştirildi.

Ölçümler; jelatin ve jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz ve jelatin tabanlı mikrobiyal temelli biyosensörler için fosfat tamponunda (pH:7,5; 50 mM), jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz ve katalaz biyosensörleri için Tris-HCl tamponunda (pH:7,5 ;50 mM), jelatin tabanlı ve jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörleri için fosfat tamponunda (pH:7,0; 50 mM) gerçekleştirildi.

## **2.10 Alkol Tayinine Yönelik Olarak Geliştirilen Farklı Alkol Oksidaz, Katalaz ve Mikrobiyal Biyosensörlerin Karakterizasyonu**

Alkol tayinine yönelik olarak geliştirilen tüm biyosensörlerin optimizasyonu çalışmaları sonrası biyosensörlerin karakterizasyonu amacıyla; etanol tayin sınırlarının, substrat spesifikliğinin, girişim etkilerinin, analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin, operasyonel karalılığın ve depo karalılığının belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirildi.

### **2.10.1 Etanol tayin sınırlarının belirlenmesi**

Geliştirilen tüm biyosensörlerin enzim, jelatin, glutaraldehid,  $\kappa$ -karrajenan, aljinat ve *C.tropicalis* hücre miktarı gibi biyoaktif bileşenlerinin optimizasyonu ve hemen ardından optimum pH, en uygun tampon sistemi ve konsantrasyonu ile optimum sıcaklık gibi çalışma koşullarının optimizasyonu gerçekleştirildi. Bu çalışmaları takiben her bir biyosensör için optimum çalışma koşullarında etanole ilişkin doğrusal tayin sınırlarının belirlenmesine yönelik ölçümler gerçekleştirilerek standart grafikler elde edildi.

### 2.10.2 Substrat spesifikliğinin belirlenmesi

Biyosensörlerin substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda etanol ile benzer cevap verebileceği düşünülen metanol, propanol, bütanol, izo-propanol, etilenglikol, dietilenglikol, glukoz ve L-askorbik asitin standart çözeltileri kullanıldı.

Her substrat, ilgili biyosensörün optimizasyon koşullarına uygun olarak hazırlanarak ölçümler yapıldı.

Alkol oksidaz ile hazırlanan jelatin ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörler ile yapılan ölçümlerde çözeltilerin 0,5 mM'lık konsantrasyonları ile çalışılırken jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile yapılan ölçümlerde ise çözeltilerin 0,1 mM'lık konsantrasyonları kullanıldı.

Katalaz enzimi ile hazırlanan jelatin, jelatin-κ-karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerle yapılan ölçümlerde çözeltilerin 0,4 mM'lık konsantrasyonları kullanıldı.

*C.tropicalis* hücreleriyle hazırlanan mikrobiyal biyosensörlerle yapılan ölçümlerde ise çözeltilerin 2,5 mM'lık konsantrasyonları ile çalışıldı.

Tüm biyosensörlerde etanol için elde edilen cevaplar % 100 kabul edildi ve diğer çözeltiler için elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı.

### 2.10.3 Girişim etkilerinin belirlenmesi

Bu çalışmada bazı maddelerin biyosensörlerin cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, reaksiyon ortamında sadece etanol varken ve ayrıca etanol ile birlikte bazı girişim etkisi yapabilecek maddelerin de (metanol,propanol, bütanol, izo-propanol, etilenglikol, dietilenglikol, glukoz ve L-askorbik asitin standart çözeltileri) birarada bulunduğu sistemlerde ölçümler gerçekleştirildi.



Alkol oksidaz enzimi ile hazırlanan jelatin ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörler ile yapılan ölçümlerde çözeltilerin 0,5 mM'lık konsantrasyonları ile çalışılırken jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile yapılan ölçümlerde çözeltilerin 0,1 mM'lık konsantrasyonları kullanıldı.

Katalaz enzimi ile hazırlanan jelatin, jelatin-κ-karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerle yapılan ölçümlerde çözeltilerin 0,4 mM'lık konsantrasyonları kullanıldı.

*C.tropicalis* hücreleriyle hazırlanan mikrobiyal biyosensörlerle yapılan ölçümlerde ise çözeltilerin 2,5 mM'lık konsantrasyonları ile çalışıldı.

Tüm biyosensörler için ortamda sadece etanol varken elde edilen biyosensör cevapları % 100 kabul edildi ve bu değer etanol ile birlikte diğer girişimci maddeleri de içeren diğer çözeltiler için elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslanarak maddelerin biyosensörler cevabı üzerine etkisi belirlendi.

#### **2.10.4 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi**

Tüm biyosensörlerin optimize edilen çalışma koşullarında gerçekleştirilen denemelerde, her bir biyosensör ile etanolün belirli bir konsantrasyonunda (n=10) ölçümler yapıldı.

Denemelerde alkol oksidaz enzimi ile hazırlanan jelatin ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörler ile yapılan ölçümlerde etanolün 0,5 mM'lık konsantrasyonu için, jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile yapılan ölçümlerde etanolün 0,1 mM'lık konsantrasyonu için (n=10) ölçümler gerçekleştirildi.

Katalaz enzimi ile hazırlanan jelatin, jelatin-κ-karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerle yapılan ölçümlerde etanolün 0,4 mM'lık konsantrasyonu için (n=10) ölçümler gerçekleştirildi..

*C.tropicalis* hücreleriyle hazırlanan mikrobiyal biyosensörlerle yapılan ölçümlerde ise etanolün 2,5 mM'lık konsantrasyonu için (n=10) ölçümler gerçekleştirildi.

Yapılan ölçümler sonrası herbir biyosensöre ilişkin standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayıları (V.K) belirlendi.

### **2.10.5 Operasyonel kararlılığın belirlenmesi**

Biyosensörlerin operasyonel kararlılıklarının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensörler daha önce optimizasyonu yapılarak belirlenmiş olan çalışma sıcaklığında ve çalışma tamponu içinde bekletilerek her saat başında belirli bir etanol standardı için ölçümler gerçekleştirildi.

Denemelerde alkol oksidaz enzimi ile hazırlanan jelatin ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörler ile yapılan ölçümlerde çözeltilerin 0,5 mM'lık konsantrasyonları ile çalışılırken jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile yapılan ölçümlerde çözeltilerin 0,1 mM'lık konsantrasyonları kullanıldı.

Katalaz enzimi ile hazırlanan jelatin, jelatin-κ-karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerle yapılan ölçümlerde çözeltilerin 0,4 mM'lık konsantrasyonları kullanıldı.

*C.tropicalis* hücreleriyle hazırlanan mikrobiyal biyosensörlerle yapılan ölçümlerde ise çözeltilerin 2,5 mM'lık konsantrasyonları ile çalışıldı.

Ölçümler alkol oksidaz ve katalaz enzimleri ile hazırlanan biyosensörler için 35<sup>0</sup>C'de mikrobiyal biyosensör için ise 30<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi. Başlangıçta elde edilen biyosensör cevapları % 100 kabul edilerek her saat başı yapılan ölçümlerde elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı.

### 2.10.6 Depo kararlılığının belirlenmesi

Biyosensörlerin depo kararlılıklarının belirlenmesine yönelik çalışmalarda yeni hazırlanan biyosensörlerle hazırlandığı anda ölçümler gerçekleştirildi. Ölçümler sonrası biyosensörler +4<sup>0</sup>C'de soğuk odada saklandı ve periyodik olarak belirli zaman aralıklarında yine belirli konsantrasyondaki bir etanol standardı için ölçümler gerçekleştirildi.

Hazırlanan biyosensörler sadece depo kararlılığı tespiti amacıyla kullanıldı.

Denemelerde alkol oksidaz enzimi ile hazırlanan jelatin ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörler ile yapılan ölçümlerde etanolün 0,5 mM'lık konsantrasyonu ile çalışılırken jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile yapılan ölçümlerde etanolün 0,1 mM'lık konsantrasyonu kullanıldı.

Katalaz enzimi ile hazırlanan jelatin, jelatin-κ-karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerle yapılan ölçümlerde etanolün 0,4 mM'lık konsantrasyonları kullanıldı.

*C.tropicalis* hücreleriyle hazırlanan mikrobiyal biyosensörlerle yapılan ölçümlerde ise etanolün 2,5 mM'lık konsantrasyonları ile çalışıldı.

Ölçümler alkol oksidaz ve katalaz enzimleri ile hazırlanan biyosensörler için 35<sup>0</sup>C'de mikrobiyal biyosensör için ise 30<sup>0</sup>C'de gerçekleştirildi.

Ölçümler sonunda başlangıçta elde edilen biyosensör cevapları % 100 kabul edilerek belirli zaman dilimlerinde elde edilen biyosensör cevapları ile kıyaslandı.

### 2.11 Alkol Tayinine Yönelik Olarak Hazırlanan Biyosensörlerin Kıyaslanması

Bu çalışmada alkol oksidaz,katalaz enzimleri ve *C.tropicalis* hücreleri kullanılarak farklı immobilizasyon materyalleri ile

immobilize edilerek hazırlanan tüm biyosensörlerin etanol tayin aralığı, substrat spesifikliğı, girişim etkileri, depo kararlılığı, tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılık gibi parametrelerinin incelenmesi sonrası elde edilen sonuçların birbiri yanında kıyaslanması yapılarak etanol tayini için en iyi sonuçları veren biyosensör seçimi gerçekleştirildi.

Seçilen biyosensör ile daha sonra alkollü içeceklerde etanol tayini gerçekleştirilerek elde edilen sonuçların enzimatik-spektrofotometrik esaslı etanol tayin yöntemi ile elde edilen sonuçlarla kıyaslaması yapıldı.

### **2.12 Jelatin Tabanlı Alkol Oksidaz Biyosensörü ile Alkollü İçeceklerde Etanol Tayini**

Geliştirilen tüm biyosensörlerin etanol tayin aralığı, substrat spesifikliğı, girişim etkileri, depo kararlılığı, tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılık gibi parametrelerinin incelenmesi sonrası elde edilen sonuçların birbiri yanında kıyaslanması sonrası etanol tayini için en iyi sonuçları veren biyosensörün jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü olduğuna karar verildi.

Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile alkollü içeceklerde etanol tayini amacıyla gazları önceden uzaklaştırılmış olan Troy Light (alkol oranı % 3,0), Miller (alkol oranı % 4,7) ve Carlsberg (alkol oranı % 5,0) biraları kullanıldı. Herbir bira örneğine ilişkin çözeltiler 0,25 mM etanol içerecek şekilde fosfat tamponu içinde (pH:7,5;50 mM) hazırlandı.

Denemelerde bira örnekleri için etanolün 0,25 mM'lık konsantrasyonunda çalışıldı ve (n=5) ölçüm gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara ilişkin standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayıları (V.K) hesaplanarak sonuçlar standart katma metodu kullanılarak elde edilen sonuçlarla desteklendi.

### **2.13 Enzimatik-Spektrofotometrik Esaslı Yöntem ile Alkollü İçeceklerde Etanol Tayini**

Bu çalışmada da jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensöründe olduğu gibi etanol tayini amacıyla Troy Light (alkol oranı % 3,0),

Miller (alkol oranı % 4,7) ve Carlsberg (alkol oranı % 5,0) biraları kullanıldı.

Ölçümler, modifiye alkol oksidaz aktivite tayini (*Sigma Product No: A0438, A2404, A6941*) Sigma Kalite Kontrol Test Prosedürü esasına göre gerçekleştirildi.

Bira örnekleri 40 kat seyreltilerek fosfat tamponu (pH:7,5; 50 mM) içinde hazırlandı. Her bir bira örneği için (n=5) ölçüm gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara ilişkin standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayıları (V.K) hesaplanarak sonuçlar standart katma metodu kullanılarak elde edilen sonuçlarla desteklendi.

#### **2.14 Alkollü İçeceklerde Etanol Tayinine Yönelik Olarak Jelatin Tabanlı Alkol Oksidaz Biyosensörü ile Elde Edilen Sonuçların Enzimatik-Spektrofotometrik Esaslı Yöntem ile Elde Edilen Sonuçlarla Karşılaştırılması**

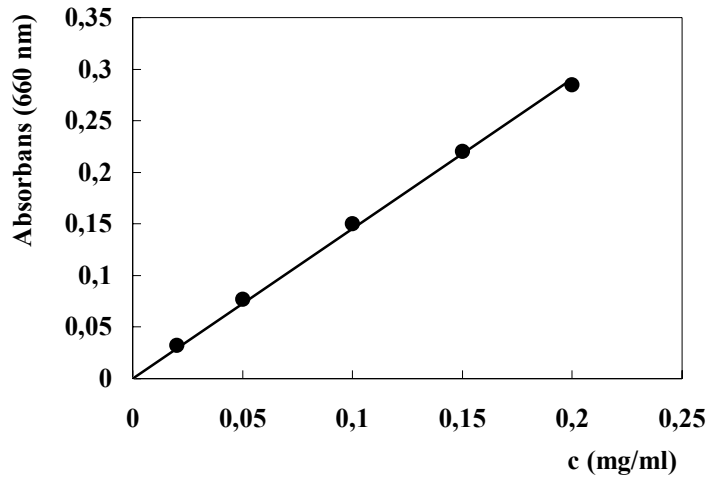
Her iki yöntemle bira örnekleri kullanılarak etanol tayinleri gerçekleştirildi. Standart ve standart katmalı yöntemler kullanılarak bira örnekleri için elde edilen sonuçlar standart sapma ve varyasyon katsayılarını da içerecek şekilde bir tabloda özetlendi

### 3. BULGULAR ve TARTIŞMA

#### 3.1 Protein Standart Grafiği

Alkol oksidaz enziminin eldesi amacıyla *C.tropicalis* maya hücrelerinin kültür ortamından her saat başı alınan örneklerde aktivite tayini yanında protein tayinleri de yapıldı.

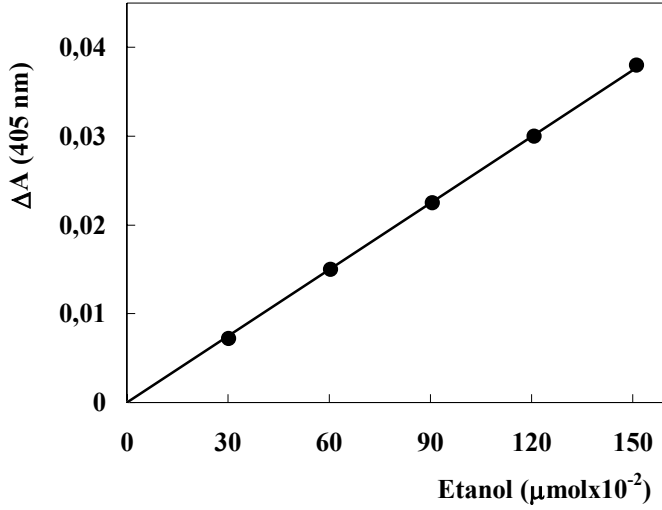
Modifiye Lowry protein tayin metodunun kullanılmasıyla gerçekleştirilen tayinlerde örneklerin içerdiği protein miktarları protein standart grafiğinden yararlanılarak tespit edildi.



Şekil 3.1 Protein standart grafiği

#### 3.2 Enzimatik Aktivite Standart Grafiği

Alkol oksidazın aktivite tayin reaksiyonunda açığa çıkan renkli bileşiğin (ABTS), 405 nm.'deki absorbans değışimini ile etanol miktarı arasındaki ilişkiyi gösteren grafik Şekil 3.2'de verilmiştir.

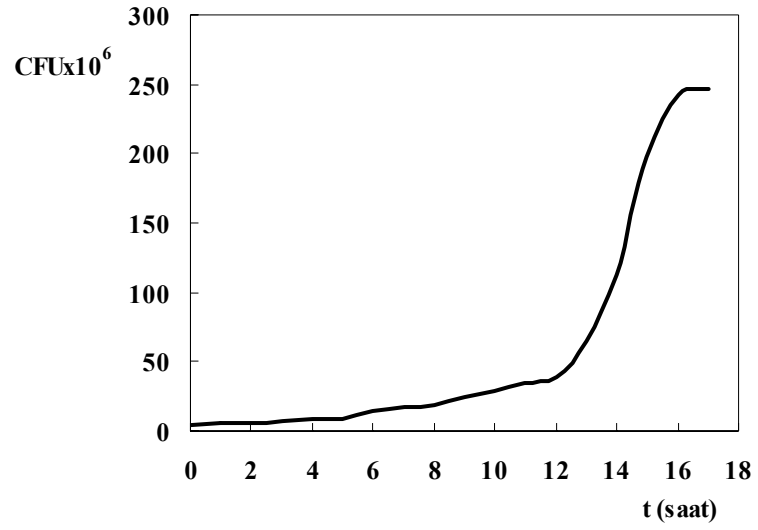


Şekil 3.2 Enzimatik aktivite standart grafiği ( Fosfat tamponu, pH:7,5;50 mM, T:25<sup>0</sup>C)

### 3.3 *C.tropicalis* Büyüme Eğrisi

Kültür ortamından başlangıç anında ve bir saat aralıklarla alınan hücre örneklerinde canlı hücre sayımı yapılarak CFU(Colony Forming Unit) değerleri zamana karşı grafiğe geçirildi. Bu şekilde *C.tropicalis* hücrelerinin büyüme eğrisi oluşturularak, mikrobiyal temelli biyosensör hazırlanması için spesifik üreme hızı sabit ve maksimum olan logaritmik fazdaki hücrelerin kültür ortamından izolasyonu amacıyla 14.saatdeki hücreler (log faz) en uygun hücre örnekleri olarak belirlendi ve kültür ortamından izolasyonları gerçekleştirilerek gerekli işlemler sonrası liyofilize preparat halinde saklandı.

Elde edilen büyüme eğrisi Şekil 3.3’de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 *C.tropicalis* hücrelerine ait büyüme eğrisi

### 3.4 Alkol Oksidaz Temelli Biyosensörlerin Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonuna İlişkin Bulgular

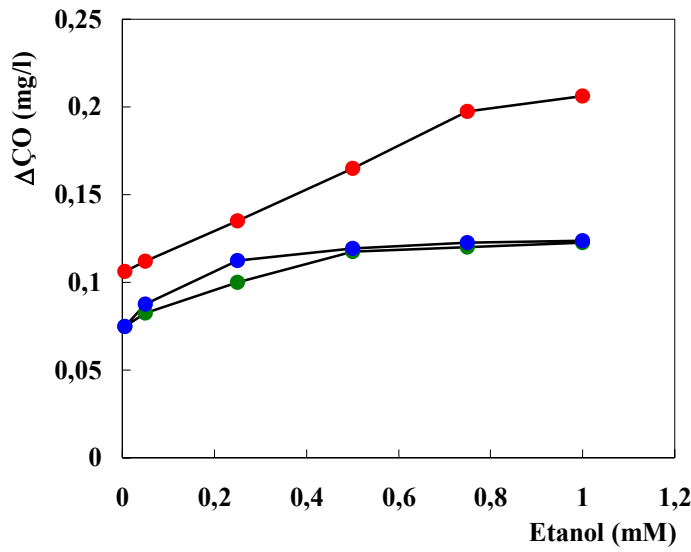
Alkol oksidaz (AO) enzimi kullanılarak hazırlanan jelatin, jelatin- $\kappa$ -karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerde, enzim, jelatin,  $\kappa$ -karrajenan, aljinat ve glutaraldehid oranlarının biyosensör cevaplarına etkilerinin incelendiği biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonuna ait sonuçlar bu bölümde verilmiştir.



### 3.4.1 Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

#### 3.4.1.1 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinde enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla jelatin ve glutaraldehid miktarının sabit tutulup bununla birlikte biyoaktif membran tabakasında 0,089 U/cm<sup>2</sup>, 0,177 U/cm<sup>2</sup> ve 0,354 U/cm<sup>2</sup> alkol oksidaz (AO) aktivitesi olacak şekilde hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümler sonrası elde edilen sonuçlara ait standart grafikleri çizildi.



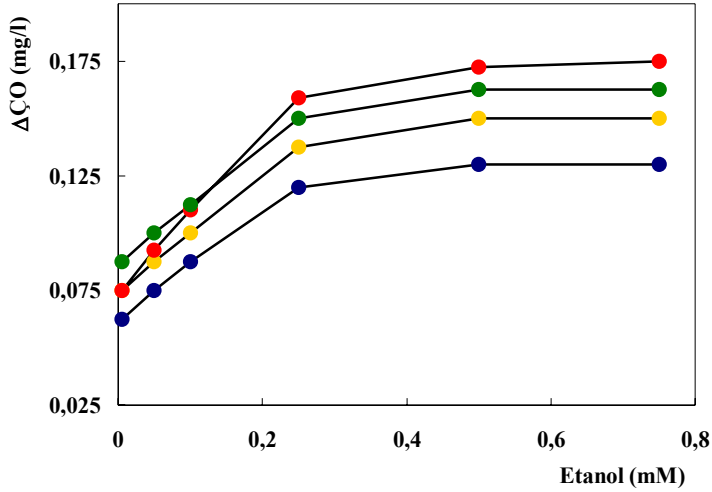
Şekil 3.4 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine enzim miktarının etkisi, [ Fosfat tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:35<sup>0</sup>C, ● : 0,089 U/cm<sup>2</sup>AO, ● : 0,177 U/cm<sup>2</sup>AO, ● : 0,354 U/cm<sup>2</sup>AO. Tüm biyosensörler için jelatin oranı 5,9mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 0,5'dir].

Elde edilen sonuçlar sonrası en ideal biyosensör cevaplarının  $0,177 \text{ U/cm}^2$ 'lik alkol oksidaz aktivitesi olacak şekilde hazırlanan biyosensör ile alındığı belirlendi. Bu aktivitedeki AO ile hazırlanan biyosensör ile  $(0,005-0,75) \text{ mM}$  etanol aralığında doğrusal bir grafik elde edilirken,  $0,089 \text{ U/cm}^2$ 'lik AO ile hazırlanan biyosensör ile  $(0,005-0,5) \text{ mM}$  ve  $0,354 \text{ U/cm}^2$ 'lik AO ile hazırlanan biyosensör ile de  $(0,005-0,25) \text{ mM}$  etanol konsantrasyon aralığında doğrusal bir grafik elde edildi.

Biyoaktif membran tabakasındaki enzim miktarının dolayısıyla aktivitenin yarıya düşürülmesi ile biyosensör cevabında da  $0,5 \text{ mM}$ 'lık etanol konsantrasyon aralığına kadar yaklaşık % 50'lik belirgin bir düşme görülmüştür, biyosensör cevabındaki düşme daha yüksek substrat konsantrasyonlarında daha da artmıştır. Bununla birlikte enzim miktarı iki katına çıkarıldığında biyosensör cevabında herhangi bir artış gözlenmemiş buna karşın % 50'den daha yüksek bir oranda düşme de belirlenmiştir. Bunun muhtemel nedeni olarak, glutaraldehid muamelesi sonrası enzim-enzim arasındaki çapraz bağların jelatin-enzim arasındakilere nazaran daha çok ve sıklıkla meydana gelmesi dolayısıyla enzimin hareket yeteneğinin sterik olarak sınırlandırılmış olması ve bunun da enzim aktif merkezinin substratla yoğun bir şekilde etkileşmesine engel teşkil etmesi düşünülebilir.

#### **3.4.1.2 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinde enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensörlerde alkol oksidaz miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla; jelatin, κ-karrajenan ve glutaraldehid miktarının sabit tutulup bununla birlikte biyoaktif membran tabakasında  $0,044 \text{ U/cm}^2$ ,  $0,089 \text{ U/cm}^2$ ,  $0,177 \text{ U/cm}^2$  ve  $0,354 \text{ U/cm}^2$  alkol oksidaz (AO) aktivitesi olacak şekilde hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümler sonrası elde edilen sonuçlara ilişkin standart grafikler Şekil 3.5'de verilmiştir.



Şekil 3.5 Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine enzim miktarının etkisi, [ Fosfat tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:35<sup>0</sup>C ,  
 ● : 0,044 U/cm<sup>2</sup>AO, ● : 0,089 U/cm<sup>2</sup>AO, ● : 0,177 U/cm<sup>2</sup>AO,  
 ● : 0,354 U/cm<sup>2</sup>AO. Tüm biyosensörler için jelatin oranı 0,44mg jelatin/cm<sup>2</sup>,  $\kappa$ -karrajenan oranı 1,1 mg  $\kappa$ -karrajenan/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 0,5'dir ].

Grafiklerden edilen sonuçlar sonrası en ideal biyosensör cevaplarının 0,177 U/cm<sup>2</sup> olacak şekilde alkol oksidaz enzimi kullanılarak hazırlanan biyosensör ile elde edildiği belirlendi. Bu aktivitedeki alkol oksidaz ile hazırlanan biyosensör ile (0,005-0,25) mM etanol konsantrasyonu aralığında doğrusal bir grafik elde edilirken, 0,089 U/cm<sup>2</sup>'lik alkol oksidaz ve 0,044 U/cm<sup>2</sup>'lik alkol oksidaz ile hazırlanan biyosensörler ile de (0,005-0,25) mM etanol konsantrasyon aralığında fakat daha düşük biyosensör cevaplarıyla doğrusal grafikler elde edildi.

Biyoaktif membran tabakasındaki enzim miktarının dolayısıyla aktivitenin düşürülmesi ile normalde de beklenildiği gibi biyosensör cevabında da belirgin bir düşme görüldü. Biyosensör cevabındaki düşme daha yüksek etanol konsantrasyonlarında daha da artmıştır. Bununla birlikte enzim miktarı 0,044 U/cm<sup>2</sup>'den 0,089 U/cm<sup>2</sup>'ye ve

0,177 U/cm<sup>2</sup>, ye çıkarıldığında biyosensör cevaplarında da yine beklenildiği gibi bir artış gözlemlendi.

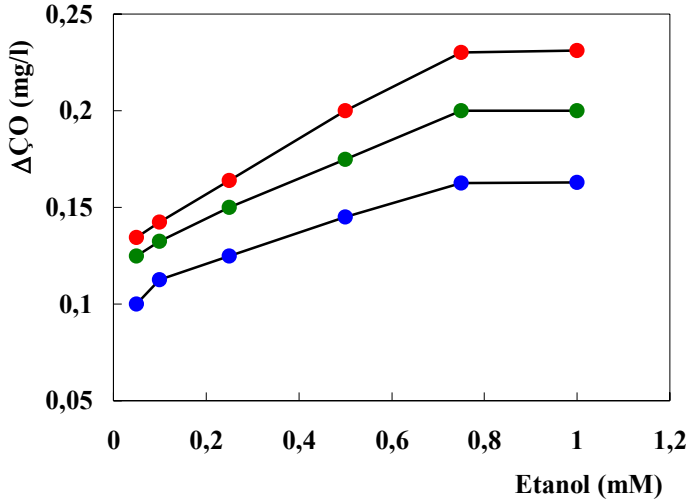
Enzim miktarındaki artışla paralel olarak artan biyosensör cevabı baz alınarak 0,354 U/cm<sup>2</sup> AO aktivitesine sahip bir biyosensör daha hazırlandı fakat yapılan ölçümlerde 0,177 U/cm<sup>2</sup>'lik AO aktivitesine sahip biyosensörünkine nazaran biyosensör cevabında beklenen düzeyde bir artış gerçekleşmediği görüldü.

Diğer biyosensörlere nazaran doğrusal tayin aralığının daha dar sınırlarda bulunmasının en önemli nedeni olarak membranın yapısal özellikleri düşünülmektedir. Özellikle oksijne daha geçirgen bir membranın, ölçüm hücresi ve arayüzey çözünmüş oksijen konsantrasyonuna ilişkin dengelerin daha düşük konsantrasyonlarda oluşumuna yol açtığı düşünülebilir.

### **3.4.1.3 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinde enzim miktarının biyosensör cevabına etkisi**

Jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerde alkol oksidaz miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla; jelatin, Ca-aljinat ve glutaraldehid miktarının sabit tutulup bununla birlikte biyoaktif membran tabakasında 0,666 U/cm<sup>2</sup>, 1,330 U/cm<sup>2</sup>, ve 2,660 U/cm<sup>2</sup> alkol oksidaz (AO) aktivitesi olacak şekilde hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümler sonrası elde edilen sonuçlara ait standart grafikleri çizildi.

Grafiklerden edilen sonuçlar sonrası en ideal biyosensör cevaplarının 1,330 U/cm<sup>2</sup> aktivitedeki alkol oksidaz enzimi kullanılarak hazırlanan biyosensör ile alındığı belirlendi.



Şekil 3.6 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine enzim miktarının etkisi [ Tris-HCl tamponu; pH:7,5;50 mM, T:35<sup>0</sup>C, ● : 0,666 U/cm<sup>2</sup>AO, ● : 1,330 U/cm<sup>2</sup>AO, ● : 2,660 U/cm<sup>2</sup> AO Tüm biyosensörler için jelatin oranı 2,95mg jelatin/cm<sup>2</sup>, aljinat oranı % 2,0 ve glutaraldehid oranı % 0,5'dir ].

Alkol oksidaz aktivitesi 1,330 U/cm<sup>2</sup> olacak şekilde hazırlanan biyosensör ile (0,05-0,75) mM etanol konsantrasyonu aralığında doğrusal bir grafik elde edilirken, 0,666 U/cm<sup>2</sup>'lik alkol oksidaz ile (0,1-0,75) mM etanol konsantrasyon aralığında, 2,660 U/cm<sup>2</sup> aktivitedeki alkol oksidaz enzimi kullanılarak hazırlanan biyosensör ile de (0,05-0,75) mM etanol konsantrasyonu aralığında doğrusal bir grafik elde edildi. Ancak 1,330 U/cm<sup>2</sup>'lik alkol oksidaz ile hazırlanan biyosensöre göre daha düşük biyosensör cevapları belirlendi.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar için jelatin-κ-karrajenan biyosensörü için yapılan yorumlara benzer bir yorum yapılabilir. Enzim miktarındaki dolayısıyla aktivitesindeki azalma beklentilere uygun bir şekilde biyosensör cevabında düşmelere neden olmuştur. Enzim aktivitesindeki artışla birlikte enzimin içerdiği -NH<sub>2</sub> gruplarının glutaraldehid ile daha fazla sayıda çapraz bağ oluşturması, Ca-aljinatın da enzimin hareket yeteneğini sınırlandırmış olması ve oluşan karmaşık

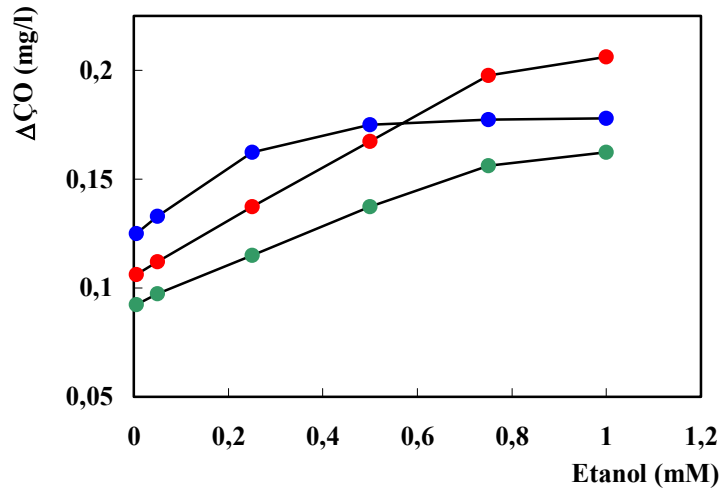
yapının substrat diffüzyonunu olumsuz yönde etkilemesi gibi nedenlerden dolayı düşük cevaplar alınmış olabileceği de düşünülebilir.

### 3.4.2 Jelatin miktarının biyosensörler cevabı üzerine etkisi

#### 3.4.2.1 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinde jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörleri cevabına jelatin miktarının etkisinin incelendiği çalışmada biyosensörler hazırlanırken daha önce en uygun enzim miktarı olarak belirlenen  $0,177 \text{ U/cm}^2$  aktiviteye sahip alkol oksidaz ve % 0,5'lik glutaraldehid oranları sabit tutulup biyoaktif tabakada 2,95; 5,90 ve  $11,8 \text{ mg}$  jelatin/ $\text{cm}^2$  olacak şekilde değişen oranlarda jelatin kullanıldı.

Ölçümler sonrası elde edilen grafikler Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine jelatin miktarının etkisi [ Fosfat tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:35°C, ● : 2,95 mg jelatin/ $\text{cm}^2$ , ● : 5,90 mg jelatin/ $\text{cm}^2$ , ● : 11,8 mg jelatin/ $\text{cm}^2$ . Tüm biyosensörler için enzim aktivitesi  $0,177 \text{ U/cm}^2$ AO ve glutaraldehid oranı % 0,5'dir ].

Şekilden de anlaşılacağı gibi biyoaktif tabakadaki jelatin oranı arttıkça biyosensörün verdiği cevapta da bir azalma gözlemlendi. 2,95 mg

jelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatin miktarı ile hazırlanan biyosensörle 5,9 mg jelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatin miktarı ile hazırlanan biyosensöre kıyasla daha yüksek bir cevap alınmakla birlikte doğrusallık 0,25 mM'a kadardır.

Bunun nedeni olarak jelatin miktarının düşmesiyle birlikte biyoaktif tabakadaki inceltme sonucu substrat difüzyonu problemindeki azalmadır. Bu durum özellikle düşük substrat konsantrasyonlarında daha yüksek bir biyosensör cevabıyla sonuçlanmıştır. Ancak daha yüksek substrat konsantrasyonlarında muhtemelen kosubstrat olan oksijen difüzyonunun etanole göre farklanması nedeniyle doğrusallıktan daha çabuk uzaklaşmıştır.

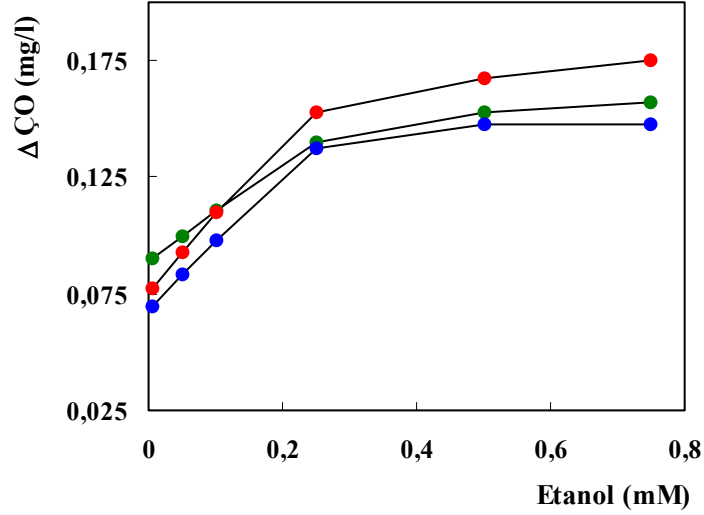
Jelatin oranı 11,8 mg jelatin/cm<sup>2</sup>'ye çıkarıldığında biyosensör cevabında düşme gözlemlendi. Bu sonuç, jelatin miktarının artmasıyla biyoaktif membran tabakasının kalınlaşmasına, enzim için sterik olumsuzluklar ve substrat difüzyonunun zorlaşmasına bağlanabilir.

Sonuç olarak en iyi biyosensör cevabının 5,9 mg jelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatin oranı ile hazırlanan biyosensörle alındığı belirlendi.

#### **3.4.2.2 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinde jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Bu çalışmada, hazırlanan tüm biyosensörlerde alkol oksidaz; 0,177 U/cm<sup>2</sup>, κ-karrajenan; 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı da % 0,5 olarak sabit tutuldu bununla birlikte jelatin oranı 0,22-0,44 ve 0,88 mg jelatin/cm<sup>2</sup> olacak şekilde farklılaştırılarak biyosensörler hazırlandı. Bu çalışmada κ-karrajenanın jelatin ile birlikte kullanılmasının nedeni, tek başına κ-karrajenan ile hazırlanan biyosensördeki biyoaktif tabakanın çok çabuk bir biçimde deforme olarak parçalanmasıdır.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.8 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine jelatin miktarının etkisi [ Fosfat tamponu; pH:7,5; 50 mM,T:35<sup>0</sup>C, ● : 0,22 mg jelatin/cm<sup>2</sup>, ● : 0,44 mg jelatin/cm<sup>2</sup>, ● : 0,88 mg jelatin/cm<sup>2</sup>. Tüm biyosensörler için alkol oksidaz 0,177 U/cm<sup>2</sup>, κ-karrajenan oranı 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 0,5 olarak sabit tutuldu ].

Şekilden görüldüğü gibi jelatin miktarı 0,22 mg/cm<sup>2</sup>'den 0,44 mg/cm<sup>2</sup>'ye arttırıldığında ilk standart hariç biyosensör cevabında bir artma bununla birlikte jelatin oranı 0,88 mg/cm<sup>2</sup>'ye çıkarıldığında biyoaktif membran tabakasındaki kalınlaşma ve bunun paralelinde substrat diffüzyonundaki problemlerden dolayı biyosensör cevabında bir düşme gözlemlendi.

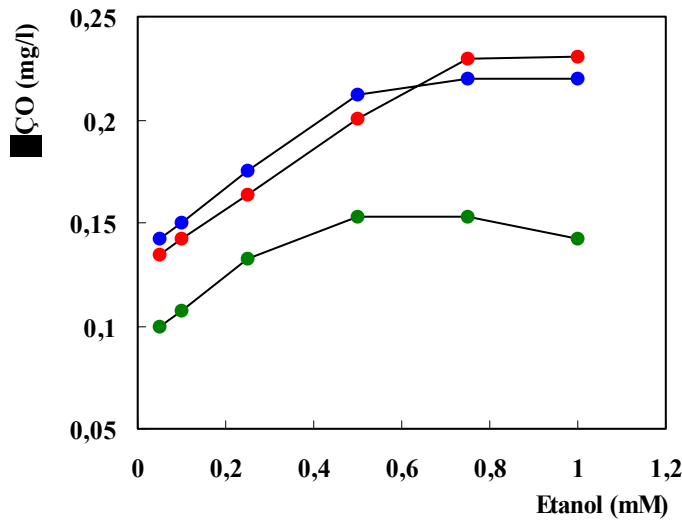
Her üç jelatin miktarı ile hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümlerde doğrusallığın 0,05-0,25 mM etanol konsantrasyon aralığında olduğu belirlendi. 0,22 mgjelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatin ile hazırlanan biyosensöre nazaran 0,44 mgjelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatin ile hazırlanan biyosensör ile yapılan denemelerde biraz daha yüksek bir cevap alınması ve biyoaktif tabakanın 0,22 mgjelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatinle hazırlanan biyosensörün biyoaktif tabakasına nazaran daha dayanıklı olması nedenlerinden dolayı bu biyosensörde 0,44 mgjelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatin oranı ile çalışmaya karar verildi.



### 3.4.2.3 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinde jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Jelatin miktarının Jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerin cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla biyoaktif tabaka oluşturulmasında alkol oksidazın  $1,330 \text{ U/cm}^2$ , aljinatın % 2,0 ve glutaraldehid oranının % 0,5 olarak sabit tutulup değişen oranlarda jelatinin kullanıldığı biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümler sonrası elde edilen biyosensör cevaplarına ilişkin standart grafikler Şekil 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3.9 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine jelatin miktarının etkisi [ Tris-HCl tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:35<sup>0</sup>C, ● : 0,22 mg jelatin/cm<sup>2</sup>, ● : 0,44 mg jelatin/cm<sup>2</sup>, ● : 0,88 mg jelatin/cm<sup>2</sup>. Tüm biyosensörler için alkol oksidaz  $1,330 \text{ U/cm}^2$ , aljinat oranı % 2,0 ve glutaraldehid oranı % 0,5 olarak sabit tutuldu ].

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar için alkol oksidaz enzim temelli diğer biyosensörler için elde edilen sonuçlara için yapılan yorumlara benzer bir yorum yapılabilir. Jelatin oranı arttıkça biyosensör cevabında düşme gözlemlendi. 0,22 mg jelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatin

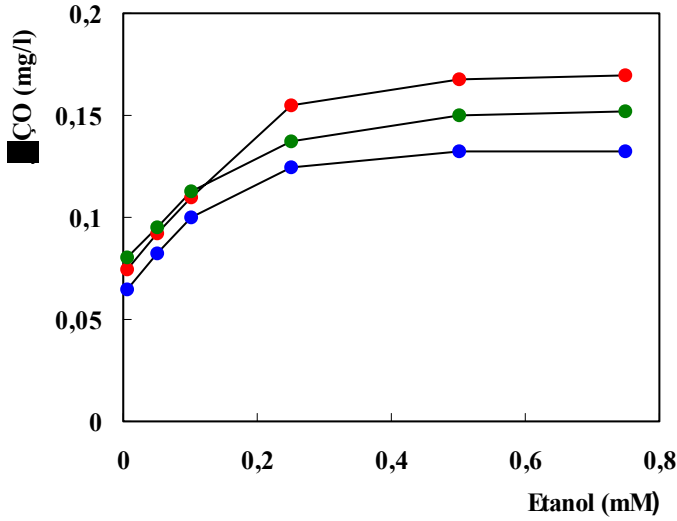
kullanılarak hazırlanan biyosensörle en yüksek cevap alınmakla birlikte doğrusallık 0,5 mM etanol konsantrasyonuna kadardır. Burada jelatin miktarının düşmesiyle birlikte biyoaktif tabakadaki incelme sonucu substrat difüzyonu problem azalmıştır. Bu durum özellikle düşük substrat konsantrasyonlarında daha yüksek bir biyosensör cevabıyla sonuçlanmıştır. Ancak daha yüksek substrat konsantrasyonlarında muhtemelen kosubstrat olan oksijenin difüzyonunun etanole göre farksız olması nedeniyle doğrusallıktan daha çabuk uzaklaşmıştır. 0,44 mgjelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatin oranı kullanıldığında ise doğrusallık 0,75 mM etanol konsantrasyonuna kadar ulaşmaktadır.

Jelatin oranındaki artışın biyoaktif membran tabakasının kalınlığının artmasına neden olduğunu ve bununla birlikte substrat difüzyonunu zorlaştırdığını söyleyebiliriz. Bununla birlikte burada kullanılan jelatin oranı alkol oksidaz temelli diğer biyosensörlere nazaran çok daha düşük olduğu için jelatin oranının artışıyla biyosensör cevabındaki düşmeyi daha çok, enzimin içerdiği -NH<sub>2</sub> gruplarının glutaraldehid ile daha fazla sayıda çapraz bağ oluşturmaya ve kalsiyum iyonlarının aljinat ile çok sayıda şelat oluşturmaya enzimin hareket yeteneğinin sınırlandırılmış olmasına ve oluşan karmaşık yapının substrat difüzyonunu olumsuz yönde etkilemesine dayandırabiliriz.

### **3.4.3 κ-karrajenan miktarının alkol oksidaz temelli biyosensör cevabı üzerine etkisi**

κ-karrajenan miktarının alkol oksidaz temelli biyosensörler cevabı üzerine etkisinin belirlendiği bu çalışmada biyoaktif tabakanın bileşenleri olan alkol oksidaz 0,177 U/cm<sup>2</sup>, jelatin 0,44 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid % 0,5 olarak sabit tutulurken değişen oranlarda κ-karrajenan kullanılarak biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan denemeler sonrası elde edilen sonuçlara ilişkin olarak çizilen standart grafikler Şekil 3.10'da gösterilmiştir.



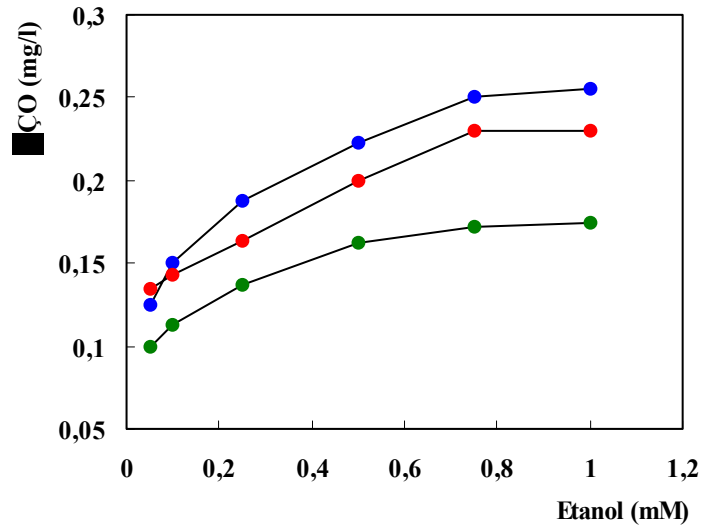
Şekil 3.10 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine κ-karrajenan miktarının etkisi, [ Fosfat tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:35<sup>0</sup>C, ● : 0,55 mg κ-karrajenan /cm<sup>2</sup>, ● : 1,10 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup>, ● : 2,20 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup>. Tüm biyosensörler için alkol oksidaz 0,177 U/cm<sup>2</sup>, jelatin oranı 0,44 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 0,5 olarak sabit tutuldu ].

Şekilden de görüldüğü gibi κ-karrajenan miktarının artışı biyosensör cevabında az da olsa düşmelere neden olmaktadır. Bu düşüşün muhtemel en önemli nedeni olarak biyoaktif tabaka kalınlaşması ile belirginleşen difüzyon problemleri gösterilebilir. Bununla birlikte her üç κ-karrajenan oranıyla hazırlanan biyosensörle etanol için doğrusal tayin aralığı 0,005-0,25 mM olarak belirlenmiştir.

### 3.4.4 Aljinat miktarının alkol oksidaz temelli biyosensör cevabı üzerine etkisi

Aljinat miktarının alkol oksidaz temelli biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla biyoaktif tabakanın bileşenleri olan alkol oksidaz  $1,330 \text{ U/cm}^2$ , jelatin  $2,95 \text{ mg/cm}^2$  ve glutaraldehid % 0,5 olarak sabit tutulurken değişen oranlarda aljinat kullanılarak biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörlerle gerçekleştirilen denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.11’de verilmiştir.



Şekil 3.11 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine aljinat miktarının etkisi, [ Tris-HCl tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:35°C, ● : % 1,0 aljinat , ● : % 2,0 aljinat , ● : % 3,0 aljinat. Tüm biyosensörler için alkol oksidaz  $1,330 \text{ U/cm}^2$ , jelatin oranı  $2,95 \text{ mg/cm}^2$  ve glutaraldehid oranı % 0,5 olarak sabit tutuldu ].

Denemeler sonrası elde edilen grafiklerden aljinat miktarındaki azalmayla birlikte biyosensör cevabının arttığını bununla birlikte en geniş doğrusal aralığı veren sonuçların % 2,0 aljinat oranı kullanılarak hazırlanan biyosensörle alındığı tespit edildi.

% 1,0 aljinat oranı ile hazırlanan biyosensörle diğerlerine nazaran biraz daha yüksek cevaplar alındı. Ancak grafik tam doğrusal olmadığı gibi ölçümleri takiben biyoaktif membran tabakasında büyük oranda deformasyonlar meydana geldi.

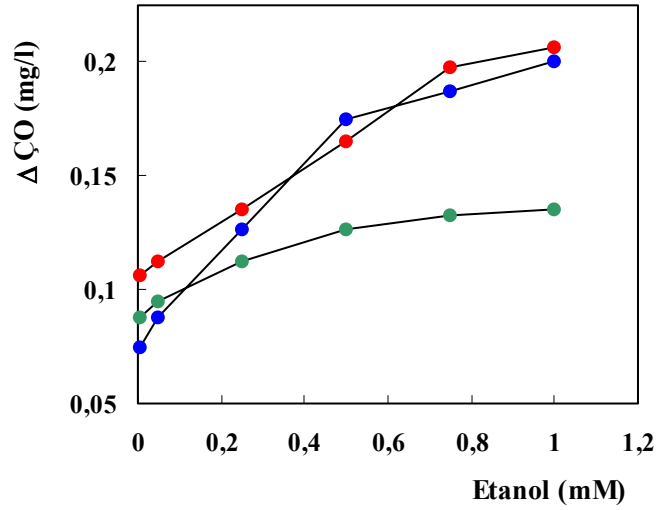
% 3,0 aljinat oranı kullanılarak hazırlanan biyosensör ile en düşük biyosensör cevabı alındı. Bunun nedeni olarak; enzim-enzim, enzim-jelatin, jelatin-jelatin arasındaki daha karmaşık ve yoğun çapraz bağlarla oluşan yapının yoğun kalsiyum-aljinat yapısı tarafından zorlanması ve bu durumun özellikle substrat diffüzyonu üzerindeki olumsuz etkisi gösterilebilir.

### **3.4.5 Glutaraldehid oranının alkol oksidaz temelli biyosensör cevabı üzerine etkisi**

#### **3.4.5.1 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla biyosensörlerin hazırlanmasında biyoaktif membran tabakasındaki alkol oksidaz  $0,177 \text{ U/cm}^2$  ve jelatin oranı  $5,9 \text{ mg jelatin/cm}^2$  olarak sabit tutulurken değişen oranlarda glutaraldehid ile çapraz bağlar oluşturuldu.

Geliştirilen biyosensörlerle yapılan denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.12’de verilmiştir.



Şekil 3.12 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine glutaraldehid miktarının etkisi, [ Fosfat tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:35<sup>0</sup>C, ● : % 0,25 glutaraldehid, ● : % 0,5 glutaraldehid, ● : % 1,0 glutaraldehid. Tüm biyosensörler için alkol oksidaz 0,177 U/cm<sup>2</sup> ve jelatin oranı 5,90 mg jelatin/cm<sup>2</sup> olarak sabit tutuldu ].

Glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlendiği çalışmalardan elde edilen grafiklerden glutaraldehid oranı % 0,25 iken 0,5 mM etanol konsantrasyonuna, % 0,5 iken 0,75 mM etanol konsantrasyonuna kadar doğrusal grafikler elde edildiği bununla birlikte % 1,0 oranında glutaraldehid kullanıldığında ise biyosensör cevabının düşmesi yanında doğrusallığın da kaybolduğu gözlemlendi. Doğaldır ki, glutaraldehid konsantrasyonundaki artış enzim-enzim, enzim-jelatin ve jelatin-jelatin arasında oluşan çapraz bağ sayısını da arttırmış ve bu sonuç beraberinde difüzyon problemlerini açığa çıkarmıştır.

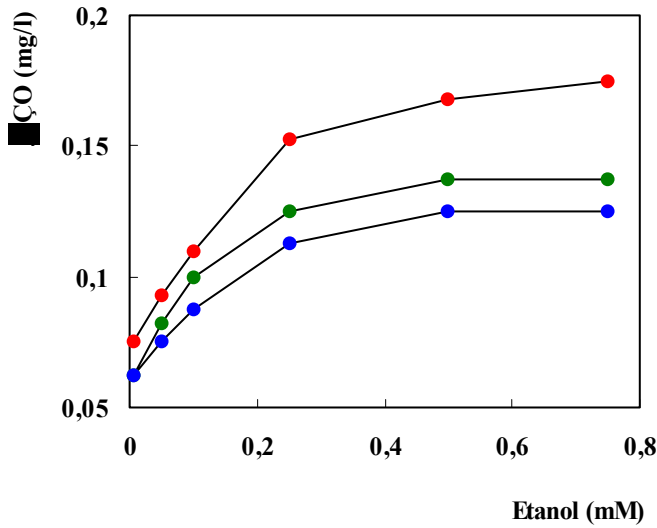
% 0,25 oranında glutaraldehid ile hazırlanan biyosensör ile alınan cevaplar 0,5 mM'lık etanol konsantrasyonuna kadar hızlı bir artış gösterirken bu noktadan sonra eğilme görüldü. % 0,5 oranında glutaraldehid ile hazırlanan biyosensör cevabı ise 0,75 mM'lık etanol

konsantrasyonuna kadar doğrusallık göstermiştir. Tüm bu sonuçlar ışığında % 0,5'lik glutaraldehid oranının kullanılmasına karar verildi.

### 3.4.5.2 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan biyosensörlerde biyoaktif membran tabakasındaki alkol oksidaz;  $0,177 \text{ U/cm}^2$ , κ-karrajenan oranı;  $1,1 \text{ mg κ-karrajenan/cm}^2$  ve jelatin oranı  $0,44 \text{ mg jelatin/cm}^2$  olarak sabit tutulurken değişen oranlarda glutaraldehid kullanılarak çapraz bağlar oluşturuldu.

Geliştirilen biyosensörlerle yapılan denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.13'de verilmiştir.



Şekil 3.13 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine glutaraldehid oranının etkisi, [ Fosfat tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:35<sup>0</sup>C , ● :% 0,25 glutaraldehid, ● :% 0,5 glutaraldehid, ● :% 1,0 glutaraldehid. Tüm biyosensörler için alkol oksidaz;  $0,177 \text{ U/cm}^2$ , jelatin oranı  $0,44 \text{ mg jelatin/cm}^2$  ve κ-karrajenan oranı  $1,1 \text{ mg κ-karrajenan/cm}^2$  olarak sabit tutuldu ].

Şekilden de görüldüğü gibi en düşük ve en yüksek glutaraldehid oranları kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile elde edilen cevapların % 0,5'lik glutaraldehid oranı kullanılarak hazırlanan biyosensör cevabına göre daha düşük olduğu belirlendi.

% 0,25'lik glutaraldehid kullanılarak hazırlanan biyosensörde enzim-jelatin, jelatin-jelatin ve enzim-enzim arasındaki çapraz bağ sayısının diğerlerine nazaran daha düşük olması biyoaktif tabakanın daha geçirgen bir yapıda oluşmasına neden olmuştur. Bu durum, ara yüzeydeki çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki düşüşün dışarıdan daha kolay difüzlendiği oksijen nedeniyle daha az gözlenmesine neden olmaktadır. Diğer taraftan % 1,0'lik glutaraldehid kullanılarak hazırlanan biyosensörde diğerlerine nazaran daha fazla oluşan çapraz bağlar biyoaktif tabakadaki enzimi sterik olarak olumsuz yönde etkileyerek aktivite düşüşüne neden olmaktadır.

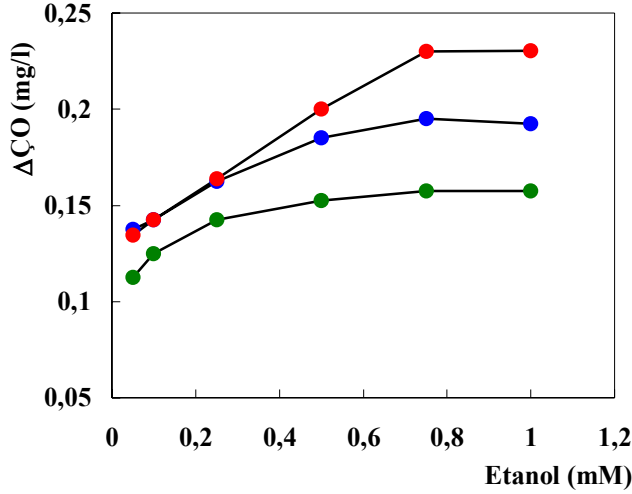
Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde % 0,5'lik glutaraldehid oranı ile en iyi biyosensör cevabının alındığı belirlendi.

### **3.4.5.3 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan biyosensörlerde biyoaktif membran tabakasındaki alkol oksidaz 1,330 U/cm<sup>2</sup>, Ca-aljinat oranı % 2,0 ve jelatin oranı 2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> olarak sabit tutulurken değişen oranlarda glutaraldehid kullanılarak biyoaktif membran tabakasında çapraz bağlar oluşturuldu.

Geliştirilen biyosensörlerle yapılan denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.14'de verilmiştir.





Şekil 3.14 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine glutaraldehid oranının etkisi, [ Tris-HCl tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:35<sup>0</sup>C, ● : % 0,25 glutaraldehid, ● : % 0,5 glutaraldehid, ● : % 0,75 glutaraldehid. Tüm biyosensörler için alkol oksidaz 1,330 U/cm<sup>2</sup>, jelatin oranı 2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve aljinat oranı % 2,0 olarak sabit tutuldu ].

Denemeler sonunda en düşük ve en yüksek glutaraldehid oranları kullanıldığında elde edilen biyosensör cevaplarının % 0,5'lik glutaraldehid oranı kullanılarak hazırlanan biyosensör cevabına göre daha düşük olduğu belirlendi.

Burada da diğer biyosensörlerde olduğu gibi % 0,25'lik glutaraldehid kullanılarak hazırlanan biyosensörde enzim-jelatin, jelatin-jelatin ve enzim-enzim arasındaki çapraz bağ sayısının yetersizliğinden dolayı substratın geri kaçıması mümkündür. Ayrıca arayüzey çözünmüş oksijen konsantrasyonu özellikle yüksek etanol konsantrasyonlarında oksijenin dışarıdan daha kolay difüzyonu nedeniyle etanol konsantrasyonu ile orantılı olarak düşmemektedir. Diğer taraftan % 0,75'lik glutaraldehid kullanılarak hazırlanan biyosensörde çapraz bağların fazla olması nedeniyle sterik etkilerden dolayı enzim aktivitesindeki düşüş biyosensör cevabındaki düşüşün en önemli nedenidir.

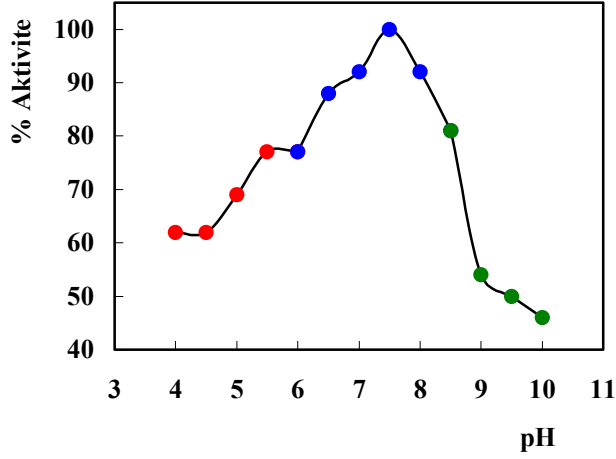
### **3.5 Alkol Oksidaz Temelli Biyosensörlerin Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular**

Alkol tayinine yönelik olarak alkol oksidaz (AO) enzimi kullanılarak hazırlanan jelatin, jelatin-κ-karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerin optimum pH, uygun tampon sistemi, uygun tampon konsantrasyonu ve optimum sıcaklık gibi çalışma koşullarına ait optimizasyon sonuçları bu bölümde verilmiştir

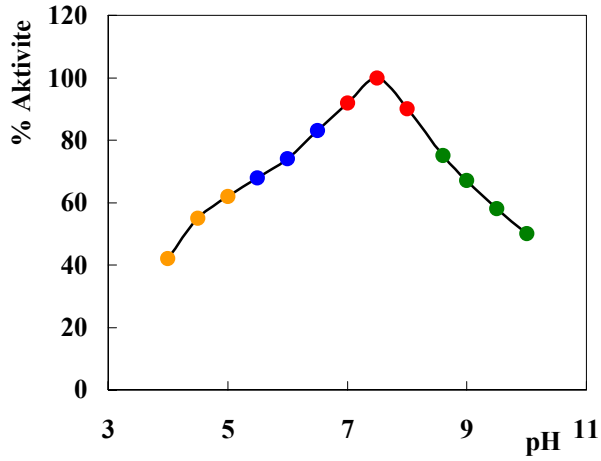
#### **3.5.1 Optimum pH**

Alkol oksidaz temelli jelatin, jelatin-κ-karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerin biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu sonrası her biyosensörün optimizasyon koşullarında yeni biyosensörler hazırlanarak bu biyosensörlere ilişkin optimum pH taramaları yapıldı.

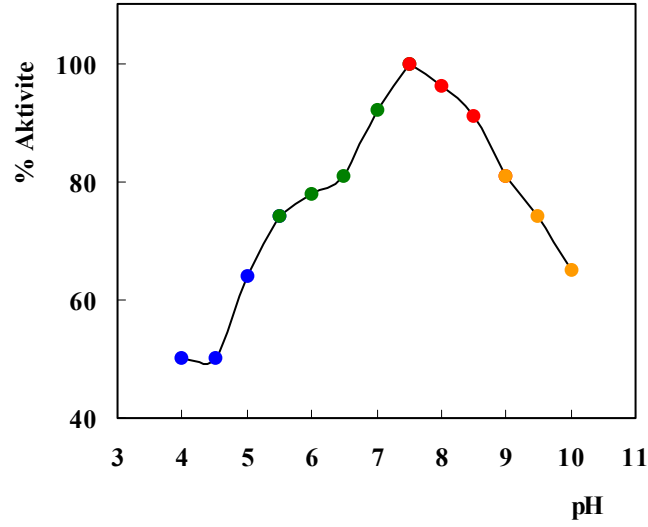
Geliştirilen her üç farklı alkol oksidaz biyosensörü ile yapılan optimum pH taramalarında biyosensörlerin en iyi cevabı pH:7,5 değerinde verdikleri görüldü. Serbest alkol oksidazın optimum pH değerinin de 7,5 civarı olduğu göz önüne alındığında immobilizasyon yöntemlerinin enzimin optimum pH'sında herhangi bir farklanma yaratmadığı açıktır. Her üç biyosensör için yapılan optimum pH çalışmasına ilişkin grafikler sırasıyla Şekil 3.15, 3.16 ve 3.17'de verilmiştir.



Şekil 3.15 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörüne ilişkin optimum pH grafiği [ ● : Sitrat tamponu, ● : Fosfat tamponu, ● : Glisin tamponu Tüm tamponların konsantrasyonu 50 mM'dır. T:35<sup>0</sup>C. Etanol konsantrasyonu 0,4 mM ].



Şekil 3.16 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörüne ilişkin optimum pH grafiği. [ ● : Asetat tamponu, ● : Sitrat tamponu, ● : Fosfat tamponu, ● : Glisin tamponu. Tüm tamponların konsantrasyonu 50 mM'dır. T:35<sup>0</sup>C. Etanol konsantrasyonu 0,1mM ].

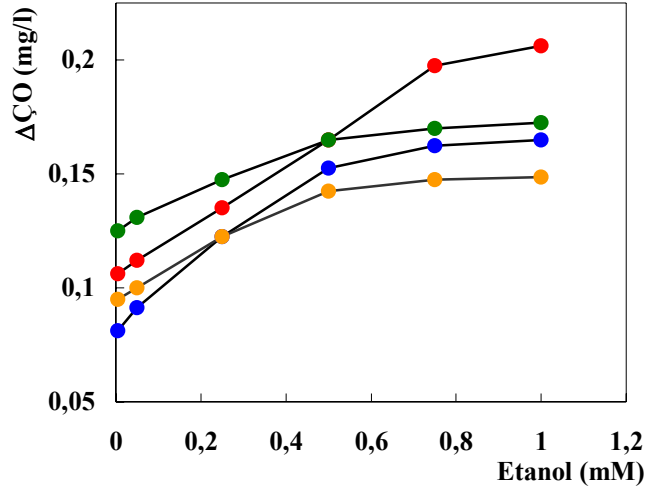


Şekil 3.17 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörüne ilişkin optimum pH grafiği [ ● : Asetat tamponu, ● : Tris-maleat tamponu, ● : Tris-HCl tamponu, ● : Glisin tamponu. Tüm tamponların konsantrasyonu 50 mM'dır. T:35°C. Etanol konsantrasyonu 0,4 mM ].

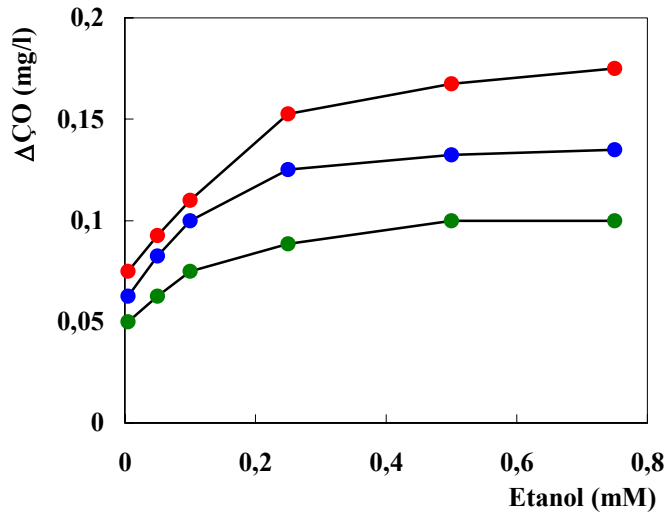
### 3.5.2 Uygun tampon sistemi

Alkol oksidaz temelli biyosensörlerin pH optimizasyonu sonrası bu pH değerine sahip olan tampon sistemleriyle de denemeler yapılarak pH'nın yanısıra tampon sistemlerinin de biyosensör cevabını ne yönde etkilediğinin belirlendiği çalışmalar gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda denemelerde pH: 7,5 değerine sahip K-Fosfat, Na-Fosfat, Tris-HCl ve Trietanolamin-HCl tampon sistemleri kullanıldı. Denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.18,3.19 ve 3.20'de gösterilmiştir.

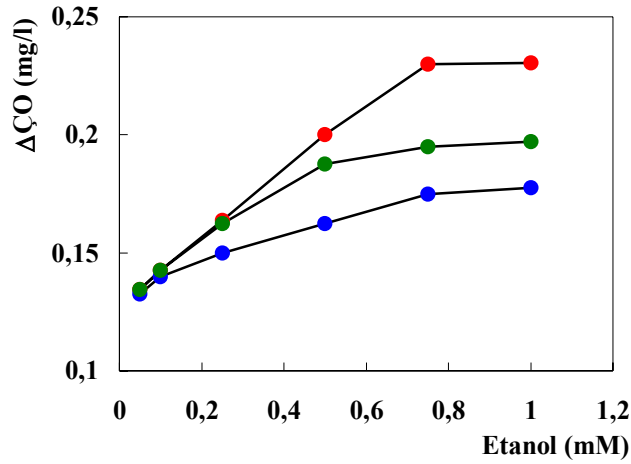
Jelatin ve jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörleri için en uygun tampon sisteminin K-Fosfat sistemi olduğu tespit edilirken jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensör için Tris-HCl tampon sisteminin en uygun olduğu belirlendi.



Şekil 3.18 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine tampon sisteminin etkisi, [ ● : Trietanolamin-HCl tamponu ● : Tris-HCl tamponu, ● : K-Fosfat tamponu, ● : Na-Fosfat tamponu. T:35<sup>0</sup>C. Tüm tamponların konsantrasyonu 50 mM'dır ].



Şekil 3.19 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine tampon sisteminin etkisi, [ ● : K-Fosfat tamponu ● : Na-Fosfat tamponu, ● : Tris-HCl tamponu, T:35<sup>0</sup>C. Tüm tamponların konsantrasyonu 50 mM'dır ].



Şekil 3.20 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine tampon sisteminin etkisi, [ ● :Tris-HCl tamponu, ● : Trietanolamin/HCl tamponu, ● :Tris-Maleat tamponu, T:35<sup>0</sup>C. Tüm tamponların konsantrasyonu 50 mM'dir ].

Şekil 3.20'den de görüldüğü gibi Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz için en iyi biyosensör cevabı Tris-HCl tampon sistemi kullanıldığında alındı. Tris-HCl ve en düşük biyosensör cevapları alınmasına rağmen Trietanolamin/HCl tampon sistemleri kullanıldığında 0,05-0,75 mM etanol standart aralığında doğrusal sonuçlar elde edildi. Tris-Maleat tamponu ile yapılan ölçümlerde Trietanolamin/HCl tampon sistemine nazaran daha yüksek biyosensör cevapları alınmasına rağmen bir dezavantaj olarak 0,05-0,5 mM etanol konsantrasyonu aralığında doğrusal grafik elde edildi.

Bu sonuçlar biyosensör cevabı üzerine tampon sistemlerinin etkisinin önemini ayrıntılı bir biçimde ortaya koymuştur. Tampon sistemlerinin ihtiva ettikleri iyonların biyoaktif tabaka bileşenleri ile ,substrat ile ya da oluşan ürünler ya da enzimdeki yüklü gruplar ile etkileşimi biyosensör cevaplarını değişik şekillerde etkilemektedir.

Jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerde pH:7,5 olan fosfat tamponu sistemleri kullanılamamaktadır. Bunun en önemli nedeni Ca-aljinat kompleksindeki  $Ca^{2+}$  iyonlarının fosfat iyonları tarafından çekilmesi ve biyoaktif tabakanın yapısının bozulmasına yolaçmasıdır .

### 3.5.3 Uygun tampon konsantrasyonu

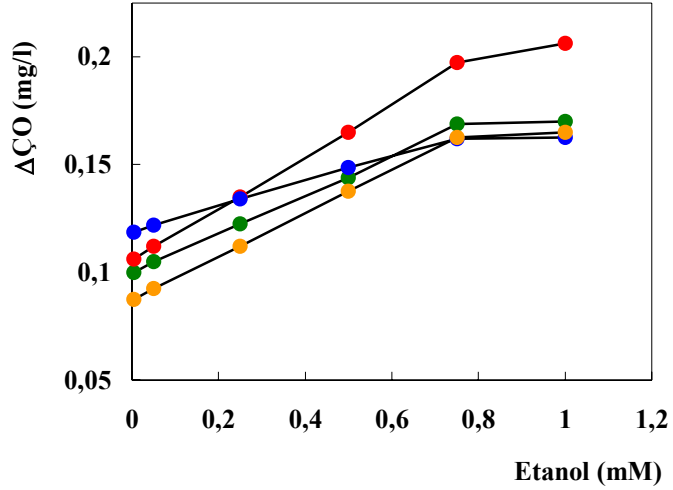
Alkol oksidaz temelli biyosensörlerin pH optimizasyonun belirlenmesi ve bu pH değerine sahip olan tampon sistemlerinin tespit edilmesinden sonra bu tampon sistemlerinin hangi konsantrasyonları ile çalışıldığında en iyi biyosensör cevaplarının alındığının belirlenmesi amacıyla en uygun tampon konsantrasyonlarının belirlenmesine yönelik çalışmalara geçildi.

Bu amaç doğrultusunda denemelerde pH: 7,5 değerine sahip K-Fosfat (jelatin ve jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörleri için) ve Tris-HCl (jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensör için) tampon sistemlerinin 25-50-100 ve 200 mM'lık konsantrasyonları kullanıldı.

Denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.22'de gösterilmiştir.

Jelatin ,jelatin- $\kappa$ -karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörleri ile yapılan ölçümlerde en iyi biyosensör cevaplarının 50 mM'lık tampon sistemleri kullanıldığında alındığı belirlendi.

Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun etkisine ilişkin grafik Şekil 3.21'de verilmiştir.



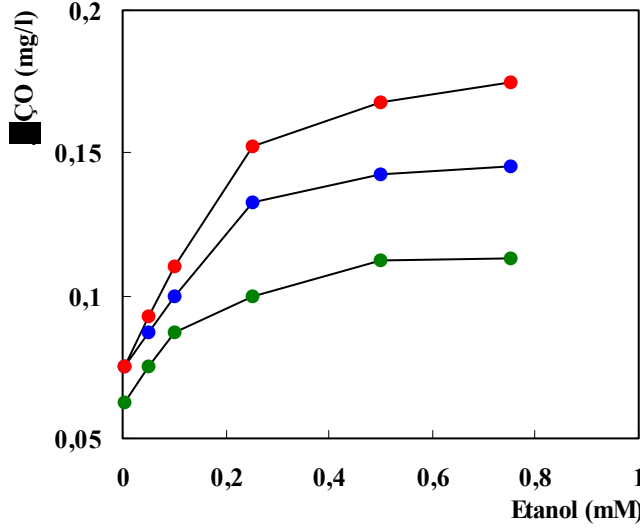
Şekil 3.21 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi, [ K-Fosfat tamponu; ● :25 mM, ● :50 mM, ● :100 mM, ● :200 mM. T:35<sup>0</sup>C ].

Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile farklı konsantrasyonlardaki fosfat tamponları ile yapılan ölçümler sonrası tüm konsantrasyonlar için 0,005-0,75 mM etanol konsantrasyon aralığında doğrusal sonuçlar alınırken en yüksek biyosensör cevabı 50 mM'lık konsantrasyon kullanıldığında elde edildi.

100 mM'lık tampon konsantrasyonu ile özellikle 0,25 mM'lık etanol konsantrasyon aralığına kadar en yüksek biyosensör cevapları alındı fakat bu konsantrasyondan sonra düşük eğimle seyreden bir doğrusal grafik elde edildi. Tampon konsantrasyonu arttıkça iyon şiddetindeki artışa paralel olarak özellikle daha yüksek etanol konsantrasyonlarında biyosensör cevaplarının azaldığı belirlendi.

Jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun etkisine ilişkin grafik Şekil 3.22'de verilmiştir.



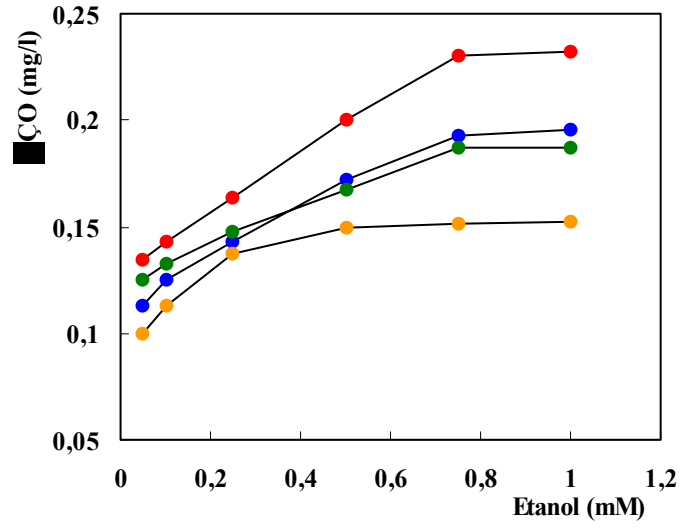


Şekil 3.22 Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi, [K-Fosfat tamponu; ●:25 mM, ●:50 mM, ●:100 mM. T:35<sup>0</sup>C].

Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörleri ile farklı konsantrasyonlardaki fosfat tamponları ile yapılan ölçümler sonrası tüm konsantrasyonlar için 0,005-0,25 mM etanol konsantrasyon aralığında doğrusal sonuçlar alınırken en yüksek biyosensör cevabı 50 mM'lık konsantrasyon kullanıldığında elde edildi.

Tampon konsantrasyonunun artışı iyon konsantrasyonu ve iyon şiddetinin artmasına neden olmaktadır. Genel olarak iyon şiddetinin artması enzim aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır. Bu genel çerçeveden bakıldığında bu çalışmada 50 mM'lık konsantrasyondaki biyosensör cevaplarının 25 mM'lık konsantrasyona nazaran daha düşük çıkması bir tezat gibi görülsede aradaki aktivite farkının çok küçük olması, bunun yanısıra 25-50 mM gibi çok düşük konsantrasyonlarda çalışılması, bu immobilizasyon yönteminde iyon şiddetinde bu aralıktaki bir artışın enzim mikro çevresinde aktivite üzerine olumlu katkı yapacak değişikliklere yol açtığını düşündürmektedir. İyon şiddeti daha fazla arttırıldığında ise (100 mM) genel ilke çerçevesinde beklenen durum gerçekleşmiş ve biyosensör cevabı düşmüştür.

Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun etkisine ilişkin grafik Şekil 3.23’de verilmiştir.



Şekil 3.23 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi, [ Tris-HCl tamponu; ●25 mM, ●50 mM, ●100 mM, ●200 mM. T:35<sup>0</sup>C ].

Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile farklı tampon konsantrasyonları kullanılarak yapılan ölçümler sonrası elde edilen grafiklerden en iyi ve yüksek elektrod cevabının 50 mM’lık tampon konsantrasyonu ile alındığı belirlendi.

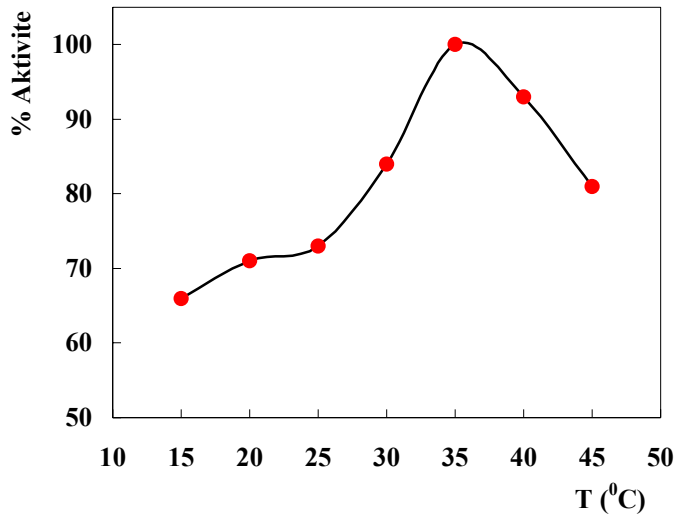
Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörleri ile farklı konsantrasyonlardaki Tris-HCl tamponları ile yapılan ölçümler sonrası 25 mM’lık Tris-HCl tamponu ile 0,1-0,75 mM etanol konsantrasyonu aralığında 200 mM’lık konsantrasyondaki Tris-HCl tamponu kullanıldığında ise 0,05-0,25 mM etanol konsantrasyonu aralığında doğrusal sonuçlar alındı. 50 ve 100 mM tampon konsantrasyonları için ise 0,05-0,75 mM etanol konsantrasyon aralığında doğrusal sonuçlar alınırken en yüksek biyosensör cevabı 50 mM’lık konsantrasyon kullanıldığında elde edildi.

Tampon konsantrasyonu arttıkça iyon şiddetindeki artışa paralel olarak özellikle daha yüksek etanol konsantrasyonlarında biyosensör cevaplarının daha fazla azaldığı belirlendi.

### 3.5.4 Optimum sıcaklık

Optimizasyon çalışmalarının son denemelerini kapsayan bu çalışmada alkol oksidaz temelli biyosensörlerle 15-20-25-30-35-40 ve 45°C'lerde standart grafikler çizilerek sıcaklığın biyosensör cevapları üzerine etkisi belirlendi.

Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine sıcaklığın etkisi Şekil 3.24'de verilmiştir.

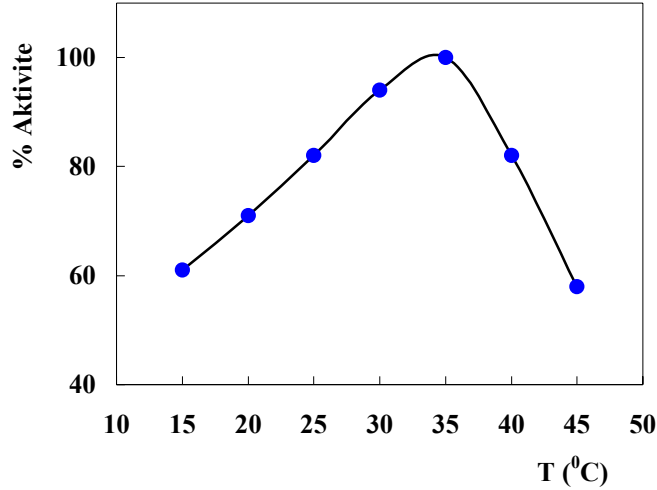


Şekil 3.24 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine Sıcaklığın etkisi, [ Fosfat tamponu, pH:7,5; 50 mM, Etanol konsantrasyonu: 0,5 mM ].

Şekilden de görüldüğü gibi 35°C'ye kadar biyosensör cevabında artış, üstünde ise azalma kaydedildi. Sıcaklık artışıyla paralel olarak çözülmüş oksijen konsantrasyonunda da azalma dolayısıyla biyosensör cevabında da düşme beklenirken 35°C'ye kadar artış kaydedilmesini

enzimin aktivitesinin optimum sıcaklığı olan 35<sup>0</sup>C'ye kadar artış göstermesiyle, 35<sup>0</sup>C'den daha yüksek sıcaklıklarda biyosensör cevabında düşme gözlenmesini ise optimum sıcaklığın aşılmasıyla birlikte gerek enzim aktivitesinde ve gerekse sıcaklık artışıyla çözülmüş oksijen konsantrasyonundaki azalmayla açıklamak mümkündür.

Jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine sıcaklığın etkisi Şekil 3.25'de verilmiştir.

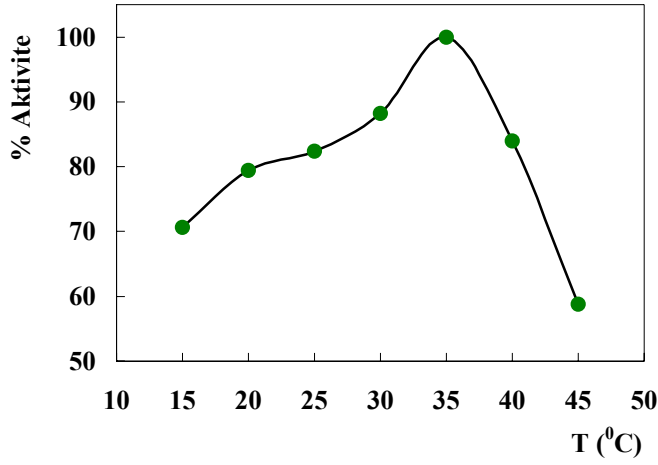


Şekil 3.25 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine sıcaklığın etkisi, [ Fosfat tamponu,pH:7,5; 50 mM, Etanol konsantrasyonu : 0,1 mM ].

Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü için elde edilen optimum sıcaklık sonuçlarına benzer olarak elde edilen bu grafikte de optimum sıcaklık olarak 35<sup>0</sup>C bulundu. 35<sup>0</sup>C'nin altında ve üstünde biyosensör cevabında düşüş gözlemlendi. Bu düşüşün 35<sup>0</sup>C'nin üstündeki sıcaklıklarda daha belirginleştiği tespit edildi.

Bu sonuca etkili parametreler olarak enzimin optimum sıcaklığının aşılması, sıcaklık artışıyla çözülmüş oksijen konsantrasyonundaki azalmanın yanısıra immobilizasyon yönteminin etkilerini de göz önünde tutmak gerekir.

Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine sıcaklığın etkisi Şekil 3.26'da verilmiştir.



Şekil 3.26 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabı üzerine sıcaklığın etkisi, [ Tris-HCl tamponu, pH:7,5;50 mM, Etanol konsantrasyonu : 0,5 mM ].

Jelatin ve Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörleri için elde edilen optimum sıcaklık sonuçlarına benzer olarak elde edilen bu grafikte de optimum sıcaklık olarak 35°C bulundu. Yine 35°C'nin altında ve üstünde biyosensör cevabında düşme gözlemlendi, bu düşmelerin Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensöründe olduğu gibi 35°C'nin üstündeki sıcaklıklarda daha belirginleştiği görüldü.

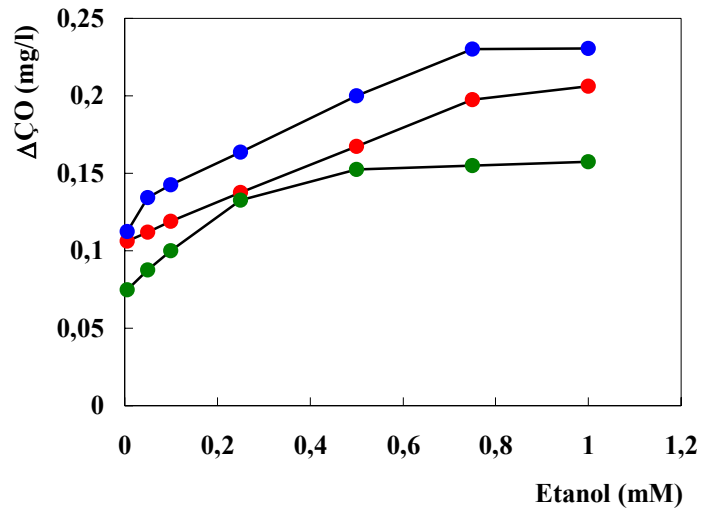
Burada da sonuca etkiyen parametreler olarak enzimin optimum sıcaklığının aşılması, sıcaklıkla çözülmüş oksijen konsantrasyonundaki azalmanın yanısıra immobilizasyon yönteminin etkilerini de gözönünde tutmak gerekir. Nitekim bu biyosensörde 45°C'de ölçüm yapıldıktan sonra biyoaktif tabakada büyük oranda bir deformasyon gözlemlendi.

### 3.6 Alkol Oksidaz Temelli Biyosensörlerin Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

Bu bölümde alkol oksidaz temelli biyosensörler için etanol tayin sınırlarının, analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin, substrat spesifikliğin, girişim etkilerinin, operasyonel ve depo kararlılıklarının belirlenmesine yönelik olarak elde edilen sonuçlar verildi.

#### 3.6.1 Etanol tayin sınırları

Jelatin, jelatin- $\kappa$ -karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerine ait etanol tayin sınırlarının belirlenmesine yönelik denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.27'de verilmiştir.



Şekil 3.27 Alkol oksidaz temelli biyosensörlerin etanol tayin aralığı  
 [ ● : Jelatin-Ca-aljinat tabanlı (Tris-HCl tamponu ,pH:7,5;50 mM), ● : Jelatin tabanlı ( Fosfat tamponu ,pH:7,5;50 mM), ● : Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı ( Fosfat tamponu, pH:7,5;50 mM), Tüm biyosensörler için çalışma sıcaklığıT:35<sup>0</sup>C ].

Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek cevaplar jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile alınmıştır. Bununla birlikte bu biyosensör ile 0,05-0,75 mM etanol konsantrasyonu aralığında

doğrusal bir grafik elde edilirken jelatin tabanlı biyosensör ile 0,005-0,75 mM etanol konsantrasyon aralığında doğrusal sonuçlar elde edildi. jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensörle ise 0,005-0,25 mM etanol konsantrasyonu aralığında doğrusal bir grafik elde edildi. En düşük biyosensör cevabının jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensör ile alınmasına ve bu biyosensör ile tayin edilebilen en düşük etanol konsantrasyonunun jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörüne nazaran 10 kat daha yüksek olması immobilizasyon materyal ve yöntemlerinin biyosensör cevaplarını önemli ölçüde etkileyebildiğini göstermektedir.

Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü hem doğrusal tayin aralığı bakımından, hem immobilizasyon prosedürünün kolay uygulanabilir olması ve hem de mekanik kararlılığının diğer biyosensörlere nazaran daha yüksek olması gibi nedenlerden dolayı önemli avantajlara sahiptir.

### 3.6.2 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

Alkol oksidaz temelli biyosensörlerle yapılan analizlerin sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin tayini amacıyla her bir biyosensörle etanolün belirli bir konsantrasyonunda (n=10) ölçümler yapıldı. Elde edilen sonuçlara ilişkin bulunan standart sapma(S.S) ve varyasyon katsayılarına ilişkin değerler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Alkol oksidaz temelli biyosensörlerde analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği (n=10)

	Etanol Kons. (mM)	Ortalama Değer ( $\bar{X}$ ) (mM)	Standart Sapma (S.S) (mM)	Varyasyon Katsayısı (V.K) (%)
<b>Jelatin Tabanlı AO Biyosensörü</b>	0,5	0,496	± 0,00569	1,15
<b>Jel.-Ca-aljinat Tabanlı AO Biyosensörü</b>	0,5	0,495	± 0,00632	1,28
<b>Jel.-κ-karrajenan Tabanlı AO Biyosensörü</b>	0,1	0,097	± 0,00290	2,98

Çizelgeden de anlaşılacağı gibi her üç biyosensörle de oldukça iyi sonuçlar alınmış olup kıyaslama açısından bakıldığında en iyi

sonuçların jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile alındığı görülmektedir.

### 3.6.3 Substrat spesifikliği

Alkol oksidaz temelli biyosensörlerin substrat spesifikliklerine ilişkin olarak elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2’de özetlenmiştir.

Çizelge3.2 Alkol oksidaz temelli biyosensörlerin substrat spesifikliği

Substrat	Jelatin Tabanlı AO Biyosensörü için % Aktivite	Jel.-Ca-aljinat Tabanlı AO Biyosensörü için % Aktivite	Jel.-κ-karrajenan Tabanlı AO Biyosensörü için % Aktivite
Etanol	100	100	100
Metanol	20	38	22
Propanol	66	46	16
Bütanol	53	58	34
İzo-propanol	47	31	19
Etilenglikol	76	54	19
Dietilenglikol	73	62	25
Glukoz	47	62	22
L-Askorbik asit	93	92	200

Substrat konsantrasyonları jelatin tabanlı ve jel.-Ca-aljinat tabanlı biyosensörler için 0,5 mM, jel.-κ-karrajenan tabanlı biyosensör için 0,1 mM’dir.

Çizelgeden de görüldüğü gibi jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile diğer AO biyosensörlerine nazaran L-askorbik asit için daha yüksek cevap alınmıştır. Bunun nedeni olarak bu biyosensörün hazırlanmasında kullanılan immobilizasyon yönteminin biyoaktif tabakanın kalınlığı, gözenek boyutu polaritesi ve benzeri fiziksel ve kimyasal özelliklerinde yapabileceği değişiklikler düşünülmektedir. Bunların yanısıra enzimin söz konusu yöntemle immobilizasyonunun üç boyutlu yeri üzerine etkisinde L-askorbik asitle etkileşimini diğer yöntemlere nazaran daha olumlu etkilemiş olabileceği de düşünülmektedir.

### 3.6.4 Etanol tayininde bazı maddelerin girişim etkileri

Bu çalışmada bazı maddelerin etanol tayininin hedeflendiği biyosensörlerin cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla,



reaksiyon ortamında etanolün yanısıra ayrıca bazı girişim etkisi yapabilecek maddelerin de (metanol,propanol, bütanol, izo-propanol, etilenglikol, dietilenglikol, glukoz ve L-askorbik asitin standart çözeltileri) bulunduğu sistemler oluşturularak ölçümler gerçekleştirildi.

Ölçümler sonunda elde edilen sonuçlara ilişkin veriler Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3 Alkol oksidaz temelli biyosensörler ile etanol tayininde bazı maddelerin girişim etkilerinin belirlenmesi

Substrat	Jelatin Tabanlı AO Biyosensörü için % Aktivite	Jel.-Ca-aljinat Tabanlı AO Biyosensörü için % Aktivite	Jel.-κ-karrajenan Tabanlı AO Biyosensörü için % Aktivite
Etanol	100	100	100
(Etanol + Metanol)	102	104	104
(Etanol + Propanol)	133	104	96
(Etanol + Bütanol)	120	115	83
(Etanol + izo-propanol)	106	112	92
(Etanol + Etilenglikol)	93	92	108
(Etanol + Dietilenglikol)	93	119	100
(Etanol + Glukoz)	106	96	92
(Etanol +L-Ask. Asit)	180	169	208

Substrat konsantrasyonları jelatin tabanlı ve jel.-Ca-aljinat tabanlı biyosensörler için 0,5 mM, jel.-κ-karrajenan tabanlı biyosensör için 0,1 mM’dir.

Çizelge 3.3’den görüldüğü gibi reaksiyon ortamında tek olarak bulduklarında oldukça yüksek biyosensör cevapları veren maddeler etanol ile birlikte reaksiyon ortamına ilave edildiğinde tek başlarına verdikleri etkinin oldukça altında bir düzeyde biyosensör cevabını etkilemektedir. Özellikle metanolün etkisi etanol ile bir arada iken daha da azalmıştır. Bu sonuç özellikle etanol içeren ortamlarda normalde etanolün yanında çok daha düşük konsantrasyonda bulunma ihtimali olan diğer alkollerin dikkate değer bir girişim etkisine yol açmayacaklarının en önemli kanıtı olarak ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak, alkol oksidazın diğer alkollerin varlığında etanolü seçimli olarak dönüşüme uğrattığı görülmektedir. Etanol tayin edilecek ortamlarda diğer bulunması en muhtemel alkol olan metanol söz

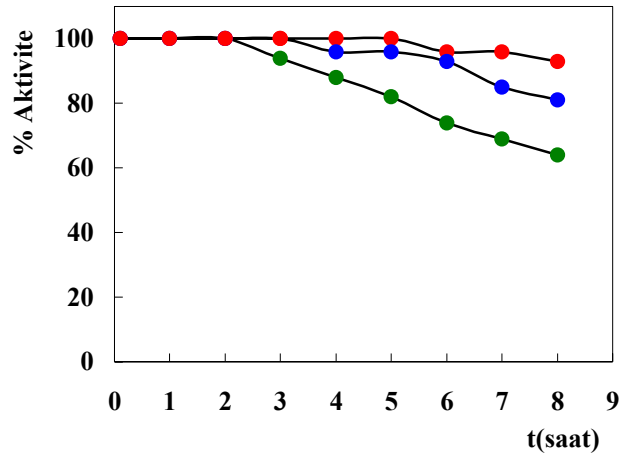
konusu olduğunda her üç biyosensöründe etanol tayini için yeterli güvenilirliği sağlayacağı belirgin bir şekilde görülmektedir.

### 3.6.5 Operasyonel kararlılık

Biyosensörlerin operasyonel kararlılıklarının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensörler daha önce optimizasyonu yapılarak belirlenmiş olan çalışma sıcaklığında ve çalışma tamponu içinde bekletilerek bir saatlik periyotlar sonunda alkol oksidaz enzimi temelli biyosensörler ile ölçümler yapıldı.

Jelatin ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörler ile yapılan ölçümlerde etanolün 0,4 mM konsantrasyonundaki standardı ile çalışılırken jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile yapılan ölçümlerde etanol standardının 0,1 mM'lık konsantrasyonları kullanıldı.

Denemeler sonrası sonuçlara yönelik olarak elde edilen grafikler Şekil 3.28'de verilmiştir.



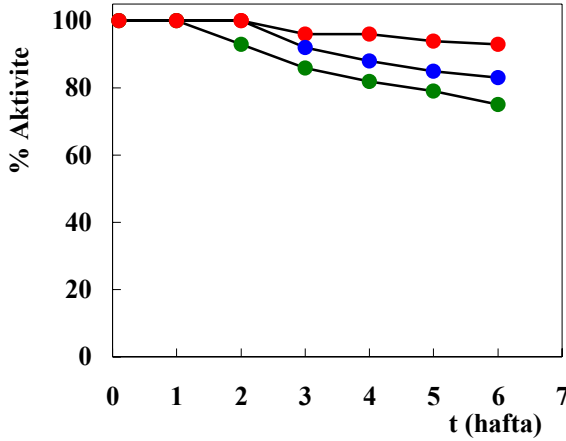
Şekil 3.28 Alkol oksidaz temelli biyosensörlerin operasyonel kararlılığı  
 [ ● : Jelatin-Ca-aljinat tabanlı (Tris-HCl tamponu, pH:7,5;50 mM)  
 ● : Jelatin tabanlı (Fosfat tamponu ,pH:7,5;50 mM),  
 ● : Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı ( Fosfat tamponu, pH:7,5;50 mM),  
 Tüm biyosensörler için çalışma sıcaklığı T:35<sup>0</sup>C ].

Operasyonel kararlılık denemelerinde sekiz saatlik periyot sonunda jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabında sadece % 7,0'lık bir düşme meydana gelirken bu oran jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensöründe % 19, jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensöründe ise % 36 olarak bulundu. Bu bulgular immobilizasyon materyalinin biyosensörlerin operasyonel kararlılığı üzerinde önemli ölçüde etkili olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar jelatin tabanlı biyosensörün diğerlerine nazaran bu açıdan daha avantajlı olduğunu göstermektedir.

### 3.6.6 Depo kararlılığı

Denemelerde alkol oksidaz enzimi ile hazırlanan jelatin ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörler ile yapılan ölçümlerde etanolün 0,4 mM'lık konsantrasyonları ile jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile yapılan ölçümlerde ise 0,1 mM'lık etanol konsantrasyonu ile çalışıldı.

Denemeler sonrası sonuçlara yönelik olarak elde edilen grafikler Şekil3.29'da verilmiştir.



Şekil 3.29 Alkol oksidaz temelli biyosensörlerin depo kararlılığı

- [ ● : Jelatin-Ca-aljinat tabanlı (Tris-HCl tamponu, pH:7,5 ;50 mM),
  - : Jelatin tabanlı (Fosfat tamponu ,pH:7,5;50 mM)
  - : Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı (Fosfat tamponu, pH:7,5;50 mM),
- Tüm biyosensörler için çalışma sıcaklığı; T:35<sup>0</sup>C].

Altı haftalık bir periyot sonrasında, yapılan ölçümler sonunda jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabında sadece % 7,0'lik bir azalma kaydedilirken , jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensör cevabında % 17'lik, jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü cevabında ise % 25'lik bir azalma tespit edildi. Bu sonuçlar jelatin tabanlı biyosensörün diğerlerine nazaran bu açıdan daha avantajlı olduğunu göstermektedir.

### **3.7 Katalaz Temelli Biyosensörlerin Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonuna İlişkin Bulgular**

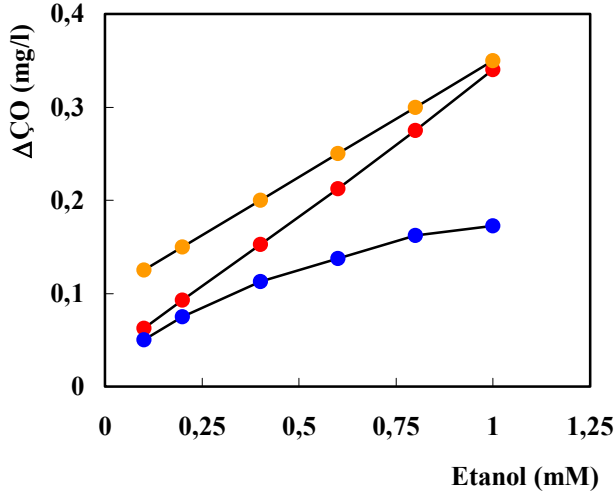
Bu bölümde katalaz enzimi kullanılarak hazırlanan jelatin, jelatin-κ-karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerde enzim, jelatin, κ-karrajenan, aljinat ve glutaraldehid oranlarının biyosensörler cevabına etkilerinin incelendiği biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonuna ilişkin sonuçlar verilmiştir.

#### **3.7.1 Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

##### **3.7.1.1 Jelatin tabanlı katalaz biyosensörlerinde enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla jelatin ve glutaraldehid miktarının sabit tutulup bununla birlikte biyoaktif membran tabakasında 826 U/cm<sup>2</sup>, 1652 U/cm<sup>2</sup> ve 8260 U/cm<sup>2</sup> katalaz enzim aktivitesi olacak şekilde hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümler sonrası elde edilen sonuçlara ait standart grafikleri çizildi.

Jelatin tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine enzim miktarının etkisinin belirlendiği grafikler Şekil 3.30'da verilmiştir.



Şekil 3.30 Jelatin tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine enzim miktarının etkisi [ Fosfat tamponu; pH:7,0; 50 mM, T:35<sup>0</sup>C, ● : 826 U/cm<sup>2</sup>, ● : 1652 U/cm<sup>2</sup>, ● : 8260 U/cm<sup>2</sup> Tüm biyosensörler için jelatin oranı 11,8mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'dur ].

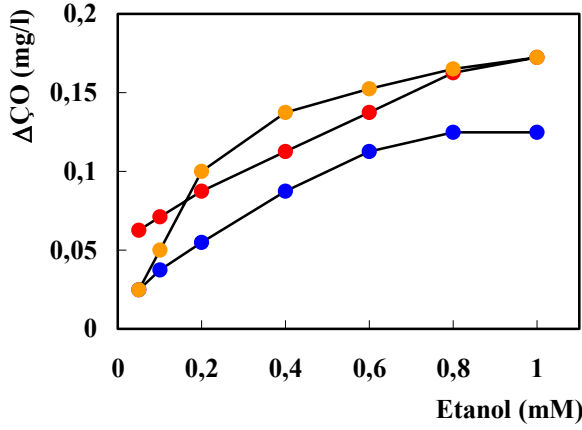
Şekilden de görüleceği gibi enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla jelatin ve glutaraldehid miktarının sabit tutulup biyoaktif membran tabakasında 826 U/cm<sup>2</sup>, 1652 U/cm<sup>2</sup> ve 8260 U/cm<sup>2</sup> katalaz aktivitesi olacak şekilde hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümler sonrası elde edilen sonuçlar sonrası en yüksek elektrod cevabının 8260 U/cm<sup>2</sup>'lik katalaz enzim aktivitesi kullanılarak hazırlanan biyosensör ile alındığı belirlendi. Ancak 1652 U/cm<sup>2</sup>'lik katalaz aktivitesine sahip biyosensör ile alınan cevapların da oldukça yüksek ve 8260 U/cm<sup>2</sup>'lik katalaz enzim aktivitesine sahip biyosensör ile elde edilen sonuçlara yakın olduğu gözlemlendi. Her iki biyosensör ile (0,1-1,0) mM etanol aralığında doğrusal bir grafik elde edilirken, 826 U/cm<sup>2</sup>'lik enzim konsantrasyonu ile hazırlanan biyosensör ile (0,1-0,8)mM etanol konsantrasyon aralığında doğrusal bir grafik elde edildi. Kullanılan enzim miktarı açısından değerlendirildiğinde daha ekonomik olması nedeniyle 1652 U/cm<sup>2</sup>'lik aktiviteye sahip olan biyosensörün ideal niteliklere sahip olduğuna karar verildi.

Biyoaktif membran tabakasındaki enzim miktarının dolayısıyla aktivitenin artışıyla biyosensör cevabında da doğal olarak artış görülmüştür. Ancak bu artış enzim miktarındaki artışla orantılı bir şekilde gerçekleşmemektedir. Enzim miktarları 5-10 katına çıkarıldığında biyosensör cevabındaki artış aynı oranda olmamıştır. Enzim miktarındaki dolayısıyla protein miktarındaki artışla paralel olarak biyoaktif tabakada glutaraldehid muamelesi sonrası çok daha fazla sayıda çapraz bağ oluşmuştur. Bunun sonucunda, artan sterik engeller aktivitede düşmeye neden olarak biyosensör cevabında beklenen oranda bir yükselmeye izin vermemiştir.

### **3.7.1.2 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörlerinde enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensörlerde katalaz miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla; jelatin, κ-karrajenan ve glutaraldehid miktarının sabit tutulup bununla birlikte biyoaktif membran tabakasında 2477 U/cm<sup>2</sup>, 4955 U/cm<sup>2</sup> ve 9911 U/cm<sup>2</sup> katalaz aktivitesi olacak şekilde hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümler sonrası elde edilen sonuçlara ait standart grafikleri çizildi.

Jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine enzim miktarının etkisinin incelendiği grafikler Şekil 3.31'de gösterilmiştir.



Şekil 3.31 Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine enzim miktarının etkisi, [ Fosfat tamponu; pH:7,0; 50 mM, T:35<sup>0</sup>C. ● : 2477 U/cm<sup>2</sup>, ● : 4955 U/cm<sup>2</sup>, ● : 9911 U/cm<sup>2</sup> Tüm biyosensörler için  $\kappa$ -karrajenan oranı 1,1 mg- $\kappa$ -karrajenan/cm<sup>2</sup> jelatin oranı 11,8mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'dur ].

Grafiklerden elde edilen sonuçlar sonrası doğrusal tayin aralığı en geniş biyosensör cevabının 4955 U/cm<sup>2</sup>'lik katalaz enzimi kullanılarak hazırlanan biyosensör ile alındığı belirlendi. Bu konsantrasyondaki katalaz ile hazırlanan biyosensör ile (0,05-0,8) mM etanol konsantrasyonu aralığında doğrusal bir grafik elde edilirken, 2477 U/cm<sup>2</sup>'lik katalaz ile (0,05-0,6) mM ve 9911 U/cm<sup>2</sup>'lik katalaz ile hazırlanan biyosensörler ile de (0,05-0,2) mM etanol konsantrasyon aralığında doğrusal grafikler elde edildi.

Biyoaktif membran tabakasındaki enzim miktarının dolayısıyla aktivitenin düşürülmesi ile normalde de beklenildiği gibi biyosensör cevabında da düşme görüldü. Bununla birlikte enzim miktarı 4955 U/cm<sup>2</sup>'den 9911 U/cm<sup>2</sup>'ye çıkarıldığında biyosensör cevaplarında beklenildiği gibi bir artış gözlenmekle birlikte istenilen düzeyde bir doğrusallık elde edilemedi.

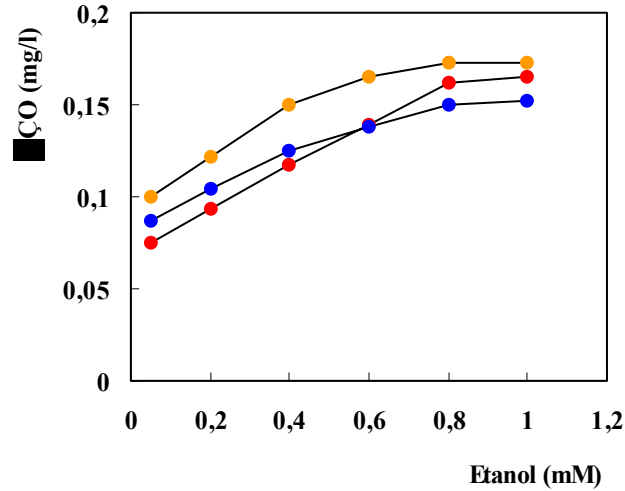
Bu sonucun, glutaraldehid muamelesi sonrası enzim-enzim arasındaki çapraz bağların jelatin-enzim arasındakilere nazaran daha çok ve sıklıkla meydana gelmesi dolayısıyla enzimin hareket

yeteneğinin sterik olarak sınırlandırılmış olması ve enzim aktif merkezinin substratla etkileşiminin olumsuz yönde etkilenmesinden kaynaklanabileceği düşünüldü.

### 3.7.1.3 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörlerinde enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerde katalaz miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla; jelatin, Ca-aljinat ve glutaraldehid miktarının sabit tutulup bununla birlikte biyoaktif membran tabakasında 1652 U/cm<sup>2</sup>, 3304 U/cm<sup>2</sup>, ve 6608 U/cm<sup>2</sup> katalaz aktivitesi olacak şekilde hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümler sonrası elde edilen sonuçlara ait standart grafikler çizildi.

Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine enzim miktarının etkisinin incelendiği grafikler Şekil 3.32’de gösterilmiştir.



Şekil 3.32 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine enzim miktarının etkisi [Tris-HCl tamponu; pH:7,0;50 mM, T:35<sup>0</sup>C. ● : 1652 U/cm<sup>2</sup>, ● : 3304 U/cm<sup>2</sup>, ● : 6608 U/cm<sup>2</sup>. Tüm biyosensörler için aljinat oranı % 2,0, jelatin oranı 2,95mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 0,5’dir].



Grafiklerden elde edilen sonuçlar sonrası en ideal biyosensör cevabının  $1652 \text{ U/cm}^2$  aktivitedeki katalaz enzimi kullanılarak hazırlanan biyosensör ile alındığı belirlendi.

Bu aktivitedeki katalaz enzimi ile hazırlanan biyosensör ile (0,05-0,8) mM etanol konsantrasyonu aralığında doğrusal bir grafik elde edilirken,  $3304 \text{ U/cm}^2$ 'lik katalaz kullanılarak hazırlanan biyosensör ile (0,05-0,4) mM etanol konsantrasyon aralığında,  $6608 \text{ U/cm}^2$  aktivitedeki katalaz enzimi kullanılarak hazırlanan biyosensör ile de yine (0,05-0,4) mM etanol konsantrasyonu aralığında doğrusal bir grafik elde edildi.

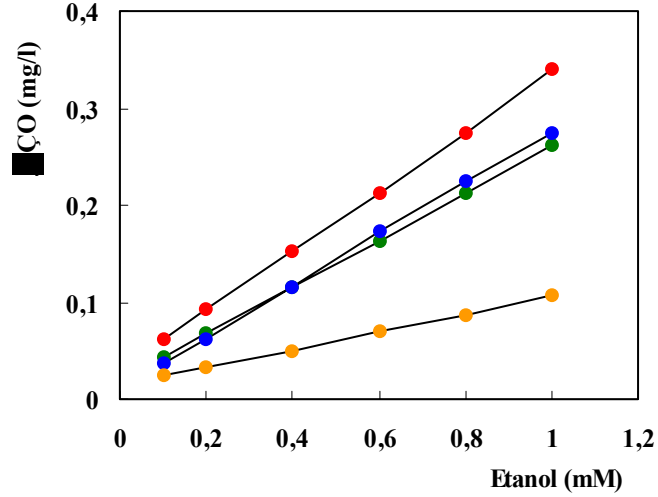
En düşük aktivitedeki katalaz enzimi ile hazırlanan biyosensörle en uygun sonuçların alınmasında temel nedenler olarak; artan enzim miktarıyla birlikte enzimin içerdiği  $-\text{NH}_2$  gruplarının glutaraldehid ile daha fazla sayıda çapraz bağ oluşturmasını ve Ca-aljinat şeklinde çok sayıda şelat oluşumuyla enzimin hareket yeteneğinin sınırlandırılmış olmasını ve ayrıca oluşan karmaşık ve daha sık gözenekli yapının substrat difüzyonunu da olumsuz yönde etkilemiş olmasını sayabiliriz. Bu durumların enzim miktarının artmasıyla biyosensör cevabında bir yükselme gözlenmesine rağmen difüzyon problemleri etkisiyle doğrusallığın bozulmasına katkı yaptıkları gözlenmektedir.

### **3.7.2 Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

#### **3.7.2.1 Jelatin tabanlı katalaz biyosensörlerinde jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Jelatin tabanlı katalaz biyosensörleri cevabına jelatin miktarının etkisinin incelendiği çalışmada biyosensörler hazırlanırken daha önce en uygun enzim miktarı olarak belirlenen  $1652 \text{ U/cm}^2$  aktiviteye sahip katalaz ve % 2,5'lük glutaraldehid oranları sabit tutulup biyoaktif tabakada 2,95; 5,90; 11,8 ve  $14,75 \text{ mg jelatin/cm}^2$  olacak şekilde değişen oranlarda jelatin kullanıldı.

Ölçümler sonrası elde edilen grafikler Şekil 3.33'de gösterilmiştir.



Şekil 3.33 Jelatin tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine jelatin miktarının etkisi, [ Fosfat tamponu; pH:7,0; 50 mM, T:35<sup>0</sup>C.  
 ● : 2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup>, ● : 5,90 mg jelatin/cm<sup>2</sup>  
 ● : 11,8 mg jelatin/cm<sup>2</sup>, ● : 14,75 mg jelatin/cm<sup>2</sup>.  
 Tüm biyosensörler için glutaraldehid oranı % 2,5'dur ].

Şekilden görüleceği gibi biyoaktif tabakadaki jelatin oranı 2,95 mgjelatin/cm<sup>2</sup> ve 5,9 mgjelatin/cm<sup>2</sup> olduğunda birbirine oldukça yakın biyosensör cevapları alındı. Jelatin oranının 11,8 mgjelatin/cm<sup>2</sup>'lik düzeye çıkmasıyla daha yüksek biyosensör cevapları elde edildi. Buna karşılık jelatin oranı 14,75 mgjelatin/cm<sup>2</sup>'ye çıkarıldığında biyosensör cevabında oldukça belirgin bir düşme gözlemlendi.

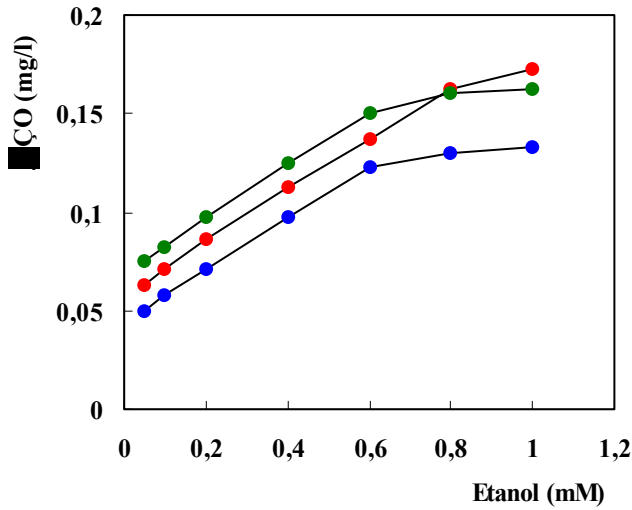
Bu sonuç, biyoaktif tabakadaki jelatin miktarının artırılmasının bir değere kadar biyosensör cevaplarına olumlu katkı yaptığını göstermektedir. Bu durumun biyoaktif tabaka kalınlığının ve çapraz bağ oranlarının ara yüzey-biyoaktif tabaka ve dış ortam arasındaki substrat-kosubstrat dengesinin difüzyon yoluyla etkilenmesi ve ideal enzim aktivitesi için uygun sterik koşulların oluşması nedeniyle gözlemlendiği yorumlanabilir. Jelatin miktarının daha da yükselmesi membran kalınlaşması paralelinde bu yöndeki bazı parametrelerinde olumsuz şekilde etkimesiyle biyosensör cevabının düşmesine neden olmaktadır.

Sonuç olarak en iyi biyosensör cevabının 11,8mg jelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatin oranı ile hazırlanan biyosensörle alındığı belirlendi.

### 3.7.2.2 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörlerinde jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Bu çalışmada, hazırlanan tüm biyosensörlerde katalaz; 4955 U/cm<sup>2</sup>, κ-karrajenan; 1,1 mgκ-karrajenan/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı da % 2,5 olarak sabit tutuldu bununla birlikte jelatin oranı 1,1; 2,21 ve 4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup> olacak şekilde farklılaştırılarak biyosensörler hazırlandı.

Denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.34'de gösterilmiştir.



Şekil 3.34 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine jelatin miktarının etkisi, [ Fosfat tamponu; pH:7,5; 50 mM,T:35<sup>0</sup>C. ● :1,1 mg jelatin/cm<sup>2</sup>, ● : 2,21 mg jelatin/cm<sup>2</sup>, ● : 4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup>. Tüm biyosensörler için katalaz; 4955 U/cm<sup>2</sup>, κ-karrajenan oranı 1,1 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid % 2,5 olarak sabit tutuldu ].

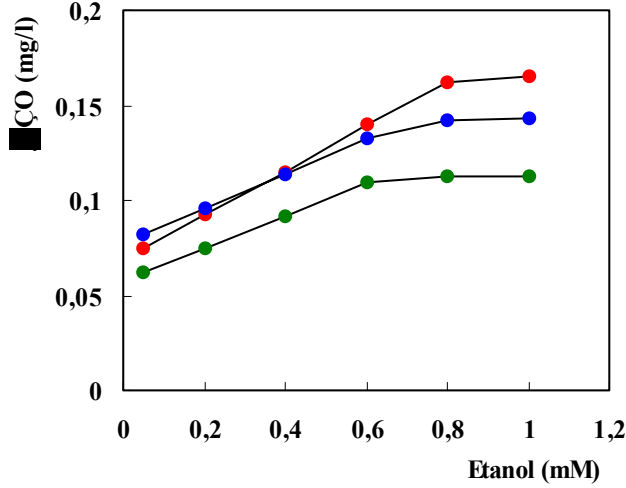
Şekilden görüldüğü gibi jelatin miktarı 1,1 mg/cm<sup>2</sup>'den 4,42 mg/cm<sup>2</sup>'ye arttırıldığında biyosensör cevabında bir azalma gözlemlendi. Bu sonuç muhtemelen biyoaktif tabakada kalınlaşma ve bunun paralelinde reaksiyon bileşenlerinin diffüzyonundaki problemlerden kaynaklanmaktadır.

1,1 ve 4,42 mg/cm<sup>2</sup> jelatin miktarı ile hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümlerde doğrusallığın 0,05-0,6 mM etanol aralığında olduğu belirlendi. 2,21 mg/cm<sup>2</sup> jelatin miktarı ile hazırlanan biyosensör ile yapılan denemelerde doğrusallığın 0,8 mM etanol konsantrasyonuna kadar uzanmasından dolayı 2,21 mg jelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatin oranı katalaz biyosensörü hazırlanmasında kullanılacak en uygun jelatin oranı olarak seçildi.

### **3.7.2.3 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörlerinde jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Jelatin miktarının jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörleri cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla biyoaktif tabaka oluşturulmasında katalazın 1652 U/cm<sup>2</sup> , aljinatın % 2,0 ve glutaraldehid oranının % 0,5 olarak sabit tutulup değişen oranlarda jelatinin kullanıldığı biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan ölçümler sonrası elde edilen biyosensör cevaplarına ilişkin standart grafikler Şekil 3.35'de verilmiştir.



Şekil 3.35 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine jelatin miktarının etkisi, [ Tris-HCl tamponu; pH:7,5;50 mM, T:35°C. ● :1,48 mg jelatin/cm<sup>2</sup>, ● : 2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup>, ● :5,90 mg jelatin/cm<sup>2</sup>. Tüm biyosensörler için katalaz 1652 U/cm<sup>2</sup>, aljinat oranı % 2,0 ve glutaraldehid oranı % 0,5 olarak sabit tutuldu ].

Şekilden de görüldüğü gibi 2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatin kullanılarak hazırlanan biyosensörle doğrusal tayin aralığı en geniş olan grafik çizildi. 1,48 mg jelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatin oranı kullanıldığında da hemen hemen benzer biyosensör cevapları alınmakla birlikte standart grafiğin daha düşük etanol konsantrasyonlarında doğrusallıktan saptığı belirlendi. Bu koşullarda biyoaktif tabakanın inceliği yanısıra daha gözenekli yapısı özellikle belli konsantrasyonlardan sonra substrat geri kaçışını hızlandırmıştır. 5,90 mg jelatin/cm<sup>2</sup>'lik jelatin oranı kullanıldığında ise doğrusallık 0,6 mM etanol konsantrasyonuna kadar ulaşmaktadır. Ancak biyosensör cevapları diğerlerine göre düşük kalmaktadır.

Jelatin oranındaki artışın biyoaktif membran tabakasının kalınlığının artmasına neden olduğunu ve bununla substrat diffüzyonunu zorlaştırdığını söyleyebiliriz. Bunun yanısıra enzimin içerdiği -NH<sub>2</sub> gruplarının glutaraldehid ile daha fazla sayıda çapraz bağ oluşturması ve Ca<sup>2+</sup> iyonlarının-aljinat ile çok sayıda şelat oluşturarak

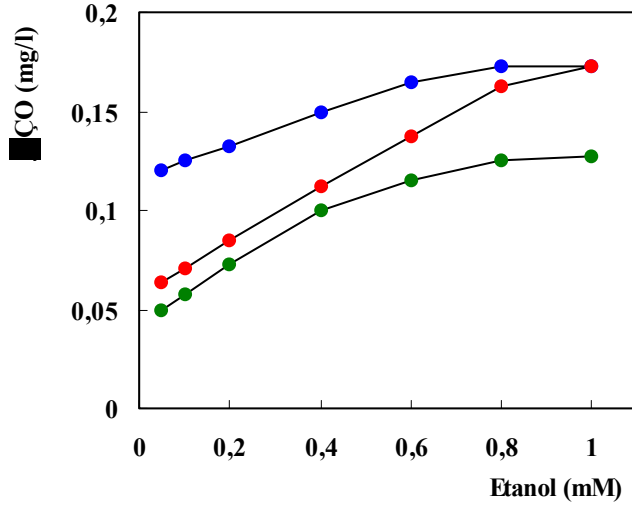
ilave bir kafes yapısı meydana getirmesi enzimin hareket yeteneğini sınırlandırmaktadır.

### **3.7.3 $\kappa$ -karrajenan miktarının katalaz temelli biyosensör cevabı üzerine etkisi**

$\kappa$ -karrajenan miktarının katalaz temelli biyosensörler cevabı üzerine etkisinin belirlendiği bu çalışmada biyoaktif tabakanın bileşenleri olan katalaz 4955 U/cm<sup>2</sup>, jelatin 2,21 mgjelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid % 2,5 olarak sabit tutulurken 0,55; 1,10 ve 2,20 mg  $\kappa$ -karrajenan/cm<sup>2</sup> olacak şekilde  $\kappa$ -karrajenan kullanılarak biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan denemeler sonrası elde edilen sonuçlara ilişkin olarak çizilen standart grafikler Şekil 3.36'da gösterilmiştir.

$\kappa$ -karrajenan miktarının artışı biyosensör cevabında düşmeye neden olmaktadır. Bununla birlikte, 0,55 mg  $\kappa$ -karrajenan/cm<sup>2</sup> miktarı ile hazırlanan biyosensörle etanol için 0,05-0,6 mM konsantrasyon aralığında doğrusal grafikler elde edilirken, 1,10 mg  $\kappa$ -karrajenan/cm<sup>2</sup>'lik miktar ile hazırlanan biyosensörle doğrusal aralık 0,05-0,8 mM olarak belirlendi. 2,20 mg  $\kappa$ -karrajenan/cm<sup>2</sup>'lik miktar kullanılarak hazırlanan biyosensörle ise doğrusal aralık 0,05-0,4 mM olarak tespit edildi.



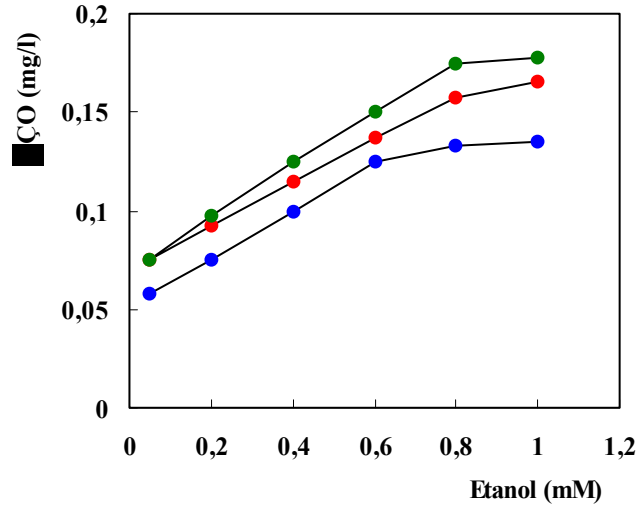
Şekil 3.36 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine κ-karrajenan miktarının etkisi, [ Fosfat tamponu; pH:7,0; 50 mM, T:35°C. ● : 0,55 mg κ-karrajenan /cm<sup>2</sup>, ● : 1,10 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup>, ● : 2,20 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup>. Tüm biyosensörler için katalaz; 4955 U/cm<sup>2</sup>, jelatin oranı 2,21 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 2,5'dur ].

En yüksek biyosensör cevabı 0,55 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup> karrajenan oranı ile hazırlanan biyosensörle alınmakla birlikte ölçümler sonrası biyoaktif tabakada deformasyon oluşumu gözlemlendi. Doğrusal tayin aralığı en geniş standart grafik ise 1,10 mg κ-karrajenan/cm<sup>2</sup>'lik karrajenan oranı ile hazırlanan biyosensörle alındı.

### 3.7.4 Aljinat miktarının katalaz temelli biyosensör cevabı üzerine etkisi

Aljinat miktarının katalaz temelli biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla biyoaktif tabakanın bileşenleri olan katalaz; 1652 U/cm<sup>2</sup>, jelatin; 2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid; % 0,5 olarak sabit tutulurken % 1,0; % 2,0 ve % 3,0'lük aljinat oranlarının değiştirilmesiyle biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörlerle gerçekleştirilen denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.37’de verilmiştir.



Şekil 3.37 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine aljinat miktarının etkisi, [ Tris-HCl tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:35<sup>0</sup>C.  
 ● : % 1,0 aljinat , ● : % 2,0 aljinat, ● : % 3,0 aljinat  
 Tüm biyosensörler için katalaz; 1652 U/cm<sup>2</sup>, jelatin oranı 2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı; % 0,5’dir ].

Denemeler sonrası elde edilen grafiklerden aljinat miktarındaki azalmayla birlikte biyosensör cevabının arttığını en iyi ve doğrusal sonuçların % 1,0 ve % 2,0 aljinat kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle alındığı tespit edildi.

% 1,0’lik aljinat oranı ile hazırlanan biyosensörle en yüksek cevaplar alınmakla birlikte denemeler sonrası biyoaktif membran tabakasında büyük oranda deformasyonlar meydana geldi.

% 3,0’lük aljinat oranı ile hazırlanan biyosensör ile nispeten daha düşük bir biyosensör cevabı alındı. Buna neden olarak; enzimin, Ca-aljinat şeklinde yoğun bir şelat oluşumu ile meydana gelen kafes



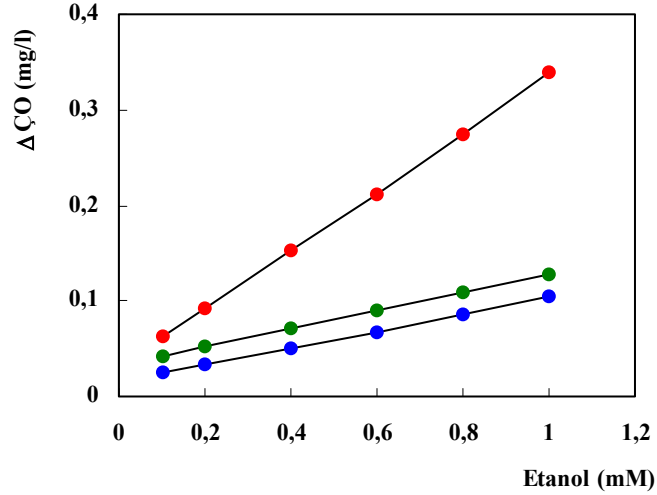
yapısının enzimi sterik olarak olumsuz etkilemesi ve membran kalınlaşmasının katkı sağladığı difüzyon problemleri gösterilebilir.

### **3.7.5 Glutaraldehid oranının katalaz temelli biyosensör cevabı üzerine etkisi**

#### **3.7.5.1 Jelatin tabanlı katalaz biyosensörlerinde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Jelatin tabanlı katalaz biyosensörlerinde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla biyosensörlerin hazırlanmasında biyoaktif membran tabakasındaki katalaz  $1652 \text{ U/cm}^2$  ve jelatin oranı  $11,8 \text{ mgjelatin/cm}^2$  olarak sabit tutulurken % 1,25, % 2,5 ve % 5,0 oranlarında glutaraldehid kullanılarak çapraz bağlar oluşturuldu.

Geliştirilen biyosensörlerle yapılan denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.38'de verilmiştir.



Şekil 3.38 Jelatin tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine glutaraldehid miktarının etkisi, [ Fosfat tamponu; pH:7,0;50 mM, T:35<sup>0</sup>C.  
 ● : % 1,25 glutaraldehid, ● : % 2,5 lutaraldehid, ● : % 5,0 glutaraldehid. Tüm biyosensörler için katalaz 1652 U/cm<sup>2</sup> ve jelatin oranı 11,8 mg jelatin/cm<sup>2</sup> olarak sabit tutuldu ].

Glutaraldehid oranının biyosensörler cevabı üzerine etkisinin belirlendiği çalışmalara ilişkin grafiklerden glutaraldehid oranı % 1,25 ve % 5,0 iken biyosensör cevaplarının oldukça düşük elde edildiği, buna karşılık % 2,5 oranında glutaraldehid kullanılmasıyla hazırlanan biyosensörün cevabının ise diğerlerine nazaran oldukça yükseldiği belirlendi.

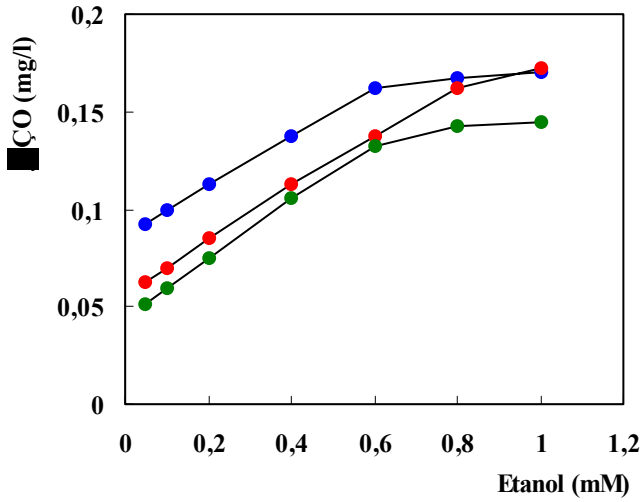
% 1,25 oranında glutaraldehid ile hazırlanan biyosensör ile alınan cevapların düşük çıkmasında yetersiz çapraz bağ oluşumu nedeniyle substrat geri kaçıışı ve ayrıca kosubstrat oksijenin arayüze kolay difüzyonu ile enzimatik reaksiyonla ilişkili arayüzey çözünmüş oksijen konsantrasyon farkının belirgin hale gelememesinin önemli rol oynadığı düşünülebilir. % 5,0 oranında glutaraldehid ile hazırlanan biyosensör ile alınan cevapların düşük çıkmasında ise çok sayıda çapraz bağ oluşumu nedeniyle substratın biyoaktif tabakaya difüzyonunun güçleşmesi, bunun yanısıra enzimin sterik olarak

olumsuz etkilenmesiyle meydana gelen aktivite düşüşünün önemli katkıları bulunduğu söylenebilir.

### 3.7.5.2 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörlerinde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörlerinde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan biyosensörlerde biyoaktif membran tabakasındaki katalaz  $4955 \text{ U/cm}^2$ , κ-karrajenan oranı  $1,1 \text{ mg κ-karrajenan/cm}^2$  ve jelatin oranı  $2,21 \text{ mg jelatin/cm}^2$  olarak sabit tutulurken % 1,25, % 2,5 ve % 5,0 oranlarında glutaraldehid kullanılarak çapraz bağlar oluşturuldu.

Geliştirilen biyosensörlerle yapılan denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.39'da verilmiştir.



Şekil 3.39 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine glutaraldehid oranının etkisi, [ Fosfat tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:35<sup>0</sup>C. ● : % 1,25 glutaraldehid, ● : % 2,5 glutaraldehid, ● : % 5,0 glutaraldehid. Tüm biyosensörler için katalaz  $4955 \text{ U/cm}^2$ , jelatin oranı  $2,21 \text{ mg jelatin/cm}^2$  ve κ-karrajenan oranı  $1,1 \text{ mg κ-karrajenan/cm}^2$  olarak sabit tutuldu ].

Glutaraldehid oranının artışı biyosensör cevaplarında bir düşüşe yol açmaktadır.

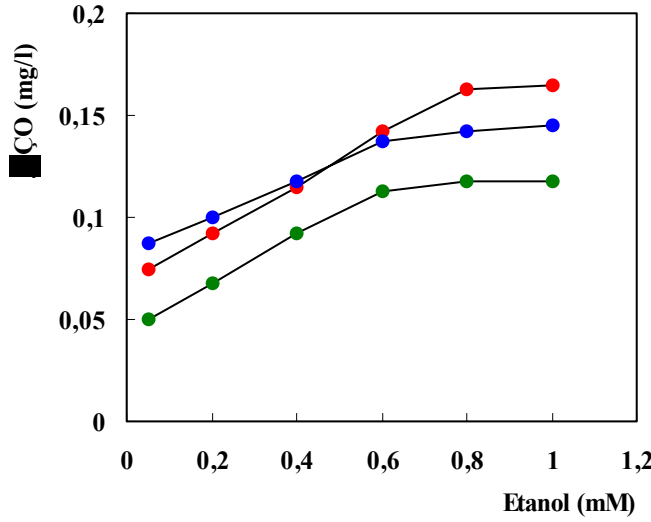
Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek biyosensör cevapları % 1,25'lik glutaraldehid kullanılarak hazırlanan biyosensörle alındı. Ancak elde edilen standart grafik % 5,0'lik glutaraldehid ile hazırlanan biyosensörle aynı etanol standart aralığında (0,05-0,6 mM) ve % 2,5'luk glutaraldehid oranı kullanılan biyosensöre ilişkin olandan daha dar doğrusal bir grafik vermiştir. % 2,5'luk glutaraldehid oranı kullanıldığında ise biyosensör ile 0,05-0,8 mM etanol standart aralığında doğrusal bir grafik elde edildi.

Biyoaktif tabakada  $\kappa$ -karrajenanın bulunması, yalnızca jelatin olması durumuna karşın biyosensör cevaplarının kullanılan glutaraldehid yüzdesi değişiminden daha az etkilendiğini göstermektedir.

### **3.7.5.3 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörlerinde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörlerinde glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan biyosensörlerde biyoaktif membran tabakasındaki katalaz 1652 U/cm<sup>2</sup>, aljinat oranı % 2,0 ve jelatin oranı 2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> olarak sabit tutulurken % 0,25, % 0,5 ve % 1,0 oranlarında glutaraldehid kullanılarak biyoaktif membran tabakasında çapraz bağlar oluşturuldu.

Geliştirilen biyosensörlerle yapılan denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.40'da verilmiştir.



Şekil 3.40 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine glutaraldehid oranının etkisi, [ Tris-HCl tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:35°C. ● : % 0,25 glutaraldehid, ● : % 0,5 glutaraldehid, ● : % 1,0 glutaraldehid. Tüm biyosensörler için katalaz 1652 U/cm<sup>2</sup> jelatin oranı 2,95 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve aljinat oranı % 2,0 olarak sabit tutuldu ].

Yapılan ölçümlere sonrası % 0,25 ve % 0,5'lik glutaraldehid kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle benzer cevaplar alınmakla birlikte % 0,5'lik glutaraldehid kullanılarak hazırlanan biyosensörle yapılan ölçümlerden elde edilen grafiğin doğrusal aralığının daha geniş olduğu belirlendi.

% 0,25 oranında glutaraldehid ile hazırlanan biyosensör ile alınan cevapların yüksek etanol konsantrasyonlarında daha düşük çıkmasında yetersiz çapraz bağ oluşumu nedeniyle substrat geri kaçıışı ve kosubstrat oksijenin arayüze kolay difüzyonu ile enzimatik reaksiyonla ilişkili arayüzey çözülmüş oksijen konsantrasyon farkının belirgin hale gelememesinin önemli rol oynadığı düşünülebilir. % 1,0 oranında glutaraldehid ile hazırlanan biyosensör ile alınan cevapların düşük çıkmasında ise tam tersine çok sayıda çapraz bağ oluşumu nedeniyle substratın biyoaktif tabakaya difüzyonunun güçleşmesi yanısıra enzimin sterik olarak olumsuz etkilenmiş olabileceğinden

bahsedilebilir. Tüm bu nedenlerden dolayı elde edilen bulgulara da dayanılarak en uygun glutaraldehid oranı % 0,5 olarak belirlendi.

### **3.8 Katalaz Temelli Biyosensörlerin Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna İlişkin Bulgular**

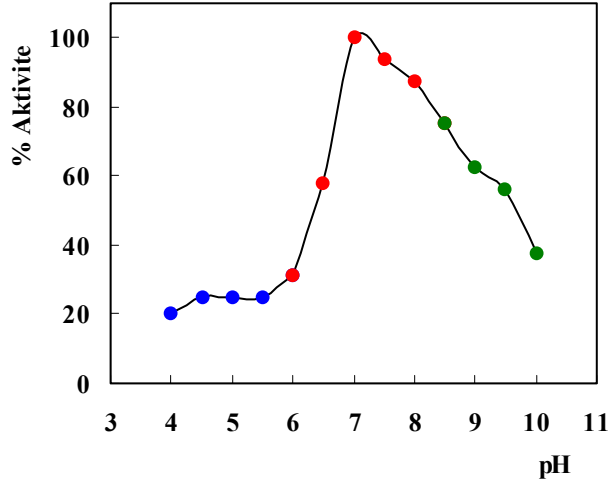
Katalaz enzimi kullanılarak hazırlanan jelatin, jelatin- $\kappa$ -karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerde, geliştirilen biyosensörlerin optimum pH, en uygun tampon sistemi, en uygun tampon konsantrasyonu ve optimum sıcaklık gibi çalışma koşullarına ait optimizasyon sonuçları bu bölümde verilmiştir.

#### **3.8.1 Optimum pH**

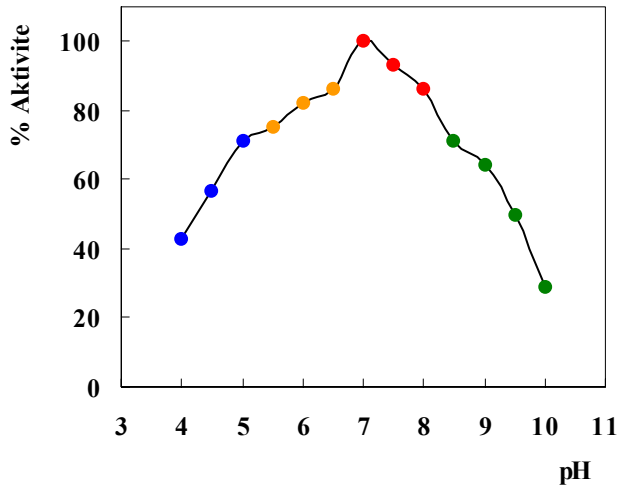
Katalaz enzimi temelli jelatin, jelatin- $\kappa$ -karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerin biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu sonrası her biyosensörün optimizasyon koşullarında yeni biyosensörler hazırlanarak bu biyosensörlere ilişkin optimum pH taramaları yapıldı.

Her üç biyosensörle yapılan çalışmalarda enzimin genelde pH: 7-7,5 aralığında çalıştığı ve bu aralığın serbest enzimin optimum pH'sı ile uyumluluk gösterdiği belirlendi.

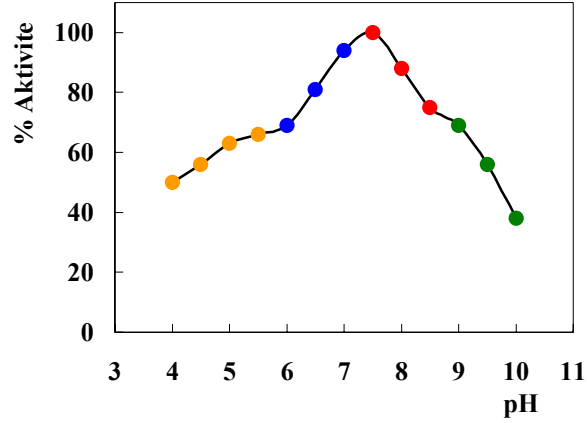
Geliştirilen her üç farklı katalaz biyosensörü ile yapılan optimum pH taramalarında jelatin ve jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı katalaz biyosensörü için optimum pH değerinin pH:7,0, jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü için optimum pH değerinin ise pH:7,5 olduğu belirlendi. Serbest katalazın optimum pH değerinin de 6-8 aralığında olduğu göz önüne alındığında immobilizasyon yöntemlerinin enzimin optimum pH'sında farklanma yaratmadığı açıktır. Her üç biyosensör için yapılan optimum pH çalışmasına ilişkin grafikler Şekil 3.41, 3.42 ve 3.43'de verilmiştir.



Şekil 3.41 Jelatin tabanlı katalaz biyosensörü optimum pH grafiği  
 [ ● : Sitrata tamponu, ● : Fosfat tamponu, ● : Glisine tamponu  
 Tüm tamponların konsantrasyonu 50 mM'dir. T:35°C ].



Şekil 3.42 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörü optimum pH grafiği  
 [ ● : Asetat tamponu, ● : Sitrata tamponu, ● : Fosfat tamponu,  
 ● : Glisine tamponu, Tüm tamponların konsantrasyonu 50 mM'dir.  
 T:35°C ].



Şekil 3.43 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü optimum pH grafiği [ ● : Asetat tamponu, ● : Tris-Maleat tamponu, ● : Tris-HCl tamponu, ● : Glisin tamponu, Tüm tamponların konsantrasyonu 50 mM'dir. T:35°C ].

Katalaz biyosensörlerinin optimum pH değerlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre çizilen grafiklerden enzimin maksimum aktivite göstermesinde etkili olan pH değerinin immobilizasyon materyali ve yöntemine göre farklılık gösterebildiği belirlendi.

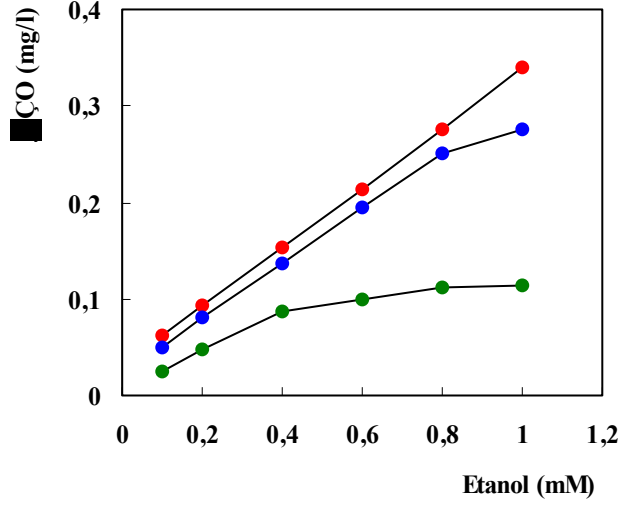
### 3.8.2 Uygun tampon sistemi

Katalaz temelli biyosensörlerin pH optimizasyonu sonrası bu pH değerine sahip olan tampon sistemleriyle de denemeler yapılarak pH'nın yanısıra tampon sistemlerinde biyosensör cevabını ne yönde etkilediğinin belirlendiği çalışmalar gerçekleştirildi.

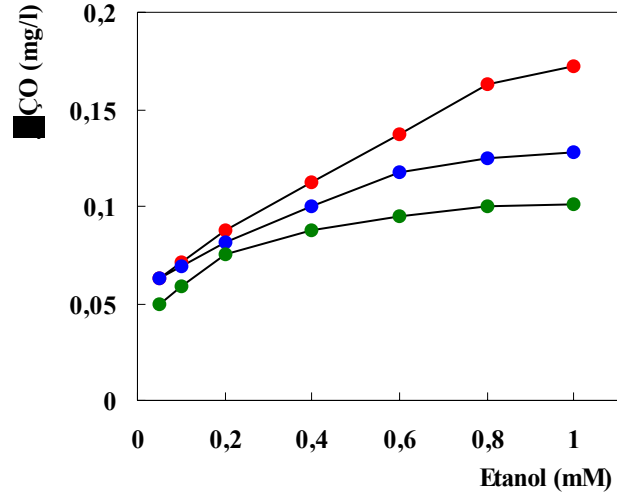
Bu amaç doğrultusunda denemelerde pH: 7,0 ve 7,5 değerlerine sahip K-Fosfat, Na-Fosfat, Tris-HCl, Tris-Maleat ve Trietanolamin-HCl tampon sistemleri kullanıldı. Denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.44, 3.45 ve 3.46'da gösterilmiştir.



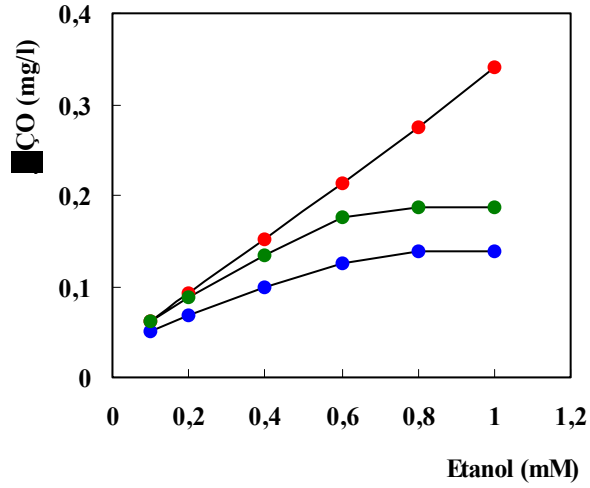
Jelatin ve jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı katalaz biyosensörleri için en uygun tampon sisteminin K-Fosfat sistemi olduğu tespit edilirken jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensör için Tris-HCl tampon sisteminin en uygun olduğu belirlendi.



Şekil 3.44 Jelatin tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine tampon sisteminin etkisi [ ●:Trietanolamin-HCl tamponu, ●:K-Fosfat tamponu, ●:Na-Fosfat tamponu. Tüm tamponların konsantrasyonu 50 mM'dir. T:35<sup>0</sup>C ].



Şekil 3.45 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine tampon sisteminin etkisi [ ● : Trietanolamin-HCl tamponu, ● : K-Fosfat tamponu, ● : Na-Fosfat tamponu. Tüm tamponların konsantrasyonu 50 mM'dir. T: 35°C ].



Şekil 3.46 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine tampon sisteminin etkisi [ ● : Trietanolamin-HCl tamponu, ● : Tris-HCl tamponu, ● : Tris-Maleat tamponu. Tüm tamponların konsantrasyonu 50 mM'dir. T: 35°C ].

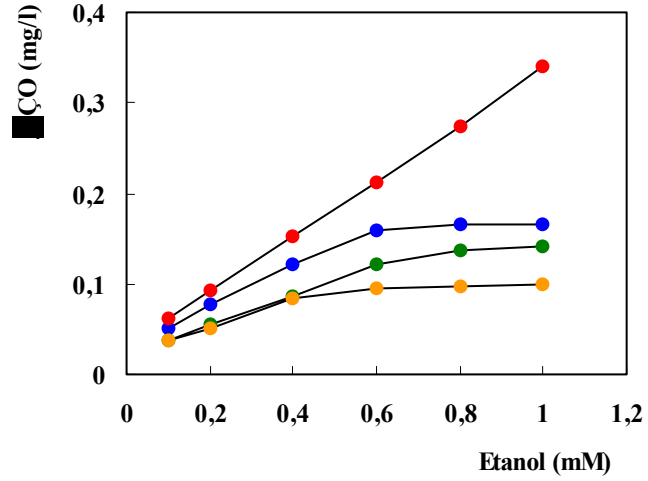
### 3.8.3 Uygun tampon konsantrasyonu

Katalaz temelli biyosensörlerin pH optimizasyonu sonrası bu pH değerine sahip olan tampon sistemleriyle de denemeler yapılarak pH'nın yanısıra tampon sistemlerinde biyosensör cevabını ne yönde etkilediğinin belirlendiği çalışmalar yapıldı. Bu çalışmaların ardından optimum pH değerleri ve en uygun tampon sistemleri belirlenen biyosensörlerin bu tampon sistemlerinin hangi konsantrasyonları ile çalışıldığında en iyi biyosensör cevaplarının alındığının belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirildi.

Bu amaç doğrultusunda denemelerde pH: 7,0 değerine sahip K-Fosfat (jelatin ve jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı katalaz biyosensörleri için) ve Tris-HCl (jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensör için) tampon sistemlerinin 25-50-100 ve 200 mM'lık konsantrasyonları kullanıldı.

Denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.47, 3.48 ve 3.49'da gösterilmiştir.

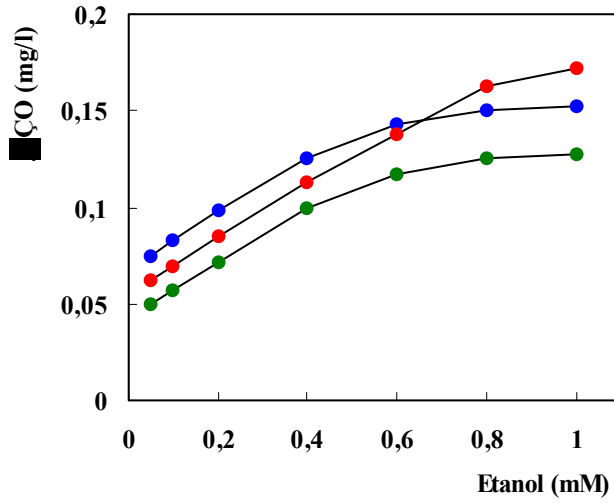
Jelatin ,jelatin- $\kappa$ -karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörleri ile yapılan ölçümler sonrası en iyi biyosensör cevaplarının 50 mM'lık tampon konsantrasyonu kullanıldığında alındığı belirlendi.



Şekil 3.47 Jelatin tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi [ K-Fosfat tamponu,pH:7,0; T:35°C.  
●: 25 mM, ●: 50 mM, ●: 100 mM, ●: 200 mM ].

Jelatin tabanlı katalaz biyosensörü ile farklı konsantrasyonlardaki fosfat tamponları ile yapılan ölçümler sonrası 50 mM'lık tampon konsantrasyon ile yapılan denemelerde 0,1-1,0 mM etanol konsantrasyon aralığında doğrusal sonuçlar alınırken en yüksek biyosensör cevabı da yine 50 mM'lık tampon konsantrasyonu ile çalışıldığında elde edildi.

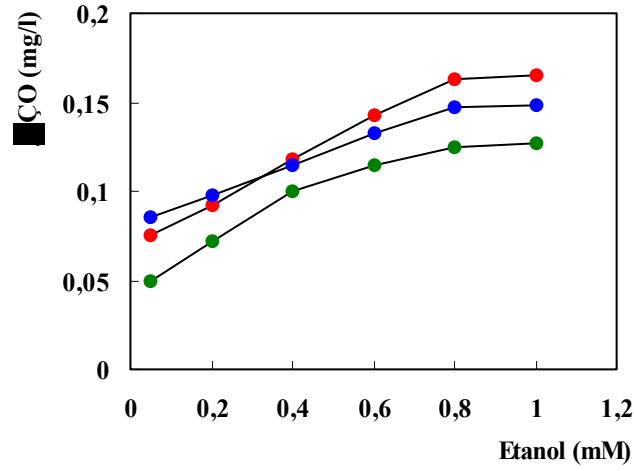
Bununla birlikte özellikle 100 ve 200 mM'lık tampon konsantrasyonları ile 50 mM'lık tampon konsantrasyonuna nazaran çok daha düşük biyosensör cevabı ve daha düşük eğimli grafikler elde edildi. Tampon konsantrasyonu arttıkça iyon şiddetindeki artışla ilişkili olarak özellikle daha yüksek etanol konsantrasyonlarında biyosensör cevaplarının azaldığı belirlendi.



Şekil 3.48 Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi. [ K-Fosfat tamponu,pH:7,0; T:35<sup>0</sup>C. ● : 25 mM, ● : 50 mM, ● : 100 mM ].

Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı katalaz biyosensörleri ile farklı konsantrasyonlardaki fosfat tamponları ile yapılan ölçümler sonrası 25 ve 100 mM'lık tampon konsantrasyonları için 0,05-0,6 mM etanol konsantrasyon aralığında doğrusal sonuçlar alınırken en yüksek ve doğrusal aralığı daha geniş (0,05-0,8 mM) biyosensör cevabı 50 mM'lık konsantrasyonda çalışıldığında elde edildi.

100 mM'lık tampon ile yapılan ölçümler sonrası düşük cevaplar alınması tampon konsantrasyonunun artmasıyla birlikte iyon şiddetindeki artışa paralel olarak enzim aktivitesindeki azalmayla bağlantılıdır.



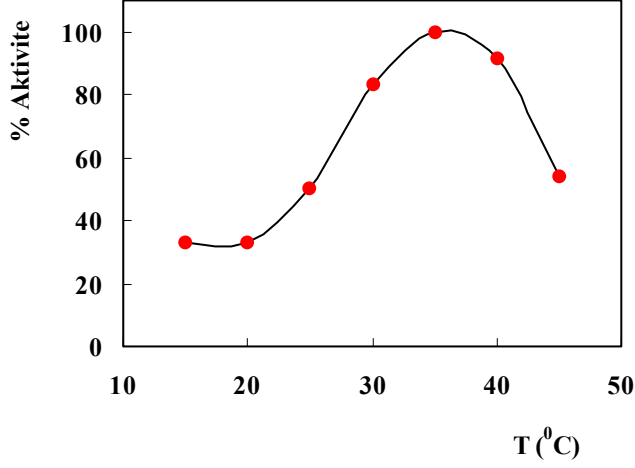
Şekil 3.49 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi [ Tris-HCl tamponu, pH:7,5; T:35<sup>0</sup>C. ● : 25 mM, ● : 50 mM, ● : 100 mM ].

Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü ile yapılan denemelerde 25 ve 50 mM'lık Tris-HCl tamponu ile hemen hemen benzer şekilde biyosensör cevapları alındı bununla birlikte 100 mM konsantrasyonundaki Tris-HCl tamponu ile daha düşük biyosensör cevapları ve doğrusal tayin aralığı nispeten daha dar standart grafikler elde edildi. Gerek tamponlama kapasitesi ve gerekse 25 mM'lık tampona göre nispeten daha yüksek cevaplar alındığı için Tris-HCl tamponunun 50 mM'lık konsantrasyonu Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü için uygun tampon konsantrasyonu olarak belirlendi.

### 3.8.4 Optimum sıcaklık

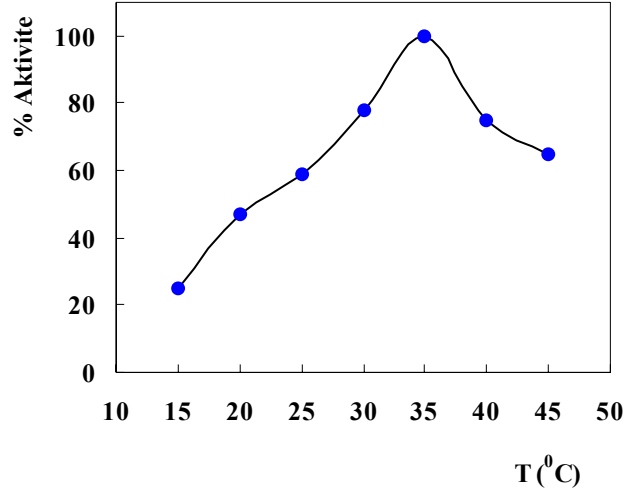
Katalaz temelli biyosensörlerin optimizasyonu ile ilgili çalışmaların son denemelerini kapsayan bu çalışmada jelatin, jelatin-κ-karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörleri ile 15-20-25-30-35-40 ve 45<sup>0</sup>C'lerde standart grafikler çizilerek sıcaklığın biyosensör cevapları üzerine etkisi belirlendi.

Yapılan ölçümler sonrası elde edilen sonuçlara ilişkin grafikler Şekil 3.50, 3.51 ve 3.52’de verilmiştir.



Şekil 3.50 Jelatin tabanlı katalaz biyosensörünün optimum sıcaklığı [ Fosfat tamponu, pH:7,0; 50 mM, Etanol konsantrasyonu 0,4 mM ].

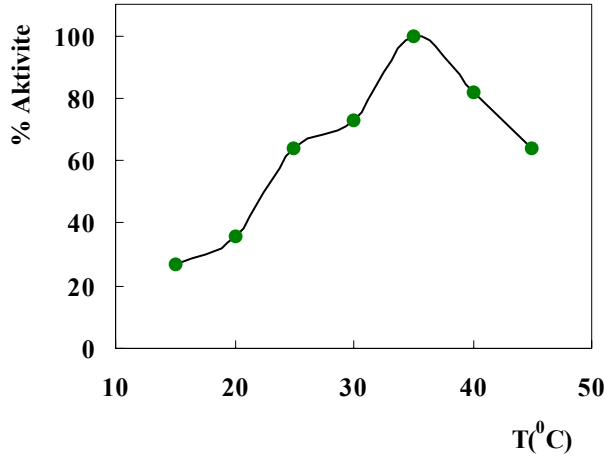
Şekilden de görüldüğü gibi 15 ve 20°C’de yapılan denemelerde biyosensör cevabında herhangi bir farklanma görülmedi. Bununla birlikte özellikle 25°C’den sonra 35°C’ye kadar biyosensör cevabında artış 35°C’nin altında ise azalma kaydedildi. Sıcaklık artışıyla paralel olarak çözülmüş oksijen konsantrasyonunda da azalma gerçekleşiyor olmasına rağmen biyosensör cevabında 35°C’ye kadar artış kaydedilmesini enzimin aktivitesinin optimum sıcaklığı olan 35°C’ye kadar artış göstermesiyle açıklamak mümkündür. 35°C’den 40°C’ye geçildiğinde biyosensör cevabında az bir düşme 45°C’de ise belirgin bir azalma gözlemlendi. Bu sonuç optimum sıcaklığın aşılmasıyla birlikte enzim aktivitesindeki düşüş ve bununla birlikte sıcaklık artışıyla çözülmüş oksijen konsantrasyonundaki azalma ile açıklanabilir.



Şekil 3.51 Jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörünün optimum sıcaklığı [ Fosfat tamponu,pH:7,0; 50 mM, Etanol konsantrasyonu : 0,4 mM ].

Jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörü için yapılan optimum sıcaklık denemelerine ilişkin Şekil 3.52'den görüleceği gibi söz konusu biyosensör için optimum sıcaklık değeri 35<sup>0</sup>C olarak bulundu. Jelatin tabanlı katalaz biyosensörüne nazaran 35<sup>0</sup>C'nin altında ve üstünde biyosensör cevabında daha belirgin bir düşme gözlemlendi.





Şekil 3.52 Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörünün optimum Sıcaklığı [ Tris-HCl tamponu,pH:7,5;50 mM, Etanol konsantrasyonu : 0,4 mM ].

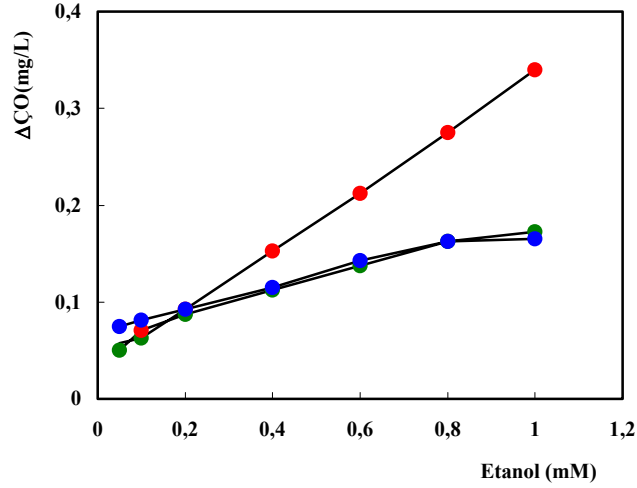
Jelatin ve Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı katalaz biyosensörleri için elde edilen optimum sıcaklık denemeleri sonuçlarına benzer olarak elde edilen bu grafikte de optimum sıcaklık olarak 35°C bulundu. Yine 35°C'nin altında ve üstünde biyosensör cevabında düşme gözlemlendi. 45°C'de ölçüm yapıldıktan sonra jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensöründekine benzer şekilde katalaz biyosensörünün biyoaktif tabakasında da büyük oranda bir deformasyon belirlendi.

### 3.9 Katalaz Temelli Biyosensörlerin Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

Bu bölümde katalaz temelli biyosensörler için etanol tayin sınırlarının, analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin, substrat spesifikliğin, girişim etkilerinin, operasyonel ve depo kararlılıklarının belirlenmesine yönelik denemelere ilişkin sonuçlar sunulmuştur.

### 3.9.1 Etanol tayin sınırları

Jelatin, jelatin- $\kappa$ -karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörlerine ait etanol tayin sınırlarının belirlenmesine yönelik denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.53'de verilmiştir.



Şekil 3.53 Katalaz temelli biyosensörlerin etanol tayin aralığı

- [ ● : Jelatin-Ca-aljinat tabanlı (Tris-HCl tamponu ,pH:7,5;50 mM),
  - : Jelatin tabanlı ( Fosfat amponu ,pH:7,0;50 mM),
  - : Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı ( Fosfat tamponu, pH:7,0;50 mM),
- Tüm biyosensörler için çalışma sıcaklığı T:35<sup>0</sup>C ].

Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek cevaplar jelatin tabanlı katalaz biyosensörü ile alınmıştır. Bu biyosensör ile 0,1-1,0 mM etanol konsantrasyonu aralığında doğrusal bir grafik elde edilirken jelatin- $\kappa$ -karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörler ile neredeyse aynı biyosensör cevapları alınarak 0,05-0,8 mM etanol konsantrasyon aralığında doğrusal sonuçlar elde edildi.

İmmobilizasyon prosedürünün kolay uygulanabilir olması yanında en yüksek ve doğrusal aralıklı biyosensör cevaplarını verdiği için jelatin tabanlı katalaz biyosensörü diğer iki katalaz biyosensör tipine nazaran kullanım açısından daha avantajlıdır.

### 3.9.2 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

Katalaz temelli biyosensörlerle yapılan analizlerin sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin tayini amacıyla her bir biyosensörle etanolün belirli bir konsantrasyonunda (n=10) ölçümler yapıldı. Elde edilen sonuçlara ilişkin bulunan standart sapma(S.S) ve varyasyon katsayılarına ilişkin değerler Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.4 Katalaz temelli biyosensörlerde analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği (n=10)

	Etanol Kons. (mM)	Ortalama Değer ( $\bar{x}$ ) (mM)	Standart Sapma (S.S) (mM)	Varyasyon Katsayısı (V.K) (%)
Jelatin Tabanlı Katalaz Biyosensörü	0,4	0,396	$\pm 0,00516$	1,30
Jelatin-Ca-aljinat Tabanlı Katalaz Biyosensörü	0,4	0,406	$\pm 0,01265$	3,11
Jelatin- $\kappa$ -karrajenan Tabanlı Katalaz Biyosensörü	0,4	0,404	$\pm 0,01174$	2,91

Çizelgeden de anlaşılacağı gibi her üç biyosensörle de oldukça iyi sonuçlar elde edilmiş olup kıyaslama açısından bakıldığında en iyi sonuçların jelatin tabanlı katalaz biyosensörü ile alındığı görüldü.

### 3.9.3 Substrat spesifikliğı

Katalaz temelli biyosensörlerin substrat spesifikliklerine ilişkin olarak elde edilen sonuçlar Çizelge 3.5’de özetlenmiştir.

Çizelge3.5 Katalaz temelli biyosensörlerin substrat spesifikliğı

Substrat	Jelatin Tabanlı Katalaz Biyosensörü için % Aktivite	Jel.-Ca-aljinat Tabanlı Katalaz Biyosensörü için % Aktivite	Jel.-κ-karrajenan Tabanlı Katalaz Biyosensörü için % Aktivite
Etanol	100	100	100
Metanol	17	43	42
Propanol	50	64	25
Bütanol	29	29	29
İzo-propanol	25	21	17
Etilenglikol	0	0	13
Dietilenglikol	0	0	08
Glukoz	17	14	08
L-Askorbik asit	58	200	166

Substrat konsantrasyonları tüm biyosensörler için 0,4 mM'dır.

Çizelgeden de görüldüğü gibi katalaz temelli biyosensörlerin substrat olarak kullanılan hemen tüm alkollere karşı değişen oranlarda aktivite göstermesi biyosensör cevaplarına farklı yüzdelerde yansdı. Burada en dikkat çekici sonuç, bazı substratlar, için immobilizasyon tipine göre farklı katalaz biyosensörleri ile farklı biyosensör cevapları alınması oldu. Örneğin etilenglikol ve dietilenglikol için jelatin ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörleri ile hiç cevap alınamazken jelatin-κ-karrajenan tabanlı biyosensör için düşük oranda da olsa cevap alındı.

Bu sonuç, gerek biyosensörlerde kullanılan enzimlerin substrat spesifikliğinin ve gerekse biyosensörlerin seçimliliğinin korunmasında immobilizasyon yöntemi ve materyalinin etkili birer parametre olduğunu göstermektedir.

### 3.9.4 Etanol tayininde bazı maddelerin girişim etkileri

Bu çalışmada bazı maddelerin etanol tayininin hedeflendiği katalaz temelli biyosensörlerin cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, reaksiyon ortamında etanolün yanısıra ayrıca bazı girişim yapabilecek maddelerin de (metanol,propanol, bütanol, izo-propanol, etilenglikol, dietilenglikol, glukoz ve L-askorbik asit) bulunduğu sistemler oluşturularak ölçümler gerçekleştirildi.

Ölçümler sonunda elde edilen sonuçlara ilişkin veriler Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6 Katalaz temelli biyosensörler ile etanol tayininde bazı maddelerin girişim etkilerinin belirlenmesi

Substrat	Jelatin Tabanlı Katalaz Biyosensörü için % Aktivite	Jel.-Ca-aljinat Tabanlı Katalaz Biyosensörü için % Aktivite	Jel.-κ-karrajenan Tabanlı Katalaz Biyosensörü için % Aktivite
Etanol	100	100	100
(Etanol + Metanol)	108	114	102
(Etanol + Propanol)	75	86	100
(Etanol + Bütanol)	100	86	125
(Etanol + izo-propanol)	67	100	92
(Etanol + Etilenglikol)	100	100	100
(Etanol + Dietilenglikol)	100	100	101
(Etanol + Glukoz)	67	100	100
(Etanol +L-Ask. Asit)	250	371	266

Substrat konsantrasyonları tüm biyosensörler için 0,4 mM'dır.

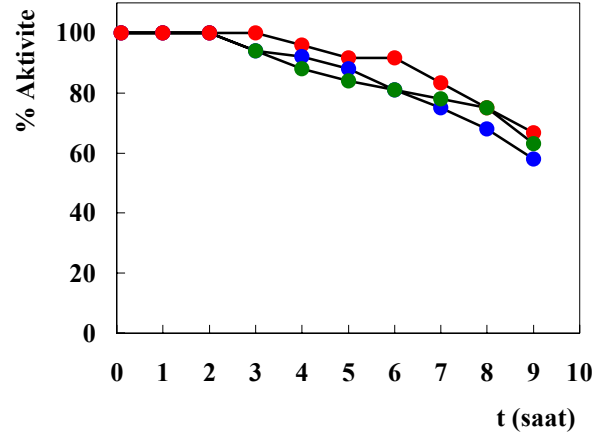
Çizelge 3.6'dan görüldüğü gibi reaksiyon ortamında tek olarak bulduklarında oldukça yüksek biyosensör cevapları veren maddeler etanol ile birlikte reaksiyon ortamına ilave edildiğinde tek başlarına verdikleri etkinin oldukça altında bir düzeyde biyosensör cevabını etkilemektedir. Özellikle metanolün etkisi etanol ile bir arada iken çok azalmıştır. Bu sonuç özellikle etanol içeren ortamlarda normalde etanolün yanında çok daha düşük konsantrasyonda bulunma ihtimali olan diğer alkollerin dikkate değer bir girişim etkisine yol açmayacaklarının en önemli kanıtı olarak ortaya çıkmaktadır

### 3.9.5 Operasyonel kararlılık

Biyosensörlerin operasyonel kararlılıklarının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensörler daha önce optimizasyonu yapılarak belirlenmiş olan çalışma sıcaklığında ve çalışma tamponu içinde bekletildi ve her bir saatlik periyotlar sonunda katalaz enzimi temelli biyosensörler ile ölçümler yapıldı.

Jelatin, jelatin- $\kappa$ -karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerin her üçü ile yapılan ölçümlerde etanolün 0,4 mM konsantrasyonundaki standardı ile çalışıldı.

Denemeler sonrası sonuçlara yönelik olarak elde edilen grafikler Şekil3.54’de verilmiştir.



Şekil 3.54 Katalaz temelli biyosensörlerin operasyonel kararlılığı

- [ ● : Jelatin-Ca-aljinat tabanlı (Tris-HCl tamponu, pH:7,5;50 mM)
  - [ ● : Jelatin tabanlı (Fosfat tamponu ,pH:7,0;50 mM),
  - [ ● : Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı ( Fosfat tamponu, pH:7,0;50 mM),
- Tüm biyosensörler için çalışma sıcaklığı T:35<sup>0</sup>C ].

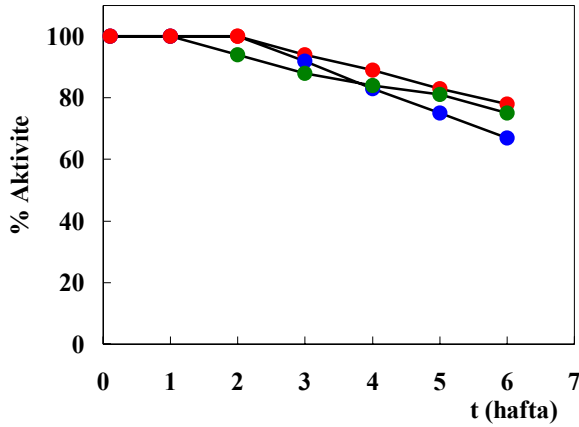
Operasyonel kararlılık denemelerinde dokuz saatlik periyot sonunda jelatin tabanlı katalaz biyosensörü cevabında % 33'lük bir düşme meydana gelirken bu oran jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensöründe % 37, jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı katalaz

biyosensöründe ise % 42 olarak bulundu. Bu sonuçlar, jelatin, jelatin-Ca-aljinat ve jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı katalaz biyosensörlerinin aktivitelerinde sırasıyla bir azalma olmakla birlikte genelde söz konusu immobilizasyon yöntem ve materyallerinin operasyonel kararlılığı üzerine çok belirgin bir etkisi olmadığını göstermiştir.

### 3.9.6 Depo kararlılığı

Denemelerde katalaz enzimi ile hazırlanan jelatin, jelatin- $\kappa$ -karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörler ile yapılan ölçümlerde etanolün 0,4 mM'lık konsantrasyonları ile çalışıldı.

Denemeler sonrası elde edilen sonuçlara yönelik olarak çizilen grafikler Şekil3.55'de verilmiştir.



Şekil 3.55 Katalaz temelli biyosensörlerin depo kararlılığı

- [ ● : Jelatin-Ca-aljinat tabanlı (Tris-HCl tamponu, pH:7,5;50 mM)
  - [ ● : Jelatin tabanlı (Fosfat tamponu ,pH:7,0;50 mM)
  - [ ● : Jelatin- $\kappa$ -karrajenan tabanlı (Fosfat tamponu, pH:7,0;50 mM)
- Tüm biyosensörler için çalışma sıcaklığı T:35<sup>0</sup>C ].

Altı haftalık bir periyot sonrasında, yapılan ölçümler sonunda jelatin tabanlı katalaz biyosensörü cevabında % 22,0'lik bir azalma kaydedilirken ,jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensör cevabında % 25'lik,

jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörü cevabında ise % 32'lik bir azalma tespit edildi.

Bu sonuçlar, jelatin, jelatin-Ca-aljinat ve jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörlerinin aktivitelerinde sırasıyla bir azalma olmakla birlikte genelde söz konusu immobilizasyon yöntem ve materyallerinin depo kararlılığı üzerine çok belirgin bir etkisinin olmadığını göstermiştir.

### **3.10 *C.tropicalis* Maya Hücreleri Temelli Mikrobiyal Biyosensörlerin Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonuna İlişkin Bulgular**

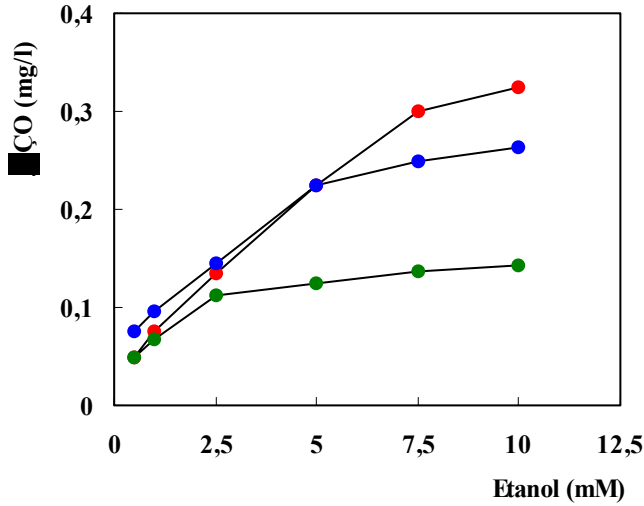
Bu bölümde *C.tropicalis* Maya Hücreleri kullanılarak hazırlanan jelatin tabanlı biyosensörlerde enzim, jelatin ve glutaraldehid oranlarının biyosensör cevabına etkilerinin incelendiği, biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonuna ilişkin sonuçlar verilmiştir.

#### **3.10.1 *C.tropicalis* hücre miktarının mikrobiyal biyosensör cevabı üzerine etkisi**

*C.tropicalis* hücrelerinin kullanılması ile hazırlanan alkol tayinine yönelik mikrobiyal biyosensörlerde hücre miktarının mikrobiyal biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla jelatin ve glutaraldehid oranları sabit tutulup 5,10 ve 20 mg kuru hücrenin kullanılmasıyla biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörler ile yapılan ölçümler sonucu mg kuru hücre miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi Şekil 3.56'da verilmiştir.





Şekil 3.56 *C.tropicalis* hücre miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi [ Fosfat tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:30<sup>0</sup>C. ● : 2,21mg kuruhücre/cm<sup>2</sup> , ● : 4,42 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup>, ● : 8,84 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup>. Tüm biyosensörler için jelatin oranı 4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 0,5'dir ].

Şekilden de görüldüğü gibi biyoaktif tabakadaki hücre sayısındaki artışla orantılı olacak şekilde artan bir biyosensör cevabı yerine özellikle 0,5-5,0 mM etanol konsantrasyonu aralığında hücre sayısı artışıyla azalan bir biyosensör cevabı elde edildi. 2,21 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup> oranı kullanılarak hazırlanan biyosensör ile 0,5-5,0 mM etanol aralığında doğrusal sonuçlar elde edilirken 4,42 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup> oranı ile hazırlanan biyosensör ile 0,5-7,5 mM etanol aralığında doğrusal sonuçlar elde edildi. 8,84 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup> oranı ile hazırlanan biyosensörle yapılan ölçümlerde ise 0,5-2,5 mM aralığında doğrusal sonuçlar alındı.

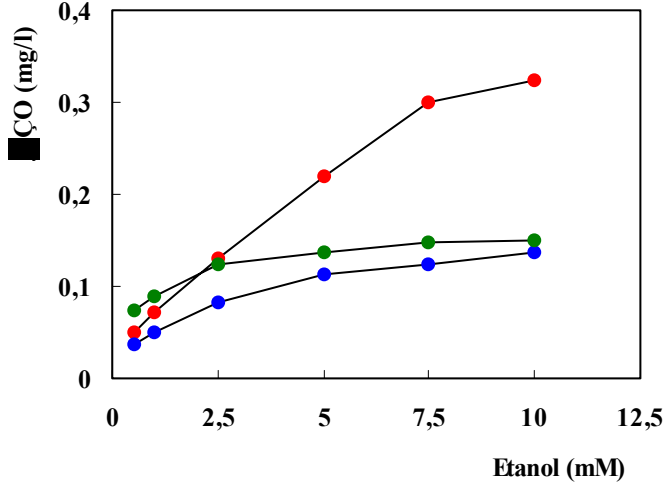
2,21 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup> oranı kullanılarak hazırlanan biyosensör ile elde edilen grafiğin 4,42 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup> oranı ile hazırlanan biyosensörünki ile başlangıçta benzer olmakla birlikte 5,0 mM'dan sonra doğrusallıktan saparak daha yatay seyir izlemesi, ara yüzeydeki ÇO konsantrasyon farkının değişimiyle ilgilidir. Ara yüzey ÇO konsantrasyon farkının daha az olması ara yüzeye daha düşük etanol konsantrasyonlarında daha fazla oksijen difüzyonuna bağlıdır. Bu, etanol konsantrasyonunun artışıyla onun tüketilebilme hızının aynı

oranda ilerlemediğinin bir göstergesidir. 4,42 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup> oranı ile hazırlanan biyosensör ile yapılan ölçümlerden elde edilen grafikte yüksek etanol konsantrasyonlarında bu farkın devam etmesi olayın hücre miktarı ile ilişkisini doğrular görünmektedir. Buna karşın 4,42'den 8,84 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup> oranına çıkıldığında biyoaktif membran tabakasının kalınlaşması önemli difüzyon problemlerine yol açabileceği gibi, hücre sayısının çok artması hücreler arasında membran proteinleri üzerinden glutaraldehid ile çok daha fazla çapraz bağ oluşumu nedeniyle hem hücreler arasında difüzyon, hem de hücre içine difüzyonda önemli problemlere neden olabilir.

### **3.10.2 Jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi**

Mikrobiyal temelli biyosensörün cevabı üzerine mikroorganizma miktarının etkisinin belirlenmesi sonrası biyoaktif tabaka bileşenlerinden olan jelatin miktarının etkisinin belirlenmesine yönelik çalışmalara geçildi. Bu amaç doğrultusunda 2,21, 4,42 ve 8,84 mg jelatin/cm<sup>2</sup> olacak şekilde jelatin oranları kullanılarak biyosensörler hazırlandı.

Hazırlanan biyosensörlerle yapılan denemeler sonrası elde edilen standart grafikler Şekil 3.57'de gösterilmiştir.



Şekil 3.57 *C.tropicalis* temelli biyosensör cevabı üzerine jelatin miktarının etkisi [ Fosfat tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:30<sup>0</sup>C. ●: 2,21mg jelatin/cm<sup>2</sup>, ●: 4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup>, ● : 8,84 mg jelatin/cm<sup>2</sup>. Tüm biyosensörler için hücre miktarı 4,42 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 0,5'dir ].

Jelatin miktarının artışıyla birlikte 0,5 ve 1,0 mM'lık etanol standartları için elde edilen biyosensör cevaplarında küçük artışlar belirlendi. Buna karşılık 1,0 mM etanol konsantrasyonundan daha yüksek konsantrasyonlarda 2,21 ve 8,84 mg jelatin/cm<sup>2</sup> oranı ile hazırlanan biyosensörlerde daha çok yatay seyreden bir grafik elde edilirken, 4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup> jelatin oranı ile hazırlanan biyosensör ile giderek artan bir biyosensör cevabıyla 0,75 mM etanol konsantrasyonuna kadar doğrusal bir grafik elde edildi.

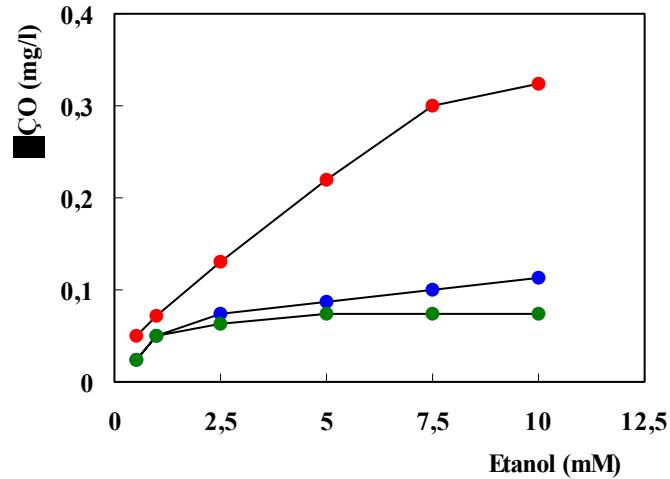
Bu çalışmada 2,21 mg jelatin/cm<sup>2</sup> jelatin oranı ile hazırlanan biyosensör ile alınan cevapların düşük bulunması; daha gözenekli bir biyoaktif tabakadan oksijen difüzyonunun, mikroorganizma tarafından tüketilen oksijen miktarının arayüzeyde belirgin bir  $\Delta\text{CO}$  farkı oluşturmasına imkan vermeyecek düzeyde yüksek olmasıyla açıklanabilir. Diğer taraftan 8,84 mg jelatin/cm<sup>2</sup> oranında jelatin kullanılarak hazırlanan biyosensörle alınan cevapların düşük bulunması ise dah yoğun sterik engeller nedeniyle mikroorganizmanın hareket

kabiliyetinin ve ayrıca biyoaktif tabaka kalınlığının substrat diffüzyonunu azaltmış olmasıyla açıklanabilir.

### 3.10.3 Glutaraldehid oranının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonuna yönelik olarak gerçekleştirilen bu çalışmada, çapraz bağlayıcı reaktif olan glutaraldehitin biyosensör cevabı üzerine etkisini belirlemek üzere biyoaktif tabakada 4,42 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup> ve 4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup> içerecek şekilde mikrobiyal biyosensörler hazırlandı. Hazırlanan biyosensörler % 0,05 ; % 0,1 ve % 0,2 oranlarındaki glutaraldehit ile muamele edildi.

Biyosensörlerle yapılan denemeler sonrası elde edilen sonuçlara ilişkin standart grafikler Şekil 3.58'de verilmiştir.



Şekil 3.58 *C.tropicalis* temelli biyosensör cevabı üzerine glutaraldehid miktarının etkisi [ Fosfat tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:30<sup>0</sup>C. ●: % 0,05 glutaraldehid, ●: % 0,1 glutaraldehid, ●: % 0,2 glutaraldehid. Tüm biyosensörler için hücre miktarı 4,42 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup> ve jelatin miktarı 4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup> dir ].

Şekilden de görüldüğü gibi en iyi ve doğrusal biyosensör cevapları % 0,1'lik glutaraldehid oranı kullanılarak hazırlanan biyosensörle alındı.

Glutaraldehitin % 0,05 ve % 0,2 oranları kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle yapılan denemelerde birbirine benzer ve oldukça düşük biyosensör cevapları alındı. % 0,05 oranında glutaraldehid kullanıldığında elde edilen sonuçlar; daha gözenekli bir biyoaktif tabakadan oksijen difüzyonunun, mikroorganizma tarafından tüketilen oksijen miktarının arayüzeyde belirgin bir  $\Delta\text{ÇO}$  farkı oluşturmamasına imkan vermeyecek düzeyde hızlı olmasından kaynaklandığını göstermektedir.

Diğer taraftan % 0,2'lik bir glutaraldehid oranı kullanıldığında elde edilen düşük biyosensör cevapları muhtemelen jelatin-jelatin arasında oluşabilecek çapraz bağ sayısının artışı, bunun yaratabileceği sterik etki ve diffüzyon problemi yanında biyoaktif tabakadaki *C.tropicalis* hücrelerinin bir kısmının glutaraldehitin toksik etkisiyle yaşamsal faaliyetlerini kaybetmiş olmasından kaynaklanmaktadır.

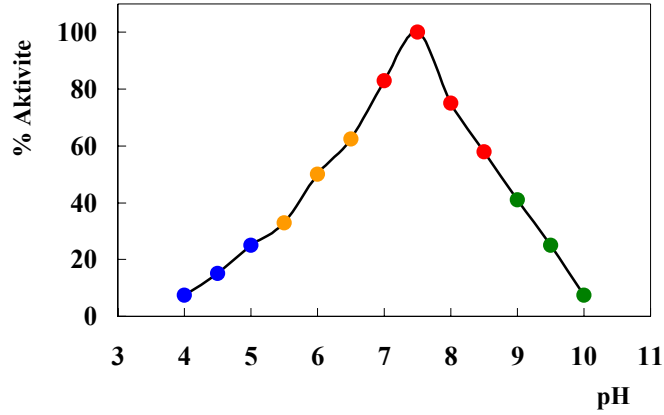
### **3.11 *C.tropicalis* Maya Hücreleri Temelli Mikrobiyal Biyosensörlerin Biyoaktif Tabaka Bileşenlerinin Optimizasyonuna İlişkin Bulgular**

*C.tropicalis* maya hücreleri kullanılarak hazırlanan jelatin tabanlı biyosensörlerin optimum pH, uygun tampon sistemi, uygun tampon konsantrasyonu ve optimum sıcaklık gibi çalışma koşullarına ait optimizasyon sonuçları bu bölümde verilmiştir.

#### **3.11.1 Optimum pH**

Mikrobiyal biyosensörün biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonu sonrası pH'nın biyosensör cevabı üzerine etkisini ve optimum pH değerini belirlemek üzere asetat, sitrat, fosfat ve glisin tamponlarının kullanıldığı pH optimizasyonuna yönelik çalışmalar

gerçekleştirildi. Denemeler sonrası elde edilen sonuçlara yönelik grafik Şekil 3.59'da verilmiştir.



Şekil 3.59 *C.tropicalis* temelli biyosensörün optimum pH grafiği

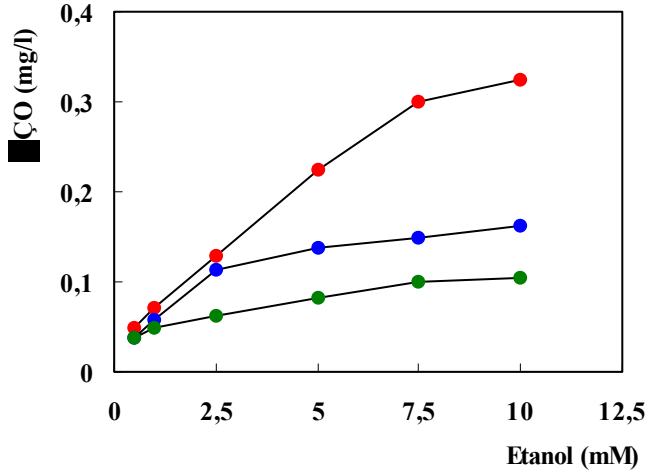
[ ● : Asetat tamponu, ● : Sitrat tamponu, ● : Fosfat tamponu, ● : Glisin tamponu. Tüm biyosensörler için hücre ve jelatin oranı 4,42 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup> ve 4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 0,5'dir. Çalışma sıcaklığı T:30°C ].

pH:7,5 değerinden daha asidik ve daha bazik bölgelere gidildikçe biyosensör cevabında azalmalar tespit edildi. Mikroorganizmanın kültür ortamının pH değerinin de 7,5 olduğunu göz önüne alındığında mikrobiyal temelli biyosensörün optimum pH değerinin 7,5 çıkması beklenen bir neticedir ve mikroorganizmaların biyolojik gereksinimlerinin bir sonucudur.

### 3.11.2 Uygun tampon sistemi

Mikrobiyal biyosensörün optimum pH değeri olarak pH:7,5 belirlendikten sonra bu pH değerindeki K-fosfat, Na-fosfat ve Tris/HCl tamponları hazırlanarak tampon sisteminin biyosensör cevabı üzerine etkisi incelendi.

Yapılan denemeler sonrası elde edilen sonuçlara ilişkin grafikler Şekil 3.60'da verilmiştir.



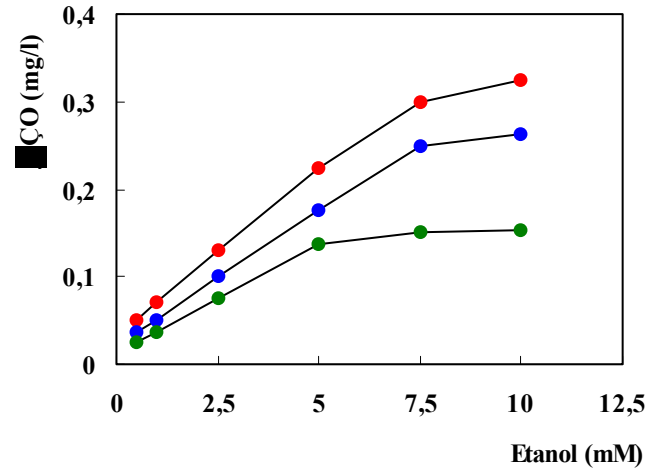
Şekil 3.60 *C.tropicalis* temelli biyosensör cevabı üzerine tampon sisteminin etkisi, [ T:30°C,pH:7,5), ● : Na-fosfat tamponu, ● :K-fosfat tamponu, ● : Tris-HCl tamponu, Tüm biyosensörler için hücre ve jelatin oranı 4,42 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup>,4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı %0,5'dir]

Mikrobiyal temelli biyosensörler ile yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar, en iyi ve doğrusal biyosensör cevabının K-fosfat tamponu ile alındığını gösterdi. En düşük biyosensör cevapları ise Tris-HCl tamponu kullanıldığında alındı.

### 3.11.3 Uygun tampon konsantrasyonu

Optimum pH değerinin 7,5 ve bu pH değerindeki en uygun tampon sisteminin de K-fosfat tampon sistemi olduğunun belirlenmesinden sonra tampon konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisinin tespitine yönelik çalışmalar gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda 25, 50 ve 100 mM'lık tampon konsantrasyonları ile denemeler gerçekleştirildi.

Denemeler sonrası elde edilen sonuçlara ilişkin grafikler Şekil 3.61'de verilmiştir.



Şekil 3.61 *C.tropicalis* temelli biyosensör cevabı üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi [ T:30°C, pH:7,5 Fosfat tamponu . ●: 25 mM, ●: 50 mM, ●: 100 mM. Tüm biyosensörler için hücre ve jelatin oranları 4,42 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup>, 4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 0,5'dir ].

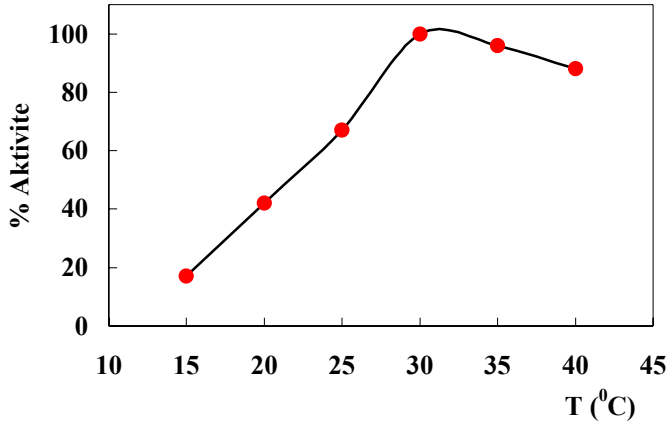
Denemeye ilişkin olarak elde edilen grafiklerden en yüksek ve doğrusal biyosensör cevaplarının 50 mM'lık konsantrasyondaki fosfat tamponu ile alındığı görüldü. 25 mM konsantrasyondaki fosfat tamponu ile de benzer bir doğrusal grafik elde edilmiş olmakla birlikte 50 mM'a nazaran daha düşük cevaplar elde edildi. Diğer taraftan 100 mM'lık fosfat tamponu kullanıldığında ise en düşük cevaplar alındı. Bu sonuçlar konsantrasyon artışıyla birlikte iyon şiddetindeki artışın belirli bir değere kadar enzim aktivitesinde artış ve daha yüksek değerlerde azalmaya yol açmasıyla uyumludur. Mikroorganizma aktivitesi içinde bu denemede benzer sonuçlar elde edilmiştir.

### 3.11.4 Optimum sıcaklık

Mikrobiyal temelli biyosensörün çalışma koşullarının optimizasyonuna yönelik bu çalışmada optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik denemeler gerçekleştirildi. Denemeler 15-20-25-30-35 ve 40°C'lerde yapıldı.



Denemelerin sonuçlarına ilişkin grafik Şekil 3.62’de verilmiştir.



Şekil 3.62 *C.tropicalis* temelli biyosensörün optimum sıcaklığı  
 [ Fosfat tamponu, pH:7,5;50 mM. Etanol konsantrasyonu : 2,5 mM.  
 Tüm biyosensörler için hücre ve jelatin oranları; 4,42 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup>,  
 4,42 mg jelatin/cm<sup>2</sup> ve glutaraldehid oranı % 0,5’dir ].

Şekilden de görüldüğü gibi 30°C’ye kadar giderek artan bir biyosensör cevabı elde edildi, 30°C’de en yüksek cevap alındı. 30°C’den 35 ve 40°C’lere çıkıldığında biyosensör cevabında az da olsa düşmeler gözlemlendi. 45°C’de gerçekleştirilen denemeler de ise biyosensörün biyoaktif tabakasında meydana gelen deformasyon ölçüm yapılmasına imkan vermedi.

### 3.12 *C.tropicalis* Maya Hücreleri Kullanılarak Hazırlanan Mikrobiyal Biyosensörün Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

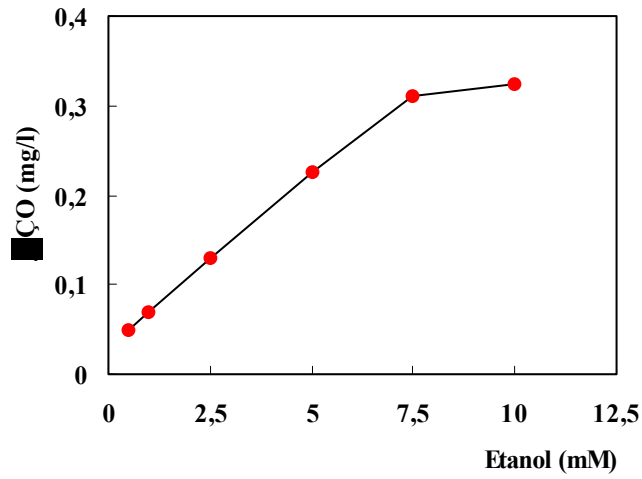
Mikrobiyal biyosensörün karakterizasyonu amacıyla etanol tayin sınırlarının, analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin, substrat spesifikliğin, etanol tayininde bazı maddelerin girişim etkilerinin, operasyonel kararlılığın ve depo kararlılığının belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirildi.

### 3.12.1 Etanol tayin sınırları

Geliştirilen mikrobiyal temelli biyosensörün gerek biyoaktif tabaka bileşenlerinin ve gerekse çalışma koşullarının optimizasyonu sonrası etanol için standart denemeler yapılarak biyosensörün etanol için tayin sınırları belirlendi.

Şekil 3.63 mikrobiyal temelli biyosensöre ait etanol tayin sınırlarını gösteren standart grafiği göstermektedir.

Optimize edilen koşullarda hazırlanan biyosensörle yapılan denemeler sonrası 0,5-7,5 mM etanol konsantrasyonu aralığında doğrusal grafikler elde edildi.



Şekil 3.63 *C. tropicalis* temelli biyosensör için etanol tayin sınırları [ Fosfat tamponu; pH:7,5; 50 mM, T:30°C. Hücre oranı 4,42 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup>, jelatin oranı 4,42 mg kuruhücre/cm<sup>2</sup>, ve glutaraldehid oranı % 0,5'dir ].

### 3.12.2 Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği

Mikrobiyal temelli biyosensörle yapılan analizlerin sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin tespiti amacıyla etanolün 2,5 mM konsantrasyonunda (n=10) ölçümler yapıldı. Elde edilen sonuçlara ilişkin bulunan standart sapma(S.S) ve varyasyon katsayılarına (V.K) ilişkin değerler Çizelge 3.7’de verilmiştir.

Çizelge 3.7 *C.tropicalis* temelli biyosensörlerde analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği (n=10)

	Etanol Kons. (mM)	Ortalama Değer ( $\bar{x}$ ) (mM)	Standart Sapma (S.S) (mM)	Varyasyon Katsayısı (V.K) (%)
Jelatin Tabanlı Mikrobiyal Biyosensör	2,5	2,43	$\pm 0,0823$	3,39

### 3.12.3 Substrat spesifikliğı

Mikrobiyal temelli biyosensörün substrat spesifikliğıne ilişkin olarak elde edilen sonuçlar Çizelge 3.8’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.8 *C.tropicalis* temelli biyosensörün substrat spesifikliğı

Substrat*	% Aktivite
Etanol	100
Metanol	59
Propanol	21
Bütanol	21
İzo-propanol	0
Etilenglikol	0
Dietilenglikol	0
Glukoz	53
L-Askorbik asit	421

\*Konsantrasyonlar 2,5 mM’dir.

Çizelgeden de görüldüğü gibi mikrobiyal biyosensör ile dört karbonlu primer alkollere kadar cevap alınmaktadır. Elde edilen sonuçlar bu özellikteki alkoller ile bunların yanısıra glukoz ve L-askorbik asidin de mikroorganizma tarafından bir karbon kaynağı olarak kullanılabilirdiğini göstermektedir.

### 3.12.4 Etanol tayininde bazı maddelerin girişim etkileri

Bu bölümde *C.tropicalis* temelli mikrobiyal biyosensör ile etanol tayininin hedeflendiği koşullarda reaksiyon ortamında etanolün yanısıra bazı girişim yapabilecek maddelerin de (metanol,propanol, bütanol, izo-propanol, etilenglikol, dietilenglikol, glukoz ve L-askorbik asitin standart çözeltileri) bulunduğu sistemler oluşturularak ölçümler gerçekleştirildi.

Ölçümler sonunda elde edilen sonuçlara ilişkin veriler Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9 *C.tropicalis* temelli biyosensörler ile etanol tayininde bazı maddelerin girişim etkilerinin belirlenmesi

Substrat	% Aktivite
<b>Etanol</b>	100
<b>(Etanol + Metanol)</b>	113
<b>(Etanol + Propanol)</b>	100
<b>(Etanol + Bütanol)</b>	100
<b>(Etanol + izo-propanol)</b>	100
<b>(Etanol + Etilenglikol)</b>	100
<b>(Etanol + Dietilenglikol)</b>	100
<b>(Etanol + Glukoz)</b>	113
<b>(Etanol +L-Ask. Asit)</b>	600

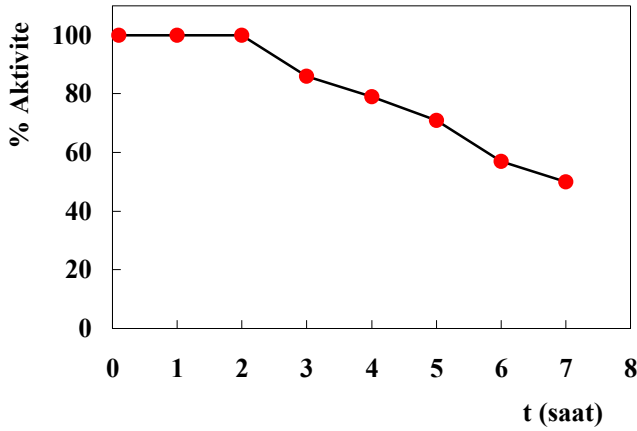
Konsantrasyonlar 2,5 mM'dır.

Çizelge 3.9'dan görüldüğü gibi reaksiyon ortamında tek olarak bulduklarında oldukça yüksek biyosensör cevapları veren metanol ve glukoz etanol ile birlikte reaksiyon ortamına ilave edildiğinde tek başlarına verdikleri etkinin oldukça altında bir düzeyde biyosensör cevabını etkilemektedir. Özellikle metanolün etkisinin etanol ile bir arada iken daha da azaldığı belirlenmiştir. Bu durum, etanol içeren ortamlarda normalde etanolün yanında çok daha düşük konsantrasyonda bulunma ihtimali olan diğer alkollerin dikkate değer bir girişim etkisine yol açmayacaklarının en önemli kanıtı olarak ortaya çıkmaktadır.

### 3.12.5 Operasyonel kararlılık

Biyosensörün operasyonel kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan mikrobiyal temelli biyosensör daha önce optimizasyonu yapılarak belirlenmiş olan çalışma sıcaklığında (30<sup>0</sup>C) ve çalışma tamponu içinde (Fosfat tamponu, pH:7,5;50 mM) bekletilerek bir saatlik periyotlar sonunda ölçümler yapıldı.

Denemelerin sonuçlarına yönelik olarak elde edilen grafikler Şekil3.64'de verilmiştir.



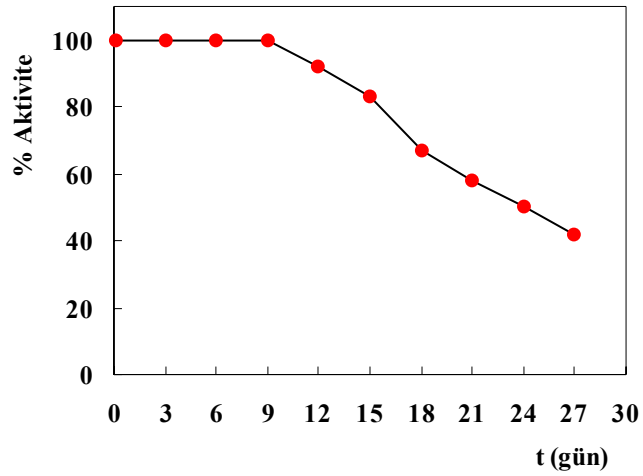
Şekil 3.64 *C.tropicalis* temelli biyosensörün operasyonel kararlılığı  
[ Fosfat tamponu; pH:7,5;50 mM,T.30<sup>0</sup>C. Etanol konsantrasyonu: 2,5 mM].

Operasyonel kararlılık denemelerinde yedi saatlik periyot sonunda jelatin tabanlı mikrobiyal biyosensörün cevabında % 50'lik bir düşme belirlendi.

### 3.12.6 Depo kararlılığı

Geliştirilen biyosensörün depo kararlılığının belirlenmesi amacıyla yeni hazırlanan biyosensör ile başlangıç anında ve üç günlük periyotlar sonunda 2,5 mM etanol konsantrasyonu için ölçümler yapıldı.

Yapılan ölçümler sonrası elde edilen sonuçlara ilişkin grafik Şekil 3.65'de verilmiştir.



Şekil 3.65 *C.tropicalis* temelli biyosensörün depo kararlılığı

[ Fosfat tamponu; pH:7,5;50 mM,T.30<sup>0</sup>C. Etanol konsantrasyonu :2,5 mM].

27 günlük bir zaman periyodu sonunda mikrobiyal temelli biyosensörün cevabında % 58'lik bir düşme belirlendi. Biyosensör cevabındaki bu düşme büyük olasılıkla ölçümler haricinde soğuk odada

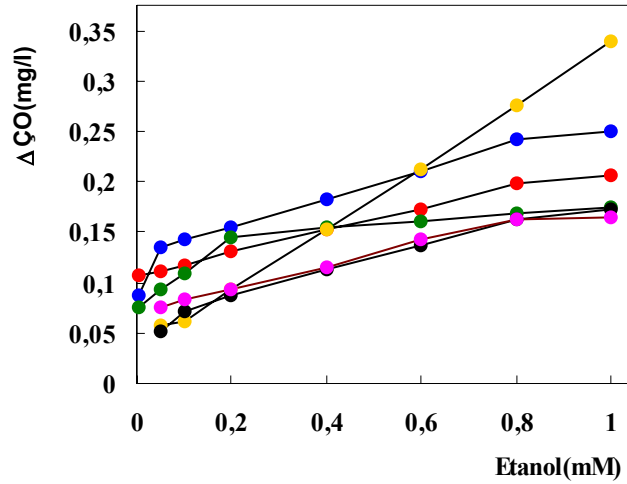
+4<sup>0</sup>C'de ve tampon içinde bekletilen biyosensörde zamanla mikroorganizma kayıplarının yaşanmış olmasından kaynaklanmaktadır.

### **3.13 Etanol Tayinine Yönelik Hazırlanan Biyosensörlerin Karşılaştırılması**

Bu bölümde, etanol tayinine yönelik olarak geliştirilen yedi farklı tipte biyosensörlerin optimum biyoaktif tabaka bileşenlerinin belirlenmesi, çalışma koşullarının optimizasyonu ve karakterizasyonlarına yönelik bulguların karşılaştırmalı kıyaslanması yapıldı.

Bu amaçla, biyosensörler için etanol tayin aralığı, substrat spesifikliğı, girişim etkilerine karşı duyarlılığı, operasyonel kararlılığı, cevap süreleri ve analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği gibi parametreler gözönüne alındı.

Şekil 3.66'da etanol tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensörlerin etanol tayin aralıkları görülmektedir.



Şekil 3.66 Alkol oksidaz ve katalaz temelli biyosensörlerin etanol tayin aralığı

- [ ● : Jelatin tabanlı AO biyosensörü ( Fosfat tamponu; pH:7,5, 50 mM). Etanol tayin aralığı : 0,005-0,75 mM.
  - : Jel.-Ca-aljinat tabanlı AO biyosensörü ( Tris-HCl tamponu; pH:7,5, 50 mM). Etanol tayin aralığı : 0,05-0,75 mM.
  - : Jel.-κ-karrajenan tabanlı AO biyosensörü ( Fosfat tamponu; pH:7,5, 50 mM). Etanol tayin aralığı : 0,005-0,25 mM.
  - : Jelatin tabanlı katalaz biyosensörü ( Fosfat tamponu; pH:7,0, 50 mM) Etanol tayin aralığı : 0,1-1,0 mM.
  - : Jel.-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörü ( Fosfat tamponu; pH: 7,5, 50 mM). Etanol tayin aralığı : 0,05-0,8 mM.
  - : Jel.-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü ( Tris-HCl tamponu; pH:7,5, 50 mM). Etanol tayin aralığı : 0,05-0,8 mM.
- Tüm biyosensörler için çalışma sıcaklığı 35<sup>0</sup>C'dir ].

Şekilden de görüleceği gibi en ideal biyosensör cevabı jelatin tabanlı katalaz biyosensörü ile alındı. Bununla birlikte bu biyosensör ile tayin edilebilir en düşük etanol konsantrasyonu 0,1 mM'dır. Aynı durum jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörü için de geçerlidir. Jelatin tabanlı alkol oksidaz ile 0,005-0,75 mM etanol aralığında doğrusal sonuçlar alındı. 0,005 mM etanol standardı için jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile de ölçüm yapılabildi fakat bu biyosensör ile 0,25 mM etanol konsantrasyonuna kadar doğrusallık elde edildi. Diğer biyosensörlerin gerek biyosensör



cevapları ve gerekse doğrusal aralıkları jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensöründen düşüktür. Tüm bu sonuçlar en düşük limit değere (0,005 mM) sahip ve doğrusal tayin aralığı en geniş (0,005-0,75 mM) biyosensörün jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü olduğunu göstermektedir. Buna karşın, en düşük limit değeri daha yüksek (0,1 mM) olmakla beraber doğrusal tayin aralığı daha yüksek etanol konsantrasyonlarına ulaşabilen biyosensör ise jelatin tabanlı katalaz biyosensörüdür.

Biyosensörlerin cevap sürelerini de dikkate alacak olursak, jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile 1 dakikada, jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü ile 3 dakikada ve diğer biyosensörler ile 5 dakika içerisinde ölçüm yapılabilmektedir. Bu durum bu açıdan da jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörüne bir üstünlük kazandırmaktadır.

Biyosensörlerin substrat spesifikliğinin karşılaştırılması Çizelge 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.10 Etanol tayinine yönelik biyosensörlerin substrat spesifikliğinin karşılaştırılması\*

Substrat	% Aktivite						
	AO <sup>a</sup>	AO <sup>b</sup>	AO <sup>c</sup>	K <sup>d</sup>	K <sup>e</sup>	K <sup>f</sup>	M <sup>g</sup>
Etanol	100	100	100	100	100	100	100
Metanol	20	38	22	17	43	42	59
Propanol	66	46	16	50	64	25	21
Bütanol	53	58	34	29	29	29	21
İzo-propanol	47	31	19	25	21	17	0
Etilenglikol	76	54	19	0	0	13	0
Dietilenglikol	73	62	25	0	0	08	0
Glukoz	47	62	22	17	14	08	53
Askorbik asit	93	92	200	58	200	166	421

\*Konsantrasyonlar; AO<sup>a</sup> ve AO<sup>b</sup> temelli biyosensörler için; 0,5 mM, AO<sup>c</sup> için; 0,1 mM K<sup>d</sup>, K<sup>e</sup> ve K<sup>f</sup> temelli biyosensörler için; 0,4 mM ve M<sup>g</sup> temelli biyosensör için; 2,5 mM'dir.

<sup>a</sup> Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü

<sup>b</sup> Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörü

<sup>c</sup> Jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü

<sup>d</sup> Jelatin tabanlı katalaz biyosensörü

<sup>e</sup> Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü

<sup>f</sup> Jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörü

<sup>g</sup> Jelatin tabanlı mikrobiyal biyosensör

Biyosensörler substrat spesifikleri açısından kıyaslandıklarında incelenen madde açısından önemli farklar göze çarpmaktadır. Etanolün yanında bulunması en muhtemel alkol olan metanol açısından bakıldığında jelatin tabanlı katalaz ve jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörlerinin daha avantajlı olduğu görülmektedir. Propanol ve metanol açısından bakıldığında mikrobiyal biyosensörde daha düşük cevaplar alınmıştır. Ancak, alkol tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesinde temel hedef etanol tayini olduğu için etanol tayininde sözkonusu girişimcilerin varlığı ve bunların, tayinleri ne düzeyde etkilediği daha fazla önem taşımaktadır.

Biyosensörlerin cevabı üzerine girişimci maddelerin etkisine yönelik sonuçlar Çizelge 3.11’de verilmiştir.

Çizelge 3.11 Etanol tayinine yönelik biyosensörlerin cevabı üzerine girişimci maddelerin etkilerinin karşılaştırılması\*

Substrat	% Aktivite						
	AO <sup>a</sup>	AO <sup>b</sup>	AO <sup>c</sup>	K <sup>d</sup>	K <sup>e</sup>	K <sup>f</sup>	M <sup>g</sup>
Etanol	100	100	100	100	100	100	100
(Metanol + Etanol)	102	104	104	108	114	102	113
(Propanol + Etanol)	133	104	96	75	86	100	100
(Bütanol + Etanol)	120	115	83	100	86	125	100
(İzo-propanol + Etanol)	106	112	92	67	100	92	100
(Etilenglikol + Etanol)	93	92	108	100	100	100	100
(Dietilenglikol + Etanol)	93	119	100	100	100	101	100
(Glukoz + Etanol)	106	96	92	67	100	100	113
(Askorbik asit + Etanol)	180	169	208	250	371	266	600

\*Konsantrasyonlar; AO<sup>a</sup> ve AO<sup>b</sup> temelli biyosensörler için; 0,5 mM, AO<sup>c</sup> için; 0,1 mM

K<sup>d</sup>, K<sup>e</sup> ve K<sup>f</sup> temelli biyosensörler için; 0,4 mM ve M<sup>g</sup> temelli biyosensör için; 2,5 mM’dir.

<sup>a</sup> Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü, <sup>b</sup> Jelatin-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz biyosensörü

<sup>c</sup> Jelatin-κ-karrajenan tabanlı alkol oksidaz biyosensörü, <sup>d</sup> Jelatin tabanlı katalaz biyosensörü

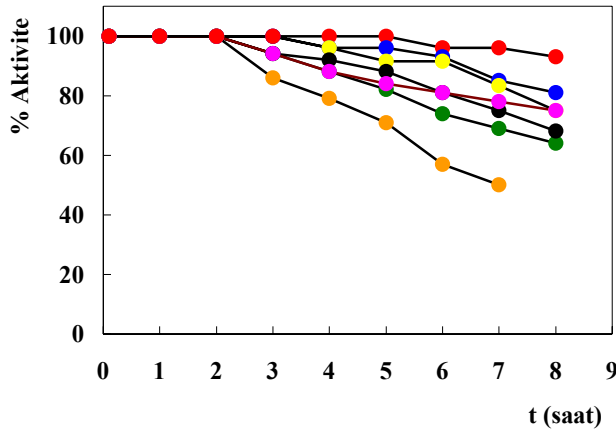
<sup>e</sup> Jelatin-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü, <sup>f</sup> Jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörü

<sup>g</sup> Jelatin tabanlı mikrobiyal biyosensör

Tayin edilecek etanole eşdeğer konsantrasyonda metanol varlığında en uygun biyosensör cevabı jelatin tabanlı alkol oksidaz ve jelatin-κ-karrajenan tabanlı katalaz biyosensörü ile alınmıştır. Ancak tayin aralığı ve standart grafik açısından jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü önemli üstünlüklere sahiptir. Katalaz ve MO temelli biyosensörlerde L-askorbik asit ve etanolün birarada bulunması yüksek biyosensör cevapları alınmasına neden olmuştur. Burada katalaz biyosensörü için her iki substratın katalaza birlikte etkiyi olabileceği,

mikrobiyal biyosensör için ise mikroorganizmanın L-askorbik asiti C kaynağı olarak değerlendirmesi ve bununla metabolik aktiviteyi dolayısıyla solunum aktivitesini de arttırmış olabileceği düşünülebilir. Etanol tayini yapılacak gıda veya biyolojik örneklerde diğer alkollerin varlığı gerçekte çok küçük değerlerdedir ve hemen hiçbir zaman etanolün yanında onunla eşdeğer düzeyde bulunmamaktadır. Bu nedenle diğer alkollerin etanole eşdeğer düzeyde tutulduğu bu çalışmada bile girişim etkileri kabul edilebilir sınırlarda iken gerçek koşullarda çok daha sağlıklı sonuçların alınacağı kesindir.

Biyosensörlerin operasyonel kararlılıklarının karşılaştırılması Şekil 3.67’de gösterilmiştir.



Şekil 3.67 Alkol oksidaz, katalaz ve mikrobiyal temelli biyosensörlerin operasyonel kararlılığı

- : Jelatin tabanlı AO biyosensörü
- : (Jel.-Ca-aljinat) tabanlı AO biyosensörü
- : (Jel.-κ-karrajenan) tabanlı AO biyosensörü
- : Jelatin tabanlı katalaz biyosensörü
- : (Jel.-κ-karrajenan) tabanlı katalaz biyosensörü
- : (Jel.-Ca-aljinat) tabanlı katalaz biyosensörü
- : Mikrobiyal temelli biyosensör

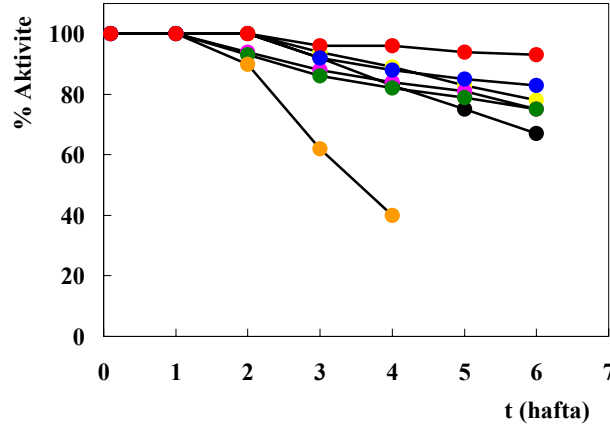
Biyosensörlerin operasyonel kararlılıklarına ilişkin olarak sekiz saatlik periyot sonrası elde edilen biyosensör cevapları detaylı bir şekilde Çizelge 3.12’de verilmiştir. 8 saatlik bir periyot sonrası elde edilen grafiklerden operasyonel kararlılığı en yüksek biyosensör jelatin

tabanlı alkol oksidaz olurken, operasyonel kararlılığı en düşük biyosensör *C.tropicalis* temelli mikrobiyal biyosensör oldu.

Çizelge 3.12 Alkol oksidaz, katalaz ve *C.tropicalis* temelli biyosensörlerin operasyonel kararlılığı

Biyosensör	Başlangıç cevabı (%)	8 saat sonrası cevap (%)
Jelatin tabanlı alkol oksidaz	100	93
Jel-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz	100	81
Jel-κ-karajenan tabanlı alkol oksidaz	100	64
Jelatin tabanlı katalaz	100	79
Jel-Ca-aljinat tabanlı katalaz	100	79
Jel-κ-karajenan tabanlı katalaz	100	68
Jelatin tabanlı mikrobiyal	100	48

Biyosensörlerin depo kararlılıklarının da karşılaştırıldığı grafikler Şekil 3.68’de verilmiştir.



Şekil 3.68 Alkol oksidaz, katalaz ve mikrobiyal temelli biyosensörlerin depo kararlılığı

- : Jelatin tabanlı AO biyosensörü
- : Jel.-Ca-aljinat tabanlı AO biyosensörü
- : Jel.-κ-karajenan tabanlı AO biyosensörü
- : Jelatin tabanlı katalaz biyosensörü
- : Jel.-κ-karajenan tabanlı katalaz biyosensörü
- : Jel.-Ca-aljinat tabanlı katalaz biyosensörü
- : Mikrobiyal temelli biyosensör

Biyosensörlerin depo kararlılıklarına ilişkin olarak altı haftalık periyot sonrası elde edilen biyosensör cevapları detaylı bir şekilde Çizelge 3.13’de verilmiştir.

Çizelge 3.13 Alkol oksidaz, katalaz ve *C.tropicalis* temelli biyosensörlerin depo kararlılığı

Biyosensör	Başlangıç cevabı (%)	6 hafta sonrası cevap (%)
Jelatin tabanlı alkol oksidaz	100	93
Jel-Ca-aljinat tabanlı alkol oksidaz	100	83
Jel-κ-karajenan tabanlı alkol oksidaz	100	75
Jelatin tabanlı katalaz	100	78
Jel-Ca-aljinat tabanlı katalaz	100	75
Jel-κ-karajenan tabanlı katalaz	100	68
Jelatin tabanlı mikrobiyal	100	42*

\* Mikrobiyal biyosensör için 4 hafta sonrası

Depo kararlılığı açısından da operasyonel kararlılık için elde edilen bulgulara benzer olarak 6 haftalık bir periyot sonrası depo kararlılığı en yüksek biyosensör jelatin tabanlı alkol oksidaz olurken, depo kararlılığı en düşük biyosensör *C.tropicalis* temelli mikrobiyal biyosensör oldu.

Jel-κ-karajenan esaslı enzim elektrodlarında yıkama ve bekletme adımlarında kullanılan çözeltilerin  $K^+$  iyonlarını içermesinin biyosensörlerin deformasyonunu azaltarak biyoaktif tabakanın kararlılığına katkı yapabileceği düşünülmektedir. Söz konusu biyosensörlerin diğerlerine nazaran bu açılarından daha olumsuz niteliklere sahip olmasının en önemli nedenlerinden biri olarak bu durum düşünülmektedir. Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerde de  $Ca^{2+}$  iyonları için benzer bir durumun söz konusu olabileceği düşünülmektedir.

### 3.14 Jelatin Tabanlı Alkol Oksidaz Biyosensörü Kullanılarak Alkollü İçeceklerde Etanol Tayinine İlişkin Bulgular

Geliştirilen tüm biyosensörlerin etanol tayin aralığı, substrat spesifikliğı, girişim etkileri, depo kararlılığı, tekrarlanabilirlik ve operasyonel kararlılık gibi parametrelerinin incelenmesi sonrası elde edilen sonuçların birbiri yanında kıyaslanması sonrası genel olarak etanol tayini için en iyi sonuçları veren biyosensörün jelatin tabanlı

alkol oksidaz biyosensörü olduğuna karar verildi. Bu aşamadan sonra jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile alkollü içeceklerde etanol tayini amacıyla Troy Light (alkol oranı % 3,0), Miller (alkol oranı % 4,7) ve Carlsberg (alkol oranı % 5,0) biraları kullanıldı. Her bir bira örneğine ilişkin çözeltiler fosfat tamponu içinde (pH:7,5;50 mM) hazırlandı.

Denemelerde bira örneklerinin belirtilen etanol konsantrasyonu dikkate alınarak yapılan seyreltmelerle hazırlanan ve yaklaşık 0,25 mM'lık etanol konsantrasyonundaki çözeltilerde ölçümler gerçekleştirildi (n=5). Elde edilen sonuçlara ilişkin standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayıları (V.K) da hesaplandı. Sonuçlar standart katma metodu kullanılarak sınıandı.

Yapılan ölçümler sonrası elde edilen sonuçlar Çizelge 3.14 ve 3.15'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.14 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile alkollü içeceklerde etanol tayini

Örnek	Alkol Oksidaz Biyosensörü			
	Bilinen etanol (%)	Bulunan etanol (%)	n=5	
			S.S	% V.K
Troy Light	3,0	3,01	± 0,00269	1,07
Miller	4,7	4,74	± 0,00273	1,09
Carlsberg	5,0	5,04	± 0,00278	1,10

Çizelge 3.15 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile standart katma metodu kullanılarak alkollü içeceklerde etanol tayini

Örnek	Alkol Oksidaz Biyosensörü			
	Bulunan etanol miktarı (%)	Bulunan + ilave edilen etanol (%)	Belirlenen etanol miktarı (%)	Geri Kazanım (%)
Troy Light	3,01	4,21	4,27	101,4
Miller	4,74	5,94	5,99	100,8
Carlsberg	5,04	6,24	6,27	100,5

Çizelgelerden de görüldüğü gibi jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile oldukça hassas ve doğru bir şekilde alkollü içeceklerde etanol tayini yapmak mümkündür.

### 3.15 Enzimatik-Spektrofotometrik Yöntem ile Alkollü İçeceklerde Etanol Tayini

Bu çalışmada da jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensöründe olduğu gibi etanol tayini amacıyla Troy Light (alkol oranı % 3,0), Miller (alkol oranı % 4,7) ve Carlsberg (alkol oranı % 5,0) biraları kullanıldı.

Ölçümler, modifiye alkol oksidaz (EC 1.1.3.13) aktivite tayini (*Sigma Product No: A0438, A2404, A6941*), Sigma Kalite Kontrol Test Prosedürü esasına göre gerçekleştirildi.

Bira örnekleri 40 kat seyreltilerek fosfat tamponu (pH:7,5; 50 mM) içinde hazırlandı. Her bir bira örneği için n=5 ölçüm gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara ilişkin standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayıları (V.K) hesaplandı. Sonuçlar standart katma metoduyla sınılandı.

Yapılan ölçümler sonunda elde edilen sonuçlara ilişkin değerler Çizelge 3.16 ve 3.17’de verilmiştir.

Çizelge 3.16 Enzimatik-spektrofotometrik yöntem ile alkollü içeceklerde etanol tayini

Örnek	Enzimatik-Spektrofotometrik Metod			
	Bilinen etanol (%)	Bulunan etanol (%)	n=5	
			S.S	% V.K
Troy Light	3,0	3,04	± 0,00547	2,15
Miller	4,7	5,15	± 0,00550	2,01
Carlsberg	5,0	5,54	± 0,00447	1,62

Çizelge 3.17 Enzimatik-spektrofotometrik yöntem ile standart katma metodu kullanılarak alkollü içeceklerde etanol tayini

Örnek	Enzimatik-Spektrofotometrik Metod			
	Bulunan etanol miktarı (%)	Bulunan + ilave edilen etanol (%)	Belirlenen etanol miktarı (%)	Geri Kazanım (%)
Troy Light	3,04	4,24	4,36	102,8
Miller	5,15	6,35	6,62	104,3
Carlsberg	5,54	6,74	6,93	102,8

### 3.16 Etanol Tayinine Yönelik Hazırlanan Alkol Oksidaz Temelli Biyosensör ile Enzimatik-Spektrofotometrik Yöntem Sonuçlarının Karşılaştırılması

Her iki yöntemle bira örneklerinde yapılan etanol tayinlerine ilişkin veriler kıyaslamalı olarak Çizelge 3.18 ve 3.19'da özetlendi.



Çizelge 3.18 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile alkollü içeceklerde etanol tayin sonuçlarının enzimatik-spektrofotometrik etanol tayin sonuçları ile karşılaştırılması

Örnek	Alkol Oksidaz Biyosensörü			
	Bilinen etanol (%)	Bulunan etanol (%)	n=5	
			S.S	% V.K
Troy Light	3,0	3,01	$\pm 0,00269$	1,07
Miller	4,7	4,74	$\pm 0,00273$	1,09
Carlsberg	5,0	5,04	$\pm 0,00278$	1,10
Örnek	Enzimatik-Spektrofotometrik Metod			
	Bilinen etanol (%)	Bulunan etanol (%)	n=5	
			S.S	% V.K
Troy Light	3,0	3,04	$\pm 0,00547$	2,15
Miller	4,7	5,15	$\pm 0,00550$	2,01
Carlsberg	5,0	5,54	$\pm 0,00447$	1,62

Çizelgeden anlaşılacağı gibi, çok büyük bir fark olmamakla birlikte jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ile alkollü içeceklerde yapılan tayinler sonunda elde edilen sonuçlar; standart sapma ve varyasyon katsayıları da dikkate alındığında enzimatik-spektrofotometrik metod ile yapılan tayinlerin sonuçlarına göre daha duyarlı ve içeceklerin üzerinde rapor edilen değerlere daha yakındır. Bununla birlikte her iki yönteminde doğru bir şekilde etanol tayinini gerçekleştirdiğini söyleyebiliriz.

Ancak, biyosensör yöntemleri aynı enzim miktarı ile çok sayıda analiz yapılabilmesi ve pratik bir şekilde sonuç vermesi, her ölçüm öncesi uzun hazırlıklara ihtiyaç göstermemesi açılarından diğerlerine kıyasla önemli üstünlükler sağlamaktadır.

Çizelge 3.19 Jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ve enzimatik-spektrofotometrik yöntem ile alkollü içeceklerde standart katma metoduyla etanol tayin sonuçlarının karşılaştırılması

Örnek	Alkol Oksidaz Biyosensörü			
	Bulunan etanol miktarı (%)	Bulunan + ilave edilen etanol (%)	Belirlenen etanol miktarı (%)	Geri Kazanım (%)
Troy Light	3,01	4,21	4,27	101,4
Miller	4,74	5,94	5,99	100,8
Carlsberg	5,04	6,24	6,27	100,5
Örnek	Enzimatik-Spektrofotometrik Metod			
	Bulunan etanol miktarı (%)	Bulunan + ilave edilen etanol (%)	Belirlenen etanol miktarı (%)	Geri Kazanım (%)
Troy Light	3,04	4,24	4,36	102,8
Miller	5,15	6,35	6,62	104,3
Carlsberg	5,54	6,74	6,93	102,8

Bu çalışmada , her iki yöntem ile alkollü içeceklerde etanol tayininin yüksek bir duyarlılık ve doğrulukla yapılabildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte enzimatik-spektrofotometrik metodun oldukça pahalı enzimlere ve kimyasallara gereksinim göstermesi, ölçüm süresinin uzunluğu ve jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörüne nazaran girişim etkilerine daha açık bir yöntem olması etanol tayinleri için biyosensörlerin kullanımını daha tercih edilir kılmaktadır.

### 3.17 Genel Değerlendirme

Etanol; gıda, içki, ilaç, tıp, kozmetik, boya, otomotiv sanayiinde sıklıkla kullanılan ve özellikle son yıllarda dünya petrol rezervlerindeki hızlı azalmayla birlikte petrol ve ürünlerine alternatif bir yakıt maddesi olarak hem bilim ve teknoloji hem de ekonomi gündeminde oldukça fazla yer edinen bir maddedir.

Ekonomik ve endüstriyel boyuttaki yararları ve öneminin yanında, alkollü içeceklerle alındığında fazla miktarda meydana gelen alkol toksikasyonu bulguları ile benzerlik gösteren beyin travmaları, üremi, diyabet asidozisi gibi rahatsızlıklara ilişkin bulgular fizyolojik sınırlarda da alkol tayinini zorunlu kılmaktadır. Kronik alkolizmin komplikasyonlarının önemi, teşhis ve tedavinin doğruluğu açısından etanol tayinine oldukça fazla ihtiyaç duymaktadır.

Ayrıca alkollü içeceklerdeki alkol miktarlarının belirlenmesi de söz konusu ürünlerin kalitelerinin tesbiti açısından da önem taşımaktadır.

Günümüzde etanol tayini genellikle alkol dehidrogenaz ve alkol oksidaza dayalı enzimatik-spektrofotometrik esaslı yöntemler, kromatografik yöntemler, kimyasal sensörler , bitki dokusu, hücre ve enzim gibi biyomateryallerin bir sinyal iletici ve kaydedici sistemle kombinasyonu ile geliştirilen biyosensörler ile yapılabilmektedir.

Enzimatik-spektrofotometrik yöntemlerde temel enzimler olarak alkol dehidrogenaz ve alkol oksidazın yanısıra genelde peroksidaz gibi ikinci bir enzime, alkol dehidrogenaz temelli yöntemlerde ise ilave koenzime gereksinim duyulması özellikle ekonomik açıdan önemli dezavantajlar olarak göze çarpmaktadır.

HPLC, CLC ve GC gibi kromatografik yöntemlerle oldukça hassas düzeylerde etanol tayini yapılabilmektedir. Bununla birlikte kromatografik yöntemlerin oldukça pahalı ekipmanlara ihtiyaç göstermesi, sistemin her laboratuvar şartına adapte edilememesi söz konusu yöntemlerin cazibesini azaltmıştır.

Sensör teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak civa film, karbon pasta gibi elektrot yüzeyindeki kimyasal reaksiyonları baz alan kimyasal sensörlerle de etanol tayinleri yapılabilmektedir. Kimyasal sensörlerle etanol tayininde daha çok redoks potansiyeline sahip kimyasalların kullanılması yoluna gidilmekle birlikte, elektrotların çabuk ve çoğu zaman rejenerasyona izin vermeyen deformasyonu ve bu durumun yarattığı tekrar kullanılabilirliğinin yetersizliği, özellikle biyolojik moleküllerin tayininde spesifikliğin düşük olması, kimyasal sensörlerin en genel dezavantajları olarak görülmektedir.

Tüm bu tayin yöntemlerinin yanısıra biyolojik materyallerin spesifikliğinin elektrod teknolojisindeki gelişmelerle birlikte sinyal iletilen sistemlerin hassasiyeti ile birleştirilmesiyle geliştirilen biyosensörler ile de etanol tayinleri pratik, spesifik, tekrarlanabilir düzeyde ve ekonomik bir şekilde yapılabilir.

Bu çalışmada alkol tayinine yönelik olarak alkol oksidaz ve katalaz temelli jelatin, jelatin- $\kappa$ -karrajenan ve jelatin-Ca-aljinat tabanlı biyosensörlerin yanısıra *C.tropicalis* maya hücrelerinin kullanıldığı jelatin tabanlı mikrobiyal bir biyosensör de geliştirildi.

Geliştirilen biyosensörlerin biyoaktif tabaka bileşenlerinin (enzim, jelatin,  $\kappa$ -karrajenan, aljinat, *C.tropicalis* maya hücreleri ve glutaraldehid) biyosensörler cevabı üzerine etkisinin belirlendiği çalışmaların yanısıra pH, sıcaklık, tampon sistemi ve konsantrasyonu gibi çalışma koşullarının optimizasyonuna yönelik araştırmalar da gerçekleştirildi.

Tüm biyosensörlerin kendi içlerinde immobilizasyon aşaması ve ölçüm prosedürü açısından bir standardizasyonu mevcut olup, biyosensörler ölçüm aralarında polarizasyon aşamasında tampon içerisinde bekletildi ve her ölçüm sonrası bidestile su ile yıkandı. Özellikle enzim elektrodları ile yapılan ölçümlerde çok sayıda ve tekrarlanabilir sonuçlar alınmış olması biyoaktif tabakadan enzim kaçışının olmadığını olsa bile gerek immobilizasyon materyallerinin girişim etkileri, gerekse de genelde kullanılan enzim miktarının tayin sınırlarının altında olması nedeniyle yıkama sularında protein tayinine gerek duyulmadı.

Optimizasyon çalışmaları sonrası, geliştirilen biyosensörlerin karakterizasyonu amacıyla; substrat spesifikliği, tekrarlanabilirlik, termal kararlılık, operasyonel kararlılık, depo kararlılığı ve girişim etkilerinin belirlenmesini kapsayan çalışmalar yapıldı.

Gerek optimizasyon ve gerekse karakterizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar geliştirilen tüm biyosensörlerle spesifik, pratik ve tekrarlanabilir düzeyde sonuçlar verecek şekilde etanol tayini yapılabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte tüm bu optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar ışığında

geliştirilen biyosensörler birbirleri ile kıyaslandığında, uygulamaya yönelik olarak en avantajlı biyosensörün jelatin tabanlı alkol oksidaz temelli biyosensör olduğu sonucuna varıldı.

Uygulamaya yönelik çalışmalarda jelatin tabanlı alkol oksidaz biyosensörü ve enzimatik-spektrofotometrik yöntemle alkollü bira örneklerinde etanol tayinleri yapılarak iki yöntem ile elde edilen sonuçlar birbiri ile kıyaslandı. Her iki yöntemle aynı örnekler için standart katma metodu kullanılarak da tayinler gerçekleştirildi ve bu çalışmanın sonuçları da birbiri ile kıyaslandı. Elde edilen bulgular ışığında her iki yöntemle oldukça spesifik ve duyarlı sonuçlar alınmakla birlikte alkol oksidaz temelli biyosensör ile elde edilen sonuçların enzimatik-spektrofotometrik yöntemle elde edilen sonuçlara nazaran daha yüksek bir geri kazanım oranına sahip olduğu belirlendi.

Vücuda alınan etanolün yaklaşık % 2,0'lik bir kısmı peroksizomlarda bulunan katalaz enzimi tarafından dönüşüme uğratılıyor olması etanol tayinine yönelik katalaz biyosensörü geliştirilmesinin temel düşüncesini oluşturdu. Bu düşünce doğrultusunda geliştirilen katalaz temelli biyosensörlerle de oldukça duyarlı, tekrarlanabilir sonuçlar alındı.

Alkol tayinine yönelik katalaz temelli biyosensöre ulaşılabilen literatür verilerinde henüz rastlanılmamış olması geliştirilen bu biyosensörü düşünce bazında da oldukça ilginç ve orijinal kılmaktadır.

Alkol oksidaz ve katalaz temelli biyosensörlerin yanısıra liyofilize *C.tropicalis* maya hücrelerinin kullanıldığı alkol tayinine yönelik bir mikrobiyal biyosensörde geliştirilerek ülkemizde henüz çok fazla çalışma alanı bulmamış olan mikrobiyal biyosensörler konusunda bir alt yapı oluşumuna katkıda bulunulması da gerçekleştirilmiş oldu.

*C.tropicalis* temelli biyosensör ile yapılan ölçümler sonrası elde edilen sonuçlar, alkol tayinine yönelik olarak geliştirilmiş mikrobiyal biyosensörler verileriyle kıyaslandığında, geliştirilen mikrobiyal biyosensörün oldukça duyarlı ve amaca yönelik olduğu belirlenmiştir.

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

**Akyılmaz, E.**, 1996, Preparation of ascorbate oxidase enzyme electrode and its usage for L-ascorbic acid determination, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

**Akyılmaz, E., and Dinçkaya, E.**, 2000, A mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate based alcohol oxidase electrode for alcohol determination in serum, *Talanta*, 53: 505-509.

**Amit, Z., Aragon, C.M.G., and Smith, B.R.**, 1986, Alcohol metabolizing enzymes as possible markers mediating voluntary consumption, *Canadian Journal of Public Health*, 1: 15-20.

**Aragon, C.M.G., Stotland, L.M., and Amit, Z.**, 1991, Studies on ethanol brain catalase interaction: evidence for control ethanol oxidation, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 15: 165-169.

**Ashin, V., and Trotsenko, Y.**, 2000, Alcohol oxidase of the methylotrophic yeasts: new findings, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10: 295-303.

**Ashin, V.V., and Trotsenko, Y.A.**, 1998, Formation and distribution of modified FAD between isozymes of alcohol oxidase in the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*, *Biochemistry(Moscow)*, 63: 1407-1413.

**Ashmarin, I.P., Danilova, R.A., Obakhova, M.F., Moskvitina, T.A., and Prosorovsky, V.N.**, 2000, Main ethanol metabolizing alcohol dehydrogenases (ADH I and ADH IV): biochemical functions and the physiological manifestation, *FEBS Letters*, 486: 49-51.

**Becerra, M., Baroli, B., Fadda, A.M., Mendez, J.B., and Siso, M.I.G.**, 2001, Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluveromyces lactis* cells, *Enzyme and Microbial Technology*, 29: 506-512.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

**Bigi, A., Borghi, M., Lojazzi, G., Fichera, A.M., Panzavolta, S., and Roveri, N.,** 2000, Structural and mechanical properties of crosslinked drawn gelatin films, *Journal of Thermal Analysis*, 61: 451-459.

**Blandin, G., Kalegeropoulos, O.O., Wincker, P., Artiguenave, F., and Dujon, B.,** 2000, Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 16. *Candida tropicalis*, *FEBS Letters*, 487: 91-94.

**Boujtita, M., Chapleau, M., and El Murr, N.,** 1996, Biosensors for analysis of ethanol in food: effect of the pasting liquid, *Analytica Chimica Acta*, 319: 91-96.

**Boujtita, M., and El Murr, N.,** 1995, Biosensors for analysis of ethanol in foods, *Journal of Food Science*, 60: 201-204.

**Boujtita, M., Hart, J.P., and Pittson, R.,** 2000, Development of a disposable ethanol biosensor based on a chemically modified screen-printed electrode coated with alcohol oxidase for the analysis of beer, *Biosensors and Bioelectronics*, 15: 257-263.

**Buemann, B., and Astrup, A.,** 2001, How does the body deal with energy from alcohol, *Nutrition*, 17: 638-641.

**Bystrykh, L.V., Dijkhuizen, L., and Harder, W.,** 1991, Modification of flavin adenine dinucleotide in alcohol oxidase of the yeast *Hansenula polymorpha*, *Journal of Genetic Microbiology*, 137: 2381-2386.

**Cai, C.X., Xue, K.H., Zhou, Y.M., and Yang, H.,** 1997, Amperometric biosensor for ethanol based on immobilization of alcohol dehydrogenase on a nickel hexacyanoferrate modified microband gold electrode, *Talanta*, 44: 339-347.

**Campanella, L., Favero, G., Sammartino, M.P., and Tomassetti, M.,** 1999, Enzymatic immobilization in kappa-carrageenan gel suitable for organic phase enzyme electrode (OPEE) assembly, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7: 101-113.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

**Cao, N.J., Krishnan, M.S., Du, J.X., Gong, C.S., Ho, N.W.Y., Chen, Z.D., and Tsao, G.T.,** 1996, Ethanol production from corn cobs pretreated by the ammonia steeping process using genetically engineered yeast, *Biotechnology Letters*, 18: 1013-1018.

**Castanon, M.J.L., Ordieres, A.J.M., and Blanco, P.T.,** 1997, Amperometric detection of ethanol with poly-(o-phenylenediamine)-modified enzyme electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, 12: 511-520.

**Cho, K.M., and Yoo, Y.J.,** 1999, Novel ssf process for ethanol production from microcrystalline cellulose using the delta-integrated recombinant yeast, *Saccharomyces cerevisiae* L-2612-Delta GC, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9: 340-345.

**Colby, T.D., Bahnson, B.J., Chin, J.K, Klinman, J.P, and Goldstein, B.M.,** 1998, Active site modifications in a double mutant of liver alcohol dehydrogenase: structural studies of two enzyme-ligand complexes, *Biochemistry*, 37: 9295-9304.

**Correa, C.L., and Pedroso, R.C.,** 1997, Headspace gas chromatography, with capillary column for urine alcohol determination, *Journal of Chromatography B.*, 704: 365-368.

**Cosnier, S.,** 1999, Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review, *Biosensors and Bioelectronics*, 14: 443-456.

**Cosnier, S., Novoa, A., Mousty, C., and Marks, R.S.,** 2002, Biotinylated alginate immobilization matrix in the construction of an amperometric biosensor: application for the determination of glucose, *Analytica Chimica Acta*, 453: 71-79.

**Curtis, W.R., Wang, P., and Humphrey, A.,** 1995, Role of calcium and differentiation in enhanced sesquiterpene elicitation from calcium alginate-immobilized plant tissue, *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 554-557.



**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

**Davis, G.C., Karey, L.H., and Kissinger, P.T.,** 1979, *Journal of Liquid Chromatography*, 2: 663-665.

**Dickinson, F.M., and Wadforth, C.,** 1992, Purification and some properties of alcohol oxidase from alkane-grown *Candida tropicalis*, *Biochemical Journal*, 282: 325-331.

**Dinçkaya, E.,** 1991, Okzalot oksidaz elektrodu hazırlanması ve fizyolojik sıvılarda okzalot tayininde kullanılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

**Dinçkaya, E., and Telefoncu, A.,** 1993, Enzyme electrode based on oxalate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of oxalate, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 30: 282-284.

**Dinçkaya, E.,**1999, Enzim Sensörleri, Biyosensörler (Yaz Okulu), editor: A.Telefoncu, s 91.

**D'Souza, S.F.,** 2001, Microbial biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 16: 337-353.

**Esposito, E., Cortesi, R., and Nastrazzi, C.,** 1995, Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties, *Biomaterials*, 20: 2009-2020.

**Eventoff, W.,** 1976, Crystalline bovine liver catalase, *Journal of Molecular Biology*, 103: 799-801.

**Freeman, A., and Lilly, M.D.,** 1998, Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells, *Enzyme and Microbial Technology*, 23: 335-345.

**Gaisford, W.C., Richardson, N.J., Haggett, B.G.D., and Rawson, D.M.,** 1991, *Biosensors*, 19: 15-18.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

**Gardin, H., and Pauss, A.,** 2001,  $\kappa$ -carrageenan/gelatin gel beads for the co-immobilization of aerobic and anaerobic microbial communities degrading 2,4,6-trichlorophenol under air-limited conditions, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 517-523.

**Geissler, J., Ghisla, S., and Kroneck, P.M.H.,** 1986, Flavin-dependent alcohol oxidase from yeast, *European Journal of Biochemistry*, 160: 93-100.

**Gonchar, M.V., Maidan, M.M., Moroz, O.M., Woodward, J.R., and Sibirny, A.A.,** 1998, Microbial O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – electrode sensors for alcohol assays based on the use of permeabilized mutant yeast cells as the sensitive bioelements, *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 945-952.

**Guilbault, G.G., and Kauffmann, J.M.,** 1987, Enzyme-based electrodes as analytical tools, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 9: 95-113.

**Guilbault, G.G., Danielsson, B., Mandenlus, C.F., and Mosbach, K.,** 1983, Enzyme electrode and thermistor probes for determination of alcohols with alcohol oxidase, *Analytical Chemistry*, 55: 1582-1585.

**Hbermuller, K., Mosbach, M, and Schuhmann, W.,** 2000, Electron transfer mechanism in amperometric biosensors, *Foresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366: 560-568.

**Hamby-Mason, R., Chen, J.J., Schenker,S., Perez, A., and Henderson, G.I.,** 1997, Catalase mediates acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21. 1063-1072.

**Han, T.S., Kim, Y.C., Sasaki, S., Yano, K., Ikebukuro, K., Kitayama, A., Nagamune, T., and Karube, I.,** 2001, Microbial sensor for trichloroethylene determination, *Analytica Chimica Acta*, 431: 225-230.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

**Heim, S., Schneider, I., Binz, D., Vogel, A., and Bilitewski, U.,** 1999, Development of an automated microbial sensor system, *Biosensors and Bioelectronics*, 14: 187-193.

**Hemachender, C., Bose, N., and Puvanakrishnan, R.,** 2001, Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production, *Process Biochemistry*, 36: 629-633.

**Herzberg, R.G., and Rogerson, M.,** 1985, Use of alcohol oxidase to measure the methanol produced of during the hydrolysis of D- and L-methyl-3-hydroxybutiric acid, *Analytical Biochemistry*, 149: 354-357.

**Hikuma, M., Kubo, T., and Yasuda, T.,** 1979, Microbial electrode sensor for alcohols, *Biotechnology and Bioengineering*, 21: 1845-1853.

**Hjerde, T., Smidsrod, O., and Christensen, B.E.,** 1999, Analysis of conformational properties of  $\kappa$ - and  $\iota$ -carrageenan by size exclusion chromatography combined with low angle laser light scattering, *Biopolymers*, 49: 71-80.

**Johansson, K., Petterson, G.J., Gorton, L., Marko-Varga, G., and Csoregi, E.,** 1993, A reagentless amperometric biosensor for alcohol detection in column liquid chromatography based on co-immobilized peroxidase and alcohol oxidase in carbon paste, *Journal of Biotechnology*, 31: 301-316.

**Jung, G., and Ferard, G.,** 1978, Enzyme coupled measurement of ethanol in whole blood and plasma with a centrifugal analyzer, *Clinical Chemistry*, 24: 873-876.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

**Kanai, T., Hara, A., Kanayama, N., Ueda, M., and Tanaka, A.,** 2000, An n-alkane responsive promoter element found in gene encoding the peroxisomal protein of *C.Tropicalis* does not contain a C<sub>6</sub> zinc cluster DNA-binding motif, *Journal of Bacteriology*, 182: 2492-2497.

**Kartlik, J., Svorc, J., Stred'ansky, M., and Miertus, S.,** 1998, Composite alcohol biosensors based on solid binding matrix, *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 181-191.

**Karube, I., Suzuki, S., Okada, T., and Hikuma, M.,** 1980, Microbial sensors for volatile compounds, *Biochimie*, 62: 567-573.

**Kato, N., Omori, Y., Tani, Y., and Ogata, K.,** 1976, Alcohol oxidases of *Kloeckera sp.* and *Hansenula polymorpha*, *European Journal of Biochemistry*, 64: 341-350.

**Katzung, B.G.,** 1998, Basic principles-Introduction, in Basic and clinical pharmacology, Appleton Lange, 5.

**Kitagawa, Y., Ameyama, M., Nakashima, K., Tamiya, E., and Karube, I.,** 1987, Amperometric alcohol sensor based on immobilized bacteria cell membrane, *Analyst*, 112: 1747-1749.

**Kitagawa, Y., Tamiya, E., and Karube, I.,** 1987, Microbial FET-alcohol sensor, *Analytical Letters*, 20(1): 81-96.

**Klatsky, A.B.,** 1995, Blood pressure and alcohol intake, in Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management (Laragh, J.H., and Brenner, B.M., eds.) Raven Press, New-York, 2649.

**Ko, T.P, Day, J., Malkin, A., and McPherson, A.,** 1999, Structure of orthorhombic crystals of beer liver catalase, *Acta Crystallography D Biological Crystallography*, 55: 1383-1394.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

**Korpan, I., Gonchar, M.V., Soldatkin, A.P., Starodub, N.F., Sandrovski, A.K., Sibirny, A.A., and El'skaia, A.V.,** 1992, Cellular microbiosensors for methanol and ethanol determination on the basis of pH-sensitive field transistors, *Ukrainski Biokhimicheskii Zhurnal*, 64: 96-100.

**Kovar, J., Schneider, J., Skursky, L., and Dubsy, H.,** 1984, A new photometric assay for blood alcohol, *Analytical Biochemistry*, 137(1): 74-79.

**Lands, W.E.M.,** 1995, Alcohol and energy intake, *American Journal of Clinical Nutrition*, 62: 1101-1106.

**Latif, F., and Rajoka, M.I.,** 2001, Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts, *Bioresour Technology*, 77: 57-63.

**Lee, W.C, and Huang, C.T.,** 1995, Enhancement of ethanol production from sucrose by *Zymomonas mobilis* by the addition of immobilized invertase, *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 79-84.

**Liden, H., Vijayakumar, A.R., Gorton, L., and Marko-Varga, G.,** 1998, Rapid alcohol determination in plasma and urine by column liquid chromatography with biosensor detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17 (6-7): 1111-1128.

**Lieber, C.S.,** 1994, Metabolic consequences of ethanol, *The Endocrinologist*, 4(2): 127-139.

**Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.,** 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.

**Lubrano, G.J., Faridnia, M.H., Palleschi, G., and Guilbault, G.G.,** 1991, Amperometric alcohol electrode with extended linearity and reduced interferences, *Analytical Biochemistry*, 198: 97-103.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

**Luong, J.H.T., Bouvrette, P., and Male, K.B.,** 1997, Developments and applications of biosensors in food analysis, *Trends in Biotechnology*, 15: 369-376.

**Macchia, T., Mancinelli, R., Gentili, S., Lugaresi, E.C., Raponi, A., and Taggi, A.,** 1995, Ethanol in biological fluids: headspace GC measurement, *Journal of Analytical Toxicology*, 19: 241-246.

**Marko-Varga, G., Johansson, K., and Gorton, L.,** 1994, Enzyme-based biosensor as a selective detection unit in column liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 660: 153-167.

**Marko-Varga, G., Somogyi, J., Posta, J., and Boris, L.,** 1993, Effect of different columns and internal standards on the quality assurance of the gas chromatographic determination of blood ethanol, *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 31(11): 373-376.

**Maskevich, A.A., Artsukevich, I.M., and Stepuro, V.I.,** 1997, Fluorescent properties of the alcohol oxidase prosthetic group and their relationship to the functional state of proteins, *Journal of Molecular Structure*, 408/409: 261-264.

**Matsumoto, K., and Waki, K.,** 1999, Simultaneous biosensing of ethanol and glucose with combined use of a rotating bioreactor and a stationary column reactor, *Analytica Chimica Acta*, 380: 1-6.

**Michel, A.S., Mestagh, M.M., and Axelos, M.A.V.,** 1997, Physicochemical properties of carrageenan gels in presence of various counterions, *International Journal of Biological Macromolecules*, 21: 195-200.

**Miertus, S., Kartlik, J., Pizzarelli, A., Stred'ansky, M., Svitel, J., and Svorc, J.,** 1998, Amperometric biosensors based on solid binding matrices applied in food quality monitoring, *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 911-923.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

- Mizgunova, U.M., Zolotova, G.A., and Dolmanova, I.F.,** 1996, Enzymatic method for the determination of ethanol and methanol with spectrophotometric detection of the rate of the process, *Analyst*, 121: 431-433.
- Morales, A., Lespedes, F., Fabregas, E.M., and Alegret, S.,** 1998, Ethanol amperometric biosensor based on an alcohol oxidase-graphite-polymer biocomposite, *Electrochimica Acta*, 43:3575-3579.
- Moran, L.A., and Scrimgeour, K.G. (Eds.),** 1994, Biochemistry (2nd edition) Prentice Hall, Inc. USA.
- Morris, D., and Lorenz, D.,** 1995, How much energy does it take to make a gallon of ethanol?, Review, Minneapolis, Institute for local self reliance, USA.
- Mulchandani, A., and Rogers, K.R.,** 1998, Enzyme and microbial biosensors: Techniques and protocols, Humana Press, Totowa, NJ.
- Mullor, S.G., Cabezudo, M.S., Ordieres, A.J.M., and Ruiz, B.L.,** 1996, Alcohol biosensor based on alcohol dehydrogenase and meldonium immobilized into a carbon paste electrode, *Talanta*, 43: 779-784.
- Park, J.K., Yee, H.J., Lee, W.Y., Shin, M.C., Kim, T.H., and Kim, S.R.,** 1999, Determination of breath alcohol using a differential type amperometric biosensor based on alcohol dehydrogenase, *Analytica Chimica Acta*, 390: 83-91.
- Patel, N.G., Maier, S., Cammann, K., and Chemnitz, G.C.,** 2001, Screen-printed biosensors using different alcohol oxidases, *Sensors and Actuators B*, 75: 101-110.
- Pellegrino, S., Bruno, F.S., and Petrarulo, M.,** 1999, Liquid chromatographic determination of ethyl alcohol in body fluids, *Journal of Chromatography B*, 729: 103-110.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

**Picker, K.M.**, 1999, Matrix tablets of carrageenans I: A compaction study, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25: 339-346.

**Prencipe, L., Iaccheri, E., Manzati, C.**, 1987, Enzymic ethanol assay: a new colorimetric method based on measurement of hydrogen peroxide, *Clinical Chemistry*, 33: 486-489.

**Ramakrishan, S., and Prud'homme, R.K.**, 2000, Behavior of  $\kappa$ -carrageenan in glycerol and sorbitol solutions, *Carbohydrate Polymers*, 43: 327-332.

**Rangel, A.O.S.S., and Toth, I.V.**, 2000, Enzymatic determination of ethanol and glycerol by flow injection parallel multi-site detection, *Analytica Chimica Acta*, 416: 205-210.

**Reinus, J.F., Heymsfield, S.B., Wiskind, R., Casper, R., and Galambos, J.T.**, 1989, Ethanol. Relative fuel value and metabolic effects in vivo, *Metabolism*, 38: 125-135.

**Reshelitov, A.N., Lobanov, A.V., Morozova, N.O., Gordon, S.H., Greene, R.V., and Leathers, T.D.**, 1998, Detection of ethanol in a two component glucose/ethanol mixture using a nonselective microbial sensor and a glucose enzyme electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 787-793.

**Reshelitov, A.N., Trotsenko, J.A., Morozova, N.O., Iliasov, P.V., and Ashin, V.V.**, 2001, Characteristics of *Gluonobacter oxydans* B-1280 and *Pichia methanolica* MN4 cell based biosensors for detection of ethanol, *Process Biochemistry*, 36: 1015-1020.

**Riedel, K., Renneberg, R., Wollenberger, U., Kaiser, G., and Scheller, F.W.**, 1989, Microbial sensors: fundamentals and application for process control, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 44: 85-106.



**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

**Rodriguez, R., Chinae, G., Lopez, N., Pons, T., and Vriend, G.,** 1998, Homology modeling, model and software evaluation: three related resources, *CABIOS*, 14: 523-528.

**Rose, P.J., Mark, H.F., Bikales, N.M., Overberger, C.G., Menges, G., and Kroschwitz, J.I.,** 1987, Encyclopedia of polymer science and engineering, 2nd.ed., vol.7, Wiley Interscience, New-York.s 89.

**Rüger, P., Bilitewski, U., and Schmid, R.D.,** 1991, Glucose and ethanol biosensors based on thick- film technology, *Sensors and Actuators B*, 4: 267-271.

**Scardi, V.,** 1987, Immobilization of enzymes and microbial cells in gelatin, *Methods in Enzymology*, 135: 293-294.

**Scouten, H.W., Luong, J.H.T., and Brown, R.S.,** 1995, Enzyme or protein immobilization techniques for application in biosensor design, *Trends in Biotechnology*, 13: 178-185.

**Sigma Product No. A0438, A2404 and A6941,** Enzymatic assay of alcohol oxidase (EC 1.1.3.13), Technical Service, Sigma, Deisenhofen-Germany.

**Smyth, A.B., Talasila, P.C., and Cameron, A.C.,** 1999, An ethanol biosensor can detect low oxygen injury in modified atmosphere packages of fresh-cut produce, *Postharvest Biology and Technology*, 15: 127-134.

**Suter, P.M., Je'quier, E., and Schutz, Y.,** 1994, Effect of ethanol on energy expenditure, *American Journal of Physiology*, 266: 1204-1212.

**Svitel, J., Curilla, O., and Tkac, Z.,** 1998, Microbial cell-based biosensor for sensing glucose, sucrose or lactose, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 27: 153-158.

**KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)**

**Tagliaro, F., Lubli, G., Ghielmi, S., Franchi, D., and Marigo, M.,** 1992, Chromatographic methods for blood alcohol determination, *Journal of Chromatography*, 580: 161-190.

**Tagliaro, F., Schiavon, G., Dorizzi, R., and Marigo, M.,** 1991, Development of post-column enzymic reactors with immobilized alcohol oxidase for use in the high performance liquid chromatographic assay of alcohols with electrochemical detection, *Journal of Chromatography*, 563: 11-21.

**Tangerman, A.,** 1997, Highly sensitive gas chromatographic analysis of ethanol in whole blood, serum, urine, and fecal supernatants by the direct injection method, *Clinical Chemistry*, 43: 1003-1009.

**Telefoncu, A.,** 1995, *Biyoteknoloji*, Ege Üni.Yayınları, İzmir-Türkiye.

**Urbana-Marquez, A., Estruch, R., Fernandez-Sola, J., Nicolas, J.M., Pare, J.C., and Rubin, E.,** 1995, The greater risk of alcoholic cardiomyopathy and myopathy in women compared with men, *Journal of American Medical Association*, 274(2): 149-154.

**Vijayakumar, A.R., Csöregi, E., Heller, A., and Gorton, L.,** 1996, Alcohol biosensors based on coupled oxidase-peroxidase systems, *Analytica Chimica Acta*, 327: 223-234.

**Waterham, H.R., Russell, K.A., De Vries, Y., and Cregg, J.M.,** 1997, Peroxisomal targeting, import, and assembly of alcohol oxidase in *Pichia pastoris*, *Journal of Cell Biology*, 139: 1419-1431.

**ÖZGEÇMİŞ**

**Adı,Soyadı** : **Erol AKYILMAZ**

**Doğum Tarihi** : **11.02.1971**

**Doğum Yeri** : **Dörtyol/HATAY**

**Medeni Hali** : **Evli**

**Çocuk Sayısı** : **1**

**Uyruğu** : **T.C**

**İş Adresi** : **Ege Üniversitesi Fen Fakültesi  
Biyokimya Bölümü  
(35100) Bornova/İZMİR**

**Ev Adresi** : **126 Sokak, No.14/3 D:6  
Bornova/İZMİR**

**E-mail** : **[akyilmaz@sci.ege.edu.tr](mailto:akyilmaz@sci.ege.edu.tr)**

**Telefon** : **0.232.3884000/1774 (iş)  
0.232.3752502 (ev)**

**Yabancı Dil** : **İngilizce**

**Eđitim Durumu :**

<b>Okul</b>	<b>Derece</b>	<b>Yıl</b>
Ege Üniversitesi	B.Sc (Kimya/Biyokimya)	1989-1993
Ege Üniversitesi	Yabancı Dil Eğitimi	1993-1994
Ege Üniversitesi	M.Sc (Kimya/Biyokimya)	1994-1996
Ege Üniversitesi	Ph.D (Biyokimya)	1996-

**Yaptığı Görevler :**

<b>Görev</b>	<b>Görev Yeri</b>	<b>Yıl</b>
Araş.Gör.	Ege Üni.Fen Fak.Biyokimya Bölümü	1995-2001
Uzman	Ege Üni.Fen Fak.Biyokimya Bölümü	2001-

**BİLİMSEL MAKALELER****Science Citation Index'te (SCI) Yer Alan Dergilerde Yayımlanan Makaleler**

1998, Erhan Dinçkaya, Erol Akyılmaz, Sinan Akgöl, Seçil Önal, Figen Zihnioglu, Azmi Telefoncu, - "A Novel Catechol Oxidase Enzyme Electrode for the Specific Determination of Catechol", Biosci. Biotech.and Biochem,1998, 62(11),2098-2100

1999, Erhan Dinçkaya,Erol Akyılmaz,Sinan Akgöl,Azmi Telefoncu, - "Eggplant Tissue Homogenate Based Bioselective Membrane Electrode for Determination of Catechol"., Indian.J.Biochem.Biophys 1999, 36, 36-38.

1999, Erol Akyılmaz, Erhan Dinçkaya - "A New Enzyme Electrode Based on Ascorbate Oxidase Immobilized in Gelatin for Specific Determination of L-Ascorbic Acid" Talanta,1999, 50(1), 87-93.

2000, Nil Ertaş, Suna Timur, Erol Akyılmaz, Erhan Dinçkaya, - "Specific Determination of Hydrogen Peroxide with a Catalase Biosensor Based on Mercury Thin Film Electrode" Turk.J.Chem., 2000, 24(1), 95-99.

2000, Erhan Dinçkaya, Erol Akyılmaz, Sinan Akgöl, - " Urate Oxidase Enzyme Electrode Based on Dissolved Oxygen Probe for Urine Uric Acid Determination", Indian.J.Biochem.Biophys.,2000, 37, 67-70.

2000, Erol Akyılmaz, Erhan Dinçkaya - "A mushroom (Agaricus bisporus) tissue homogenate based alcohol oxidase electrode for alcohol determination in serum" Talanta, 2000, 53(3), 505-509.

### **Ulusal Dergilerde Yayınlanan Makaleler**

1996, Erol Akyılmaz, Erhan Dinçkaya, - "A New Titrimetric Method For the Activity Determination of Partially Purified Ascorbate Oxidase From Cucumber (Cucumis sativus L.)", Hacettepe Bulletin of Natural Sciences and Engineering, 1996, Volume 25, Seri C, S: 135-145.

1996, Erhan Dinçkaya, Erol Akyılmaz, Sinan Akgöl, Azmi Telefoncu, - "A New Spectrophotometric Method Utilizing the Couple of Alcohol Oxidase-Peroxidase for the Determination of Alcohol in Serum", Hacettepe Bulletin of Natural Sciences and Engineering, 1996, Volume 25, Seri C, S: 163-176.

### **BİLİMSEL TEBLİĞLER**

#### **Uluslararası Sempozyumlarda Sunulanlar**

Dinçkaya, Erhan ; Akyılmaz,Erol ; Akgöl, Sinan; The Characterization of Urate Oxidase Electrode and Its Usage for Determination of Uric Acid Level in Urine.The First International Biosciences Days, April 20-24,1999;

Dinçkaya ,Erhan and Akyılmaz, Erol, Determination of Ethanol by using Mushroom(Agaricus bisporus) Tissue Based Biosensor. The First International Biosciences Day, ,April 20-24,1999,Antalya;

Akyılmaz Erol;Ertaş,Nil;Timur,Suna;Dinçkaya,Erhan;A Novel Ascorbate Oxidase Biosensor Based on Mercury Thin Film Electrode For l-Ascorbic Acid Determination;BIOMED 2000,The 7 th International Symposium on Biomedical Science and Technology,September 25-27, - 2000 Ankara-TURKEY

### Ulusal Sempozyumlarda Sunulanlar

Önal Tatar,Seçil; Zihniöglu,Figen; Akgöl,Sinan; Dinçkaya,Erhan; Akyılmaz,Erol and Telefoncu,Azmi.; “Purification and Characterization of Catechol Oxidase From Eggplant (*Solanum melongena*)”.XIII. National Biochemistry Congrees,26-30 March 1996,Antalya

Dinçkaya,Erhan;Akyılmaz,Erol;Akgöl,Sinan and Telefoncu, Azmi, “A New Spectrophotometric Method Utilizing the Couple of Alcohol Oxidase-Peroxidase for the Determination of Alcohol in Serum”.XIII.National Biochemistry Congrees,26-30 March 1996,Antalya;

Akyılmaz,Erol ve Dinçkaya,Erhan, “Preparation of Ascorbate Oxidase Electrode for L-Ascorbic Acid Determination and Its Optimization and Characterization” ,BIOMED 3,3th National Biomedical Science and Technology Symposium,11-14 December 1996,Bursa;

Dinçkaya,Erhan ;Akyılmaz,Erol,Akgöl,Sinan,Önal Tatar,Seçil; Zihniöglu,Figen ve Telefoncu,Azmi, “Kateşol Oksidaz Enzim Elektrodu Hazırlanması ve Kateşol Tayininde Kullanılması”, BIOMED 3,3th National Biomedical Science and Technology Symposium,11-14 December 1996,Bursa,

Akyılmaz,Erol ve Dinçkaya,Erhan; “Determination of Vitamin C in Vitamin Tablets and Fruit Juices by Using Ascorbate Oxidase Enzym Electrode”;Chemistry'98, 12. National Chemistry Congrees, 7-11 September 1998,Edirne;

Dinçkaya,Erhan, Akyılmaz,Erol ve Akgöl,Sinan; “Development of Urate Oxidase Enzym Electrode and Optimization Its Working Condition” ,BIYOMED 5, 5th National Biomedical Science and Technology Symposium., 16-18 December 1998,Ankara,

Ertaş, Nil, Timur, Suna, Akyılmaz, Erol ve Dinçkaya, Erhan; “Civa Film Elektrodu Esaslı Katalaz Biyosensörü Geliştirilmesi ve Hidrojen Peroksidin Voltametrik Tayininde Kullanılması”, 1st Electrochemical Days, 31 January-3 February 1999, Bolu;

1999, Yıldız, Hatice, Dinçkaya, Erhan ve Akyılmaz, Erol, “Selüloz Asetat Küreciklerde İmmobilize Katalaz Preparatlarının Çalışma Koşullarının Optimizasyonu ve Karakterizasyon Verilerinin Değerlendirilmesi”, Kimya'99, XIII. Ulusal Kimya Kongresi, 31 Ağustos - 4 Eylül - 1999-Samsun

1999, Görenek, Gülseren, Dinçkaya, Erhan ve Akyılmaz, Erol, “Aljinat-Jelatin Küreciklerde İmmobilize Katalaz Preparatlarının Çalışma Koşullarının Optimizasyonu ve Karakterizasyon Verilerinin Değerlendirilmesi”, Kimya'99, XIII. Ulusal Kimya Kongresi, 31 Ağustos - 4 Eylül 1999-Samsun

2001, Akyılmaz, Erol, Sezgintürk, M. Kemal, Dinçkaya, Erhan, “Development of A New Biosensor Based on Urate Oxidase-Peroxidase Coupled Enzyme System, 5-8 Eylül, ODTÜ-Ankara(sözlü)

2001, Önal, Seçil, Timur, Suna, Akyılmaz, Erol, Telefoncu, Azmi, “Lipoksigenaz Temelli Spektrofotometrik Yöntem ile Esansiyel Yağ Asitlerinin Tayini”, XV. Ulusal Kimya Kongresi, 4-7 Eylül, Boğaziçi Üni.-İSTANBUL

2001, Timur, Suna, Önal, Seçil, Akyılmaz, Erol, Telefoncu, Azmi, “Esansiyel Yağ Asitlerinin Tayinine Yönelik Lipoksigenaz Temelli Biyosensör Geliştirilmesi”, II. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, 31 Ekim-4 Kasım, Kuşadası-AYDIN



## **Projeler**

Biyosensör Teknolojisinin Gıda Katkı Maddelerinin Tayini Amacıyla Geliştirilmesi, TÜBİTAK, TBAG-2019 (101 T031)-2001

Ürat Oksidaz-Peroksidaz Çiftli Enzim Sistemine Dayalı Biyosensör Geliştirilmesi ve Fizyolojik Sıvılarda Ürik Asit Tayininde Kullanılması, E.U. Research Fund- 2000 Fen 011

Alkol Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi, E.Ü. Araştırma Fonu- 99 Fen 012

Preparation of Urate Oxidase Electrode and Its Usage for Uric Acid Determination in Urine, TÜBİTAK, TBAG-1459, 1998

Aşırı Doymamış Yağ Asitlerinin Tayini için Biyosensör Geliştirilmesi E.U Research Fund- 97 Fen 008

Askorbat Oksidaz Elektrodu Hazırlanması ve L-Askorbik Asit Tayininde Kullanılması, E.Ü. Araştırma Fonu, 95 Fen 06

## **Yaz Okulları**

Membran Proteinleri Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, 14-20 Mayıs 1995, Çeşme-İZMİR

Enzimoloji Lisansüstü Yaz Okulu, 21-27 Eylül 1997, Kuşadası-AYDIN

Biyosensörler Lisansüstü Yaz Okulu, 20-26 Haziran 1999, Kuşadası-AYDIN

Biyokimyada Temel ve Modern Teknikler Lisansüstü Yaz Okulu, 27 Ağustos-3 Eylül 2000, Kuşadası-AYDIN.

### **Kurslar**

Gaz Kromatografisi Teori ve Uygulamaları, EBİLTEM, 24-26 Nisan 2000.