

Geliştirilecek Yüksek Hassasiyetteki Elektrokimyasal Sensör Sistemi ile  
Toksin Madde Analizi

Hande Anıl

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Polimer Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Mart 2021

Development of High Precision Electrochemical Sensor Systems for Toxin Analysis

Hande Anıl

**MASTER OF SCIENCE THESIS**

Department of Polymer Science and Technology

March 2021

Geliştirilecek Yüksek Hassasiyetteki Elektrokimyasal Sensör Sistemi ile  
Toksin Madde Analizi

Hande Anıl

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Polimer Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Hüseyin Avcı

Mart 2021

## ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Hüseyin Avcı danışmanlığında hazırlamış olduğum “Geliştirilecek Yüksek Hassasiyetteki Elektrokimyasal Sensör Sistemi ile Toksin Madde Analizi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 12/03/2021

Hande Anıl

İmza

## ÖZET

Toksin maddeler, gıda güvenliğini tehdit eden ve canlı organizmaların ölümüne neden olabilen biyolojik tehlike unsurları arasındadır. Geleneksel yöntemlerin dışında, gıda toksinlerini analiz etmek için biyosensörler son yıllarda geniş kullanım alanı bulmuştur. Bu sensörlerin yapılarına enzimler, hücreler, dokular, antikorlar, DNA vb. biyolojik materyallerin eklenmesiyle isimlendirilmiştir.

Bu çalışmada deniz ürünlerinde önemli bir toksin madde niteliğinde olan domoik asitin hızlı ve güvenilir olarak tespit edilmesi için tek kullanımlık perde baskılı elektrotlar (SPE) kullanılmıştır. SPE'ler, tek seferde çok sayıda üretilebilen, ön işlem ya da eğitilmiş kullanıcıya ihtiyaç duyulmayan, kullanımı kolay ve gerçek zamanlı algılama için uygun özellikteki ucuz malzemelerdir.

Bu çalışmada, altın SPE'ler (SPGE) potasyum ferrisiyanür redoks probu ile inkübe edilmiş ve örneklerin elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) analizi karakterize edilerek değerlendirilmiştir. SPGE'lere biyofonksiyonel özellikler kazandırmak için, dört farklı derişimde domoik asit (DA) solüsyonu inkübe edilerek empedans ölçümleri alınmıştır. Empedans ölçümleri sonrasında elde edilen Nyquist grafikleri değerlendirilmiştir. Ayrıca SPGE'lerin yüzey özellikleri atomik kuvvet mikroskobu (AFM), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve SEM cihazına entegre enerji yayımlı X ışını (EDX) analiziyle incelenmiş ve sonraki çalışmalarda yüzeyde oluşacak diğer ara katmanların EIS ölçümlerinde karşılaşılabilecek olası sorunlar tartışılmıştır.

Sonuç olarak, elde edilen biyosensörlerin düşük hata paylarıyla çalışacağı ve toksin analizinin sonuçlarının gelecekteki çalışmalar için önemli olması beklenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Toksin, Domoik asit, perde baskılı elektrot, elektrokimyasal empedans spektroskopisi, biyosensör, gıda.

## SUMMARY

Toxins are among the biological hazard elements that threaten the safety of food and can cause the death of living organisms. Apart from traditional methods, biosensors to analyze food toxins have found wide use in recent years. These sensors include enzymes, cells, tissues, antibodies, DNA, etc. which are named by the addition of the biological agents.

In this study, disposable screen-printed electrodes (SPE) were used to detect domoic acid, which is an important toxic substance in seafood, in a quick and reliable manner. SPEs are inexpensive materials that can be produced in large numbers at once, do not require pre-treatment or trained users, are easy to use and are suitable for real-time detection.

In this study, gold based SPEs (SPGE) were incubated with potassium ferricyanide redox probe and electrochemical impedance spectroscopy analysis (EIS) of the samples were characterized and evaluated. Impedance measurements were taken by incubating domoic acid (DA) solutions at four different concentrations in order to gain biofunctional properties to SPGEs. Nyquist plots were obtained after impedance measurements, then the results were evaluated. In addition, the surface properties of SPGEs were examined by atomic force microscope (AFM), scanning electron microscope (SEM) and energy dispersive X ray (EDX) analysis which is integrated to the SEM device, and in subsequent studies, possible problems that may be encountered in EIS measurements of other intermediate layers that will form on the surface were discussed.

Consequently, it is expected that our develop biosensor can be operated with low margins of error and the results of the toxin analysis will be important for the future studies in the field.

**Keywords:** Toxin, Domoic acid, screen-printed electrode, electrochemical impedance spectroscopy, biosensor, food.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	vi
<b>SUMMARY</b> .....	vii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	viii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xvi
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xvii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI</b> .....	2
2.1. Toksin Maddeler .....	2
2.1.1. Tanımı ve önemi .....	2
2.2. Gıda Güvenliğinin Önemi .....	3
2.2.1. Tanımı .....	3
2.2.2. Gıda güvenliğini tehdit eden başlıca unsurlar .....	4
2.2.2.1. <u>Fiziksel etkenler</u> .....	4
2.2.2.2. <u>Kimyasal etkenler</u> .....	4
2.2.2.3. <u>Biyolojik etkenler</u> .....	4
2.2.3. Gıda toksin maddeleri .....	5
2.2.3.1. <u>Doğal besin toksinleri</u> .....	5
2.2.3.2. <u>Mikrobiyal toksinler</u> .....	5
2.2.3.3. <u>Kimyasal kirleticiler</u> .....	6
2.3. Gıda toksin maddeleri analiz yöntemleri .....	6
2.3.1. Geleneksel gıda analiz yöntemleri .....	6
2.3.1.1. <u>Kütle spektroskopisi</u> .....	6
2.3.1.2. <u>Yüksek performanslı sıvı kromatografisi</u> .....	9
2.3.1.3. <u>Enzime bağlı immunosorbent testi</u> .....	10
2.3.1.4. <u>Gaz kromatografisi</u> .....	12
2.3.2. Elektrokimyasal esaslı biyosensörler .....	13

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.2.1. <u>Tanımı</u> .....	13
2.3.2.2. <u>Sınıflandırılması</u> .....	15
2.3.2.3. <u>Uygulama alanları</u> .....	16
2.3.2.4. <u>Perde baskılı elektrotlar</u> .....	18
2.4. Deniz Ürünlerinde Toksin Madde Analizi .....	19
2.4.1. Deniz ürünlerinde bulunan toksin maddeler .....	19
2.4.2. Domoik asit yapısı ve etki mekanizması .....	20
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>21</b>
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler .....	21
3.1.1. Sitrik asit çözeltisi .....	21
3.1.2. Potasyum ferri siyanür .....	21
3.1.3. Merkaptoundekanoik asit .....	22
3.1.4. Etanol .....	22
3.1.5. Etilen diklorür çözeltisi .....	23
3.1.6. N-Hidroksisüksinimid çözeltisi .....	23
3.1.7. Domoik asit çözeltisi .....	24
3.1.8. Kendiliğinden birleşen katman çözeltisi .....	25
3.1.9. Streptavidin çözeltisi .....	25
3.1.10. Monoklonal anti domoik asit çözeltisi .....	26
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	26
3.2.1. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi .....	26
3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu ve Çalışma Prensipleri .....	33
3.4. Atomik Kuvvet Mikroskobu .....	33
3.5. Sensör Yüzeylerinin Biyofonksiyonelleştirilmesi .....	34
3.6. Rejenerasyon ve Elektrotların Yüzey Modifikasyonu .....	37
3.6.1. Perde baskılı elektrotun rejenerasyonu .....	37
3.6.2. Perde baskılı elektrotun yüzey modifikasyonu .....	38
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA</b> .....	<b>39</b>



**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<b><u>Sayfa</u></b>
4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu Analiz Sonuçları .....	39
4.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analiz Sonuçları .....	40
4.3. Enerji Yayılımlı X Işını Analiz Sonuçları .....	41
4.4. Sensör Yüzeylerinin Biyofonksiyonelleştirilmesi .....	55
4.5. Rejenerasyon Ve Elektrotlerin Yüzey Modifikasyonu .....	58
4.5.1. Perde baskılı altın elektrotu rejenerasyonu .....	58
4.5.2. Perde baskılı altın elektrotu yüzey modifikasyonu .....	59
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>61</b>
<b>6. KAYNAKLAR DİZİNİ</b>	

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Bir kütle spektrometresinin şematik görünümü .....	7
2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nin şematik görünümü .....	9
2.3. Sandviç ELISA yöntemi şematik görünümü .....	11
2.4. Gaz Kromatografisi Şematik Görünümü .....	12
2.5. Bir biyosensörün şematik görünümü .....	13
2.6. Bir biyosensörün genel çalışma prensibi .....	14
2.7. Bir perde baskılı elektrot örneği .....	18
2.8. Domoik asidin yapısal formülü .....	20
3.1. Sitrik asit kimyasal yapısı .....	21
3.2. Potasyum Ferri Siyanür kimyasal yapısı .....	22
3.3. Merkaptoundekanoik asit kimyasal yapısı .....	22
3.4. Etanol kimyasal yapısı .....	22
3.5. Etilen diklorür kimyasal yapısı .....	23
3.6. N-Hidroksisüksinimid kimyasal yapısı .....	23
3.7. Domoik asit kimyasal yapısı .....	24
3.8. AC gerilimde Ohm kanunları .....	27
3.9. AC devrede saf direncin direnç gerilimi ve akım ile olan ilişkisi .....	27
3.10. Empedans ve reaktansın şematik anlatımı .....	28
3.11. Eşdeğer devre elemanları için kullanılan empedans denklemleri .....	29
3.12. Empedans diyagramı .....	30
3.13. Gamry Reference 3000 model Potansiyostat-Galvanostat .....	31
3.14. $K_3Fe(CN)_6$ 'ün 50 mV/s tarama hızıyla CV ölçümü .....	32
3.15. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu .....	33
3.16. Atomik kuvvet mikroskobu şematik görünümü .....	34
4.1. SPGE (a) işlem görmemiş karşıt elektrotu, (b) biyofonksiyonelleştirilmiş karşıt elektrotu, (c) işlem görmemiş referans elektrotu, (d) biyofonksiyonelleştirilmiş referans elektrotunu, (e) işlem görmemiş çalışma elektrotu ve (f) biyofonksiyonelleştirilmiş çalışma elektrotunun SEM görüntüleri .....	39

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.2. Perde baskılı altın çalışma elektrotu (a) işlem görmemiş, (b) biyofonksiyonelleştirilmiş, (c) rejenerasyon sonrası, (d) yeniden biyofonksiyonelleştirilmiş .....	40
4.3. İşlem görmemiş Perde baskılı altın elektrot çalışma elektrotu Enerji yayımlı X ışını görüntüsü .....	41
4.4. İşlem görmemiş Perde baskılı altın çalışma elektrotu Enerji yayımlı X ışını bileşen yüzdeleri .....	42
4.5. İşlem görmemiş Perde baskılı altın karşıt elektrot Enerji yayımlı X ışını analiz bölgeleri görüntüsü .....	43
4.6. İşlem görmemiş Perde baskılı altın karşıt elektrot 1.bölge Enerji yayımlı X ışını bileşen yüzdeleri .....	43
4.7. İşlem görmemiş Perde baskılı altın karşıt elektrot 2.bölge Enerji yayımlı X ışını bileşen yüzdeleri .....	44
4.8. İşlem görmemiş Perde baskılı altın referans elektrot Enerji yayımlı X ışını analiz bölgeleri görüntüsü .....	44
4.9. İşlem görmemiş Perde baskılı altın referans elektrot 1.bölge Enerji yayımlı X ışını bileşen yüzdeleri .....	45
4.10. İşlem görmemiş Perde baskılı altın referans elektrot 2.bölge Enerji yayımlı X ışını bileşen yüzdeleri .....	45
4.11. Biyofonksiyonelleştirilmiş Perde baskılı altın çalışma elektrotu Enerji yayımlı X ışını görüntüsü .....	46
4.12. Biyofonksiyonelleştirilmiş Perde baskılı altın karşıt elektrotu Enerji yayımlı X ışını bileşen yüzdeleri .....	47
4.13. Biyofonksiyonelleştirilmiş Perde baskılı altın çalışma elektrotu Enerji yayımlı X ışını görüntüsü .....	47
4.14. Biyofonksiyonelleştirilmiş Perde baskılı altın çalışma elektrotu 1.bölge Enerji yayımlı X ışını bileşen yüzdeleri .....	48

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.15. Biyofonksiyonelleştirilmiş Perde baskılı altın çalışma elektrotu 2.bölge Enerji yayımlı X ışını bileşen yüzdeleri .....	48
4.16. Biyofonksiyonelleştirilmiş Perde baskılı altın referans elektrotu Enerji yayımlı X ışını görüntüsü .....	49
4.17. Biyofonksiyonelleştirilmiş Perde baskılı altın referans elektrotu 1.bölge Enerji yayımlı X ışını bileşen yüzdeleri .....	49
4.18. Rejenerasyon işlemi sonrası Perde baskılı altın çalışma elektrotu Enerji yayımlı X ışını görüntüsü .....	50
4.19. Rejenerasyon işlemi sonrası Perde baskılı altın çalışma elektrotu 1. bölge Enerji yayımlı X ışını bileşen yüzdeleri .....	50
4.20. Rejenerasyon işlemi sonrası Perde baskılı altın çalışma elektrotu 2.bölge Enerji yayımlı X ışını bileşen yüzdeleri .....	51
4.21. Rejenerasyon işlemi sonrası Perde baskılı altın karşıt elektrotu Enerji yayımlı X ışını görüntüsü .....	51
4.22. Rejenerasyon işlemi sonrası Perde baskılı altın karşıt elektrotu 1.bölge Enerji yayımlı X ışını bileşen yüzdeleri .....	52
4.23. Rejenerasyon işlemi sonrası Perde baskılı altın karşıt elektrotu 2.bölge Enerji yayımlı X ışını bileşen yüzdeleri .....	52
4.24. Rejenerasyon işlemi sonrası Perde baskılı altın referans elektrotu Enerji yayımlı X ışını görüntüsü .....	53
4.25. Rejenerasyon işlemi sonrası Perde baskılı altın referans elektrot 1. bölge Enerji yayımlı X ışını bileşen yüzdeleri .....	54
4.26. Rejenerasyon işlemi sonrası Perde baskılı altın referans elektrot 2. bölge Enerji yayımlı X ışını bileşen yüzdeleri ..	54
4.27. Perde baskılı altın elektrotun immobilizasyon prosesinin şematik gösterimi .....	55
4.28. Perde baskılı altın elektrotun Elektrokimyasal empedans spektroskopi yöntemi ile farklı Domaik asit konsantrasyonlarında 10 kHz – 0.1 Hz frekans aralığındaki Nyquist grafiği .....	56
4.29. $\Delta R_{ctDA} / \Delta R_{ctMab}$ kalibrasyon grafiği .....	57

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
4.30. Perde baskılı altın elektrotun rejenerasyon prosesi şematik gösterimi .....	58
4.31. Perde baskılı altın elektrotun 1.rejenerasyon (sol) ve 2. rejenerasyon (sağ) prosedürü sonrası görüntüleri .....	59
4.32. Perde baskılı altın elektrotun (a) İşlem görmemiş, (b) 30 s Au nanopartikül modifikasyonu, (c) 90 s Au nanopartikül modifikasyonu ve (d) 150 s Au nanopartikül modifikasyonu sonrası görüntüleri .....	59

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Biyoalgılama Materyalleri Temel Alınarak Yapılan Sınıflandırma .....	14
2.2. Tarım, gıda ve çevre konularında yer alan biyosensör uygulamaları .....	16
2.3. Kabuklu su ürünlerinin neden olduğu zehirlenmeler .....	19
4.1. İşlem görmemiş SPGE çalışma elektrotu EDX analizi .....	42
4.2. İşlem görmemiş SPGE karşıt elektrot 2.bölge EDX analizi .....	46
4.3. İşlem görmemiş SPGE referans elektrot 2.bölge EDX analizi .....	47
4.4. Kalibrasyon eğrisindeki Domoik asit derişim ve $\Delta R_{ctDA} / \Delta R_{ctMab}$ değerleri .....	57
4.5. Elde edilen tayin sınırı ve hassasiyet değerleri .....	57

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
m /z	Kütle/yük
cm/s	Santimetre/saniye
mV/s	Milivolt/saniye
V	Volt
$\Omega$	Ohm
$\omega$	Açısal Frekans
Z	Empedans
X	Reaktans
Hz	Hertz
kHz	Kilohertz
O <sub>2</sub>	Oksijen
Ig	İmünoglobulin
mAb	Monoklonal antikor
mg	Miligram
mL	Mililitre
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ g	Mikrogram
mM	Milimolar
ng	Nanogram
R	Direnç
Si	Silikon
Al	Alüminyum
K	Potasyum
Ag	Gümüş
C	Karbon
S	Kükürt
N	Azot

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
Fe	Demir
Cl	Klor



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AC	Alternatif Akım
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
ARfD	Akut Referans Doz
ASP	Amnesik Kabuklu Zehirlenmesi
AuE	Altın Elektrot
AuNPs	Altın Nano Partikülleri
Au-SCPE	Altın Perde Baskılı Karbon Elektrotlar
Cd-Elisa	Doğrudan Enzime Bağlı İmunosorbent Testi
Cdl	Çift Tabaka Kapasitansı
CE	Karşıt Elektrot
CE-EIA	Kılcal Elektroforez Tabanlı Enzim İmmünoassay
Ci-Elisa	Dolaylı Enzime Bağlı İmunosorbent Testi
CPE	Karbon Pastası Elektrotlar
CPE	Sabit Faz Elementi
CV	Döngüsel Voltametri
DA	Domoik Asit
DI	İyonları alınmış
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EC	Elektrokimyasal
EDC	Etilen diklorür
EDX	Enerji Yayılımlı X Işını
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu
EIS	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
ELISA	Enzime Bağlı İmunosorbent Testi
ESI	Elektrosprey İyonizasyonu
FAO	Gıda Tarım Örgütü

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
GC	Gaz Kromatografisi
GCE	Camsı Karbon Elektrotlar
GOD	Glukozoksidaz
HACCP	Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları
HCA	Heterosiklik Aminler
GOD	Glukozoksidaz
HACCP	Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları
HCA	Heterosiklik Aminler
HMDE	Asılı Cıva Damla Elektrotu
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC	Sıvı Kromatografisi
LOD	Tayin Sınırı
MALDI	Matris Destekli Lazer Desorpsiyonu-İyonizasyonu
MC	Kütle Kromatografisi
MUA	Merkaptoundekanoik Asit
NHS	N-Hidroksisüksinimid
PAH	Politik Karbonlar
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
RE	Referans Elektrot
SAM	Self Assembly Monolayer
SCPE	Perde Baskılı Karbon Elektrotlar
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SPGE	Perde Baskılı Altın Elektrotlar
TOF	Uçuş Zamanı
UV	Morötesi
YSI	Yellow Springs Instrument
W	Difüzyon

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)****Kısaltmalar**

WE

WHO

**Açıklama**

Çalışma Elektrotu

Dünya Sağlık Örgütü

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bu çalışmada deniz ürünlerinde önemli bir toksin madde niteliğinde olan domoik asitin hızlı ve güvenilir olarak tespit edilmesi için yüksek hassasiyetteki elektrokimyasal sensör sistemlerinin geliştirilmesi araştırılmıştır. Araştırma çalışmalarımızda toksin tayini için tek kullanımlık perde baskılı elektrotlar (SPE) kullanılmıştır. SPE'ler, tek seferde çok sayıda üretilen, ön işlem ya da eğitilmiş kullanıcıya ihtiyaç duyulmayan, kullanımı kolay ve gerçek zamanlı algılama için uygun özellikteki ucuz malzemelerdir.

Bu çalışmada altın SPE'ler (SPGE) potasyum ferri süyanür redoks probu ile inkübe edilmiş ve örneklerin elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) analizi ile karakterize edilerek değerlendirilmiştir. EIS'nin temel işlevinden biri elektrot / elektrolit üzerindeki çift katmanlı yapıların karakterizasyonudur. Bu yöntem, malzeme sentezi, korozyon, piller, yakıt hücreleri ve diğer birçok alanda elektrokimyasal reaksiyonların analizi için kullanılmaktadır. SPGE'lere biyofonksiyonel özellikler kazandırmak için, 0,01 ng / mL, 0,01 ng / mL, 1,00 ng / mL domoik asit (DA) solüsyonu inkübe edilerek empedans ölçümleri alınmıştır. Uygun eşdeğer elektrik devresi ile modellenen SPGE'nin modifiye edilmesinden sonra elde edilen Nyquist grafikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda toksin maddesinin anti-toksin-Mab'a bağlanması sonucu yük aktarım direncinde ( $R_{ct}$ ) artış gözlenmiştir.  $R_{ct}$  değerindeki bu artış, DA konsantrasyonu artışı ve Mab'ye bağlanması nedeniyle olmuştur. Ayrıca SPGE'lerin yüzey morfolojik özellikleri atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile incelenmiş ve sonraki çalışmalarda yüzeyde oluşacak diğer ara katmanların EIS ölçümlerinde karşılaşılabilecek olası sorunlar tartışılmıştır.

Çalışmamızın amacı bu biyosensörün düşük hata paylarıyla istenilen ölçümleri yapabilmesi ve toksin analizinin sonuçlarının gelecekteki çalışmalar için önemli olmasıdır.

## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

### 2.1. Toksin Maddeler

#### 2.1.1. Tanımı ve önemi

Toksin maddeler, canlı organizmaya dışarıdan solunum yoluyla, fiziksel temasla ya da beslenme yoluyla alındığında zararlı etki gösteren maddeler olarak tanımlanabilir (Ayaz ve Yurttagül, 2008). Bir maddenin canlılar için toksik etki yaratıp yaratmayacağını belirleyen en temel unsur, maddenin organizma içerisine alınan miktarı yani dozudur (Dolan vd., 2010).

Toksinler, endüstriyel ve tarımsal faaliyetlerde kullanılan kimyasal kirleticiler yoluyla canlı organizmaya etki ettiği gibi gıda tedarikinde doğal olarak da bulunabilir. Örneğin mitotoksinler, tahılların ve yer fıstığının mantar enfeksiyonuyla oluşan ve gıda işleme teknikleriyle uzaklaştırılmayan özel bir toksin çeşididir. Ayrıca tarım ürünleri ve böcek ilaçları gibi pek çok farklı toksin madde canlılar için tehlikeli olabilecek zararlı etkiler içerebilir (Ligler vd., 2003).

Gerek gıdalardan uzaklaştırılmayan gerekse işleme ve pişirme sırasında oluşan gıda toksinlerinin küçük miktarlarda tüketimi kaçınılmazdır. Bu durumda oluşacak olumsuz etkilerin düşük seviyede olması ülkelerin ilgili düzenleyici kurumlarının belirlediği eylem planları, toksik etki sınırları, kullanılan uyarı etiketleri gibi özel önlemler ile sağlanmıştır. Gıda üreticileri ve ilgili düzenleyici kurumların aldığı önlemlere bakılmaksızın toksik etki yaratabilecek maddelerin küçük miktarlarda tüketilmesi gerekmektedir. Gıda toksinlerinin tüketilmesinden kaynaklanan toksik etki riski düşük olmasına rağmen, aşırı tüketim, alerjik etki, bulaşma riski ve canlıya özgü fizyolojik tepkiler sebebiyle her zaman risk oluşmaktadır (Ligler vd., 2003).

Toksin maddeler, bu etkiler nedeniyle canlı organizmaya zarar vermeden tespit edilmeli ve gerekli önlemler alınarak zarar verme riski en az düzeye indirilmelidir.

## 2.2. Gıda Güvenliğinin Önemi

### 2.2.1. Tanımı

Gıda maddesi, insanlar tarafından çiğ, pişmiş ya da yarı pişmiş olarak yeme içme yoluyla tüketilen her türlü maddeyi kapsamaktadır. Bu kapsamda gıdalarda bulunan insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen fiziksel, kimyasal ya da radyoaktif maddeler gıda bulaşanları olarak nitelendirilmektedir. Gıda güvenliği ise gıdanın kendisini ya da hammaddesini üretimden son tüketime kadarki süreçte insan sağlığına zarar verecek fiziksel, biyolojik veya kimyasal etkilerden korumak için uygulanan kurallar bütünüdür (Boğa ve Binokay, 2010; Erkmen, 2010; Karabal, 2019).

İnsanlık gıda güvenliği ile evcilleştirdiği ilk hayvan türleriyle birlikte tanışmıştır. Bu tarihlerde et ürünlerini kurutarak, süt ürünlerinden peynir yaparak gıdaların güvenli şekilde saklanmasını sağlamaya çalışmışlardır. Tarihsel evrim süreçlerinin getirdiği bilgi birikimi kullanılarak hayvanlardan bulaşabilecek hastalıkların öğrenilmesi gıda güvenliğini sağlamada önemli bir dönüm noktası olmuştur. Bu dönemden sonra medeni toplumlar gıdaların elde edilmesi, saklanması ve güvenli olarak tüketilmesi için özel kurallar koymuşlardır. Bu kurallar bütünü günümüzde kullanılan gıda güvenliği standartlarının temelini oluşturmaktadır (Boğa ve Binokay, 2010; Karabal, 2019).

Gıda kaynaklı hastalıklar Gıda Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Gıda Güvenliği Uzman Komitesi tarafından dünyada en sık görülen sağlık sorunu olarak gösterilmektedir. Gıda maddelerindeki tehlikeli bileşenlerin, tanımlanması, ölçülmesi ve tehlike sınırlarının belirlenmesinde HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point, Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları) yöntemi önemli bir sistemdir. Bu sistem sayesinde gıda güvenliğini tehdit eden mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal tehlikeler belirlenerek önlenebilmektedir (Sezgin ve Özkaya, 2014; Esmer ve Melikoğlu, 2015).

## 2.2.2. Gıda güvenliğini tehdit eden başlıca unsurlar

### 2.2.2.1. Fiziksel etkenler

Gıdanın yapısını bozmayan ancak fiziksel olarak insanlara zarar verici nitelikte olan etkileri ifade etmektedir. Bu etkenlere cam kırıkları, metal/plastik/tahta parçalar, insan/hayvan kılı gibi örnek verilebilir (Sezgin ve Özkaya, 2014; Güler ve Can, 2017; Keener, 2001). Fiziksel tehlikelerden kaynaklı hastalık veya yaralanmaların çoğu ağız içi, yemek borusu, karın veya beslenme kanalının diğer ilgili organlarında oluşmaktadır ve bu durum nadiren yaşamı tehdit eder niteliktedir (Keener, 2001).

### 2.2.2.2. Kimyasal etkenler

Gıdaların doğal yapısından, muhafaza edildiği yerlerden ve üretim esnasındaki zararlı çevresel atıklardan bulaşan pestisitler, ilaç kalıntıları, ağır metaller (civa, kadmiyum gibi) ve ilgili mevzuatlarda belirtilen miktarın üzerinde kullanılan gıda katkı maddeleridir. Gıdaların işlenmesi aşamasında yağlayıcılar, solventler, hidrolik sıvılar, makine yağı ve benzeri bileşiklerin kullanımı kaçınılmazdır. Bu malzemelerin kullanımından kaynaklı kimyasal kirlenmenin etkileri yaygın olmasa bile gerçekleştiğinde sonuçları hemen ve şiddetli şekilde görülmektedir (Sezgin ve Özkaya, 2014; Güler ve Can, 2017; Keener, 2001).

### 2.2.2.3. Biyolojik etkenler

Biyolojik etkenler gıdaların üretiminden son tüketimine kadarki sürecin her aşamasında etkili olabilen ve gıdaların yapısında doğal olarak bulunan kimyasallar; gıdaların üretim ve saklama koşullarının uygunsuzluğu sebebiyle ortaya çıkan küf, mantar, parazit, virüs ve mikrobiyal toksinler; genetiği değiştirilmiş organizmaları kapsamaktadır (Sezgin ve Özkaya, 2014; Güler ve Can, 2017). Günümüzde gıdaların küresel boyutta taşınması, transferi ve depolanması aşamalarının herhangi birinde gıda kaynaklı patojenlerin saptanması gerekmektedir. Bu patojenler, epidemiyolojik, fizyolojik ve virüs oluşturma riski açısından farklılıklar göstermektedir (Schirone vd., 2017). E. coli, S. aureus, Cl. botulinum, Cl. perfringens, L. monocytogenes gibi bakteriler önemli biyolojik tehlikelere neden olabilecek patojenler arasında yer almaktadır (Güler ve Can, 2017).

### **2.2.3. Gıda toksin maddeleri**

#### **2.2.3.1 Doğal besin toksinleri**

Doğal besin toksinleri, bitkilerin ve hayvanların yapısında doğal olarak bulunan veya kimyasal bileşiklerden kaynaklanan ve toksik etki gösteren öğelerdir. Bu toksinlerin en önemlileri; baklagiller, badem, elma, şeftali vb. meyve çekirdekleri ve keten tohumunda bulunan siyajonik glikozitler; karalahana, şalgam ve hardal gibi bitkilerde bulunan guatrojenler; patatestede bulunan solanindir. Mantarlarda bulunan doğal toksin maddeleri ise oldukça zehirli etkiye sahiptir ve pişirme ya da saklama koşullarına bağlı olarak etkisini kaybetmemektedir (Ayaz ve Yurttagül, 2008; Özkaya, 2004).

#### **2.2.3.2. Mikrobiyal toksinler**

Mikotoksinler, bazı küflerin metabolizmaları sonucu oluşturdukları tehlikeli bir mikrobiyal toksin türüdür. Mikotoksinler, yetiştirme sürecinde, doğrudan hasat sırasında, işleme sırasında, işlemeyi izleyen evrede ya da depolama evresinde gıdalara bulaşabilir veya gıdalarda gelişebilirler. Bu toksinlerin en önemlisi aflotoksinlerdir. Aflotoksinler, mısır, yerfıstığı, ceviz, karbonhidrat içeriği yüksek olan diğer gıdalar ile bitki ve baharatların sık görülen kontaminantlarındandır. Gıdaları tarlada ekili oldukları zamandan başlayarak büyüme, hasat, nakliyat, kötü depolama koşulları, üretim sırasındaki koşullar ve hatta hazır gıda olarak kullanılan ürünün raf ömrü esnasında, kısacası ekimden tüketime kadar her aşamada kontamine edebilirler (Ayaz ve Yurttagül, 2008; Özkaya, 2004).

#### **2.2.3.2. Kimyasal kirleticiler**

Kurşun, kadmiyum, civa gibi ağır metaller, pestisit ve veteriner ilaç kalıntıları, ambalaj malzemelerinden gıdaya geçen kalıntılar, pişirme sırasında yağın pirolizisi ile oluşan pnolitik karbonlar (PAH) ve heterosiklik aminlerdir (HCA) (Ayaz ve Yurttagül, 2008; Özkaya, 2004).

Gıda katkı maddeleri, tek başına gıda olarak tüketilmeyen, gıda ham ya da yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, gıdaların raf ömrünün uzatılması, tat, koku, görünüş, yapı ve



diğer niteliklerinin korunması amacıyla kullanılan maddelerdir. Bu maddeler, yeterince denetim sağlanmadığı takdirde alerjik, kanser yapıcı, mutajenik ve teratojenik etkiler gösterebilmektedir (Boğa ve Binokay, 2010).

## **2.3. Gıda Toksin Maddeleri Analiz Yöntemleri**

### **2.3.1. Geleneksel gıda analiz yöntemleri**

Gıda güvenliğinin sağlanması için analitik yöntemlerin ve tekniklerin geliştirilmesi, özellikle tüketicilerin gıda tedarikinde içerik ve güvenlik konusundaki endişelerinin giderilmesi bakımından önemlidir.

Gıda sektöründe,

\*pestisit kalıntıları, mikotoksin, hormonlar, ağır metaller, antibiyotikler vb. analizler gıda güvenliği kapsamında;

\*antioksidanlar, tatlandırıcılar, boyar maddeler, termal özellikler vb. analizler aroma ve tekstür özellikleri kapsamında ;

\*aminoasitler, yağ asitleri, vitaminler, şekerler vb. analizler ise gıda katkıları kapsamında talep edilmektedir.

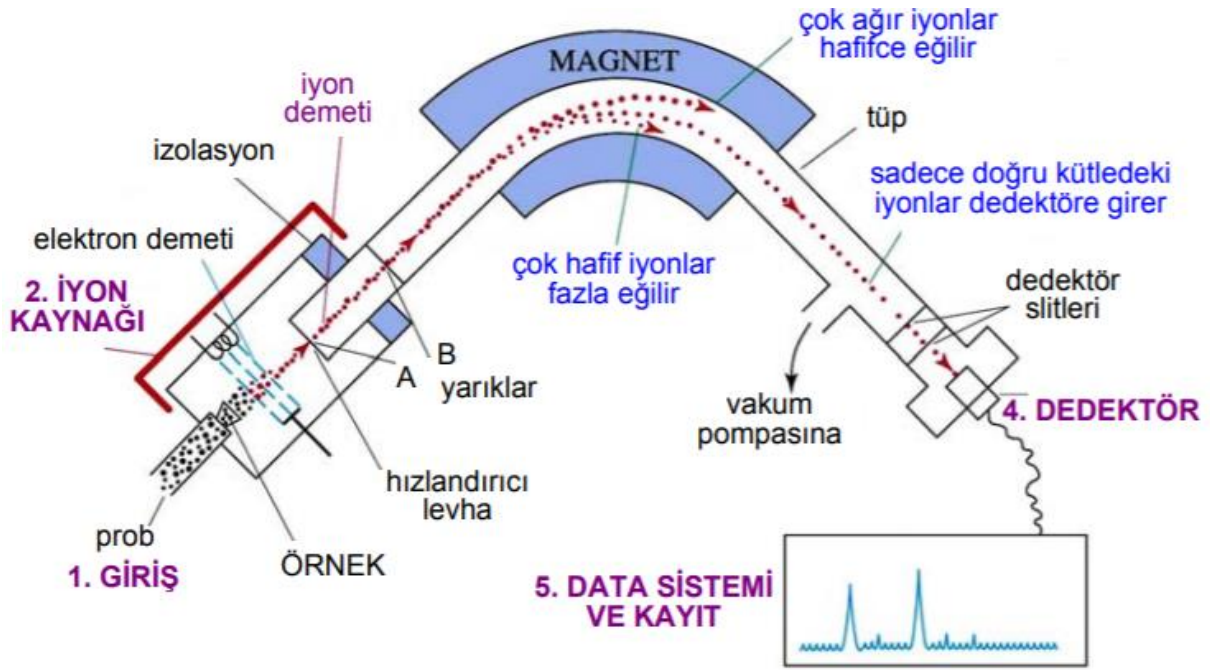
#### **2.3.1.1. Kütle spektroskopisi**

Kütle spektrometreleri, analiz örneğinin buharlaştırılarak manyetik veya elektriksel bir alanda kolaylıkla hareket eden iyonlara dönüştürülmesi ve kütle/yük ( $m/z$ ) değerlerine göre ayrılarak analiz edilmesi esasına göre çalışmaktadır (Biberoğlu, 2003; Anonim, 2020; Beşergil, 2016; Merey, 2015).

Kütle spektrometresi ile kompleks karışımların farklı kütlelerdeki iyon akımlarının karışım konsantrasyonuyla olan ilişkisinden yararlanılarak kantitatif olarak analizi yapılmaktadır (Beşergil, 2016). Karışım içerisinde herhangi bir yükle yüklenmemiş moleküller, kütle spektrometresi içerisinde iyonizasyon işlemi ile uyarılarak pozitif yüklü iyonlara dönüştürülürler. Bu iyonlar, büyük bir hızla kütle/yük değerlerine göre spektrometrenin analizör kısmına ulaşırlar. Bu değerlerin bağıl bolluklarına göre grafiğe geçirilmesiyle Kütle Spektrumu oluşturularak molekülün yapısı tayin edilir (Biberoğlu, 2003).

Kütle spektrometresi 5 kısımdan oluşur ve Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

1. Analiz edilecek bileşiğe ait örnek girişi
2. İyonlaştırma kaynağı ve Hızlandırıcı
3. Kütle Analiz Tüpü
4. İyon Toplayıcı ve Kuvvetlendirici
5. Dedektör



Şekil 2.1 Bir kütle spektrometresinin şematik görünümü (Beşergil’den, 2016).

Kütle spektrometresinde proteinlerin iyonizasyonu için kullanılan iki yöntem vardır.

- 1- Elektrosprey iyonizasyonu (ESI)
- 2- Matris destekli lazer desorpsiyonu / iyonizasyon (MALDI)

**ESI:** İlk defa 1984 yılında kullanılan ve proteinler, polipeptidler, oligonükleotitler gibi polar, iyonize ve yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklerin analizi için önerilen iyonizasyon tekniğidir. Bu teknik atmosfer basıncında ve oda sıcaklığında gerçekleşmektedir.

ESI özellikle buharlaştırılması ve iyonlaştırılması zor olan yüksek moleküler ağırlıklı bileşikler için faydalı bir iyonizasyon tekniğidir ve sıvı kromatografi/kütle spektrometrisi (LC/MS) ile

kullanılmaktadır (Anonim, 2020; Beşergil, 2016; Merey, 2015; Anonim, 2016; Anonim, 2018; Nunez vd., 2005).

**MALDI:** Numune, özel bir dalga boyundaki kısa lazerden gelen ışını sönümleyen tabaka içinde çözülür. Ardından iyonlaşarak kütle analizörlerinde bileşenlerine ayrılır. Bu yöntem “Time of Flight” kütle spektroskopisiyle (TOF) birleştirilerek kullanılabilir ancak sıvı kromatografisiyle kullanımı uygun değildir (Beşergil, 2016).

Proteinler öncelikle bu yöntemlerden biriyle iyonize edilir ve daha sonra bir kütle analizörüne girer. Başlıca 4 tip kütle analizörü bilinmektedir.

**Manyetik Sektör Analizörler:** Bu analizörler iyonlaştırma kaynağında oluşan farklı Kütle/yük oranına sahip iyonların aynı manyetik alana girdiklerinde hafif olanların ağır olanlara göre sapma açılarının daha büyük olması esasına dayanarak analiz gerçekleştirmektedir (Biberoğlu, 2003).

**“Quadrupole” Analizörler (Q):** Daha çok gaz kromatografisinde kullanılan güçlü bir detektördür. Kuadrupol analizörler dört paralel çubuktan oluşur. Bunlar özel bir radyo frekans alanı sağlamaktadır. Çubuklar arasında voltaj uygulandığında oluşan potansiyel farka dayalı özel bir titreşim gerçekleşir. Böylece sadece bazı kütle/yük oranındaki tanecikler analizörden geçebilirler (Biberoğlu, 2003).

**Uçuş Zamanlı Analizörler (Time of flight, TOF):** Bu analizörde iyonları hızlandırmak için elektrik alan kullanılır. Hızlandırılan iyonlar, bir metre boyundaki elektrik alanı bulunmayan bir tüp içerisine girerler. İyonların dedektörde toplanma süreleri (“Time-of-flight”) iyonik yükleri ile doğru; molekül ağırlıkları ile ters orantılıdır. Yani daha hafif iyonlar dedektöre daha hızlı ulaşır (Biberoğlu, 2003; Alıç, 2011).

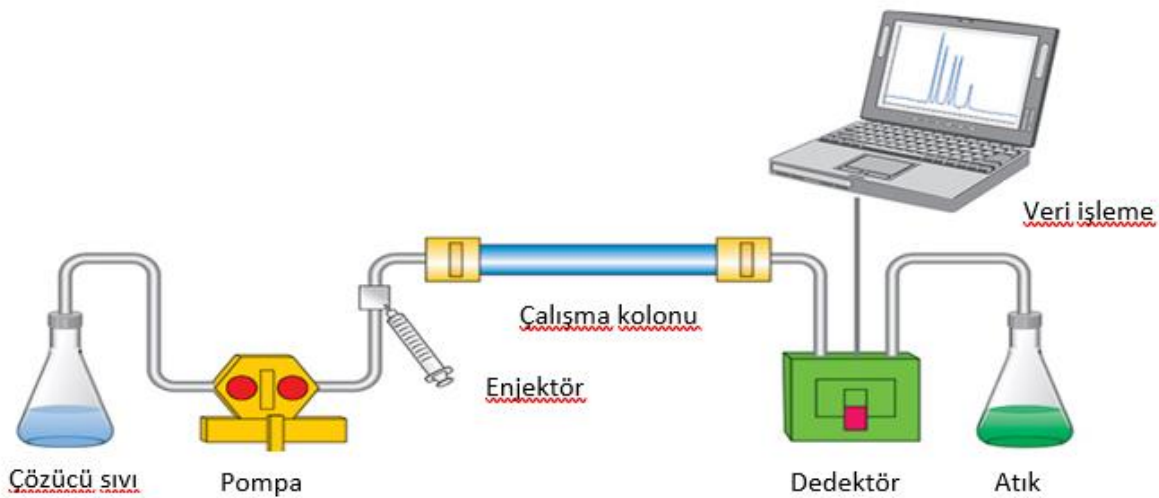
**İyon Kapanları (Ion traps):** Diğer kütle analizörlerine göre daha hassas olan bu yöntemde merkezde bir halka ve iki uçta yarım daire şeklinde olan üç adet elektrot bulunmaktadır. Merkez elktroda radyo frekans voltajı uygulanarak iyonlar yakalanır ve aynı anda analiz edilir (Biberoğlu, 2003).

Kütle analizöründen gelen iyonlar bir yarıktan geçerek, bir elektrot üzerinde toplanır. Burada üretilen akım büyük bir dirençten toprağa verilirken oluşan potansiyel düşmesi bir transistörde algılanır ve oluşan akım yükseltilecek kaydedilir.

### 2.3.1.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

Kromatografi, çok az miktardaki ve kimyasal yapıları birbirine yakın kimyasal madde veya karışımlarının fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre ayrılmasında kullanılan teknikleri içerir. Kromatografide genel olarak bir sabit (stasyoner) faz, bir de hareketli (mobil) faz vardır (Oruç, 2005).

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) bir sıvıda çözülmüş bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan sabit faz ile etkileşime girerek kolon içinde değişik hızlarla hareket ederler. Böylece farklı zamanlarda bileşenler kolonu terk ederek dedektörde miktarları tayin edilir (Anonim, 2020; Eser ve Dinçel, 2018). Şekil 2.2’de gösterilen Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi aşağıdaki gibi bir yapıya sahiptir.



Şekil 2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nin şematik görünümü (Anonim'den, 2018).

HPLC genel olarak sekiz bölümden oluşmaktadır. Bunlar; analiti taşıyan ve genellikle sulu tamponlardan hidrokarbonlara kadar farklı polaritedeki çözücülerden oluşan mobil faz şişeleri, bu şişelerden taşınan hareketli faz içerisindeki gazların ve hava kabarcıklarının giderilmesinde kullanılan degazör, analitin ve hareketli fazın sistem içerisinde sürekli akışını

sağlayan pompa, analitin kolon içerisine gönderilmeden hareketli faza el ile ya da otomatik olarak eklendiği enjektör, ayırma kolonunu sabit sıcaklıkta tutan kolon fırını, bileşenlerin ayrılmasını sağlayan sabit fazın olduğu kolon, kolondan çıkan bileşenlerin ayrımlarının görüldüğü dedektör ve ayırma işleminin kaydedildiği bir kaydedicidir (Eser ve Dinçel, 2018).

HPLC, ayırma gücü, duyarlılığı ve geri kazanımı yüksek hızlı bir yöntemdir. Bu yöntemde hareketli fazın basınç altında kolondan cm/s gibi yüksek bir hızla geçirilmesiyle ayırma hızı çok daha düşük olan ve hidrostatik basınçla çalışan açık sıvı kolon kromatografisine göre ayırma gücü çok daha yüksektir. Böylece ayırma işlemi birkaç saatte tamamlanabilmektedir (Anonim, 2018; Krasikov, 2003).

Domoik asidin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda geliştirilen HPLC prosedürüne göre öncelikle doku örneklerinin saflaştırılmamış sulu metanol ekstraktları bir siyano önkolon kartuşu ile kısmen saflaştırılmıştır. Ayırma, ters fazlı gradyan elüsyonlu bir C-18 sütununda yapılmış ve doğrulama için morötesi (UV) spektrumları alınmıştır. Analit geri kazanımları çeşitli dokular için %89'dan %100'e kadar elde edilmiştir. UV spektrumu ile onaylanan algılama sınırı 0,1 µg/g olarak belirlenmiştir. Bu yöntem ile el ile numune temizleme adımının kullanımını ortadan kaldırılmıştır. Ayrıca yöntemin diğer prosedürlerin aksine bazı deniz ürünü örneklerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunabilen NaCl'ye duyarlı olmadığı görülmüştür (Dhoot vd., 2013).

### **2.3.1.3. Enzime bağlı immunosorbent testi**

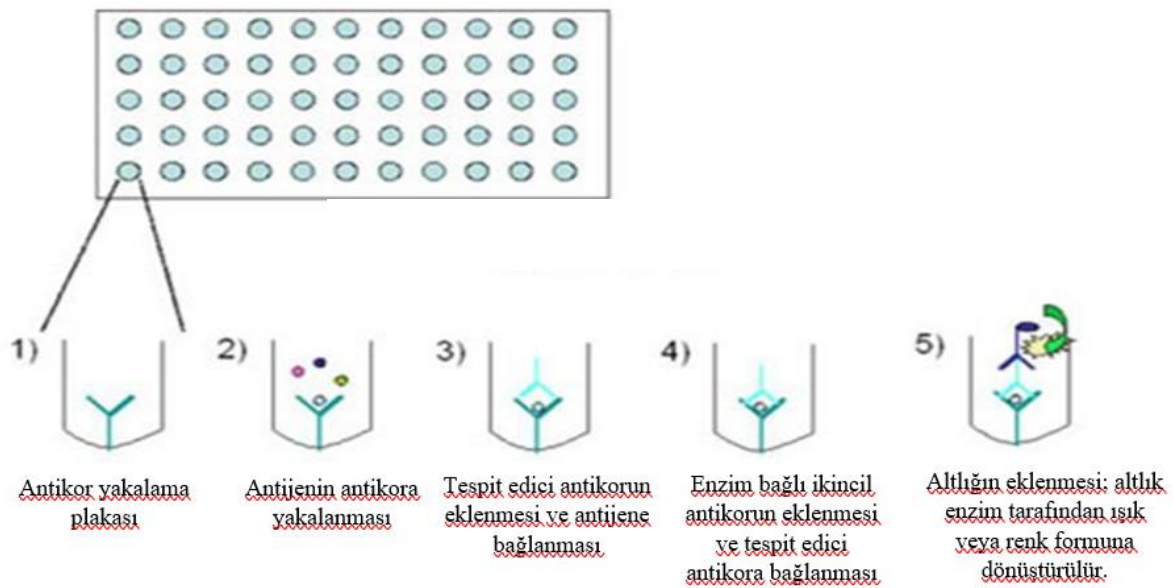
Enzime bağlı immunosorbent testi (ELISA), antikorlar, antijenler, proteinler ve glikoproteinlerin biyolojik örneklerini ölçmek için kullanılan yaygın bir immünolojik testtir. Bu testte, enzim ile işaretli antikorlar (konjugat) ve substrat kullanılarak, şüpheli materyalde bulunan etken madde ya da bunlara karşı oluşmuş antikor varlığı araştırılmaktadır (Asensio vd., 2008; Coşkun vd., 2016).

Gıda doğrulama için en çok dolaylı ve sandviç ELISA yöntemleri kullanılmaktadır. Dolaylı ELISA yönteminde, biri antijene özgü ve diğeri bir enzime bağlı iki antikor kullanılır. Bu ikinci antikor, teste "enzime bağlı" adını verir ve kromojenik veya florojenik bir substratın

bir sinyal üretmesine neden olur. Bazen bu ikinci antikor, birincil antikor biyotin etiketli ise, avidin veya streptavidin gibi bir proteine bağlanabilir. Sandviç ELISA yönteminde antijen yakalama ve tespit olmak üzere iki antikor arasına bağlanır. Saptama antikoru, bir enzime bağlanabilir veya biyokimyasal reaksiyonu üretecek konjugatı bağlayabilir (Asensio vd., 2008).

Antikor ile kaplanan “ELISA plate” yuvalarına antijen miktarı belirlenmek istenen numune yüklenir ve antijen-antikor bağlanması için beklenir. Ardından yıkama işlemi yapılarak bağlanmamış veya özgün olmayan proteinler uzaklaştırılması sağlanır. Enzim bağlı ikincil antikorlar da eklenerek antijen-antikor yapısına bağlanıp sandviç yapısını oluştururlar. Enzimle etkileşecek altlık eklenerek oluşan ışığa ile protein miktarı spektrofotometrik olarak ölçülür.

Sandviç ELISA yönteminin şematik görünümü Şekil 2.3’de verilmiştir .



Şekil 2.3. Sandviç ELISA yöntemi şematik görünümü (Anonim’den, 2018).

ELISA yöntemiyle değişik mikotoksin analizlerinin yapılabilmesi için antikor üretimi için daha etkili yöntemlerin geliştirilerek bu mikotoksinlere karşı özel antikor üretilmesi gerekmektedir (Oruç, 2005).

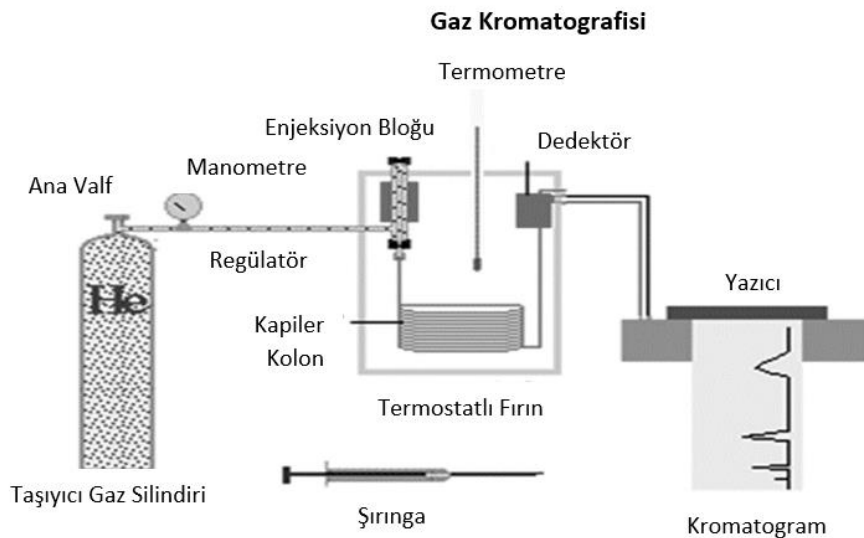
Kabuklu deniz ürünleri örneklerinde DA'yı 5 dakika içinde elektrokimyasal (EC) tespiti ile belirlemek için yeni bir kılcal elektroforez tabanlı enzim immünoassay (CE-EIA) tekniği oluşturulmuştur. Doğrusal aralık 0,1–50 ng/mL ve LOD 0,02 ng/mL olarak bulunmuştur.

Analitlerin geri kazanımı %89,6 – %105,8 dir. Tekniğin duyarlılığı, geleneksel ELISA'dan 16 kat daha fazladır ve DA'ya özgü bir monoklonal antikor (mAb) üretilmiştir. Antikor karakterizasyonu için ise doğrudan ELISA (cdELISA) ve dolaylı ELISA (ciELISA) oluşturulmuştur. Ayrıca, DA için hassas ve hızlı bir mAb bazlı koloidal altın (nanopartikül bazlı) immünostrip geliştirilmiştir. Benzer şekilde, ELISA kitleri, pseudo-nitzschia (LOD 6,8 ng/L) çözülmüş DA örneklerinin belirlenmesi için kullanılmıştır (Saaed vd., 2017).

#### 2.3.1.4. Gaz kromatografisi

Bu yöntemde sabit bir fazdan mobil faz olarak gaz akımı (He, Azot vb.) geçirilerek uçucu bileşikler adsorbsiyon ve dağılım farkına göre birbirlerinden ayrılır. Gaz kromatografide (GC) numune buharlaştırılarak kromatografik kolonun girişine enjekte edilir. Hareketli bir gaz fazı ile ayırma işlemi gerçekleştirilir. Burada kullanılan gazın tek görevi numuneyi kromatografik kolon boyunca taşımaktır. Diğer kromatografi yöntemlerinde olduğu gibi numune ile herhangi bir etkileşime girmez. Şekil 2.4'de şematik görünüm verilmiştir (Anonim, 2020).

GC sistemi; inert ve helyum, azot, hidrojen gazlarının kullanıldığı taşıyıcı gaz silindiri, sızdırma enjektörlerin kullanıldığı enjeksiyon ünitesi, uzunlukları genel olarak 2-50 m. arasında değişen ve dolgu maddesi özel bir sıvı ile kaplanmış olan açık tüplü ya da iç yüzeyi özel sıvı ile kaplanmış kolon, numune karışındaki bileşenleri algılayabilen duyarlılığı yüksek bir dedektör ve kaydedici kısımlarından oluşmaktadır.



Şekil 2.4. Gaz kromatografisi şematik görünümü (Gündüz, 2013).

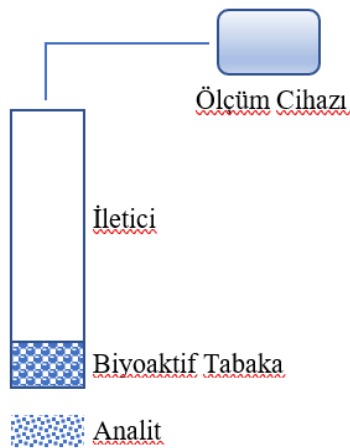
Gaz-Katı ve Gaz-Sıvı olmak üzere iki tip gaz kromatografisi vardır. Kullanımı daha yaygın olan Gaz-Sıvı kromatografide sabit faz sıvıdır. Mitotoksinlerin analizinde Gaz-Katı kromatografi daha sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bu yöntem diğer yöntemler kadar kullanışlı değildir (Oruç, 2005).

## 2.3.2. Elektrokimyasal esaslı biyosensörler

### 2.3.2.1. Tanımı

Biyoalgılama, genel olarak biyomoleküllerin elektrokimyasal sensörler yardımıyla yapılarının tanımlanmasıdır. Elektrokimyasal sensörler, kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve konsantrasyona bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlardır (Bhalla ve Zazubovich, 2011). Bu sensörlerin yapısına enzim, hücre, doku, antikor, DNA, vb. biyolojik maddelerin eklenmesiyle BİYONSENSÖR adını almışlardır (Oruç, 2005; Bhalla ve Zazubovich, 2011; Aykut ve Temiz, 2006; Mohammadipناه vd., 2020).

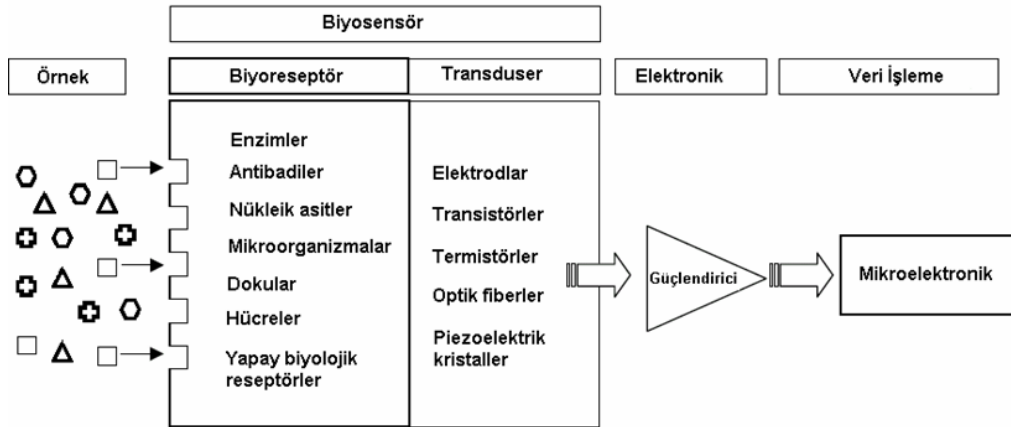
Biyosensör tanımlaması ilk olarak 50'li yılların ortalarında L.C.Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın oksijen ( $O_2$ ) miktarını bir elektrod ile izlemesiyle ortaya çıkmıştır. Ardından 1962 yılında Clark ve Lyons Glukozoksidaz (GOD) enzimini  $O_2$  elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçebilmişler ve biyosensör terimini ilk defa kullanmışlardır. Çalışan ilk biyosensör 1972 yılında Yellow Springs Instrument (YSI) olarak piyasada tanınmıştır ve Şekil 2.5'de şematik görünüm verilmiştir .



Şekil 2.5. Bir biyosensörün şematik görünümü (Uyar vd, 2020).



Biyosensörler, analiz edilecek maddeyle etkileşime girerek onun tanımlanmasını sağlayan biyoreseptör yapı ve tanımlama sonucu elde edilen verinin ölçülebilir sayısal bir değere dönüşmesi sağlayan elektrokimyasal yapı olmak üzere iki bölümden oluşur (Tüylek, 2017). Şekil 2.6’da genel çalışma prensibi gösterilmektedir .



Şekil 2.6. Bir biyosensörün genel çalışma prensibi (Aykut ve Temiz’den, 2006).

Biyoreseptör, analiz edilecek numunenin tanımlandığı ve tek bir partiküler substratı bağlayıp diğerleri ile etkileşime girmeyecek özellikte olan biyolojik hassasiyete sahip bölümdür (Bulut, 2011).

Transdüser, elektrokimyasal, optik, floresans, piezoelektrik, manyetik ve benzeri olabilir. Biyoreseptör, analitin tanınmasından sonra fiziksel ve kimyasal değişimi algılayarak transdüsera tespit edilebilir sinyal gönderir. Bu sinyal analite uygun transdüser tarafından ölçülerek dijital sinyallere dönüştürülür (Tüylek, 2017).

Nükleik asitlerden (DNA) oluşan tanıma yüzeyleri, bilinen elektrokimyasal biyosensörlere yeni özellikler eklemektedir. Bu amaçla kullanılan DNA modifiye edilmiş camsı karbon elektrotlar (GCE), karbon pastası elektrotlar (CPE), perde baskılı karbon (SCPE) ve altın perde baskılı elektrotlar (Au-SCPE), Altın elektrotlar (AuE) ve asılı civa damla elektrodu (HMDE) incelenen analitin çok küçük konsantrasyonlarının dahi güvenli ölçümlerinin yapılabilmesini sağlamaktadır (Li, 2006).

### 2.3.2.2. Sınıflandırılması

Biyosensörler, biyoalgılama materyalleri ve uygulanan dönüştürme araçları temel alınarak aşağıdaki Çizelge 2.1’de gösterildiği şekilde sınıflandırılabilir

Çizelge 2.1. Biyoalgılama Materyalleri Temel Alınarak Yapılan Sınıflandırma (Aykut ve Temiz’den, 2006).

Biyosensör Grubu	Kapsadığı Analiz Alanı
<b>Enzim Sensörleri</b>	Küçük moleküllü organik ve anorganik maddeler (Metabolitler, ilaçlar, gıda maddeleri, vitaminler, antibiyotikler, pestisitler vb.)
<b>Mikrobiyal Sensörler</b>	Enzim sensörlerinin kapsadığı alanlar + BOD, toksisite, mutajenite
<b>DNA sensörleri</b>	Virüsler, patojen mikroorganizmalar
<b>İmmüno sensörler</b>	Virüsler, patojen mikroorganizmalar, ksenobiyotikler

**Enzim Sensörleri:** Enzimler biyosensörlerde, kimyasal dönüşümlerin modelini belirleyen, enerjinin farklı şekillere dönüşmesine aracılık eden ve biyolojik sistemlere katalizör etkisi gösteren en yaygın kullanımdaki biyoalgılama materyalidir (Li, 2006). Enzim sensörleri genel olarak, biyomolekül olarak enzimlerin yer aldığı biyoaktif tabaka, transduser (iletici) ve ölçüm sisteminden oluşmaktadır (Tüylek, 2017).

Enzim sensörlerinde; enzimlerin van der Waals kuvvetleri, iyonik bağlama veya difüzyon bariyerleriyle adsorbsiyon veya fiziksel olarak tutulması ile fonksiyonel protein gruplarının ve destek materyallerinin arasında gerçekleşen reaksiyon yoluyla transdüsere kovalent bağlama yoluyla bağlanması şeklinde gerçekleşen iki önemli immobilizasyon metodu bulunmaktadır (Li, 2006).

**Mikrobiyal Sensörler:** Mikroorganizmaların kimyasal bileşik ve diğer canlıların tespit edicileri olarak kullanıldığı mikrobiyal biyosensörler, solunum temelli transdüsere ile bağlantılı sabitlenmiş canlı mikrobiyal hücreler ve hücrelerin metabolik fonksiyonlarını içermektedir. Bu

sensörler genelde gıda güvenliğinde patojenlerin ve toksinlerin çevresel izleme ve tespiti için geliştirilmişlerdir (Li, 2006).

**DNA Sensörleri:** Tek dizilimli nükleik asit molekülünün analit içerisindeki kendi tamamlayıcı eş molekülünü tanıyarak ona bağlanma (hibridize) özelliği esas alınarak oluşturulmaktadır. Bu sensörler, su, gıdalar, bitkiler veya hayvanlara ait patojenik bakteri veya virüslerin tespitinde kullanılabilirler (Li, 2006).

**İmmüno Sensörler:** Önemli bir protein sınıfını temsil eden ve genel olarak tüm memelilerin serum ve dokularında görülen glikoprotein grubu imünoglobülinler (Ig) olarak adlandırılan antikorlar, belirli antijenlere reaksiyon olarak üretilmekte ve toksinleri nötralize ederek, bakteri veya hücrelere yapışarak ve çözünebilir antijenleri çökeltmek hareketine geçerler. Immunoassay testleri, çözeltideki her iki tepkinin konsantrasyonunu ölçmek için antijen ve bir antikor arasındaki reaksiyonu temel alan bir tekniktir. Immunoassay testleri, serbest ve bağlı antijenlerin ayırımına ihtiyaç duymayan homojen bir sistem veya heterojen olabilir. İmmüno sensörlerin tasarımında kullanılan üç temel bağışıklık deney çeşidi vardır.

1. Doğrudan immunoassay testi: Antikorlar (veya antijenler) bir transdüser yüzeyinde sabitlenmişlerdir ve örnekteki analit, sabitlenmiş antikorlara bağlanır;
2. Sandviç immunoassay testi: Antikorlar transdüser yüzeyde sabitlenmişlerdir. Örnekteki analit, sabitlenmiş antikorlara bağlanır (temel veya yakalanmış antikorlar) ve sonra etiketlenmiş ikincil antikor (veya tespit antikorları) analite bağlanır.
3. Kompetitif immunoassay testi: Antikorlar transdüser yüzeyinde sabitlenmiştir ve örnekteki analit ve etiketli analit benzer şekilde sabit antikorları bağlarlar (Li, 2006).

### **2.3.2.3. Uygulama alanları**

Genel kullanım alanları incelendiğinde biyosensörler, tıbbi analizler başta olmak üzere çevresel analizlerde, tarımda ilaç analizlerinde ve savunma faaliyetlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Çizelge 2.2'de tarım, gıda ve çevre konularında yer alan biyosensör uygulamalarından örnekler verilmiştir.

Çizelge 2.2. Tarım, gıda ve çevre konularında yer alan biyosensör uygulamaları (Li'den, 2006).

Uygulama	Analitik Hedefler	Biyosensör Tipleri
Tarım		
İnsektisitler	Paraoxon, dichlorvos, aldicard, chlorpyrifos ethyl oxon, methamidophos, malaaxon, etofenprox vb.	Amperometrik immuno ve enzim sensörler Potensiyometrik immuno ve enzim sensörler Emilim immuno ve enzim sensörler Floresan immuno ve enzim sensörler
	Atrazine, cyanazine, propazine, smazine, prometon, terbutryn, vb.	Hücre esaslı elektrokimyasal ve optik sensörler LAPS immuno enzim ve sensörler Fiber optik immuno sensörler
Fungusitler	Dithiocarbamate, carbofuran, metalaxyl, triadimefon, vb.	QCM immuno sensörler
	Putrescine, cadaverine Hypoxanthine	Amperometrik enzim sensörler Amperometrik immuno sensörler, DNA-RNA sensörler
Gıda	L-lactate, D-lactate	Amperometrik hücre esaslı ve doku sensörler
	Glukoz, laktoz, sukroz, fruktoz	Potensiyometrik enzim sensörler
	Glutamat, aspartam	LAPS immuno sensörler
	Etanol, sülfid	Optik FIA biyosensör
	Listeria monocytogenes	Floresan immuno sensörler, PCR-DNA sensörler
	E.coli O157:H7	SPR immuno sensörler, DNA sensörler
	Salmonella typhimurium	Kemiluminesans immuno sensörler
	Staphylococcus aureus	QCM immuno sensörler, QCM-DNA sensörler, empedans immuno sensörler
	Diğer bakteri ve virüsler	Termal enzim sensörler
	Oksijen	Amperometrik immuno ve mikrop sensörler
Çevre	Paraoxon, atrazine, Dithiocarbamate, vb.	Potensiyometrik hücre esaslı sensörler Empedans immuno sensörler
	Alkilat sülfonat	Fiber optik immuno sensörler, Floresans sensörler
	Sefalosporinler, penisilinler, nystatin	Optik hücre esaslı sensörler LAPS immuno sensörler

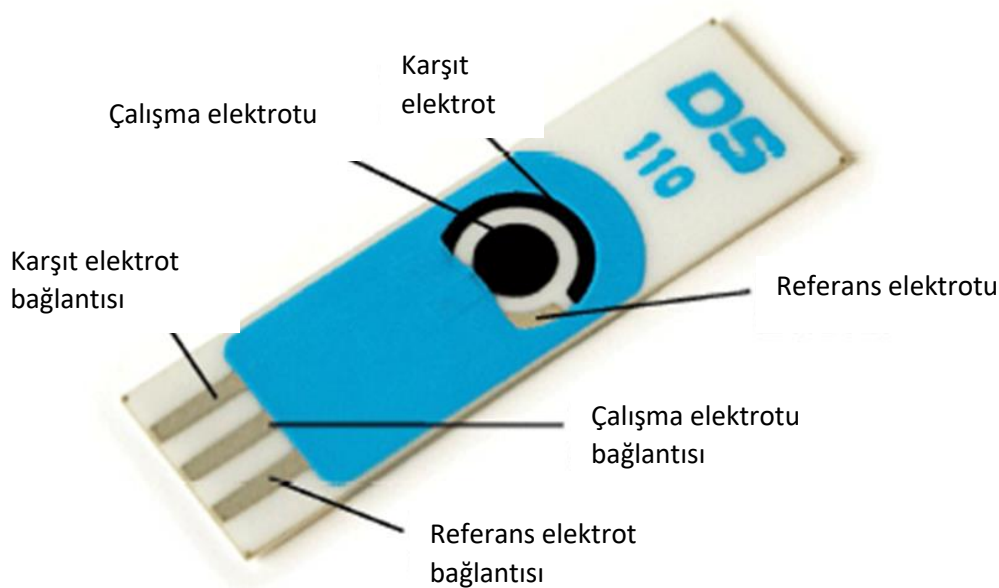
Tıptaki Uygulamalar: Üretimin büyük bir kısmının tıp alanında kullanıldığı görülmektedir. Bu alanda ilk sırayı, glikoz tayinine yönelik enzim esaslı biyosensörler oluşturmaktadır. Ayrıca üre ve kreatinin elektrotları, kolesterol elektrotları, asetilkolin elektrotları da tıpta kullanılan biyosensörlere örnektir. Bu sensörler sayesinde çok önemli hastalıkların teşhisi sağlanabilir (Kökbaş vd., 2003).

Gıda Alanındaki Uygulamalar: Biyosensörler gıdalarda kompozisyon belirlemede, işlenmiş ve çiğ gıdalarda kontaminasyonu belirlemede, fermentasyon prosesinin on-line kontrolünde kullanılmaktadır. Bunun yanında et ve süt ürünlerinde ilaç kalıntıları, hormonlar, antibiyotik kalıntılarının belirlenmesi ve gıdaya bulaşan Salmonella, Listeria ve Staphylococcus gibi çeşitli mikroorganizmaların belirlenmesi biyosensörler tarafından gerçekleştirilebilmektedir.

### 2.3.2.4. Perde baskılı elektrotlar

Perde baskılı elektrotlar (SPE), çeşitli seramik, plastik ve cam alt tabakalar üzerine sentetik sınıf grafit, vinil veya epoksi bazlı polimerik bağlayıcı ve çözücülerden oluşan mürekkep katmanlarının çeşitli inert substratlar üzerinde ardışık olarak biriktirilmesiyle elde edilmektedir. SPE'ler farklı malzemelerden yapılması ve enzimler, antikorlar, DNA gibi biyolojik elementlerle modifiye edilmeye uygun cihazlardır. Ayrıca SPE'lerin analitik özelliklerini geliştirmek amacıyla, çeşitli nanomateryaller ve sentetik tanıma unsurları ile modifiye edilmeleri çoğu durumda başarılı olmuştur. SPE'lerin geliştirilmesi, enzim biyosensörlerinin dah pratik kullanım alanlarının oluşturulması bakımından oldukça önemlidir. SPE'ler; kolay taşınabilir olmaları, seri üretimle üretilmeleri, yüksek maliyet verimlilikleri gibi bir çok konuda avantaj sağlamaktadır (Moscone vd., 2016; Garcia vd., 2008).

Perde baskılı altın elektrotlarda altın çalışma elektrodu, referans gümüş elektrodu ve karşıt elektrot, polimerik mürekkeplerin esnek plastik alt tabaka üzerine perde baskı yöntemiyle basılmasıyla elde edilmiştir. SPGE'ler tek kullanımlıktır ve düşük maliyetlidir. Bu elektrotlar, tiyollenmiş oligonükleotitlerin altın yüzeyde hiçbir ön hazırlık yapmadan kovalent bağlanarak tekrarlanabilir immobilizasyona olanak sağlaması açısından önemlidir (Bozdağ, 2010). Aşağıda Şekil 2.7'de bir perde baskılı elektrod örneği görülmektedir



Şekil 2.7. Bir perde baskılı elektrod örneği (Anonim'den, 2013).

## 2.4. Deniz Ürünlerinde Toksin Madde Analizi

### 2.4.1. Deniz ürünlerinde bulunan toksin maddeler

Deniz ürünlerinde bulunan toksin maddeler, doğrudan deniz kabukluları ve balıklara zarar vermezken bu ürünleri tüketen canlılarda zehirlenmelere sebep olmaktadır. Virüslerden, bakterilerden ve toksinlerden kaynaklanan bu zehirlenmelerde toksinlerin çoğunluğunun ısıya karşı dirençli olması, görüntü ve tat olarak ayırt edilememesi canlılar için tehlike oluşturmaktadır. Çizelge 2.3’de kabuklu su ürünlerinin neden olduğu zehirlenmeler listelenmiştir (Terzi, 2008). Amnesik kabuklu zehirlenmesi (ASP), insanlarda hafıza kaybına yol açan ve tek hücreli su yosunu pennat diatomlar (*Pseudo-nitzshia*) tarafından üretilen domoik asitin neden olduğu bir zehirlenme çeşididir.

Çizelge 2.3. Kabuklu su ürünlerinin neden olduğu zehirlenmeler (Terzi, 2008).

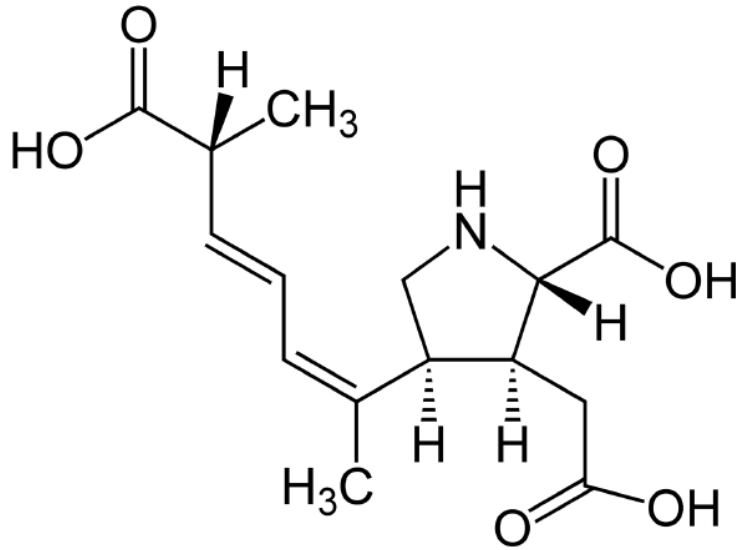
İntoksikasyon	Toksijenik mikroorganizma	Toksin	Sorumlu deniz ürünü
PSP	<i>Alexandrium catenalla</i>	Saksitoksin	Midye
	<i>Alexandrium tamarenis</i>	Neosaksitoksin	Midye
	<i>Alexandrium minutum</i>	Gonyatoksin (1-6)	D. Tarağı
	<i>Pyrodinium bahamense</i>	Diğer saksitoksin deriveleri (12-16)	İstiridye
DSP	<i>Gymnodinium catenatum</i>		
	<i>Dinophysis fortii</i>	Okadaik asit	Midye
	<i>Dinophysis acuminata</i>	Dinofisis toksin (1-3)	D. Tarağı
	<i>Dinophysis acuta</i>	Pektenotoksin (1-6)	Midye
	<i>Dinophysis mitra</i>	Yessotoksin	
NSP	<i>Prorocentrum lima</i>		
	<i>Karenia brevis</i>	Brevetoksin	İstiridye Midye
ASP	<i>Nitzschia pungens</i>	Domoik asit	D. Tarağı
	<i>Nitzschia australis</i>		Midye

PSP: Paralitik kabuklu su ürünü zehirlenmesi  
 DSP: Diyaretik kabuklu su ürünü zehirlenmesi  
 NSP: Nörotoksik kabuklu su ürünü zehirlenmesi  
 ASP: Amnezik kabuklu su ürünü zehirlenmesi

ASP ilk olarak 1987’de Kanada’da mavi midyelerin (*Mytilus edulis*) tüketilmesi sonucu 150'nin üzerinde insanın zehirlendiği ve birkaçının ölmesine sebep olmasıyla fark edilmiştir. ASP’nin tanımlanmış herhangi bir tedavisi bulunmamaktadır.

### 2.4.2. Domoik asit yapısı ve etki mekanizması

Domoik asit (DA); Pseudo-nitzshia türüne ait çok sayıda mikroalg tarafından üretilen sinir sistemi içerisinde bulunan kainate alt tipinin glutamat reseptörlerine bağlanan ve suda çözünebilen uyarıcı bir amino asittir (Terzi, 2008). DA insan vücuduna girdiğinde hipokampus bölgesi üzerinde etki eder. Bu bölge, hafıza ve iç organ fonksiyonlarının işlendiği medial temporal lobda yer alan ve yön bulmada önemli rol oynayan bölgedir. DA glutamat reseptörlerine bağlandığında zar kanallarının (sodyum geçirgen) açılmasına neden olur ve öncelikle sodyum akışına ardından da zar depolarizasyonunun artmasına yol açar. DA insan vücuduna girdiğinde; gastrointestinal (mide-bağırsak) sistem hastalıkları, bulantı, kusma, mide krampları ve ishal şeklinde en hafif etkileri göstermektedir. Daha ağır seyirlerde baş ağrısı, baş dönmesi ve kısa süreli bellek kaybı meydana gelebilir. Aşağıda Şekil 2.9’da domoik asidin yapısal formülü verilmiştir .



Şekil 2.8. Domoik asidin yapısal formülü (Anonim’den, 2020).

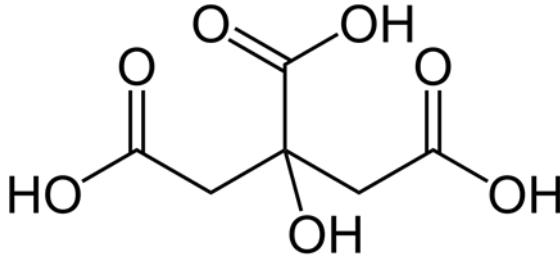
Küresel bir sorun niteliğinde olan kabuklu deniz ürünlerindeki DA varlığı üzerinde 2009 yılında, Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA) akut referans dozun (ARfD) aşılması için kabuklu deniz ürünleri tüketiminin 4,5 mg DA/kg’dan az olması yönünde bir görüş bildirmiştir. (Anonim, 2020).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

##### 3.1.1. Sitrik asit çözeltisi

Sitrik asit Şekil 3.1’de gösterildiği gibi  $C_6H_8O_7$  formülüne sahip karboksilik asitlerden, renksiz, kristal yapılu organik bir bileşiktir. Metal temizleme işlerinde, gıdaların ve çeşitli organik maddelerin dayanıklılığını arttırmak için ve bazı alkolsüz içeceklere tat vermek için kullanılır.



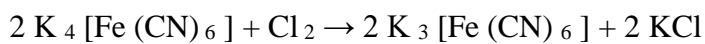
Şekil 3.1. Sitrik asit kimyasal yapısı

Sitrik asit buffer aşağıdaki gibi hazırlanmıştır (50 mM):

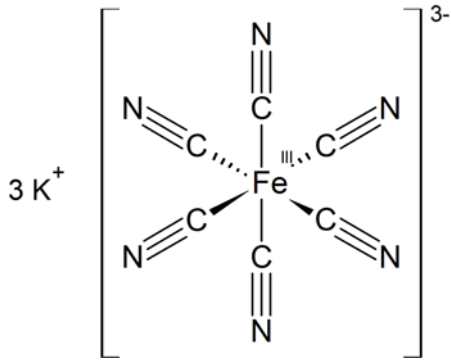
4,803 g sitrik asit + 450 mL iyonları alınmış saf (DI) su (pH 2 veya 3 civarı) içerisine bir miktar NaOH eklenerek pH 4,5 civarına getirilmiş ve sonrasında 50 mL DI su daha eklenip 500 mL’ye tamamlanmıştır.

##### 3.1.2. Potasyum ferrisiyanür

Potasyum ferrisiyanür Şekil 3.2’de gösterildiği gibi  $K_3[Fe(CN)_6]$  formülüne sahip inorganik bileşiktir. Rengi kırmızıdır. Potasyum ferrisiyanür, klorun potasyum ferrisiyanür çözeltisinden geçirilmesiyle aşağıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi elde edilir.



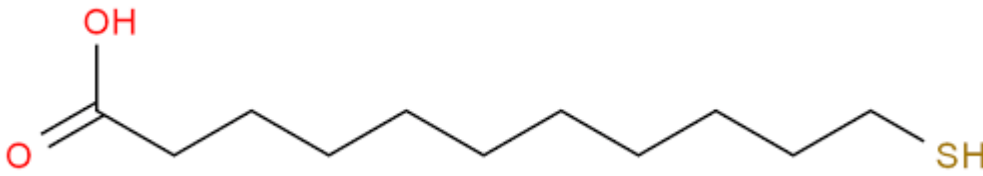




Şekil 3.2. Potasyum Ferri Siyanür kimyasal yapısı

### 3.1.3. Merkaptoundekanoik asit (MUA)

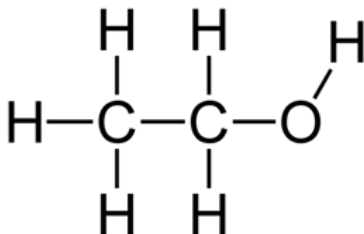
Merkaptoundekanoik asit Şekil 3.3'de gösterildiği gibi bir kimyasal yapıya sahiptir.



Şekil 3.3. Merkaptoundekanoik Asit kimyasal yapısı

### 3.1.4. Etanol

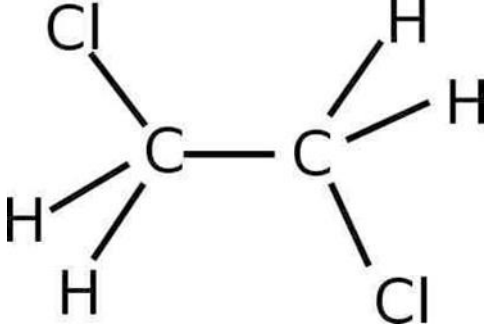
Etanol Şekil 3.4'de gösterildiği gibi  $C_2H_5OH$  kimyasal formülüne sahip renksiz ve yanıcı bir sıvıdır. İki karbonlu bir monoalkoldür ve dimetil eterin izomeridir.



Şekil 3.4. Etanol kimyasal yapısı

### 3.1.5. Etilen diklorür (EDC) çözeltisi

Etilen diklorür (EDC), kimyasal formülü  $C_2H_4Cl_2$  olan ve genellikle etilen diklorür olarak bilinen klorlu bir hidrokarbondur. Şekil 3.5’de kimyasal yapısı verilmiştir.



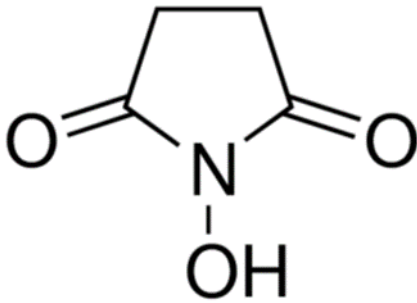
Şekil 3.5. Etilen diklorür (EDC) kimyasal yapısı

EDC’nin hazırlanması (Moleküler ağırlık 99,0 g/mol):

EDC ve sitrik asit buffer 50 mM (gereken molarite) olacak şekilde karıştırılmış ve 1 mL sitrik asit buffer + 9,55 mg EDC elde edilmiştir.

### 3.1.6. N-Hidroksisüksinimid (NHS) çözeltisi

(CHCCO) -NOH formülüne sahip organik bir bileşik olan N-Hidroksisüksinimidin kimyasal yapısı Şekil 3.6’da gösterilmiştir.



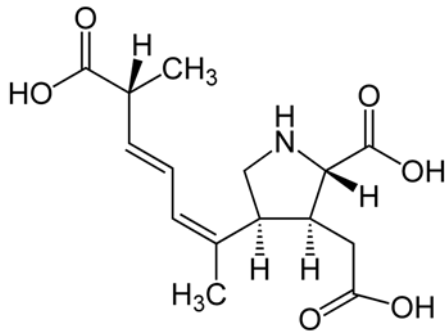
Şekil 3.6. N-Hidroksisüksinimid (NHS) kimyasal yapısı

NHS'in hazırlanması (Molekuler ağırlık 115,09 g/mol)

NHS ve sitrik asit buffer = 50 mM (gereken molarite) olacak şekilde karıştırılmış ve 1 mL sitrik asit buffer + 5,75 mg NHS elde edilmiştir.

### 3.1.7. Domoik asit (DA) çözeltisi

Domoik asitin kimyasal yapısı Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Domoik asit (DA) kimyasal yapısı

0.01 ng/mL Domoik asit çözeltisinin hazırlanması

- i. 1 mg domoik asit + 1 mL potasyum fosfat tampon çözeltisi (PBS) = 1 mg/mL konsantrasyon
- ii. 10 µL hazırlanan 1 mg/mL konsantrasyondan alınıp + 1990 µL PBS eklenerek 5 µg/mL konsantrasyonda toplamda 2 mL çözelti hazırlanmıştır.
- iii. 5 µg/mL konsantrasyondaki 2 mL çözeltiden 10 µL alınıp PBS eklenerek 10 mL'ye tamamlanmış ve sonuç olarak 5 ng/mL çözelti hazırlanmıştır.
- iv. 5 ng/mL'lik 10 mL çözeltiden 20 µL alınıp PBS eklenmiş, 10 mL'ye tamamlanmış ve sonuç olarak 0,01 ng/mL'lik çözelti hazırlanmıştır. 0,01 ng/mL'lik çözelti sonraki aşamalarda kullanılmak üzere 2 mL'lik eppendorf tüplere bölünmüştür.

0,09 ng/mL Domoik asit çözeltisinin hazırlanması

5 ng/mL'lik 10 mL çözeltiden 18 µL alınıp PBS eklenmiş, 1 mL'ye tamamlanmış ve sonuç olarak 0,09 ng/mL'lik çözelti hazırlanmıştır.

0,90 ng/mL Domoik asit çözeltisinin hazırlanması

5 ng/mL'lik 10 mL çözeltiden 18 µL alınıp PBS eklenerek 100 µL'ye tamamlanmış ve sonuç olarak 0,90 ng/mL'lik çözelti hazırlanmıştır.

4 ng/mL Domoik asit çözeltisinin hazırlanması

5 ng/mL'lik 10 mL çözeltiden 80 µL alınıp PBS eklenerek 100 µL'ye tamamlanmış ve sonuç olarak 4 ng/mL'lik çözelti hazırlanmıştır.

### **3.1.8. SAM çözeltisi**

Kendiliğinden birleşen katmanın (SAM) hazırlanması;

- 11-Merkaptoundekanoik asit (MUA) + etanol = 10 mM (gereken molarite) ve MUA'nin moleküler ağırlığı = 218,36 g/mol olduğu için;

- 50 mL etanol + 109,18 mg MUA = 10 mM elde edilmiştir.

10 mM MUA hazırlandığında kapak kısmı buharlaşma olmasın diye parafilm ile sürekli kapalı tutulmuştur.

### **3.1.9. Streptavidin çözeltisi**

Streptavidin çözeltisinin hazırlanması

-1 mg toz streptavidin + 1 mL DI su = 1 mg/mL konsantrasyon hazırlanmış ve

-15 µL hazırlanan 1 mg/mL konsantrasyondan alınıp PBS (11985 µL) eklenerek 1,25 µg/mL konsantrasyonda toplamda 12 mL çözelti elde edilmiştir.

1,25 µg/mL'lik çözelti sonraki aşamalarda kullanılmak üzere 2 mL'lik eppendorf tüplere bölünmüştür. Streptavidin ışığa karşı oldukça duyarlı olduğundan eppendorf tüpler alüminyum folye ile sarılıp kapatılmıştır.

### **3.1.10. Monoklonal anti domoik asit çözeltisi**

Monoklonal anti-domoik asit antikor çözeltisinin hazırlanması için;

1 mg biotinlenmiş anti-domoik asit antikor + 1 mL PBS = 1 mg/mL konsantrasyon elde edilmiş ve 15 µL hazırlanan 1 mg/mL konsantrasyondan alınıp PBS (11985 µL) eklenerek 1,25 µg/mL konsantrasyonda toplamda 12 mL çözelti hazırlanmıştır. 1,25 µg/mL'lik çözelti sonraki aşamalarda kullanılmak üzere 2 mL'lik eppendorf tüplere bölünmüştür.

## **3.2. Kullanılan Cihazlar**

### **3.2.1. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi**

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) malzeme sentezi, kaplama, korozyon, piller, yakıt hücreleri vb. alanlarda elektrokimyasal reaksiyonların tanımlanması için kullanılan bir analiz yöntemidir (Battistel vd., 2017).

Bu yöntemde iletken yüzey üzerine uygulanan düşük genlikli alternatif akım ile yüzeyin iletkenliği, yük transferi, statik özellikleri, çözelti direnci ve buradaki değişimler ölçülebilir (Arslan, 2016). Sensörlerde, hassasiyetinin oldukça yüksek olması ve bunu yaparken kullanıldığı sistemde kalıcı değişiklikler yaratmaması nedeniyle kullanılmaktadır.

EIS yönteminde elektrokimyasal sisteme uygulanan alternatif akıma karşılık sistem gösterdiği dirençle karşılık verir (Arslan, 2016). Direnç, elektron hareketini engellemeye çalışan elektriksel bir devre elemanı olup "R" ile gösterilir. Birimi ise ohm'dur ( $\Omega$ ) (Anonim, 2021). EIS ile belirlenen direnç polarizasyon direncidir. Ayrıca EIS kullanılarak yük transfer direnci, iletken yüzeydeki kaplama direnci ve sistemdeki iyon difüzyonuna karşı gösterilen dirençler hakkında da bilgi edinilebilmektedir (Döner, 2012).

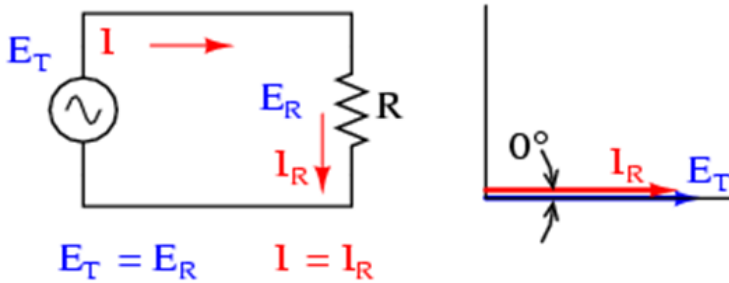
EIS yönteminde sisteme uygulanan alternatif akımla (AC) oluşan direnç Ohm kanununa göre  $E=I \cdot Z$  olarak formülize edilir. Formüldeki  $Z$  terimi empedansı ifade etmektedir ve birimi ohm'dur ( $\Omega$ ). Dolayısıyla AC devrelerde empedans için Ohm kanunları geçerlidir ve ilgili eşitlikler Şekil 3.8'de verilmiştir.

$$\mathbf{E = IZ} \quad \mathbf{I = \frac{E}{Z}} \quad \mathbf{Z = \frac{E}{I}}$$

(Bütün değerler kompleks veya kutupsaldır.)

Şekil 3.8. AC gerilimde Ohm kanunları (Anonim'den, 2021).

Alternatif akımda saf dirençten geçen akım ve gerilim arasında faz açısı sıfırdır. Bu durum aşağıda Şekil 3.9 ile gösterilmiştir (Anonim, 2021).

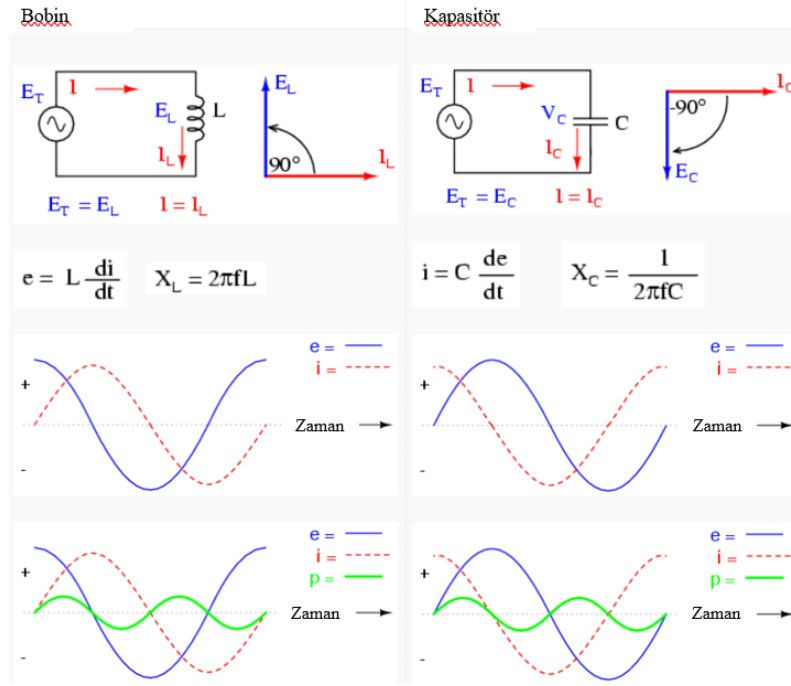


Şekil 3.9. AC devrede saf direncin direnç gerilimi ve akım ile olan ilişkisi (Anonim'den, 2021).

Empedans ise içinde kondansatör, indüktans gibi zamana bağlı olarak değişen akım değerlerine sahip elemanların olduğu devrelerde kullanılmaktadır. Empedans, akım ve gerilimin genliğini ve fazını açıklar. Elektron hareketini engelleyen devre elemanı olan direncin yanında elektron hareketine karşı devre içerisinde gösterilen atalet ise reaktans olarak ifade edilir. Kapasitörler için devredeki gerilimle orantılı elektrik alanında ve bobinler için devredeki akımla orantılı manyetik alanda reaktans bulunur,  $X$  ile gösterilir ve birimi ohm'dur ( $\Omega$ ).

Direnç ve reaktansın bileşkesi ise empedansı oluşturur. Bir empedans ölçümü basitçe bir salınım voltajı uygulandığında salınan akımın verdiği yanıt ölçülerek yapılmaktadır.

Direncin olmadığı devreye AC uygulandığında gerilimle akım arasındaki fazda  $90^\circ$  lik bir kayma olur. Bu durum Şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.10. Empedans ve reaktansın şematik anlatımı

Uygulanan salınım geriliminin denklemini;

$$E_t = E_0 \sin(\omega t) \quad (3.1)$$

Burada  $E_0$  uygulanan voltaj sinyalinin genliğidir.  $\omega = 2\pi f$  ise açısal frekans olarak ifade edilir. Empedans frekansa bağlı olarak değişmektedir. Yüksek frekanslarda kısa devre davranışı göstererek sifira doğru gitmekte; düşük frekanslarda ise açık devre potansiyel davranışı göstererek sonsuza doğru gitmektedir.

Uygulanan sinyalin yanıtı olarak sinyalden faz olarak da kaydırılan  $I$  genliğine sahip bir akım olacaktır.

$$I_t = I_0 \sin(\omega t + \phi) \quad (3.2)$$

Akım, dirence ek olarak genliği değiştiren bir reaktans nedeniyle fazda kaydırılır. Empedans bu nedenle řu şekilde ifade edilebilir:

$$Z = E_t = E_0 \sin(\omega t) = Z \sin(\omega t) \quad I_t I_0 \sin(\omega t + \phi) \sin(\omega t + \phi) \quad (3.3)$$

Bu ifade empedansın genlik ( $Z_0$ ) ve faz kayması ( $\phi$ )'na bağlı olarak türetilerek bir vektör gibi değerlendirilebilmesini sağlar.

Empedans kompleks sayılarla daha doğru ifade edilir. Kompleks sayının gerçek bileşeni  $Z'$  ; hayali bileşeni ise  $Z''$  dir.

$$(Z' = Z_0 \cos \phi) \quad (3.4)$$

$$(Z'' = j Z_0 \sin \phi) \quad (3.5)$$

Buradaki negatif ifadenin sebebi hayali kısımdan gelen negatif değerdir.


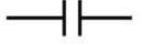

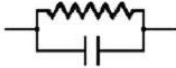
$$Z = Z_0 (\cos \phi + j \sin \phi) = Z' - j Z'' \quad (3.6)$$

Denklem 3.6 ise aşağıdaki gibi yazılabilir;

$$Z = Z e^{j\phi} \quad (3.7)$$

Burada  $j = \sqrt{-1}$  'dir.

Eşdeğer devre elemanları için kullanılan empedans denklemleri aşağıda şekil 3.11' de gösterilmiştir.

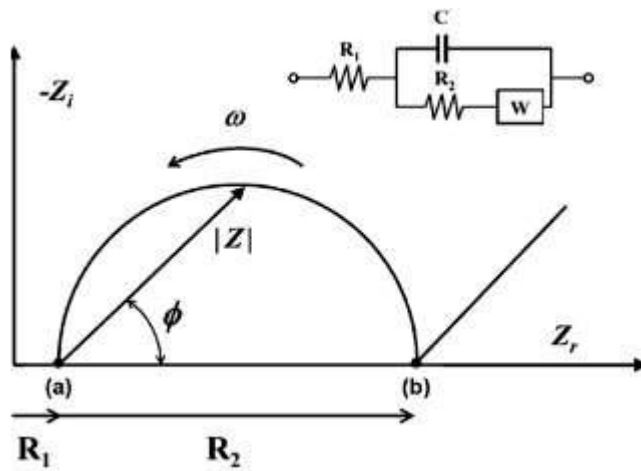
• Eşdeğer Devre Elemanları		DEVRE ELEMANLARI	EMPEDANS DENKLEMLERİ
• 1-REZİSTÖR	→		$Z = R + 0j$ $j = \sqrt{-1}$
• 2-KAPASİTÖR	→		$Z = 0 - j / \omega C$ $\omega = 2\pi f$
• 3-İNDÜKTÖR	→		$Z = 0 + j \omega L$ $\omega = 2\pi f$
			$Z = \frac{R}{1 + \omega^2 C^2 R^2} - \frac{j \omega C R^2}{1 + \omega^2 C^2 R^2}$

şekil 3.11. Eşdeğer devre elemanları için kullanılan empedans denklemleri



Elektrokimyasal reaksiyonlar için direnç, kapasitör ve indüktör olarak modellenen bir devrenin empedans spektrumu Nyquist grafiği adı altında gerçek dirence karşı hayali bir direnç olarak çizilir ve aşağıda Şekil 3.12’de gösterilmiştir.  $R_1$  direncine (a) ait değerle başlayan ve (b) değeriyle biten, toplamı  $R_1+R_2$  olan bir yarı daire şeklindedir.  $R_1$  değeri çözelti direncini gösterirken  $R_2$  direnci yük transfer direnci ( $R_{ct}$ )’ni göstermektedir.

Yüksek frekanslardaki yarı daire şeklindeki kısım elektron transfer süreciyle, düşük frekanslardaki doğrusal kısım ise difüzyon ile ilgilidir (Huang, vd., 2021).



Şekil 3.12. Empedans diyagramı (Huang, vd.’den, 2021).

Tez çalışmasındaki EIS ölçümleri çalışma elektrodu (WE), karşıt elektrot (CE) ve referans elektrot (RE) kullanılmak üzere üç elektrot sistemi ve buna bağlı elektrokimyasal cihazı (potentiyostat) kullanılarak yapılmıştır (Garcia vd., 2008).

Yapılan deneysel çalışmalarda altın ve karbon çalışma elektrotları kullanılmıştır. Altın elektrodu göreceli olarak iyi bir kararlılığa sahip, avantajlı elektron transfer kinetiği ile yüksek düzlem iletkenlik gösterebilen ve aynı zamanda biyoyumlu, yüzeye kolayca reseptörlerin istikrarlı immobilizasyonu için kovalent bağ oluşturma yeteneği gösterirler. Kullanılan altın elektrotların yüzeyinde immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmeden önce, mikroeletrotların yüzeyi iki aşamalı işlemle geçirilerek temizlenmiştir. Elektrot yüzeyinin temiz olmadığı durumlarda pik akımında azalma ve/veya pik potansiyelinde kayma meydana gelme ihtimali mevcuttur.

Çalışmamızda Gamry marka Reference 3000 model Potansiyostat-Galvanostat cihazı kullanılmıştır ve aşağıda Şekil 3.8’de gösterilmiştir. Tasarlanan biyosensörün DA'e seçimliliği, gerek sentetik farklı antikörler gerek doğal antikörler içeren karmaşık ortamlar içerisinde EIS metodu ile test edilmiştir. Yüzey fonksiyonelleştirilmesi sonucunda sensörler sadece DA'ya karşı seçici olmalıdır. Burada hedeflenen sonuç sadece DA'nın elektrot yüzeyi ile etkileşime girmesi ve diğer kimyasalların inkübasyon sırasında spesifik olarak bağlanmamasıdır.



Şekil 3.13. Gamry Reference 3000 model Potansiyostat-Galvanostat (Anonim'den 2019)

**Elektrolit Direnci ( $R_s$ ):** Çözelti direnci, üç elektrotlu potansiyostatik hücrede karşıt elektrot ile referans elektrot arasındaki direnci kompanse ettiği için elektrokimyasal hücrenin empedansında önemli bir faktördür.

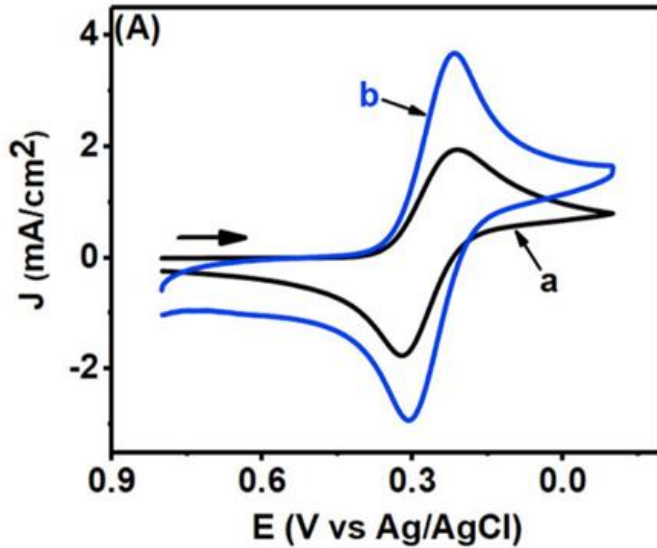
**Çift Tabaka Kapasitansı ( $C_{dl}$ ):** Elektriksel çift tabaka kapasitansı, elektrot ile onu çevreleyen elektrolit ara yüzünde çözültiden elektrot yüzeyine doğru oluşmaktadır.

**Polarizasyon Direnci ( $R_p$ ):** Eğer bir elektrotun potansiyel değeri açık devre potansiyelinden farklı bir değere gelmeye zorlanırsa elektrot polarize olur. Polarize olmuş elektrotta ise akım elektrot yüzeyinde akar.

**Difüzyon ( $W$ ):** Difüzyon, Warburg empedansı olarak bilinen empedansı meydana getirmektedir. Bu değer potansiyel bozulması frekansına bağlı olarak yüksek frekanslarda difüzyon reaktanları çok uzağa doğru hareket edemediği için Warburg empedansı küçük; düşük frekanslarda ise reaktanlar daha uzağa difüze oldukları için yüksektir.

**Sabit Faz Elementi (CPE):** Kapasitör bazı EIS deneylerinde ideal davranış göstermemektedir. Bu durumda sabit faz elementi (CPE) olarak tanımlanmaktadır. Gerçek hücrelerde çift tabaka kapasitör, kapasitör olarak değilde CPE olarak davranmaktadır. Bu ideal olmayan davranışı teoride tanımlayacak bir görüş kabul edilmediğinden birçok durumda deneysel bir sabit olarak değerlendirilmektedir.

**Döngüsel voltametri (CV):** Solüsyon içerisindeki bir analitin ya da elektrot üzerine adsorbe edilen bir molekülün elektrokimyasal özelliklerini incelemek için kullanılan potansiyodinamik bir ölçümdür. CV’de ferrisiyanür, dopamin, askorbik asit vb. elektroaktif maddeler kullanılarak bir çalışma elektrodu ile bir karşılaştırma elektrodu arasına uygulanan ve değeri zamanla değiştirilen gerilime karşı, çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasındaki akım ölçülmektedir. Buradaki ileri yönlü gerilim belirli bir değere ulaştıktan sonra doğrusal olarak azalacak şekilde ters çevrilip voltametrimin döngüsü tamamlanarak elektrot yüzeyinin; elektroaktif ya da iletken özelliği, yüzeye bağlanan grupların indirgenme veya yükseltgenme tepkimeleri, ilgili analitlere karşı duyarlılığı elde edilen veriler doğrultusunda bulunur (Aydın, 2007; Arslan, 2016).



Şekil 3.14.  $K_3Fe(CN)_6$  'ün 50 mV/s tarama hızıyla CV ölçümü (Ahammad vd.'den, 2018)

### 3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Çalışma Prensibi

SEM numune yüzeyinin yüksek enerjili elektronlar ile etkileşerek farklı açılarda oluşan elektron ve foton sinyallerinin bir dedektör tarafından toplanıp incelenmesiyle görüntü oluşturan bir cihazdır. İkincil elektronlar, malzeme topografisi ve geri saçılan elektronlar, atom numarasına ve kontrasta bağlı atomik kompozisyon hakkında bilgi vermektedir (Anonim, 2020).

Çalışmamızda kullandığımız perde baskılı altın elektrotların yüzey analizi için üniversitemizin merkezi araştırma ve uygulama laboratuvarında bulunan Hitachi Regulus 8230 marka/model taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır ve Şekil 3.9'da aşağıda gösterilmiştir. Bu cihaz sahip olduğu soğuk alan emisyonlu tabancası sayesinde; geniş çalışma voltaj aralığı, numune özelliklerine bağlı olarak 2000k kadar büyütme sağlama, düşük voltajlarda yüksek çözünürlükte görüntüleme gibi avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca cihaza birleşik olarak çalışan Enerji yayımlı X ışını dedektörü ile perde baskılı altın elektrotların bileşiminde bulunan elementlerin yüzdelik dağılımları da belirlenmiştir (Anonim, 2020).



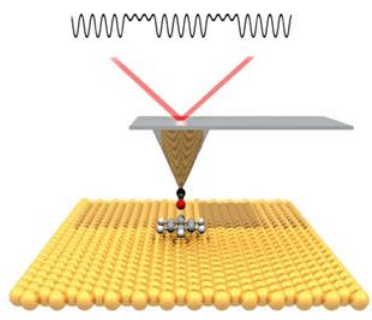
Şekil 3.15. Alan Emisyonlu SEM cihazı (ARUM, ESOGU)

### 3.4. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

AFM malzemenin; yüzey pürüzlülüğü, topografik bilgisi, elektriksel yük dağılımı hakkında bilgiler verir. AFM, numune yüzeyini taramak için bir çubuk benzeri düzenek ile ucundaki oldukça ince ve genel olarak Silikon (Si) ya da  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (Silisyum Nitrür)'den yapılmış ve kalınlığı 0,2 nanometre ile 10 nanometre arasında olan bir iğne kullanır. Esnek kol ile

malzeme arasına sabit bir kuvvet uygulanır ve uç malzeme üzerindeki yükseklik ve çukurlara göre kendini dengelemek için sürekli hareket eder.

Eğer uç sabit bir yükseklikte tarama yaparsa, yüzeye çarpıp hasar oluşturma riski doğar. Bu nedenle genellikle uç ile yüzey arasındaki kuvveti sabit tutmak ve mesafeyi ayarlamak amacıyla bir negatif geri besleme mekanizması kullanılır. Malzeme numunesi, “z” yönünde hareket edip yüksekliği ayarlayan, “x” ve “y” yönünde hareket edip taramayı sağlayan bir dizi piezoelektrik düzenek aracılığıyla taranır. Böylece malzeme yüzeyinin 3 boyutlu taraması yapılmış olur (Tamer, 2020). Aşağıda Şekil 3.10’da atomik kuvvet mikroskobunun şematik bir görünümü verilmiştir.



Şekil 3.16. Atomik kuvvet mikroskobu şematik görünümü (Anonim’den, 2017).

SPE-Au AFM analizi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi bünyesinde bulunan Veeco Multimode 5 marka Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.5. Sensör Yüzeylerinin Biyofonksiyonelleştirilmesi

Yapılan deneysel çalışmalarda perde baskılı altın elektrot (SPGE) kullanılmıştır. Kullanılan altın çalışma elektrotların yüzeyinde immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmeden önce, mikroelektronların yüzeyi PBS ile 100 µL pipet uçları kullanarak elektrot yüzeyine değmeden 2-3 defa yıkılarak temizlenmiştir. Elektrot yüzeyinin temiz olmadığı durumlarda pik akımında azalma ve/veya pik potansiyelinde kayma meydana gelme ihtimali mevcuttur.

SPGE’nin yüzey morfolojik ve mikro yapısal özellikleri SEM, AFM ve EDX analiz yöntemleri ile incelenmiştir.

SPGE'nin elektro analitik performansı hakkında bilgi sahibi olmak, immobilizasyon aşaması için uygun redoks probunu belirlemek ve EIS ölçümü için uygun frekans aralığını tayin edebilmek için altı farklı çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiler 2 mM, 5 mM ve 50 mM derişimlerinde  $K_3Fe(CN)_6$  ile 0,1 M KCl ve 0,1 M KCl'nin hazırlanan üç farklı derişimdeki  $K_3Fe(CN)_6$  redoks probleleriyle eş hacimdeki çözeltileridir. Bu çözeltiler:

- 2 mM  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisi, 50 ml'lik deiyonize su içerisine, 32,920 mg  $K_3Fe(CN)_6$  konularak,
- 5 mM  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisi, 50 ml'lik deiyonize su içerisine, 82,325 mg  $K_3Fe(CN)_6$  konularak,
- 50 mM  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisi, 50 ml'lik deiyonize su içerisine, 823,25 mg  $K_3Fe(CN)_6$  konularak,
- 0,1 M KCl çözeltisi, 50 ml'lik deiyonize su içerisine, 370 mg KCl konularak,
- 2 mM  $K_3Fe(CN)_6$  (0,1 M KCl) çözeltisi, 2 mM  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisinden ve 0,1 M KCl çözeltisinden eş hacimde alınarak,
- 5 mM  $K_3Fe(CN)_6$  (0,1 M KCl) çözeltisi, 5 mM  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisinden ve 0,1 M KCl çözeltisinden eş hacimde alınarak,
- 50 mM  $K_3Fe(CN)_6$  (0,1 M KCl) çözeltisi, 50 mM  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisinden ve 0,1 M KCl çözeltisinden eş hacimde alınarak hazırlanmıştır.

Hazırlanan redoks problemleri SPGE yüzeyine inkübe edilerek EIS ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elektrot yüzeyine, kimyasal maddelerin kendiliğinden ya da dışarıdan bir etkiyle tutturulmasıyla elde edilen elektrotlara immobilizasyonu gerçekleştirilmiş elektrot denir. Immobilizasyonu gerçekleştirilen elektrotun yüzeyine bir reaktifin çeşitli etkilerle tutturulması ve modifiye yüzeye reaktifin davranışının kazandırılmasıyla yeni elektrot yüzeyleri tasarlanabilmekte, pek çok elektroanalitik problem çözülebilmekte, yeni analitik uygulama ve sensör çalışmalarının geliştirilmesi mümkün olabilmektedir. SPGE'nin çalışma elektrot bölgesi üzerinde adım adım oluşturulan katmanlar sayesinde modifikasyon yapılarak hedef toksini yakalayacak uygun hale getirilmesiyle elektrotun immobilizasyonu yapılmıştır.

İmmobilizasyon aşamasında, SPGE biyofonksiyonelleştirilerek anti-domoik asit antikorumun, farklı derişimlerdeki domoik asit antijenini tutması sağlanmıştır. Bu aşamada da EIS ölçümleri yapılarak empedans cevaplarının Nyquist gösterimi elde edilmiştir.

Tasarlanan biyosensörün DA'ya seçimliliği, gerek sentetik farklı antikolar gerek doğal antikolar içeren karmaşık ortamlar içerisinde EIS metodu ile test edilmiştir. Yüzey fonksiyonelleştirilmesi sonucunda sensörler sadece DA'ya karşı seçici olmalıdır. Burada hedeflenen sonuç sadece DA'nın elektrot yüzeyi ile etkileşime girmesi ve diğer kimyasalların inkübasyon sırasında spesifik olarak bağlanmaması esasına dayanmaktadır.

SPGE yüzeyinde immobilizasyon işlemi yapılabilmesi için elektrot yüzeyinin aktive edilmesi gerekmektedir. SPGE yüzeyine asetat tampon çözeltisi (pH: 4,6) inkübasyonu yapılarak 0 to 1,6 V potansiyel altında 60 saniye süre CV yöntemi ile aktive edilmiştir.

SPGE yüzeyinin biyofonksiyonelleştirilmesi aşamasında sırasıyla aşağıdaki adımlar izlenmiş ve sonuçlar kaydedilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

1. PBS ile elektrot yüzeyinin yıkanması: 100 µL pipet uçları kullanılarak elektrot yüzeyine değmeden 2-3 defa yıkanması

2.  $K_3Fe(CN)_6$  konularak impedance alınması

3. PBS ve etanol ile yıkanıp yüzeyin yaklaşık 5 dak bekletilerek kurutulması

4. Daha sonrasında self assembly monolayer (SAM) eklenip 1 saat inkübasyon yapılması (Burada her 15 dakikada bir kontrol edilip SAM seviyesinde azalma varsa ekleme yapılmıştır)

5. Etanol ve PBS ile yıkama yapılması

6. Hemen öncesinde hazırlanan 1:1 oranında NHS/EDC (50 mM'lik NHS ve EDC karıştırılarak elde edilen 2 mL solüsyon) konularak yarım saat inkübasyona bırakılması

7. NHS/EDC elektrot yüzeyinden uzaklaştırılıp, hemen öncesinden hazırlanan 1,25 µg/mL PBS içerisindeki streptavidin çözeltisi (buzdolabı -20 °C) ile 1 saat inkübasyon yapılması.

8. Elektrot yüzeyinin yıkama solüsyonu (1x) ile yıkanması

9. Hemen öncesinden hazırlanan 1,25 µg/mL ve PBS içerisinde seyreltilen biotinlenmiş monoklonal anti-domoik asit antikor ile 1 saat inkübasyon yapılması

10. Elektrot yüzeyinin yıkama solüsyonu (1x) ile yıkanması

11.  $K_3Fe(CN)_6$  konularak impedance alınması

12. Elektrot yüzeyinin PBS ile yıkanması

13. Hemen öncesinden PBS içerisinde 0,01 ng/mL konsantrasyonda hazırlanan domoik asit ile yarım saat inkübasyon yapılması

14. Elektrot yüzeyi yıkama solüsyonu (1x) ile yıkanması

15.  $K_3Fe(CN)_6$  konularak impedance alınması
16. Elektrot yüzeyinin PBS ile yıkanması
17. Artan konsantrasyon olan 0,09 ng/mL domoik asit (antijen) konularak toplamda 0,10 ng/mL olacak şekilde yarım saat inkübasyon yapılması
18. Elektrot yüzeyinin yıkama solüsyonu (1x) ile yıkanması
19.  $K_3Fe(CN)_6$  konularak impedance alınması
20. Elektrot yüzeyinin PBS ile yıkanması
21. Artan konsantrasyon olan 0,90 ng/mL domoik asit (antigen) konularak toplamda 1,00 ng/mL'ye tamamlanacak şekilde yarım saat inkübasyon yapılması
22. Elektrot yüzeyinin yıkama solüsyonu (1x) ile yıkanması
23.  $K_3Fe(CN)_6$  konularak impedance alınması
24. Elektrot yüzeyinin PBS ile yıkanması
25. Artan konsantrasyon olan 4,00 ng/mL domoik asit (antigen) konularak toplamda 5,00 ng/mL'ye tamamlanan yüzeyin yarım saat inkübasyon yapılması
26. Elektrot yüzeyinin yıkama solüsyonu (1x) ile yıkanması
27.  $K_3Fe(CN)_6$  konularak impedance alınması
28. Elektrot yüzeyinin PBS ile yıkanması
29. Kalibrasyon eğrisinin çizilmesi

### 3.6. Rejenerasyon ve Elektrotların Yüzey Modifikasyonu

#### 3.6.1. Perde baskılı elektrodun rejenerasyonu

İmmobilizasyonu sağlanmış SPE'nin birden çok kez kullanımını için elektrotların rejenere edilmesi ve temizlenmesi gerekir. Rejenerasyon işlem inde elektrot yüzeyinde bulunan katmanlar ortadan kaldırılır. Dolayısıyla bu işlem sınırlı tekrarda ve sayıda elektrotların hasar görüp bozulmasına kadar sürdürülebilir.

Çalışmamızda iki farklı rejenerasyon prosedürü uygulanmıştır. Bunlar;

1. Rejenerasyon Prosedürü :

a) 10 mM  $H_2SO_4$  çözeltisi inkübe edilip, CV ile (0,0 V – (+)1,8 V ), tarama oranı:100mV/s, 6 çevrim parametrelerinde temizlenmesi



b) 50 mM  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisi inkübe edilip, CV ölçümü ile (1,0 V – (+)1,2) V, tarama oranı:100mV/s, 6 çevrim parametrelerinde temizlenmesi

c) 50 mM  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisi inkübe edilip, 10 kHz – 0,1 Hz frekans aralığındaki EIS ile ölçümü alınması

## 2. Rejenerasyon Prosedürü :

a) 0.1 M  $H_2SO_4$  çözeltisi inkübe edilip, CV ile (0,0 V – (+)1,4 V), tarama oranı: 50mV/s, 15 çevrim parametrelerinde temizlenmesi

b) 50 mM  $K_3Fe(CN)_6$  çözeltisi inkübe edilip, 10 kHz – 0,1 Hz frekans aralığındaki EIS ile ölçümü alınması

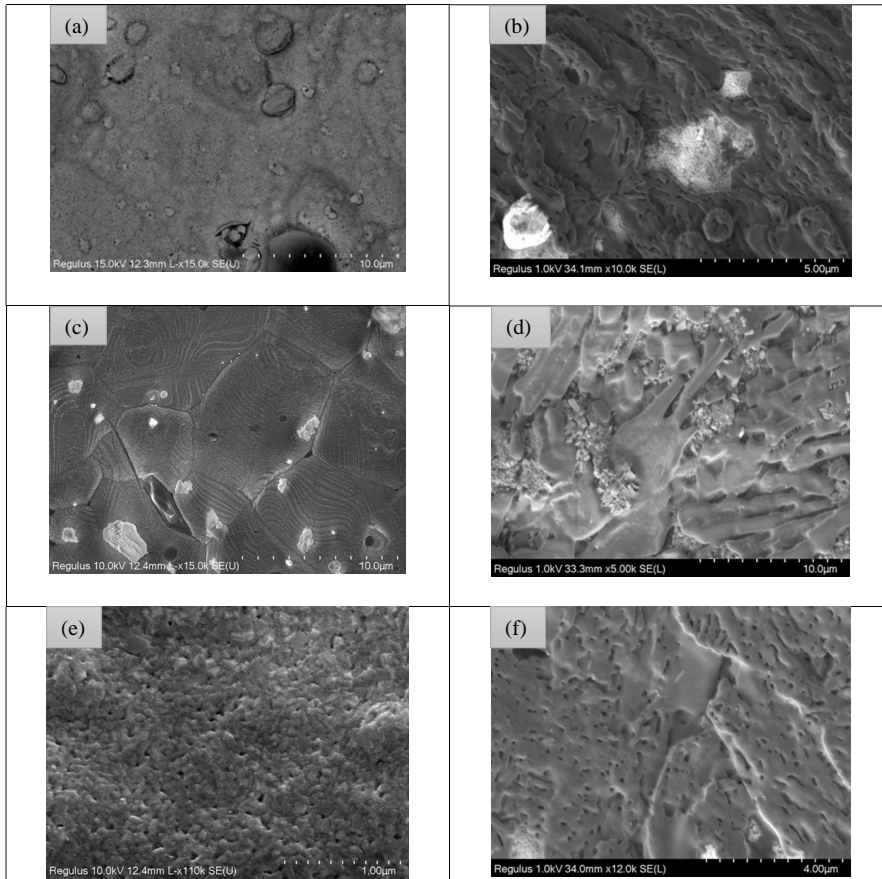
### 3.6.2. Perde baskılı elektrodun yüzey modifikasyonu

SPGE'nin elektrokimyasal performansının daha iyi seviyelere çıkarılması için altın nanopartikülleri (AuNPs) kullanılarak yüzey modifikasyonu yapılmıştır. Altın elektrot 2 mM  $HAuCl_4$  (0,5 M  $H_2SO_4$ ) çözeltisi ile -0,3 V potansiyel altında 120 sn modifikasyon zamanı kullanılarak karakterize edilmiştir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. SEM Analiz Sonuçları

SPGE'nin üç ayrı bölgesi için de SEM analizi yapılmıştır. Bu bölgeler aşağıda görüleceği üzere sırasıyla gösterilmiştir. (a) işlem görmemiş karşıt elektrotu, (c) işlem görmemiş referans elektrotu ve (e) ise işlem görmemiş çalışma elektrotunun SEM görüntülerini göstermektedir. SPGE'nin biyofonksiyonelleştirilmiş üç ayrı bölgesi için de SEM analizi yapılmıştır. Bu bölgeler aşağıda Şekil 4.1'de görüleceği üzere (b) biyofonksiyonelleştirilmiş karşıt elektrotu, (d) biyofonksiyonelleştirilmiş referans elektrotunu ve (f) ise biyofonksiyonelleştirilmiş çalışma elektrotunun SEM görüntülerini göstermektedir.



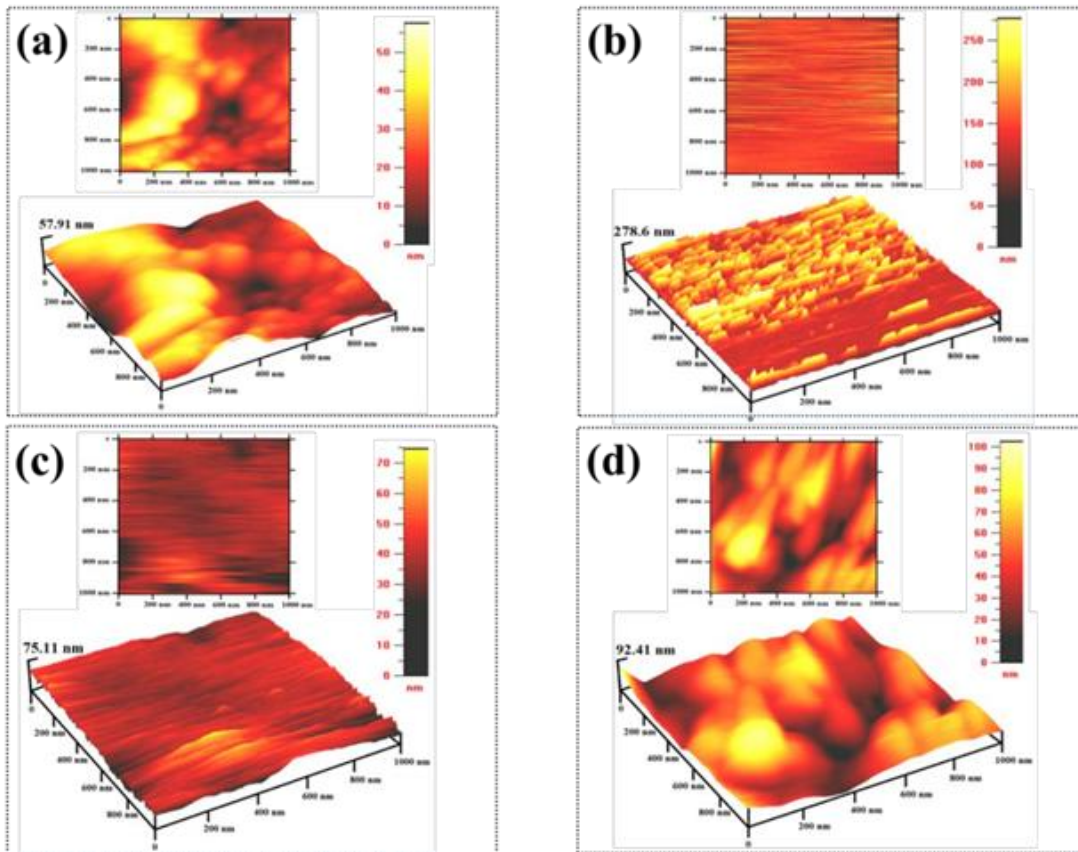
Şekil 4.1. SPGE (a) işlem görmemiş karşıt elektrotu, (b) biyofonksiyonelleştirilmiş karşıt elektrotu, (c) işlem görmemiş referans elektrotu, (d) biyofonksiyonelleştirilmiş referans elektrotunu, (e) işlem görmemiş çalışma elektrotu ve (f) biyofonksiyonelleştirilmiş çalışma elektrotunun SEM görüntüleri

Görüntüler incelendiğinde immobilizasyon aşamasında yüzey katmanlarının oluşacağı ve reaksiyonların gerçekleştiği çalışma elektrotunun yüzey morfolojisinin kısmen düzgün olduğu ve bazı gözenekli yapıların olduğu anlaşılmaktadır. Referans ve karşıt elektrotta da benzer yüzey morfolojilerinin olduğu hatta referans elektrotta bazı dalgalanmaların olduğu görülmektedir.

Elde edilen biyosensörün yüzey morfolojisi incelendiğinde ve işlem görmemiş elektrot ile karşılaştırıldığında biyofonksiyonelleştirme işleminin büyük oranda başarılı olduğu görülmektedir.

#### 4.2. AFM Analiz Sonuçları

AFM analizi aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



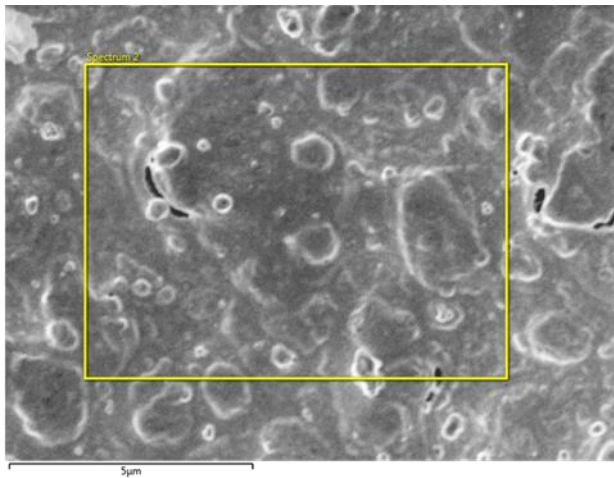
Şekil 4.2. SPGE çalışma elektrotu (a) işlem görmemiş, (b) biyofonksiyonelleştirilmiş, (c) rejenerasyon sonrası, (d) yeniden biyofonksiyonelleştirilmiş yüzeylere ait AFM analizlerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.2’de SPGE’nin çalışma elektrotunun sırasıyla işlem görmemiş (a), biyofonksiyonelleştirilmiş (b), rejenerasyonu yapılmış (c) ve tekrar biyofonksiyonelleştirilmiş (d) AFM görüntüleri yer almaktadır. Bu analizde maksimum-minimum noktalar arasındaki farkın (a)’da 57,91 nm., (b)’de 278,6 nm., (c)’de 78,11nm. ve (d)’de 92,41 nm. olduğu görülmüştür. Yüzey pürüzlülük değerleri ise (a)’da 10,9 nm., (b)’de 18,2 nm., (c)’de 12,1 nm. ve (d)’de 12,4 nm. ‘dir.

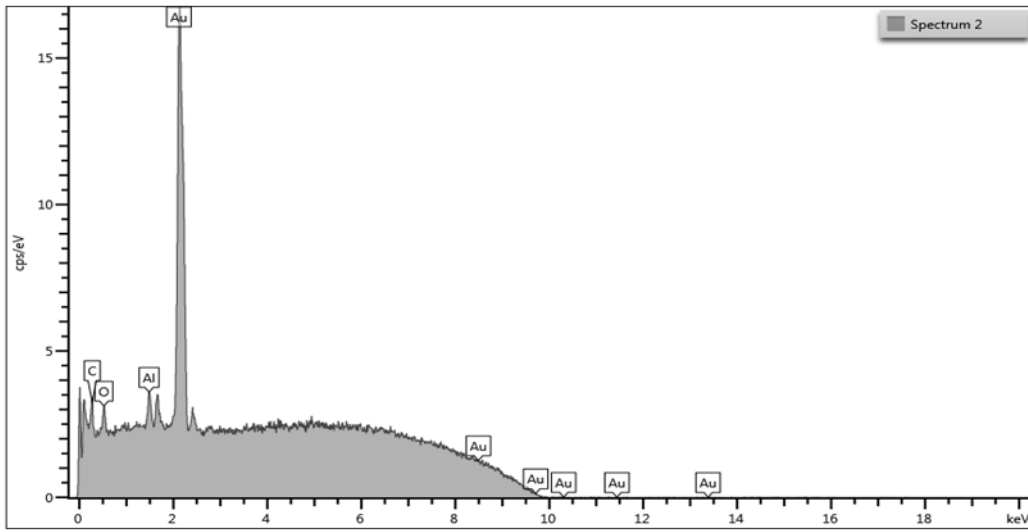
(a)’daki SPGE’nin maksimum-minimum değerlerinin (b)’de artması biyofonksiyonelleştirme işleminin başarılı olduğunu göstermektedir. Ardından oluşan bu katmanlar (c)’de rejenerasyon işlemiyle kaldırılmıştır. (d)’de görülen rejenerasyon sonrası maksimum-minimum noktalarının yükselmesi bu aşamadaki biyofonksiyonelleştirmenin çalışmada istenilen seviyenin çok altında gerçekleştiğini göstermektedir. Buradan rejenerasyon sonrası SPGE’nin yeniden kullanıma uygun olmadığı anlaşılmıştır.

### 4.3. EDX Analiz Sonuçları

İşlem görmemiş (uygulama yapılmamış) haldeki SPGE’nin çalışma elektrotunun EDX analizi sonucunda %95,34 oranında Altın (Au), %2,24 oranında Karbon (C), %1,48 oranında Alüminyum (Al) ve %0,94 oranında Oksijen (O) olduğu görülmüştür ve Çizelge 4.1’de verilmiştir. EDX analizi yapılan bölge ve bileşen yüzdeleri grafiği aşağıda sırasıyla Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. İşlem görmemiş SPGE çalışma elektrotu EDX görüntüsü (skala 5µm)



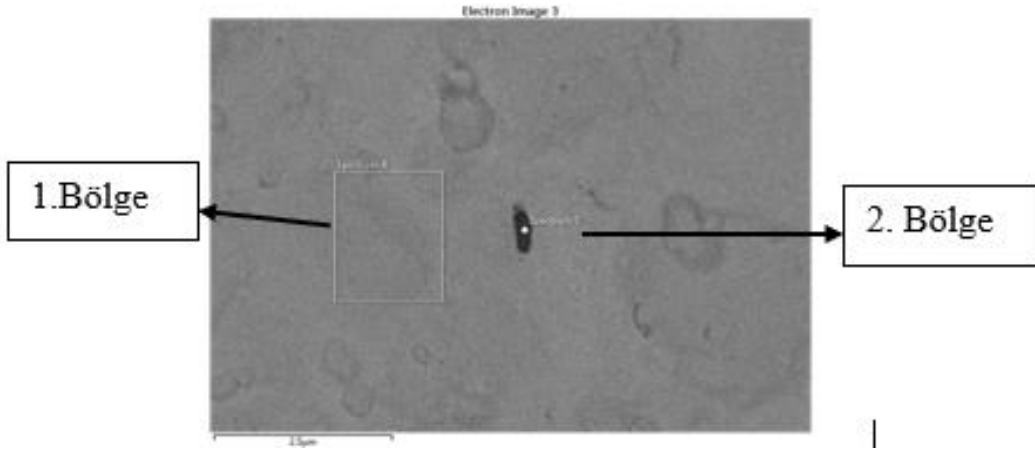
Şekil 4.4. İşlem görmemiş SPGE çalışma elektrotu EDX bileşen yüzdeleri

Buna göre, beklenildiği gibi tüm reaksiyonların büyük oranda gerçekleşeceği çalışma elektrotu bölgesinde yüksek oranda altın olduğu görülmüş ve az miktarda karbon ve alüminyum içerdiği anlaşılmıştır.

Çizelge 4.1. İşlem görmemiş SPGE çalışma elektrotu EDX analizi

Element	Ağırlıkça Miktar %	Min.	Mak.	Ortalama	Std. Sapma
C	2,24	2,24	2,24	2,24	0,00
O	0,94	0,94	0,94	0,94	0,00
Al	1,48	1,48	1,48	1,48	0,00
Au	95,34	95,34	95,34	95,34	0,00
<b>Toplam</b>	<b>100,0</b>				

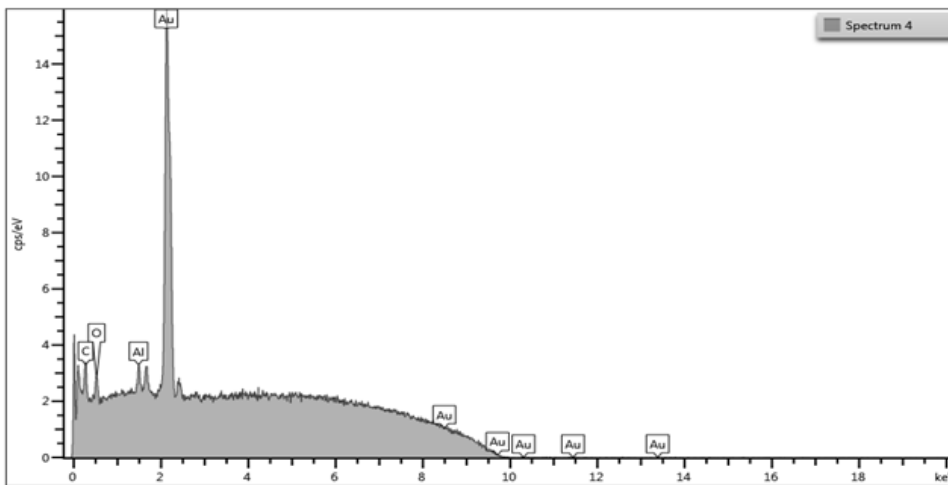
SPGE'nin karşıt elektrotunun 1. bölgesinin EDX analizi yapıldığında %95,05 Au, %2,80 oranında C, %1,21 oranında Al ve %0,94 oranında O olduğu görülmüştür. EDX analizi yapılan bölgeler ve bileşen yüzdeleri grafikleri aşağıda sırasıyla Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



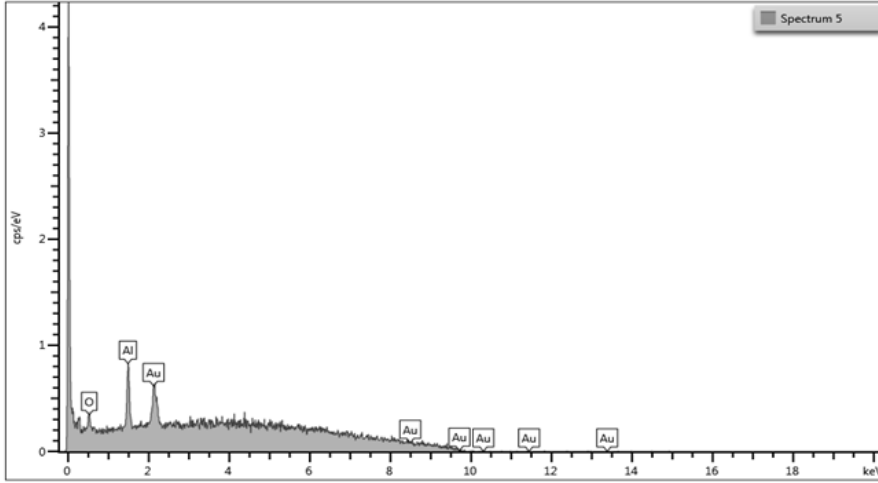
Şekil 4.5. İşlem görmemiş SPGE karşıt elektrot EDX analiz bölgeleri görüntüsü

Burada elde edilen sonuçların çalışma elektrotu bölgesine benzer olduğu görülmektedir. Bununla beraber dikkatimizi çeken, karşıt elektrotta 2 ile gösterilen bölgenin EDX analizi yapıldığında ise %73,82 Au, %21,75 oranında Al, ve %4,43 oranında O ihtiva ettiği görülmüştür ve Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Diğer bölgelerden daha koyu renkte gözüken bu bölgenin altın oranının düşük olduğu ve beklenilmedik oranda yüksek oranda alüminyuma sahip olduğu görülmüştür. Bu ise kullanılan hazır elektrotların biyosensor oluşturmada tam anlamı ile ideal bir yapıya sahip olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.6. İşlem görmemiş SPGE karşıt elektrot 1.bölge EDX bileşen yüzdeleri

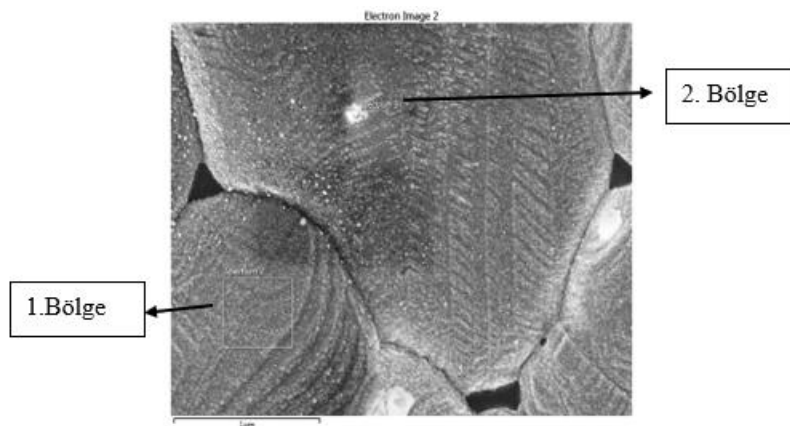


Şekil 4.7. İşlem görmemiş SPGE karşıt elektrot 2.bölge EDX bileşen yüzdeleri

Çizelge 4.2. İşlem görmemiş SPGE karşıt elektrot 2.bölge EDX analizi

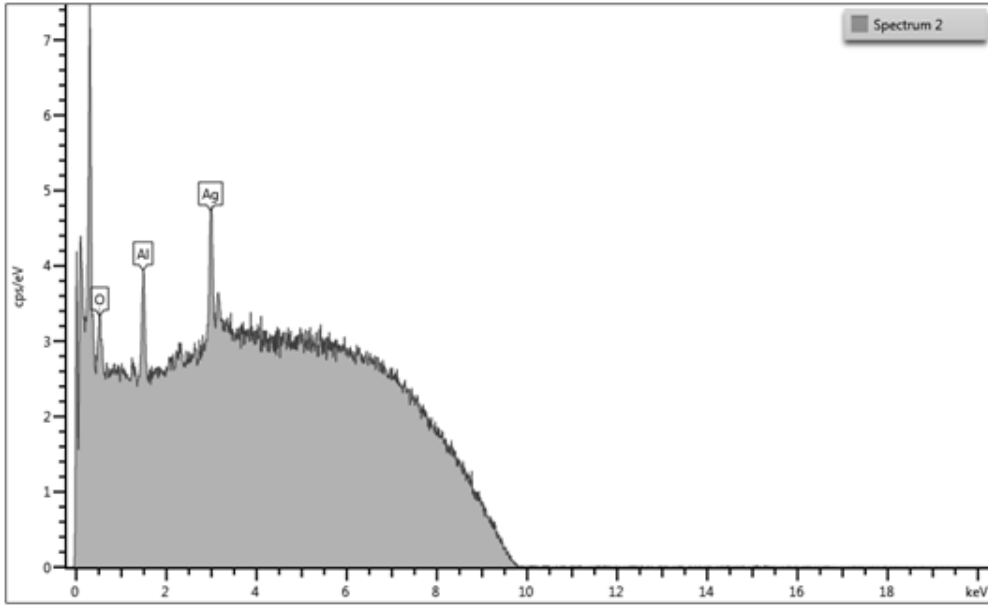
Element	Ağırlıkça Miktar %	Min.	Mak.	Ortalama	Std. Sapma
O	4,43	4,43	4,43	4,43	0,00
Al	21,75	21,75	21,75	21,75	0,00
Au	73,82	73,82	73,82	73,82	0,00
Toplam	100,0				

SPGE'nin referans elektrotunun EDX analiz bölgelerinin görüntüsü aşağıda Şekil 4.8'de verilmiştir.

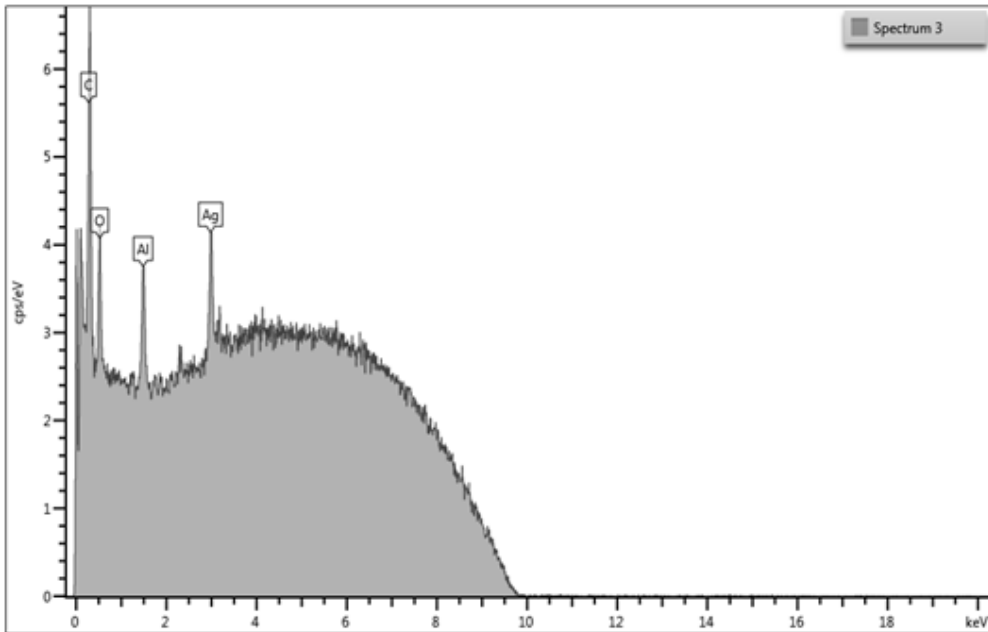


Şekil 4.8. İşlem görmemiş SPGE referans elektrot EDX analiz bölgeleri görüntüsü

1.bölgenin analizine göre burada %85,58 oranında Ag, %9,20 oranında Al ve %5,22 oranında O olduğu görülmüştür. 2. Bölgenin EDX analizi yapıldığında ise %71,90 oranında Ag, %11,49 oranında O, %9,69 oranında Al ve %6,92 oranında C ihtiva ettiği görülmüştür ve Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. EDX analizi yapılan bölgeler ve bileşen yüzdeleri grafikleri aşağıda sırasıyla Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. İşlem görmemiş SPGE referans elektrot 1.bölge EDX bileşen yüzdeleri



Şekil 4.10. İşlem görmemiş SPGE referans elektrot 2.bölge EDX bileşen yüzdeleri

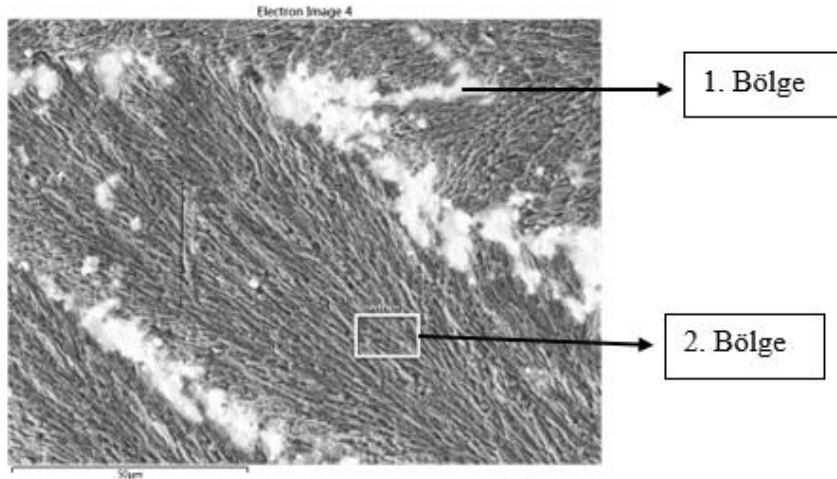


Çizelge 4.3. İşlem görmemiş SPGE referans elektrot 2.bölge EDX analizi

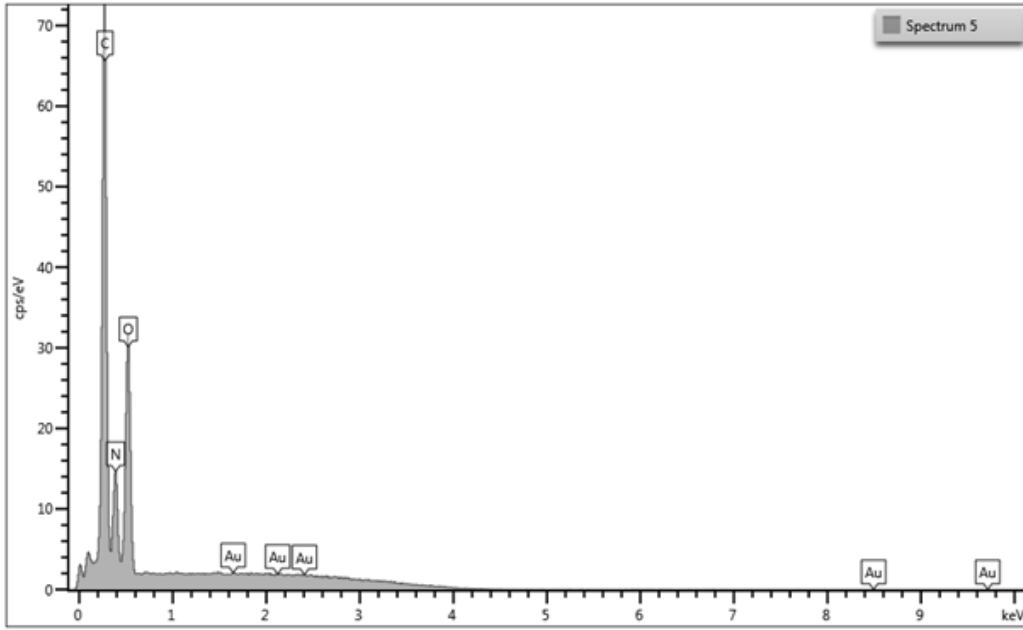
Element	Ağırlıkça Miktar %	Min.	Mak.	Ortalama	Std. Sapma
C	6,92	6,92	6,92	6,92	0,00
O	11,49	11,49	11,49	11,49	0,00
Al	9,69	9,69	9,69	9,69	0,00
Au	71,90	71,90	71,90	71,90	0,00
<b>Toplam</b>	<b>100,0</b>				

Kullanılan SPE referans elektrot bölgesinin yüksek oranda gümüş olduğu görülse de Al ve O miktarının yüksekliği dikkat çekmektedir. Şekilde diğer bölgelerden daha açık ve parlak renkte görülen 2. bölgenin analizinde diğer bölgelerden daha fazla oksijen görülmesi SPE'nin ticari bir ürün olmasından kaynaklı çevre şartlarının etkisiyle bölgesel oksitlenmeye uğradığı sonucuna varılmıştır.

Biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE karşıt elektrotunun 2. bölgesinin EDX analizi yapıldığında %59,71 oranında C, %25,04 oranında O ve %14,61 oranında Azot (N) olduğu görülmüştür. Görüleceği üzere çalışma elektrotunda olduğu gibi koyu renkli yerlerde altına rastlanılmamıştır. 1. bölgenin EDX analizinde ise %87,01 oranında Au, %3,32 oranında O, %0,67 oranında Al ve %0,62 oranında N ihtiva ettiği görülmüştür. Bu analizlere ait görüntüler aşağıda sırasıyla Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



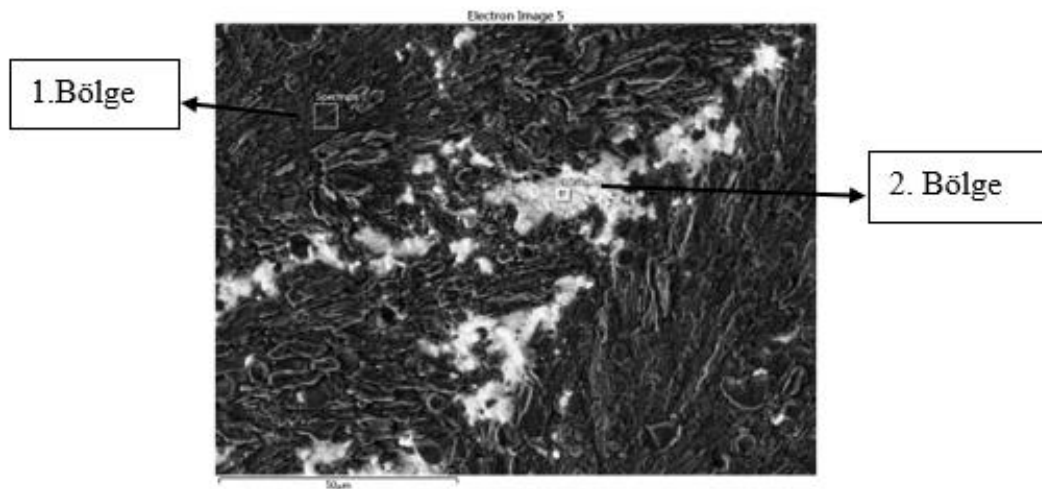
Şekil 4.11. Biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE karşıt elektrotu EDX görüntüsü



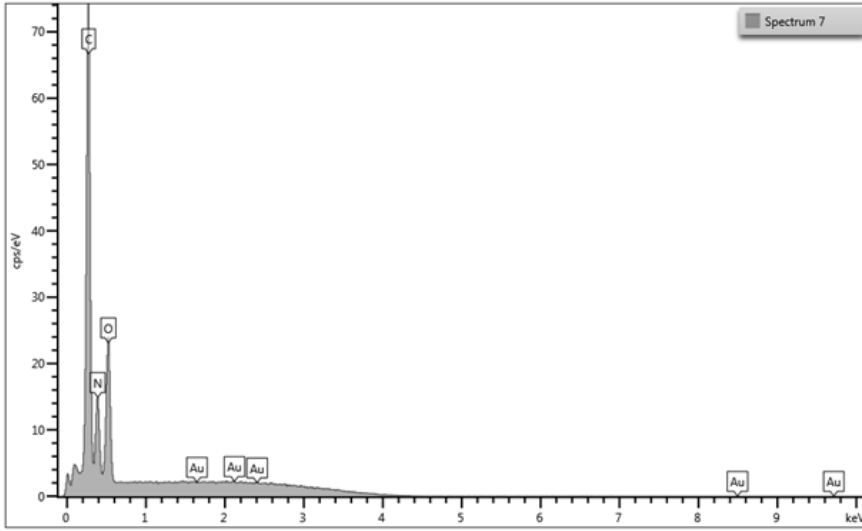
Şekil 4.12. Biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE karşıt elektrotu EDX bileşen yüzdeleri

Beklenildiği gibi bazı bölgelerde altına rastlanılabilmekle biyofonksiyonelleştirme işlemindeki aşamalarda yüzeydeki kalıntılar ve katmanlar yüzeydeki altının görülmesini engelleyebilmektedir. Ayrıca karşıt elektrotta çok azda olsa alüminyuma rastlanılmıştır. Bu da işlem görmemiş haldeki SPGE'nin karşıt elektrot bölgesindeki alüminyum içeriğinden kaynaklanmaktadır.

SPGE'nin çalışma elektrotunun EDX analizi yapılmıştır. Bu analizlere ait görüntüler aşağıda sırasıyla Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de gösterilmiştir.

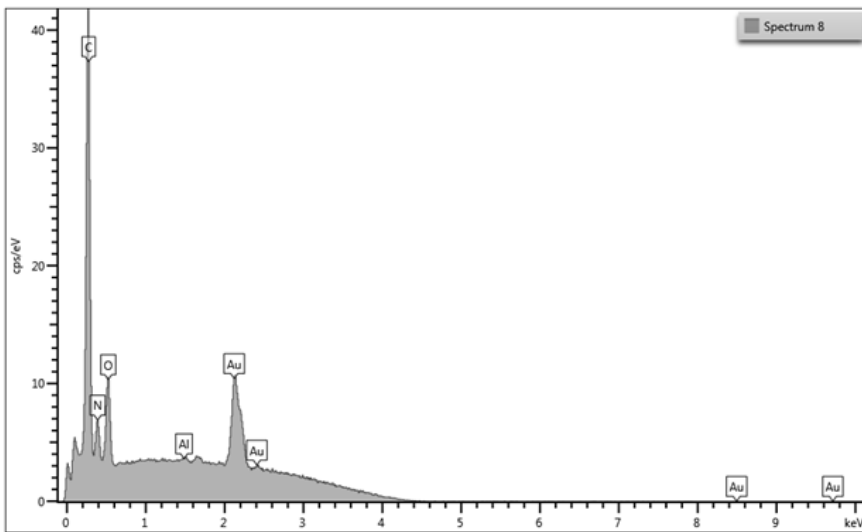


Şekil 4.13. Biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE çalışma elektrotu EDX görüntüsü



Şekil 4.14. Biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE çalışma elektrotu 1.bölge EDX bileşen yüzdeleri

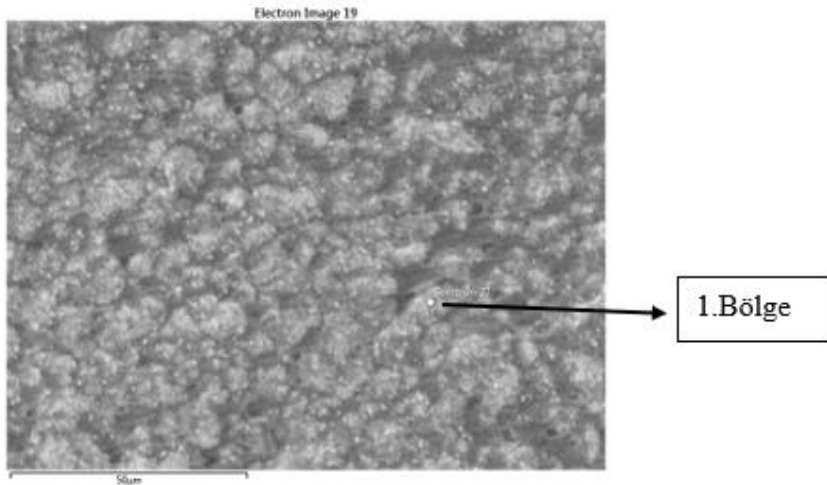
SPGE'nin çalışma elektrotunun 1. bölgesinin EDX analizi yapıldığında %63,32 oranında C, %20,36 oranında O ve %16,32 oranında N olduğu görülmüştür. SPGE'nin çalışma elektrot bölgesinin işlem görmemiş elektrotta görülen yüksek miktarda Au'nun biyofonksiyonelleştirme sonrasında başarılı bir şekilde kaplandığı anlaşılmaktadır. 2. bölgenin EDX analizinde ise %58,93 oranında Au, %33,29 oranında C, %4,43 oranında O ve %3,01 oranında N olduğu görülmüştür.



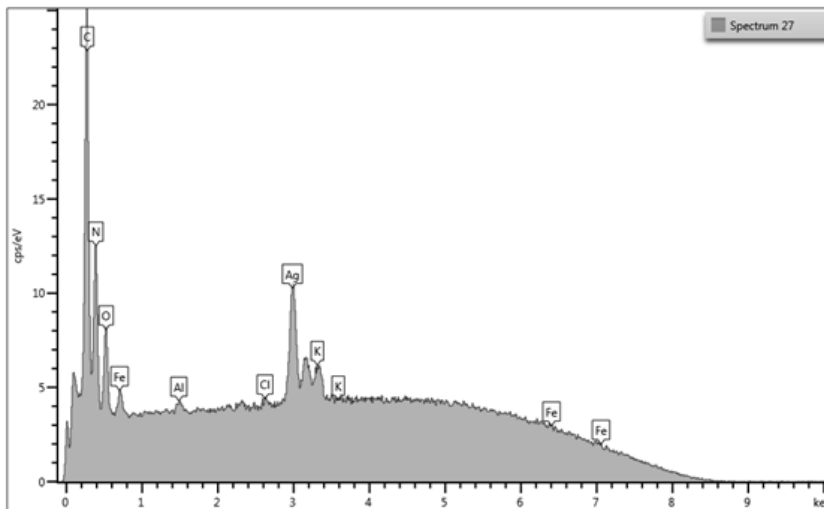
Şekil 4.15. Biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE çalışma elektrotu 2.bölge EDX bileşen yüzdeleri

Bu bölgede belirli oranlarda altın görülmesi biyofonksiyonelleştirme aşamasında çalışma elektrotunun bazı bölgelerinde immobilizasyonun tam anlamıyla başarılı olmadığı anlamını taşımaktadır.

SPGE'nin referans elektrotun 1.bölgesinin EDX analizi yapılmıştır ve analizlere ait görüntüler aşağıda sırasıyla Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de gösterilmiştir. Buna göre bu bölgede %43,23 oranında Ag, %22,84 oranında C, %18,11 oranında N, %8,16 oranında O, %4,51 oranında Potasyum (K), %2,28 oranında Demir (Fe), %0,49 Al ve %0,37 oranında Klor (Cl) olduğu görülmüştür. Beklenildiği gibi en yüksek oranda Ag çıkmasına rağmen, referans elektrot bölgesinde diğer bölgelerde gözlemlenmeyen K, Fe'in biyofonksiyonelleştirme aşamasında ölçümleri almak için kullandığımız  $K_3Fe(CN)_6$  redoks probundan olabileceği düşünülmektedir.

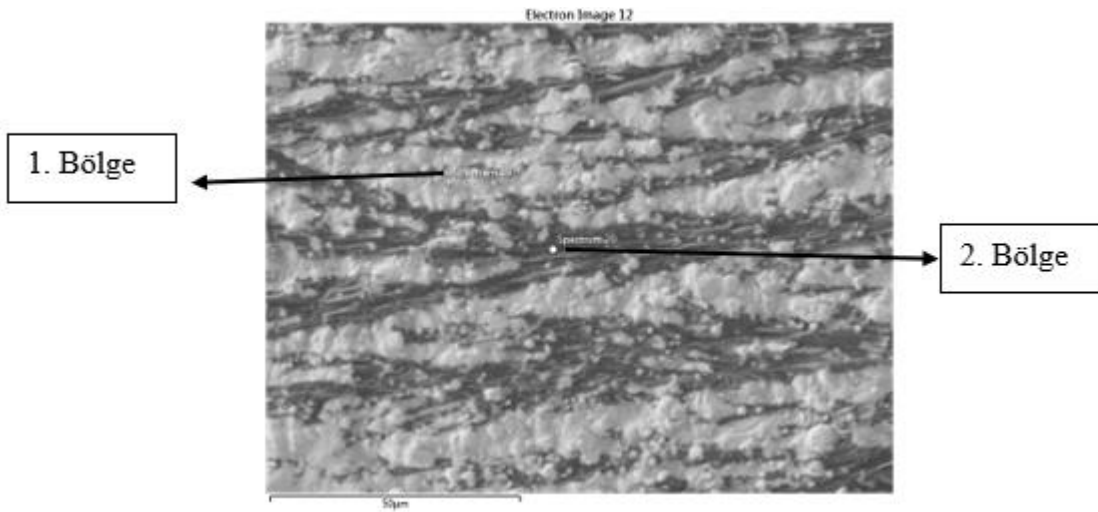


Şekil 4.16. Biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE referans elektrotu EDX görüntüsü

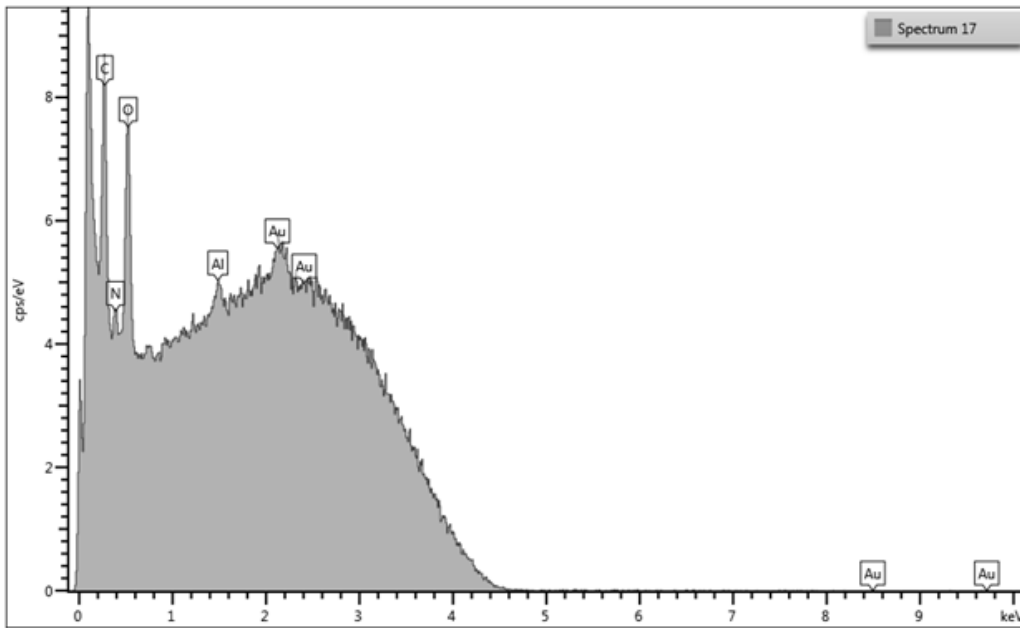


Şekil 4.17. Biyofonksiyonelleştirilmiş SPGE referans elektrotu 1.bölge EDX bileşen yüzdeleri

SPGE'nin rejenerasyon işleminde yüzeyindeki tüm katmanların ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Çalışma elektrotunun 1. bölgesinin EDX analizi yapılmıştır ve elde edilen görüntüler aşağıda sırasıyla Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Burada %87,97 oranında Au, %8,36 oranında C, %3,31 oranında O ve %0,36 oranında N olduğu görülmüştür. İşlem görmemiş haldeki SPGE'nin altın oranının %95,34 iken rejenerasyon işlemi sonrasında altın oranının beklenildiği gibi yükseldiği ve %87,97'ye ulaştığı görülmüştür

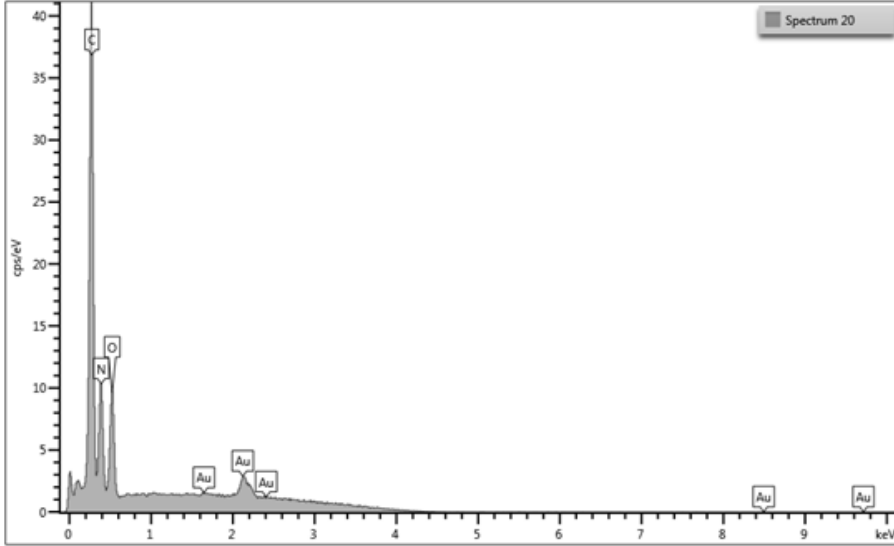


Şekil 4.18. Rejenerasyon işlemi sonrası SPGE çalışma elektrotu EDX görüntüsü



Şekil 4.19. Rejenerasyon işlemi sonrası SPGE çalışma elektrotu 1. bölge EDX bileşen yüzdeleri

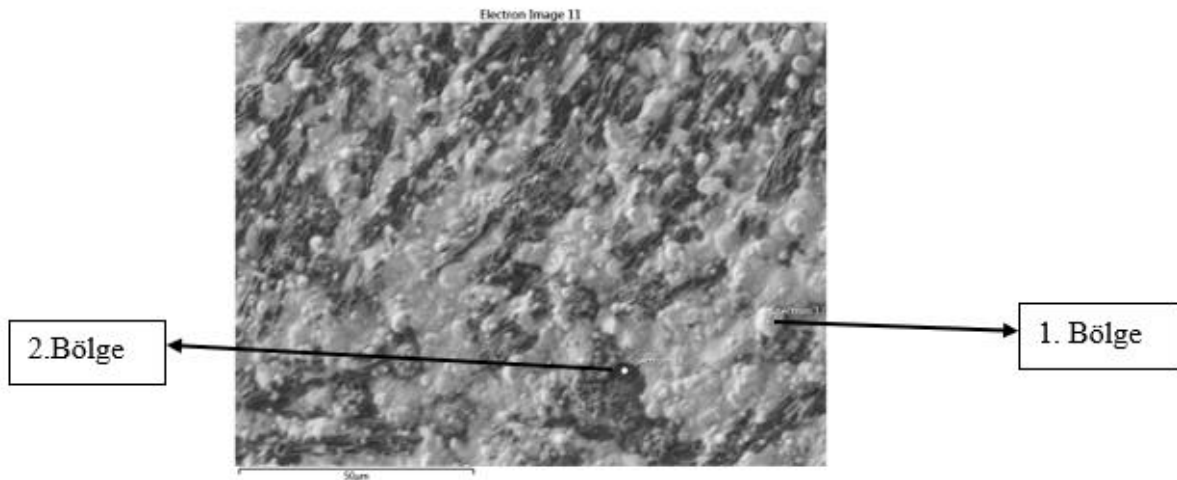
Bununla birlikte rejenerasyon işlemi sonrasında altın miktarının da azaldığı görülmüştür. 2. bölgenin EDX analizinde %51,71 oranında C, %24,25 oranında Au, %14,05 oranında N ve %9,98 oranında O olduğu görülmüştür.



Şekil 4.20. Rejenerasyon işlemi sonrası SPGE çalışma elektrotu 2.bölge EDX bileşen yüzdeleri

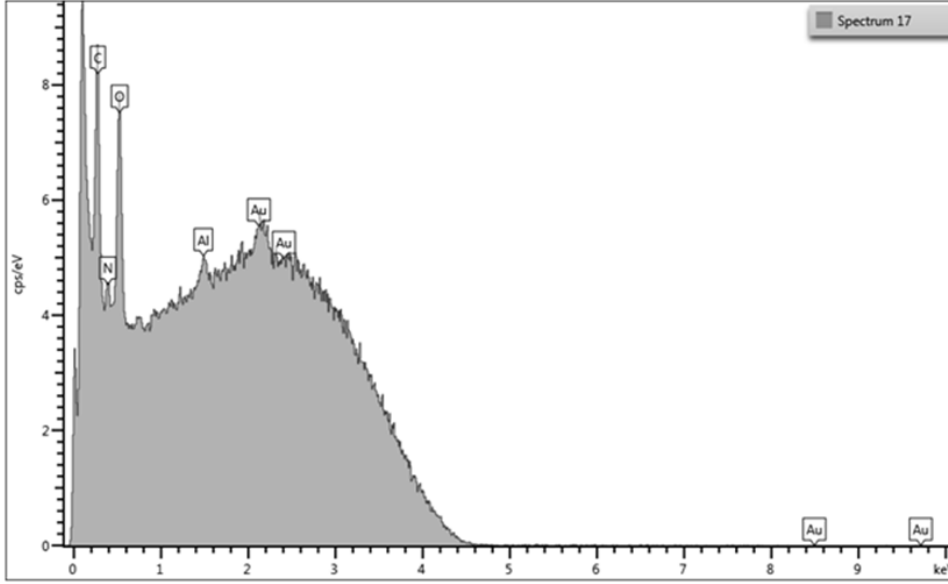
Bu bölgede altın oranının daha az çıkması, rejenerasyon aşamasında bazı spesifik bölgelerde elektrot yüzeyindeki altının aşındığı ya da tam temizlenme olmadığını göstermektedir.

SPGE'nin karşıt elektrotun 1. bölgesinin EDX analizi sonuçları aşağıda sırasıyla Şekil 4.21, Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'de gösterilmiştir



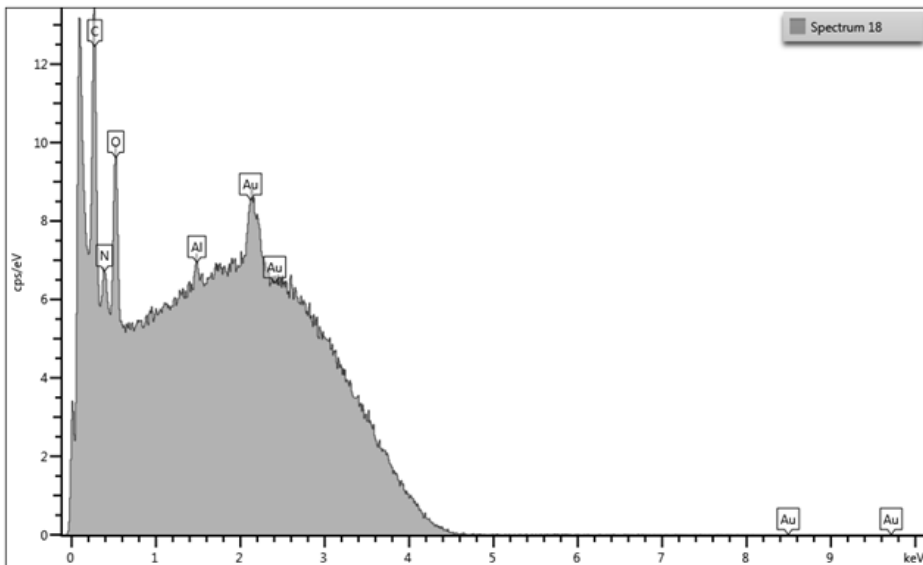
Şekil 4.21. Rejenerasyon işlemi sonrası SPGE karşıt elektrotu EDX görüntüsü

SPGE'nin karşıt elektrotun 1. bölgesinin EDX analizi sonucunda %55,53 oranında Au, %27,42 oranında C, %10,93 oranında O, %3,70 oranında N ve %2,42 oranında Al olduğu görülmüştür.



Şekil 4.22. Rejenerasyon işlemi sonrası SPGE karşıt elektrotu 1.bölge EDX bileşen yüzdeleri

2. bölgenin EDX analizinde ise %43,82 oranında Au, %31,01 oranında C, %18,25 oranında O, %3,91 oranında Al ve %3,01 oranında N olduğu görülmüştür.

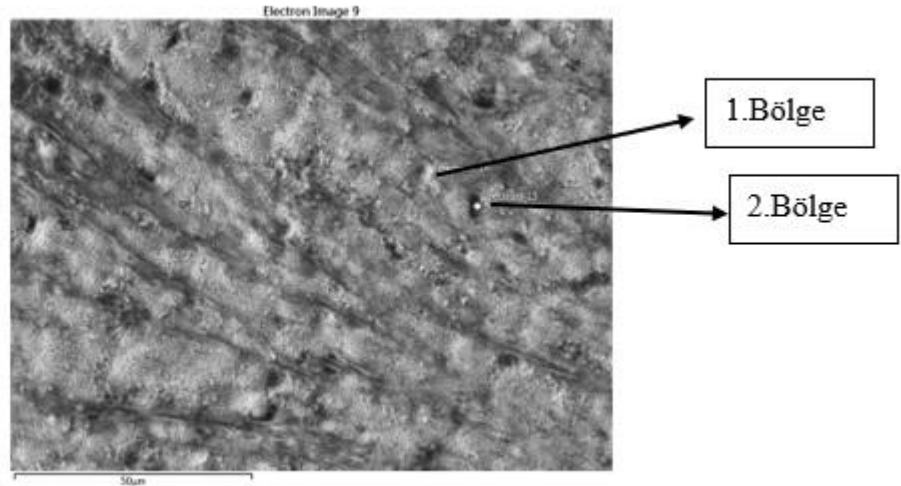


Şekil 4.23. Rejenerasyon işlemi sonrası SPGE karşıt elektrotu 2.bölge EDX bileşen yüzdeleri

İşlem görmemiş haldeki SPGE ile karşılaştırıldığında rejenerasyon sonrası altın oranı %95,05'ten %55 seviyelerine inmiştir. Rejenerasyon aşamasının altın miktarını etkilediği görülebilmektedir. Ayrıca 1 ve 2 bölgeleri karşılaştırıldığında koyu olan 2 bölgesinde Au oranının daha az olduğu, alüminyum oranının ise bir miktar daha fazla olduğu görülmektedir.

Bu durum işlem görmemiş haldeki SPGE'nin sonuçlarının da göz önünde bulundurularak elektrotun her noktada tam anlamı ile aynı karakteristiği göstermediğini anlatmaktadır.

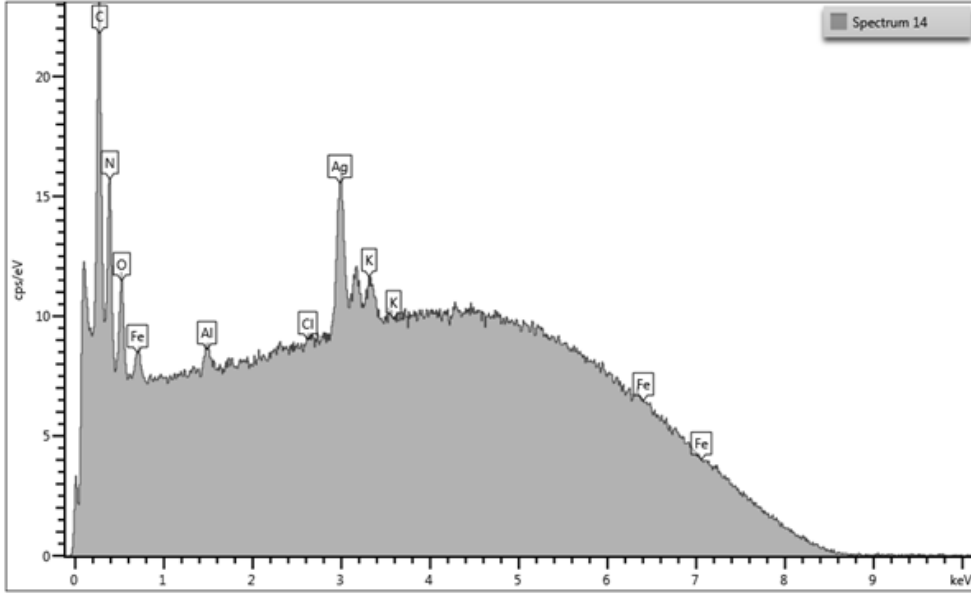
SPGE'nin referans elektrotun Rejenerasyon işlemi sonrası 1. ve 2. bölgelerinin EDX analizi sonuçları aşağıda sırasıyla Şekil 4.24, Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da gösterilmiştir



Şekil 4.24. Rejenerasyon işlemi sonrası SPGE referans elektrotu EDX görüntüsü

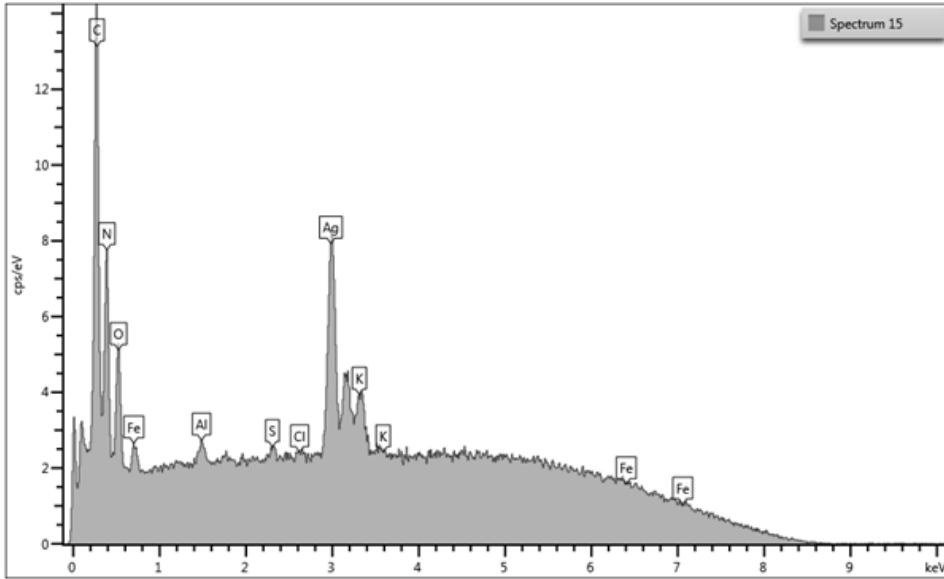
SPGE'nin referans elektrotun 1.bölgesinin EDX analizi yapıldığında %44,52 oranında Ag, %18,09 oranında C, %15,40 oranında N, %9,53 oranında Fe, %7,02 oranında O, %4,23 oranında K, %1,06 Al ve %0,14 oranında Cl olduğu görülmüştür. Burada en yüksek oranda Ag çıkmasına rağmen, referans elektrot bölgesinde diğer bölgelerde gözlemlenmeyen K ve Fe'in biyofonksiyonelleştirme ve rejenerasyon aşamasında ölçümleri almak için kullandığımız  $K_3Fe(CN)_6$  redoks probunun kalıntıları olabileceği düşünülmektedir. 2.bölgenin EDX analizi yapıldığında ise %52,54 oranında Ag, %16,95 oranında C, %15,22 oranında N, %7,60 oranında O, %5,07 oranında K, %1,23 Fe, %0,68 oranında kükürt (S), %0,67 oranında Al ve %0,03 oranında Cl ihtiva ettiği görülmüştür.





Şekil 4.25. Rejenerasyon işlemi sonrası SPGE referans elektrot 1. bölge EDX bileşen yüzdeleri

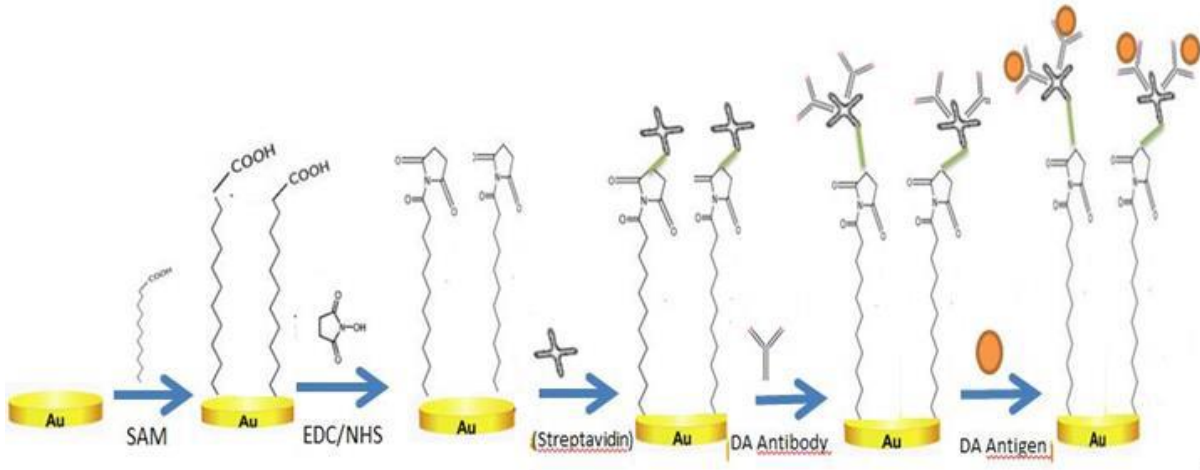
2. bölgenin EDX analizinde daha önce görülmemiş %0,68 oranında S'e rastlanılmıştır. Bunun nedeninin rejenerasyon aşamasında  $H_2SO_4$  kullanılarak CV ile temizleme işleminin sonucu olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.26. Rejenerasyon işlemi sonrası SPGE referans elektrot 2. bölge EDX bileşen yüzdeleri

#### 4.4. Sensör Yüzeyinin Biyofonksiyonelleştirilmesi

SPGE'nin çeşitli modifikasyonlarla elektrot üzerinde oluşturulan katmanlar sayesinde biyofonksiyonelleştirilerek hedef antijeni yakalayacak hale getirilmesine elektrotun immobilizasyonu denir.

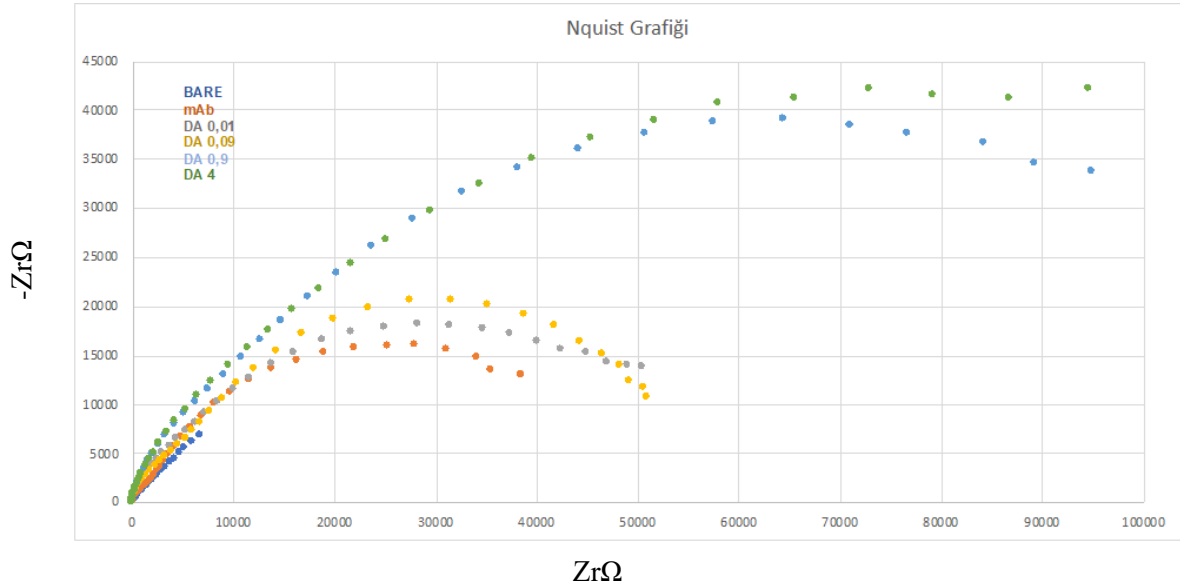


Şekil 4.27. SPGE'nin immobilizasyon prosesinin şematik gösterimi

Yukarıda Şekil 4.27'den anlaşılacağı üzere öncelikle elektrot yüzeyi PBS ile temizlenmiş ve elektrotun üzerine 50 mM  $K_3Fe(CN)_6$  konularak EIS ölçümü alınmıştır. Bu aşamadan sonra elektrot yüzeyinde katmanlar oluşturularak biyofonksiyonelleştirme aşamaları gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalarda öncelikle elektrotların yüzeyinde tiol (-COOH) yapılarını oluşturmak için 10 mM SAM çözeltisi eklenmiş ve reaksiyon tamamlanması için 1 saat süreyle oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. Ardından elektrot yüzeyi bağlanmamış SAM moleküllerinin uzaklaştırılması için etanol ve PBS ile yıkanmıştır. 1:1 oranında 50 mM EDC ve 50 mM NHS karışım çözeltisi elektrot yüzeyine eklenerek 30 dakika boyunca inkübasyon yapılmıştır.

Antikorları yüzeye sabitlemek için ise literatürde geliştirilen yaklaşım göz önüne alınarak 1,25  $\mu\text{g/mL}$  streptavidin çözeltisi ile 1 saat boyunca inkübasyon yapılmış ve ardından PBS ve yıkama tamponu ile elektrot yüzeyi yıkanarak reaksiyona girmemiş moleküller uzaklaştırılmıştır. Bir sonraki aşamada 1,25  $\mu\text{g/mL}$  PBS içerisinde seyreltilen monoklonal anti-domoik asit antikor çözeltisi elektrot yüzeyine eklenerek 1 saat süreyle inkübe edilip reaksiyona girmemiş moleküller yine yıkama tamponu ve PBS ile uzaklaştırılmıştır.

Bu aşamadan sonra 50 mM  $K_3Fe(CN)_6$  redoks probu ile EIS ölçümleri alınmış ve tekrar PBS ile yıkama yapılarak dört farklı konsantrasyonda (0,01 ng/mL; 0,09 ng/mL; 0,90 ng/mL ve 4,00 ng/mL) hazırlanan domoik asit sırasıyla eklenerek 30'ar dakika boyunca inkübe edilmiştir. Her konsantrasyon inkübesi sonrası 50 mM  $K_3Fe(CN)_6$  redoks probu ile EIS ölçümleri yapılmış, Nyquist grafiği oluşturulmuş ve kalibrasyon grafiği çizilmiştir ve aşağıda Şekil 4.28'de gösterilmiştir.



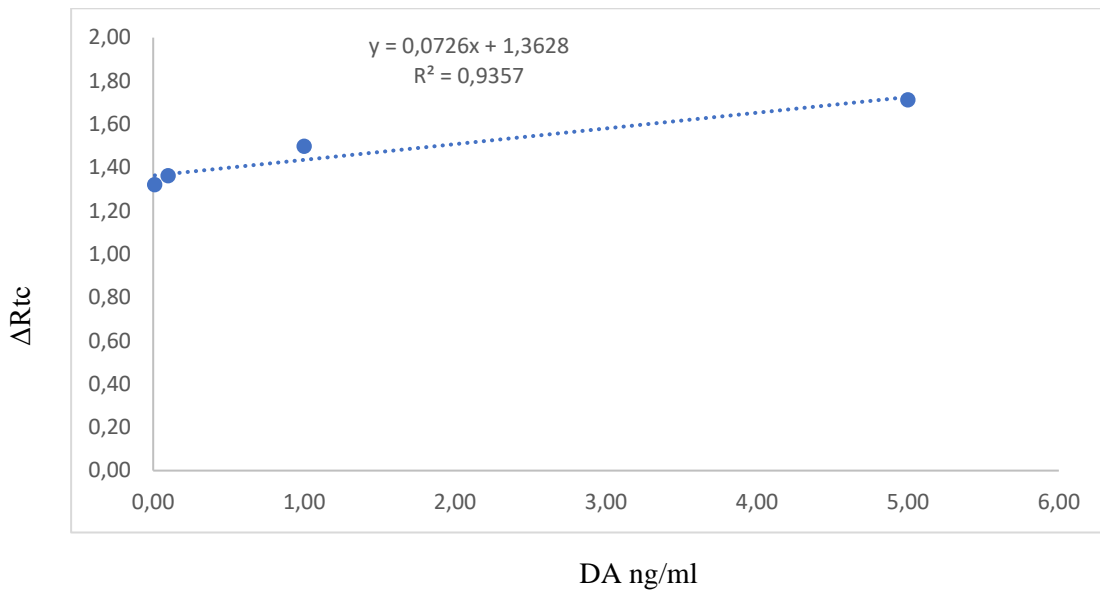
Şekil 4.28. SPGE'nin EIS yöntemi ile farklı DA konsantrasyonlarında 10 kHz – 0,1 Hz frekans aralığındaki Nyquist grafiği

Şekil 4.28'deki Nyquist Grafiği incelendiğinde işlem görmemiş haldeki elektrot üzerine immobilize edilen her bir katman sonrasında empedans değerlerinin arttığı görülmektedir.

Kalibrasyon grafiğini oluşturmak için 10 farklı elektrotun immobilizasyonu yapılmış uygun  $\Delta R_{ctDA} / \Delta R_{ctMab}$  değerleri elde edilerek Şekil 4.29'daki grafik oluşturulmuştur. Dört farklı derişimdeki DA antijenlerinin Rct değeri ile DA-Mab'ın Rct değerlerinin oranı alınarak hesaplanmıştır. DA derişim ve  $\Delta R_{ctDA} / \Delta R_{ctMab}$  değerleri aşağıda Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kalibrasyon eğrisindeki DA derişim ve  $\Delta R_{ctDA} / \Delta R_{ctMab}$  değerleri

Domoik Asit Derişimi	0,01 ng/mL	0,1 ng/mL	1 ng/mL	5 ng/mL
$\Delta R_{ctDA} / \Delta R_{ctMab}$	1,32	1,36	1,46	1,84



Şekil 4.29.  $\Delta R_{ctDA} / \Delta R_{ctMab}$  kalibrasyon eğrisi grafiği

Elde edilen kalibrasyon grafiği incelendiğinde  $R^2$  değerinin 0,9357 çıktığı görülmüştür. Ayrıca biyosensörün tayin sınırı 2,93 ng/mL ve duyarlılığı da 0,0726 olarak bulunmuştur. Bu sonuç da elde edilen biyosensör için oluşturulan kalibrasyon grafiğinin sağlıklı sonuç verdiğini ortaya koymaktadır.

$$\alpha = 0,06452$$

$$S = 0,0726$$

$$LOD = 3,3x \alpha / S$$

$$R_{ct} = \text{Yük transfer direnci}$$

$$R_{ct} = R_{ct} (1) + R_{ct} (2) \text{ (k}\Omega \text{ cm}^2\text{)}$$

Elde edilen sonuçlar aşağıda Çizelge 4.5’de gösterildiği üzere biyosensör uygulamaları DA’nın tespitinde, geleneksel gıda toksin madde analizlerine göre daha yüksek hassasiyette ve daha düşük tayin sınırında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.5. Elde edilen Tayin Sınırı ve Hassasiyet değerleri

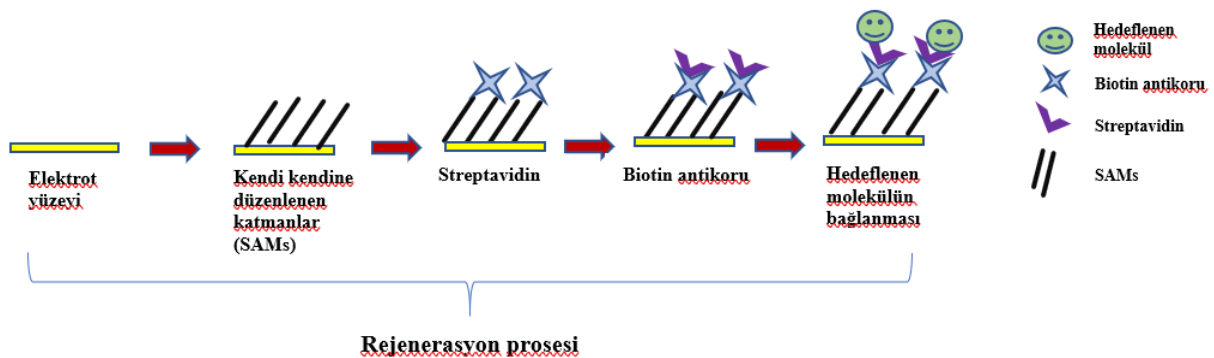
Analiz Adı	Kullanılan Yöntem	Tayin Sınırı	Referans
HPLC	Ayırma kolonu	0,1 mg/g	(Dhoot vd., 2013)
Elisa	Elisa plate	0.02 ng/mL	(Saaed vd., 2017)
Döngüsel voltametri (CV)	Altın bazlı perde baskılı elektrot (Au-SPE)	0.02378 g/mL	(Zuki vd., 2019)
Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)	CB-SPE	0,4 ng/mL	(Nelis vd., 2020)
Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)	Perde baskılı elektrot (SPGE)	2,93 ng/mL	Bu Çalışmanın Sonucudur.

## 4.5. Rejenerasyon Ve Elektrotlerin Yüzey Modifikasyonu

### 4.5.1. SPGE'nin rejenerasyonu

İmmobilizasyonu sağlanmış SPGE'nin birden çok kez kullanımı için elektrotların yüzeyinde bulunan katmanlar ortadan kaldırılarak rejenerere edilmesi ve temizlenmesi gerekir. Bu işlem elektrotların hasar görüp bozulmasına kadar sınırlı tekrarda ve sayıda sürdürülebilir.

SPGE'ye uygulanan 1. Rejenerasyon Prosedüründe; 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi inkübe edilerek CV ile (0,0 V – (+)1,8 V), tarama oranı:100 mV/s, 6 çevrim parametrelerinde temizlenmiştir. Ardından 50 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> çözeltisi inkübe edilerek CV ölçümü ile (1,0 V – (+)1,2 V), tarama oranı: 100 mV/s, 6 çevrim parametrelerinde temizleme işlemi yapılmıştır. Son olarak 50 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> çözeltisi inkübe edilip, 10 kHz – 0,1 Hz frekans aralığında EIS ile ölçüm alınmıştır. Söz konusu işlem in şematik gösterimi Şekil 4.30'da aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.30. SPGE'nin Rejenerasyon prosesi şematik gösterimi

SPGE'ye uygulanan 2. Rejenerasyon Prosedüründe ise öncelikle 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi elektrot yüzeyine inkübe edilerek CV ile (0,0 V – (+)1,4 V), tarama oranı: 50 mV/s, 15 çevrim parametrelerinde temizlenmiştir. Ardından 50 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> çözeltisi inkübe edilip 10 kHz – 0,1 Hz frekans aralığında EIS ile ölçüm alınmıştır.

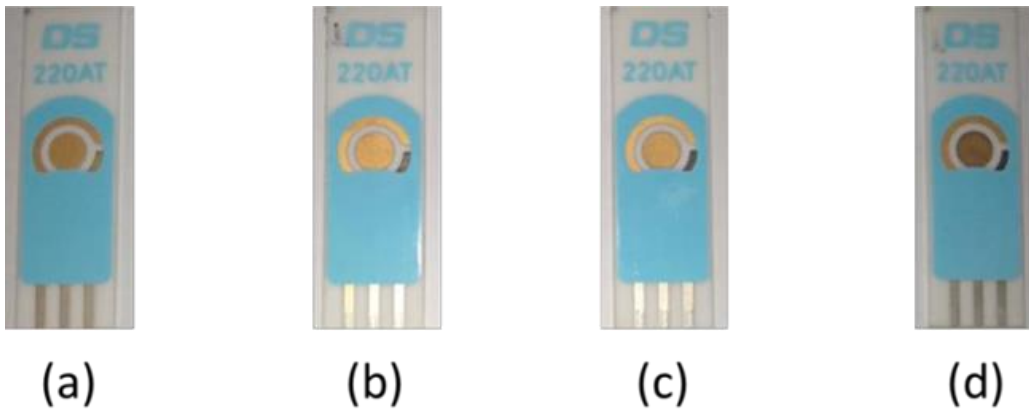
Şekil 4.31'de SPGE'nin 1. ve 2. rejenerasyon prosedürleri sonrası görüntüleri yer almaktadır. 2. Rejenerasyon sonrasında elektrotta kararma ve hafif yanmalar görülmüştür.



Şekil 4.31. SPGE'nin 1.rejenerasyon (sol) ve 2. rejenerasyon (sağ) prosedürü sonrası görüntüleri.

#### 4.5.2. SPGE'nin yüzey modifikasyonu

SPGE'nin elektrokimyasal performansının daha iyi seviyelere çıkarılması için altın nanopartikülleri (AuNPs) kullanılarak yüzey modifikasyonu yapılmıştır.



Şekil 4.32. SPGE'nin (a) İşlem görmemiş, (b) 30 s Au nanopartikül modifikasyonu, (c) 90 s Au nanopartikül modifikasyonu ve (d) 150 s Au nanopartikül modifikasyonu sonrası görüntüleri

Şekil 4.32'de SPGE'nin işlem görmemiş hali ve üç farklı Au modifikasyon süreleri sonrasındaki görüntüleri verilmiştir. İşlem görmemiş elektrot ile karşılaştırıldığında, Au modifikasyonu ile elektrot yüzeyinde renk değişimleri görülmüştür. Ayrıca elektrotlara uygulanan modifikasyon süreleri arttıkça çalışma elektrotu bölgesinde giderek koyulaşan renk değişimi gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin modifikasyon süresindeki artış ile birlikte Au

nanopartikülleri ile elektrot yüzeyi arasında daha fazla meydana gelen etkileşim olduğu düşünülmektedir. Ayrıca modifikasyon süresi arttıkça referans elektrotta da renk değişimleri gözlemlenmiştir. Buradan daha uzun modifikasyon süresinin referans elektrotta değişimlere neden olabileceği anlaşılmaktadır.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada SPGE, yüzeyinde herhangi bir değişiklik yapılmadan immobilize edilmiş ve dört farklı konsantrasyonda hazırlanan DA (0,01 ng/mL; 0,09 ng/mL; 0,90 ng/mL ve 4,00 ng/mL) sırasıyla eklenerek 50 mM  $K_3Fe(CN)_6$  redoks probu ile EIS ölçümleri alınmıştır. Uygun devre elemanlarıyla gerekli hesaplamalar yapılarak Nyquist Grafiği oluşturulmuştur. Grafik incelendiğinde işlem görmemiş elektrot yüzeyine immobilize edilen her bir katmanın empedans değerini arttırdığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.28). DA'nın anti-DA-Mab'a bağlanmasının bir sonucu olarak  $R_{ct}$ 'deki artış SPGE'nin biyofonksiyonelleştirilmesi işleminin başarılı olduğunu göstermiştir.

Kalibrasyon grafiği immobilizasyonu yapılmış 10 farklı SPGE'nin dört farklı derişimdeki DA antijenlerinin  $R_{ct}$  değeri ile DA-Mab'ın  $R_{ct}$  değerlerinin oranı alınarak hesaplanmıştır. Elde edilen kalibrasyon grafiği incelendiğinde  $R^2$  değerinin 0,9357 çıktığı görülmüştür. Ayrıca biyosensörün tayin sınırı 2,93 ng/mL ve duyarlılığı da 0,0726 olarak bulunmuştur.

Bu değerler Çizelge 4.5'de belirtilen yöntemler ile karşılaştırıldığında ticari olarak satılan SPGE'lerin daha hassas ve daha iyi bir tayin sınırında ölçüm yapabileceği görülmüştür.

SPGE'nin rejenerasyon işlemine tabi tutulmasının ardından elektrot bölgesinde oluşan bozulmalar sebebiyle bu işleme uygun olmadığı anlaşılmıştır. SPGE'nin Au nanopartikülleriyle yapılan yüzey modifikasyonunda düzgün ve homojen bir elektrot yüzeyi elde edilmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda geliştirilen biyosensör düşük hata paylarına ve kabul edilebilir hassasiyete sahiptir.

İlerleyen aşamalarda yoğun tüketilen gerçek deniz ürünleri örneklerinde geliştirilen DA toksin biyosensörleri ile analiz yapılabilir nitelikte olacaktır.



## KAYNAKLAR DİZİNİ

Ahammad, A.J.S., Islam, T., Hasan, M. Md., Mozumder, M.N.I., Karim, R., vd., 2018, Reduced Graphene Oxide Screen-Printed FTO as Highly Sensitive Electrodes for Simultaneous Determination of Dopamine and Uric Acid, Journal of The Electrochemical Society, 165, 5, 174-183.

Alıç, T.Y., 2011, Laser Kütle Spektrometresi Kullanılarak Bütan Molekülünün İzomerlerinin Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 63 s. (yayımlanmamış).

Anonim, 2021, <https://diyot.net/ac-devrede-direncr-enduktansx-ve-empedanz>, erişim tarihi: 02.04.2021.

Anonim, 15.01.2020, <https://arum.ogu.edu.tr/Sayfa/Index/80/alan-emisyonlu-taramali-elektron-mikroskobu-fe-sem>, erişim tarihi: 23.11.2020.

Anonim, 2020, <https://www.taek.gov.tr/tr/sik-sorulan-sorular/148-malzeme-teknolojisi-sss/948-taramali-elektron-mikroskobu-sem-nasil-calisir.html>, erişim tarihi: 23.11.2020.

Anonim, 2020, [https://tr.wikipedia.org/wiki/Domoik\\_asit](https://tr.wikipedia.org/wiki/Domoik_asit), erişim tarihi: 21.11.2020.

Anonim, 2020, [https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/88588/mod\\_resource/content/1/Su%20%C3%9Cr%C3%BCnlerinde%20HijyenA%C3%A7%C4%B1k%20Ders%2011..%20Hafta.pdf](https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/88588/mod_resource/content/1/Su%20%C3%9Cr%C3%BCnlerinde%20HijyenA%C3%A7%C4%B1k%20Ders%2011..%20Hafta.pdf), erişim tarihi: 21.11.2020.

Anonim, 2020, [https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/51394/mod\\_resource/content/0/MASS%20spektroskopisi%20-%20Pratik.pdf](https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/51394/mod_resource/content/0/MASS%20spektroskopisi%20-%20Pratik.pdf), erişim tarihi: 19.11.2020.

Anonim,2020,[https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile/php/84790/mod\\_resource/content/0/425-6.pdf](https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile/php/84790/mod_resource/content/0/425-6.pdf), erişim tarihi: 19.11.2020.

Anonim, 2019, <https://www.gamry.com/assets/Uploads/Reference-3000-Operators-annual.pdf>, erişim tarihi: 23.11.2020.

Anonim, 2018, <http://slideplayer.biz.tr/slide/3288092>, erişim tarihi: 19.11.2020.

Anonim, 2018, Anonim <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc>, erişim tarihi: 19.11.2020.

Anonim, 2017, <https://bilimfili.com/atomik-kuvvet-mikroskobu-nedir-nasil-calisir>, erişim tarihi: 23.11.2020.

Anonim, 2016, [http://www.esisresearch.org/Uploads/Documents/2016kutle\\_kb\\_6\\_all.pdf](http://www.esisresearch.org/Uploads/Documents/2016kutle_kb_6_all.pdf), erişim tarihi: 19.11.2020.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Anonim, 2013, [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-Dropsens-screen-printed-electrode\\_fig1\\_258854754](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-Dropsens-screen-printed-electrode_fig1_258854754), erişim tarihi: 20.11.2020.
- Arduini, F., Micheli, L., Moscone, D., Paleschi, G., Piermarini, S., vd., 2016, Electrochemical biosensors based on nanomodified screen-printed electrodes: Recent applications in clinical analysis, *Analytical Chemistry*, 79, 114–126.
- Arslan, E., 2016, Elektrokimyasal Yöntemler İle Monometalik Paladyum Ve Bimetalik Paladyum-Altın Nanopartikül Modifiye Poliprolin Film Elektrotların Geliştirilmesi Ve Analitik Uygulamaları, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 227 s.
- Asensio, L., Gonzalez, I., Garcia, T., Martin, R., 2008, Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Food Control*, 19, 1–8.
- Ayaz, A., Yurttagül, M., Besinlerdeki Toksik Öğeler-1, 2008, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 727, s.7.
- Aydın, E.A., 2007, Bedt-Ttf Temelli Yeni Organik Süperiletkenlerin Sentezleri Ve Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 60 s. (yayınlanmamış).
- Aykut, U., Temiz, H., 2006, Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3, 51-59.
- Bahalla, V., Zazudovich, V., 2011, Self-assembly and sensor response of photosynthetic reaction centers on screen-printed electrodes, *Analytica Chimica Acta*, 707, 184–190.
- Beşergil, B., 2016, [http://besergil.cbu.edu.tr/kutle\\_1.pdf](http://besergil.cbu.edu.tr/kutle_1.pdf).
- Biberoğlu, G., 2003, Kütle Spektrometresi ve Tıp Alanında Kullanımı, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 23, 491-498.
- Boğa, A., Binokay, S., 2010. Gıda Katkı Maddeleri ve Sağlığımıza Etkileri, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 19, 3, 141-154.
- Bolado, P.F., Santos, D.H., Ardisana, P.J.L., Pernia, A.M., Garcia, A.C., 2008, Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes, *Electrochimica Acta*, 53, 3635–3642.
- Bozdağ, M., 2010, Nükleik Asit Tayinine Yönelik Elektrokimyasal Genosensör Dizayını, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 73 s. (yayınlanmamış).

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bulut, Y., 2011, Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış, 6th International Advanced Technologies Symposium Bildiriler Kitabı, 8-10.
- Coşkun, Y., Kafa, Ö., Koçyiğit, Y., Erdoğan, A.T., 2016, Ticari Bir Florfenikol Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) Test Kiti ile Florfenikolün Tespit Edilememesi Durumu, Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 27, 2, 75-81.
- Dhoot, J.S., Del Rosario, A.R., Appel, B.R., Tamplin, B.R., 2013, An Improved HPLC Procedure for Domoic Acid Analysis in Seafood, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 53, 4, 261-268.
- Dolan, L.C., Matulka, R.A., Burdock, G.A., 2010, Naturally Occurring Food Toxins, Toxins, 2, 2289-2332.
- Döner, A., 2012, Nikel-Kadmiyum Kaplı Grafit Elektrotta Metanol Oksidasyonunun Araştırılması, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 186 s.
- Erkmen, O., 2010, Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 53, 220-235.
- Eser, B., Dinçel, A.A., 2018, Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları, Journal of Health Services and Education, 2, 2, 51-57.
- Esmer, Ö.K., Melikoğlu, A.Y., 2015, Gıda Güvenliğinin Sağlanmasında Radyo Frekanslı Tanımlama Teknolojisinin Rolü, Akademik Gıda, 13, 1, 72-80.
- Gonzalez, R.G., Abedul, M.T.F., Pernia, A., Garcia, A.C., Electrochemical characterization of different screen-printed gold electrodes, Electrochimica Acta, 53, 3242–3249.
- Güler, Ü.A., Can, Ö.P., 2017, Kimyasal Kontaminantların Çevre Sağlığı ve Gıda Güvenliği Üzerine Etkileri, Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 2, 1, 170-195.
- Gündüz, Z.Y., 2013, Katı Faz Mikroekstraksiyon Yöntemi İle Pestisitlerin Gaz Kromatografisinde Tayini, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 111 s. (yayınlanmamış).
- Huang, X., Zhu, Y., Kianfar, E., 2021, Nano Biosensors: properties, applications and Electrochemical Techniques, Journals of Materials Research and Technology, doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.03.048 (in press).
- Karabal, A., 2019, Gıda Mevzuatı ve Gıda Güvenliği, International Journal of Social and Humanities Sciences (IJSHS), 3, 1, 179-198.
- Keener, L., 2001, Chemical And Physical Hazards: The “Other” Food Safety Risks, <https://www.foodsafetyprofessionals.com/www.foodsafetyprofessionals.com/www.foodsafetyprofessionals.com/keenerhazards.pdf>, erişim tarihi: 18.11.2020.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kostera, D., Dua, G., Battistel, A., Mantia, F.L., 2017, Dynamic impedance spectroscopy using dynamic multi-frequency analysis: A theoretical and experimental investigation, *Electrochimica Acta*, 246, 553–563.
- Kökbaşı U., Tuli A., Kayrın L., 2003, Biosensors and their Medical Applications, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 22, 499-513.
- Krasikov, V.D., 2003, Contemporary Planar Chromatography, *Journal of Analytical Chemistry*, 58, 8, 706–719.
- Li, Y., 2006, Biosensors, Hardware, A. M. St. Joseph (Ed.), *CIGR Handbook of Agricultural Engineering*, p.52-93.
- Ligler, F.S., Taitt, C.R., Shriver-Lake, L.C., Sapsford KE, Shubin, Y., vd., 2003, Array biosensor for detection of toxins, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, 3, 469-477.
- Nelis, J.L., Migliorelli, D., Jafari, S., Generelli, S., Franco, J.L., vd., 2020, The benefits of carbon black, gold and magnetic nanomaterials for point-of-harvest electrochemical quantification of domoic acid, *Microchimica Acta*, 187, 164, 1-11.
- Nunez, O., Moyano, E., Galceran, M.T., 2005, LC–MS/MS analysis of organic toxics in food, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24, 7, 683-703.
- Oruç, H.H., 2005, Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri, *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med*, 24, 1-2-3-4, 105-110.
- Özkaya, İ., 2004, Gıda Katkı Maddeleri ve Toksinler, *Sağlıkta ve Hastalıkta Beslenme Sempozyum Dizisi*, 41, 39-44.
- Piroozmand, F., Mohammadipanah, F., Faridbod, F., *Emerging biosensors in detection of natural products, Synthetic and Systems Biotechnology*, 5, 293–303.
- Saaed, A.F., Awan, S.A., Ling, S., Wang, R., Wang, S., 2017, Domoic acid: Attributes, exposure risks, innovative detection techniques and therapeutics, *Algal Research*, 24, 97-110.
- Schirone, M., Visciano, P., Tofalo, R., Suzzi, G., 2017, Editorial: Biological Hazards in Food, *Front.Microbiol.*,7:2154,<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.02154/full>, erişim tarihi: 18.11.2020.
- Sezgin, A.C., Özkaya, F.D., 2014, Toplu Beslenme Sistemlerine Genel Bir Bakış, *Akademik Gıda*, 12, 1, 124-128.
- Şerey, G., 2015, [http://web.hitit.edu.tr/dersnotlari/gokcemerey\\_13.10.2015\\_9L6X.pdf](http://web.hitit.edu.tr/dersnotlari/gokcemerey_13.10.2015_9L6X.pdf).

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tamer, S., 2020, Yüksek Performanslı Moo/Cnt Hibrit Süperkapasitör Üretimi Ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Karabük Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, 66 s. (yayımlanmamış).
- Terzi, G., Deniz Ürünlerine Bağlı Zehirlenmeler ve Etkileri, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 65, 1, 51-60.
- Tüylek, Z., 2017, Biyosensörler ve Nanoteknolojik Etkileşim, BEÜ Fen Bilimleri Dergisi, 6, 2, 71-80.
- Uyar, İ., Güven, Ö., Artıktay, I., 2020, <http://kisi.deu.edu.tr/bulent.cavas/ders/bok10.pdf>, erişim tarihi: 20.11.2020.
- Zuki, H.M., Nasri, N.M., Muhamad, F.N., Jusoh, N.S., Ahmad, A., vd., 2019, Modification of gold screen printed electrode for the detection of toxic domoic acid, Malaysian Journal of Analytical Sciences, 23, 6, 991 – 1000.