

**Atf İçin:** Canbay, E., Kundakçı, Ş., Yıldız, E., Çelik Canbay, Z., Doğan, S. ve Akyılmaz, E. (2023). Rutenyum Mediyatör Kompleksi Temelli Galaktoz Biyosensörü Geliştirilmesi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2769-2779.

**To Cite:** Canbay, E., Kundakçı, Ş., Yıldız, E., Çelik Canbay, Z., Doğan, S. & Akyılmaz, E. (2023). Development of Galactose Biosensor Based on Ruthenium Mediator Complex. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2769-2779.

### Rutenyum Mediyatör Kompleksi Temelli Galaktoz Biyosensörü Geliştirilmesi

Erhan CANBAY<sup>1</sup>, Sevval KUNDAKÇI<sup>2</sup>, Ezginur YILDIZ<sup>2</sup>, Zeynep ÇELİK CANBAY<sup>3</sup>, Serçin DOĞAN<sup>2</sup>, Erol AKYILMAZ<sup>3</sup>.

#### Öne Çıkanlar:

- Rutenyum mediyatör kompleksli karbon pasta elektrot kullanıldı.
- Amperometrik galaktoz biyosensörü geliştirildi.
- Örnek uygulaması liyofilize serum ve süt örneklerinde deneme yapıldı.

#### Anahtar Kelimeler:

- Rutenyum mediyatör kompleksi
- Galaktoz
- Galaktozemi
- Biyosensör
- Amperometri

#### ÖZET:

Galaktoz seviyesinin ölçümü, galaktozemi ve galaktoz intoleransı açısından klinik önem taşır. Özellikle yenidoğanlarda hemen tespit edilmemesi ölümcül sonuçlar doğurabilir. Teşhis konduktan sonra da galaktozun diyetten çıkarılması gerekir. Dolayısıyla hem kan hem de diyetle özellikle süt ve süt ürünlerinde galaktozun tayini büyük önem taşır. Literatür verilerinde galaktoz tayini için geliştirilen yöntemler spektrofotometre, kromatografi, kütle spektrometresi gibi ön işlem ve pahalı ekipman gerektiren, zaman alıcı ve nispeten yavaş yöntemlerdir. Bu çalışmanın amacını da galaktoz tayini için hızlı, spesifik, ucuz elektrokimyasal bir biyosensör sistemi geliştirilmesi oluşturmaktadır. Biyokomponent olarak Galaktoz Oksidaz (GaOX) enzimi kullanılan bu çalışmada, çalışma elektrodu olarak Rutenyum mediyatör kompleksi içeren karbon pasta elektrot kullanılmıştır. GaOX enzimi pasta yapısı içerisinde immobilize edilmiştir. Çalışmanın özgünlüğünü pasta yapısı içerisinde kullanılan Rutenyum mediyatör sisteminin kullanılması oluşturmaktadır. Elektrot yapımı aşamaları döngüsel voltammetri (CV) yöntemiyle karakterize edilirken, optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları 0&0.9 V arası DP, ve 0.5 V'ta amperometrik ölçümler yoluyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda ayrıca çalışma tamponu içerisinde 1 mM p-benzokinin mediyatör sistemi kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonu optimum pH 6,5, optimum sıcaklık ise 30 °C olarak bulunmuştur. Geliştirilen biyosensörün doğrusal tayin aralığı 0.05 – 1 mM arası bulunurken, tekrarlanabilirliği 0.25 mM galaktoz için ortalama 0.24 mM, standart sapma ± 0.021 ve varyasyon katsayısı (%VK) %8,3 olarak bulunmuştur. Girişim etkisi denemesinde herhangi bir girişim gözlenmemiştir. Örnek denemesi liyofilize serum ve laktosuz süt örneklerinde yapılmış ve % geri elde hesaplanmıştır. Bu projede kullanılan Rutenyum mediyatör kompleksinin biyosensör yapımında kullanılmasına literatürde çok az rastlanılmış olmakla birlikte bu çalışmayla ilk defa bir galaktoz biyosensöründe ve ilk defa bir karbon pasta elektrotla kullanımı gerçekleştirilmiştir.

### Development of Galactose Biosensor Based on Ruthenium Mediator Complex

#### Highlights:

- Ruthenium mediator complexed carbon paste electrode was used.
- An amperometric galactose biosensor was developed.
- Sample analysis were conducted on lyophilized serum and milk samples.

#### Keywords:

- Ruthenium mediator complex
- Galactose
- Galactosemia
- Biosensor
- Amperometry

#### ABSTRACT:

Measurement of galactose level is of clinical significance in terms of galactosemia and galactose intolerance. Especially in newborns, it can have fatal consequences if it is not detected immediately. After diagnosis, galactose should be removed from the diet. Therefore, the determination of galactose in both blood and diet, especially milk and dairy products, is of great importance. In the literature data, the methods developed for galactose determination are time consuming and relatively slow methods that require pre-processing and expensive equipment such as spectrophotometer, chromatography, mass spectrometer. The aim of this study is to develop a fast, specific, inexpensive electrochemical biosensor system for galactose determination. In this study, in which Galactose Oxidase (GaOX) enzyme was used as a biocomponent, a carbon paste electrode containing a ruthenium mediator complex was used as the working electrode. GaOX enzyme was immobilized in the paste structure. The originality of the study is the use of the Ruthenium mediator system used in the paste structure. Electrode construction stages were characterized by cyclic voltammetry (CV) method, while optimization and characterization studies were carried out by means of DP between 0 & 0.9 V and amperometric measurements at 0.5 V. The studies also used a 1 mM p-benzoquinone mediator system in working buffer. As a result of optimization studies, optimum pH was found to be 6.5 and optimum temperature was 30 °C. While the linear detection range of the developed biosensor was found between 0.05- mM, the repeatability was found to be 0.24 mM on average, the standard deviation ± 0.021 and the coefficient of variation (CV%) as 8.3% for 0.25 mM galactose. No interference was observed in the interference effect trial. Sample analysis was made on lyophilized serum and lactose-free milk samples and % recovery was calculated. The use of the Ruthenium mediator complex used in this project in the production of biosensors has been rarely encountered in the literature. However, with this study, it was used for the first time in a galactose biosensor and for the first time with a carbon paste electrode.

<sup>1</sup> Erhan CANBAY (Orcid ID: 0000-0003-0948-1675), Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup> Sevval KUNDAKÇI (Orcid ID: 0000-0002-2566-4618), Ezginur YILDIZ (Orcid ID: 0000-0003-1815-6970), Serçin DOĞAN (Orcid ID: 0000-0002-9735-8142), Özel Ege Lisesi, İzmir, Türkiye

<sup>3</sup> Zeynep ÇELİK CANBAY (Orcid ID: 0000-0001-7159-1088), Erol AKYILMAZ (Orcid ID: 0000-0003-4108-2738), Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Erhan CANBAY, e-mail: [erhancanbay87@gmail.com](mailto:erhancanbay87@gmail.com) ; [erhan.canbay@ege.edu.tr](mailto:erhan.canbay@ege.edu.tr)

Bu çalışma Tübitak 2204-A Lise Öğrenci Araştırma Projeleri Yarışmasında yarışmış ve Ege Bölge elemelerine kalan 8 projeden biridir.

## GİRİŞ

Galaktoz normalde üç enzimin koordineli aktiviteleri yoluyla glikoza metabolize edilir: galaktokinaz (GALK), galaktoz-1-fosfat uridil transferaz (GALT) ve üridin difosfoglukoz 4-epimeraz (GALE) (Anderson, 2018). Yüksek konsantrasyonlarda galaktoz ve metabolitleri memeliler için toksiktir (Anderson, 2018). Galaktokinaz ve GALT'ın ve belki de nadiren epimerazın kalıtsal eksiklikleri, galaktoz içermeyen bir diyetin erken tanınması ve kurumuyla önlenebilecek klinik bozukluklara neden olur (Beutler, 1991). Galaktoz, sağlıklı kişilerde maksimum 0.28 mM ve 5 günden daha küçük yenidoğanlarda 1.11mM'de seviyesinde bulunur (Connell, 2012). Yenidoğan bebeklerde 1.11 mM'dan yüksek galaktoz seviyeleri ölümcül olabilir (Adam vd., 2015; Beutler, 1991). Galaktozemi galaktoz metabolizmasındaki enzimlerden birinin eksikliği durumunda ortaya çıkan kalıtsal bir metabolik bozukluk olup galaktoz birikimi ile karakterizedir (Anderson, 2018; Beutler, 1991). Yenidoğan döneminde teşhis edilmeyen ve dolayısıyla tedavi edilmeyen hastalarda yetersiz beslenme, gelişememe, sarılık, karaciğer hastalığı, katarakt, E. coli sepsisi ve yenidoğan ölümü gerçekleşebilir (Adam vd., 2015; Vaca vd., 1978). Galaktozeminin tedavisi, süt ve süt ürünlerini içeren diyet galaktozunun kısıtlanmasını içerir (Beutler, 1991; Connell, 2012).

Biyosensör sistemlerinde kullanılan redoks mediyatörleri reaksiyonu hızlandırırken enzimin de rejenerasyonunu sağlarlar. Literatüre bakıldığında ferrisyanür, ferrosen, benzokinon, metil violojen gibi çok sayıda mediyatör sistemi biyosensör sistemlerinde kullanılmıştır (Cosnier, 2014; Sohail & Adeloju, 2016; Turner, 2013). Osmiyum ve rutenyum komplekslerinin redox mediyatörü olarak kullanıldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Akyılmaz vd., 2010; Marazuela vd., 1997; Ryabov vd., 2001). Özellikle  $[Ru(XX)_2Y_2]$  yapısında XX'in 1,2-bypiridine, Y'nin ise asit ligandı olduğu türleri oksiredüktazlarla hızlı bir şekilde reaksiyona girmiştir (Akyılmaz vd., 2010). Ne var ki rutenyum mediyatör komplekslerinin kullanıldığı çalışmalar sınırlı olmakla birlikte Galaktoz Oksidaz ile kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Galaktoz tayini için önceki yöntemler arasında kolorimetri (Kim vd., 2012) , kütle spektrometri (Li vd., 2011) , ince tabaka kromatografisi (Pruden vd., 1975) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Gross & Acosta, 1991; Hu vd., 1995) bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemler maliyetli, zaman alıcıdır ve yüksek girişim etkisi ile (özellikle kolorimetrik yöntem için) yeterince spesifik değildir, bu nedenle bu sorunların üstesinden gelmek için galaktoz tayini için yapılan biyosensörler diğer analitler için olduğu gibi galaktoz tayini için de büyük ilgi çekmektedir. Özellikle yeni mediyatör sistemleri, karbon nanotüpler, nanopartiküllerin kullanımıyla biyosensörlerin hassasiyet ve seçicilikleri artmıştır (Canbay & Akyılmaz, 2014; Karunakaran vd., 2015; Mulchandani & Pan, 1999; Turner, 2013). Bir biyosensör, bir biyolojik algılama elemanını bir dönüştürücü ile birleştirerek analit konsantrasyonuyla orantılı bir sinyal üretir (Karunakaran vd., 2015; Nikolelis & Nikoleli, 2018). Biyosensörlerin kullanımı sadece laboratuvarında değil ev, sokak, arazi, hastane hemen her yerdedir. Glukoz oksidazın kullanıldığı glukoz biyosensörleri ilk ticarileşen türleri olmakla birlikte bugün birçok analit için ticarileşen biyosensör vardır. Bütün bu biyosensörlerin ortak noktası öncelikle laboratuvarında oluşturulan yöntem çalışmalarıyla başlamasıdır. Sonra optimizasyon çalışmaları yapılır, yöntemin doğruluğu, kesinliği, girişim etkisi ve stabilitesi belirlendikten sonra piyasanın da o analit için talebi doğrultusunda ticarileşir. Biyosensörler sayesinde bir hasta bir damla kan alabilir ve glikoz konsantrasyonunu bir dakikadan daha kısa sürede okuyabilir. Biyosensörler sadece analitleri tanımlamak ve ölçmek için değil, aynı zamanda çok düşük bir konsantrasyonda bile kompleks bileşiklerde bulunan spesifik moleküllerin taranmasında da kullanılabilir. Bu özellik, analitik araştırma, gıda ve kimya endüstrileri, kirlilik kontrolü , süreç izleme ve klinik tanı alanlarında

faydalarını sağlamıştır. Biyosensörler basitliği, hızlı tepkisi, göreceli düşük maliyeti, sürekli izlenmesi ve minyatürleştirilmesi nedeniyle tamamlayıcı bir araç olarak düşünülebilir (Farré & Barceló, 2007; Karunakaran vd., 2015; Scheller vd., 1985). Galaktoz oksidaz galaktoz biyosensörleri yapımında en fazla kullanılan enzimdir (Evik vd., 2010; Kanyong vd., 2013; Tkac vd., 2007; Xie vd., 2016). Galaktoz oksidaz (GaOX) enzimi galaktozu oksijen varlığında yükseltirken açığa  $H_2O_2$  çıkar.  $H_2O_2$  elektroaktif bir türdür ve birçok elektrotla 0.7 V'ta yükseltgenmesi izlenebilir. Galaktoz biyosensörlerinin birçoğu bu prensiple çalışır (Tkac vd., 2007). Fakat 0.7 V ürik asit, askorbik asit gibi kolay okside olabilen türler için girişime açık bir potansiyeldir. Bu potansiyeli düşürmek için mediyatör sistemleri kullanılır ki bu da ikinci nesil biyosensörlerin çalışma prensibini oluşturmaktadır (Karunakaran vd., 2015). Diğer katı elektrotların (Altın, Camımsı karbon, Platin.vb) yanında karbon pasta elektrotların avantajı hızlı hazırlanabilmeleri, ucuz olmaları, yüzeyinin çizilme sorunu olmaması, mediyatör ve biyoaktif yapının pasta yapısı içerisinde immobilize edilme kolaylığı gibi birçok avantajı vardır. Dezavantajı ise diğer katı elektrotlara nazaran tersinirliğinin nispeten düşük olması, yüksek potansiyelerde yükseltgenme -indirgenme yapması sayılabilir. Fakat bu sorun pasta yapısı içerisinde, nanopartiküllerin (Şvancara vd., 2009), nanotüplerin (Zhang vd., 2011), grafenin, iyonik sıvıların (Canbay vd., 2014) ve mediyatörlerin kullanılması ile giderilebilmektedir.

Özetle bu çalışmanın konusunu galaktoz tayinine yönelik Rutenyum mediyatör kompleksi temelli hızlı, spesifik, kolay hazırlanan, ucuz bir biyosensör sistemi geliştirmek oluşturmaktadır. Bu proje kapsamında kullanılacak olan rutenyum mediyatör kompleksi (2,2'-bipyridine) (chloro)(p-cymene)rutenium(II)]chloride) literatür verilerine göre ikinci kez kullanılacak olup karbon pasta elektrot yapısı içinde ve galaktoz tayinine yönelik olması ilk defa bu çalışma da gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın özgün yanını da bu oluşturmaktadır.

## MATERYAL VE METOT

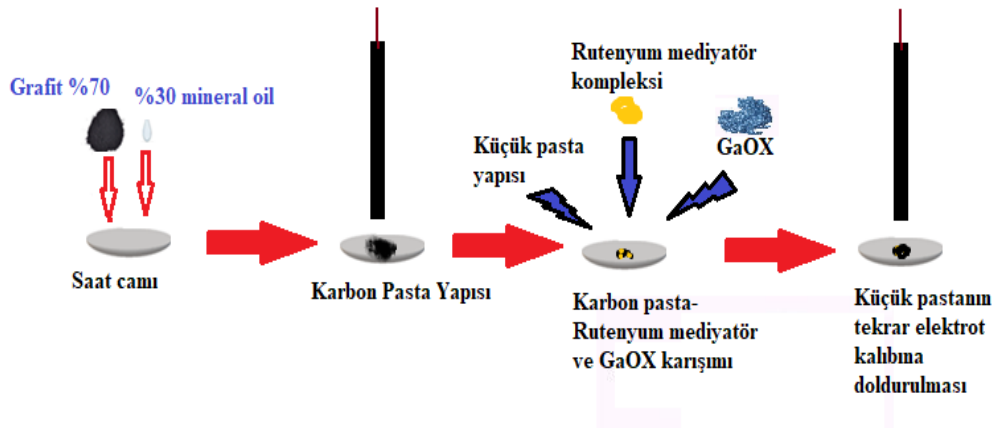
### Kimyasallar ve Ekipmanlar

Galaktoz oksidaz (1000 U veya 3000 U/g), galaktoz, grafit tozu, mineral yağı, grafit tozu (%99.99 saflıkta), potasyum fosfat dibazik, potasyum fosfat monobazik, ferrisiyanür, ferrosiyanür, p-benzokinon Sigma (U.S.A)'den temin edilmiştir. Rutenyum mediyatör kompleksi (2,2'-bipyridine)(chloro)(p-cymene)rutenium(II)]chloride Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Anorganik Kimya Anabilim Dalında Lalrempuia ve ark. bulduğu yöntemle sentezlenmiştir (Lalrempuia vd., 2005). Denemelerde Palm Sens Ins. (Hollanda) marka potansiyostat; karbon pasta elektrot kalıbı, CHI 111 model Ag/AgCl doygun referans elektrodu, CHI 115 model Pt yardımcı elektrodu; P1000 otomatik pipetleri, Nuve (TR) marka termostat, Yellow line manyetik karıştırıcı, Sonikatör LC 30 kullanıldı.

### Yöntem

#### Biyosensörün hazırlanması

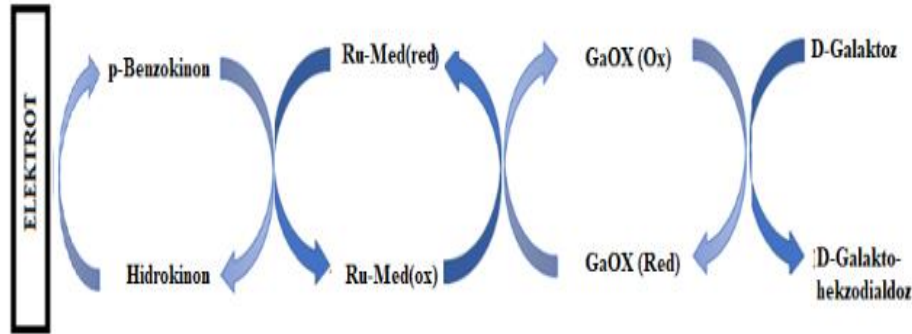
Öncelikle grafit tozundan %70 mineral yağından %30 olacak tartımlar yapılarak bir saat camı içine eklenir. Bu yapı birbiri içerisinde iyice karışana ve macun kıvamında olana kadar karıştırılarak karbon pasta elektrot (CPE) oluşturulur. Elektrot yüzeyi temiz bir A4 kağıt üzerinde oval bir biçimde hareket ettirilerek elektrot yüzeyi düz ve pürüzsüz hale getirilir. Bu elektrodun kısmındaki küçük pasta yapısı tekrar saat camına dökülür. Bu küçük pastaya 4 mg olacak şekilde rutenyum mediyatör kompleksi ve 5 mg (yaklaşık 15 U) GaOX eklenerek pasta yapısı içerisinde iyice dağılına kadar karıştırılır. Karbon pasta elektrot kabı tekrar bu küçük pasta yapısına batırılarak pastanın elektrot içine girmesi sağlanır. Ardından elektrot tekrar A4 kağıt yüzeyi üzerinde hareket ettirilerek oval ve pürüzsüz yapı elde edilir (CPE-RuMed-GaOX). Biyosensörün şematik gösterimi Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Biyosensör hazırlanmasının şematik gösterimi

### Biyosensörün çalışma prensibi

Geliştirilen biyosensörün çalışma prensibi şekil 2’de şematize edilmiştir. Buna göre GaOX D-Galaktozu D-Galakto-hekzodialdoza yükseltir. Rutenyum mediyatör (Ru-Med) kompleksi GaOX’u tekrar okside haline çevirirken kendisi indirgenir. Ru-Med rejenere etmek ve elektron transferini hızlandırmak için benzokinon çözelti içerisindeki mediyatör olarak kullanılmıştır. Benzokinon Ru-Med’den aldığı elektronlarla hidrokinona indirgenirken hidrokinonun elektrot yüzeyinde yükseltgenmesi ile anodik pikte artış gözlenir. Yapılan çalışmalarda tampon olarak 0.1 M KCl ve 1 mM benzokinon içeren pH:6 fosfat tamponu kullanılmıştır. Ag/AgCl referans elektrodu, Pt tel yardımcı elektrot ve CPE-RuMed-GaOX elektrodu ise çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır.

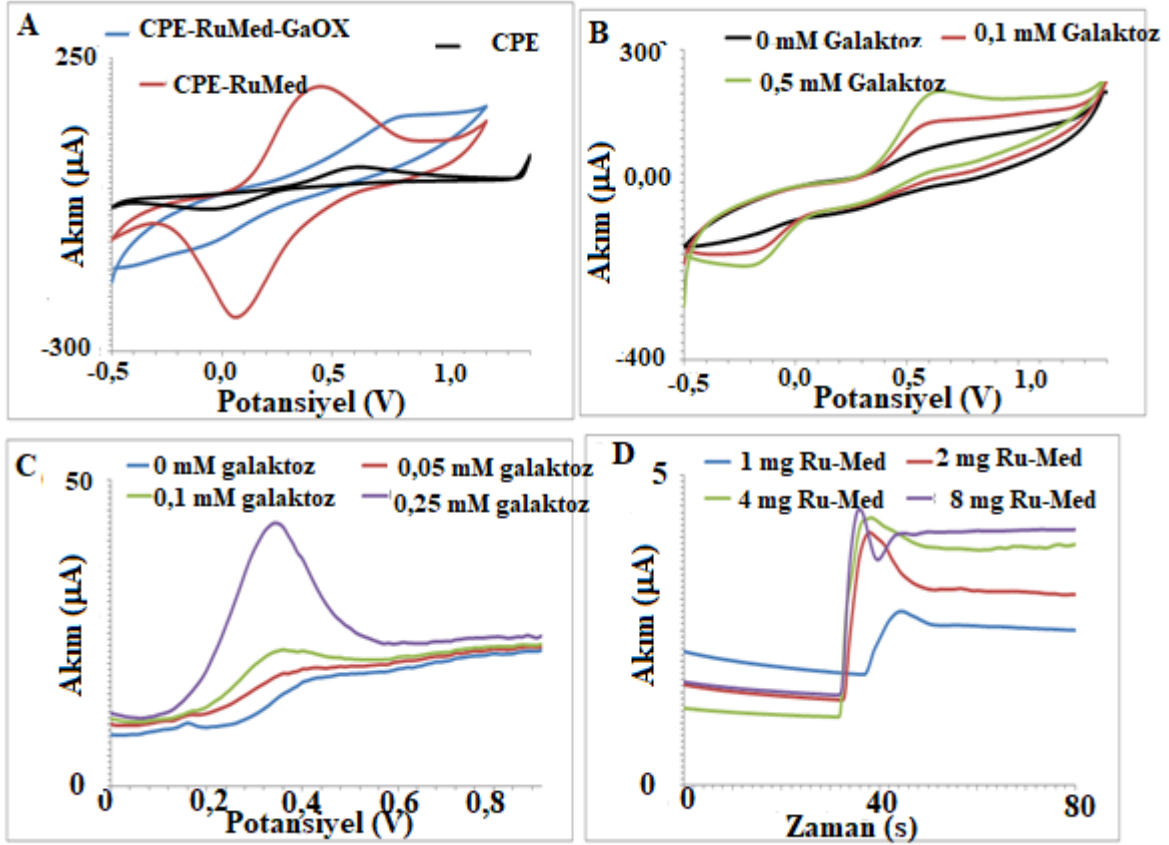


Şekil 2. Biyosensörün çalışma prensibi

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Galaktoz Biyosensörünün İmmobilizasyonuna İlişkin Bulgular

Şekil 3A’da geliştirilen Galaktoz biyosensörünün immobilizasyon aşamalarına ilişkin Ferri/Ferro siyanür prob çözeltisinde alınmış döngüsel voltammogramları (CV) yer almaktadır. Rutenyum mediyatör kompleksinin kullanıldığı elektrodun sinyal yoğunluğunu ve pik tersinirliğini yalnız karbon pasta elektrot (CPE) ile karşılaştırıldığında ciddi oranda arttırdığı gözlenmektedir. Bu durum Rutenyum mediyatör kompleksinin karbon pasta yapısı içerisine iyi bir şekilde geçtiğini göstermesinin yanı sıra iletkenliğinin ne derece iyi olduğunu da göstermektedir. CPE-RuMed elektroda enzimin ilavesiyle pik tersinirliği nispeten bozulmuş ve sinyal yükseklikleri düşmüştür. GaOX’un yalıtkan doğası gereği pik yüksekliğinin düşmesi beklenen bir durumdur ve enzimin pasta yapısı içerisine immobilize olduğunu gösterir.



**Şekil 3:** (A) Galaktoz biyosensörünün immobilizasyon aşamalarına ilişkin döngüsel voltammogramlar. pH:7.0 PBS (0.1 M KCl ve 5 mM Ferri/Ferro Çözeltisi içeren) Tarama hızı: 50 mV/s, Sıcaklık : 25 °C. CPE: Karbon pasta elektrot, RuMed: Rutenyum Mediyatör Kompleksi, GaOX: Galaktoz Oksidaz (B) Galaktoz biyosensörünün galaktoz ilavesiz ve 0.1 mM ve 0.5 mM galaktoz eklemeleri (ekleme sonrası çözelti içindeki konsantrasyonları) sonrası alınan CV'leri. pH:6.0 PBS (0.1 M KCl ve 1 mM p-Benzokinin içeren) Tarama hızı: 50 mV/s, Sıcaklık : 30 °C. (C) Galaktoz biyosensörünün galaktoz ilavesiz ve 0.05 mM; 0.1 ve 0.25 mM galaktoz eklemeleri (ekleme sonrası çözelti içindeki konsantrasyonları) sonrası alınan DP'leri. pH:6.0 PBS (0.1 M KCl ve 1 mM p-Benzokinin içeren) Tarama hızı: 50 mV/s, Sıcaklık: 30 °C. (D) Galaktoz biyosensörünün cevabına Rutenyum mediyatör kompleksinin miktarının etkisi. Ölçümler amperometriktir. 0.25 mM galaktoz ilavesine ilişkin amperometrik sonuçlar

### Galaktoz Biyosensörünün Galaktoz Cevabına İlişkin Bulgular

Şekil 3 B'de galaktoz biyosensörünün galaktoza verdiği cevabın döngüsel voltammetri sonuçları Şekil 3 C'de bu sonuçtan yola çıkarak hedef alınan anodik pike ilişkin Differansiyel Puls Voltammetrisi (DP) sonuçlarına ilişkin bulgular yer almaktadır. Optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları DP ve amperometri teknikleri ile yapılmıştır. DP ölçümleri substrat ilavesini takiben 3 dakikalık inkübasyon sonrası alınmış olup amperometrik ölçümler ekleme anında kaydedilen sonuçları göstermektedir.

Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 20 - 40 °C arasında çalışılmıştır. Biyosensör cevabı 30 °C'ye kadar artmış sonrasında ise hemen hemen sabit kalmıştır. Enzim stabilitesinin yüksek sıcaklıklarda azaldığı bilindiği için 30 °C optimum sıcaklık olarak seçilmiştir.

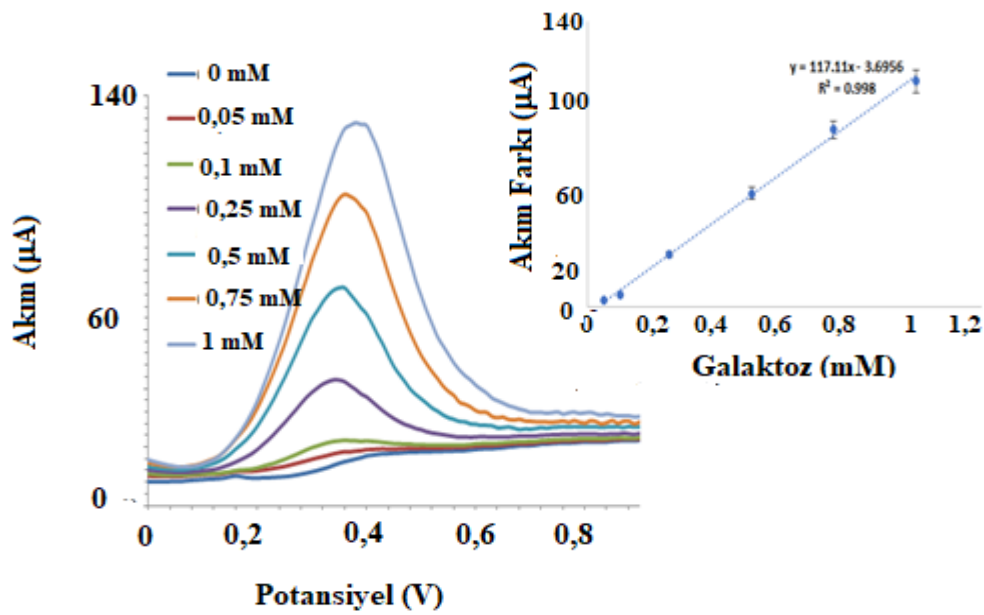
### Galaktoz Biyosensörünün Cevabına Rutenyum Mediyatör Kompleksinin Miktarının Etkisine İlişkin Bulgular

Rutenyum mediyatör kompleksi bu projenin özgünlüğünü oluşturduğu için elektrot yapısı içindeki miktarının belirlenmesi önemlidir. Karbon pasta elektrotlar 4 farklı Ru-Med miktarlarıyla hazırlanmış ve ölçümler 0.25 mM galaktoz için amperometrik yöntemle alınmıştır. Her ölçüm 3 kere tekrarlanmış ve aynı miktarı içeren elektrotlar 2'li olarak hazırlanmıştır. Şekil 3 D'ye bakıldığında Ru-

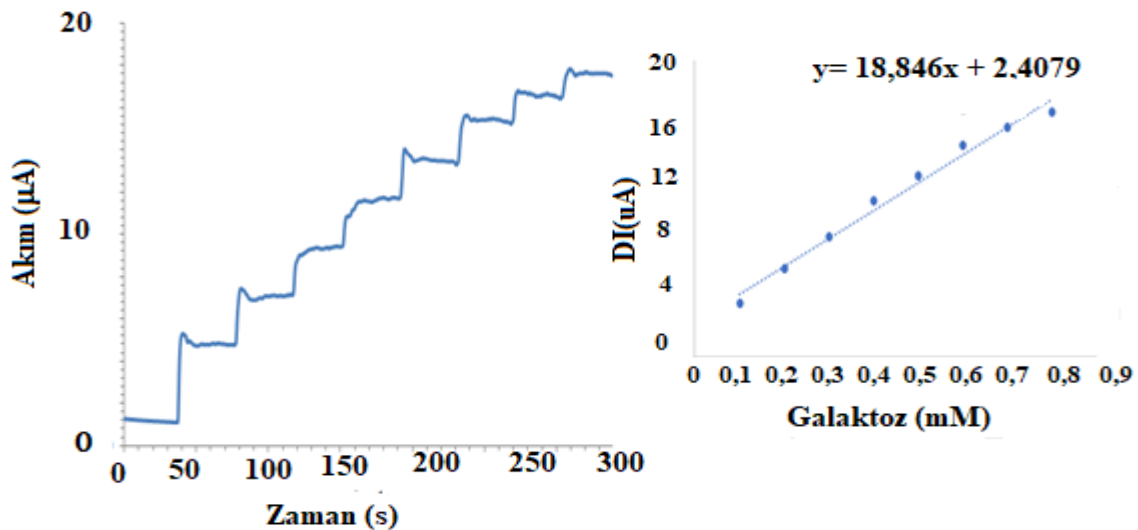
Med kompleksinin kullanılması verilen biyosensör cevabını da arttırmıştır. 4 mg Ru-Med kullanılan elektrotta alınan cevap tepe noktasını oluştururken 8 mg Ru-Med'in kullanıldığı elektrotla 4 mg'ın kullanıldığına hemen hemen aynı cevap alınmıştır. Ru-Med'in fazlası elektrodun pasta yapısını bozduğu gibi enzim-substrat ilişkisi için bir difüzyon bariyeri oluşturmuş olabilir.

### Galaktoz Biyosensörünün Doğrusal Tayin Aralığına İlişkin Bulgular

Geliştirilen galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığına ilişkin DP sonuçları ve o sonuçlara göre çizilen standart grafiği Şekil 4'de , sıralı katım amperometri sonuçları ve o sonuçlara göre çizilen standart grafiği ise Şekil 5'de verilmiştir. Her iki grafiğinde doğrusallığı validasyon kriterlerine uymakla birlikte DP ile elde edilen sonuçların doğrusallığı çok daha iyidir. DP ölçümleri 0.05-1.00 mM galaktoz konsantrasyonları için alınırken amperometri sonuçları ise 0.1-0.8 mM galaktoz konsantrasyonlarına göre elde edilmiştir.



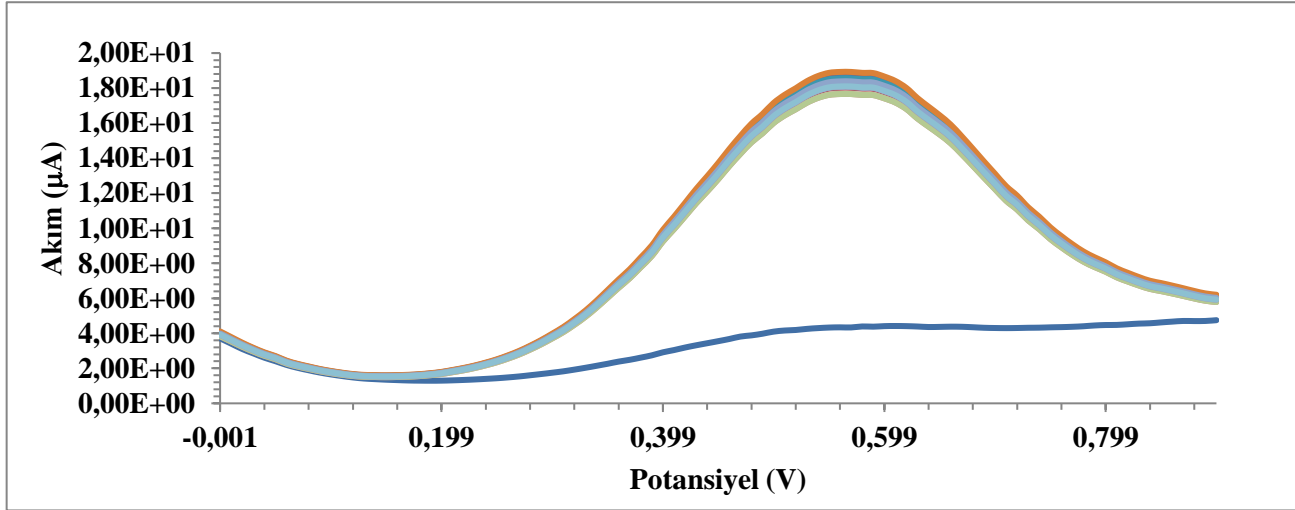
Şekil 4. Galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığını belirlemeye yönelik DP sonuçları ve bu sonuçlara göre çizilmiş standart grafiği



Şekil 5. Galaktoz biyosensörünün doğrusal tayin aralığını belirlemeye yönelik 0.1 mM galaktoz sıralı katım amperometri sonuçları ve bu sonuçlara göre çizilmiş standart grafiği

### Galaktoz Biyosensörünün Tekrarlanabilirliğine İlişkin Bulgular

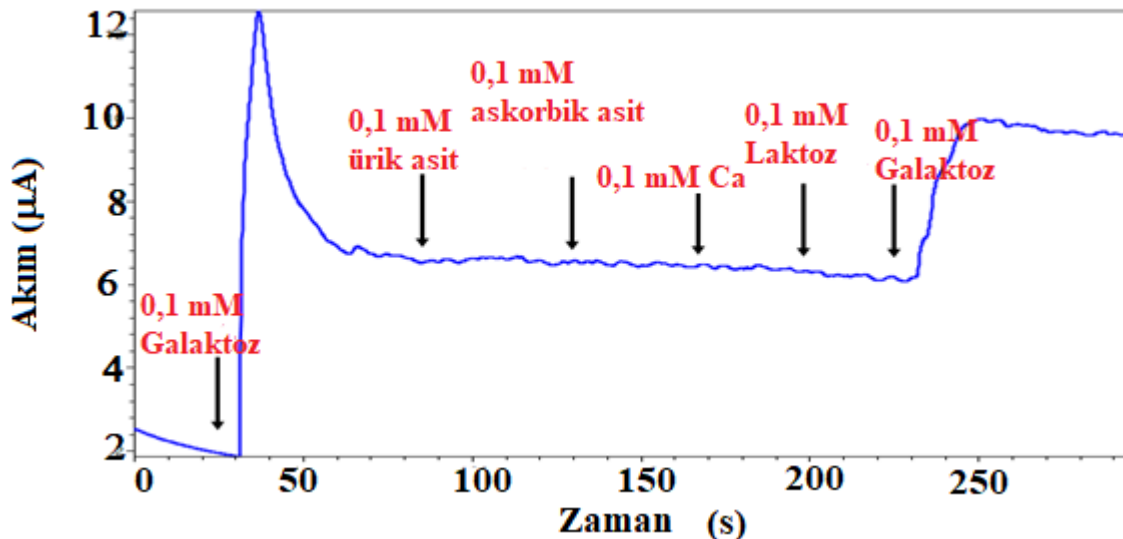
Tekrarlanabilirlik bir analitik yöntemin kesinliğini gösteren bir parametredir. Biyoanalitik yöntem validasyon kriterlerine göre varyasyon katsayısı %15'in altında olmalıdır. Bu çalışmada 0.25 mM galaktoz DP yöntemiyle 10 defa ölçülmüş ve elde edilen DP'ler Şekil 6'da gösterilmiştir. Bu çalışmada 0.25 mM galaktoz ortalaması 0.24 mM, standart sapması 0.021 ve varyasyon katsayısı %8.3 olarak bulunmuştur. Söz konusu değerler validasyon kriterlerine uymaktadır (European Medicines Agency & Ema, 2012).



Şekil 6. Geliştirilen galaktoz biyosensörünün tekrarlanabilirliğine ilişkin DP sonuçları.(n=10)

### Galaktoz Biyosensörünün Girişim Etkisi Çalışmasına İlişkin Bulgular

Geliştirilen galaktoz biyosensörünün girişimci etkisi denemesi 0.5V'ta amperometrik ölçüm yoluyla yapılmıştır (Şekil 14). Deney kolay okside olabilen ürik asit, askorbik asit ve ölçümü planlanan örnek süt olduğu için sütte bol bulunan kalsiyum ve laktozla yapılmıştır. Şekil 7'de görüleceği üzere galaktoz ilavesi ile akım artarken diğer analitlerin ilavesi akımda kaydadeğer bir fark yaratmamıştır. Son ilave edilen galaktoz için elde edilen cevap ise ilk cevaba göre %5 oranında azalmıştır. Bunun nedeni diğer analitlerin eklenmesiyle çözelti hacminin artması ve galaktozun derişimin görece azalmasıdır. Ancak %5'lik fark kabul edilebilir bir farktır.



Şekil 7. Geliştirilen galaktoz biyosensörüne girişimci etkisini gösteren amperometrik ölçüm.

### Örnek Denemesi ve Geri Elde Denemesine İlişkin Bulgular

Örnek denemesi hem ticari satın alınan liyofilize serum örneğiyle (BIORAD) hem de laktozsuz sütlerde standart katma yoluyla yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 1'de gösterilmiştir. Hem liyofilize serumda hem de laktozsuz sütte yapılan denemelerde %geri elde %100'e yakın çıkmıştır. Bu da yöntemin doğru ölçüm yapabildiğini gösterir.

**Çizelge 1.** Geliştirilen biyosensörle liyofolize serum ve laktozsuz sütte geri elde denemesi

Örnek	Eklenen (mM)	Biyosensörle bulunan (mM)	% Geri elde
Serum (BIORAD)	0	0.15 ± 0.012	
	0.25	0.39 ± 0.06	96
	0.5	0.66 ± 0.09	102
Laktozsuz Süt (25 kat seyreltilmiş)	0	0.52± 0.08	
	0.25	0.79± 0.11	108

### Literatürdeki Galaktoz Biyosensörleri ile Karşılaştırma

**Çizelge 2.** Literatürdeki galaktoz biyosensörlerinin karşılaştırması

Elektrot	Cevap Süresi (s)	Tayin Aralığı	Tayin Limiti	Duyarlılık	Elektrot hazırlama süresi	Referans
PEP	5	2.0-16.0 mM	0.025 mM	1.75 $\mu\text{A}/\text{mM}$	Yaklaşık 26 saat	(Şenel vd., 2011)
PGVFc	5	2.0-20.0 mM	0.1 mM	23 nA/mM	Yaklaşık 26 saat	(Evik vd., 2010)
PMP	4	2.0-20.0 mM	-	15 nA/mM	Yaklaşık 1 saat	(Ekinci & Paşahan, 2004)
PVF	30	1.0-40.0 mM	-	4.5 mA/mM	Yaklaşık 40 dakika	(Gülce vd., 2002)
p(HEMA)/PPy	70	0.05-10 mM	-	0.94 $\mu\text{A mM}^{-1}$	Yaklaşık 1 saat	(Brahim vd., 2002)
PPEG	5	0-24 mM	-	0.025 $\mu\text{A mM}^{-1}$	Yaklaşık 30 dakika	(Sung & Bae, 2006)
ITO/EDOT	5	0.1-1.0 mM	-	1.59 $\mu\text{A mM}^{-1}$	Yaklaşık 1 saat	(Lee vd., 2011)
CPE/RuMed	5	0.05-1.0 mM	-	20 $\mu\text{A mM}^{-1}$	Yaklaşık 20 dakika	Bu çalışma

PGVFc, poly (glycidyl methacrylate-co-vinylferrocene); PMP, poly (4-methoxyphenol); PVF, polyvinylferrocene; PPy, polypyrrole.; p(HEMA)/PPy, Polypyrrole hidroksimetakrilat; PPEG, polipirrol poli etilen glikol; ITO-EDOT, indium tin oxide (ITO) glass electrode, 3,4-Ethylenedioxythiophene (EDOT)



## SONUÇ

Bu proje kapsamında tayini özellikle galaktozemi tanısı, tedavisinin izlenmesi ve diyetin kontrolü açısından büyük önem taşıyan galaktoz için yeni bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. Bu projede kullanılan Rutenyum mediyatör kompleksinin biyosensör yapımında kullanılmasına literatürde çok az rastlanılmış olmakla birlikte bu çalışmayla ilk defa bir galaktoz biyosensöründe ve ilk defa bir karbon pasta elektrotla kullanımı gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen biyosensörle optimizasyon çalışmaları 0&0.9 V arasında DP yöntemiyle yapılırken sensörün performansını gösteren deneyler hem DP hem de 0.5 V'ta amperometrik ölçümler yoluyla gerçekleştirilmiştir. DP ölçümleri 3 dakikalık karıştırılmalı inkübasyon sonrası alınırken amperometrik ölçümler galaktoz ilavesi ile anlık olarak alınmıştır. Çalışmada ayrıca çalışma tamponu içerisinde elektron transferini hızlandırması ve Ru-Med'in rejenerasyonu sağlaması açısından 1 mM p-benzokinin mediyatör olarak kullanılmıştır. İmmobilizasyon aşamalarını gösteren Şekil 3A'da Ru-Med yapısının elektrot yapımında kullanılmasının pik yüksekliği ve kalitesine yaptığı pozitif etki rahatlıkla görülebilmektedir.

Çalışma koşullarının optimizasyonunda optimum pH 6.5 ve optimum sıcaklık 30 °C olarak bulunurken her iki değerde literatür verileriyle uyumludur ve kullanılan immobilizasyon tekniğinin galaktoz oksidaz enziminin çalışma koşullarını değiştirmedikini göstermektedir. Rutenyum mediyatör kompleksinin biyosensör cevabına etkisini gösteren deneyde kullanılan rutenyum miktarı ile biyosensör cevabının 4 mg'a kullanılabildiği daha sonra ise sabit kaldığı anlaşılmıştır. Bunun nedeni 4 mg'ın fazlasının pasta yapısını bozması ve enzim substrat ilişkisi için difüzyon bariyeri oluşturması olabilir.

Biyosensörün performansını gösteren doğrusal tayin aralığı denemesinde biyosensör cevabı 0.05-1.0 mM arasında doğrusal çıkmıştır. Bu aralık kan glukoz seviyelerinin tespiti için yeterlidir. Tekrarlanabilirlik denemesinde 0.25 mM galaktoz için %VK 8,3 çıkmıştır. Bu değer biyoanalitik yöntemler için kabul edilebilir bir değerdir. Girişim etkisi denemesi amperometrik yöntemle yapılmış ve sonuçlar Şekil 7'de gösterilmiştir. Şekil 7'den de anlaşılacağı üzere aynı konsantrasyondaki ürik asit, askorbik asit, kalsiyum ve laktozun herhangi bir girişimi olmamıştır. Bu sonuç geliştirilen biyosensörün ne denli seçici olduğunu gösterir. Örnek denemesi hem liyofilize serum hem de laktozsuz süt örneklerinde yapılmıştır. Hem liyofilize serum hemde laktozsuz sütte elde edilen % geri elde sonuçları %100'e yakındır ve bu da geliştirilen biyosensörün doğru ölçüm yaptığını gösterir.

Son olarak Çizelge 2'de literatürde var olan galaktoz biyosensörleriyle bu çalışmada geliştirilen biyosensör tayin aralığı, cevap süresi, duyarlılık ve elektrot hazırlama süresi açısından karşılaştırılmıştır. Çizelge 2'ye göre bu çalışmada geliştirilen biyosensörün tayin aralığı diğerleri ile benzerlik göstermekle birlikte cevap süresi oldukça kısa, duyarlılığı yüksek ve en önemlisi diğerlerine nazaran oldukça basit ve hızlı bir elektrot hazırlama süresine sahip olma gibi avantajları mevcuttur.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

## KAYNAKLAR

Adam, B. W., Flores, S. R., Hou, Y., Allen, T. W., & De Jesus, V. R. (2015). Galactose-1-phosphate uridyltransferase dried blood spot quality control materials for newborn screening tests. *Clinical Biochemistry*, 48(6), 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.12.009>

- Akyilmaz, E., Kozgus, O., Türkmen, H., & Çetinkaya, B. (2010). A mediated polyphenol oxidase biosensor immobilized by electropolymerization of 1,2-diamino benzene. *Bioelectrochemistry*, 78(2), 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.09.003>
- Anderson, S. (2018). GALT Deficiency: Galactosemia. *MCN The American Journal of Maternal/Child Nursing*, 43(1), 44–51. <https://doi.org/10.1097/NMC.0000000000000388>
- Beutler, E. (1991). Galactosemia: screening and diagnosis. *Clinical Biochemistry*, 24(4), 293–300. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(91\)80003-L](https://doi.org/10.1016/0009-9120(91)80003-L)
- Brahim, S. I., Maharajh, D., Narinesingh, D., & Guiseppi-Elie, A. (2002). Design and characterization of a galactose biosensor using a novel polypyrrole-hydrogel composite membrane. *Analytical Letters*, 35(5), 797–812. <https://doi.org/10.1081/AL-120004070>
- Canbay, E., & Akyilmaz, E. (2014). Design of a multiwalled carbon nanotube-Nafion-cysteamine modified tyrosinase biosensor and its adaptation of dopamine determination. *Analytical Biochemistry*, 444, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.09.019>
- Canbay, E., Türkmen, H., & Akyilmaz, E. (2014). Ionic liquid modified carbon paste electrode and investigation of its electrocatalytic activity to hydrogen peroxide. *Bulletin of Materials Science*, 37(3), 617–622. <https://doi.org/10.1007/s12034-014-0681-2>
- Connell, E. (2012). Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (5th edn). *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*. <https://doi.org/10.1258/acb.2012.201217>
- Cosnier, S. (2014). Electrochemical biosensors. İçinde *Electrochemical Biosensors*. <https://doi.org/10.1039/B714449K>
- Ekinci, E., & Paşahan, A. (2004). Poly (4-methoxyphenol) film as a galactose-sensing material. *European Polymer Journal*, 40(8), 1605–1608. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.04.020>
- European Medicines Agency, & Ema. (2012). Guideline on bioanalytical method validation. *EMA Guideline*, 44(July 2011), 1–23. <https://doi.org/EMA/CHMP/EWP/192217/2009>
- Evik, E., Şenel, M., & Fatih Abasyank, M. (2010). Construction of biosensor for determination of galactose with galactose oxidase immobilized on polymeric mediator contains ferrocene. *Current Applied Physics*, 10(5), 1313–1316. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2010.03.014>
- Farré, M., & Barceló, D. (2007). Sensor, biosensors and MIP based sensors. İçinde *Food Toxicants Analysis* (ss. 599–636). <https://doi.org/10.1016/B978-044452843-8/50017-1>
- Gross, K. C., & Acosta, P. B. (1991). Fruits and vegetables are a source of galactose: Implications in planning the diets of patients with Galactosaemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 14(2), 253–258. <https://doi.org/10.1007/BF01800599>
- Gülce, H., Ataman, I., Gülce, A., & Yildiz, A. (2002). A new amperometric enzyme electrode for galactose determination. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(1), 41–44. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00452-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00452-5)
- Hu, O. Y., Hu, T. -M., & Tang, H. -S. (1995). Determination of galactose in human blood by high-performance liquid chromatography: Comparison with an enzymatic method and application to the pharmacokinetic study of galactose in patients with liver dysfunction. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(2), 231–235. <https://doi.org/10.1002/jps.2600840223>
- Kanyong, P., Pemberton, R. M., Jackson, S. K., & Hart, J. P. (2013). Development of an amperometric screen-printed galactose biosensor for serum analysis. *Analytical Biochemistry*, 435(2), 114–119. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2013.01.006>
- Karunakaran, C., Rajkumar, R., & Bhargava, K. (2015). Introduction to Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 1–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>
- Kim, M. Il, Shim, J., Li, T., Woo, M. A., Cho, D., Lee, J., & Park, H. G. (2012). Colorimetric quantification of galactose using a nanostructured multi-catalyst system entrapping galactose oxidase and magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics. *Analyst*, 137(5), 1137–1143. <https://doi.org/10.1039/c2an15889b>
- Lalrempuia, R., Kollipara, M. R., Carroll, P. J., Yap, G. P. A., & Kreisel, K. A. (2005). Syntheses and characterization of cyano-bridged homo and hetero bimetallic complexes containing  $\eta^5$  and  $\eta^6$ -cyclic hydrocarbons. *Journal of Organometallic Chemistry*, 690(17), 3990–3996. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2005.05.044>
- Lee, K. N., Lee, Y., & Son, Y. (2011). Enhanced sensitivity of a galactose biosensor fabricated with a bundle of conducting polymer microtubules. *Electroanalysis*, 23(9), 2125–2130. <https://doi.org/10.1002/elan.201100183>

- Li, Y., Ptolemy, A. S., Harmonay, L., Kellogg, M., & Berry, G. T. (2011). Ultra fast and sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry based assay for galactose-1-phosphate uridylyltransferase and galactokinase deficiencies. *Molecular Genetics and Metabolism*, 102(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.08.018>
- Marazuela, M. D., Cuesta, B., Moreno-Bondi, M. C., & Quejido, A. (1997). Free cholesterol fiber-optic biosensor for serum samples with simplex optimization. *Biosensors and Bioelectronics*, 12(3), 233–240. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(97\)85341-9](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(97)85341-9)
- Mulchandani, A., & Pan, S. (1999). Ferrocene-conjugated m-phenylenediamine conducting polymer-incorporated peroxidase biosensors. *Analytical biochemistry*, 267(1), 141–147. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2983>
- Nikolelis, D. P., & Nikoleli, G. P. (2018). Nanotechnology and biosensors. İçinde *Nanotechnology and Biosensors*. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-00358-0>
- Pruden, B. B., Pineault, G., & Loutfi, H. (1975). A thin-layer chromatographic method for the quantitative determination of d-mannose, d-glucose and d-galactose in aqueous solution. *Journal of Chromatography A*, 115(2), 477–483. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)98950-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)98950-2)
- Ryabov, A. D., Sukbarev, V. S., Alexandrova, L., Le Lagadec, R., & Pfeffer, M. (2001). New synthesis and new bio-application of cyclometalated ruthenium(II) complexes for fast mediated electron transfer with peroxidase and glucose oxidase. *Inorganic Chemistry*, 40(25), 6529–6532. <https://doi.org/10.1021/ic010423h>
- Scheller, F. W., Schubert, F., Renneberg, R., Müller, H. G., Jänchen, M., & Weise, H. (1985). Biosensors: trends and commercialization. *Biosensors*. [https://doi.org/10.1016/0265-928X\(85\)80001-8](https://doi.org/10.1016/0265-928X(85)80001-8)
- Şenel, M., Bozgeyik, I., Çevik, E., & Fatih Abasiyanik, M. (2011). A novel amperometric galactose biosensor based on galactose oxidase-poly(N-glycidylpyrrole-co-pyrrole). *Synthetic Metals*, 161(5–6), 440–444. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2010.12.025>
- Sohail, M., & Adeloju, S. B. (2016). Nitrate biosensors and biological methods for nitrate determination. İçinde *Talanta* (C. 153, ss. 83–98). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.002>
- Sung, W. J., & Bae, Y. H. (2006). Glucose oxidase, lactate oxidase, and galactose oxidase enzyme electrode based on polypyrrole with polyanion/PEG/enzyme conjugate dopant. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 114(1), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.04.027>
- Švancara, I., Vytrás, K., Kalcher, K., Walcarius, A., & Wang, J. (2009). Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: A review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. İçinde *Electroanalysis*. <https://doi.org/10.1002/elan.200804340>
- Tkac, J., Whittaker, J. W., & Ruzgas, T. (2007). The use of single walled carbon nanotubes dispersed in a chitosan matrix for preparation of a galactose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.014>
- Turner, A. P. F. (2013). Biosensors: Sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*. <https://doi.org/10.1039/c3cs35528d>
- Vaca, G., Sanchez-Corona, J., Medina, C., Olivares, N., Rivera, H., Hernández, A., Ibarra, B., Sotomayor, J. M., & Cantó, J. M. (1978). Galactosemia as a result of galactose-1-phosphate uridylyltransferase deficiency. *Archivos de Investigacion Medica*, 9(3).
- Xie, J., Chen, C., Zhou, Y., Fei, J., Ding, Y., & Zhao, J. (2016). A Galactose Oxidase Biosensor Based on Graphene Composite Film for the Determination of Galactose and Dihydroxyacetone. *Electroanalysis*. <https://doi.org/10.1002/elan.201500486>
- Zhang, X., Cui, Y., Lv, Z., Li, M., Ma, S., Cui, Z., & Kong, Q. (2011). Carbon nanotubes, conductive carbon black and graphite powder based paste electrodes. *International Journal of Electrochemical Science*.