

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**NANOLİF ESASLI YÜZEY BASKILI ELEKTROTLARIN HAZIRLANMASI
VE BİYOSENSÖR UYGULAMALARI**

Elif Merve ÖZER

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

MAYIS 2023

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**NANOLİF ESASLI YÜZEY BASKILI ELEKTROTLARIN HAZIRLANMASI
VE BİYOSENSÖR UYGULAMALARI**

Elif Merve ÖZER

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

MAYIS 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOLİF ESASLI YÜZEY BASKILI ELEKTROTLARIN HAZIRLANMASI
VE BİYOSENSÖR UYGULAMALARI

Elif Merve ÖZER

KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı 2019/2 ile, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından FDK-2020-5311 numaralı proje ile ve YÖK 100/2000 Öncelikli Alanlara Yönelik Doktora Bursu ile desteklenmiştir.

MAYIS 2023

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOLİF ESASLI YÜZEY BASKILI ELEKTROTLARIN HAZIRLANMASI
VE BİYOSENSÖR UYGULAMALARI

Elif Merve ÖZER

KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 18/05/2023 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU (Danışman)

Prof. Dr. Elif ŞAHİN IŞGIN

Prof. Dr. Meltem ASİLTÜRK ERSOY

Prof. Dr. Songül ŞEN GÜRSOY

Doç. Dr. Önder TOPEL

ÖZET

NANOLİF ESASLI YÜZEY BASKILI ELEKTROTLARIN HAZIRLANMASI VE BİYOSENSÖR UYGULAMALARI

Elif Merve ÖZER

Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU

Mayıs 2023; 122 sayfa

Biyolojik ve biyokimyasal süreçler; klinik teşhisler, tıbbi uygulamalar, biyoreaktörler, gıda kalite kontrolü, tarım, endüstriyel atık su kontrolü, madencilik ve savunma sanayisinde çok önemli bir role sahiptir. Ancak, biyolojik verilerin ölçülebilir sinyale dönüştürülmesi oldukça zaman alıcı bir süreçtir. Bu bağlamda biyosensörler geniş bir şekilde araştırılmış olup, yüksek hassasiyet, seçicilik ile ölçüm yapabilen biyosensörlere olan ilgi ve ihtiyaç hızla artmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, düşük maliyetli, minyatürleştirilmeye uygun ve seri üretimi kolay olan yüzey baskılı elektrotların (YBE'lerin), yeni elektrokimyasal algılama platformları geliştirmek ve performanslarını iyileştirmek için geleneksel elektrotlara güçlü bir alternatif oluşturduğunu göstermiştir. Güvenilir ve hassas bir biyosensörün geliştirilmesinde anahtar faktörlerden biri biyoreseptörlerin immobilizasyonu için uygun bir matris hazırlanmasıdır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, nanolif içeren matrislerin kullanımının geniş yüzey alanına sahip olmaları sebebi ile biyosensör performansına olumlu yönde etki ettiğini göstermiştir. Bu matrisler arasında poliakrilonitril (PAN) nanolifleri sahip olduğu yüksek çekme dayanımı, termal ve mekanik stabilite, çözünme ve organik çözücülerde şişmeye karşı direnç gösterme gibi özellikleri nedeniyle öncü bir rol oynamıştır. Ayrıca, enzimin aktif merkezi ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferini geliştiren ve medyatör olarak adlandırılan maddelerin yapıya dahil edilmesinin de biyosensör performansına olumlu yönde katkı sağladığı bilinmektedir.

Bu bilgilerden yola çıkarak bu tez çalışmasında medyatör içeren nanolifler, yüzey baskılı ve geleneksel elektrotlar kullanılarak, yüksek duyarlılığa sahip yeni nesil biyosensörlerin üretilmesi amaçlanmıştır. PAN, PAN-MWCNT, Naylon 6-MWCNT, PAN/Metilen Mavisi, PAN/Nötral Kırmızı ve PAN/Tiyonin nanoliflerinin ucuz, basit yöntemler ile elde edilmesi ve amperometrik biyosensörlerde matris olarak kullanılmaları hedeflenmiştir. Elektro-eğirme yöntemi ile hazırlanan bu matrisler ile Glikoz oksidaz, Üreaz ve Polifenol oksidaz temelli biyosensörler hazırlanmış ve duyarlılık, ölçüm aralığı, kararlılık, tespit sınırı, girişim etkisi ve gerçek numune analizi açısından değerlendirilmiştir. Gerçek numune analizlerinde glikoz biyosensörleri için ticari meyve suları, polifenol biyosensörleri için musluk suyu ve üre biyosensörleri için ise insan idrarı örnekleri kullanılmıştır.

Glikoz oksidaz temelli biyosensörler arasında, Tiyonin (TH) içeren ancak iletken bir nanoparçacık ilavesine (MWCNT) ve elektrokimyasal polimerizasyona ihtiyaç duyulmadan hazırlanan YBCE/PAN-TH-Nfs/GOx biyosensörünün $126,73 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ ile en yüksek duyarlılığa sahip olduğu bulunmuştur. Fenolik bileşiklerin analizi için tasarlanan polifenol biyosensörlerinde ise Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörünün katekol, p-klorofenol ve fenol için elde edilen duyarlılık değerleri sırasıyla, $366 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$, $25 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ ve $14,66 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ olarak hesaplanmıştır. Son olarak üre biyosensörü için elde edilen duyarlılık değeri $325,74 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ olarak belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında hazırlanan biyosensörler literatürdeki diğer çalışmalar ile kıyaslandığında medyatör ve nanolif temelli matris kullanımının enzim biyosensörlerinin performansına olumlu etki yaptığı belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELE: Amperometrik biyosensör, Elektro-eğirme, Glikoz oksidaz, Medyatör, Nanolif, Polifenol oksidaz, Üreaz, Yüzey baskılı karbon elektrot

JÜRİ: Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU

Prof. Dr. Elif ŞAHİN IŞGIN

Prof. Dr. Meltem ASILTÜRK ERSOY

Prof. Dr. Songül ŞEN GÜRSOY

Doç. Dr. Önder TOPEL

ABSTRACT

PREPARATION OF NANOFIBER-BASED SCREEN-PRINTED ELECTRODES AND BIOSENSOR APPLICATIONS

Elif Merve ÖZER

PhD Thesis in CHEMISTRY

Supervisor: Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU

May 2023; 122 pages

Biological and biochemical processes have a very important role in clinical diagnostics, medical applications, bioreactors, food quality control, agriculture, industrial wastewater control, mining and defense industries. However, converting biological data into measurable signal is a very time-consuming process. In this context, biosensors have been extensively researched, and the interest and need for biosensors that can measure with high sensitivity and selectivity is increasing rapidly. Recent studies have shown that screen-printed electrodes (SPEs), which are low-cost, suitable for miniaturization, and easy to mass-produce, represent a powerful alternative to conventional electrodes to develop new electrochemical sensing platforms and improve their performance. One of the key factors in the development of a reliable and sensitive biosensor is the preparation of a suitable matrix for the immobilization of bioreceptors.

Recent studies have shown that the use of nanofiber-containing matrices has a positive effect on biosensor performance due to their large surface area. Among these matrices polyacrylonitrile (PAN) nanofibers has played a leading role due to its high tensile strength, thermal and mechanical stability, resistance to dissolution and swelling in organic solvents. In addition, it is known that the inclusion of substances called mediators, which improve the electron transfer between the active center of the enzyme and the electrode surface, contributes positively to the biosensor performance.

Based on this information, in this thesis, it is aimed to produce new generation biosensors with high sensitivity by using nanofibers containing mediator, screen-printed and conventional electrodes. It is aimed to obtain PAN, PAN-MWCNT, Nylon 6-MWCNT, PAN/Methylene Blue, PAN/Neutral Red and PAN/Thionine nanofibers by cheap and simple methods and to use them as matrix in amperometric biosensors. With these electrospun matrices Glucose oxidase, Urease and Polyphenol oxidase based biosensors were prepared and all were evaluated in terms of sensitivity, linear range, stability, detection limit, interference effect and real sample analysis. In real sample analysis, commercial fruit juices were used for glucose biosensors, tap water for polyphenol biosensors and human urine samples were used for urea biosensors.

Among the glucose oxidase-based biosensors, YBCE/PAN-TH-Nfs/GOx biosensor containing Thionine (TH), which was prepared without the addition of MWCNT, a conductive nanoparticle or electrochemical polymerization, was found to have the highest sensitivity with $126.73 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$. In the polyphenol biosensors designed for the analysis of phenolic compounds, Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO

biosensor revealed sensitivity of 366 $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$, 25 $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ and 14.66 $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ for catechol, p-chlorophenol and phenol, respectively. Finally, the sensitivity value obtained for the urea biosensor was determined as 325.74 $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$. When the biosensors prepared within the scope of the thesis study were compared with other studies in the literature, it was determined that the use of mediator and nanofiber-based matrix had a positive effect on the performance of enzyme biosensors.

KEYWORDS: Amperometric biosensor, Electrospinning, Glucose oxidase, Mediator, Nanofiber, Polyphenol oxidase, Screen printed carbon electrode, Urease

COMMITTEE: Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU

Prof. Dr. Elif ŞAHİN IŞGIN

Prof. Dr. Meltem ASİLTÜRK ERSOY

Prof. Dr. Songül ŞEN GÜRSOY

Assoc. Prof. Dr. Önder TOPEL

ÖNSÖZ

Biyosensörler; bir enzim veya antikor gibi biyolojik bir reseptörü, ölçülebilir ve işlenebilir bir sinyal üretmek için elektronik bir bileşenle entegre eden cihaz veya prob olarak tanımlanabilmektedir. Son zamanlarda nanomalzemelerin, özellikle de nanoliflerin yüksek yüzey alanına ve gözenekli yapıya sahip olmaları sebebi ile biyosensörlerde matris olarak kullanımı oldukça ilgi çekici hale gelmiştir. Bu doktora tez çalışması ile tek kullanımlık ve düşük maliyete sahip yüzey baskılı elektrotlar ile geleneksel Pt elektrotlar ve medyatör içeren nanoliflerden yola çıkarak glikoz, üre ve fenolik bileşikler gibi insan sağlığına olumsuz etkileri olduğu bilinen çeşitli maddelerin, yüksek hassasiyetle tayinine olanak sağlayacak amperometrik biyosensörlerin hazırlanması amaçlanmıştır. Bu sebeple poliakrilonitril (PAN) ve Naylon 6 ile çeşitli medyatörleri içeren (metilen mavisi, nötral kırmızı ve tiyonin gibi) nanolifler elektro-eğirme yöntemiyle hazırlanmış; elde edilen nanolifler ile Üreaz, Glikoz oksidaz ve Polifenol oksidaz temelli, literatürde bulunmayan amperometrik biyosensörler hazırlanmış ve analitik performansları incelenmiştir.

Biyosensör konusunda bana çalışma fırsatı sağlayan, doktora çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, her türlü destek ve imkânı sağlayarak bana destek olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını FDK-2020-5311 numaralı proje ile destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (BAP) teşekkürlerimi sunarım.

2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı 2019/2 ile desteklerini sunan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na (BİDEB) teşekkürlerimi sunarım.

YÖK 100/2000 Öncelikli Alanlara Yönelik Doktora Bursu ile desteklerini sunan Yükseköğretim Kurulu'na teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında yanımda olan, karşılıksız sevgileriyle birlikte benden desteklerini esirgemeyen başta canım annem Handan ŞAHİN olmak üzere, babam Cengiz ŞAHİN'e tüm kalbimle sonsuz teşekkür ederim.

Bana her zaman güvenip destek olan sevgili eşim Burak ÖZER'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Nanoteknoloji ve Nanolifler	1
1.2. Elektro-eğirme Yöntemi Mekanizması ve Yöntem Parametreleri	1
1.2.1. Potansiyel etkisi	3
1.2.2. Akış hızı.....	3
1.2.3. İğne ve toplayıcı plaka arasındaki mesafe	3
1.2.4. Viskozite	3
1.2.5. Polimer çözeltisinin konsantrasyonu ve polimerin molekül ağırlığı	3
1.2.6. İletkenlik	4
1.2.7. Nem ve Sıcaklık.....	4
1.3. Enzimler	4
1.3.1. Enzimlerin sınıflandırılması	5
1.3.1.1. Oksidoredüktazlar	5
1.3.1.2. Transferazlar	6
1.3.1.3. Liyazlar	6
1.3.1.4. İzomerazlar	6
1.3.1.5. Ligazlar	6
1.3.1.6. Hidrolazlar	6
1.4. Enzim Kinetiği	7
1.5. Sensörler ve Biyosensörler	10
1.5.1. Biyosensörlerin tasarımı ve bileşenleri.....	10
1.5.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	11
1.5.2.1. Optik biyosensörler	11

1.5.2.2. Termal biyosensörler	11
1.5.2.3. Piezoelektrik biyosensörler	11
1.5.2.4. Elektrokimyasal biyosensörler	11
1.5.3. Biyosensörlerde kullanılan medyatör çeşitleri.....	14
1.5.3.1. Tiyonin	15
1.5.3.2. Metilen Mavisi	16
1.5.3.3. Nötral Kırmızı	16
1.5.4. Biyosensörlerin performans kriterleri.....	17
2. KAYNAK TARAMASI	19
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Kullanılan kimyasallar.....	27
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	27
3.1.3. Kullanılan elektrotlar, hücreler ve konnektörler.....	27
3.2. Metot	28
3.2.1. Elektrot yüzeyinin aktivasyonu ve temizlenmesi	28
3.2.2. Elektro-eğirme koşullarının belirlenmesi	28
3.2.3. PAN içeren nanoliflerin hazırlanması	29
3.2.4. Nylon 6-MWCNT-Ferrosen nanoliflerinin hazırlanması	29
3.2.5. Tampon çözeltilerinin hazırlanması	30
3.2.6. PMB sentezi.....	30
3.2.7. PTH sentezi.....	30
3.2.8. GOx biyosensörlerinin hazırlanması	30
3.2.9. PPO biyosensörlerinin hazırlanması.....	30
3.2.10. Üreaz biyosensörlerinin hazırlanması.....	31
3.2.11. Elektrokimyasal ölçüm tekniği	31
3.2.12. Biyosensörlerin analitik performanslarının incelenmesi	32
3.2.12.1. Duyarlılık	32
3.2.12.2. Tespit sınırı (LOD)	33
3.2.12.3. Biyosensörlerin kullanım kararlılığı	33
3.2.12.4. Raf ömrü	33
3.2.12.5. Girişim etkisi.....	33

3.2.12.6. Gerçek numune analizi	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1. Glikoz Oksidaz Temelli Biyosensörler	37
4.1.1. YBCE/PAN-NFs /GOx biyosensörü ile ilgili çalışmalar	37
4.1.1.1. Elektro-eğirme koşullarının belirlenmesi	37
4.1.1.2. pH etkisinin incelenmesi	38
4.1.1.3. Çalışma potansiyelinin etkisinin incelenmesi	39
4.1.1.4. Kronoamperometri çalışmaları	40
4.1.1.5. Kullanım kararlılığı	41
4.1.1.6. YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörüne girişim etkisinin incelenmesi ve gerçek numune analizi	42
4.1.2. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü ile ilgili çalışmalar	43
4.1.2.1. Elektro-eğirme koşullarının belirlenmesi	43
4.1.2.2. Elde edilen nanolif temelli biyosensörlerin elektrokimyasal incelenmesi	44
4.1.2.3. Optimum çalışma koşullarının belirlenmesi	45
4.1.2.4. Kronoamperometri çalışmaları	48
4.1.2.5. YBCE/PAN-TH-NFs/PTH elektrotun hazırlanması	51
4.1.2.6. YBCE/PAN-TH-NFs/PTH/GOx biyosensörüne ait kronoamperometri çalışmaları	52
4.1.2.7. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörüne MWCNT etkisinin değerlendirilmesi	55
4.1.2.8. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörünün kararlılık çalışması	56
4.1.2.9. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörlerinde girişim etkisi ve gerçek numune analizleri	56
4.1.3. YBCE/PAN-MB-NFs /GOx biyosensörü ile ilgili çalışmalar	58
4.1.3.1. Elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi	59
4.1.3.2. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörü için uygun çalışma koşullarının belirlenmesi	60
4.1.3.3. Kronoamperometri çalışmaları	63
4.1.3.4. YBCE/PAN-MB-NFs/PMB/GOx biyosensörüne ait kronoamperometri çalışmaları	64

4.1.3.5. Kullanım kararlılığı.....	68
4.1.3.6. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörlerinde girişim etkisi ve gerçek numune analizleri	69
4.1.4. YBCE’ler üzerinde elde edilen PAN-Nötral Kırmızı nanoliflerine ilişkin bulgular.....	70
4.1.4.1. PAN-Nötral Kırmızı nanoliflerinin elektrokimyasal olarak incelenmesi.....	71
4.1.4.2. YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörü için uygun çalışma koşullarının belirlenmesi	72
4.1.4.3. Kronoamperometri çalışmaları	74
4.1.4.4. Kullanım kararlılığı.....	75
4.1.4.5. YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörlerinde girişim etkisi ve gerçek numune analizleri	76
4.2. Polifenol Oksidaz Temelli Biyosensörler.....	79
4.2.1. PAN-MWCNT nanoliflerine ilişkin bulgular	79
4.2.1.1. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü ile katekolün elektrokimyasal analizi ve optimum parametrelerin belirlenmesi	79
4.2.1.2. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörünün analitik performansının değerlendirilmesi	81
4.2.1.3. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü ile kullanım kararlılığı ve raf ömrü analizi.....	85
4.2.1.4. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü ile girişim etkisinin incelenmesi ve gerçek numune analizi.....	86
4.3. Üreaz Temelli Biyosensörler.....	88
4.3.1. YBCE esaslı üre biyosensörleri ile ilgili çalışmalar	88
4.3.1.1. YBCE/PAN-MWCNT-Nfs/Üreaz biyosensörünün kronoamperometri çalışmaları	88
4.3.1.2. YBCE/PAN-MWCNT-TH-NFs/Üreaz biyosensörünün kronoamperometri çalışmaları	90
4.3.1.3. YBCE/PAN-MWCNT-AuNP-Fc-Nfs/Üreaz biyosensörünün kronoamperometri çalışmaları	92

4.3.2. Pt/PAN-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörünün kronoamperometri çalışmaları.....	92
4.3.3. Pt/Naylon-6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörü ile ilgili çalışmalar.....	93
4.3.3.1. Elektrokimyasal analizlerin incelenmesi	94
4.3.3.2. Kronoamperometri çalışmaları	96
4.3.3.3. Biyosensörünün analitik performansının değerlendirilmesi	99
4.3.3.4. Kullanım kararlılığı, gerçek numune ve girişim etkisinin incelenmesi.....	101
5. SONUÇLAR	104
6. KAYNAKLAR	110
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “**Nanolif Esaslı Yüzey Baskılı Elektrotların Hazırlanması ve Biyosensör Uygulamaları**” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

18/05/2023

Elif Merve ÖZER

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C	:	Derişim
I	:	Akım
I_{max}	:	Maksimum akım
ΔI	:	Akım değişimi
μA	:	Mikroamper
K_m	:	Michaelis-Menten sabiti
mM	:	Milimolar
M	:	Molar
s	:	Saniye
S/N	:	Sinyal/Gürültü
s/m	:	Standart sapma/eğim
U	:	Birim
V	:	Volt
μA	:	Mikromolar

Kısaltmalar

AA	:	Askorbik asit
CV	:	Dönüşümlü voltametri
DMF	:	N,N-Dimetilformamid
Fc	:	Ferrosen
GA	:	Glutaraldehit
GOx	:	Glikoz oksidaz
LOD	:	Tespit sınırı
MB	:	Metilen Mavisi
MWCNT	:	Çok duvarlı karbon nanotüp
Nf	:	Nanolif

NR	:	Nötral Kırmızı
PAN	:	Poliakrilonitril
Py	:	Pirol
PPy	:	Polipirol
PPO	:	Polifenol oksidaz
PBS	:	Fosfat tamponu
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
Pt	:	Platin disk elektrot
ÇE	:	Çalışma elektrotu
RSD	:	Bağıl standart sapma
cv	:	Varyasyon katsayısı
sd	:	Standart sapma
sa	:	Saat
SA	:	Sitrik asit
SEM	:	Taramalı elektron mikroskobu
TH	:	Tiyonin
THF	:	Tetrahidrofuran
YBE	:	Yüzey baskılı elektrot
YBCE	:	Yüzey baskılı karbon elektrot

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Elektro-eğirme cihazının şematik olarak gösterimi	2
Şekil 1.2. Zaman içinde substrat (A), ürün (P), serbest enzim (E), enzim substrat kompleksi (EA) ve toplam enzim (Et) konsantrasyonundaki değişim.....	8
Şekil 1.3. a) Michaelis-Menten grafiği; b) Lineweaver-Burk eğrisi	9
Şekil 1.4. Bir medyatörün çalışma prensibi	14
Şekil 1.5. Fenazin boyalarının genel yapısı ($X=O, N, S$; $R_1, R_2=H, CH_3, C_2H_5$).....	14
Şekil 1.6. Tiyonin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 1.7. TH-Leuko-TH dönüşümü tepkimesi	15
Şekil 1.8. Metilen Mavisinin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 1.9. Nötral kırmızının kimyasal yapısı	16
Şekil 3.1. a) YBCE'lerin genel yapısı; b) Pt disk elektrodun genel yapısı	28
Şekil 3.2. PPO biyosensörlerinin çalışma mekanizması.....	32
Şekil 4.1. Kütlece %4'lük PAN-NFs'lerine ait SEM görüntüsü	38
Şekil 4.2. YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörü için akım farkına karşı pH grafiği (+0,7 V, 25 °C).....	39
Şekil 4.3. YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörü için akım farkına karşı çalışma potansiyeli grafiği (pH 7,4 0,1 M PBS, 25 °C)	40
Şekil 4.4. YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörü için a) akım-zaman grafiği ve b) akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (+0,7 V; 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25 °C).....	41
Şekil 4.5. YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörünün kullanım kararlılığı (0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 0,5 mM glikoz, 25 °C).....	42
Şekil 4.6. YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörünün +0,7 V çalışma potansiyelindeki girişim çalışması (+0,7 V; 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25 °C).....	43
Şekil 4.7. Kütlece %4 PAN ve 1 mM TH içeren nanoliflere ait SEM görüntüsü	44
Şekil 4.8. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörünün 50 mV/s tarama hızındaki ait döngüsel voltamogramı (0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C).....	45

Şekil 4.9. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü için akım değişimine karşı uygulanan potansiyel grafiği (0,5 mM için, 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C)	45
Şekil 4.10. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü için akım farkına karşı pH grafiği (0,5 mM için, -0,4 V, 25 °C)	46
Şekil 4.11. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü için a) akım-zaman grafiği ve b) akım-zaman grafiğinden elde edilen akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (-0,4 V; 0,1 M pH 7 fosfat tamponu, 25 °C)	49
Şekil 4.12. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü için a) akım-zaman grafiği ve b) akım-zaman grafiğinden elde edilen akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (+0,7 V; 0,1 M pH 7 fosfat tamponu, 25 °C)	50
Şekil 4.13. TH'nin YBCE üzerindeki elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları (0,1 M KCl içeren pH 7,0 0,1 M fosfat tamponunda 1,0 mM TH monomer çözeltisinde, 50 mV/s tarama hızında, 15 döngü).....	51
Şekil 4.14. PAN-TH-NFs matrisi üzerinde TH'nin polimerizasyonu sonrası elde edilen SEM görüntüsü	52
Şekil 4.15. YBCE/PAN-TH-NFs/PTH/GOx biyosensörü için a) akım-zaman grafiği ve b) akım-zaman grafiğinden elde edilen akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (-0,4 V; 0,1 M pH 7 fosfat tamponu, 25 °C)	52
Şekil 4. 16. YBCE/PAN-TH-NFs/PTH elektrotu için farklı tarama hızlarında elde edilen akım değerlerinin a) tarama hızının kareköküne; b) tarama hızına karşı grafiği; YBCE/PAN-TH-NF elektrotu için farklı tarama hızlarında elde edilen akım değerlerinin c) tarama hızın kareköküne; ç) tarama hızına karşı grafiği (1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ , 10-125 mV/s tarama hızı, 25 °C)	54
Şekil 4.17. YBCE/PAN-MWCNT-TH-NFs/GOx biyosensörü için a) akım-zaman grafiği ve b) akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (-0,4 V; 0,1 M pH 7 fosfat tamponu, 25°C)	55
Şekil 4.18. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörünün kullanım kararlılığı (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, 0,5 mM glikoz, 25 °C).....	56
Şekil 4.19. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörünün a) -0,4 V ve b) +0,7 V çalışma potansiyelindeki girişim yapan türlere etkisi (-0,4 V; 0,1 M pH 7 fosfat tamponu, 25°C)	57
Şekil 4.20. PAN-MB-NFs'lerine ait SEM görüntüsü	58
Şekil 4.21. YBCE-PAN-MB-NFs/GOx biyosensörünün 50 mV/s tarama hızındaki döngüsel voltamogram(0,1 M pH 7,0 PBS, 25 °C).....	59

Şekil 4.22. MB medyatörünün glikoz tayininde kullanımına ait tayin mekanizması.....	59
Şekil 4.23. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan YBCE-PAN-MB-NFs/GOx biyosensörlerine ait 50 mV/s tarama hızındaki döngüsel voltamogramlar (0,1 M pH 7,0 PBS, 25 °C)	60
Şekil 4.24. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörü için akım değişimine karşı uygulanan a) potansiyel ve b) pH grafiği (oda koşullarında, 0,5 mM için, 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C)	61
Şekil 4.25. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörü için a) akım-zaman grafiği ve b) akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (-0,35 V; 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25°C)	63
Şekil 4.26. MB'nin YBCE üzerindeki elektropolimerizasyonun döngüsel voltamogramları (0,1 M KCl içeren pH 7,0 0,1 M fosfat tamponunda 0,5 mM MB monomer çözeltisinde, 100 mV/s tarama hızında, 10 döngü)	64
Şekil 4.27. PAN-MB-PMB-NFs'lerine ait SEM görüntüsü	65
Şekil 4.28. YBCE/PAN-MB-NFs/PMB/GOx biyosensörü için a) akım-zaman grafiği ve b) akım-zaman grafiğinden elde edilen akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (-0,35 V; 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C)	66
Şekil 4.29. YBCE/PAN-MB-NFs/PMB elektrotu için farklı tarama hızlarında elde edilen akım değerlerinin a) tarama hızının kareköküne; b) tarama hızına karşı grafiği; YBCE/PAN-MB-NF elektrotu için farklı tarama hızlarında elde edilen akım değerlerinin c) tarama hızının kareköküne; ç) tarama hızına karşı grafiği (1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ , 25 °C).....	68
Şekil 4.30. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörünün kullanım kararlılığı (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, -0,35 V, 0,5 mM glikoz, 25 °C).....	69
Şekil 4.31. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörünün -0,35 V çalışma potansiyelindeki girişim yapan türlere etkisi (-0,35 V; 0,1 M pH 7 fosfat tamponu, 25°C)	70
Şekil 4.32. Kütlece %4 PAN ve 1 mM NR içeren nanoliflere ait SEM görüntüsü	71
Şekil 4.33. YBCE/PAN-NR-NFs biyosensörüne ait döngüsel voltamogram (-0,6 V ve +0,4 V arasında, 50 mV/s tarama hızında, 25 °C)	72
Şekil 4.34. YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörü için akım değişimine karşı uygulanan a) potansiyel ve b) pH grafiği (25 °C, 0,5 mM glikoz)	73
Şekil 4.35. YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörü için enzim optimizasyon çalışması (0,5 mM glikoz, 25 °C).....	74

Şekil 4.36. YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörü için a) akım-zaman grafiği ve b) akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (-0,5 V; 0,1 M pH 7 fosfat tamponu, 25 °C)	75
Şekil 4.37. SPCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörünün kullanım kararlılığı (0,10 M pH 7 fosfat tamponu, -0,5 V, 0,5 mM glikoz, 25 °C)	76
Şekil 4.38. YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörünün -0,5 V çalışma potansiyelindeki girişim yapan türlere etkisi (0,10 M pH 7 fosfat tamponu, -0,5 V, 0,5 mM glikoz, 25 °C)	76
Şekil 4.39. PAN-MWCNT (%7:0,7) nanolifine ait SEM görüntüsü	79
Şekil 4. 40. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörünün a) 100 µM katekol ve b) katekol (100 µM), fenol and p-klorofenol (0,05 mM) ilavesi öncesi ve sonrası elde edilen akım-potansiyel grafiği (0,1 M pH 7,5 sodyum fosfat tamponu, 25 °C)	80
Şekil 4.41. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörünün 0,1 M pH 7,5 (▲) ve pH 8,0 (▲) sodyum fosfat tamponundaki katekole karşı kalibrasyon grafiği (25°C, 0,0 V)	81
Şekil 4.42. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü ile katekol tespiti için gerçekleştirilen a) kronoamperometrik yanıt ve b) kalibrasyon eğrisi (0,0 V; 0,1 M pH 8,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C)	82
Şekil 4.43. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü ile p-klorofenol tespiti için gerçekleştirilen a) kronoamperometrik yanıt ve b) kalibrasyon eğrisi (0,0 V; 0,1 M pH 8,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C)	83
Şekil 4.44. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü ile fenol tespiti için gerçekleştirilen a) kronoamperometrik yanıt ve b) kalibrasyon eğrisi (0,0 V; 0,1 M pH 8,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C)	84
Şekil 4.45. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörünün a) kullanım kararlılığı ve b) depolama ömrü (0,10 M pH 8,0 sodyum fosfat tamponu, 0,0 V, 5 µM katekol, 25 °C)	86
Şekil 4.46. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörünün a) katekol ile glikoz, fruktoz, sitrik ve askorbik asit karşısında amperometrik yanıtı ve b) farklı fenol bileşikleri için seçicilik ve performansın kronoamperometrik değerlendirmesi monofenoller (fenol, klorofenol) ve difenol (katekol) (0,0 V'da 0,1 M PBS pH 8,0, 25 °C)	87
Şekil 4.47. YBCE/PAN-MWCNT-Nfs/Üreaz biyosensörü ile üre tespiti için a) -0,2 V; b) -0,1 V; c) +0,2 V; ç) +0,3 V; d) +0,4 V; e) +0,7 V; f) +0,8 V potansiyellerine ait örnek kronoamperogramlar (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)	89

Şekil 4.48. YBCE/PAN-MWCNT-Nfs/Üreaz biyosensörü ile üre tespiti için a) yanıt alınan ve b) yanıt alınamayan denemelere ait örnek kronoamperogramlar (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)	90
Şekil 4.49. YBCE/PAN-MWCNT-TH-NFs/Üreaz biyosensörünün üre ilavesi sırasında a) 0,0 V; b) -0,1 V; c) -0,4 V çalışma potansiyelinde kayıt edilen kronoamperogramları (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C).....	91
Şekil 4.50. YBCE/PAN-MWCNT-AuNP-Fc-Nfs/Üreaz biyosensörü ile üre tespiti için yapılan denemelere ait örnek bir kronoamperogram (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)	92
Şekil 4.51. Pt/PAN-MWCNT-Nfs/Fc/Üreaz biyosensörü ile üre tespiti için yapılan denemelere ait örnek bir kronoamperogram (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)	93
Şekil 4.52. Nylon 6-MWCNT-NFs ait SEM görüntüsü.....	94
Şekil 4.53. Pt/Nylon 6-MWCNT-Fc-NFs elektrotunun üre varlığında ve yokluğunda 100 mV/s tarama hızındaki döngüsel voltamogramı (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)	94
Şekil 4.54. Pt/Nylon-6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörünün üre varlığında ve yokluğundaki 100 mV/s tarama hızındaki döngüsel voltamogramı (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)	96
Şekil 4.55. Pt/Nylon-6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörünün optimum çalışma potansiyelin belirlenmesi (0,005 mM üre, 0,1 mM pH 8,0 PBS, 25 °C)	97
Şekil 4.56. a) +0,35 V ve b) +0,40 V çalışma potansiyelinde ardışık üre ilavesi sırasında kayıt elde edilen amperogramlar (0,1 mM pH 8,0 PBS, 25 °C)	98
Şekil 4.57. Pt/Nylon-6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörü için optimum pH değerinin belirlenmesi (0,05 mM üre, -0,2 V, 25 °C)	99
Şekil 4.58. Pt/Nylon-6-MWCNT-Fc/Üreaz biyosensörünün ardışık üre ilavesi sonrası elde edilen a) akım-zaman grafiği ve b) akım-konsantrasyon grafiği (-0,2 V, 0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)	100
Şekil 4.59. Pt/Nylon-6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörünün kararlılık analizi sonrası elde edilen %bağıl aktivite-ölçüm sayısı grafiği (0,10 M pH 8,0 PBS, 0,005 mM üre, 25 °C).....	102
Şekil 4.60. Pt/Nylon-6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörünün -0,2 V çalışma potansiyelinde girişim yapabilecek türlerin etkisi için elde edilen kronoamperogram (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. Nanolif eldesi için kullanılan çözeltiler ve bileşimleri	29
Çizelge 3.2. Tez kapsamında hazırlanan biyosensörler	35
Çizelge 4.1. PAN-DMF çözeltisi ile nanolif hazırlama koşulları	37
Çizelge 4.2. YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörünün analitik performansı	40
Çizelge 4.3. PAN-Tiyonin-DMF çözeltisi ile nanolif hazırlama koşulları	44
Çizelge 4.4. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü için elektro-eğirme süresi ile analitik performans ilişkisi	47
Çizelge 4.5. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü için medyatör miktarı ile analitik performans ilişkisi	47
Çizelge 4.6. Meyve sularında glikoz tayini	58
Çizelge 4.7. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörü için elektro-eğirme süresi ve analitik performans ilişkisi	62
Çizelge 4.8. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörü için medyatör miktarı ve analitik performans ilişkisi	62
Çizelge 4.9. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörü biyosensörünün analitik performansı	63
Çizelge 4.10. Meyve sularında glikoz tayini	70
Çizelge 4.11. YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörünün analitik performansı	75
Çizelge 4.12. Meyve sularında glikoz tayini	77
Çizelge 4.13. Tez kapsamında hazırlanan glikoz oksidaz temelli biyosensörlerin analitik performansları	78
Çizelge 4.14. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü ile elde edilen gerçek numuneler için geri kazanım değerleri (n=3)	88
Çizelge 4.15. Pt/Naylon-6-MWCNT-Fc/Üreaz biyosensörünün analitik performansı	101
Çizelge 5.1. Tez kapsamında hazırlanan tüm biyosensörlerin analitik performansı	108

1. GİRİŞ

1.1. Nanoteknoloji ve Nanolifler

21. yüzyılın en umut verici teknolojilerinden biri olan nanoteknoloji terimi ilk kez 1965 yılı Nobel Fizik ödülü sahibi Richard Feynman'ın 1959 yılında "Altta çok yer var" adlı konuşmasında ortaya çıkmıştır. Feynman bu konuşmasında; ilk kez atomların yapı parçacıkları olarak kullanılmasıyla nano boyutlu ürünler üretme olasılığı ele alınmıştır (Talocko 2009). İşte buradan doğan nanoteknoloji terimi kabaca, nanometre ölçeğinde maddeyi gözlemleyerek, ölçerek veya üreterek nanobilim teorisini faydalı uygulamalara dönüştürme yeteneği olarak ifade edilebilir (Bayda vd. 2020). Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Bilim ve Teknoloji Konseyi nanoteknolojiyi; "Moleküler düzeyde daha büyük yapılar tasarlayabilmek için daha küçük boyutlarda çalışma yeteneğidir. Burada amaç; yapıların ve cihazların atomik, moleküler veya supramoleküler seviyelerde kontrolünü kazanarak, bu özelliklerinden yararlanmak ve cihazları verimli bir şekilde üretmeyi ve kullanmayı öğrenmektir" şeklinde açıklamıştır (Roco ve Williams 1999; Monsoori ve Soelaiman 2005). Bu tür malzeme ve sistemlerin boyutları itibarıyla yeni ve önemli ölçüde üstün fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler sergilemelerinden dolayı özellikle son dönemlerde oldukça popüler hale gelmiştir (Roco ve Williams 1999). Bu bağlamda, geçtiğimiz yıllarda sentezlenen çeşitli nanoyapılar arasında nanolifler, yüksek yüzey alanına ve gözenekli yapılara sahip olmalarından dolayı özellikle dikkat çekmiştir.

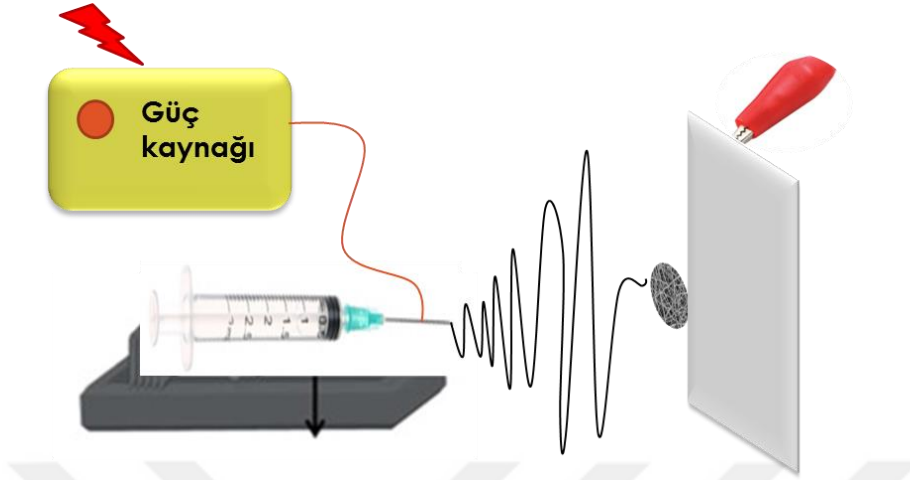
Nanolifler, çapları 1-1000 nanometre aralığında olan lifler olarak tanımlanabilir. Diğer yapılarla kıyaslandığında daha yüksek yüzey alanına sahip olduğu bilinen nanolifler, ayrıca gözenekli bir yapıya sahip olup yüksek çekme dayanımı sergilerler. Çekme yöntemi ile nanolif elde etme, şablon temelli sentez, faz ayırma, kendiliğinden tutunma ve elektro-eğirme nanolif üretiminde kullanılan yöntemlerdendir (Ramakrishna 2005; Jin vd. 2020). Bu yöntemler arasında elektro-eğirme yöntemi uygun maliyetli olması, yöntemde kullanılan polimer çeşidinin fazla olması ve sürekli nanoliflerin seri üretimi için tek yöntem olması onu literatürde en kapsamlı incelenen yöntem haline getirmiştir. Ayrıca bu yöntemle elde edilen nanoliflerin geniş yüzey alanı sergilemesi ve gözenek boyutunun kontrolünün sağlanabilmesi yine diğer yöntemlere karşı üstünlükleri arasındadır (Huang vd. 2003; Garkal vd. 2021).

1.2. Elektro-eğirme yöntemi mekanizması ve yöntem parametreleri

Elektro-eğirme teknolojisinin başlangıcı, 1934'te Formhals tarafından icat edilen yüksek voltajlı elektrostatik itme ile polimer liflerinin üretimine ilişkin cihaza atfedilir (Formhals 1934; Jin vd. 2020). Formhals, bu cihazla elektrostatik eğirme prosesinin ve ekipmanlarını detaylı olarak açıklamıştır (Anton 1934; Taylor 1964; Chen vd. 2019). 1964 yılında Taylor, elektro-eğirme işlemi sırasında "eğirme düzesi"ndeki konik damlacığın oluşumunu aydınlatmıştır. Son olarak 1995 yılında Doshi ve Reneker (Doshi ve Reneker 1995; Reneker ve Chun 1996), elektro-eğirme yoluyla nanolif hazırlamanın mümkün olabileceğini göstermiştir (Chen vd. 2019). Tipik bir elektro-eğirme cihazı temelde 4 ana parçadan oluşmaktadır (Şekil 1.1):

- Yüksek voltajlı güç kaynağı
- Şırınga pompası

- Polimer çözeltisini içeren metal uçlu şırınga
- Toplayıcı plaka



Şekil 1.1. Elektro-eğirme cihazının şematik olarak gösterimi

Bu teknikte, ilk olarak uygun bir çözücünde çözülen polimer çözeltisini içeren şırınga, sabit bir akış hızında serbest bırakılması için bir şırınga pompası üzerine yerleştirilir. Metalik şırınga ucu ile toplayıcı plaka arasına 10-70 kV’lık bir potansiyel uygulandığında şırınga ucunda bulunan polimer damlası oldukça elektrikli hale gelir ve bu sırada iki ana kuvvete maruz kalır: yüzey yükleri arasındaki elektrostatik itmeler ve harici bir elektrik alan tarafından uygulanan Coulomb kuvveti. Uygulanan potansiyel bir eşik değerine ulaştığı anda polimer damlası “Taylor konisi” adı verilen konik bir şekil alır (Kozanoğlu 2006; Garkal vd. 2021). Polimer çözeltisinin yüzey gerilimi, elektrik alan eşliğini aştığında elektrostatik kuvvet devreye girer ve polimer damlası jeti püskürtülür. Bu yüklü sıvı jeti, şırınganın ucundaki polimer çözeltisi ile toplayıcı plaka arasında oluşan potansiyel farkın bir sonucu olarak toplayıcı plaka üzerinde birikir. Polimer jetinin, polimer içeren şırıngadan toplayıcı plakaya olan hareketi esnasında çözücü buharlaşır ve toplayıcı plaka üzerinde rastgele biriken ultra ince nanolifler elde edilmiş olur (Giram vd. 2018; Shitole vd. 2019a; Shitole vd. 2019b; Garkal vd. 2021).

Elektro-eğirilmiş nanoliflerin geniş yüzey/hacim oranına sahip olmaları ilk aşamada onları biyomedikal ve doku mühendisliği gibi çeşitli alanlardaki uygulamaları ile popüler hale getirmiştir. Daha sonraki dönemlerde ise bu tip nanolifler, tekstil sanayisinde, biyosensörlerde, filtrelerde, enerji depolamada ve yakıt pili gibi çeşitli alanlardaki uygulamaları ile çığır açar hale gelmiştir (Thenmozhi vd. 2017).

Elektro-eğirme yöntemiyle elde edilmiş nanolif morfolojisine uygulanan voltajın, çözelti konsantrasyonunun, akış hızının, iğne ucunun, şırınga-toplayıcı arasındaki mesafenin, sıcaklık ve nem gibi ortam parametrelerinin ciddi bir şekilde etki ettiği bilinmektedir. Bu nedenle istenilen nanolif morfolojisinin elde edilmesinde tüm bu parametreler göz önüne alınmalıdır.

1.2.1. Potansiyel etkisi

Yapılan araştırmalar elektro-eğirme yoluyla elde edilen nanoliflerin çapının uygulanan potansiyelin değiştirilmesiyle değiştiğini göstermiştir (Thenmozhi vd. 2017). Yüksek potansiyel uygulanması, küresel damlacığın deformasyonuna ve buna bağlı olarak da ekstra ince nanoliflerin elde edilmesi ile sonuçlanır. Potansiyel kritik bir değere ulaşana kadar arttırılmaya devam edilirse daha küçük çaplı nanolifler elde edilir. Potansiyelin bu kritik değerin daha da üstüne çıkartılması boncuklu ve düzensiz morfolojide nanoliflerin oluşumuyla sonuçlanır (Sill ve Recum 2008; Auffan vd. 2012; Garkal vd. 2021).

1.2.2. Akış hızı

Nanolif morfolojisine etki eden bir başka parametre ise çözeltinin akış hızıdır. Akış hızı, polimerik çözelti için kritik bir değerde tutulması durumunda düzgün morfolojide boncuksuz nanolifler elde edilebilirken, bu kritik değerin aşılması durumunda ise boncuk oluşumu söz konusu olabilmektedir (Megelski vd. 2002; Garkal vd. 2021).

1.2.3. İğne ve toplayıcı plaka arasındaki mesafe

İğne ve toplayıcı plaka arasındaki mesafe, elektro-eğrilmiş nanoliflerin morfolojisini önemli ölçüde etkilediği bilinmektedir. Önceden yapılan çalışmalar göstermiştir ki iğne ile toplayıcı plaka arasındaki mesafe azaldıkça, elde edilen nanoliflerin çapı da aynı oranda büyümektedir (Garkal vd. 2021).

1.2.4. Viskozite

Elektro-eğirme yöntemiyle nanolif eldesi için incelenen bir başka parametre ise bu yöntemde kullanılacak olan polimer çözeltisinin viskozitesidir. Düşük viskozitede yuvarlak ve damlacıklı nanolifler oluşurken viskozite arttıkça ve optimum bir değere ulaştığında nanoliflerin üzerinde oluşan boncukların şekli değişir ve pürüzsüz, iyi biçimlendirilmiş nanolifler elde edilir (Fong vd. 1999; Garkal vd. 2021).

1.2.5. Polimer çözeltisinin konsantrasyonu ve polimerin molekül ağırlığı

Çözeltinin viskozitesi, kullanılan polimerin molekül ağırlığı ve polimer çözeltisinin konsantrasyona bağlı olarak değişir. Viskozite üzerinde etkili olan bu iki parametre aynı zamanda, nanoliflerin morfolojisini de etkilemektedir. Yüksek molekül ağırlıklı polimerler, geniş bir yüzey alanına sahip olduklarından polimer zincirlerinin dolaşıklığını artırarak çözeltinin viskozitesinin artmasına neden olurlar. Bu viskozite artışı daha büyük çaplı nanoliflerin oluşumuna yol açabilir (Bhardwaj vd. 2010; Liu vd. 2018). Zincir dolaşıklığındaki bu artış yüzey geriliminin üstesinden gelir ve boncuksuz elektro-eğrilmiş nanolifler elde edilmiş olur. Konsantrasyon daha da arttırılırsa, şerit benzeri lifler üretilebilir ve hatta elektro-eğirme süreci bozulabilir. Bu nedenle, optimum bir değer bulmak kusursuz nanolifler elde etmek için önemlidir (Mercante vd. 2017; Garkal vd. 2021).

1.2.6. İletkenlik

Elektro-eğirme yönteminde Taylor konisi oluşumu, çözeltinin iletkenliğinden etkilenir. Çözeltinin iletkenliği ayrıca nanolif çapını da etkilediği bilinmektedir. İletkenliği düşük olan çözeltide damlacık herhangi bir yüke maruz kalmaz, bu nedenle Taylor konisi oluşumu gözlenmez. İletkenliğin istenilen seviyede artmasıyla bu durumun tam tersi olarak Taylor konisi oluşumunda neden olan bu damlacıkların yüzeyindeki yük artar ve elektro-eğirme yöntemiyle toplayıcı plaka üzerinde kusursuz nanolifler elde edilmiş olur (Sun vd. 2014; Garkal vd. 2021).

1.2.7. Nem ve Sıcaklık

Bağıl nem ve sıcaklık, polimer çözeltisinde kullanılan çözücünün buharlaşması üzerinde etkili olan çevresel faktörlerdir. Çözücünün buharlaşma hızı bağıl nem de yüksektir ve buna bağlı olarak da nanolif çapı daha düşüktür. Ayrıca, yüksek bağıl nem nanoliflerin üzerinde gözeneklerin oluşumuna da neden olmaktadır.

Ortam sıcaklığının artması çözücünün buharlaşmasını hızlandırır. Ayrıca yüzey geriliminin ve viskozitenin de azalmasına neden olur. Buna bağlı olarak, polimer jetinin uzaması kolaylaşır ve nanoliflerin çapı azalmış olur (Yang vd. 2017; Garkal vd. 2021).

1.3. Enzimler

Enzimler katalitik etkiye sahip, seçiciliği yüksek ve optimum koşullar altında biyokimyasal reaksiyonları hızlandırmaktan sorumlu biyolojik makromoleküllerdir (<https://encyclopedia.pub/entry/15346>; Wang vd. 2021). Bu makromoleküller, belirli bir moleküle veya analite bağlanabilirler. Yüksek seçicilikleri, basitlikleri, biyobozunurlulukları, yan reaksiyonların az olması ve toksik olmamaları ile inorganik katalizörlere göre oldukça avantajlıdır (<https://encyclopedia.pub/entry/15346>; Rostro-Alanis vd. 2016). Enzimlerin sahip oldukları bu yüksek seçicilikleri analitlerin hızlı, kesin ve sürekli izlenmesini mümkün kılmasının yanı sıra, daha düşük analit konsantrasyonunda tayine olanak sağlar. Genel olarak bir enzim, analitin doğrudan ölçülmesine olanak sağlayan elektroaktif türlerin üretilmesi ve tüketilmesi ile ilişkilendirilebilmektedir (<https://encyclopedia.pub/entry/15346>; Perez vd. 2019; Ahangari vd. 2021).

Enzim temelli biyosensörlerin tasarlanmasındaki en önemli basamak, enzimin elektrot yüzeyine immobilizasyonudur. Bu işlem doğru bir şekilde gerçekleştirilmezse, enzimin aktif bölgesine erişilebilirliği, tekrar kullanılabilirliği ve stabilitesi etkilenebilir (<https://encyclopedia.pub/entry/15346>; Temoçin 2021). Stabilité, seçicilik ve hatta enzimin aktivitesini iyileştirmek için destek malzemesinin seçiminin yanı sıra immobilizasyonun türü de oldukça önemlidir. İmmobilize edilmiş enzimler kararlı, tekrar kullanılabilir ve katalitik aktivitelerini süreç boyunca koruyabilmektedirler. Adsorpsiyon, kovalent bağlama, çapraz bağlama, kapsülleme ve hapsedme enzimlerin immobilizasyonu için kullanılan başlıca yöntemlerdir (Gonzalez-Coronel vd. 2017; Alvarado-Ramirez vd. 2021). Adsorpsiyon ucuz ve basittir; ancak enzimlerin destekleyici materyal ile zayıf ilişkileri olduğu bilinmektedir (Gul vd. 2017). Hapsedme yöntemi ise, enzime yüksek stabilite sağlamanın yanı sıra, substratların enzimin aktif bölgesine difüzyonunu engelleyebilir. Enzim ve destekleyici materyal arasında kararlı

bir kompleks olduğu için kovalent bağlanma ile immobilizasyon, en çok kullanılan yöntemler arasındadır. Ancak, kovalent bağlanmanın enzimin aktivitesini olumsuz yönde etkilemesi bu yöntemin dezavantajı olarak gösterilebilir. Çapraz bağlanma ile immobilizasyonda ise, genellikle glutaraldehit gibi bir reaktant ile oluşturulan enzimler arasındaki kararlı bağlanma, enzimin stabilitesini ve etkinliğini olumlu yönde iyileştirilebilmektedir (<https://encyclopedia.pub/entry/15346>).

1.3.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler katalize ettikleri reaksiyonlara göre sınıflandırılabilirler.

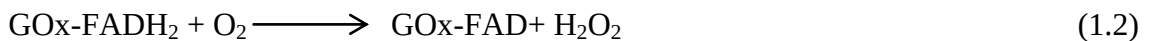
1.3.1.1. Oksidoredüktazlar

Oksidoredüktaz enzimler, indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarını katalizleyen ve oldukça kararlı olmalarından dolayı biyosensörlerde en çok kullanılan enzim sınıfıdır (<https://encyclopedia.pub/entry/15346>).

i) Glikoz Oksidaz enzimi

Günümüzde, insan sağlığını olumsuz yönde etkilemesi sebebi ile kandaki glikozun ölçülmesi büyük önem taşımaktadır (<https://encyclopedia.pub/entry/15346>; Koushki vd. 2020). Glikoz oksidaz (GOx) enzimi, glikoz tayini için geliştirilen biyosensörlerde kullanılan ortofosfat proteinlere sahip bir glikoproteindir. Başta *Aspergillus* (Kalisz vd. 1991) veya *Penicillium* (Sukhacheva vd. 2004) olmak üzere çeşitli mantar türlerinin saflaştırılması sonucu elde edilen GOx enzimi yaklaşık olarak 130 ile 175 kDa aralığında bir molekül ağırlığına sahiptir (Kalisz vd. 1991; Bankar vd. 2009). Bu enzimin suda dağılılabilirlik, kararlılık, uygun maliyet ve çökelmeye karşı direnç gibi benzersiz özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Bankar vd. 2009).

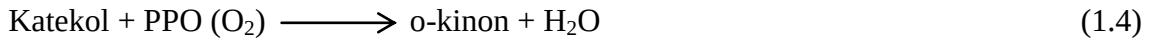
GOx, glikozu glikonik-D-laktona dönüştürmek için flavin adenin dinükleotidini (FAD) FADH₂'ye indirgeyerek görev yapar. Daha sonra, elektron alıcısı olarak kullanılan çözünmüş O₂ ile deokside edilen FADH₂, H₂O₂ üretimine neden olur. Elektroda bir çalışma potansiyeli uygulandığında ise, H₂O₂ O₂'ye yükseltgenir ve biyosensörde glikoz konsantrasyonu ile orantılı bir akım oluşmuş olur (<https://encyclopedia.pub/entry/15346>; Newman ve Turner 2005). GOx temelli biyosensörlerde H₂O₂ üretiminin takibini temel alan genel reaksiyonlar aşağıda listelenmiştir (Kausaite-Minkstiene vd. 2014).



ii) Polifenol oksidaz enzimi

Katekol oksidaz veya Tirosinaz enzimi olarak da bilinen Polifenol oksidaz (PPO) enzimi, bakteriler, mantarlar, bitkiler ve memeliler tarafından üretilen doğal bir enzimdir (<https://encyclopedia.pub/entry/15346>). Aktif merkezinde iki bakır atomu bulunan bu enzim, genellikle bira veya şarap gibi çeşitli alkollü içkilerdeki ve kahve ile meyve suyu gibi içeceklerdeki fenolik bileşiklerin tayininde sıklıkla kullanılmaktadır. Son yıllarda yeşil kimya çerçevesinde atık sulardaki fenolik bileşiklerin tayini amaçlı

çok sayıda rapor bildirilmiştir (<https://encyclopedia.pub/entry/15346>; Vicentini vd. 2016; García-Guzmán vd. 2019; Wu vd. 2020; Bounegru vd. 2021). PPO enzimi, moleküler O₂ varlığında monofenollerin o-dihidroksi fenollere hidroksilasyonu ve daha sonra da o-dihidroksi fenollerini de yine moleküler O₂ varlığında o-kinonlara oksidasyonunu kataliz eder (Fiorentino vd. 2010; Vicentini vd. 2016). PPO enziminin çalışma prensibi aşağıda gösterilmektedir (Appetrei vd. 2011):



1.3.1.2. Transferazlar

Bu enzimler aşağıdaki reaksiyondan da görülebileceği gibi bir grubu, bir substrattan (donor) diğerine (akseptör) aktarımını kataliz eder (Boyce ve Tipton 2001).



1.3.1.3. Liyazlar

Bu enzimler, C-C, C-O, C-N ve diğer bağları hidroliz veya yükseltgenme-indirgenme dışındaki reaksiyonlar özgü katalitik aktivite göstererek bu bağları ayırmaya yardımcı olurlar. Tek substrat üzerinde hareket eden çift bağlar veya halkalar bırakarak bir molekül elimine edilir (Boyce ve Tipton 2001).

1.3.1.4. İzomerazlar

Bir moleküldeki geometrik veya yapısal değişiklikleri kataliz eden izomerazlar, ilgili izomerizm tipine göre; epimerazlar, rasemerazlar, mutazlar, sis-trans izomerazlar veya siklomerazlar olarak isimlendirilebilirler (Boyce ve Tipton 2001).

1.3.1.5. Ligazlar

Ligazlar, ATP gibi bir trifosfatta, bir difosfat bağının hidrolizi ile iki molekülün birbirine bağlanmasını kataliz eder (Boyce ve Tipton 2001).

1.3.1.6. Hidrolazlar

Sistematik isimleri, substrat-x-hidrolaz şeklinde olan hidrolazlar, C-O, C-N, C-C gibi bağların hidrolitik olarak parçalanmasını katalizler (Boyce ve Tipton 2001).

i) Üreaz Enzimi

Üreaz (üre amidohidrolazlar, EC 3.5.1.5), üre hidrolizini amonyak ve karbondioksit katalize ederek katalizlenmemiş hidroliz reaksiyonuna göre reaksiyon hızını yaklaşık 8×10^{17} (Callahan vd. 2005) oranında arttıran, nikel içeren bir metaloenzimdir (Carlini ve Ligabue-Braun 2016). Bu enzime ait etki mekanizması aşağıdaki reaksiyonlarla ifade edilebilir:



1.4. Enzim Kinetiği

Enzim kinetiğini anlamak için kullanılan en basit ve en iyi bilinen yaklaşım; Leonar Michaelis ve Maud Menten tarafından geliştirilen ve daha sonra Briggs ve Holdane tarafından standart yarı kararlı durum kullanılarak türetilen “Michaelis-Menten denklemi”ne dayanmaktadır (Briggs ve Haldane 1925; Choi vd. 2017). Bu denklem katalitik sabit, k_{cat} , ve Michaelis-Menten sabiti, K_m , olmak üzere iki parametreyi kullanarak enzim katalizli reaksiyon hızlarının substrat konsantrasyonu ile ilişkisini tanımlar (Choi vd. 2007). Substrat (A)’ın enzim (E) tarafından katalize edilen ürün (P)’ye basit dönüşümü Eşitlik 1.9’da gösterilmiştir (Rogers ve Gibon 2009):



Buradan da görülebileceği gibi, ilk adım substrat bağlanmasını ve ikinci adım da katalitik adımı ifade etmektedir (Rogers ve Gibon 2009). Denklemde yer alan k_1 , E ve A oluşum hız sabitini, k_{-1} , [EA] kompleksinin ayrışma sabitini ve son olarak k_2 ise kataliz hız sabitini tanımlamaktadır. [EA]’nın ayrışma hızının (k_2), [EA]’nın oluşum hızı (k_1) ve yeniden ayrışma hızına göre yavaş olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla hız sınırlayıcı adım Eşitlik 1.10’da gösterildiği gibi belirlenir (Rogers ve Gibon 2009):

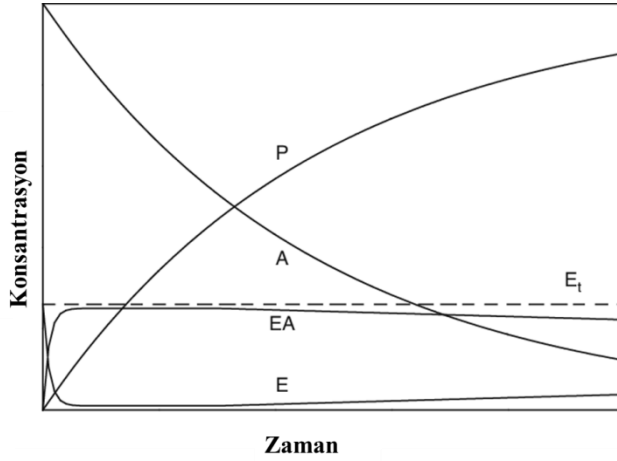
$$V = k_2[\text{EA}] \quad (1.10)$$

Şekil 1.2 substrat tüketiminin, ürün üretiminin ve enzim-substrat kompleksinin konsantrasyonunun reaksiyon boyunca nasıl değiştiğini göstermektedir. Başlangıçta, [EA] kompleksi oluşur ve tüketimin hızının oluşum hızıyla eşleştiği bir konsantrasyon değerine ulaşır. Daha sonra, [EA] belirli bir süre sabit kalır ve bu “kararlı durum” olarak bilinir. Michaelis-Menten denkleminin bu koşul için tanımlanmıştır. Süre ilerledikçe reaksiyon [EA]’nın kademeli olarak azaldığı ve substrat tükenmesi ile karakterize edilen üçüncü bir aşamaya girer. Kararlı durumda enzim-substrat kompleksinin konsantrasyonu sabittir, yani;

$$\frac{\partial[\text{EA}]}{\partial t} = 0 \quad (1.11)$$

Bu nedenle [EA] kompleksinin oluşumu ve ayrışması eşittir.

$$k_1[\text{E}][\text{A}] = k_{-1}[\text{EA}] + k_2[\text{EA}] \quad (1.12)$$



Şekil 1.2. Zaman içinde substrat (A), ürün (P), serbest enzim (E), enzim substrat kompleksi (EA) ve toplam enzim (Et) konsantrasyonundaki değişim

Eşitlik 1.12 yeniden düzenlenirse;

$$\frac{k_1[E][A]}{k_{-1} + k_2} = [EA] \quad (1.13)$$

Buradaki üç hız sabiti tek bir terim olarak birleştirilebilir. Bu sabit, Km, Michaelis-Menten sabiti olarak bilinir. Eşitlik 1.13’de Km yazılırsa;

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (1.14)$$

$$\frac{[E][A]}{K_m} = [EA] \quad (1.15)$$

Eşitlik 1.15’teki [E] bağlanmamış (serbest) enzimi belirtir. Serbest enzim [E] ve substrata [EA] bağlanan enzim miktarı reaksiyon boyunca değişir ancak, toplam miktarı (Et) Şekil 1.2’den de görülebileceği gibi sabittir.

$$E = E_t - [EA] \quad (1.16)$$

$E_t - EA$ ifadesi Eşitlik 1.15’de yerine yazılır ve düzenlenirse;

$$\frac{[E_t][A]}{K_m + [A]} = [EA] \quad (1.17)$$

Bu ifade Eşitlik 1.10’da yerine yerleştirilirse;

$$V = \frac{k_2[E_t][A]}{K_m + [A]} \quad (1.18)$$

oluşur. Mevcut tüm enzim substratına bağlandığında, maksimum reaksiyon hızına (V_{max}), ulaşılır. Yani;

$$[EA] = [E_t] \quad (1.19)$$

Doymuş substrat konsantrasyonu koşulları altında; Eşitlik 1.10 ve 1.19 birleştirilirse;

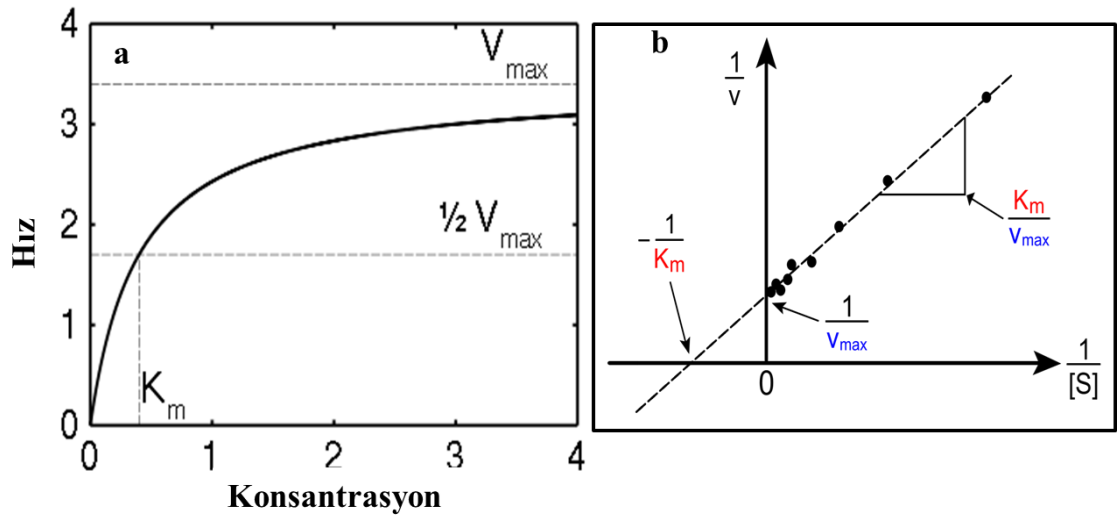
$$V_{max} = k_2[E_t] \quad (1.20)$$

olur ve bu ifade Eşitlik 1.18’de yerine konulursa yeni hız eşitliği;

$$V = \frac{V_{max}[A]}{K_m + [A]} \quad (1.21)$$

şeklinde olur ve bu eşitlik Michaelis-Menten eşitliği olarak bilinir. Burada V_{max} , doymuş substrat konsantrasyonunda elde edilen maksimum hızı, $[A]$ substrat konsantrasyonunu, K_m ise Michaelis-Menten sabitidir ve V_{max} ’ın yarısına ulaşmak için gereken substrat konsantrasyonunu ifade eder. Sabit pH ve sıcaklık durumunda belirli bir enzim için bu değer sabittir ve K_m değeri, o enzimin substratına bağlanma gücünün bir göstergesidir. Bu değer düşük olması, enzimin substrat bağlanmasının yüksek olduğunu ifade eder (Rogers ve Gibon 2009).

Şekil 1.3a reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile değişimini göstermektedir. Ancak bu grafiğin doğrusal olmaması; Michaelis-Menten parametrelerinin belirlenmesinde çeşitli hatalara yol açmaktadır. Düşük substrat konsantrasyonunda reaksiyon hızının belirlenmesindeki hatalar Lineweaver-Burk eğrisinin elde edilmesi ile büyük ölçüde giderilebilir. Şekil 1.3b $1/[A]$ ’ya karşılık gelen $1/V$ değerlerini göstermekte olup, bu grafiğin eğimi K_m/V_{max} değerine, kayım değeri ise $1/V_{max}$ ’a eşittir.



Şekil 1.3. a) Michaelis-Menten grafiği; b) Lineweaver-Burk eğrisi

1.5. Sensörler ve Biyosensörler

Sensörler ısı, basınç, nem, hareket, kuvvet ve akım gibi fiziksel niceliklerdeki değişiklikleri algılamaya yardımcı olan ve analiz ederek sinyallere dönüştürebilen cihazlar olarak tanımlanabilmektedir (Ensafi 2009; Ensafi vd. 2011; Naresh ve Lee 2021). Günümüzde hayatımızı oldukça kolaylaştıran ve fiziksel olarak çevre ile etkileşime girmemize yardımcı olan bilgisayar, fotokopi makinesi, cep telefonu, mikrodalga fırın, klima vd. gibi çeşitli cihazların varlığı bilim ve teknolojinin bir sonucudur. Bu uygulamaların çoğunda sensörler kullanılmaktadır. İdeal bir sensör yüksek hassasiyet, seçicilik, çözünürlük ve tekrarlanabilirlik gibi özelliklere sahip olmalıdır (Theavenot vd. 2001; Dincer vd. 2019; Naresh ve Lee 2021).

Sensörler; enerji kaynağına göre aktif ve pasif sensörler olarak, sinyal algılama türüne bağlı olarak da fiziksel, kimyasal, termal ve biyolojik sensörler olarak sınıflandırılabilir (White 1987; Khanna 2012). Aktif sensörlerin çalışması için harici bir enerji kaynağına ihtiyaç vardır. Bu tip sensörlere mikrofon örnek olarak verilebilir. Pasif sensörler için ise bu tip bir enerji kaynağına gerek duyulmaz. Bu tür sensörlere kendi kendini üreten sensörler denilmektedir. Fotodiyotlar, piezoelektrik sensörler pasif sensör sınıfına örnek olarak verilebilir. Sinyal algılama türüne bağlı olarak sınıflandırılan fiziksel sensörler kütle, hacim, yoğunluk ve basınç gibi fiziksel büyüklüklere bağlı sinyalleri ölçer. IUPAC tarafından yapılan tanıma göre bir kimyasal sensör; “kimyasal bilgiyi belirli bir numune bileşeninin konsantrasyonundan toplam konsantrasyona kadar değişen, analitik olarak ölçülebilir bir sinyale dönüştüren cihaz”dır. Bu tür sensörler çevre kirliliğinin izlenmesi, gıda ve ilaç analizi gibi izlemeler için ve ayrıca klinik teşhis amaçları için kullanılmaktadırlar (Naresh ve Lee 2021).

1.5.1. Biyosensörlerin tasarımı ve bileşenleri

Biyosensör; bir enzim veya antikor gibi biyolojik bir reseptör, elektronik bir bileşenle entegre ederek ölçülebilir ve işlenebilir bir sinyal üreten bir cihaz veya prob olarak tanımlanabilir. Elektronik bileşen, fizyolojik bir değişiklik veya ortamdaki çeşitli kimyasal veya biyolojik malzemelerin varlığı ile ilgili bilgileri algılar, kaydeder ve iletir. Tipik bir biyosensör; analit, biyoreseptör, dönüştürücü ve kaydedici’den oluşmaktadır (Bhalla vd. 2016).

a) Analit: Bileşenleri tanıyan veya tespit edilen glikoz, amonyak, alkol gibi ilgili bir maddeyi ifade etmektedir (Naresh ve Lee 2021).

b) Biyoreseptör: Bir molekül veya hedef substratı (analiti) tanıyabilen enzim veya hücre gibi biyolojik bir elementtir. Biyoreseptör ve analit arasındaki etkileşim sırasında sinyal üretim süreci (ısı, ışık, pH, kütle ve/veya yük değişimi vb.) biyo-tanım olarak adlandırılır (Naresh ve Lee 2021).

c) Dönüştürücü: Dönüştürücü, bir biyosensör tasarımındaki en önemli parçalardan biridir. Biyolojik tanıma, miktarla veya kimyasal biyolojik bir hedefin varlığında bağlantı kurarak ölçülebilir veya işlenebilir bir sinyale (elektriksel) dönüştürür. Bu enerji dönüşüm süreci sinyalizasyon olarak bilinir. Dönüştürücüler analit-biyoreseptör etkileşimlerinin sayısı ile orantılı olarak optik veya elektrik sinyalleri üretir (Naresh ve Lee 2021).

e) **Kaydedici:** Karşılık gelen yanıtın kullanıcı tarafından okunabilir ve anlaşılabilir sinyal haline dönüştüren bir bilgisayar sisteminden oluşmaktadır (Naresh ve Lee 2021).

1.5.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler dönüştürücünün türüne bağlı olarak elektrokimyasal, optik, termal, piezoelektrik ve gravimetrik biyosensörler olarak sınıflandırılabilir.

1.5.2.1. Optik biyosensörler

Günümüzde optik fiberler ve lazer teknolojisindeki gelişmelerle birlikte optik dönüştürücülere sahip biyosensörler büyük ilgi görmektedir. Bu tip biyosensörler, özellikle minyatür sistemler için analitik kimyada spektrofotometrik yöntemlerin uygulama sınırlarını oldukça genişletmiştir. Optik dönüştürücüye sahip biyosensörlerde ölçülen sinyal, biyokatalizörün hedef analit ile etkileşiminden kaynaklan UV-Vis absorpsiyonunda, floresans/fosforesans, biyo/kemilüminesansda, yansımada, kırılma indisi ve saçılmada meydana gelen bir değişikliğe bağlıdır (Mello ve Kubota 2002).

1.5.2.2. Termal biyosensörler

Termal biyosensörler, enzim veya mikroorganizma tarafından katalizlenen kimyasal bir reaksiyonda zaman içinde değişen sıcaklığın izlenmesine dayanır. Bununla birlikte, ısı adiyabatik bir sistemde mükemmel bir şekilde sınırlandırılmaz. Üretilen ısının bir kısmı iletim veya konveksiyon yoluyla boşa harcandığından, genellikle bir kayıp söz konusudur. Bu tip dönüştürücülerin diğer biyosensörlere kıyasla seçiciliği de azdır. Buna rağmen, minyatürleştirmeye uygun olması ve birkaç bileşiğin eş zamanlı tayini için sensör dizilerinin oluşturulabilmesi bu tip dönüştürücülerin avantajları arasındadır (Grate vd. 1993; Xie vd. 1995; Mello ve Kubota 2002).

1.5.2.3. Piezoelektrik biyosensörler

Piezoelektrik dönüştürücüler, daha çok immünosensörlerde kullanılır. Bu biyosensörlerin tasarımı bir kristalin yüzeyinde bir antikor veya antijenin immobilize edilmesine dayanır (O'Sullivan vd. 1999). Bu elementlerin analit ile oldukça spesifik etkileşimi, kristalde bir kütle değişikliğine sebep olur ve bu kristalin salınımı yoluyla izlenir. Bu tip biyosensörler immünosensörlerde, patojenik mikroorganizmaların, gazların, aromaların, pestisitlerin ve hormonların tespitinde yaygın olarak kullanılabilir (Mello ve Kubota vd. 2002).

1.5.2.4. Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal dönüştürücüye sahip bir biyosensör, enzim-substrat reaksiyonu veya antijen-antikor etkileşimi gibi biyokimyasal olayları elektrik sinyallerine (örneğin akım, voltaj, empedans vb.) çeviren analitik cihazlardır (Zheng vd. 2013; Li vd. 2016; Cho vd. 2020). Elektrokimyasal biyosensörlerde, biyomoleküllerin (enzim, antikor ve nükleik asit) immobilizasyonu ve elektronların hareketi için kullanılan destekleyici materyal anahtar bir bileşendir. Doğru immobilizasyon tekniğinin kullanılmaması enzimde aktivite kaybına ve buna bağlı olarak biyoyumluluğunun düşmesine sebep olur. Bu nedenle, immobilizasyon sırasında enzimlerin oryantasyonu ve biyolojik

aktivitesini korumak çok önemlidir. Ayrıca, elektrot için uygun işlevsel malzemenin kullanılması biyosensörlerin yüksek performansı için önemli bir süreçtir (Cho vd. 2020).

Elektrokimyasal dönüştürücüye dayalı biyosensörler, ekonomik olma, çok sayıda analite uygulanma ve hızlı yanıt verme gibi çeşitli avantajlara sahiptir (Luong vd. 1988). Elektrokimyasal biyosensörler kondüktometrik, potansiyometrik ve amperometrik biyosensörler olarak sınıflandırılabilir (Mello ve Kubota 2002).

i) Kondüktometrik biyosensörler

Bu biyosensörler, karbonhidratlar ve mikroorganizmalar gibi yüksüz substratları laktik asit benzeri ara maddelere dönüştürdüğü sırada ortamda meydana gelen iletkenlik değişiminin ölçülmesi esasına dayanır. Bu tip biyosensörler genellikle spesifik değildir ve düşük bir sinyal/gürültü oranına sahiptir. Bu nedenle elektrokimyasal biyosensör sınıfı içerisinde en az kullanılan sınıfı temsil etmektedir (Mello ve Kubota 2002).

ii) Potansiyometrik biyosensörler

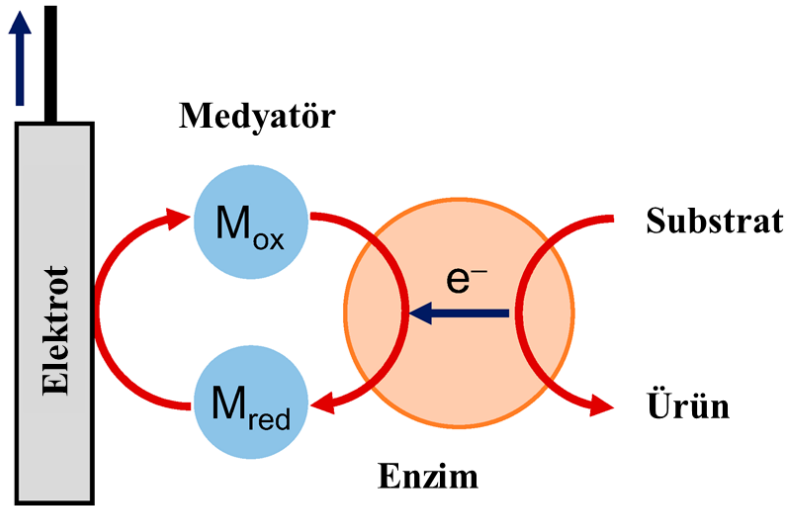
Elektrokimyasal potansiyel dönüştürücüye bağlı bir biyolojik algılama elemanı içeren cihazlar olarak tanımlanan potansiyometrik biyosensörler, genellikle daha basit bir kimyasal türe ve bunun ardından gelen elektrokimyasal algılamaya (NH_4OH , CO_2 , pH, H_2O_2 vb.) yol açan biyokimyasal reaksiyonlara dayanır. Bir potansiyometrik biyosensör tarafından üretilen analitik sinyal, elektrik potansiyelidir (Yunus vd. 2013). Potansiyometrik ölçümler, potansiyel/pH varyasyonunun kaydedilmesine dayanır ve bu tespitler gıda, klinik veya çevresel analizlerde uygulanabilir. Potansiyometrik biyosensörler, bir biyoalgılama elemanının (aslında bir enzim) analit miktarındaki değişimi algılayan bir dönüştürücü ile kombinasyonu sonucu geliştirilir. Analit konsantrasyonu ile logaritmik olarak ilişkili olan bir analitik sinyal üretilir, kaydedilir (Pisoschi 2016).

iii) Amperometrik biyosensörler

Amperometrik biyosensörler, bir elektroaktif türün, çözeltideki türlerin konsantrasyonu ile orantılı olarak kimyasal reaksiyon sonucunda üretilen akımın ölçülmesine dayanır. Amperometrik biyosensör, potansiyometrik biyosensörlere oranla daha hızlı, daha hassas, kesin ve doğrudur. Bu nedenle elektrokimyasal biyosensör sınıfı içerisinde en çok kullanılan biyosensör çeşididir. Amperometrik biyosensörlerin seçiciliği sadece mevcut elektroaktif türlerin redoks potansiyeli tarafından yönetilir (Mello ve Kubota 2002; O'Neill vd. 2004). Amperometrik biyosensörler arasında enzim temelli biyosensörler literatürde en çok incelenen biyosensör sınıfıdır.

Glikoz tayini için tasarlanan glikoz oksidaz temelli bir enzim elektrotu, Clark ve Lyons (1962) tarafından üretilen ilk amperometrik biyosensördür. Clark oksijen elektrotu ile glikoz konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak oksijen tüketimi izlenir. Bu bağlamda analit konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak, oksijen tüketiminin veya hidrojen peroksit üretiminin takibinin izlenmesi birinci nesil biyosensörler olarak adlandırılmaktadır (Mello ve Kubota vd. 2002; Dede ve Altay 2018). Enzimin aktif merkezi ve elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferini geliştiren ve medyatör olarak

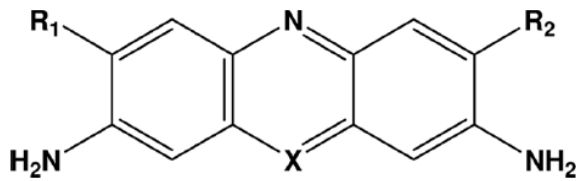
adlandırılan maddelerin yapıya dahil edilmesi ile hazırlanan biyosensörler ise ikinci nesil biyosensörler olarak adlandırılır. İdeal bir medyatörün; hem enzimin aktif bölgesi hem de elektrot yüzeyi ile hızlı bir elektron transfer hızına sahip olması, girişim etkisinden kaçınmak için düşük bir redoks potansiyeline sahip olması ve oksitlenmiş ve indirgenmiş formun kararlılığının yüksek olması beklenir (Ivanova vd. 2003; Hayat vd. 2014; Kausaite-Minkstimiene vd. 2014; Batool vd. 2019). Birçok biyolojik tür, elektrot yüzeyindeki yavaş elektron transferi nedeniyle tersinmez elektrokimyasal davranış gösterir. Bu davranış, elektrot yüzeyindeki şiddetli adsorpsiyon veya elektroaktif merkezin yalıtımı nedeniyle oluşabilir ve bu durum, biyolojik bileşenlerin elektrot yüzeyiyle etkileşimini engelleyerek elektrokimyasal sinyalin bozulmasına neden olabilir. Bu sorunu çözmek için medyatörler kullanılabilir. Medyatörler, elektron taşıma kapasiteleri sayesinde biyolojik moleküller ve elektrot arasında bir köprü görevi görürler. Böylece, medyatörler aracılığıyla elektronlar hızla elektrot yüzeyine taşınır ve biyolojik bileşenlerin elektrot yüzeyiyle etkileşimi artarak elektrokimyasal sinyaller daha doğru bir şekilde ölçülebilir hale gelir. Genel olarak, elektrokimyasal biyosensörler için enzim ve elektrot arasındaki hızlı elektron transferi yüksek hassasiyet ve anında yanıt elde etmek için gerekli bir ön koşuldur. Bu nedenle, enzim ve elektrot arasında doğrudan elektron transferi (DET) zordur. Elektron aracısı olarak kullanılan medyatör, önce enzimin aktif bölgesinden elektronları yakalayarak indirgenir ve indirgenmiş medyatör elektroda yayılır. Daha sonra uygun bir yükseltgenme potansiyeli uygulandığında elektrot yüzeyindeki orijinal durumlarına geri yükseltgenirler. Bu esnada biyokomponentler ile elektrot arasındaki elektron transfer çemberi tamamlanmış olur (Fang vd. 2020). Biyolojik molekülden elektrota elektronların transferinin teşvik edilmesinde medyatörün görevi Şekil 1.4'te gösterilmiştir. Ferrosen ile birlikte kinon, tiazin ve fenazin türevleri özellikle son zamanlarda amperometrik biyosensörlerin performanslarının artırılması amacıyla elektrot yapılarına dahil edilen medyatör sınıflarını oluşturmaktadır (Ivanova vd. 2003; Hayat vd. 2014; Kausaite-Minkstimiene vd. 2014; Batool vd. 2019). Doğrudan elektron transfer mekanizmalarına dayanan aracısız biyosensörler, üçüncü nesil biyosensörler olarak adlandırılır. Burada elektron, doğrudan elektrottan enzime ve substrat molekülüne aktarılır (veya tersi gerçekleşir). Bu mekanizmada elektron, enzimatik reaksiyonlar için ikinci bir substrat görevi görür ve bir katalitik akımın oluşmasına neden olur (Mello ve Kubota 2001).



Şekil 1.4. Bir medyatörün çalışma prensibi

1.5.3. Biyosensörlerde kullanılan medyatör çeşitleri

Fenazin türevli boyalar, 1990 yılının ortalarından itibaren elektrokimyasal sensör ve biyosensörlerde yaygın olarak kullanılan bir malzeme sınıfıdır. Aromatik azo bileşikler olarak bilinen fenazin boyaları genellikle ahşap, tekstil ve mikrobiyolojide hücre belirteçlerinin renklendirilmesinde kullanılmaktadır. Şekil 1.5'te genel yapısı verilen fenazin türevleri, genellikle azin halkasında S veya O ile süstitüe bir N ile benzen halkasında metil ve=veya amino gruplarını içerir (Pauliukaite vd. 2010).



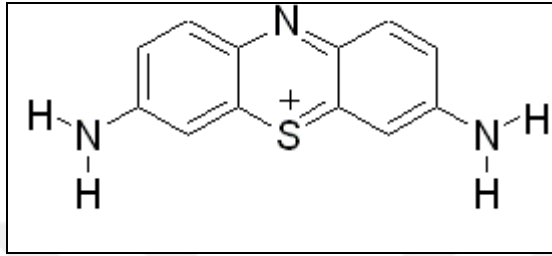
Şekil 1.5. Fenazin boyalarının genel yapısı (X=O, N, S; R₁, R₂=H, CH₃, C₂H₅)

Fenazinler yapıları gereği elektroaktif bileşikler oldukları için temel ve uygulamalı elektrokimyada yaygın olarak incelenmiş ve polimer oluşturma kabiliyetine sahip oldukları gözlemlenmiştir. Bu boyalar, karşılık gelen 10-hidroazin formunu oluşturmak için tersinir iki elektronlu, bir protonlu indirgemeye uğrar; böylece bazı organik bileşiklerin hidrojenasyon-dehidrojenasyonu elektrokatalize edilir. Ayrıca, azinlerin görünür absorpsiyon spektrumlarının, redoks dönüşümü ile fark edilir şekilde değişmesi ve anyonik polimerlere dahil edilen biyomedikal, çevresel ve biyoteknolojik analizler alanında sıklıkla redoks indikatörleri ve medyatörleri olarak kullanılmasını sağlar (Komura vd. 2004). Metilen Mavisi (MB), Meldola Mavisi (MdB), Nil Mavisi (NB), Metilen Yeşili (MG), Parlak Kresil Mavisi (BCB) ve Toluidin Mavisi (TB) gibi

azin tipi boyalar redoks medyatörleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Dilgin vd. 2007).

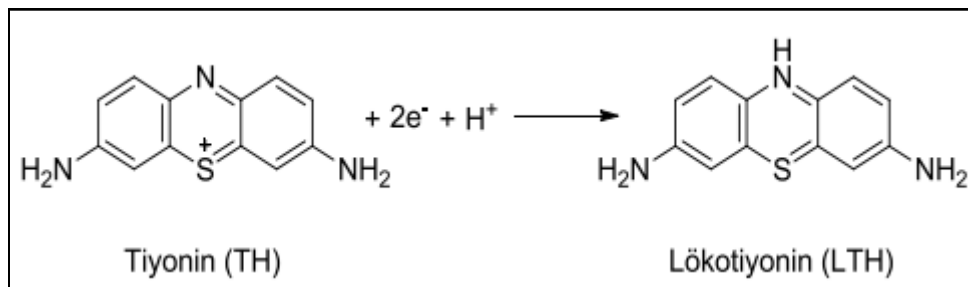
1.5.3.1. Tiyonin

Tiyonin (TH, $\text{CH}_3\text{COOC}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{S}$), aromatik halkalarının her iki tarafına simetrik olarak dağılmış α pozisyonunda iki amino grubu içeren fenotiyazin türevli metakromatik bir boya olup kimyasal yapısı Şekil 1.6’da verilmiştir (Li vd. 2004; Wang vd. 2012).



Şekil 1.6. Tiyonin kimyasal yapısı

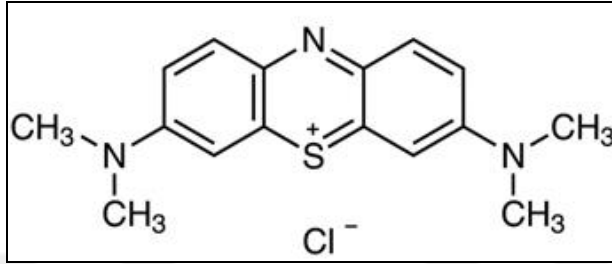
TH molekülünün polimerizasyonu ve onun medyatör olarak kullanımını içeren birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan literatür araştırmasında TH’nin elektropolimerizasyonunu sınırlayan en büyük faktörün uygulanan potansiyel aralığındaki üst limit olduğu görülmüştür. Polimerizasyon esnasında uygulanan potansiyel 0,8 V’dan daha düşük olduğunda elektrot üzerinde TH’nin elektropolimerizasyonun gerçekleşmeyeceği bildirilmiştir. Bunun nedeninin daha düşük potansiyellerde, iki elektron transferi ile TH’nin indirgenmesi sonucunda oluşan leuko-TH karşılık gelen bir dönüşümlü voltamogram gözlenmesidir. Elektrot üzerinde istenen şartlarda tiyonin polimer filmini elde etmek için uygulanan potansiyelinin, TH’deki $-\text{NH}_2$ gruplarının oksidasyon potansiyelinden büyük olması gerektiği bildirilmiştir. Tiyoninin leuko-TH’ye dönüşümünü gösteren tepkime Şekil 1.7’de gösterilmektedir. (Kurt 2020).



Şekil 1.7. TH-Leuko-TH dönüşümü tepkimesi

1.5.3.2. Metilen Mavisi

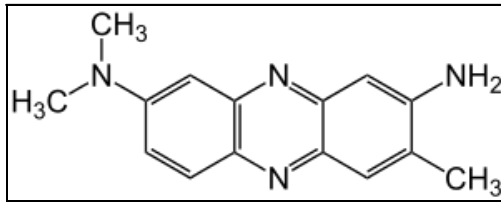
Metilen Mavisi, düşük toksisiteye sahip oldukça düşük molekül ağırlığına sahip organik bir boyadır. Birçok biyomolekülün redoks potansiyeline yakın olan Metilen Mavisi, pH 4–11 ortamlarında $-0,10$ ile $-0,40$ V (SCE'ye karşı) aralığında redoks potansiyele sahip bir redoks medyatördür ve bu nedenle bir elektron transfer aracı olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Ju vd. 1995; Erdem vd. 2000). Metilen Mavisinin kimyasal yapısı Şekil 1.8’de gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Metilen Mavisinin kimyasal yapısı

1.5.3.3. Nötral Kırmızı

Bir fenazin boyası olan Nötral Kırmızı (NR), fenazin boyası (NR; N8, N8, 3-trimetil-fenazin-2,8,-diamin klorür, Şekil 1.9), virüslerin incelemesinde biyolojik boyayıcı olarak (Guttenberg 2000; Pauliukaite ve Brett 2008), biyokimyasal sistemlerde bir pH indikatörü olarak (Ricci vd. 2002) optik ve elektrokimyasal yöntemlerle DNA tayininde (Mammone vd. 2000; Ni vd. 2006), doğal olarak türetilmiş ve sentetik biyomateryallerin değerlendirilmesinde (Pariante vd. 2002; Vince vd. 2004) kullanılır.



Şekil 1.9. Nötral kırmızının kimyasal yapısı

NR’nin medyatör olarak kullanımının mekanizması oldukça karmaşıktır (Pauliukaite vd. 2007). Bir redoks medyatörü olarak PNR’ı ve immobilize edilmiş GOx’u içeren glikoz biyosensörleri için muhtemel iki mekanizma öngörülmüştür:

1. İlk mekanizma, oksidize formu elektrotun kendisinde yeniden üretilen enzimatik oksidasyon sırasında oluşan FADH_2 ’nin PNR tarafından yeniden oksidasyonu içerir.

2. Diğer mekanizmada ise PNR'nin anodik bir proses olan H_2O_2 'nin indirgenmesini elektrokatalizlediğini bildirmişlerdir (Barsan ve Brett 2008).

Bu iki mekanizmalardan hangisinin gerçekleşeceği, enzimin doğasına ve çalışma potansiyeline bağlıdır. PNR filmi üretmek için elektropolimerizasyon yönteminin ayrıntıları, biyosensör performansı üzerinde neredeyse hiçbir etkiye sahip değilken, enzim immobilizasyonunun türü oldukça önemlidir. Nötral kırmızının medyatör olarak kullanıldığı biyosensörlerin çoğunun çalışma potansiyeli -0,35 ile -0,25 V aralığındadır. Bu potansiyellerde, PNR, özellikle asidik ve nötr ortamda enzim biyosensörleri için mükemmel bir redoks medyatörü gibi davranır (Pauliukaite ve Brett 2008).

1.5.4. Biyosensörlerin performans kriterleri

Bir biyosensörün performansının belirlenebilmesi için öncelikle çeşitli parametrelerin (çalışma potansiyeli, ortam pH'ı vb.) optimize edilmesi gerekmektedir (Banks vd. 2005; Chandra 2016; Prakash ve Chandra 2020). Analitin zamanla değişen konsantrasyonlarına bağlı olarak sinyalde meydana gelen değişikliğin grafiğe geçirilmesi ile bir kalibrasyon/regresyon grafiği elde edilir ve bu daha sonra daha ileri algılama uygulamaları için bir standart olarak kullanılır (Armbruster ve Pry 2008; Fracchiolla vd. 2013). Regresyon/kalibrasyon grafiğine bağlı olarak, biyosensörlerin bu analitik performansları şu şekilde değerlendirilir (Prohit vd. 2020):

a) Duyarlılık: Bir biyosensörün duyarlılığı/hassasiyeti, kalibrasyon grafiğinin eğimi olarak tanımlanır ve analit konsantrasyonundaki dalgalanmalar sonucunda sinyalde meydana gelen değişimi ifade eder. Analit konsantrasyonundaki çok küçük bir değişikliği bile ayırt edebilme kapasitesinin bir ölçütüdür (Purohit vd. 2020).

b) Tespit sınırı (LOD): Biyogalgılama mekanizmasında ayırt edilebilir bir sinyal oluşturan minimum analit miktarı, tespit sınırı (LOD, limit of detection) olarak bilinir. LOD genellikle, $3 \times \text{standart sapma} / \text{eğim}$ formülü kullanılarak hesaplanır (Purohit vd. 2020).

c) Lineer aralık (LDR): Sinyalin analit konsantrasyonunda meydana gelen dalgalanmayla doğru orantılı olduğu regresyon çizimindeki konsantrasyon aralığı lineer aralık olarak tanımlanır. Biyosensörler, analitin klinik olarak anlamlı konsantrasyonunu kapsayacak şekilde daha geniş bir LDR'ye sahip olmak üzere tasarlanmalıdır (Valliee-Belisle vd. 2012; Purohit vd. 2020).

Kalibrasyon grafiğine dayalı algılama parametrelerinin dışında, biyosensör performanslarını değerlendirmek için kullanılan diğer analitik parametreler aşağıda listelenmiştir:

i) Seçicilik: Bir biyosensörün temel özelliklerinden biri seçicilik; yani hedef analiti diğer moleküllerden ayırarak sadece hedef analite karşı bir sinyal üretebilme kabiliyetidir. Enzimler, aptamerler, antikorlar veya biotin-avidin benzeri biyokomponentler kullanılarak spesifiklik veya seçicilik elde edilebilir. Seçicilik, yakından ilişkili bir molekül grubunu tespit edebilme yeteneğidir (Peveler vd. 2016; Purohit vd. 2020).

ii) Cevap zamanı: Bir biyosensörün bir analit konsantrasyonuna karşı bir sinyal üretmesi için gereken süre veya sensörün yüzeyinde saptanabilir sayıda analit molekülü yakalaması için geçen süre olarak tanımlanır. Mikroakışkanlar, solüsyonda dağıtılan boncuklar tarafından analit yakalama, nano/mikromotorlar, bir biyosensörün tepki süresini azaltmak için kullanılan stratejilerden bazılarıdır (Soleymani ve Li 2017).

iii) Geri kazanım süresi: Bir biyosensörün birincisini tamamladıktan sonra ikinci algılama döngüsüne hazır olması için gereken süreye geri kazanım süresi denir (Purohit vd. 2020).

İdeal bir biyosensör, geniş bir LDR'ye, düşük LOD'ye, yüksek duyarlılığa, yüksek seçiciliğe, kısa yanıt süresine, kısa geri kazanım süresine ve uzun raf ömrüne sahiptir.

iv) Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik

Kesinliğin bileşenleri olan tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik, ölçüm sonuçlarının doğruluğunu destekleyen önemli iki parametredir. Bunlardan tekrarlanabilirlik, aynı analist, reaktifler, ekipman ve aletler gibi aynı koşullar altında sonuçların birbiri ile uyumunu ifade eder. Biyosensör teknolojisinde ise tekrarlanabilirlik, bir biyosensörün aynı koşullar altında çok sayıda ölçüm yapıldığında aynı sonuçları verebilme yeteneği olarak tanımlanır. Tekrar üretilebilirlik ise, çalışma koşulları farklı olduğunda sonuçların birbiriyle uyum derecesidir. Biyosensör teknolojisinde tekrar üretilebilirlik, aynı koşullar altında üretilen biyosensörlerin, aynı koşullar altında çalışması sonucunda aynı sonuçları verebilmesi olarak tanımlanır. Tekrarlanabilirlik testi için doğrusal aralığın tek noktalı konsantrasyonu seçilir ve bu nokta tekrarlanır. Tekrar üretilebilirlik testi için ise tüm noktalar (konsantrasyonlar) tekrarlanır. Ardışık ölçümlerden sonra, biyosensörlerin bağıl standart sapması (RSD) hesaplanır ve elde edilen düşük RSD değerleri biyosensörün başarısını ifade eder (Bahadır ve Sezgintürk 2016; Aydın vd. 2019).

2. KAYNAK TARAMASI

Tez çalışması kapsamında tek kullanımlık ve düşük maliyete sahip yüzey baskılı elektrotlar ile birlikte geleneksel Pt elektrot ve nanoliflerden yola çıkarak glikoz, üre ve fenolik bileşikler gibi insan sağlığına olumsuz etkileri olduğu bilinen çeşitli maddelerin, yüksek hassasiyetle tayinine olanak sağlayacak amperometrik biyosensörlerin hazırlanması amaçlanmaktadır. Bu sebeple destekleyici polimer olarak poliakrilonitril (PAN) ve Naylon-6 polimeri ile çeşitli medyatörleri içeren (Metilen Mavisi, Nötral Kırmızı, Tiyonin ve Ferrosen gibi) nanoliflerin, elektro-eğirme yöntemiyle hazırlanması; elde edilen nanolifler ile Üreaz, Glikoz oksidaz ve Polifenol oksidaz temelli, literatürde bulunmayan amperometrik biyosensörlerinin hazırlanması planlanmıştır. Bu nedenle bu bölümde glikoz, üre ve fenol bileşikleri analizine yönelik medyatör içeren/içermeyen çeşitli biyosensörleri içeren çalışmalar özetlenmiştir.

i) Glikoz biyosensörleri

2012 yılında Bae ve arkadaşları, yüzey baskılı elektrotlar üzerine (YBE) farklı oranlarda hazırladıkları PAN/silika çözeltisinden elektro-eğirme yöntemiyle nanolif elde etmişlerdir. Elektro-eğirme için uygulanan optimum potansiyeli 16 kV, şırınga toplayıcı arasındaki mesafeyi 10 cm ve akış hızını da 1 mL/saat olarak belirlemişlerdir. Daha sonra hazırladıkları nanolif yüzeyine glikoz oksidaz enzimi immobilize ederek bir glikoz biyosensörü tasarlamışlardır. Bu biyosensörün doğrusal aralığını 1-20 mM ve duyarlılığını da 33,47 $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ olarak tespit etmişlerdir (Bae vd. 2012).

PAN/silika/karbon nano tüp çözeltilerinden elektro-eğirme yöntemiyle YBE üzerinde nanolif elde edilmesiyle biyosensör tasarlanmasını içeren bir başka çalışma ise 2012 yılında Im ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Elektro-eğirme için uygulanan potansiyeli 20 kV, toplayıcı ile şırınga arasındaki mesafeyi 10 cm ve akış hızını da 1,2 mL/saat olarak belirlemişlerdir. Glikoz tayini için geliştirilen biyosensörün duyarlılığını 39,30 $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ ve doğrusal aralığını da 1-20 mM olarak tespit etmişlerdir (Im vd. 2012).

YBE'lerin kullanıldığı bir çalışmada Ekabutr ve arkadaşları, PAN/çok duvarlı karbon nano tüp çözeltisinden hazırladıkları nanoliflerin yüzeyini polipirol ile kaplayıp glikoz oksidaz enzimi ile immobilize etmişlerdir. Geliştirilen biyosensörün doğrusal aralığını 0,25-6 mM, tespit sınırı (LOD) 15,51 μM ve duyarlılığını ise 5,41 $\mu\text{A}/\text{mM}$ olarak tespit etmişlerdir (Ekabutr vd. 2013).

Ekabutr ve arkadaşları 2014 yılında yüzey baskılı elektrotlar üzerinde elektro-eğirme yöntemiyle PAN/grafen nanoliflerini elde etmişlerdir. Elektro-eğirme için uygulanan voltajı 15 kV ve şırınga toplayıcı arasındaki uzaklığı da 15 cm olarak bildirmişlerdir. Elde ettikleri bu biyosensörü, kare dalga voltametrisi ile dopamin tayininde kullanmışlardır. Biyosensörün doğrusal aralığını 0,5-100 μM , duyarlılığını 0,43 $\mu\text{A}/\mu\text{M}\cdot\text{cm}^2$ ve LOD değerini de 70 nM olarak belirlemişlerdir (Ekabutr vd. 2014).

Çetin ve Çamurlu, platin disk üzerinde elektro-eğirme yöntemiyle hazırladıkları PAN nanoliflerini glikoz oksidaz enzimi ile immobilize ederek bir biyosensör tasarlamışlardır. Hazırladıkları biyosensörün 0,65 V'da doğrusal aralığını 0,01 mM-0,4

mM, duyarlılığını $117 \mu\text{M}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ ve LOD değerini ise $91,5 \mu\text{M}$ olarak belirlemişlerdir (Cetin ve Camurlu 2017).

Wu ve arkadaşları tarafından 2007 yılında bildirilen çalışma, Pt elektrot kullanarak glikoz tayini için geliştirilen karbon nanofiber temelli glikoz oksidaz (CNF) biyosensörünü içermektedir. Amperometrik glikoz biyosensöründe kullanılan bu CNF membranın biyosensörün stabilitesini geliştirdiği ve $10\text{-}350 \mu\text{M}$ arasında geniş bir lineer aralık sergilediği gösterilmiştir. Amperometrik biyosensörün duyarlılık değeri $36,3 \text{ nA}/\mu\text{M}\cdot\text{cm}^2$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca çalışmada LOD değerinin $2,5 \text{ M}$ olduğu bulunmuştur (Wu vd. 2007).

Pt elektrot üzerinde farklı karbon dolgu maddeleri (fulleren, karbon nanotüpler, grafen) ile elektro-eğirilmiş kompozit poliakrilonitril nanoliflerin (PAN NF'ler) glikoz tayininde kullanımını içeren bir çalışma 2022 yılında Apetrei ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Hazırlanan bu kompozit NF'lerin morfolojik karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirilmiş olup biyoalgılama matrislerinin performansı ile ilişkilendirilmiştir. Glikoz oksidaz temelli bu algılama platformunda kullanılan karboksil fonksiyonlu çok duvarlı karbon nanotüp NF'leri için belirlenen duyarlılık, LOD ve lineer aralık gibi parametreler sırasıyla $61,5 \text{ mA}/\text{M}\cdot\text{cm}^2$, $2,0 \mu\text{M}$ olarak ve indirgenmiş grafen oksit NF'leri için ise bu değerler sırasıyla $49,3 \text{ mA}/\text{M}\cdot\text{cm}^2$, $1,6 \mu\text{M}$ ve $20 \times 10^{-3} \text{ M}$ olarak bildirilmiştir (Apetrei vd. 2022).

İnsan serumunda glikoz tayinine yönelik Naylon ağının glikoz oksidaz ve glutaraldehit çapraz bağlayıcısı ile immobilizasyonunu içeren bir çalışma 2007 yılında Nan ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Amperometrik analiz sonucu geliştirdikleri biyosensörün $18 \mu\text{M}\text{-}1,10 \text{ mM}$ aralığında doğrusal olduğunu, 80 saniyelik bir cevap süresi ile biyosensörün LOD değerini ise $9,0 \mu\text{M}$ olarak hesaplamışlardır (Nan vd. 2007).

Zhang ve arkadaşları Au elektrot ile MWCNT-MB nanokompozit bir glikoz biyosensörü tasarlamışlardır. Tasarladıkları bu biyosensörün lineer aralık değeri, duyarlılığı ve LOD değerinin sırasıyla $4 \mu\text{M}\text{-}3,78 \text{ mM}$, $22,5 \mu\text{A}/\text{mM}$ ve $1 \mu\text{M}$ olarak hesaplamışlardır (Zhang vd. 2009).

Choi ve arkadaşları 2011 yılında grafit çubuk elektrot kullanarak poli(Nötral Kırmızı) ve altın nanoparçacıkları içeren bir amperometrik glikoz biyosensörü tasarlamışlardır. $-0,5 \text{ V}$ çalışma potansiyelinde gerçekleştirdikleri amperometrik analiz sonucu bu biyosensörün duyarlılık değerini $1,58 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ olarak hesaplamışlardır. Geliştirilen bu biyosensörün $1\text{-}11 \text{ mM}$ arasında doğrusal olduğunu ve LOD değerini de $0,67 \text{ mM}$ olarak tespit etmişlerdir (Choi vd. 2011).

Jeykumari ve Narayanan 2007 yılında Glikoz oksidazın (GOx) biyokatalitik aktivitesi ile CNT'lerin elektrokatalitik özelliklerinden faydalanarak glikoz tayini için Nötral Kırmızı (NR) kombinasyonuna dayanan yeni bir biyosensör tasarlamışlardır. Bu biyosensör, bağlayıcı olarak NR ve Nafion ve biyokatalizör olarak glikoz oksidaz ile işlevselleştirilmiş çok duvarlı bir karbon nanotüplerden (MWNT'ler) oluşan grafit elektrotu içermektedir. Glikoz oksidazın glikoz üzerindeki enzimatik reaksiyonundan serbest kalan hidrojen peroksitin, NR ve işlevselleştirilmiş CNT'ler ile katalitik indirgenmesi sonucu glikozun seçici olarak tayini gerçekleştirilmiş olmaktadır.

Geliştirilen bu nanokompozit film biyosensörün 1×10^{-8} ile 1×10^{-3} M arasında geniş bir lineer aralık sergilediği ve LOD değerinin de 3×10^{-9} M olarak bulunduğu bildirilmiştir (Jeykumari ve Narayanan 2007).

MB'yi medyatör olarak kullanan bir çalışma 2001 yılında Xu ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışma camı karbon elektrot üzerinde MWCNT'nin modifiye edilmesinden sonra sırasıyla MB'nin ve yaban turpu peroksidaz enzimi (HRP)'nin eklenmesini içermektedir. Geliştirilen bu biyosensörün lineer aralığının $4 \mu\text{M}$ ile 2 mM arasında olduğu ve LOD değerinin de $1 \mu\text{M}$ olarak hesaplandığı bildirilmiştir (Xu vd. 2001).

Layer-by-layer (katman katman biriktirme) yöntemiyle üretilen hidrojen peroksit tayinine yönelik bir çalışma Wang ve arkadaşları tarafından 2012 yılında bildirilmiştir. Çalışma, pozitif yüklü bir yüzey oluşturmak için Tiyoninin camı karbon elektrot üzerinde polimerleştirilmesini ve daha sonra da negatif yüklü altın nanopartiküller ve pozitif yüklü HRP enziminin elektrostatik adsorpsiyon yoluyla elektrot üzerinde immobilizasyonunu içermektedir. Modifiye elektrotun elektrokimyasal davranışı ve hidrojen peroksit tepkisi döngüsel voltametri ile incelenmiştir. Geliştirdikleri biyosensörün $0,20$ ile $1,6 \text{ mM}$ ve $1,6$ ile $4,0 \text{ mM}$ aralıklarında doğrusal olduğunu bildirmişlerdir. Son olarak da biyosensörün LOD değerini $0,067 \text{ mM}$ olarak hesaplamışlardır (Wang vd. 2012).

ii) Fenol biyosensörleri

Bourourou ve arkadaşları 2015 yılında, PAN/çok duvarlı karbon nano tüp çözeltisinden elde ettikleri nanolif yüzeyini, Polifenol oksidaz enzimi ile immobilize ederek bir biyosensör hazırlamışlardır. Hazırladıkları biyosensörler ile katekol tayini yapmışlar ve bu biyosensörün duyarlılığını 118 mA/mol.L , maksimum akım değerini $10,66 \mu\text{A}$ ve tespit sınırını da $0,9 \mu\text{mol/L}$ olarak belirlemişlerdir (Bourourou vd. 2015).

Fartas ve arkadaşları tarafından 2017 yılında bildirilen çalışmada, fenolik bileşiklerin tespiti için yüzey baskılı karbon elektrotlar kullanılarak grafen, altın nanopartikül ve kitosan ile modifiye edilmiş elektrokimyasal polifenol oksidaz biyosensörü geliştirilmiştir. Fenol tespiti için önerilen biyosensörün elektrokatalitik aktivitesi, diferansiyel puls voltametrisi ve döngüsel voltametri kullanılarak incelenmiştir. Geliştirilen bu biyosensör fenol için $0,05$ ile $15 \mu\text{M}$ konsantrasyon aralığında doğrusallık sergilemiştir. Ayrıca bu biyosensörün duyarlılık ve LOD değerleri de sırasıyla $0,624 \mu\text{A}/\mu\text{M}$ ve $0,016 \mu\text{M}$ ($S/N = 3$) olarak hesaplanmıştır (Fartas vd. 2017).

Mayorga-Martinez ve arkadaşları tarafından 2013 yılında bildirilen çalışma, YBE'ler kullanarak katekol ve fenol tespiti için geliştirilen bizmut nanoparçacıklar ve Tirosinaz (Polifenol oksidaz) enziminin kombinasyonuna dayanan amperometrik biyosensörünü içermektedir. Amperometrik ölçümler BiNPs/Tyr biyosensörü ile -200 mV 'da gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör fenol ve katekol için sırasıyla $71 \mu\text{M}$ ve $100 \mu\text{M}$ 'ye kadar doğrusallık sergilemiş olup hesaplanan duyarlılık değerleri ise fenol ve katekol için sırasıyla $14,025$ ve $44,056 \text{ nA}/\mu\text{M}$ 'dır. Yine fenol ve katekol için bildirilen LOD değeri ise sırasıyla 62 ve 26 nM 'dir (Mayorga-Martinez vd. 2013).

Ahmad ve arkadaşları tarafından 2016 yılında bildirilen çalışmada fenolik bileşiklerin tayini için zirkonyum oksit/polietilen glikol/tirosinaz kompozit filmine dayalı bir fenolik biyosensör tasarlanmıştır. Kompozit filmin oluşumu, YBCE üzerine damlatılan hekzasetiltrimetilamonyum bromür (CTAB), polietilen glikol (PEG) ve zirkonyumoksit nanoparçacıkları arasındaki elektrostatik etkileşim yoluyla gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanokompozit filmin ve modifiye edilmiş SPCE yüzeyinin karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM), elektrokimyasal empedans spektroskopisi ve döngüsel voltametri ile incelenmiştir. Geliştirilen bu biyosensör 10 sn'den daha kısa sürede hızlı yanıt vermiş olup 0,075-10 μM ve 10-55 μM konsantrasyon aralığında fenol için doğrusallık sergilemiştir. Bu biyosensörün LOD değeri ise 0,034 μM olarak hesaplanmıştır. Biyosensör, en az 30 gün boyunca yüksek hassasiyet ve iyi depolama kararlılığı göstermiştir (Ahmad vd. 2016).

Kısmen saflaştırılmış bir Polifenol oksidaz (PPO) enzimine dayalı bir çalışma Akyılmaz ve arkadaşları tarafında 2010 yılında gerçekleştirilmiştir. Yüzey baskılı platin elektrot üzerinde [(2,2'-bipiridin)(kloro)(p-simen)rutenyum(II)]klorür] medyatör ile 1,2-diamino benzen (DAB) kompleksinin elektropolimerizasyonu sonucu amperometrik fenol biyosensörü geliştirmişlerdir. Geliştirilen biyosensörün fenoller için ölçüm prensibi, +0,65 V'de PPO tarafından katalize edilen enzimatik reaksiyonla ilgili Ru-aracı kompleksinin oksidasyon akımının tayinine dayanmaktadır. Biyosensör, 5 ila 100 μM katekol konsantrasyonu arasında doğrusallık sergilemiş olup LOD değerini de 2,385 μM olarak belirlenmiştir. 50 μM katekol standardı için ortalama değer (x), standart sapma (sd) ve varyasyon katsayısı (%cv) sırasıyla 48,75 μM , $\pm 1,56 \mu\text{M}$ ve %3,2 olarak bulunmuştur (Akyılmaz vd. 2010).

Katekol tayini amacıyla Sandeep ve arkadaşları tarafından 2019 yılında bildirilen çalışma polipirrol ve gümüş nanopartikül ile modifiye edilmiş Polifenol oksidaz temelli amperometrik biyosensörünü içermektedir. Geliştirilen Gr/PPy/AgNPs/PPO sensörünün morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Sensör performansı, döngüsel voltametri, diferansiyel puls voltametrisi, kronoamperometri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Geliştirilen katekol biyosensörü 0,001 ile 0,015 mM konsantrasyon aralığında doğrusallık sergilemiştir. Bu biyosensörün LOD değeri 0,47 μM ve duyarlılık değeri de 13,66 $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ olarak hesaplanmıştır. Gerçek numunelerde katekol tespiti için PPO biyosensörünün pratik uygulanabilirliği, bir yeşil çay örneğindeki katekol içeriği incelenerek değerlendirilmiş olup yeşil çay numunesindeki katekol içeriğini yaklaşık %98'lik bir doğrulukla tespit edebildiği gösterilmiştir (Sandeep vd. 2019).

Li ve arkadaşları tarafından 2014 yılında bildirilen çalışma, camı karbon elektrotlar üzerinde elektro-eğirme yöntemi ile elde edilen karbon nanolif (CNF) temelli polifenol biyosensörünü içermektedir. Elde edilen CNF'lerin yapılarının ve morfolojilerinin araştırması için sırasıyla Raman spektroskopisi, FTIR ve alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) kullanılmıştır. Geliştirilen bu CNF temelli katekol biyosensörü 1-1310 μM arasında lineerlik sergilemiş olup duyarlılık ve LOD değerleri sırasıyla 41 $\mu\text{A}/\text{mM}$ ve 0,63 μM olarak bildirilmiştir (Li vd. 2014).

Aynı enzim kullanılarak yapılan bir başka çalışma ise Scampicchio ve arkadaşları tarafından 2008 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, camı karbon

elektrot üzerinde Naylon 6 nanofiberleri sentezlenerek bir biyosensör geliştirilmiş ve elde edilen biyosensör, çeşitli fenolik bileşiklerin tayininde kullanılmıştır. Hazırlanan biyosensörler ile +0,7 V'da pH optimizasyonu çalışması yapılmış ve optimum pH değerini 6,5 olarak belirlemişlerdir (Scampicchio vd. 2008).

Rajesh ve arkadaşları tarafından 2004 yılında bildirilen polifenol oksidaz (tirosinaz) temelli amperometrik biyosensör matris olarak camı karbon elektrot üzerinde elektrokimyasal olarak hazırlanmış bir p-toluen sülfonat katkılı polipirol filmi içermektedir. Fenolik bileşikler (fenol, katekol ve p-klorofenol), Ag/AgCl'ye karşı 0,05 V'ta enzimatik olarak serbest bırakılan kinon türlerinin doğrudan elektrokimyasal indirgenmesiyle sulu ortamda kantitatif olarak tayin edilmiştir. Enzim elektrotu üzerinde gerçekleştirilen amperometrik tayinin sonuçları fenol, katekol ve p-klorofenol için sırasıyla 3,3-220,3, 5,6-74,3 ve 3,8-85,6 μM aralığında doğrusallık sergilemiş olup hesaplanan duyarlılık değerleri ise 17,1, 70,2 ve 24,3 $\mu\text{A}/\text{mM}$ olarak belirtilmiştir. Algılama sınırı ve tepki süresi ise bu fenolik bileşikler için sırasıyla 0,8 ila 2,4 μM ve 40 ila 75 s aralığındadır. Ayrıca geliştirilen bu enzim elektrotunun yaklaşık 4 °C'de 3 ay stabil olduğu bildirilmiştir (Rajesh vd. 2004).

Vicentini ve arkadaşları tarafından 2014 yılında bildirilen çalışmada, diheksadesilfosfat filmi içinde altın nanopartiküller (AuNP'ler) ve Tirozinaz (Polifenol oksidaz) ile modifiye edilmiş camı karbon elektrot kullanımını içeren bir biyosensör tasarlanmıştır. Tirozinaz immobilizasyonu için sistamin ve glutaraldehit çapraz bağlayıcı maddeleri kullanılmıştır. Önerilen bu biyosensör, $2,5 \times 10^{-6}$ ile $9,5 \times 10^{-5}$ mol/L arasında doğrusallık sergilemiştir. Hesaplanan LOD değeri ise $1,7 \times 10^{-7}$ mol/L olarak bildirilmiştir. Geliştirilen biyosensör, iyi tekrarlanabilirlik ve kararlılık göstermiştir. Ayrıca bu yeni amperometrik yöntem, doğal su örneklerinde katekol tayininde başarıyla uygulanmıştır. Sonuçlar, resmi spektrofotometrik yöntem kullanılarak elde edilenler için %95'lik bir güven seviyesiyle uyumlu olarak belirtilmiştir (Vicentini vd. 2014).

Zheng ve arkadaşları tarafından 2019 yılında bildirilen çalışma fenolik bileşik için polianilin (PAni)-gözenekli poliakrilonitril (PAN) ve nanoyapılı grafen (GRA) nanokompozit filmi ve Pt disk elektrot kullanılarak tasarlanan polifenol oksidaz biyosensörünü içermektedir. PAN'ın gözenekli yapısı, enzimin etkili immobilizasyonu ve artan sinerjistik etki için hibrit düzenekler elde etmek üzere PAni ve GRA'ya kolayca bağlanmak için uygun bir mikro ortam sağlamıştır. Hazırlanan biyosensörün morfolojileri ve elektrokimyasal davranışları, sırasıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM), elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve döngüsel voltametri (CV) kullanılarak incelenmiştir. Önerilen biyosensörün LOD değeri $2,65 \times 10^{-7}$ M ve duyarlılık değeri de $6,46 \mu\text{A}/\mu\text{M.cm}^2$ olarak bildirilmiştir (Zheng vd. 2019).

iii) Üre biyosensörleri

Vostiar ve arkadaşları tarafından 2002 yılında bildirilen çalışma, camı karbon elektrot üzerinde elektropolimerizasyon ile hazırlanmış poli(Toluidin Mavisi) filmi içeren üreaz temelli amperometrik biyosensörü içermektedir. Poli(Politoluidin Mavisi) filmi, adsorbe edilmiş monomerik boyaya kıyasla önemli ölçüde artan bir kararlılığa ve daha yüksek elektrokimyasal aktiviteye sahiptir. 200 mV çalışma potansiyelinde üre tayini için geliştirilen biyosensörünün duyarlılık değeri $980 \text{ nA}/\text{mM.cm}^2$ olarak bildirilmiş olup 200-800 μM aralığında doğrusallık sergilemiştir. Geliştirilen bu

biyosensörün LOD değeri ise, 0,02 mM (S/N = 3) olarak hesaplanmıştır (Vostiar vd. 2002).

Bozgeyik ve arkadaşları tarafından 2011 yılında üre tayini amacıyla Au elektrot ile poli(N-glisidilpirol-ko-pirol) iletken film temelli amperometrik üreaz biyosensörü geliştirilmiştir. Biyosensör yüzeyi, FTIR spektroskopisi ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile karakterize edilmiştir. Amperometrik analiz sonucu önerilen bu biyosensörün 0,1-0,7 mM arasında doğrusallık sergilediği bildirilmiştir. Ayrıca bu biyosensörün duyarlılık değeri 4 s'lik tepki süresi ile 4,5 μ A/mM olarak hesaplanmıştır (Bozgeyik vd. 2011).

Korkut ve arkadaşları tarafından 2019 yılında Au elektrot ile üre tayini için geliştirilen amperometrik üreaz biyosensörü matris olarak altın nanopartikül ve poli(propilen-ko-imidazol) filmini içermektedir. Geliştirilen bu biyosensör, 0,1 ile 30 mM konsantrasyon aralığında doğrusallık sergilemiştir. Bu biyosensörün LOD değeri, 36 μ M olarak hesaplanmış olup bağıl standart sapma değeri ise %2,43 (n = 18) olarak bildirilmiştir. Tasarlanan bu biyosensörün depolama kararlılığı ise 20 gün olarak belirlenmiştir (Korkut vd. 2019).

Dervisevic ve arkadaşları tarafından 2017 yılında gerçekleştirilen çalışmada, üreaz enziminin Au elektrot üzerinde poliamidoamin-çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT-PAMAM) dendrimerleri üzerinde immobilizasyonuna dayanan amperometrik üre biyosensörü tasarlanmıştır. MWCNT-PAMAM ve üreaz enzimine dayalı bu elektrot için 3 sn'lik yanıt süresi sonrası hesaplanan LOD, duyarlılık ve lineer aralık değerleri sırasıyla, 0,4 mM, 6,6 nA/mM ve 1-20 mM'dır. Geliştirilen bu biyosensör, insan serumunda üre analizinin gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılmıştır (Dervisevic vd. 2017).

Korkut Uru ve arkadaşları tarafından ürenin amperometrik tayini için 2021 yılında bildirilen çalışma, yeni bir platin nanopartikül (PtNP'ler) ile modifiye edilmiş poli(pirol-ko-1-(2 aminofenil)pirol)/üreaz film kaplı Au elektrot tasarımını içermektedir. PtNP'lerin miktarı, film yoğunluğu ve pH'ı optimize edilmiş, belediye atık sularında ve kanda kolayca bulunan bazı maddelerin girişim etkisi araştırılmıştır. Tasarlanan biyosensör 0,1 ile 30 mM konsantrasyon aralığında doğrusallık sergilemiştir. Bu biyosensörün duyarlılık değeri 31,8 μ A/mM.cm² LOD değeri de 7,58 μ M olarak bildirilmiştir. Geliştirilen bu biyosensör, belediye atık sularında üre konsantrasyonunu %97,6 (n=3) geri kazanımla algılamış ve 28. günde sonunda aktivitesinin %78'ini korumuştur (Korkut Uru vd. 2021).

Hosseinian ve arkadaşları tarafından 2019 yılında üre tayini amacıyla Pt elektrot üzerinde hem polipirol(PPy) hem de makro-gözenekli polipirol (MPPy) amperometrik üreaz biyosensörü tasarlanmıştır. Modifiye elektrotların elektrokimyasal davranışları CV ve kronoamperometrik çalışmaları ile incelenmiştir. Polipirol (PPy) içeren bu enzim elektrot için biyosensör yanıtı, 1,67-8,32 mM ($R^2=0,99$) konsantrasyon aralığında doğrusallık sergilemiştir. Bu biyosensörün duyarlılık, LOD değerleri ve tepki süresi sırasıyla 0,0035 mA/mM, 2,57 mM ve 7 s'dir. MPPy'li elektrot ise 0,5-10,82 mM ($R^2=0,99$) aralığında doğrusallık sergilemiş olup bu biyosensör için hesaplanan duyarlılık, LOD (S/N=3) ve tepki süresi sırasıyla 0,0432 mA/mM, 0,208 mM ve 5 s

olarak bildirilmiştir. Sonuç olarak ise, MPPy ile modifiye edilmiş biyosensör, üre için yüksek stabilite ve üstün seçicilik göstermiştir (Hosseinian vd. 2019).

Dervisevic ve arkadaşları tarafından 2017 yılında gerçekleştirilen çalışmada, 4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-il)anilin monomerinin (SNS-Anilin) grafit elektrot, üzerinde polimerizasyonunu ardından da medyatör olarak di-amino-ferrocene (DAFc) ile modifiye edilmesi sonucu geliştirilen üreaz temelli amperometrik üre biyosensörün hazırlanmıştır. Gerçekleştirilen bu çalışmada girişim çalışmaları ile depolama ve çalışma kararlılığı deneylerinin yanı sıra pH, sıcaklık, polimer kalınlığı ve uygulanan potansiyelin elektrot akım tepkisi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ortaya çıkan üre biyosensörünün amperometrik yanıtı, 0,54 $\mu\text{A}/\text{mM}$ duyarlılık değeri, 12 μM LOD değeri ve 2 saniyelik kısa yanıt süresi ile 0,1-8,5 mM aralığında doğrusaldır. Tasarlanan biyo-elektrot, gerçek insan kanı ve idrar numuneleri ile test edilmiştir (Dervisevic vd. 2017).

Das ve Yoon tarafından 2015 yılında indiyum kalay oksit elektrot ile üre analizi için sülfonatlı grafen/polianilin nanokompozit bazlı bir elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Anilinin sülfonatlı grafen oksit varlığında oksidatif polimerizasyonu, sulu bir ortamda elektrokimyasal yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanokompozitin yapısal özellikleri, FTIR, Raman spektroskopisi, X-ışını fotoelektron spektroskopisi ve SEM yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Üreaz enzimi immobilize edilmiş sülfonatlanmış grafen/polianilin nanokompozit filmi için hesaplanan LOD ve duyarlılık değerleri sırasıyla 0,050 mM ve 0,85 $\mu\text{A}/\text{cm}^2.\text{mM}$ 'dir. Ayrıca geliştirilen bu biyosensör 0,12-12,3 mM konsantrasyon aralığında doğrusallık sergilemiştir. 15 gün sonunda yapılan ölçümler sonucunda ise aktivitesinin %81'inin koruduğu gözlenmiştir (Das ve Voon vd. 2015).

Soares ve arkadaşları tarafından 2012 yılında bildirilen çalışma iletken polipirol filmi temelli üreaz biyosensörünü içermektedir. Elde edilen filmler döngüsel voltammetri, SEM, FTIR ve ultraviyole görünür spektroskopi (UV-VIS) ile karakterize edilmiştir. Polipirol matrisinde immobilize edilmiş üreaz enziminin enzimatik aktivitesi, standart numunelerde ve ticari gübrelerde farklı konsantrasyonlarda amperometrik olarak tayin edilmiş ve ürenin karbon dioksit ve amonyağa katalitik dönüşümü doğrulanmıştır. Tasarlanan bu iletken üreaz biyosensörünün duyarlılık ve LOD değerleri sırasıyla 2,41 $\mu\text{A}/\text{mM}.\text{cm}^2$ ve 3,0 mM olarak hesaplanmıştır (Soares vd. 2012).

Literatürde tek kullanımlık YBE'ler ile nanolifleri içeren sınırlı sayıda biyosensör çalışması bulunmakta olup, bunlardan sadece birkaçı PAN nanoliflerinin yüzey baskılı amperometrik glikoz biyosensörlerinde kullanımı ile ilgilidir. Buna karşın PAN nanoliflerinin, üre ve fenolik bileşiklerinin tayininde kullanılması ve PAN ile birlikte medyatörlerin kullanımının biyosensörlerin özelliklerine etkileri sistematik olarak incelenmemiştir. PAN ve/veya metilen mavisi, nötral kırmızı ve tiyoin medyatörü ile hazırlanmış nanoliflerin; üreaz, glikoz oksidaz ve polifenol oksidaz temelli amperometrik biyosensör uygulamalarını içeren bir çalışma bulunmamaktadır.

Literatürde benzeri bulunmayan, üstün performanslı amperometrik biyosensörlerin geliştirilebileceği düşünüldüğünden; bu tez çalışmasında YBCE'lerin diğer geleneksel elektrotlara göre sağladığı üstünlüklerden faydalanılarak, PAN ve çeşitli medyatörleri içeren nanoliflerin enzimler ile bir araya getirilmesi sonucu

amperometrik biyosensörler tasarlanmıştır. Nanolif çapı, medyatör türü, enzim türünün biyosensör performansına etkilerinin sistematik olarak incelenmesi ile de literatüre önemli derecede katkı yapıldığı düşünülmüştür.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Glikoz oksidaz (*Aspergillusniger*, 100000-250000 unit/g, GOx), PPO (Tirosinaz, mushroom, 2687 U/mg), poliakrilonitril (PAN, Mw:150000g/mol), %99 N,N-dimetilformamid (DMF), glutaraldehit çözeltisi (50 wt% H₂O'da), sodyum dodesil sulfat (SDS) (ACS saflıkta, ≥99.0%), glikoz, üre, katekol (1,2 dihidroksibenzen), fenol, 4-kloro fenol, askorbik asit, fruktoz, Metilen Mavisi (MB), Naylon 6 (pelet), formik asit (≥%99) ve Ferrosen Sigma-Aldrich'ten, potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄), dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄), monosodyum hidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, HCl, NaOH, potasyum klorür (KCl), Nötral Kırmızı (NR) Merck'ten temin edilmiştir.

Üreaz (480 kDa, Jack beans) ve Tiyonin (TH) Alfa Aesar firmasından satın alınmıştır. Sakkaroz ve sitrik asit Analar firması, ürik asit Across, karboksil grubu fonksiyonlu çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ise Nanografi firması tarafından temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Elektroegirme işlemideGamma High Voltage Power Supply ES30P markalı güç kaynağı ve New Era Syringe Pump markalı şırınga pompası kullanılmıştır.

Elektrokimyasal ölçümler PalmSens ve Ivium Compactstat marka potentiostatlar ile gerçekleştirilmiştir. PalmSens cihazı ile amperometrik tayin esnasında istenilen hızda çözeltiyi karıştırmak için Hanna manyetik karıştırıcı Ivium Compactstat ile yapılan amperometrik tayin esnasında istenilen hızda çözeltiyi karıştırmak için Basi C3 standı kullanılmıştır.

Tampon çözeltilerin hazırlanmasında Mettler Toledo pH-metre kullanılmıştır.

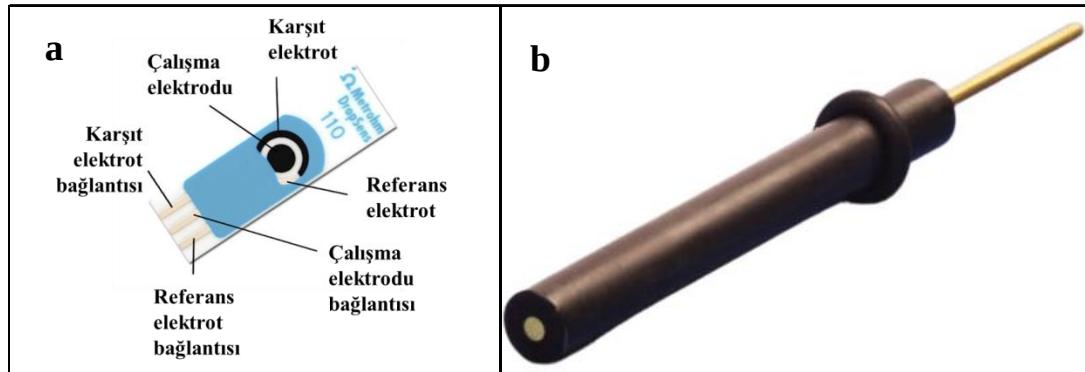
Çözeltilerin hazırlanma aşamasında katı kimyasalların tartımı için Precia XR 2055M-DR 0,01 mg duyarlı elektronik terazi kullanılmıştır. Katıların çözelti içerisinde iyi bir şekilde çözünmesini sağlamak amacıyla ultrasonik banyo olarak Bandelin Sonorex marka alet kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan ultra saf su, Millipore Milli-Q Direct Q-3 ultra saf su cihazından elde edilmiştir.

Nanoliflerin morfolojik analizleri için Zeiss LEO 1430 ve QUANTA 400F Field Emission SEM markalı cihazlar kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan elektrotlar, hücreler ve konnektörler

Bu tez çalışmasında, glikoz tayini için gerçekleştirilen amperometrik yöntemlerin tamamında Methrom firmasından temin edilen Dropsens marka yüzey baskılı karbon elektrotlar (YBCE) kullanılmıştır. YBCE'ler Şekil 2a'dan da görülebileceği gibi referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt ve çalışma elektrodu olarak karbonu bir arada bulundurmaktadır. Ayrıca çalışmanın diğer kısmını kapsayan fenol,

katod ve 4-klorofenol tayinleri için ise referans elektrot olarak Basi marka MF-2052 no'lu Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak Pt tel ve çalışma elektrotu olarak da Pt disk elektrot olmak üzere üçlü elektrot sistemi kullanılmıştır. Yüzey baskılı elektrotların ve platin disk elektrotun genel yapısı Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. a) YBCE'lerin genel yapısı; b) Pt disk elektrodun genel yapısı

3.2. Metot

3.2.1. Elektrot yüzeyinin aktivasyonu ve temizlenmesi

Yüzey baskılama teknolojisi sonucu üretilen YBCE'lerin çalışma elektrodu bilindiği gibi karbon mürekkebinden oluşmaktadır. Bu tür mürekkepler grafit partiküllerinden, polimerik bağlayıcıdan ve diğer katkı maddelerinden (dispersiyon, baskı ve yapıştırma işlemleri için gereklidir) oluşur. Oldukça fazla avantaja sahip olan YBCE'lerin karmaşık elektrot formülasyonları elektrotun redoks aktivitesini ve genel analitik performansını etkileyebilir. Ayrıca, YBCE'nin elektroanalitik performansının, kullanılan elektrokimyasal tekniklerin (puls voltametrik, amperometrik) türüne bağlı olarak büyük ölçüde değiştiği de bilinmektedir (Cui vd. 2001). Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde, fosfat tamponu içerisinde elektrokimyasal ön işlem uygulanan karbon mürekkep bazlı YBCE'lerin gelişmiş aktivite sergilediği görülmüştür. Bu gelişmiş elektrokimyasal aktivitenin; uygulanan ön işlem ile elektrotun yüzey işlevlerinin ve pürüzlülüğünün artmasına ve buna bağlı olarak da yüzey kirleticilerinin ortadan kalkmasına bağlı olduğu rapor edilmiştir (Wang vd. 1996). Bu sebeple her bir elektrota elektro-eğirme işlemi öncesinde, 0,1 M pH 7,5 PBS kullanarak +1,8 V'da 300 sn boyunca elektrokimyasal ön işlem uygulanmıştır. Ardından elektrotlar ultra saf su ile yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır.

3.2.2. Elektro-eğirme koşullarının belirlenmesi

Literatürde PAN'ın homojen morfolojide nanolif elde etmek için oldukça uygun bir polimer olduğu bilinmektedir. Bu nedenle çalışmada DMF içerisinde farklı miktarlarda PAN çözülerek, kütlece %4, %5, %7 ve %10'luk PAN-DMF çözeltileri hazırlanmıştır. Sürekli ve baloncuksuz nanolif eldesini sağlamak amacıyla uygulanan potansiyel 20 veya 25 kV, iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe ise 25 veya 30 cm olarak denenmiş ve 0,5 mL/dk'lık sabit besleme hızında YBCE'ler üzerinde nanolifler

elde edilmiştir. Optimum koşulların belirlenmesi için her bir adımda hazırlanan nanoliflerin SEM analizleri ile morfolojik yapıları incelenmiştir.

Medyatör içeren nanolif eldesi için %4'lük PAN-DMF çözeltilerine Çizelge 3.1'de verilen konsantrasyonlarda MB, TH ve NR ilave edilmiştir. Ardından hazırlanan PAN-DMF-medyatör çözeltileri kullanılarak belirlenen optimum koşullarda nanolif eldesi sağlanmıştır. Medyatör içeren bu nanoliflerin morfolojileri SEM analizi ile incelenmiştir.

PPO temelli biyosensörlerin tasarımında kullanılan Pt disk elektrot üzerinde nanolif eldesi için PAN-MWCNT içeren çözelti kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan elektro-eğirme çözeltileri, %7 PAN ve PAN:MWCNT oranı 10:1 olacak şekilde ayarlanan MWCNT'lerin DMF içinde ayrı ayrı çözülmesiyle hazırlanmış ve gece boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra, MWCNT çözeltisi, PAN çözeltisine ilave edilmiş ve tekrar minimum 24 saat boyunca sabit karıştırma altında tutulmuştur. Ayrıca elektro-eğirme parametreleri de (uygulanan potansiyel, iğne ucu-toplayıcı arasındaki mesafe ve besleme hızı) değiştirilerek boncuksuz ve sürekli nanolif eldesi sağlayan optimum değerler bulunmuştur.

Çizelge 3. 1. Nanolif eldesi için kullanılan çözeltiler ve bileşimleri

Nanolif eldesi için kullanılan çözeltiler	Konsantrasyon
PAN-DMF	%4 PAN-DMF
PAN-DMF-MB	%4 PAN-DMF-0,5 mM MB
PAN-DMF-TH	%4 PAN-DMF-1 mM TH
PAN-DMF-NR	%4 PAN-DMF-1 mM NR

3.2.3. PAN içeren nanoliflerin hazırlanması

YBCE yüzeyinde farklı nanolif matrislerinin oluşturulması için PAN-DMF, PAN-DMF-MB, PAN-DMF-TH ve PAN-DMF-NR çözeltileri Çizelge 3.1'de verilen konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden şırıngalara 1'er mL alınmış ve şırınga pompa sistemi üzerine yerleştirilmiştir. Daha sonra bir maske içine alınan YBCE'ler (veya Pt disk elektrot) timsah yardımıyla tutturularak toplayıcı plaka kısmına yerleştirilmiş ve optimum olarak belirlenen elektro-eğirme şartlarında nanolif matrisleri elde edilmiştir.

3.2.4. Naylon 6-MWCNT-Ferrosen nanoliflerinin hazırlanması

Pt disk elektrot üzerinde Naylon-6-MWCNT-Ferrosen (Pt/Naylon 6/MWCNT/Fc-Nfs) nanoliflerinin elde edilmesi için ilk olarak 1,5 g Naylon 6 ve 0,15 g MWCNT 5 mL formik asit içerisinde 1 gece boyunca sabit karıştırma koşullarında bekletilmiştir. Hazırlanan bu çözelti ile 0,03 mL/dk akış hızında, 8 cm mesafede ve 20

kV potansiyelde 5 dk boyunca elektro-eğirme işlemi gerçekleştirilmiş ve Pt disk elektrot üzerinde nanolif eldesi sağlanmıştır. Daha sonra nanolif kaplı elektrotların üzerine 2,92 mg ferrosen/5 mL etanol çözeltisinden 5 µL damlatılmıştır.

3.2.5. Tampon çözeltilerinin hazırlanması

Tez çalışması boyunca yapılacak glikoz tayinine ait her bir çalışmada destek elektrolit olarak 0,1 M KCl içerisinde 0,1 M K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 kullanılarak hazırlanan fosfat tamponu çözeltileri (PBS) kullanılmıştır. Katekol, fenol ve 4-klorofenol tayininde ise 0,1 M Na_2HPO_4 ve NaH_2PO_4 fosfat taponu kullanılmıştır. Tampon çözelti pH'larının ayarlanmasında 1 M NaOH veya 1 M HCl kullanılmıştır.

3.2.6. PMB sentezi

0,5 mM MB çözeltisi 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmıştır. MB'nin nanolif ile kaplı YBCE'lerin yüzeyinde elektrokimyasal olarak polimerleştirilmesi için döngüsel voltametri yöntemi kullanılmıştır. PMB sentezi, -0,6-+1,2 V potansiyel aralığında, 100 mV/s tarama hızında, 10 döngü uygulanarak gerçekleştirilmiştir (YBCE/PAN-MB-NFs/PMB).

3.2.7. PTH sentezi

1 mM TH çözeltisi 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmıştır. TH'nin nanolif ile kaplı YBCE'lerin yüzeyinde elektrokimyasal olarak polimerleştirilmesi için döngüsel voltametri yöntemi kullanılmıştır. PTH sentezi, -0,5 V ile +1,0 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında, 15 döngü uygulanarak gerçekleştirilmiştir (YBCE/PAN-TH-NFs/PTH).

3.2.8. GOx biyosensörlerinin hazırlanması

Optimum şartlarda elde edilen her bir nanolif kaplı elektrotun çalışma elektrotu (ÇE) kısmına, 35 µL 0,1 M pH 7,0 PBS içerisinde 2,37 mg GOx çözülerek hazırlanmış enzim çözeltisinden 5'er µL damlatılmış ve elektrot yüzeyi oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Ardından 5'er µL daha enzim çözeltisi damlatılarak elektrot yüzeyi tekrar oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra her bir elektrot üzerine % 2,5'lik glutaraldehit çözeltisinden 5'er µL damlatılmış ve tekrar oda koşullarında kurutulmuş, ardından 5'er µL daha damlatılarak tekrar oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan biyosensörler daha sonra elektrokimyasal analizlerde kullanılmak üzere +4 °C'de, sabit nem ortamında saklanmıştır.

3.2.9. PPO biyosensörlerinin hazırlanması

Optimum şartlarda elde edilen her bir nanolif kaplı Pt disk elektrot üzerine ilk olarak ~134,35 U PPO/10 µL tampon çözeltisinden damlatılmış ve oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Elektrot üzerinde enzim kuruduktan sonra üzerine %2,5'lik glutaraldehit çözeltisinden de 10 µL damlatılmış ve tekrar oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan biyosensörler daha sonra elektrokimyasal analizlerde kullanılmak üzere +4 °C'de 0,1 M pH 7 fosfat tamponu içerisinde bir sonraki kullanıma kadar bekletilmiştir.

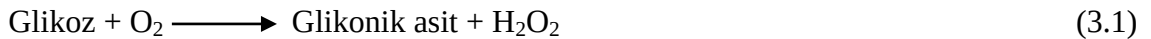
3.2.10. Üreaz biyosensörlerinin hazırlanması

Optimum şartlarda elde edilen her bir nanolif kaplı elektrodun ÇE kısmına ilk olarak 2,92 mg ferrosen/5mL etanol çözeltisinden 5 µL damlatılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra, 30 U Üreaz/10 µL tampon çözeltisinden yine elektrotun ÇE kısmına damlatılmış ve oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Elektrot üzerinde enzim kuruduktan sonra üzerine %2,5'lik glutaraldehit çözeltisinden de yine YBCE/Pt disk'lerin ÇE kısmına 5 µL damlatılmış ve tekrar oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Hazırlanan biyosensörler daha sonra elektrokimyasal analizlerde kullanılmak üzere +4 °C'de 0,1 M pH 7 fosfat tamponu içerisinde bir sonraki kullanıma kadar bekletilmiştir.

3.2.11. Elektrokimyasal ölçüm tekniği

Hazırlanan GOx biyosensörlerin, substrat olan glikoza karşı yanıtının belirlenmesi amacıyla yapılan kronoamperometri çalışmaları; 8 mL 0,1 M fosfat tamponu içeren hücreye elektrotun daldırılması ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, 200 rpm karıştırma hızında, enzim elektrotu için belirlenen değerde sabit potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Bu sabit potansiyelde, elektrotun dengeye ulaşması için bir süre beklenmiştir. Elektrot dengeye ulaştıktan sonra, ardışık olarak glikoz ilavesi gerçekleştirilmiştir. Böylece her bir ekleme sonrası akımda meydana gelen değişim kaydedilmiştir. Daha sonra eklenen glikoz miktarına karşı akım değişimi grafiği oluşturulmuştur.

GOx biyosensörlerinde ilk olarak, Eşitlik 3.1'de görülen glikozun glikonik asite oksidasyonu gerçekleşmektedir. Reaksiyon, flavo enzimin önce indirgendiği ve daha sonra yükseltgendiği iki basamak üzerinden yürümektedir. İndirgenme basamağında, glikoz iki proton ve elektronunu enzime aktararak glikonolaktona dönüşmektedir. Yükseltgenme basamağında ise enzim, moleküler oksijen ile yükseltgenmekte ve hidrojen peroksit oluşturmaktadır (Özyurt 2014). Glikoz tayini için hazırlanan elektrot yüzeyinde glikoz ile glikoz oksidaz enzimi arasında gerçekleşen reaksiyon 3.1 numaralı eşitlikte verilmiştir. Eşitlik 3.2'de ise enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksin yükseltgenmesi görülmektedir (Kausaite-Minkstiene vd. 2014):

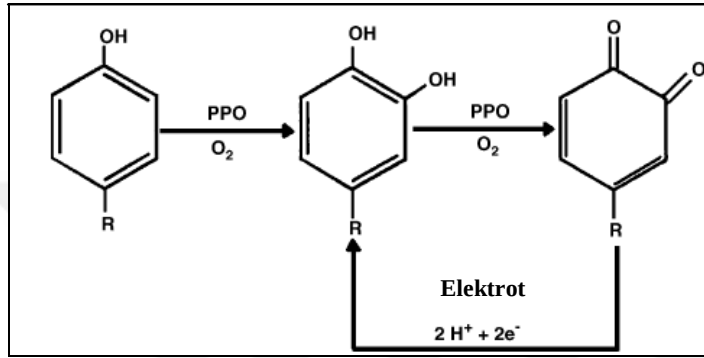


Yukarıda verilen reaksiyonlardan da görüldüğü gibi glikozun elektrokimyasal tayini için iki yöntem kullanılabilir. Bunlardan ilki; O₂ tüketiminin ölçülmesi iken diğeri; enzimatik reaksiyon tarafından üretilen H₂O₂ miktarının ölçülmesidir. Bu tez çalışmasında glikoz biyosensörlerinin amperometrik cevabı H₂O₂'in indirgenmesi üzerinden takip edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında hazırlanan PPO biyosensörlerin, substrata karşı yanıtının belirlenmesi amacıyla yapılan kronoamperometri çalışmaları; 10 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 0,12 g SDS içeren hücreye elektrotun daldırılması ile

gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, 200 rpm karıştırma hızında, enzim elektrotu için belirlenen değerde sabit potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Elektrot dengeye ulaştıktan sonra, ardışık olarak ilgili fenol türevlerinin ilavesi gerçekleştirilmiştir. Böylece her bir ekleme sonrası akımda meydana gelen değişim kaydedilmiştir. Daha sonra eklenen substrat miktarına karşı akım değişimi grafiği oluşturulmuştur.

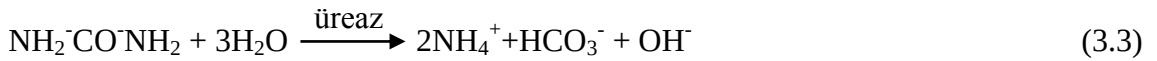
PPO biyosensörlerinde enzim iki reaksiyonu katalize edebilir (Perez vd 2006). Bunlar, moleküler oksijen varlığında; monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu ve o-kinonun yeniden katekole dönüşümü reaksiyonlarıdır (Şekil 3.2). Bu çalışmada üretilen kinonun düşük potansiyelde indirgenmesi takip edilmiştir.



Şekil 3.2. PPO biyosensörlerinin çalışma mekanizması

Tez çalışmasının son aşamasında ise, hazırlanan üreaz biyosensörleri ile üre tayini için krontamperometri yönteminden faydalanılmıştır. Bu amaçla, 10 mL 0,1 M fosfat tamponu ve 0,12 g SDS içeren hücreye nanolif kaplı Pt disk elektrot daldırılmış ve analiz 200 rpm karıştırma hızında sabit potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Bu sabit potansiyelde, elektrotun dengeye ulaşması için bir süre beklenmiştir. Elektrot dengeye ulaştıktan sonra, ardışık olarak üre ilavesi gerçekleştirilmiştir. Böylece her bir ekleme sonrası akımda meydana gelen değişim kaydedilmiştir. Daha sonra eklenen üre miktarına karşı akım değişimi grafiği oluşturulmuştur.

Üreaz biyosensörlerinde ürenin hidroliz olması sonucu oluşan amonyum iyonunun indirgenmesinin takibi yapılmıştır. Amonyum iyonunun oluşum reaksiyonu Eşitlik 3.3'te verilmiştir.



3.2.12. Biyosensörlerin analitik performanslarının incelenmesi

3.2.12.1. Duyarlılık

Duyarlılık, substrat konsantrasyonundaki birim değişime karşılık gelen akım şiddetindeki değişimin bir ölçüsüdür. Hazırlanan biyosensörlerin duyarlılığını belirlemek için optimum koşullarda gerçekleştirilen amperometrik tayin sonuçları kullanılmıştır. Bu sonuçlarla elde edilen akım değişimine karşı-substrat konsantrasyonu

grafiklerine ait eğim değerleri, elektrot alanına bölünerek her bir biyosensör için duyarlık değeri elde edilmiştir.

3.2.12.2. Tespit sınırı (LOD)

Hazırlanan biyosensörlerin LOD değerlerinin belirlenmesi için aynı elektrot ile S/N=3 koşulunda art arda on kronoamperometri çalışması yapılmıştır. Her bir ölçüm sonucunda substrat eklemesi ile akımda meydana gelen değişimler kaydedilerek standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Tüm biyosensörler için bu değerler 3*standart sapma/eğim formülünde yerine konularak LOD değerleri hesaplanmıştır.

3.2.12.3. Biyosensörlerin kullanım kararlılığı

GOx, PPO ve Üreaz biyosensörlerinin kullanım kararlılığının belirlenmesi için, her bir enzime ait biyosensör ile aynı gün içerisinde, art arda 0,5 mM substrat konsantrasyonunda, yirmi kronoamperometri çalışması yapılmıştır. Ölçümler sonucu elde edilen akım değişimlerine karşı ölçüm sayısı grafiğe geçirilmiş ve aktivitedeki bağıl azalma Eşitlik 3.4 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ bağıl aktivite} = \frac{\Delta I_n}{\Delta I_o} \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.12.4. Raf ömrü

GOx, PPO ve üreaz biyosensörlerinin raf ömrünün belirlenmesi için, her bir enzime ait biyosensör ile belirli periyotlarda (1.gün, 7.gün, 15.gün, 21.gün, 30.gün), doyumluğa yakın bir substrat konsantrasyonunda, kronoamperometri çalışması yapılmıştır. Hazırlanan biyosensörler kullanılmadıklarında +4 °C’de, sabit nem ortamında, buzdolabında muhafaza edilmiştir. Kullanım kararlılığında olduğu gibi her bir biyosensör ile % bağıl aktivite belirlenmiştir.

3.2.12.5. Girişim etkisi

GOx biyosensörlerine girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi amacıyla, optimum koşullarda sabit potansiyel uygulanarak amperometrik ölçümler alınmıştır. Sistem dengeye ulaştıktan sonra, ortama 0,5 mM glikoz çözeltisi eklenmiş ve eklenen glikoz miktarının onda biri konsantrasyon değerine sahip sakkaroz, fruktoz, askorbik asit ve sitrik asit çözeltileri sırasıyla ilave edilmiş ve ardından tekrar 0,5 mM glikoz çözeltisi eklenerek akım değişimleri ölçülmüştür.

PPO biyosensörlerine girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi amacıyla, optimum koşullarda sabit potansiyel uygulanarak amperometrik ölçümler alınmıştır. Sistem dengeye ulaştıktan sonra, ortama 5 µM katekol çözeltisi eklenmiş ve eklenen katekol miktarının onda biri konsantrasyon değerine sahip sakkaroz, fruktoz, askorbik asit ve sitrik asit çözeltileri sırasıyla ilave edilmiş ve ardından tekrar 5 µM katekol çözeltisi eklenerek akım değişimleri ölçülmüştür.

Üreaz biyosensörlerine girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi amacıyla, optimum koşullarda sabit potansiyel uygulanarak amperometrik ölçümler alınmıştır.

Sistem dengeye ulaştıktan sonra, ortama 0,0125 mM üre çözeltisi eklenmiş ve eklenen üre miktarının onda biri konsantrasyon değerine sahip glikoz, laktik asit, askorbik asit, KCl, NaCl ve ürik asit çözeltileri sırasıyla ilave edilmiş ve ardından tekrar 0,0125 mM üre çözeltisi eklenerek akım değişimleri ölçülmüştür.

3.2.12.6. Gerçek numune analizi

Hazırlanan GOx biyosensörünün ticari olarak uygulanabilirliğini test etmek için çeşitli meyve sularındaki (Cappy vişne, Cappy karışık ve Cappy kayısı) glikoz miktarları kronoamperometrik yöntemle tayin edilmiştir. Bunun için, her bir meyve suyu analizi için kurulan ve optimum koşullarda dengeye gelmiş enzim elektrotunu içeren hücreye, seyreltilmiş veya seyreltilmemiş ilgili meyve suyu numunesi eklenmiştir. Ekleme sonucunda, akımda meydana gelen değişimler kaydedilmiş ve kalibrasyon denkleminde faydalanılarak konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan konsantrasyonlar ile standart HPLC analiz sonuçlarından elde edilen konsantrasyonlar arasındaki geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Hazırlanan PPO biyosensörünün ticari olarak uygulanabilirliğini test etmek için çeşme suyu numunesindeki fenol türevi (katekol, fenol ve 4-klorofenol) içerikleri standart ekleme metodu kullanılarak, kronoamperometrik yöntemle tayin edilmiştir. Bunun için, optimum koşullarda dengeye gelmiş enzim elektrotunu içeren hücreye ilk olarak çeşme suyu numunesi eklenmiş ve akımda herhangi bir değişiklik meydana gelmediği görülmüştür. Daha sonra, her bir fenol türevi analizi için kullanılan hücrelere, çeşme suyu içerisinde hazırlanmış bilinen konsantrasyonlarda ilgili fenol türevini içeren çözeltiler eklenmiştir. Ekleme sonucunda, akımda meydana gelen değişimler kaydedilmiş ve kalibrasyon denkleminde faydalanılarak konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan konsantrasyonlar ile hücreye ilave edilen ve bilinen ilgili fenol türevi konsantrasyonu arasındaki geri kazanım değeri hesaplanmıştır.

Tez çalışmasında hazırlanan üreaz temelli biyosensörün ticari olarak uygulanabilirliğini test etmek için hastanede üre tayini yapılmış insan idrar örneğindeki üre içeriği kronoamperometrik yöntemle incelenmiştir. Bunun için, optimum şartlarda dengeye gelmiş enzim elektroduna ayrı ayrı seyreltilmiş veya seyreltilmemiş idrar numuneleri eklenmiştir. Ekleme sonucunda akımda meydana gelen değişiklik kaydedilmiş ve kalibrasyon denkleminde faydalanılarak konsantrasyon değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan konsantrasyon ile teorik olarak kabul edilen sonuçdaki konsantrasyon arasındaki geri kazanım değeri hesaplanmıştır.

Tüm tez kapsamında incelenen hazırlanan nanolif temelli biyosensörlere ait genel bilgileri ve tayini için uygulanan potansiyeli içeren açıklamalar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Tez kapsamında hazırlanan biyosensörler

Biyosensör	Elektrot Türü	Polimer	Medyatör	Nanomateriyal	Enzim	Analit	Çalışma Potansiyeli (V)
YBCE/PAN-NFs /GOx	YBCE	PAN	-	-	GOx	Glikoz	+0,7
YBCE/PAN-TH-NFs/GOx	YBCE	PAN	TH	-	GOx	Glikoz	-0,4, +0,7
YBCE/PAN-TH-NFs/PTH/GOx	YBCE	PAN	TH	-	GOx	Glikoz	-0,4
YBCE/PAN- MWCNT-TH-NFs/GOx	YBCE	PAN	TH	MWCNT	GOx	Glikoz	-0,4
YBCE/PAN-MB-NFs/GOx	YBCE	PAN	MB	-	GOx	Glikoz	-0,35, +0,7
YBCE/PAN-MB- NFs/ PMB/GOx	YBCE	PAN	MB	-	GOx	Glikoz	-0,35
YBCE/PAN-NR-NFs/GOx	YBCE	PAN	NR	-	GOx	Glikoz	-0,5
Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO	Pt disk	PAN	-	MWCNT	PPO	Katekol, p- klorofenol, Fenol	0,0
YBCE/PAN-MWCNT-NFs/Üreaz	YBCE	PAN	-	MWCNT	Üreaz	Üre	-0,2, -0,1, +0,2, +0,3, +0,4, +0,7,

							+0,8, +0,9
YBCE/PAN- MWCNT-TH-NFs/Üreaz	YBCE	PAN	TH	MWCNT	Üreaz	Üre	0,0, -0,1, -0,4
YBCE/PAN-MWCNT-AuNP-Fc-NFs/Üreaz	YBCE	PAN	Fc	MWCNT, AuNP	Üreaz	Üre	-0,2
Pt/PAN-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz	Pt disk	PAN	Fc	MWCNT	Üreaz	Üre	-0,1
Pt/Naylon 6-MWCNT-Fc-Nfs/Üreaz	Pt disk	Naylon 6	Fc	MWCNT	Üreaz	Üre	-0,2, +0,35, +0,4

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Glikoz Oksidaz Temelli Biyosensörler

4.1.1. YBCE/PAN-NFs /GOx biyosensörü ile ilgili çalışmalar

4.1.1.1. Elektro-eğirme koşullarının belirlenmesi

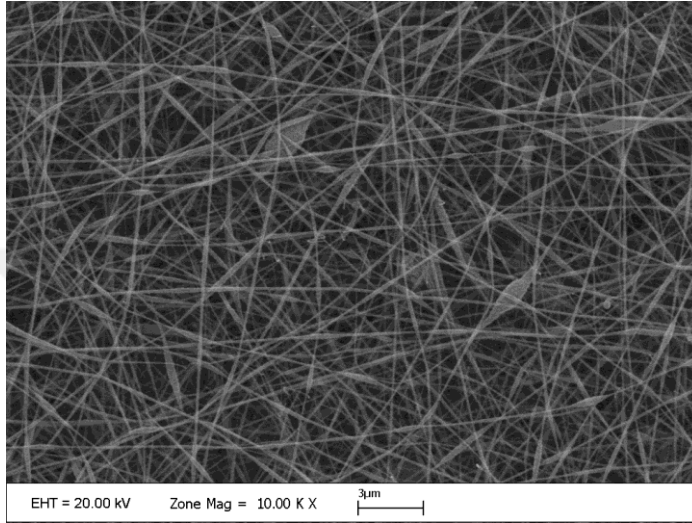
YBCE'ler üzerinde nanolif elde etmek için kullanılan PAN/DMF çözeltisine ait kütlece yüzde derişimler ve denenen elektro-eğirme koşulları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. PAN-DMF çözeltisi ile nanolif hazırlama koşulları

Kütlece % derişim	Elektro-eğirme şartları
10	0,5ml/saat, 20kV, 25cm
	0,5ml/saat, 20kV, 30cm
	0,5ml/saat, 25kV, 25cm
7	0,5ml/saat, 20kV, 25cm
	0,5ml/saat, 20kV, 30cm
	0,5ml/saat, 25kV, 25cm
5	0,5ml/saat, 20kV, 25cm
	0,5ml/saat, 20kV, 30cm
	0,5ml/saat, 25kV, 25cm
4	0,5ml/saat, 20kV, 25cm
	0,5ml/saat, 20kV, 30cm
	0,5ml/saat, 25kV, 25cm

Çizelge 4.1'deki belirtilen elektro-eğirme koşulları ile yapılan çalışmalarda kütlece %10, %7 ve %5 PAN-DMF çözeltileriyle elde edilen nanoliflerin, elektrot

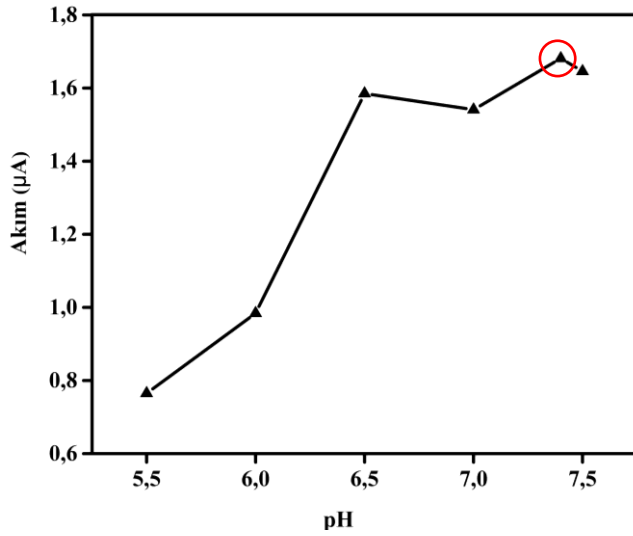
üzerindeki maskede kaldığı ve çalışma elektrotu üzerine kaplanmadığı görülmüştür. Homojen ve elektrotun üzerinde tutunabilen nanolif eldesi için en uygun koşulun, kütlece %4'lük PAN/DMF çözeltisi ile 0,5 ml/saat akış hızında, 20 kV potansiyelde ve 30 cm mesafede olduğu belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda nanolifler (PAN-NFs) belirtilen şartlarda hazırlanmıştır. Bu nanoliflerin yüzey morfolojisi hakkında bilgi almak için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile doğrudan lif matrisi üzerinden görüntüler alınmıştır (Şekil 4.1). PAN-NFs'ların fazla boncuk içermediği ve düzgün morfolojide olduğu görülmüştür. Bu NFs'lerin lif çapı 312 ± 2 nm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1. Kütlece %4'lük PAN-NFs'lerine ait SEM görüntüsü

4.1.1.2. pH etkisinin incelenmesi

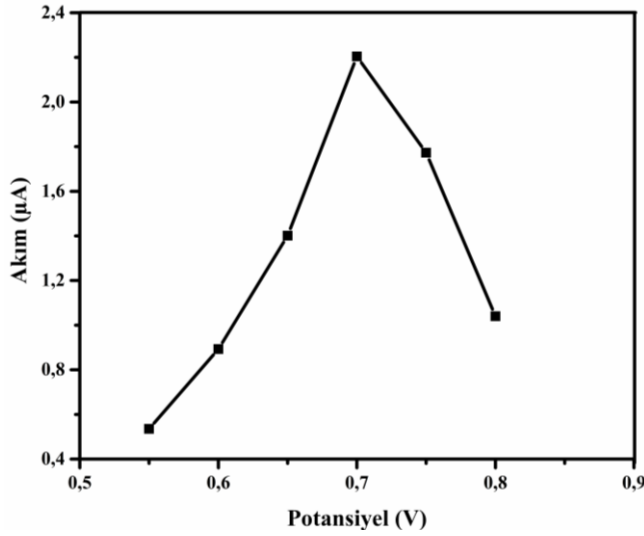
YBCE/PAN-NFs/GOx enzim elektrodunun aktivitesine, ortam pH'nın etkisini araştırmak amacıyla çeşitli pH'larda (5,5-7,5) 0,1 M fosfat tamponları hazırlanmıştır. Hazırlanan biyosensörlere her bir fosfat tamponunda 0,7 V sabit potansiyel uygulanmış ve akım sabit hale geldikten sonra 0,5 mM glikoz eklenerek kararlı haldeki akım değerleri ölçülmüştür. Ölçülen bu akım değerleriyle, ΔI 'e karşı pH grafiği çizilmiştir (Şekil 4.2). En yüksek akım değeri pH 7,4'te elde edildiği için optimum pH 7,4 olarak belirlenmiş olup bunun literatürdeki çeşitli çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür (Ekatbur vd 2013). Glikozun amperometrik tayininde bundan sonraki ölçümler 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2. YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörü için akım farkına karşı pH grafiği (+0,7 V, 25 °C)

4.1.1.3. Çalışma potansiyelinin etkisinin incelenmesi

Bilindiği üzere GOx temelli biyosensörlerde substrata karşı olan amperometrik cevap, enzimatik reaksiyon tarafından üretilen H_2O_2 'nin miktarın ölçülmesi üzerinden takip edilebileceği gibi O_2 tüketimi üzerinden de takip edilebilir. Çalışmanın bu kısmında hazırlanan YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörlerinin substrata karşı verdiği tepki, H_2O_2 'nin miktarının ölçülmesi ile belirlenmiştir. Optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi için daha önce belirtilen şartlarda hazırlanan biyosensörler çeşitli çalışmalara tabii tutulmuştur. Bu amaçla YBCE/PAN-NFs/GOx elektrotuna sabit glikoz derişiminde 0,55-0,8 V aralığında potansiyel uygulanarak akım şiddetleri ölçülmüş ve potansiyele karşı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.3'ten de görülebileceği gibi, +0,7 V'dan daha pozitif potansiyellere geçildiğinde akımda bir azalma meydana gelmiştir. Bu durum, FAD rejenasyonu ve H_2O_2 indirgenmesi arasındaki yarışmaya atfedilebilir (Pauliukaite vd. 2007, Ghica vd. 2009, Ghica ve Brett 2010, Ghica ve Brett 2014) ve bu nedenle optimum çalışma potansiyeli en yüksek akım değerinin elde edildiği +0,7 V olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.3. YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörü için akım farkına karşı çalışma potansiyeli grafiği (pH 7,4 0,1 M PBS, 25 °C)

4.1.1.4. Kronoamperometri çalışmaları

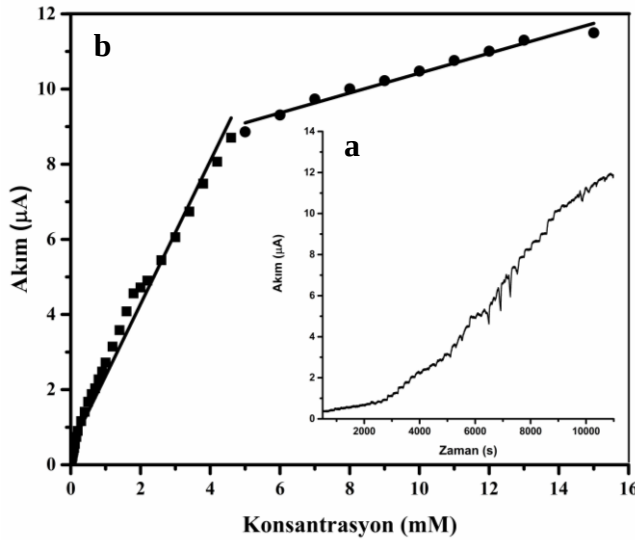
Substrat olan glikoza karşı duyarlılığın belirlenmesi amacıyla hazırlanan YBCE/PAN-NFs-GOx biyosensörleri ile H_2O_2 'nin yükseltgenme potansiyeli olan +0,7 V sabit potansiyelde, 0,1 M pH 7,4 PBS ile kronoamperometri çalışması gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.4a ilgili çalışmanın glikoz eklemesi sırasında kayıt edilen akıma karşı zaman grafiğini ve Şekil 4.4b ise, amperometrik analiz sonucu elde edilen akım değişimlerine karşı çizilen glikoz konsantrasyonu grafiğini göstermektedir. Elde edilen kalibrasyon grafiğine bakıldığında, biyosensörün glikoza karşı verdiği cevabın konsantrasyonla doğru orantılı bir şekilde arttığı ve belirli bir konsantrasyondan sonra da akımın sabit kaldığı görülmektedir. Bunun sistemin doymuş hale gelmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Kalibrasyon eğrisinin değerlendirilmesi ve tespit sınırı (LOD (limit of dedection) çalışmasının sonuçları Çizelge 4.2'de listelenmiştir. Ayrıca Lineweaver-Burk eğrisinden hesaplanan K_m ve I_{max} değerleri ise sırasıyla 0,85 mM ve 4,51 μA olarak bulunmuştur. Literatüre göre oldukça düşük olan bu K_m değeri, enzim-substrat arasındaki biyoyumluluğun oldukça yüksek olduğunu ifade etmektedir (Cetin ve Camurlu 2007, Apetrei vd. 2022).

Çizelge 4.2. YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörünün analitik performansı

LOD (μM)	1. Lineer aralık (mM)	Duyarlılık ($\mu A/mM.cm^2$)	2. Lineer aralık (mM)	Duyarlılık ($\mu A/mM.cm^2$)
3,19	0,01-4,60	35,98	5,0-15,0	4,99

Literatürdeki PAN nanolifi içeren diğer glikoz biyosensörleri ile hazırladığımız YBCE/PAN-Nfs/GOx biyosensörleri karşılaştırıldığında, elde ettiğimiz GOx temelli PAN-Nf biyosensörlerinin yüksek hassasiyet (duyarlılık), oldukça düşük LOD değeri ve

geniş lineer aralık davranışı sergilediği görülmüştür. Örneğin, Ekabutr ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada PAN/çok duvarlı karbon nanotüp çözeltisinden hazırladıkları nanoliflerin yüzeyini polipirol iletken polimeriyle kaplayıp glikoz oksidaz enzimini immobilize etmişlerdir. Geliştirilen biyosensörün doğrusal aralığını 0,25-6 mM, tespit sınırı 15,51 μM ve duyarlılığını ise 5,41 $\mu\text{A}/\text{mM}$ olarak tespit etmişlerdir. Bae ve arkadaşlarının (2012) glikoz tayininde kullanılmak üzere geliştirdikleri PAN/Silika nanolif biyosensörlerinin duyarlılık ve lineer aralık değerlerini sırasıyla 33,47 $\mu\text{A}/\text{mM.cm}^2$ ve 1-20 mM olarak bildirmişlerdir (Bae vd. 2012). Farklı oranlarda hazırladıkları PAN/silika/karbon nano tüp çözeltisinden elektro-eğirme yöntemiyle nanolif elde ederek bir biyosensörün geliştirildiği bir başka çalışma ise Im ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Glikoz tayini için tasarlanan biyosensörün duyarlılığını 39,30 $\mu\text{A}/\text{mM.cm}^2$ ve doğrusal aralığını da 1-20 mM olarak bildirmişlerdir (Im vd. 2012). PAN-MWCNT nanoliflerinin Pt disk elektrot üzerinde hazırlanmasını içeren bir çalışma da ise duyarlılık, LOD ve lineer aralık değerleri sırasıyla 117 $\mu\text{M}/\text{mM.cm}^2$, 91,5 μM 0,01 mM-0,4 mM tespit etmişlerdir (Cetin ve Camurlu 2017). Burada çalışmamıza kıyasla yaklaşık 3 kat daha yüksek duyarlılık değeri elde edilmiştir. Ancak, çalışmamıza göre glikozun tayini için lineer aralık açısından oldukça dar bir aralıkta ve neredeyse 30 kat daha az LOD değerine sahiptir. Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında, glikozun hassas bir şekilde tayininin gerçekleştirilmesi amacıyla gerçekleştirdiğimiz PAN nanolif temelli biyosensörlerimiz oldukça başarılı olduğu görülmüştür.

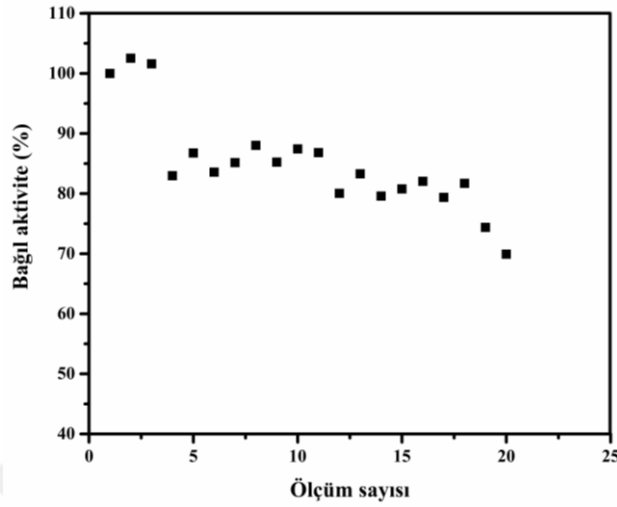


Şekil 4.4. YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörü için **a)** akım-zaman grafiği ve **b)** akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (+0,7 V; 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25 °C)

4.1.1.5. Kullanım kararlılığı

YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirliği 25 °C’de bir günde ardışık 20 ölçüm yapılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.5). Her bir ölçüm sonucunda elde edilen standart sapma $\pm 8,07$ ve varyasyon katsayısı (cv) % 9,48 (n=20)

hesaplanmıştır. Şekil 4.5 incelendiğinde, YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörünün 20. kullanımda % 69,93 oranında aktivitesini koruduğu görülmektedir.

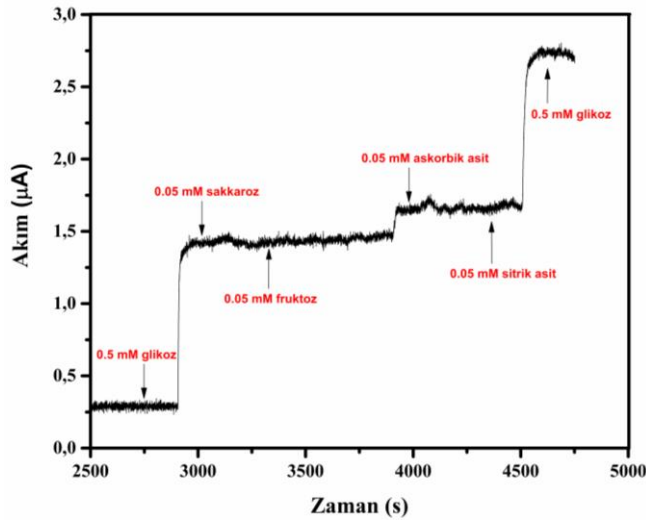


Şekil 4.5. YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörünün kullanım kararlılığı (0,10 M pH 7,4 fosfat tamponu, 0,5 mM glikoz, 25 °C)

4.1.1.6. YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörüne girişim etkisinin incelenmesi ve gerçek numune analizi

Bir biyosensörün ticari olarak uygulanabilirliğinin bir göstergesi olan gerçek numune analizi için bu tez çalışmasında çeşitli meyve suları kullanılmıştır. Bilindiği üzere meyve suları glikoz yanında genellikle sakkaroz, askorbik asit, fruktoz ve sitrik asit gibi çeşitli maddeleri de içermektedir. Bu nedenle kullanılan biyosensörün güvenilir olması için yalnızca glikoza karşı seçici olması ve diğer girişim yapabilecek bileşenlerden etkilenmemesi istenir. Bu amaçla, geliştirilen biyosensörün glikoz dışında diğer türlere karşı verdiği tepki kronoamperometri yöntemi ile incelenmiştir. Literatürde yaygın olarak kullanılan girişim yapan türlerden birkaçının +0,7 V sabit potansiyelde ortama ardışık olarak eklenmesiyle elde edilen grafik Şekil 4.6'da verilmiştir. Grafikten elde edilen veriler değerlendirildiğinde, askorbik asitin %14,26, sitrik asitin %7,27 oranında girişim yaptığı sakkaroz ve son olarak da fruktozun ise kayda değer bir oranda girişim yapmadığı tespit edilmiştir.

Gerçek numune çalışmasında ise, ticari olarak temin edilen çeşitli meyve suları (Cappy vişne ve Cappy karışık) herhangi bir seyreltme işlemine uğratılmadan +0,7 V'da çalışma hücrelerine akım sabit hale geldikten sonra eklenmiştir. Ölçülen akım değerlerine denk gelen geri kazanım değerleri, kalibrasyon grafiğinin denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. Cappy vişne meyve suyu için geri kazanım değeri %98,55 ve Cappy karışık meyve suyu için geri kazanım değerinin ise %99,32 olduğu belirlenmiştir.

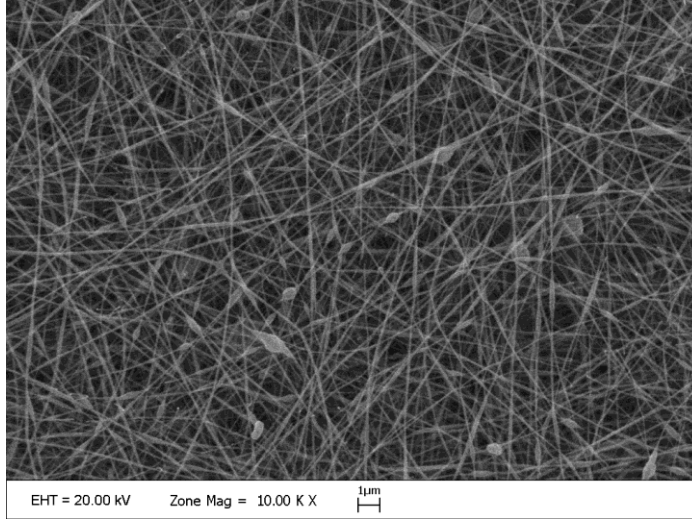


Şekil 4.6. YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörünün +0,7 V çalışma potansiyelindeki girişim çalışması (+0,7 V; 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu, 25 °C)

4.1.2. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü ile ilgili çalışmalar

4.1.2.1. Elektro-eğirme koşullarının belirlenmesi

Tezin materyal ve metot bölümünde belirtildiği şekilde hazırlanan nanolif çözeltisi (%4 PAN ve 1 mM tiyonin (TH) medyatörü içeren) ile YBCE'ler üzerinde tutunabilen nanolif elde edilebilmesi için çeşitli koşullarda çalışmalar yapılmıştır (Çizelge 4.3). Tüm şartlar değerlendirildiğinde, YBCE'ler üzerinde en etkili nanolif elde etme koşulunun besleme hızı: 0,5 mL/dk, voltaj: 20 kV ve iğne ile toplayıcı arasındaki mesafe: 20 cm olduğu belirlenmiştir. Daha sonraki çalışmalar için bu koşullarda elde edilen elektrotlar kullanılmıştır. Nanoliflerin morfolojik incelenmesi SEM analizi (Şekil 4.7'de) ile doğrudan lif matrisi üzerinden gerçekleştirilmiştir. Elde edilen medyatör temelli nanoliflerin ortalama lif çapı 206 ± 3 nm olarak belirlenmiştir. Hesaplanan nanolif çapında PAN-NF'lerine (312 ± 2 nm) göre azalma, ortamdaki medyatörün varlığı ile ilişkilendirilmiştir.



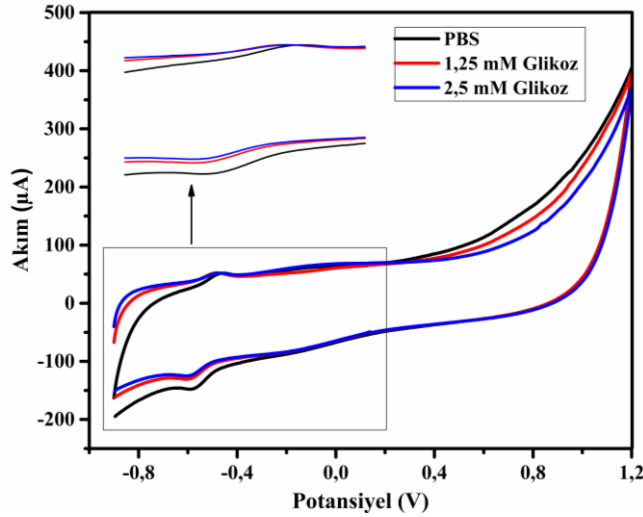
Şekil 4.7. Kütlece %4 PAN ve 1 mM TH içeren nanoliflere ait SEM görüntüsü

Çizelge 4.3. PAN-Tiyonin-DMF çözeltisi ile nanolif hazırlama koşulları

Çözelti Konsantrasyonu	Elektro-eğirme şartları
%4 PAN-1 mM Tiyonin-DMF	0,5ml/saat, 20kV, 20cm
	0,5ml/saat, 20kV, 25cm
	0,5ml/saat, 25kV, 25cm
	0,5ml/saat, 25kV, 20cm

4.1.2.2. Elde edilen nanolif temelli biyosensörlerin elektrokimyasal incelenmesi

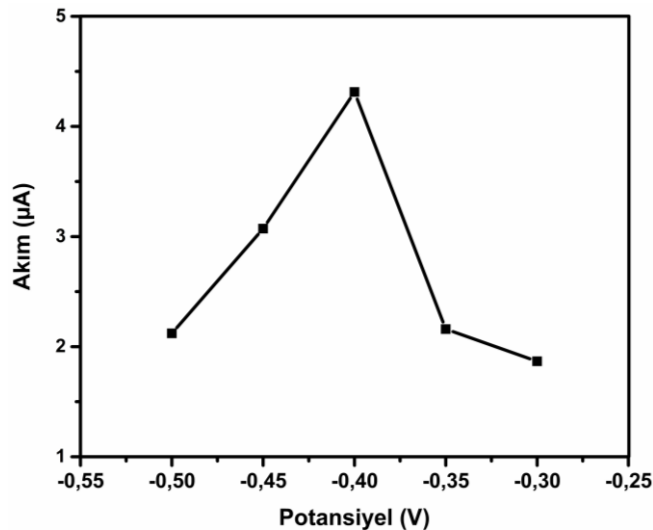
Daha önce belirtilen şartlarda hazırlanan YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörlerinin glikoza karşı verdiği cevap ilk olarak döngüsel voltametri yöntemiyle elektrokimyasal olarak incelenmiştir. Şekil 4.8, pH 7,0 0,1 M PBS içindeki ve ard arda yapılan 1,25 mM glikoz ilavesi sonrası kayıt edilen döngüsel voltamogramları göstermektedir. Döngüsel voltamogramlar incelendiğinde, glikoz ilave sonrası TH'ye ait yaklaşık -0,40 V'ta bir yükseltgenme piki ve buna karşılık yaklaşık -0,5 V'da da bir indirgenme piki gözlemlenmiştir. Ayrıca, medyatörün analite tepkisine atfedilebilecek katodik akımda bir artış gözlenmiş olup sonuçlar literatür ile de uyumludur (Feng vd. 2007).



Şekil 4.8. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörünün 50 mV/s tarama hızındaki ait döngüsel voltamogramı (0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C)

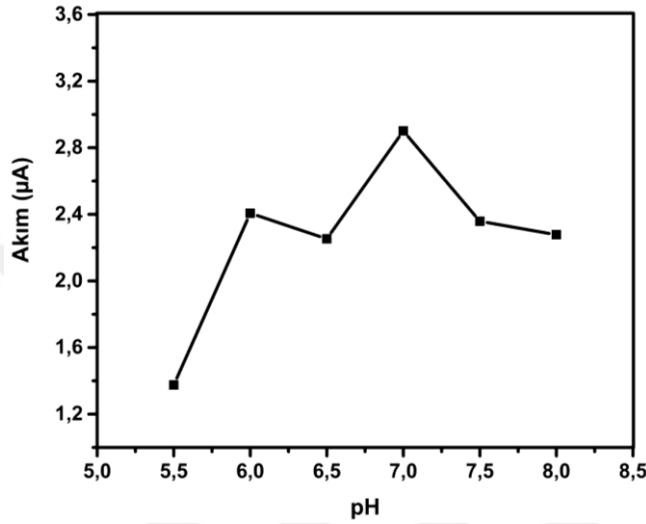
4.1.2.3. Optimum çalışma koşullarının belirlenmesi

Tez çalışmasının bu kısmında, medyatör içeren GOx temelli biyosensörlerin glikoza karşı olan cevabına çalışma potansiyelinin etkisi incelenmiştir. Döngüsel voltamogramların dikkate alınmasıyla belirlenmiş çeşitli potansiyellerde (-0,5 ile -0,3 V arasında), YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörlerinin glikoz eklenmesine karşı gösterdikleri akım şiddetleri kronoamperometri yöntemi ile belirlenmiştir. 5 farklı potansiyeldeki akım değişimlerinin potansiyele karşı çizilmesiyle elde edilen grafik Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Glikoz için en yüksek akım değerinin ölçüldüğü -0,4 V, bundan sonraki çalışmalarda uygulanacak optimum potansiyel olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü için akım değişimine karşı uygulanan potansiyel grafiği (0,5 mM için, 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C)

YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörlerinin aktivitesine ortam pH'ının etkisini incelemek ve optimum pH değerini belirlemek amacıyla çeşitli pH'larda (5,5 – 8,0) 0,1M fosfat tamponları hazırlanmıştır. Her bir fosfat tamponuna daldırılmış olan elektrotlara -0,4 V sabit potansiyel uygulanmış ve akım sabit hale geldikten sonra 0,5 mM glikoz eklenerek kararlı haldeki akım değerleri ölçülmüştür. Ölçülen akım değerleriyle ΔI 'e karşı pH grafiği çizilmiştir (Şekil 4.10). En yüksek akım değeri pH 7,0'da elde edildiği için optimum pH 7,0 olarak belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda destek elektrolit olarak 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu kullanılmıştır.



Şekil 4.10. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü için akım farkına karşı pH grafiği (0,5 mM için, -0,4 V, 25 °C)

i) Optimum elektro-eğirme süresinin belirlenmesi

Elektro-eğirme süresinin değiştirilmesi, çalışma elektrodu üzerindeki matris kalınlığı ile ilişkili olup, biyosensörün performansı üzerinde olası etkilerinin değerlendirilmesi için optimizasyon çalışması (Çizelge 4.4) yapılmıştır. Elde edilen nanoliflerle daha önce belirtilen şartlarda biyosensörler hazırlanmış ve her biri için -0,4 V'ta kronoamperometri çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak çizelge incelendiğinde en yüksek duyarlılık, 20 dk nanolif elde etme süresi ile hazırlanan biyosensörlerle gerçekleştirildiği için optimum elektro-eğirme süresi bundan sonraki deneyler için 20 dk olarak belirlenmiştir. Sürenin 20 dakikanın üzerine çıkarılmasının duyarlılık üzerinde olumsuz etkisi olduğu görülmüş ve bunun elektrot yüzeyinde elektron transferinin yavaşlamasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Çizelge 4.4. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü için elektro-eğirme süresi ile analitik performans ilişkisi

Elektro-eğirme süresi (dk)	Lineer aralık (mM)	Duyarlık ($\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$)
10	0,01-0,7	84,26
20	0,01-0,7	126,74
30	0,01-0,7	97,16

ii) Medyatör miktarı optimizasyonu

YBCE'ler üzerinde nanolif eldesinde kullanılan medyatör miktarının optimizasyonu için, 4 farklı konsantrasyonlarda (0,25, 0,50, 1,0 ve 1,5 mM) TH içeren nanolif çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu nanolif çözeltileri ile daha önce belirtilen optimum sürede nanolif kaplı elektrotlar hazırlanmış ve yine daha önce belirtilen şartlarda biyosensörler elde edilmiştir. Çizelge 4.5 değerlendirildiğinde; 1,0 ve 1,5 mM'da hazırlanan biyosensörlerdeki duyarlılık değerleri birbirine oldukça yakın olduğu görülmüş olup deneysel koşullar değerlendirildiğinde tekrarlanabilir ve güvenilir verilerin elde edildiği 1,0 mM TH optimum medyatör miktarı olarak belirlenmiştir.

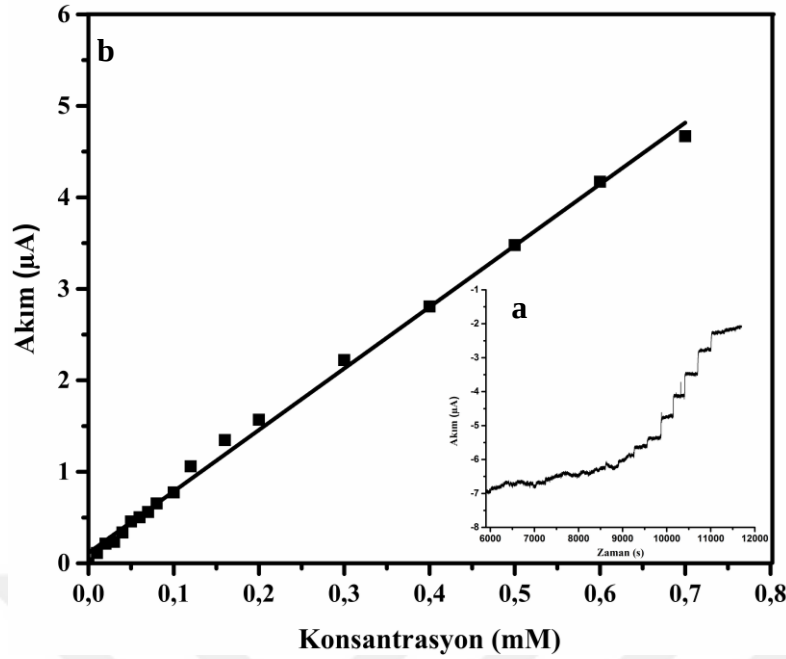
Literatürde glikoz tayininde kullanılmak üzere tasarlanan ve medyatör olarak polimer tiyoin filmi kullanan çeşitli çalışmalar ile bu sonucun tutarlı olduğu gözlenmiştir. Zhang ve arkadaşları, 1 mM TH ile hazırladıkları kompozit film elektrotunu (tiyoin/EDTA/karbon nanotüp-kitosan) hidrojen peroksit takibinin gerçekleştirilmesi amacıyla kullanmışlardır (Zhang vd. 2010). Yine aynı miktarda medyatör olarak TH monomerinin kullanımını içeren bir başka çalışma ise Ghica ve Brett tarafından (2014) bildirilmiştir (Ghica ve Brett 2014).

Çizelge 4.5. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü için medyatör miktarı ile analitik performans ilişkisi

Medyatör miktarı (mM)	Lineer aralık (mM)	Duyarlık ($\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$)
0,25	0,01-0,7	93,17
0,50	0,01-0,7	110,69
1,00	0,01-0,7	126,74
1,50	0,01-0,7	122,82

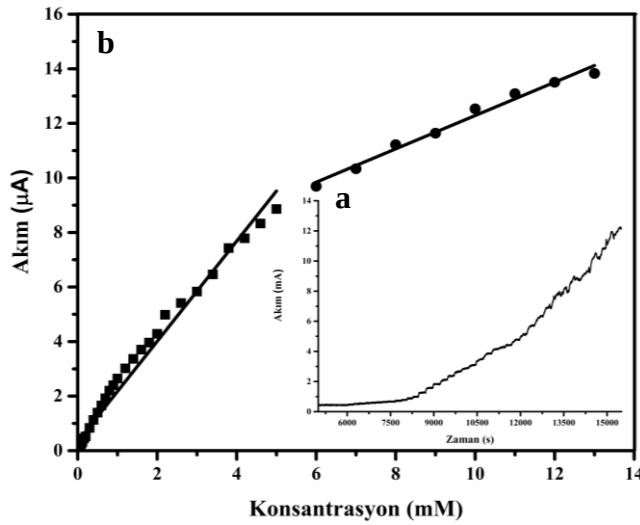
4.1.2.4. Kronoamperometri çalışmaları

Bilindiği gibi GOx, elektron alıcısı olarak moleküler O₂'i kullanarak glikozun H₂O₂ ve glukonolaktona oksidasyonunu katalize eder. Bu işlem sırasında glukonolakton, enzimatik olarak glukonik aside hidrolize edilir. GOx, elektronları doğrudan elektrotta aktaramaz çünkü redoks aktif merkez flavin adenin dinükleotidi (FAD), doğrudan elektron alıcı veya verici çiftinin bölünmesine ve elektron transferini kısıtlayabilecek bir bariyer olarak tanımlanabilen kalın bir protein tabakası ile çevrilidir. Bu nedenle, FAD ve elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferi, amperometrik glikoz biyosensörlerinin çalışmasında sınırlayıcı bir faktördür. FAD ile elektrot yüzeyi arasında elektriksel olarak bir temas kurmak için, GOx'un aktif merkezi ile elektrot yüzeyi arasında elektronları transfer edebilen yapay araçların kullanılması ile bu sınırlayıcı faktörün üstesinden gelinebilir. Bu amaçla tez çalışmasının bu kısmında medyatörün kullanılması biyosensörün performansına olan katkısı değerlendirilmiştir. Hazırlanan elektrotlarla hem medyatörün çalışma potansiyeli olan -0,4 V'da hem de H₂O₂ yükseltgenmesine ait olan potansiyel (+0,7 V) de kronoamperometri çalışması gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.11a ilgili çalışmanın -0,4 V'da glikoz eklemesi sırasında kayıtlı edilen akıma karşı zaman grafiğini ve Şekil 4.11b ise bu amperometrik analiz sonucu elde edilen kalibrasyon grafiğini göstermektedir. Şekil 4.11a'da uygulanan sabit potansiyel için glikoz derişimi artıkça ölçülen akım değerinin de arttığı görülmektedir. Biyosensör kalibrasyon grafiği denkleminin $y=6,7172x+0,1144$ ($R^2=0,9968$) olmasına bağlı olarak duyarlılık değeri 126,73 $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, biyosensörün lineer aralığının da 0,01-0,7 mM olduğu bulunmuştur. Son olarak Lineweaver-Burk eğrisinden hesaplanan K_m ve I_{max} değerleri sırasıyla 2,70 mM ve 22,59 μA 'dır. Tez çalışması kapsamında elde edilen K_m değeri literatürdeki benzer mediatörleri içeren çalışmalara göre daha düşük olduğu görülmüştür (Li vd. 2004; Deng vd. 2007) Düşük K_m değeri, GOx'un aktivitesinde çok fazla değişiklik olmaksızın immobilize edilebildiğini ve elektrot matrisindeki nanofiber ve mediatör ile oldukça biyoyumlu olduğunu göstermiştir (Deng vd. 2007).



Şekil 4.11. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü için **a)** akım-zaman grafiği ve **b)** akım-zaman grafiğinden elde edilen akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (-0,4 V; 0,1 M pH 7 fosfat tamponu, 25 °C)

Çalışmanın bir sonraki aşamasında ise H_2O_2 'nin yükseltgenme potansiyeli olan +0,7 V'da 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda kronoamperometri çalışması gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda elde edilen kalibrasyon grafiği ve kronoamperogram Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Kalibrasyon grafiğinden de görülebileceği gibi her glikoz ilavesinden sonra akım değeri artmış ve doygunluğa ulaşmasına bağlı olarak belli bir değerden sonra saptmaya başlamıştır. Grafikten de görülebileceği gibi çalışılan malzeme için iki lineer aralık bulunmuştur. Hazırlanan bu biyosensörün 1. lineer aralığı 0,01-5 mM ve ona ait olan denklem $y=1,8369x + 0,3345$ ($R^2=0,9855$), 2. lineer aralık 6-13 mM ve ona ait denklem de $y=0,6111x + 6,1746$ ($R^2=0,9849$) şeklindedir. Bu kalibrasyon denklemlerinden hesaplanan duyarlılık değerleri sırasıyla 34,66 ve 11,53 $\mu A/mM.cm^2$ olarak belirlenmiştir. İki farklı potansiyellerde yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde medyatör kullanımının duyarlılık üzerine olumlu etkisi olduğu tespit edilmiştir.

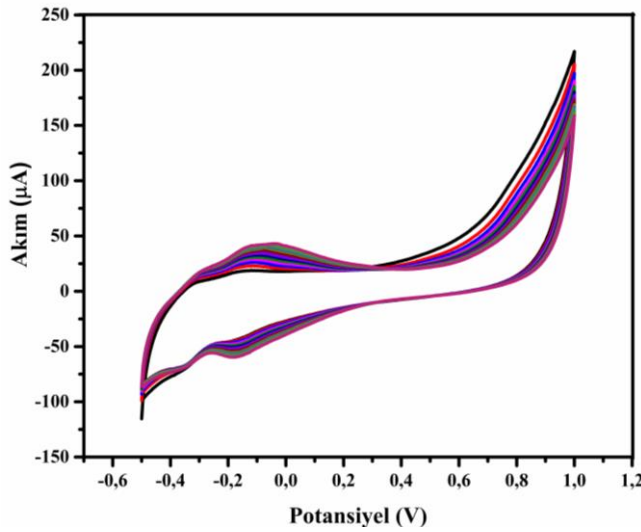


Şekil 4.12. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü için **a)** akım-zaman grafiği ve **b)** akım-zaman grafiğinden elde edilen akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (+0,7 V; 0,1 M pH 7 fosfat tamponu, 25 °C)

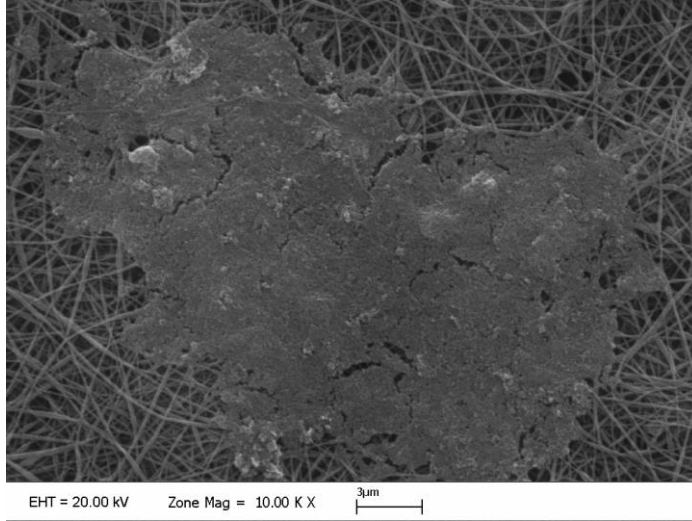
Literatür incelendiğinde tez çalışmamızın yenilikçi niteliğini kanıtlayan nanolifler ve medyatörlerin kombinasyonunu içeren bir çalışmanın olmadığı görülmüştür. Ayrıca, literatürde tyoninin polimerizasyonu dışında biyosensör uygulamalarında herhangi bir uygulamasının olmadığı da görülmüştür. Tezde elde edilen bu bulgular, literatürdeki glikoz tayininin gerçekleştirilmesi için TH'nin polimerizasyonu sonucunda medyatör olarak kullanımını içeren sonuçlarla kıyaslandığında; Ghica ve Brett'in 2014 yılında yapmış olduğu politiyonin/CNT biyosensörünün sahip olduğu duyarlılıktan ($24,6 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$), ve Tang ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen politiyonin/MWCNT/CTS-PTFE kompozit biyosensörünün sergilediği duyarlılığından ($2,8 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$) bu iki çalışmada da CNT bulunmasının katkısına rağmen çok daha yüksektir. Benzer şekilde Deng ve arkadaşlarının glikoz tayini için bir altın elektrot kullanarak tasarladıkları politiyonin/Nafion biyosensörü, çalışmamıza göre daha geniş bir lineer aralık (0,005-5 mM) sergilemiştir. Ancak altın gibi oldukça iletken ve pahalı bir elektrot materyalinin kullanılmasına rağmen tez kapsamında geliştirilen biyosensörün duyarlık değerinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür (Deng vd. 2007). Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde ve literatür ile kıyaslandığında, yapılan tez çalışmasının bu kısmında herhangi bir nanomalzeme kullanılmadan ve medyatörün polimerizasyonu yapılmadan tatmin edici bir lineer aralık ve literatüre göre çok yüksek bir duyarlılık değeri elde edilmiştir. Aslında sonuçlar lineer aralık açısından değerlendirildiğinde çoğu biyosensöre göre daha dar bir aralığa sahip olmasına rağmen duyarlılık açısından değerlendirildiğinde oldukça yüksek değerler elde edilmiştir. Bu durum, medyatörün, enzimin redoks merkezi ile elektrot arasındaki doğrudan elektron transferine olanak sağlamasına ve nanolifler tarafından sağlanan yüksek yüzey alanına bağlanabilir.

4.1.2.5. YBCE/PAN-TH-NFs/PTH elektrotun hazırlanması

Redoks medyatörü olarak kullanılan diğer fenazin türevlerinde olduğu gibi TH medyatörü de elektrokimyasal olarak polimerleştirilebilir ve iletken bir film oluşturabilir. Tez çalışmasının bu kısmında TH'nin elektrot yüzeyine elektrokimyasal olarak doğrudan polimerleştirilmesi gerçekleştirilmiş ve hazırlanan amperometrik biyosensörlerin analitik performansları değerlendirilmiştir. TH'nin YBCE'lerin yüzeyinde elektrokimyasal olarak polimerleştirilmesi, 0,1 M KCl içeren 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanan 1 mM TH'nin elektrot üzerine damlatılmasıyla, -0,5 V ile +1,0 V potansiyel aralığında 50 mV/s tarama hızında 15 döngü uygulanarak gerçekleştirilmiştir (YBCE/PAN-TH-NFs/PTH). YBCE'ler üzerinde TH'nin elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları Şekil 4.13'de verilmiş olup 2014 yılında Ghica ve Brett'in TH'nin elektropolimerizasyonu ile ilgili yapmış oldukları çalışmada elde ettikleri döngüsel voltamogramlarla uyumludur. Ghica ve Brett, TH monomerinin yükseltgenme pik potansiyelini yaklaşık +0,9 V'da gözlemlemişlerdir (Ghica ve Brett 2014). Tez çalışması kapsamında TH monomerinin yükseltgenme pik potansiyeli yaklaşık +0,8 V'da gözlenmiştir. Lif matrisi üzerinde gerçekleştirilen polimerizasyon işlemi sonrası alınan SEM görüntüleri Şekil 4.14'de gösterilmiştir. SEM görüntüleri üzerinden görülebileceği gibi lif matrisi üzerinde polimerizasyona ait tabaka halinde bir film oluşumu gözlenmiş olup bu durum polimerizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini desteklemektedir.



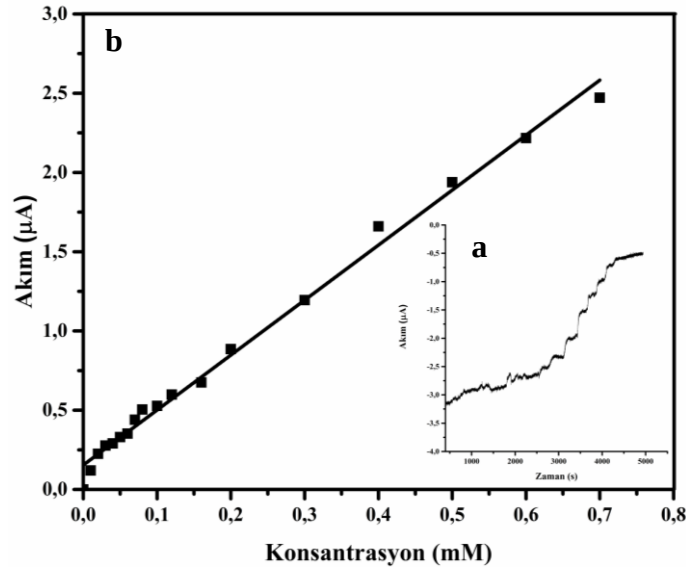
Şekil 4.13. TH'nin YBCE üzerindeki elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları (0,1 M KCl içeren pH 7,0 0,1 M fosfat tamponunda 1,0 mM TH monomer çözeltisinde, 50 mV/s tarama hızında, 15 döngü)



Şekil 4.14. PAN-TH-NFs matrisi üzerinde TH'nin polimerizasyonu sonrası elde edilen SEM görüntüsü

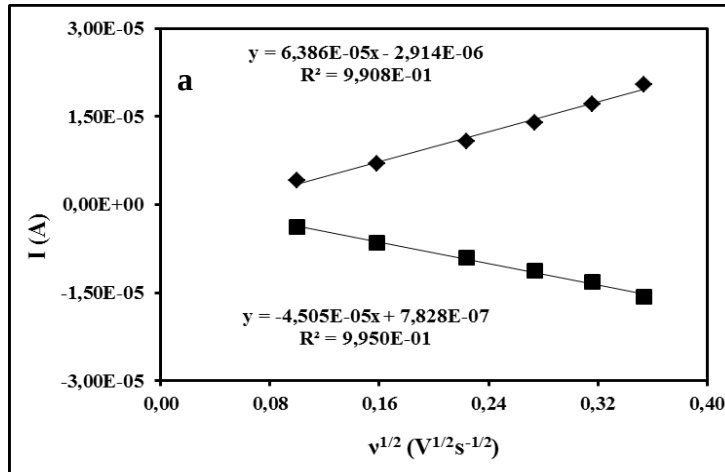
4.1.2.6. YBCE/PAN-TH-NFs/PTH/GOx biyosensörüne ait konoamperometri çalışmaları

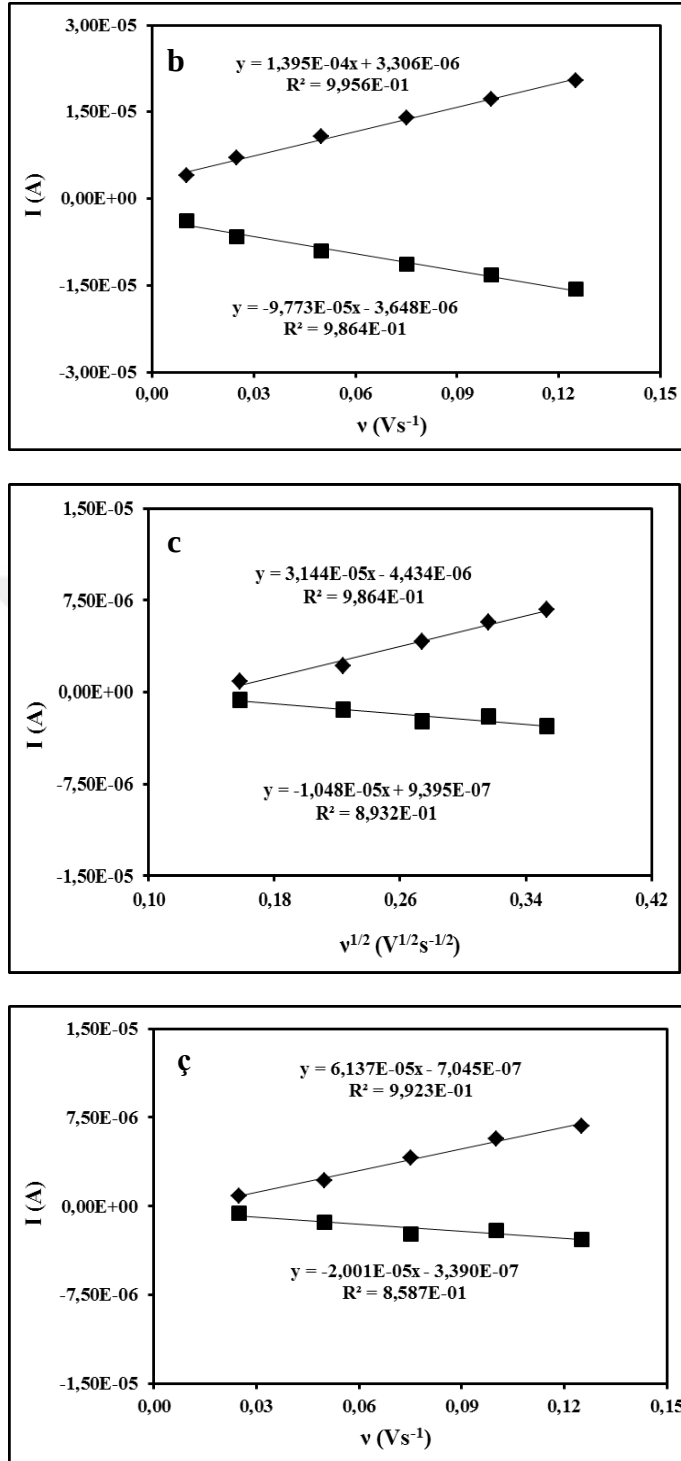
Şekil 4.15, hazırlanan YBCE/PAN-TH-NFs/PTH/GOx biyosensörü ile, substrat olan glikozun amperometrik tayini için -0,4 V 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponunda kayıt edilen konoamperogramı ve bu konoamperogramdan elde edilen akım değişimine karşı substrat konsantrasyonu grafiğini göstermektedir.



Şekil 4.15. YBCE/PAN-TH-NFs/PTH/GOx biyosensörü için **a)** akım-zaman grafiği ve **b)** akım-zaman grafiğinden elde edilen akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (-0,4 V; 0,1 M pH 7 fosfat tamponu, 25 °C)

Şekil 4.15'ten de görülebileceği gibi, hazırlanan elektrot ile artan glikoz konsantrasyonu sonucu ölçülen akım da aynı oranda artmaktadır. YBCE/PAN-TH-NFs/PTH/GOx biyosensörüne ait kalibrasyon grafiğinin $y=3,4694x+0,1541$ ($R^2=0,9929$) eşitliğine göre doğrusal aralığı 0,01-0,7 mM ve bu denklemden elde edilen duyarlılık değeri de $65,45 \mu A/mM.cm^2$ olarak bulunmuştur. Tez kapsamında PAN-TH-NFs/PTH nanoliflerinin immobilizasyon matrisi olarak kullanılması ile literatürde yaygın olarak kullanılan bir iletken polimer olan polipirole ($33,24 \mu A/mM.cm^2$) (Liv d. 2007) veya aynı medyatörün polimer film formuna ($24,60 \mu A/mM.cm^2$) (Ghica ve Brett 2014) kıyasla oldukça yüksek duyarlılık elde edilmiştir. Bu durum sadece kullanılan iletken polimerin türü ile ilgili değil, aynı zamanda yüzey alanını arttırması beklenen nanolifin morfolojisi ile de ilgilidir. Ancak bu sonuçlar YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü (elektrokimyasal polimerizasyon olmadan) ile karşılaştırıldığında, benzer doğrusal aralığa sahip olunmasına rağmen, elektrokimyasal polimerizasyonun duyarlılık açısından olumsuz bir etki sergilediği açıkça görülmektedir. Bu tür bir davranış, SEM görüntülerinden de görülebileceği gibi elektrotun yüzey alanındaki azalma ile ilgili olabilir (Şekil 4.14). Bu durumu kanıtlamak için YBCE/PAN-TH-NFs/PTH/GOx ve YBCE/PAN-TH-NFs/GOx ile tarama hızı çalışması yapılmıştır. Bu amaçla elektrotların her ikisine de 100'er mikrolitre 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi damlatılmış ve farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100 ve 125 mV/s) döngüsel voltamogramları alınmıştır. YBCE/PAN-TH/PTH-NF elektrotu için sırasıyla Şekil 4.16a ve 16b'de; YBCE/PAN-TH-NF elektrotu için ise 4.16c ve 4.16ç'de verilmiştir. Akım değerlerinin tarama hızına ve tarama hızının kareköküne karşı çizilen bu grafikler değerlendirildiğinde, her iki elektrot için de akıma karşı tarama hızı grafiğinin daha doğrusal olmasına dayanarak, TH'nin nanolif kaplı elektrot üzerinde bulunduğu ve sürecin yüzey kontrollü olduğu sonucuna varılmıştır. Yüzey kontrollü proses için, YBCE'lerin yüzeyindeki TH cinsinden elektroaktif türlerin ortalama yüzey konsantrasyonu, (Γ), Laviron denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (Bard ve Faulkner 2001).



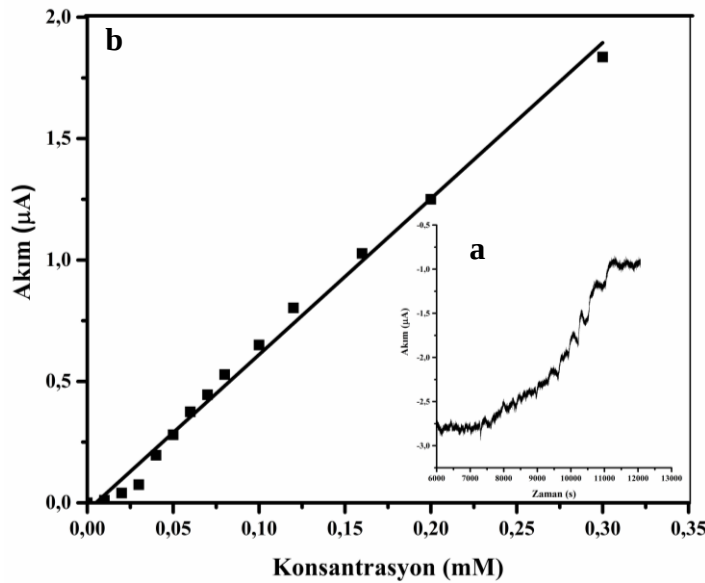


Şekil 4. 16. YBCE/PAN-TH-NFs/PTH elektrotu için farklı tarama hızlarında elde edilen akım değerlerinin **a)** tarama hızının kareköküne; **b)** tarama hızına karşı grafiği; YBCE/PAN-TH-NF elektrotu için farklı tarama hızlarında elde edilen akım değerlerinin **c)** tarama hızın kareköküne; **ç)** tarama hızına karşı grafiği (1 mM $K_3Fe(CN)_6$, 10-125 mV/s tarama hızı, 25 °C)

YBCE/PAN-TH-NF elektrotu ile YBCE/PAN-TH/PTH-NF elektrotu için hesaplanan yüzey konsantrasyon değerleri sırasıyla $6,81 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^2$ ve $1,55 \times 10^{-9} \text{ mol.cm}^2$ olarak bulunmuş olup TH polimerizasyonu ile yüzey alanının bir miktar değiştiği görülmüştür. Bununla birlikte, YBCE/PAN-TH/PTH-NF/GOx sensörünün daha düşük duyarlılık göstermesi elektrot kalınlığının artması ile de ilişkilendirilmiştir.

4.1.2.7. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörüne MWCNT etkisinin değerlendirilmesi

Bilindiği gibi grafen, karbon nanotüpler, altın nanopartiküller gibi çeşitli nanomalzemelerin kullanımı, yüksek iletkenlikleri sayesinde enzim ile elektrot arasındaki elektron transferinin hızlanması ve elektrot yüzey alanının artması nedeniyle daha yüksek hassasiyette biyosensörlerin tasarlanmasına olanak sağlamaktadır. Bu amaçla literatürce biyosensör performansı üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu bilinen MWCNT'nin elektro-eğirme çözeltisine eklenmesi ile nanolif kaplı elektrotlar daha sonra da glikoz biyosensörü (YBCE/PAN-MWCNT-TH-NFs/GOx) hazırlanmıştır. Tasarlanan bu biyosensör ile -0,40 V'da 0,1 M pH 7,0 PBS'de kronoamperometri çalışması yapılmıştır (Şekil 4.17). Kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanan duyarlılık ve lineer aralık değerleri sırasıyla $121,17 \mu\text{A/mM.cm}^2$ ve 0,01-0,30 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.17. YBCE/PAN-MWCNT-TH-NFs/GOx biyosensörü için **a)** akım-zaman grafiği ve **b)** akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (-0,4 V; 0,1 M pH 7 fosfat tamponu, 25°C)

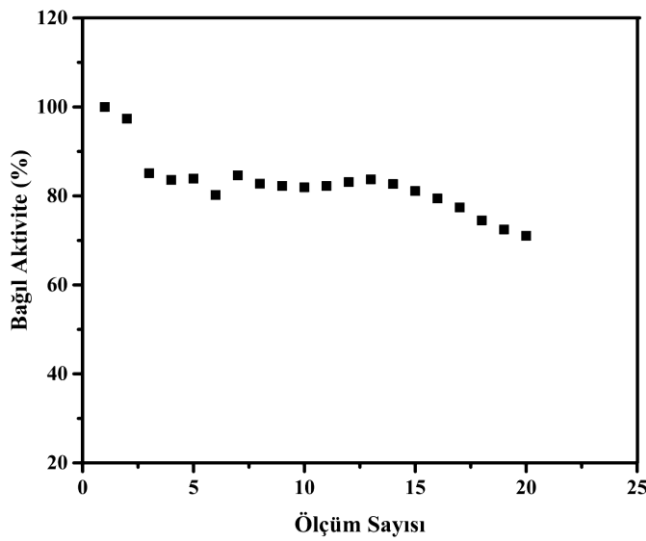
Söz konusu analitik performans, tez çalışmasının ilk bölümünde tasarlanan YBCE/PAN-TH-NFs/GOx ile karşılaştırıldığında lineer aralığın daraldığı ancak duyarlılık açısından önemli bir değişim olmadığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, yüksek performanslı bir biyosensör için medyatör ve MWCNT'nin birlikte kullanılmasının gerekli olmadığı, yani yalnızca aracı kullanıldığında bile çok yüksek bir duyarlılığın

elde edildiği sonucuna varılmıştır. Böylece ucuz bir polimeri çok az miktarda medyatör ile birleştirerek literatüre göre çok daha iyi sonuçlar veren, altın nanopartiküller gibi pahalı nanomalzemeler içeren biyosensörlerle aynı hatta daha da iyi noktaya gelinmiştir.

Tüm bu gözlemlere dayanarak, PAN nanolifin içinde moleküler formda TH kullanımının MWCNT veya elektrokimyasal polimerizasyon kullanımına göre çok daha avantajlı olduğu sonucuna varılabilir. Bu nedenle, TH biyosensörlerinin ticari kullanılabilirliğine yönelik testler (kararlılık, girişim testi, gerçek numune analizi gibi) YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörü ile gerçekleştirilmiştir.

4.1.2.8. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörünün kararlılık çalışması

YBCE/PAN-TH-NFs/GOx enzim elektrotlarının kararlılığının değerlendirilmesi için oda koşullarında, bir gün içerisinde arka arkaya 20 adet kronoamperometri çalışması yapılmıştır (Şekil 4.18). Bu çalışmalar sonucunda RSD değeri %8,27 (n=20) olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.18'dende görüldüğü üzere YBCE/PAN-TH-NFs/GOx elektrodu yüksek kullanım kararlılığı göstermiş olup 20. kullanımda bile %71,04 aktivite göstermektedir. Yüksek bağıl aktivite göstermesinin sebebinin nanoliflerin sağladığı gözenekli yapının enzim immobilizasyonu sonrasında enzimi aktivite kaybı olmadan koruyabildiğini düşündürmüştür.

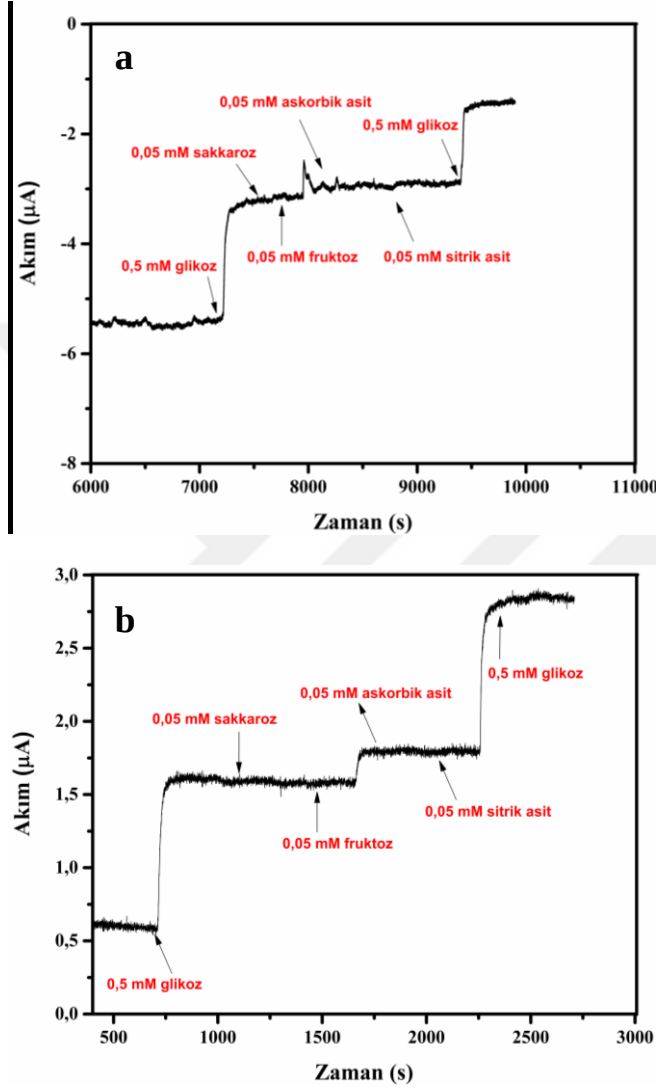


Şekil 4.18. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörünün kullanım kararlılığı (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, -0,4 V, 0,5 mM glikoz, 25 °C)

4.1.2.9. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörlerinde girişim etkisi ve gerçek numune analizleri

H₂O₂ yükseltgenmesinin takibinde kullanılan glikoz biyosensörleri, girişim yapan türlere duyarlı olabilir. Tez çalışmasının bu kısmında, girişim yapan türlerin biyosensörün performansı üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Medyatörün çalışma potansiyeli olan -0,4 V'ta, çalışma hücrelerine glikoz dışında diğer türlerin eklenmesiyle elde edilen grafik Şekil 4.19a'da, hidrojen peroksitin

yükseltgenme potansiyeli olan +0,7 V'ta çalışma hücrelerine glikoz dışında diğer türlerin eklenmesiyle elde edilen grafik Şekil 4.19b'de yer almaktadır. Şekil 4.19a incelendiğinde, fruktozun %8,11, oranında girişim yaptığı askorbik asit, sitrik asit ve sakkarozun ise kayda değer bir oranda girişim yapmadığı tespit edilmiştir. Şekil 4.18b'de ise askorbik asitin %19,78 oranında girişim yaptığı sitrik asit, sakkaroz ve son olarak da fruktozun ise kayda değer bir oranda girişim yapmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.19. YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörünün **a)** -0,4 V ve **b)** +0,7 V çalışma potansiyelindeki girişim yapan türlere etkisi (-0,4 V; 0,1 M pH 7 fosfat tamponu, 25°C)

Geliştirilen bu nanolif temelli biyosensörler, gerçek numunelerin analizinde kullanılmıştır. Seyreltilmiş meyve suyu numunelerinin amperometrik tayini hem -0,4 V'da hem de +0,7 V'da YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörleri ile yapılmıştır. -0,4 V'ta yapılan çalışmada vişne suyu ve kayısı numunesi 1:10 oranında karışık meyve suyu ise 1:5 oranında seyreltilmiş olup +0,7 V'da gerçekleştirilen çalışmada ise meyve sularına herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Seyreltilmiş veya direkt kullanılan

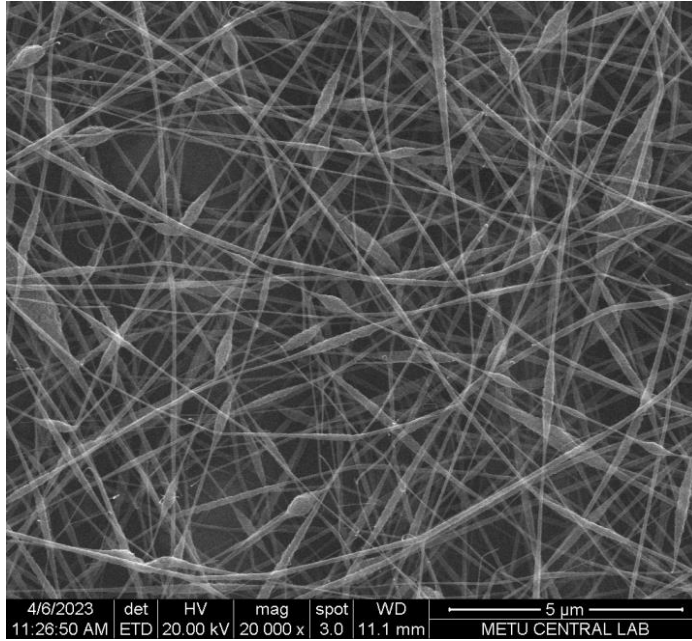
meyve sularının çalışma hücreğine eklenmesi sonucunda ölçülen akım değerlerine denk gelen geri kazanım değerleri, kalibrasyon grafiğinin denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. Gerçekleştirilen çalışma sonucunda elde edilen sonuçların referans metot ile oldukça tutarlı olduğu görülmüştür (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Meyve sularında glikoz tayini

Örnek	Cappy vişne	Cappy karışık	Cappy kayısı
YBCE/PAN-TH-NFs/GOx (-0,4 V)	%100,66	%101,49	%99,80
YBCE/PAN-TH-NFs/GOx(+0,7 V)	%98,05	%99,86	-

4.1.3. YBCE/PAN-MB-NFs /GOx biyosensörü ile ilgili çalışmalar

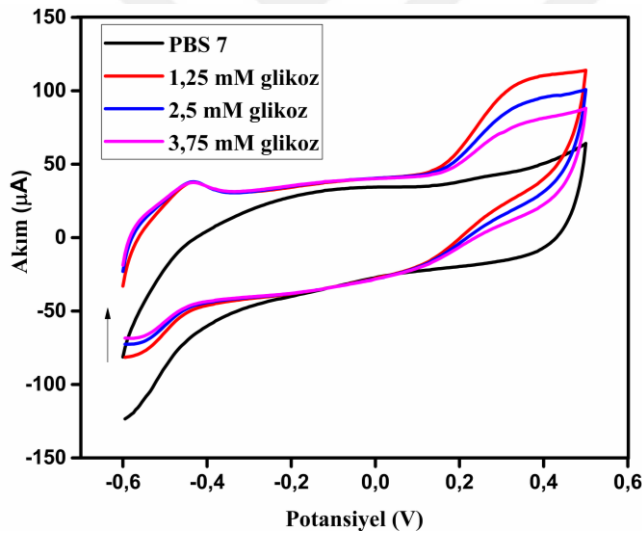
YBCE’ler üzerinde PAN-metilen mavisi nanoliflerinin (YBCE/PAN-MB-NFs) elde edilmesi amacıyla ilk olarak, literatürdeki medyatör konsantrasyonları göz önünde bulundurularak %4 PAN-DMF ve 0,5 mM MB içeren bir çözelti hazırlanmış ve daha sonra da YBCE’ler üzerinde daha önceki PAN-TH-NFs elektrodu için geçerli olan şartlarda nanolif eldesi sağlanmıştır. Elde edilen nanoliflerin morfolojisi SEM ile doğrudan lif matrisi üzerinden incelenmiş (Şekil 4.20) ve lif çapı yaklaşık 185 ± 4 nm olarak hesaplanmıştır.



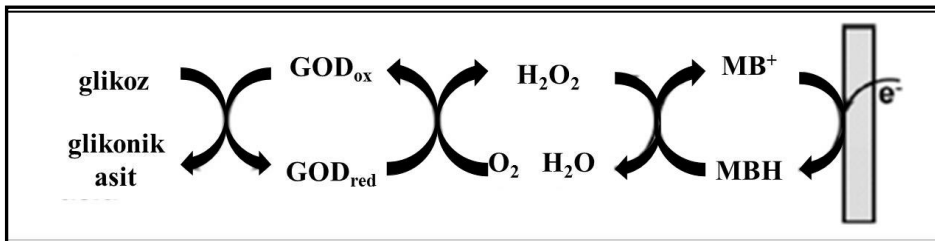
Şekil 4.20. PAN-MB-NFs’lerine ait SEM görüntüsü

4.1.3.1. Elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi

Hazırlanan elektrotlar elektrokimyasal olarak incelenmiştir. Şekil 4.21, YBCE üzerine kaplanan PAN-MB-NFs'e ait pH 7,0 0,1 M PBS ortamında ve ortama art arda eklenen 1,25 mM glikoz ilavesi sonrası elde edilen döngüsel voltamogramları göstermektedir. Ortamda glikozun olmadığı durumda neredeyse hiçbir redoks piki görülmemektedir bu da glikoz oksidazın, redoks merkezini çevreleyen kalın bir protein tabakası nedeniyle elektronları doğrudan elektrota aktaramadığını ifade etmektedir. Ortama glikozun ilave edilmesi ile birlikte, MB'ya ait olduğu düşünülen yaklaşık -0,4 V'ta bir yükseltgenme piki ve buna karşılık -0,5 V'da da bir indirgenme piki gözlemlenmiştir. Ayrıca artan glikoz konsantrasyonlarına meydana gelen yükseltgenme pik akımındaki artış ve indirme pik akımındaki negatif yöndeki artışın MB'nin etkisi ile elektrot yüzeyine olan elektron transfer hızının artmasına ve H_2O_2 'nin indirgenmesinin katalizlenebilmesine atfedilir. Elde edilen bu sonuçların, literatürdeki bazı çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür (Cetin ve Camurlu 2017). H_2O_2 'nin tayinine yönelik mekanizma Şekil 4.22'de ifade edilmiştir. Buna göre elektrotta ilk olarak medyatör (MB) indirgenir. Daha sonra medyatörün indirgenmiş formu (MBH), elektrotta oksitlenmiş formuna (MB^+) yeniden yükseltgenir ve glikoz konsantrasyonu ile orantılı bir amperometrik sinyal meydana gelmiş olur.

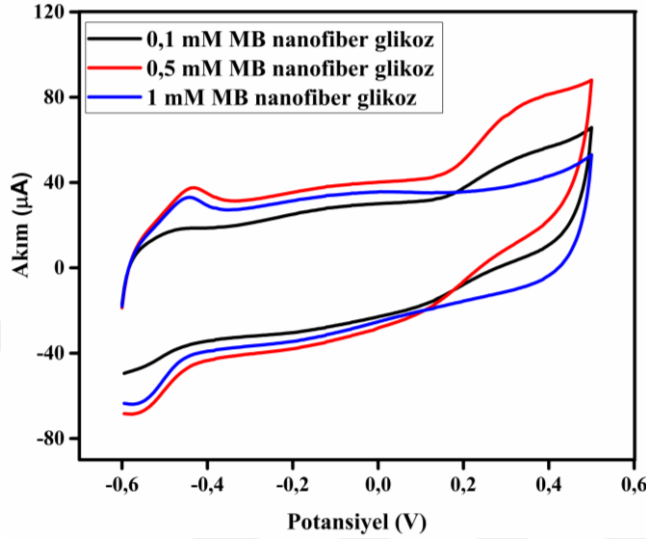


Şekil 4.21. YBCE-PAN-MB-NFs/GOx biyosensörünün 50 mV/s tarama hızındaki döngüsel voltamogram (0,1 M pH 7,0 PBS, 25 °C)



Şekil 4.22. MB medyatörünün glikoz tayininde kullanımına ait tayin mekanizması

Şekil 4.23’de ise farklı konsantrasyonlarda hazırlanan her bir PAN-MB-NFs elektrotuna 0,1 M pH 7,0 PBS ortamına 1,25 mM glikoz eklemesi sonrası elde edilen döngüsel voltamogramlar gösterilmektedir. Döngüsel voltamogramlar değerlendirildiğinde, MB oksidasyonuna ait olan en yüksek pik akımının 0,5 mM MB konsantrasyonunda elde edildiği görüldüğü için bundan sonra yapılan çalışmalarda 0,5 mM MB kullanılmıştır.



Şekil 4.23. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan YBCE-PAN-MB-NFs/GOx biyosensörlerine ait 50 mV/s tarama hızındaki döngüsel voltamogramlar (0,1 M pH 7,0 PBS, 25 °C)

4.1.3.2. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörü için uygun çalışma koşullarının belirlenmesi

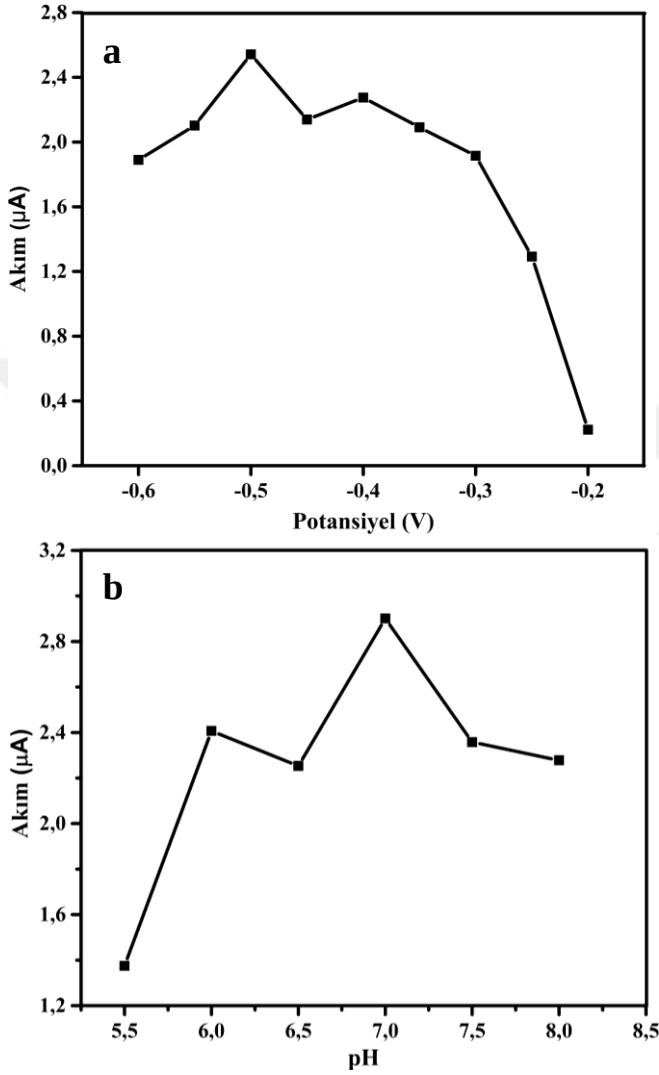
i) Optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Daha önceden belirtilen şartlarda hazırlanan YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörlerinin optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi Şekil 4.21’deki döngüsel voltamogramlar dikkate alınarak belirlenen potansiyellerde (-0,6 ile -0,2 V arasında), sabit 0,5 mM glikoz konsantrasyonuna karşılık gelen akım şiddetlerinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu bağlamda, 9 farklı potansiyeldeki akım değişimlerinin potansiyele karşı çizilmesiyle elde edilen grafik Şekil 4.24a’da gösterilmiştir. Substrat olan glikoz için en yüksek akım değeri -0,5 V da ölçüldüğü açıkça görülmektedir. Ancak bu potansiyel uygulanarak yapılan çalışmalarda tekrarlanabilir bir şekilde glikozu karşı cevap alınamaması nedeniyle literatürde yaygın olarak kullanılan -0,35 V, optimum çalışma potansiyeli olarak belirlenmiştir (Pakapongpan vd. 2012).

ii) Ortam pH’ının optimizasyonu

Optimum çalışma potansiyeli belirlendikten sonra, daha önceden belirtilen şartlarda hazırlanan YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörlerinin optimum pH’ının

belirlenmesi Şekil 4.24b’de gösterilen 6 farklı pH değerlerinde (5,5-8,0) 0,1 M PBS kullanılarak sabit -0,35 V çalışma potansiyelinde 0,5 mM glikoz konsantrasyonuna karşılık gelen akım şiddetleri ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Substrat olan glikoz için en yüksek akım değeri pH 7,0’da elde edildiği için bundan sonraki çalışmalarda kullanılacak olan pH değeri 7,0 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.24. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörü için akım değişimine karşı uygulanan **a)** potansiyel ve **b)** pH grafiği (oda koşullarında, 0,5 mM için, 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C)

iii) Optimum elektro-eğirme süresinin belirlenmesi

Uygun elektro-eğirme süresinin belirlenmesi amacı ile daha önce belirtilen bileşimdeki PAN-MB çözeltisi kullanılarak Çizelge 4.7’de belirtilen sürelerde elektrotlar hazırlanmıştır. Ardında da daha önce optimize edilen şartlarda biyosensörler hazırlanmıştır ve hem -0,35 V’da hem de +0,7 V’da kronoamperometri çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7’de listelenmiştir. Çizelge incelendiğinde

en yüksek duyarlılık, 20 dk eğirme süresi ile hazırlanan biyosensörlerle elde edildiği için eğirme süresi bundan sonraki deneyler için 20 dk olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörü için elektro-eğirme süresi ve analitik performans ilişkisi

Elektro-eğirme süresi (dk)	Lineer aralık (mM)	Duyarlılık ($\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$)
11	0,01-0,6	80,47 (-0,35 V)
	0,01-2,2	43,00 (+0,7 V)
20	0,01-0,5	110,8 (-0,35 V)
	0,01-2,2	51,1 (+0,7 V)
30	0,01-0,5	92,20 (-0,35 V)
	0,01-2,2	50,30 (+0,7 V)

iv) Medyatör miktarı optimizasyonu

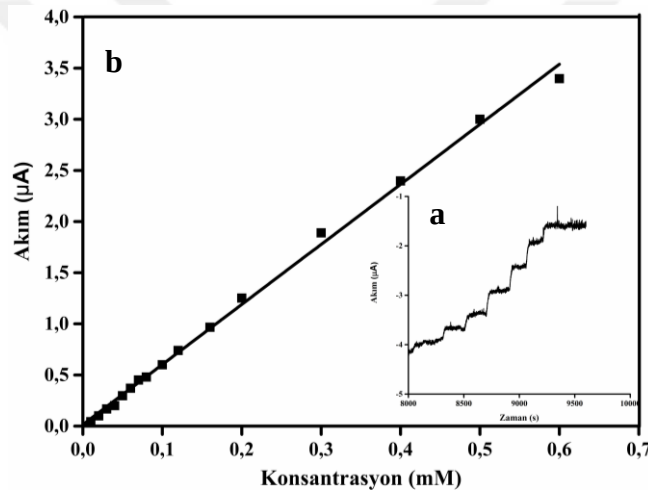
Çeşitli konsantrasyonlarda MB içeren (0,25 mM, 0,50 mM ve 1 mM) PAN-MB çözeltileri ile nanolifler hazırlanmış ve daha önce belirtilen şartlarda biyosensörler hazırlanmıştır. Daha sonra hem -0,35 V'da hem de +0,7 V'da kronoamperometri çalışması yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.8'de sunulmuştur. Çizelgeden görülebileceği gibi her iki potansiyelde elde edilen duyarlılıkların en yüksek olduğu koşul sebebiyle 0,50 mM optimum medyatör miktarı olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörü için medyatör miktarı ve analitik performans ilişkisi

Medyatör miktarı (mM)	Lineer aralık (mM)	Duyarlılık ($\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$)
0,25	0,01-0,7	92,66 (-0,35 V)
	0,01-2,2	36,17 (+0,7 V)
0,50	0,01-0,5	110,77 (-0,35 V)
	0,01-2,2	51,08 (+0,7 V)
1,00	0,01-0,6	82,00 (-0,35 V)
	0,01-2,2	37,50 (+0,7 V)

4.1.3.3. Kronoamperometri çalışmaları

Substrata karşı medyatör etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla -0,35 V'da, 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu ile kronoamperometri çalışması yapılmıştır. Şekil 4.25a'da ilgili çalışmanın glikoz eklemesi sırasında kayıt edilen akıma karşı zaman grafiğini ve Şekil 4.25b ise amperometrik analiz sonucu elde edilen kalibrasyon grafiğini göstermektedir. Şekil 4.25a'dan görülebileceği gibi, kararlı halde bulunan sisteme glikoz ilavesinden sonra akım H_2O_2 'nin üretilmesine ve oksidasyonun başlamasına bağlı olarak belirli oranda artmış ve sistemin doymuş hale gelmesi sonucunda akım çok fazla değişmemiş ve sistem lineerlikten sapmaya başlamıştır. Buna göre, elde edilen kalibrasyon grafiğine bakıldığında, biyosensörün glikoza karşı verdiği cevabın konsantrasyonla doğru orantılı bir şekilde arttığı görülmektedir. Ayrıca LOD değeri biyosensörün lineer olarak çalıştığı aralık ve duyarlılık değerleri kullanılarak hesaplanmış ve Çizelge 4.9'da listelenmiştir. Son olarak Lineweaver-Burk eğrisinden hesaplanan K_m ve I_{max} değerleri sırasıyla 9,21 mM ve 1,21 μA olarak bulunmuştur.



Şekil 4.25. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörü için **a)** akım-zaman grafiği ve **b)** akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (-0,35 V; 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25°C)

Çizelge 4.9. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörü biyosensörünün analitik performansı

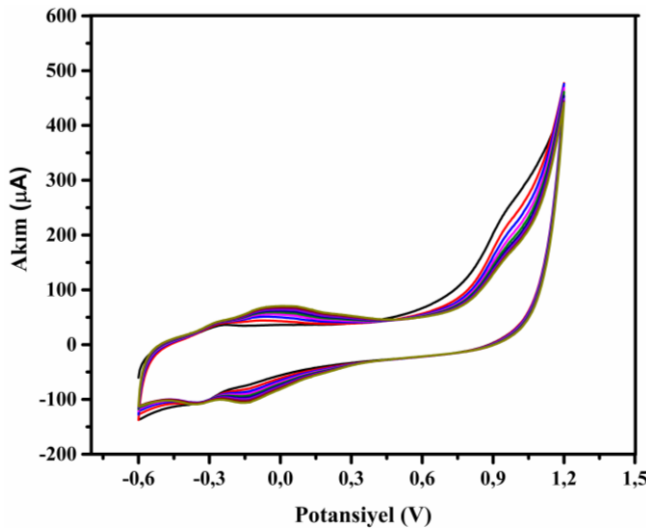
LOD (μM)	Lineer aralık (mM)	Duyarlılık ($\mu A/mM.cm^2$)
1,33	0,01-0,6	110,8

Literatürdeki medyatör MB'yi glikoz tayininde kullanımını içeren biyosensörler, tezde hazırlanan YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörü ile kıyaslandığında; bu biyosensörlerin yüksek duyarlılık ve düşük LOD değerine sahip olduğu görülmüştür. H_2O_2 tayinine yönelik bir çalışma tasarlayan Yao ve arkadaşları 2005 yılında MB ve

silikon oksit tabanlı HRP biyosensörünün lineer aralığını 1×10^{-5} - $1,2 \times 10^{-3}$ M olarak, LOD değerini ise 4×10^{-6} M olarak bildirmişlerdir (Yao vd. 2005). Bu çalışma lineer aralık açısından daha geniş bir aralığa sahip olmasına rağmen tez kapsamında elde edilen LOD değerine göre yaklaşık 4 kat daha yüksek bir değer bildirilmiştir. Zhang ve arkadaşlarına ait bir çalışmada ise, camı karbon elektrot üzerinde katyonik formdaki metilen mavisi (MB^+)/ $KLaNb_2O_7$ kompoziti ile geliştirdikleri glikoz biyosensörünün lineer aralık ve LOD değerini sırasıyla $2,5 \times 10^{-5}$ ile $2,83 \times 10^{-5}$ M ve 2×10^{-5} olarak hesaplanmıştır (Zhang vd. 2014). MB^+ 'yi elektron transfer aracı olarak kullanan bir başka çalışma Zhang ve arkadaşları tarafından bildirilen Au elektrot ile MWCNT-MB nanokompozitini içeren biyosensörün lineer aralık değeri, duyarlılığı ve LOD değerinin sırasıyla 4 μ M-3,78 mM, 22,5 μ A/mM ve 1 μ M olarak hesaplamışlardır. Görüldüğü üzere medyatör temelli nanolif biyosensörleri kullanarak tasarlanan YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörünün hiçbir iletken materyal kullanılmamasına rağmen nanoliflerin sağladığı yüksek yüzey alanına ve medyatörün elektron transfer hızını arttırmasına bağlı olarak glikozun hassas bir şekilde tayinine uygun biyosensörler geliştirilmiştir.

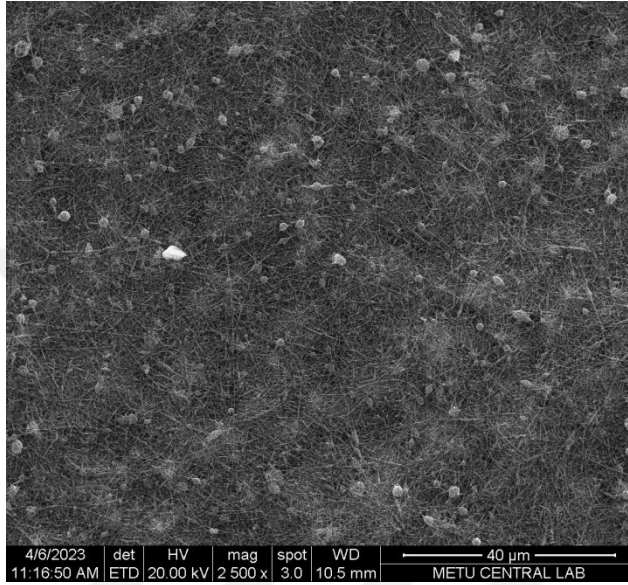
4.1.3.4. YBCE/PAN-MB-NFs/PMB/GOx biyosensörüne ait kronoamperometri çalışmaları

YBCE'ler üzerinde hazırlanan medyatör katkılı nanoliflere polimerizasyonun etkisini incelemek için, monomer olan MB^+ 'nin optimum olarak belirlenen konsantrasyonu elektrot üzerine damlatılması ile elektrokimyasal polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Elektropolimerizasyon, -0,6 - +1,2 V potansiyel aralığında 100mV/s tarama hızında 10 döngü döngüsel voltametri yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.26). Bu çalışmada elde edilen voltamogram, 2011 yılında De Cruz ve diğerleri tarafından elde edilen döngüsel voltamogramlarla uyumludur.



Şekil 4.26. MB^+ 'nin YBCE üzerindeki elektropolimerizasyonun döngüsel voltamogramları (0,1 M KCl içeren pH 7,0 0,1 M fosfat tamponunda 0,5 mM MB^+ monomer çözeltisinde, 100 mV/s tarama hızında, 10 döngü)

Şekil 4.26'ya göre, ilk olarak monomerin yükseltgenmesine atfedilen yaklaşık 0,9 V'da bir pik gözlenmiştir. -0.15 V'da yeni bir indirgeme piki (polimerin indirgenmesine atfedilen) ve yaklaşık 0 V'da da yeni bir oksidasyon piki (polimerin yükseltgenmesine atfedilen) meydana gelmiş ve bu pikler her döngüde artış göstermiştir. Bu, polimer filmin elektrot üzerinde oluştuğunu ve kalınlığının da döngü sayısının artması ile arttığını gösterir. Bu durum, gri nanolif matrisinin üzerinde mavi bir filmin gözlenmesi ile ve ayrıca SEM görüntülerinde de görülebildiği üzere kanıtlanmıştır (Şekil 4.27)

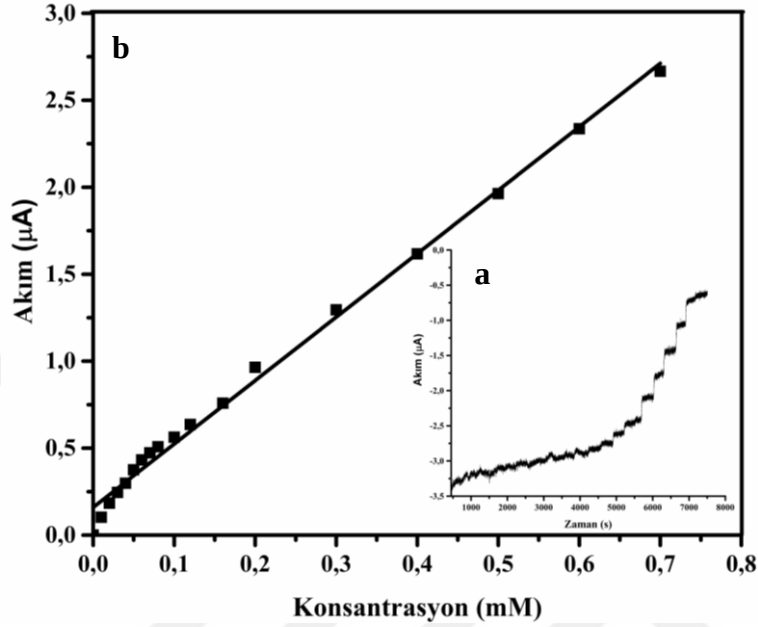


Şekil 4.27. PAN-MB-PMB-NFs'lerine ait SEM görüntüsü

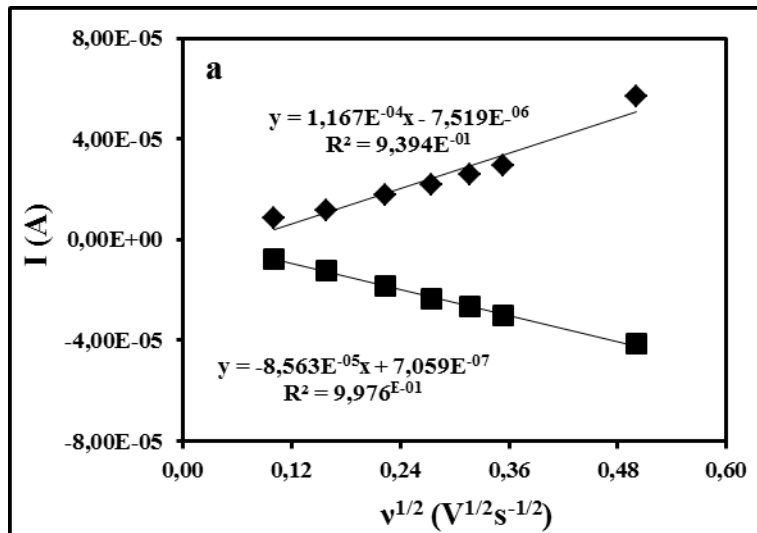
Nanolif kaplı YBCE'ler üzerinde elde edilen iletken filmin glikoza karşı olan duyarlılığının tespiti için daha önce belirtilen şartlarda biyosensörler hazırlanmış -0,35 V'ta kronoamperometri çalışması gerçekleştirilmiştir. Akıma karşı zaman grafiği ve bu grafikten elde edilen kalibrasyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.28a ve 4.28b'de verilmiştir. Kalibrasyon grafiği denklemi $y=3,6461x+0,1596$ ($R^2=0,9943$) şeklindedir. Bu denklemden hesaplanan duyarlılık değeri $68,79 \mu A/mM.cm^2$ ve biyosensörün lineer aralığı da 0,01-0,7 mM olarak belirlenmiştir. Polimerizasyon işlemi yapılmadan hazırlanan biyosensörün lineer aralıkları benzer olmasına rağmen duyarlılık değeri neredeyse yarısı kadar bir değerdir. Bu durumun nanolifin üzerinde elde edilen polimer filminin yüzey alanını azalttığı buna bağlı olarak da duyarlılık değerinin azaldığı düşünülmüştür. Bunu kanıtlamak YBCE/PAN-MB-NF ve YBCE/PAN-MB/PMB-NF elektrotları tarama hızı çalışmaları yapılmıştır.

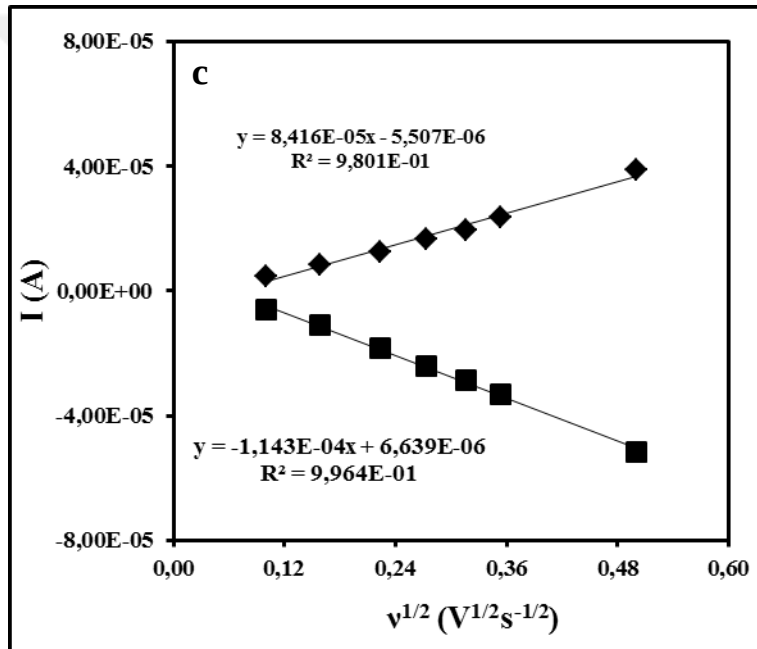
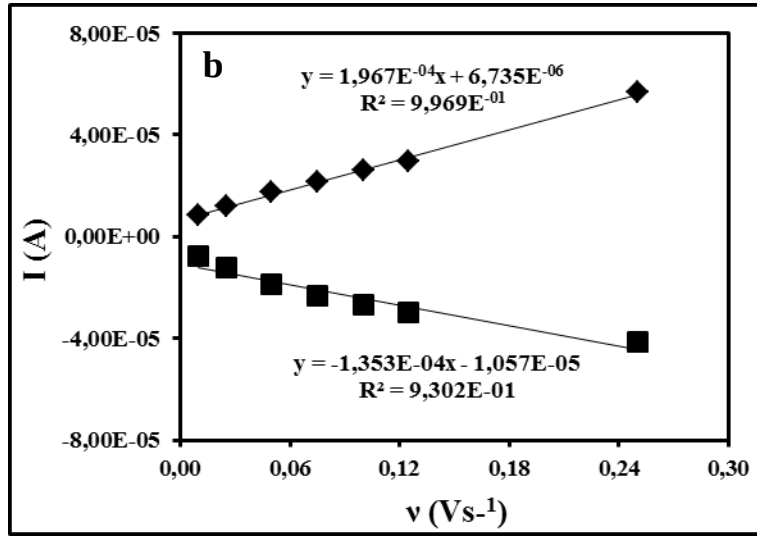
Bu amaçla elektrotların her ikisine de 100 mikrolitre 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi damlatılmış ve farklı tarama hızlarında (10, 25, 50, 75, 100 ve 125 mV/s) döngüsel voltamogramları alınmıştır. Akım değerlerinin tarama hızına ve tarama hızının kareköküne karşı çizilen grafikler YBCE/PAN-MB/PMB-NF elektrot için sırasıyla Şekil 4.29a ve 4.29b'de; YBCE/PAN-MB-NF elektrot için ise 4.29c ve 4.29ç'de verilmiştir. Grafikler incelendiğinde her iki elektrot için de akıma karşı tarama hızı

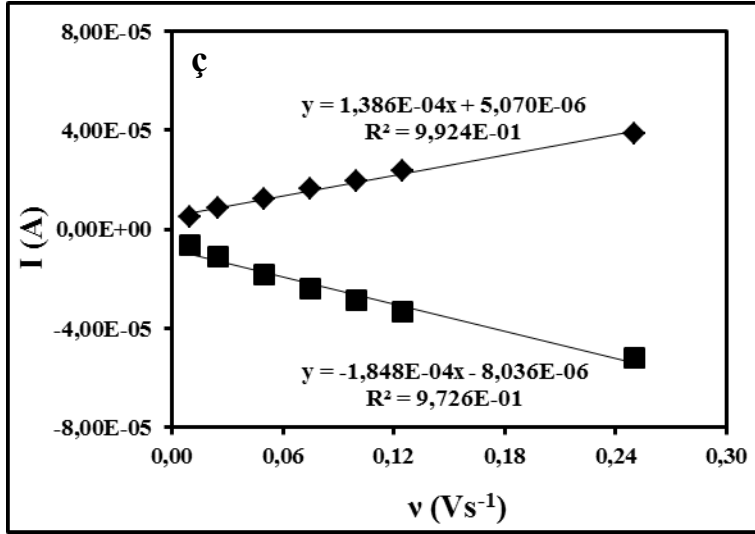
grafiğinin daha doğrusal olmasına dayanarak, MB'nin nanolif kaplı elektrot üzerinde bulunduğu ve sürecin yüzey kontrollü olduğu sonucuna varılmıştır. Yüzey kontrollü proses için, YBCE'lerin yüzeyindeki MB cinsinden elektroaktif türlerin ortalama yüzey konsantrasyonu, (Γ), Laviron denklemi kullanılarak hesaplanabilir (Bard ve Faulkner 2001).



Şekil 4.28. YBCE/PAN-MB-NFs/PMB/GOx biyosensörü için **a)** akım-zaman grafiği ve **b)** akım-zaman grafiğinden elde edilen akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (-0,35 V; 0,1 M pH 7,0 fosfat tamponu, 25 °C)





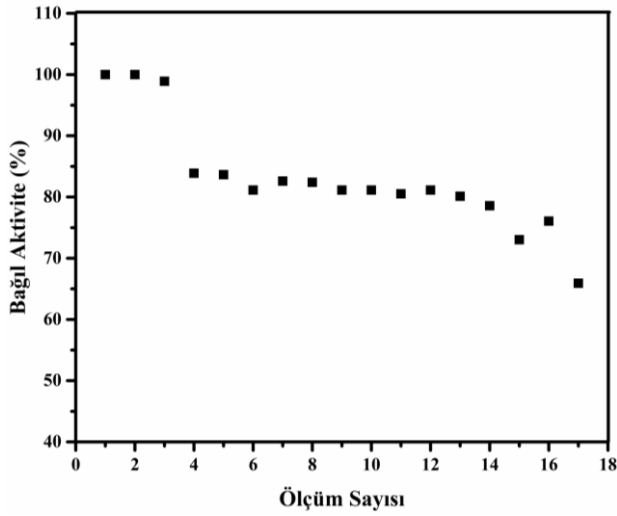


Şekil 4.29. YBCE/PAN-MB-NFs/PMB elektrotu için farklı tarama hızlarında elde edilen akım değerlerinin **a)** tarama hızının kareköküne; **b)** tarama hızına karşı grafiği; YBCE/PAN-MB-NF elektrotu için farklı tarama hızlarında elde edilen akım değerlerinin **c)** tarama hızının kareköküne; **ç)** tarama hızına karşı grafiği (1 mM $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$, 25 °C)

YBCE/PAN-MB-NF elektrotu ile YBCE/PAN-MB/PMB-NF elektrotu için hesaplanan yüzey konsantrasyon değerleri sırasıyla $1,54 \times 10^{-9} \text{ mol.cm}^2$ ve $2,18 \times 10^{-9} \text{ mol.cm}^2$ olarak bulunmuş olup MB polimerizasyonu ile yüzey alanında önemli bir değişiklik oluşmadığı anlaşılmıştır. Bununla birlikte, YBCE/PAN-MB/PMB-NF/GOx sensörünün daha düşük duyarlılık göstermesi elektrot kalınlığının artması ile ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak medyatörün nanolif matris içerisine dahil edilmesi ile geliştirilen biyosensörün (YBCE/PAN-MB-NFs/GOx) daha aktif olarak çalıştığı görülmüştür.

4.1.3.5. Kullanım kararlılığı

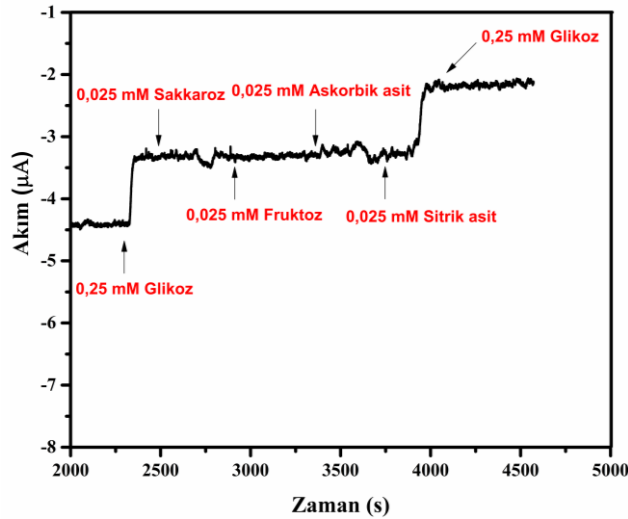
Şekil 4.30 YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörün aynı gün art arda yapılan amperometrik ölçümler sonrası elde edilen kararlılık çalışması göstermektedir. Şekil incelendiğinde, biyosensörün 17. ölçüm sonunda bile %65,92 oranında aktivitesini koruduğu görülmektedir. Bu durum biyosensörde başarılı bir immobilizasyon yönteminin kullanıldığını göstermektedir. Ayrıca bu grafikten elde edilen RSD değeri %10,95 ($n=17$) olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.30. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörünün kullanım kararlılığı (0,10 M pH 7,0 fosfat tamponu, -0,35 V, 0,5 mM glikoz, 25 °C)

4.1.3.6. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörlerinde girişim etkisi ve gerçek numune analizleri

Geliştirilen medyatör-nanolif temelli biyosensörler ile, doğru ve hassas glikoz ölçümüne engel olabilecek türlerin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma, optimum olarak belirlenen şartlarda çalışma hücresine glikoz dışındaki diğer türlerin (askorbik asit, sitrik asit, fruktoz ve sakkaroz) eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen grafik Şekil 4.31’de gösterilmiştir. Bu grafik incelendiğinde, sakkarozun %3,7, askorbik asitin %5,1 girişim yaptığı, sitrik asitin ve fruktozun ise önemli oranda girişim yapmadığı tespit edilmiştir. Bu durum seçilen çalışma potansiyelinin diğer türlerden etkilenmeden substratı tanıyabilecek oldukça seçici bir biyosensörün geliştirildiğinin bir göstergesidir.



Şekil 4.31. YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörünün -0,35 V çalışma potansiyelindeki girişim yapan türlere etkisi (-0,35 V; 0,1 M pH 7 fosfat tamponu, 25°C)

YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörlerinin ticari olarak uygulanabilirliğinin bir göstergesi olan gerçek numunelerin analizinde ise çeşitli meyve suları gerçek numune olarak kullanılmıştır. Meyve suyu numuneleri herhangi bir ön işleme uğramadan direk çalışma hücreğine eklenmiş ve -0,35 V sabit potansiyelde verdikleri akım değerleri ölçülmüştür. Ölçülen akım değerlerine denk gelen geri kazanım değerleri, kalibrasyon grafiğinin denklemleri kullanılarak hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.10'da verilmiştir. Elde edilen sonuçların referans metot ile oldukça tutarlı olduğu görülmüştür.

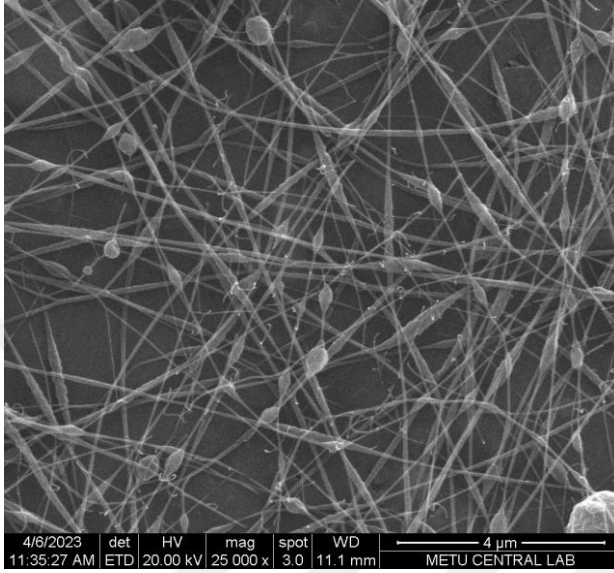
Çizelge 4.10. Meyve sularında glüköz tayini

Örnek	Cappy vişne	Cappy karışık
YBCE/PAN-MB-NFs/GOx	%100,65	%105,88

4.1.4. YBCE'ler üzerinde elde edilen PAN-Nötral Kırmızı nanoliflerine ilişkin bulgular

Tezin materyal ve metot bölümünde belirtildiği şekilde hazırlanan nanolif çözeltisi (%4 PAN ve 1 mM Nötral kırmızı (NR) medyatörü içeren) ile YBCE'ler üzerinde tutunabilen nanolif elde edilebilmesi için çeşitli koşullarda çalışmalar yapılmıştır. Tüm şartlar değerlendirildiğinde, YBCE'ler üzerinde en etkili nanolif elde etme koşulunun besleme hızı: 0,5 mL/dk, voltaj: 20 kV ve iğne ile toplayıcı arasındaki mesafe: 20 cm olduğu belirlenmiştir. Daha sonraki çalışmalar için bu koşullarda elde edilen elektrotlar kullanılmıştır. PAN-Nötral Kırmızı nanoliflerinin (PAN-NR-NFs) morfolojik incelenmesi SEM ile doğrudan lif matrisi üzerinden yapılmıştır. Kütlece %4

PAN ve 1 mM NR içeren nanoliflere ait SEM görüntüsü Şekil 4.32’de verilmiştir. Elde edilen bu nanoliflerin ortalama çapı 179 ± 3 nm olarak hesaplanmıştır. Medyator içermeyen PAN-NFs’ların nanolif çapı (312 ± 2 nm) ile karşılaştırıldığında NR medyatoru varlığında neredeyse 2 kat daha ince nanolifler elde edilmiştir. Tez çalışması kapsamında kullanılan medyatorların nanolif çaplarının genel sıralaması $NR > MB > TH$ şeklindedir.



Şekil 4.32. Kütüce %4 PAN ve 1 mM NR içeren nanoliflere ait SEM görüntüsü

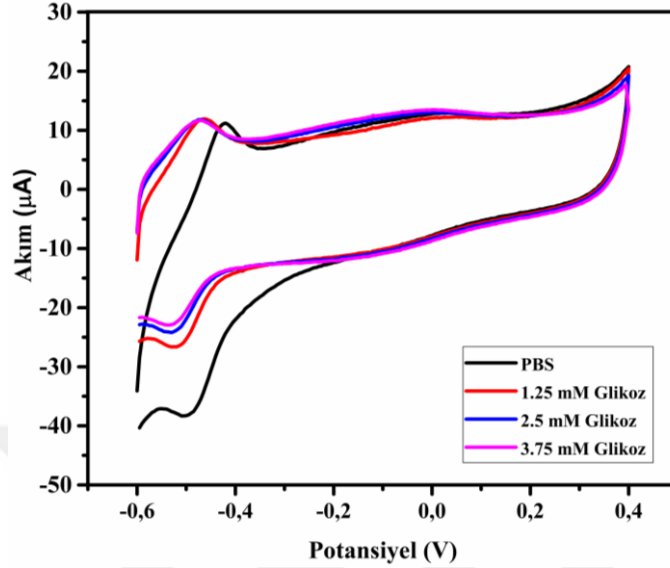
4.1.4.1. PAN-Nötral Kırmızı nanoliflerinin elektrokimyasal olarak incelenmesi

YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörlerinin glikoza karşı verdiği cevap ilk olarak döngüsel voltametri yöntemiyle incelenmiştir. Şekil 4.33, pH 7,0 0,1 M PBS ortamında art arda yapılan 1,25 mM glikoz ilavesi sonrası elde edilen döngüsel voltamogramları göstermektedir. Döngüsel voltamogramlar incelendiğinde, tampon çözeltisine glikoz ilavesi sonrası NR aracılığıyla glikozun enzim katalizli reaksiyonu ile açıklanabilen NR’ye ait yaklaşık -0,50 V’ta bir yükseltgenme piki ve buna karşılık yaklaşık yine -0,5 V’ta da bir indirgenme piki gözlemlenmiştir. Bu potansiyel, kofaktör FAD/FADH₂’nin redoks potansiyeline ve Choi ve arkadaşlarının hazırladıkları GOx/Tm₂O₃/Nafion/GC elektrotunda gözlemlenen potansiyel ile oldukça tutarlıdır (Choi vd. 2011). Glikoz konsantrasyonunun artmasıyla yükseltgenme pik akımının nispeten arttığı, indirgenme pik akımının ise negatif yönde arttığı görülmektedir. Reaksiyon mekanizması Eşitlik 4.1 ve 4.2’de gösterildiği gibidir:



Burada ilk olarak, glikoz varlığında GOx enziminin katalizlemesi sonucu NR indirgenirken glikoz da glikonik aside yükseltgenir. Daha sonra, elektronlar eşitlik 4.2’den de görülebileceği gibi elektrottan NR’ye aktarılır ve burada elektrot katot görevi

görür. İndirgenmiş formda bulunan NR, H_2O_2 'nin H_2O 'ya indirgenmesiyle yeniden yükseltgenir. Son olarakda elektrot, GOx tarafından üretilen bir ürün olan H_2O_2 'ye yanıt verir.

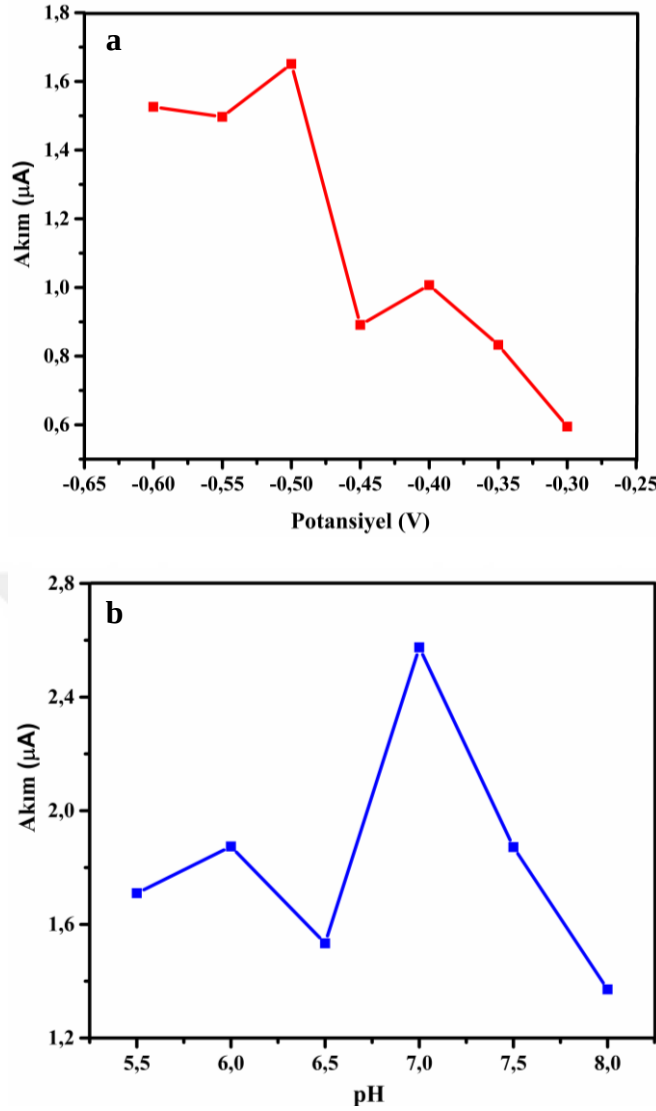


Şekil 4.33. YBCE/PAN-NR-NFs biyosensörüne ait döngüsel voltamogram (-0,6 V ve +0,4 V arasında, 50 mV/s tarama hızında, 25 °C)

4.1.4.2. YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörü için uygun çalışma koşullarının belirlenmesi

i) Optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Optimum çalışma potansiyelinin belirlenmesi amacıyla -0,6 V - -0,3 V arasında 7 farklı potansiyelde YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörlerinin gösterdiği akım şiddetleri ölçülmüş ve ilgili grafik Şekil 4.34a'da gösterilmiştir. Glikoz için en yüksek akım değerinin ölçüldüğü -0,5 V bundan sonraki çalışmalarda uygulanacak optimum potansiyel olarak belirlenmiştir.



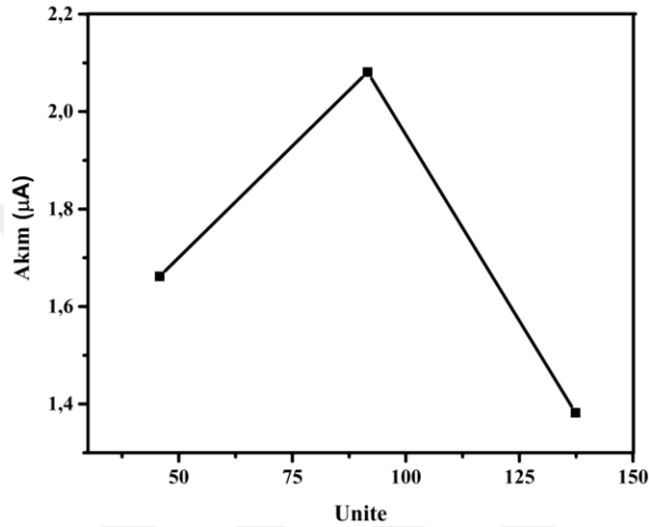
Şekil 4.34. YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörü için akım değişimine karşı uygulanan **a)** potansiyel ve **b)** pH grafiği (25 °C, 0,5 mM glikoz)

Ortam pH'nın hazırlanan biyosensörlerin aktivitesine etkisini incelemek amacıyla pH 5,5 ile 8,0 aralığında ayrı ayrı 6 farklı fosfat tamponu hazırlanmıştır. Her bir fosfat tamponuna daldırılmış olan elektrotlara -0,5 V sabit potansiyel uygulanmış ve akım sabit hale geldikten sonra 0,5 mM glikoz eklenerek kararlı haldeki akım değerleri ölçülmüştür. Ölçülen akım değişimleri değerleriyle ΔI 'e karşı pH grafiği çizilmiştir. Şekil 4.34b'deki grafikten görüleceği gibi en yüksek akım değeri pH 7,0'da elde edildiği için optimum pH 7,0 olarak belirlenmiştir.

ii) Enzim miktarı optimizasyonu

Nanolif matrisi kullanılarak yapılan çalışmalarda enzim miktarının optimizasyonunun oldukça önemli olduğu bildirilmiştir. Serbest enzime kıyasla nanolif matrisi üzerinde enzim miktarının artmasının, enzimlerin daha katı bir matris içerisine

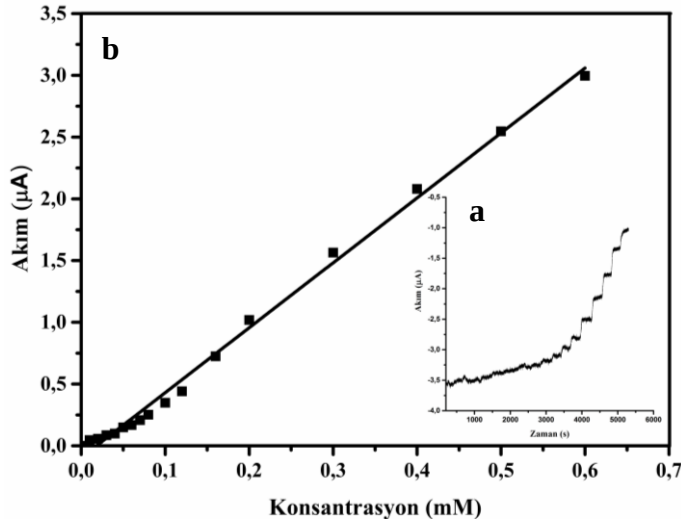
hapsedilmesinin bir sonucu olarak substrata erişiminin daha kısıtlı olduğu dahası enzim miktarının artmasıyla homojen lif morfolojinin bozulmasından dolayı lif çaplarının arttığı ve spesifik enzim aktivitesinde bir azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir (Moreno-Cortez vd. 2015, Balogh-Weiser vd. 2018). Bu nedenle tez çalışması kapsamında, PAN-NR-NFs elektrotları ile glikoz biyosensörlerinin hazırlanmasında kullanılan GOx enziminin optimizasyonu için 3 farklı ünite (45,79, 91,57 ve 137,37 U) enzim elektrotları hazırlanmış ve her bir elektrotla ayrı ayrı -0,5 V'da kronoamperometri çalışması yapılmıştır. Şekil 4.35'den de görülebileceği gibi optimum enzim miktarı 91,57 U olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.35. YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörü için enzim miktarı optimizasyon çalışması (0,5 mM glikoz, 25 °C)

4.1.4.3. Kronoamperometri çalışmaları

YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörlerinin substrat olan glikoza karşı duyarlılığının belirlenmesi amacıyla -0,5 V sabit potansiyelde, 0,1 M pH 7 PBS ile kronoamperometri çalışması gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.36a'da ilgili çalışmanın akıma karşı zaman grafiği ve Şekil 4.36b'de ise amperometrik analiz sonucu elde edilen kalibrasyon grafiği gösterilmektedir. Elde edilen kalibrasyon grafiğine bakıldığında, biyosensörün glikoza karşı verdiği cevabın konsantrasyonla doğru orantılı bir şekilde arttığı görülmektedir. LOD, biyosensörün doğrusal olarak çalıştığı aralık ve duyarlılık gibi çeşitli özellikleri hesaplanmış ve Çizelge 4.11'de listelenmiştir.



Şekil 4.36. YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörü için **a)** akım-zaman grafiği ve **b)** akım değişimine karşı-glikoz konsantrasyonu grafiği (-0,5 V; 0,1 M pH 7 fosfat tamponu, 25 °C)

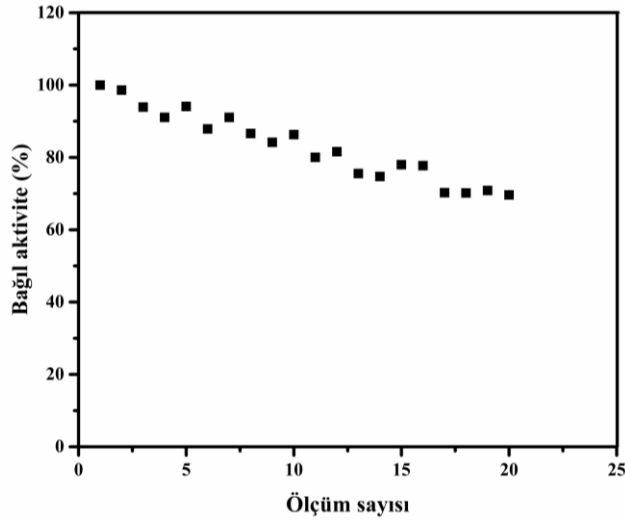
Tezde edilen bu bulgular literatür ile karşılaştırıldığında, YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörünün duyarlılığının ($99,19 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$) Choi ve arkadaşlarının yapmış olduğu grafit çubuk elektrot üzerinde nötral kırmızı monomerinin polimerleştirilmesiyle ve ardından da Nafion ekleyerek hazırladıkları glikoz biyosensörünün duyarlılığından ($1,58 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$) ve Barsan ve Brett (2009) selüloz asetat ve grafit kompozit elektrot üzerinde nötral kırmızı monomerinin polimerleştirilmesiyle hazırladıkları biyosensörün duyarlılığından ($31,5 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$) çok daha yüksek olduğu görülmüştür (Barsan ve Brett 2009 Choi vd. 2011).

Çizelge 4.11. YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörünün analitik performansı

LOD (μM)	Lineer aralık (mM)	Duyarlılık ($\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$)
0,068	0,01-0,6	99,19

4.1.4.4. Kullanım kararlılığı

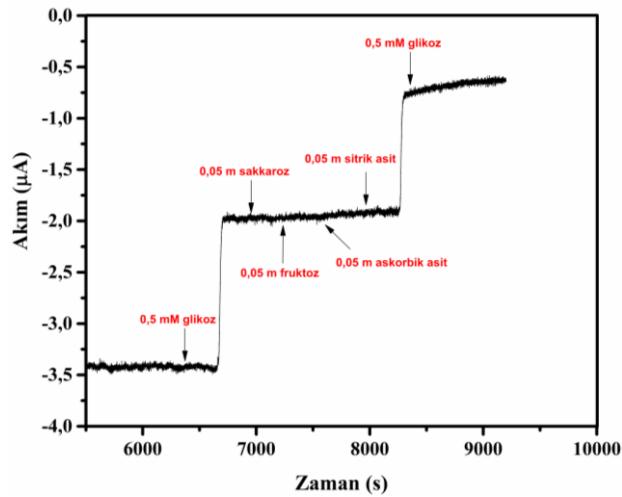
YBCE/PAN-NR-NFs/GOx enzim elektrotlarının kararlılığının değerlendirilmesi için oda koşullarında, bir gün içerisinde arka arkaya 20 kronoamperometri çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda RSD değeri %11,70 (n=20) olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.37’den de görüldüğü üzere, YBCE/PAN-NR-NFs/GOx elektrotu yüksek kullanım kararlılığı sergilemiş olup 20. kullanım sonunda bile aktivitesini %69,64 oranında korumuştur.



Şekil 4.37. SPCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörünün kullanım kararlılığı (0,10 M pH 7 fosfat tamponu, -0,5 V, 0,5 mM glikoz, 25 °C)

4.1.4.5. YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörlerinde girişim etkisi ve gerçek numune analizleri

Geliştirilen medyatör-nanolif temelli biyosensörler ile doğru ve hassas glikoz ölçümüne engel olabilecek türlerin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma, optimum olarak belirlenen şartlarda çalışma hücreesine glikoz dışındaki diğer türlerin (askorbik asit, sitrik asit, früktoz ve sakkaroz) eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen grafik Şekil 4.38’de gösterilmiştir. Bu grafik incelendiğinde, geliştirilen biyosensörün glikoz dışındaki diğer türlere herhangi bir tepki vermediği açık bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.38. YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörünün -0,5 V çalışma potansiyelindeki girişim yapan türlere etkisi (0,10 M pH 7 fosfat tamponu, -0,5 V, 0,5 mM glikoz, 25 °C)

YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörlerinin ticari olarak uygulanabilirliğinin bir göstergesi olan gerçek numunelerin analizinde ise çeşitli meyve suları gerçek numune örnekleri olarak kullanılmıştır. Meyve suyu numuneleri herhangi bir ön işleme uğramadan direk çalışma hücrelerine eklenmiş ve -0,5 V sabit potansiyelde verdikleri akım değerleri ölçülmüştür. Ölçülen akım değerlerine denk gelen geri kazanım değerleri, kalibrasyon grafiğinin denklemleri kullanılarak hesaplanmış olup sonuçlar Çizelge 4.12’de verilmiştir. Gerçekleştirilen çalışma sonucunda elde edilen sonuçların referans metot ile oldukça tutarlı olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.12. Meyve sularında glikoz tayini

Örnek	Cappy vişne	Cappy karışık
YBCE/PAN-NR-NFs/GOx	%100,37	%100,46

Tez kapsamında glikoz tayinine yönelik hazırlanan tüm glikoz oksidaz temelli biyosensörlerin analitik performansları Çizelge 4.13’de listelenmiştir. TH, MB ve NR medyatörlerinin ortama ilave edilmesinin yalın PAN-NFs matrisine kıyasla özellikle duyarlılık açısından oldukça olumlu yönde katkı yaptığı açıkça görülmektedir. Bu üç medyatörün duyarlılığı yaptığı katkı sıralaması TH>MB>NR şeklindedir. Bu durum literatür ile uyumludur.

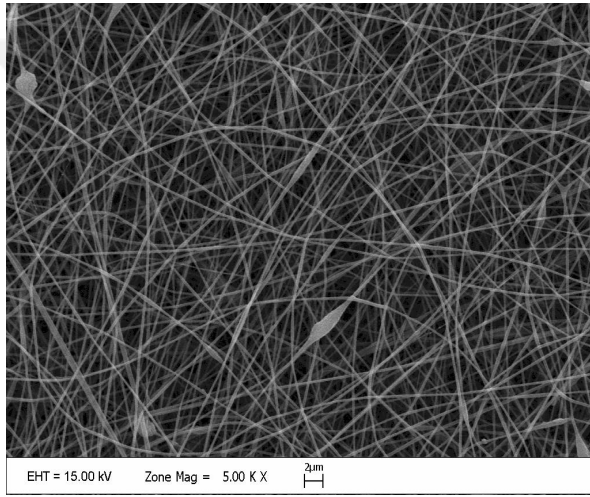
Çizelge 4.13. Tez kapsamında hazırlanan glikoz oksidaz temelli biyosensörlerin analitik performansları

Biyosensör	Lineer aralık (mM)	Duyarlılık ($\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$)	LOD (μM)	Km (μM)	I _{max} (μA)
YBCE/PAN-NFs/GOx	0,01-4,60	35,98	2,43	0,85	4,51
	5,0-15,0	4,99			
YBCE/PAN-TH-NFs/GOx	0,01-0,7	126,73 (-0,40 V)	1,17	2,70	22,59
	0,01-5,0	34,66 (+0,7 V)			
	6,0-13,0	11,53 (+0,7 V)			
YBCE/PAN-TH-NFs/PTH/GOx	0,01-0,7	65,45	-	-	-
YBCE/PAN-MWCNT/TH-NFs/GOx	0,01-0,3	121,17	-	-	-
YBCE/PAN-MB-NFs/GOx	0,01-0,6	110,80 (-0,35 V)	1,33	9,21	1,21
	0,01-2,2	51,08 (+0,7 V)			
YBCE/PAN-MB-NFs/PMB/GOx	0,01-0,7	68,79	-	-	-
YBCE/PAN-NR-NFs/GOx	0,01-0,6	99,19	0,068	-	-

4.2. Polifenol Oksidaz Temelli Biyosensörler

4.2.1. PAN-MWCNT nanoliflerine ilişkin bulgular

Tez çalışması kapsamında fenolik bileşiklerin tayininde kullanılmak üzere hazırlanan PAN-MWCNT-NFs (%7:0,7 oranı) matrisinin morfolojik incelemesi SEM görüntülemesi (Şekil 4.39) ile gerçekleştirilmiştir. Literatür verilerinde de yaygın olarak bildirildiği gibi, hazırlanan nanoliflerin yapısına MWCNT'lerin dahil edilmesiyle birlikte nanoliflerin kısmen boncuklu bir görünüme sahip olduğu tespit edilmiştir. Buradaki CNT'lerin konsantrasyonu literatürdeki çalışmalara (Cetin ve Camurlu 2017) göre seçilmiştir ve nanokompozit içerisindeki iletken element oranını artırmak için destekleyici polimer konsantrasyonu (%10 yerine) %7'ye düşürülmüştür. Böylece 170 ± 2 nm'ye kadar düşen fiber çapıyla yüzey alanı ve biyomolekül yüklemesi için kullanılabilir bölgeler artırılmıştır.

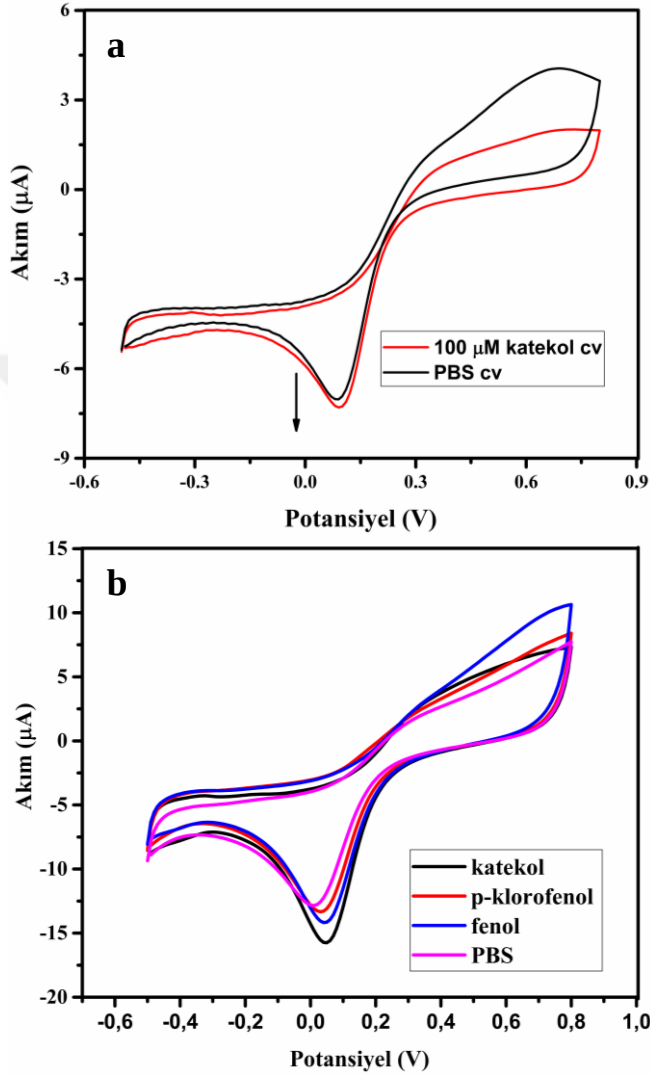


Şekil 4.39. PAN-MWCNT (%7:0,7) nanolifine ait SEM görüntüsü

4.2.1.1. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü ile katekolün elektrokimyasal analizi ve optimum parametrelerin belirlenmesi

Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörünün katekole gösterdiği elektrokimyasal davranış, döngüsel voltametri yöntemi kullanılarak araştırılmıştır (Şekil 4.40a). Voltamogram incelendiğinde, yaklaşık -0,1 V'da katekol ilavesi sonrası katekolün indirgenmesine atfedilen katodik pikte bir azalma meydana gelmiştir. Tez kapsamında substrat olarak kullanılacak diğer fenolik bileşiklerin de (p-klorofenol ve fenol) elektrokimyasal incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla -0,5 - +0,8 V potansiyel aralığında 100 mV/s tarama hızında ayrı 0,1 M pH 7,5 PBS ortamına substratlar eklenmiş ve döngüsel voltamogramları kayıt edilmiş (Şekil 4.40b) ve katodik akımda bir değişiminin ortaya çıktığı görülmüştür. Hazırlanan sensörün tayin ilkesi, fenolik bileşiğin (örn. katekol) enzimatik oksidasyonunu ve bunun sonucunda üretilen elektroaktif kinon türlerinin elektrokimyasal indirgenmesini içermektedir. Ayrıca, bu çalışmada PPO temelli biyosensör için yaygın olarak bildirilen hem mono- hem de difenol substratlar için Ag/AgCl'ye karşı 0,0 V, kronoamperometrik analiz için

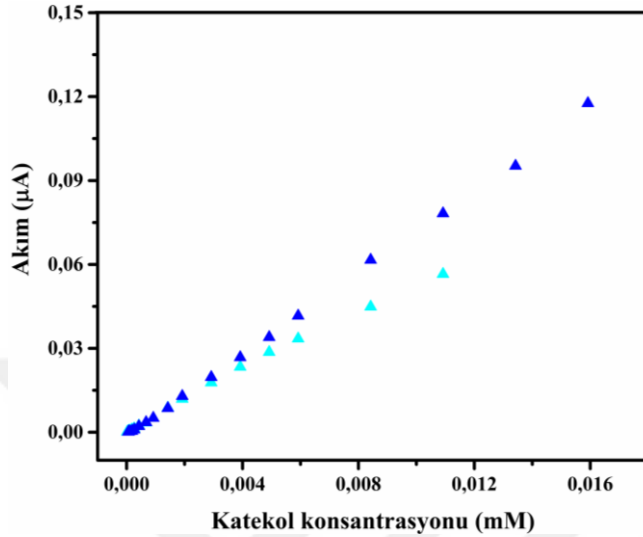
optimum potansiyel olabileceği düşünülmüştür. Şekil 4.40b'den de görülebileceği gibi indirgenme akımında meydana gelen artış sıralaması şu şekildedir: katekol>p-klorofenol>fenol. Bu nedenle, optimizasyon parametreleri ile ilerleyen bölümlerde tartışılacak olan girişim analizi, kararlılık çalışması ve raf ömrü analizi gibi çalışmalar için substrat olarak en yüksek cevabın alındığı katekol fenolik bileşiği kullanılmıştır.



Şekil 4. 40. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörünün **a)** 100 μM katekol ve **b)** katekol (100 μM), fenol and p-klorofenol (0,05 mM) ilavesi öncesi ve sonrası elde edilen akım-potansiyel grafiği (0,1 M pH 7,5 sodyum fosfat tamponu, 25 $^{\circ}\text{C}$)

Hazırlanan NFs temelli elektrotların katekol analizinde kullanılabilmesi için optimum pH değerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu parametre sodyum fosfat tamponunda pH 7,5 ile 8,0 arasında yapılan amperometrik kalibrasyon çalışmaları ile belirlenmiştir. Çalışma potansiyeli döngüsel voltamogramlara göre 0,0 V olarak belirlenmiştir. pH'ın 7,5'dan 8'e yükseltilmesinin biyosensörün lineer aralığının genişlemesi ve duyarlılığın artmasına neden olduğu belirlenmiştir. (pH 7,5 için

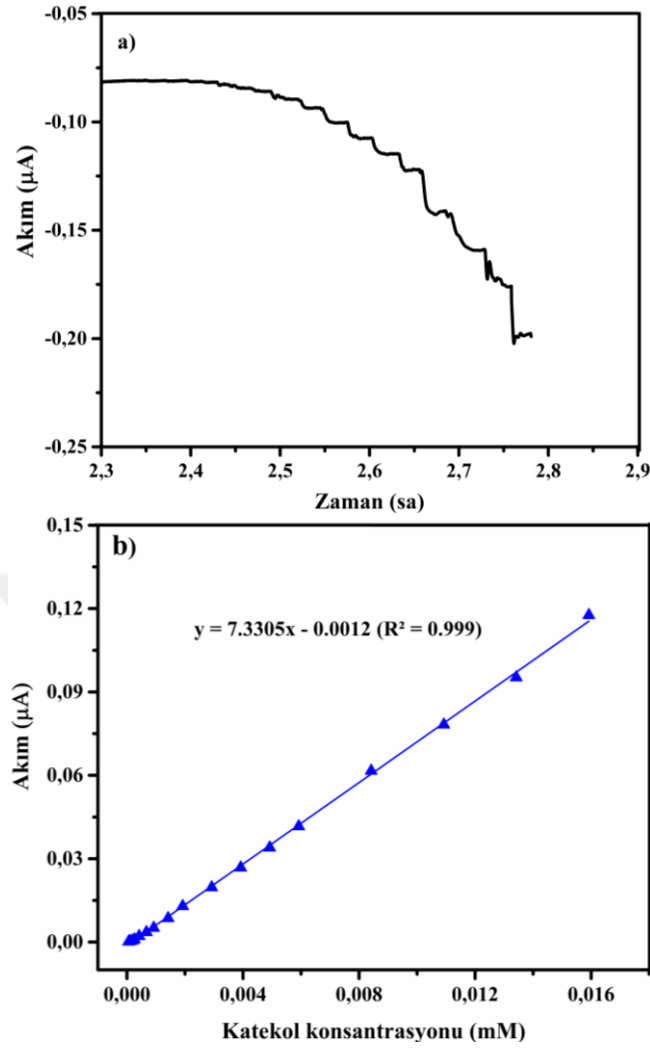
duyarlılık değeri $266 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$, pH 8,0 için ise $366 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ 'dir (Şekil 4.41). Bu nedenle immobilize PPO enziminin maksimum aktivitesini sergilediği pH (8,0) optimum olarak belirlenmiştir. Bu pH değeri, literatürde Topçu ve arkadaşları tarafından bildirilen jelatin-mantar dokusu kullanılarak hazırladıkları PPO temelli biyosensörün optimum pH değeri ile uyumludur (Campanella vd. 1993; Topçu vd. 2004).



Şekil 4.41. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörünün 0,1 M pH 7,5 (▲) ve pH 8.0 (▲) sodyum fosfat tamponundaki katekole karşı kalibrasyon grafiği (25°C, 0,0 V)

4.2.1.2. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörünün analitik performansının değerlendirilmesi

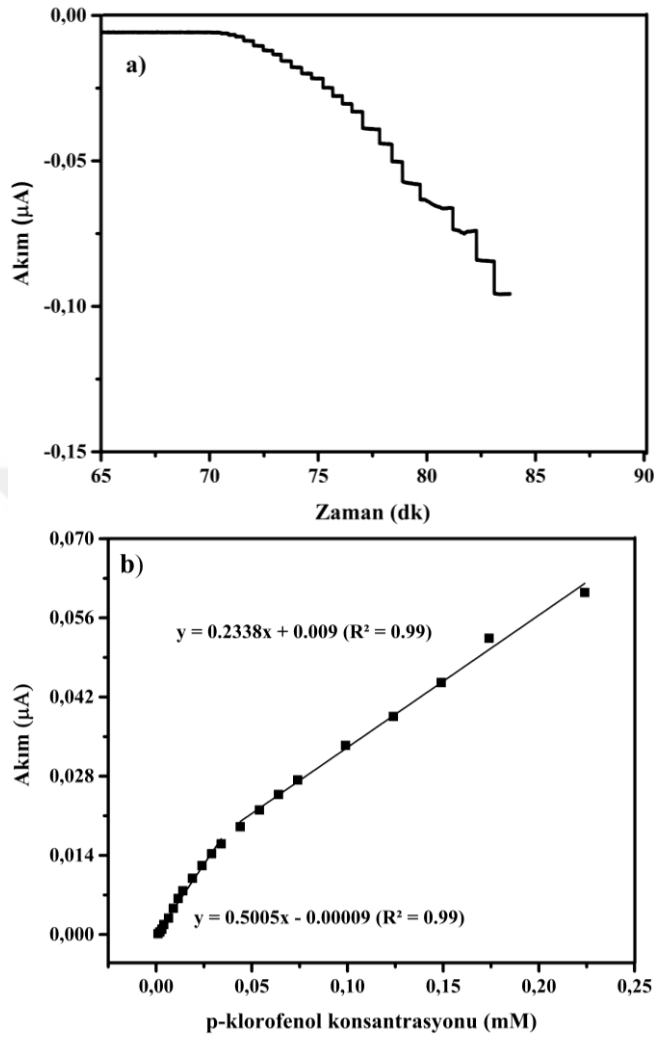
Optimize edilmiş koşullar altında hazırlanan PPO temelli biyosensörler (Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO) ile birisi o-difenol (katekol) ve diğer ikisi monofenol (fenol, p-klorofenol) olmak üzere üç fenolik bileşik ile 0,0 V potansiyel ve 0,1 M pH 8,0 sodyum fosfat tamponunda kronoamperometrik ölçümler yapılmıştır. Şekil 4.42a ardışık katekol eklemeleri sırasında akımda meydana gelen değişim, Şekil 4.42b ise bu kronoamperogramdan elde edilen akım-konsantrasyon kalibrasyon grafiğini temsil etmektedir. Katekol için bu kalibrasyon grafiğinden elde edilen duyarlılık ve lineer aralık değerleri sırasıyla $366 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ ve 0,06- 16 μM şeklindedir. Grafiğin eğimi ve ölçümlerin (S/N=3) standart sapması kullanılarak hesaplanan $4,37 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ 'lik LOD değeri, önerilen biyosensör matrisinin, katekolün ultra hassas tespitinde faydalı kıldığını kanıtlamaktadır. Literatürde Vicenti ve arkadaşları (2015) altın nanopartikül ve diheksadesilfoshat kompoziti ile hazırladıkları PPO (Tyr) temelli biyosensörün duyarlılığını 115 mA/M, lineer aralığını $2,5 \times 10^{-6}$ - $9,5 \times 10^{-5}$ mol/L ve LOD değerini de $1,7 \times 10^{-7}$ M olarak bildirmişlerdir (Vicentini vd. 2015). Elektro-eğirme yöntemini kullanarak silika-PVA-Tyr kompozit biyosensörünü hazırlayan Oriero ve arkadaşlarının bildirdikleri duyarlılık ve lineer aralık değerleri ise sırasıyla şu şekildedir: 0,0057 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ ve 10-200 μM (Oriero vd. 2015).



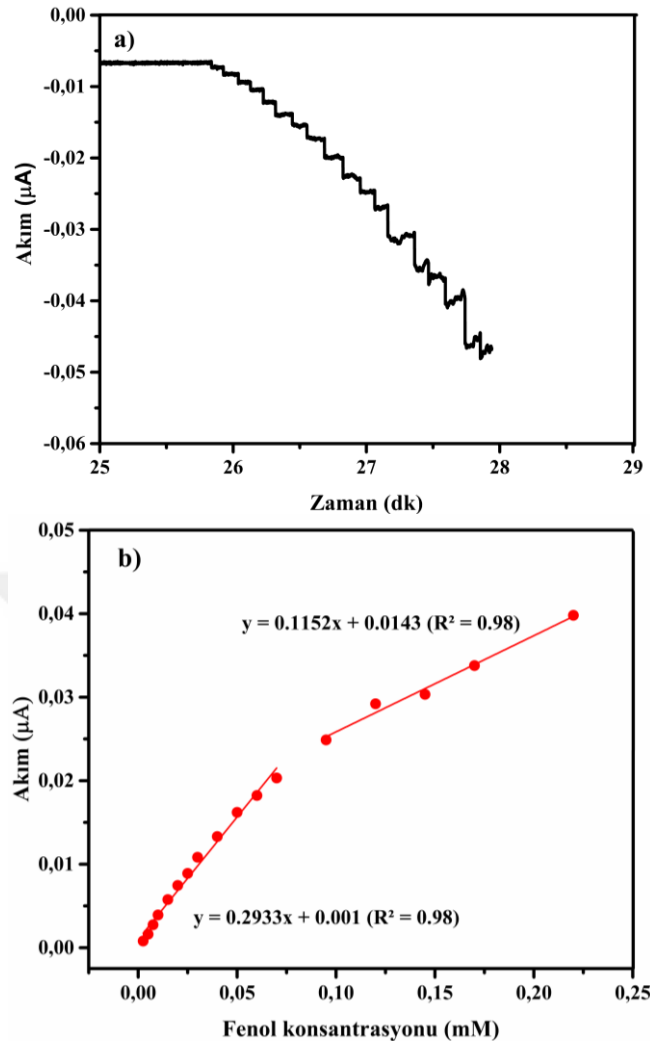
Şekil 4.42. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü ile katekol tespiti için gerçekleştirilen **a)** kronoamperometrik yanıt ve **b)** kalibrasyon eğrisi (0,0 V; 0,1 M pH 8,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C)

Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü ile monofenol olarak sınıflandırılan fenol ve p-klorofenolün tespiti katekol analizine benzer bir şekilde gerçekleştirilmiştir. p-klorofenol için gerçekleştirilen kronoamperometrik analiz sonucu elde edilen kronoamperogram ve bu amperogramdan elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.43a-b’de gösterilmektedir. Benzer şekilde fenol analizinin gerçekleştirilmesi için elde edilen kronoamperogram ve kalibrasyon grafiği ise Şekil 4.44a-b’de verilmiştir. Her iki kalibrasyon eğrisinden de görülebileceği gibi $2,2 \times 10^{-4}$ M’ye kadar iki ardışık lineer aralık ile birlikte fenol ve 4-klorofenol için sırasıyla 14,67 ve 25 mA/M.cm²’lik duyarlılık değerleri gözlenmiştir. Bu iki monofenol için hesaplanan LOD değerleri katekole oranla daha yüksek ve nanomolar aralıktadır (fenol ve 4-klorofenol için sırasıyla $4,1 \times 10^{-7}$ ve $1,1 \times 10^{-7}$ M). Fenolik bileşiklerin analizine yönelik literatürdeki çalışmalardan bazıları altın nanopartiküller, nanokristalin elmas (Zhao vd. 2009; Vicentini vd. 2016) gibi yapıları içeren daha karmaşık matrisler olmasına rağmen, tez

kapsamında önerilen biyoalgılama platformu ile bildirilen en düşük LOD'lerden biri olma ve en yüksek duyarlılık sergileme gibi rekabetçi özelliklere sahiptir.



Şekil 4.43. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü ile p-klorofenol tespiti için gerçekleştirilen **a)** kronoamperometrik yanıt ve **b)** kalibrasyon eğrisi (0,0 V; 0,1 M pH 8,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C)



Şekil 4.44. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü ile fenol tespiti için gerçekleştirilen **a)** kronoamperometrik yanıt ve **b)** kalibrasyon eğrisi (0,0 V; 0,1 M pH 8,0 sodyum fosfat tamponu, 25 °C)

Geliştirdiğimiz biyosensörün tüm substratlar açısından oldukça hassas, geniş lineer aralığa ve düşük LOD değerine sahip olduğu görülmüştür. Bu durum, biyosensör matrisinde kullanılan MWCNT'nin mükemmel iletkenliği sayesinde enzim immobilizasyonu için uygun ortam sağlamasına ve immobilize enzim ile elektrot arasındaki elektron transferini kolaylaştırmasına atfedilebilir. Ayrıca matris hazırlamada kullanılan elektro-eğirme yöntemin oldukça kolay, ucuz olması ve geniş yüzey alanı sağlaması da geliştirilen biyosensörün avantajları arasındadır.

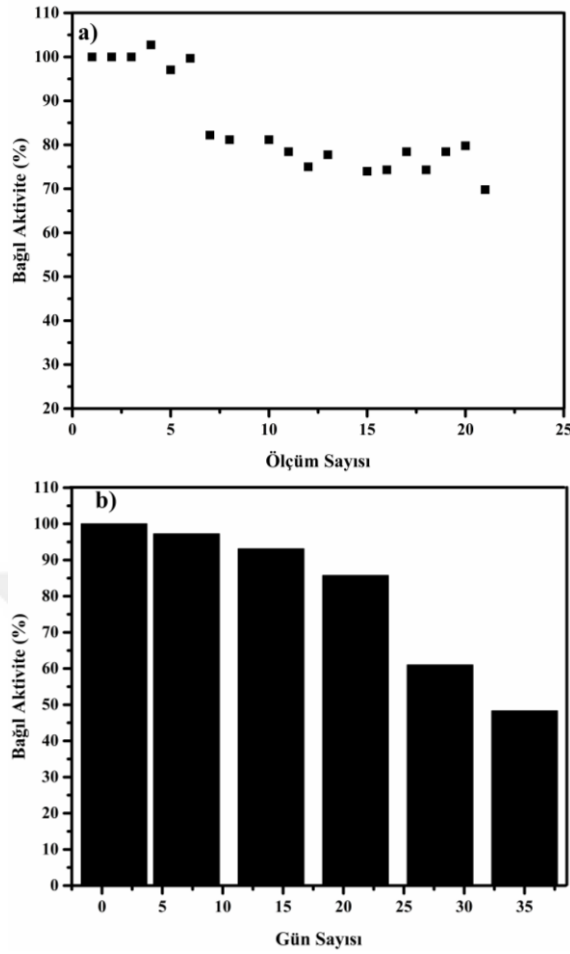
Tez çalışması kapsamında incelenen fenolik bileşiklerde bulunan hidroksil, karboksil ve halojenür gibi grupların geliştirilen biyosensörlerdeki amperometrik cevap üzerine etkisine bakıldığı zaman, sırasıyla katekol>4-klorofenol>fenol şeklinde olduğu hem döngüsel voltamogramlardan (Şekil 4.40b) hem de duyarlılık değerlerinden açıkça görülmektedir. Duyarlılık değerlerinde meydana gelen bu farklılık, K_m değerlerindeki

değişim ile ilişkilendirilebilir. Tez kapsamında substrat olarak incelenen üç fenolik bileşik için Michaelis-Menten sabiti hesaplanmıştır. En düşük K_m değeri 0,026 mM ile katekol için elde edilirken bu değerin, p-klorofenol ve fenol için sırasıyla 0,084 ve 0,154 mM'a arttığı gözlenmiştir. Bu değerlere bakıldığı zaman, enzim afinitesi en yüksek olan substrat katekol ve en az olan ise fenoldür (Genel sıralama katekol>klorofenol>fenol şeklindedir). Literatürde bildirilen çeşitli çalışmalarda da benzer durumlar gözlenmiştir (Ducey ve Meyerhoff 1998; Dong vd. 2017; Wang vd. 2018). Serra vd. orto pozisyonunda yer alan substitüe grupların için elde edilen K_m değerlerinin, para ve meta pozisyonlarda bulunan substitüe grupların yer aldığı fenolik bileşiklerle elde edilen K_m değerlerinden daha büyük dolayısıyla da daha az hassas olduğunu bildirilmişlerdir (Serra vd. 2002). Çalışmamızda yer alan katekolde bulunan orto pozisyonundaki -OH grubunun kinon dönüşümünü kolaylaştırmasının bir sonucu olarak, daha yüksek enzim-substrat etkileşimine sahip olduğu görülmüştür. p-klorofenolün fenole karşı hafif üstünlüğü de benzer şekilde substitüe grubun konumu ve türünden kaynaklandığı düşünülmektedir. para pozisyonundaki substitüe gruplar, halojenür grubunun elektron çeken karakterinden dolayı PPO enzimi için daha uygun substratlar olarak gösterilmiştir (Ikehata ve Nicel 2000).

4.2.1.3. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü ile kullanım kararlılığı ve raf ömrü analizi

PPO temelli biyosensörlerde enzimin doğası gereği nispeten kararsız olması, kısa ömürlü olması ve elektrot kirlenmesine yol açabilecek katalitik ara maddelerin (radikal kökenli) oluşumu nedeniyle kararlılık analizi oldukça önem taşımaktadır (Nistor vd. 1999; Streffer vd. 200). Katekol, tez kapsamında kullanılan diğer fenolik bileşiklere göre daha yüksek bir değerde duyarlılık gösterdiği için kararlılık çalışması sadece bu analit ile gerçekleştirilmiştir. Biyosensör ile oda koşullarında, bir gün içerisinde arka arkaya 20 kronoamperometri çalışması yapılmış ve RSD değeri %14,17 (n=20) olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.45a'da görüldüğü üzere Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO elektrotu yüksek kullanım kararlılığı göstermiş olup 20. kullanımda bile %75 aktivite göstermektedir.

Hazırlanan biyosensörün raf ömrü de benzer bir şekilde test edilmiştir. Bu amaçla ardışık olarak 7 gün boyunca her gün ve daha sonra da sırasıyla 14.gün 21.gün, 28. gün ve 35. gün olmak üzere farklı sürelerde aynı biyosensör ile kronoamperometri çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.45b'de gösterilmiştir. Şekil değerlendirildiğinde ilk 20 gün sonunda depolama ömrü, ilk performansın %85'inden fazlasını korumuş, 35. gün sonunda ise ilk güne göre yaklaşık %50 oranında düşmüştür.

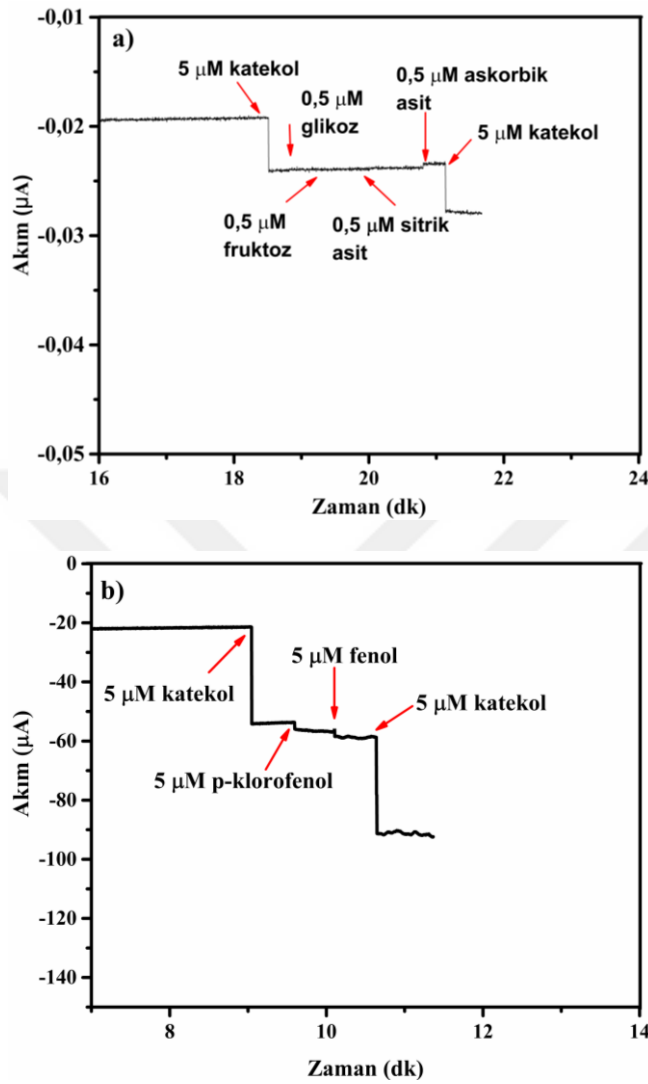


Şekil 4.45. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörünün **a)** kullanım kararlılığı ve **b)** depolama ömrü (0,10 M pH 8,0 sodyum fosfat tamponu, 0,0 V, 5 μ M katekol, 25 $^{\circ}$ C)

4.2.1.4. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü ile girişim etkisinin incelenmesi ve gerçek numune analizi

Genel olarak geliştirilen bir biyosensörün temel amacı onun gerçek örneklerdeki içeriğinin tespit etmektir. Ancak bilindiği üzere gerçek numunelerde çok sayıda bileşen bulunur ve bunlardan bazıları girişim etkisi gösterebilir. Bu etkiyi incelemek üzere analit olan katekol ve girişim yapabilecek türler (glikoz, fruktoz, sitrik asit ve askorbik asit) katekolün 1/10'u oranında 10 mL 0,1 M pH 8,0 sodyum fosfat tamponu ve 12 mg SDS içeren ortama eklenmiş ve kronoamperometrik çalışma yapılmıştır. Şekil 4.46a'da glikoz, fruktoz ve sitrik asitin mevcut yanıt üzerinde hiçbir etkisi olmadığı görülmüş ve askorbik asit ilavesinde ise akımda hafif bir değişiklik gözlemlenmiştir. Ayrıca seçilen bu üç fenol bileşiğin birbirlerinin verdiği cevap üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığı da araştırılmıştır. Bu amaçla 0,1 M pH 8,0 sodyum fosfat tamponu içeren hücreye aynı miktarlarda ilk olarak katekol, ardından klorofenol ve en sonda fenol substratı eklenmiş ve akım cevapları (Şekil 4.46b) kaydedilmiş ve konsantrasyon grafiğinden elde edilen değerler ile karşılaştırılmıştır. Görüldüğü üzere üç substratın

birbirleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı, geliştirilen biyosensörün oldukça seçici bir şekilde substratını tanıdığı görülmüştür.



Şekil 4.46. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörünün **a)** katekol ile glikoz, fruktoz, sitrik ve askorbik asit karşısında amperometrik yanıtı ve **b)** farklı fenol bileşikleri için seçicilik ve performansın kronoamperometrik değerlendirmesi monofenoller (fenol, klorofenol) ve difenol (katekol) (0,0 V'da 0,1 M PBS pH 8,0, 25 °C)

Önerilen matris, hem mono- hem de difenolleri tespit edebildiğinden ve su kirliliği de çağımız için yaygın endişelerden biri olduğundan; geliştirilen biyosensör musluk suyu numunelerindeki fenol içeriğini test etmek için kullanılmıştır. Standart ekleme yöntemi kullanılarak çeşme suyuunda üç fenol bileşiği ile testler yapılmış ve analizin doğruluğu hesaplanarak % geri kazanım değerleri belirlenmiştir. Çizelge 4.14'deki değerlendirildiğinde, önerilen biyosensörün su kaynaklarındaki eser miktardaki fenolik kirleticilerin tespitinde başarılı bir şekilde uygulanabileceği düşünülmüştür.

Çizelge 4.14. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü ile elde edilen gerçek numuneler için geri kazanım değerleri (n=3)

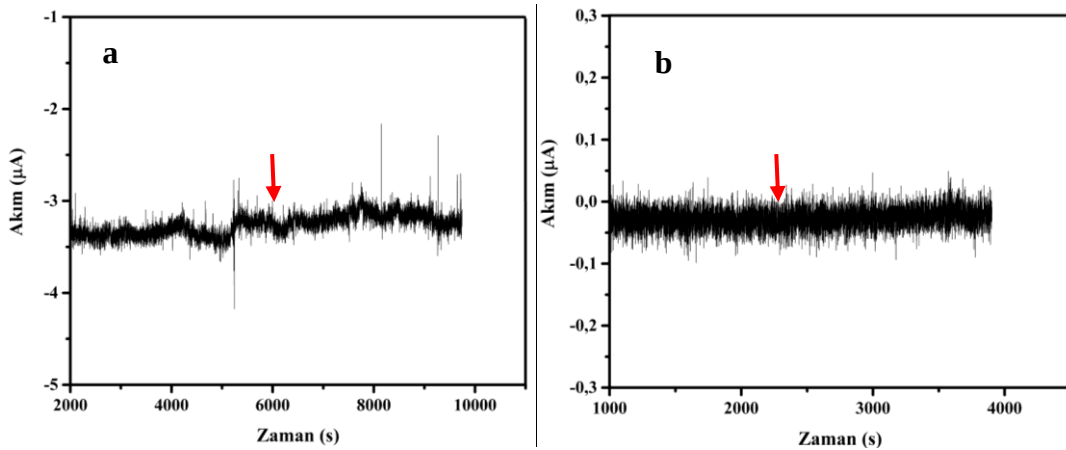
	Hesaplanan (μM)		Eklenen (μM)	Hesaplanan (μM)	Geri kazanım (%)
Örnek 1	-	katekol	0,0100	0,00972	97,19
Örnek 2	-	fenol	0,00250	0,00244	97,66
Örnek 3	-	p-klorofenol	0,00300	0,00301	100,43

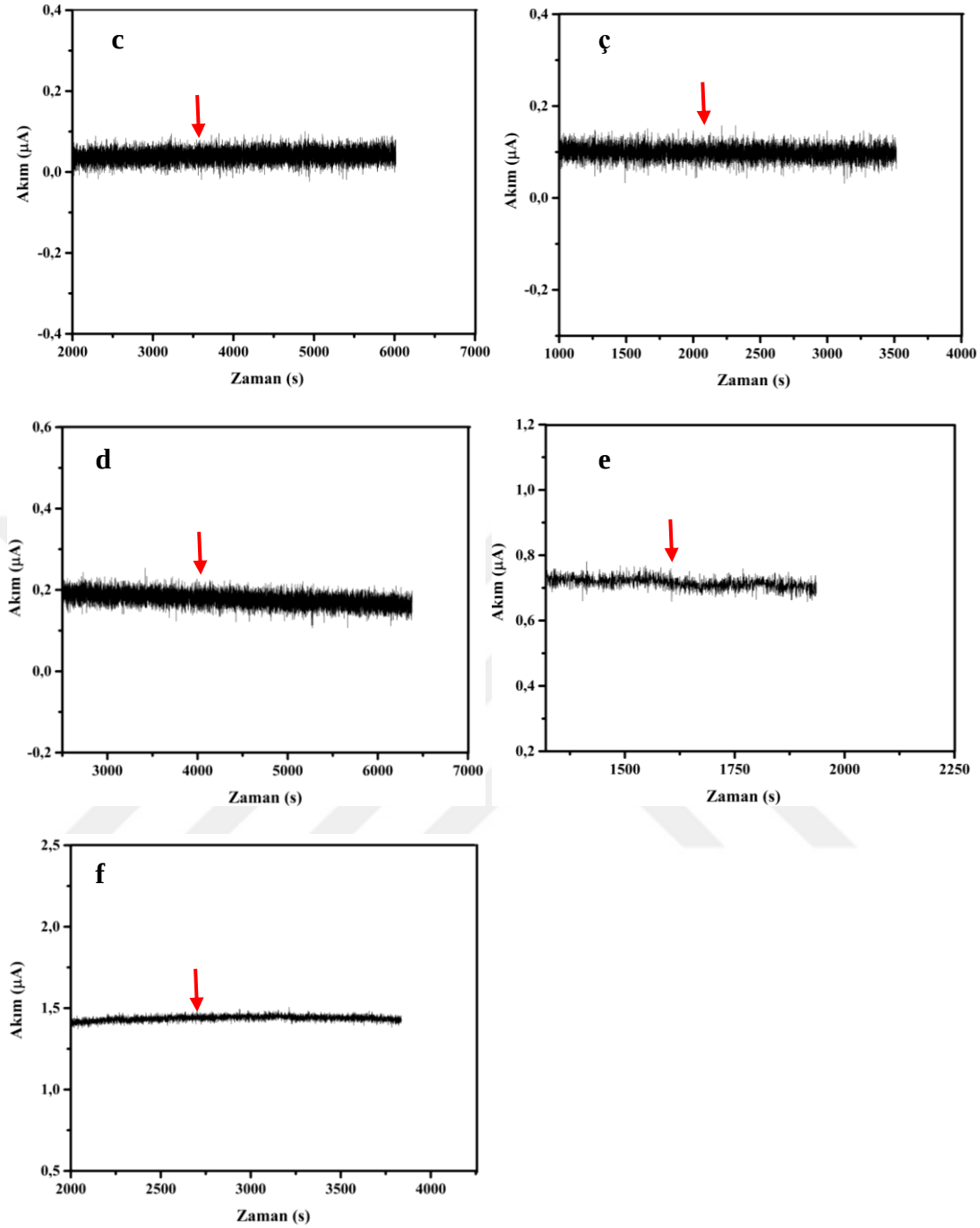
4.3. Üreaz Temelli Biyosensörler

4.3.1. YBCE esaslı üre biyosensörleri ile ilgili çalışmalar

4.3.1.1. YBCE/PAN-MWCNT-Nfs/Üreaz biyosensörünün kronoamperometri çalışmaları

Üre analizine yönelik tasarlanan PAN-MWCNT-NFs matrisli Üreaz temelli biyosensörler ile optimizasyon parametrelerinin belirlenmesi için kronoamperometri çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda literatür taraması ile belirlenen pH ve çalışma potansiyeli değerlerinde sadece 0,1 M pH 8,0 PBS tampon çözeltisi ve +0,9 V çalışma potansiyeli dışında hem pH hem de çalışma potansiyeli değiştirilmesi ile herhangi bir yanıt alınamamıştır. Bu denemelere ait kronoamperogramlar sırasıyla aşağıda verilmiştir (Şekil 4.47a-f).

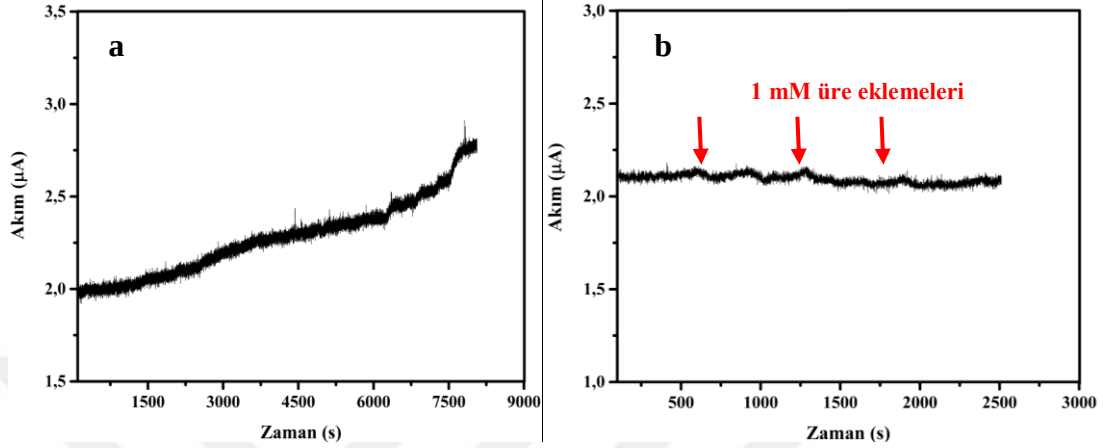




Şekil 4.47. YBCE/PAN-MWCNT-Nfs/Üreaz biyosensörü ile üre tespiti için **a)** -0,2 V; **b)** -0,1 V; **c)** +0,2 V; **ç)** +0,3 V; **d)** +0,4 V; **e)** +0,7 V; **f)** +0,8 V potansiyellerine ait örnek kronoamperogramlar (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)

Üre analizinin gerçekleştirilmesine yönelik tasarlanan Üreaz temelli biyosensörün analite (üreye) karşı verdiği yanıt (0,1 M pH 8,0 PBS ve +0,9 V çalışma potansiyeli) Şekil 4.48a’da verilmiştir. Ancak daha sonraki denemelerde aynı şartlarda hazırlanan biyosensörler ile yine aynı analite karşı yanıt alınamamıştır. Toplamda 20

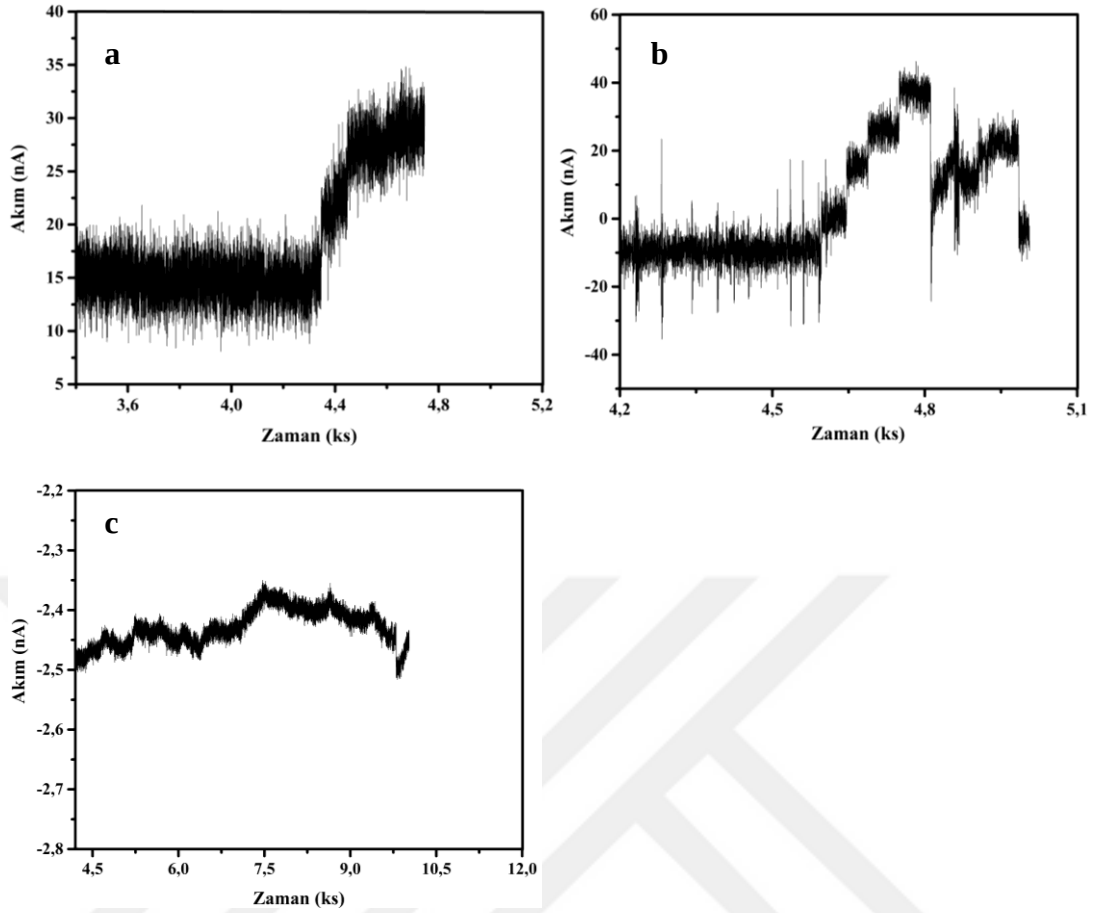
adet deneme yapılmış olup bu denemeler sonucunda biyosensör tasarlamasında da önemli bir parametre olan tekrarlanabilirlik kriteri açısından problem olduğu sonucuna varılmıştır. Aşağıda bu durumu özetleyen grafikler listelenmiştir. Şekil 4.48a'dan da görülebileceği gibi analit olan üreye karşı yanıt alınmıştır ancak daha sonraki denemeler de ya yanıt alınamamıştır ya da alınan cevapta azalma olmuştur (Şekil 4.48b).



Şekil 4.48. YBCE/PAN-MWCNT-Nfs/Üreaz biyosensörü ile üre tespiti için **a)** yanıt alınan ve **b)** yanıt alınamayan denemelere ait örnek kronoamperogramlar (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)

4.3.1.2. YBCE/PAN-MWCNT-TH-NFs/Üreaz biyosensörünün kronoamperometri çalışmaları

Çalışmanın bu kısmında denemelerde yaşanan olumsuzlukların çözümü için önerilen yaklaşım, nanolif matrisine tez projesi kapsamında var olan medyatörlerden birinin ilavesidir. Bu amaçla daha önceki çalışmalar göz önüne alındığında biyosensör performansını en olumlu yönde etkileyen medyatör TH seçilmiş ve buradan yola çıkarak PAN-MWCNT nanolif matrisine tiyonin medyatörünün etkisi incelenmiştir. YBCE/PAN-MWCNT-TH-NFs/Üreaz biyosensörü ile 0,1 M pH 8,0 PBS’de ve farklı çalışma potansiyellerinde amperometrik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Her bir çalışma potansiyelinde elde edilen kronoamperogramlar sırasıyla Şekil 4.49a-c’de verilmiştir.

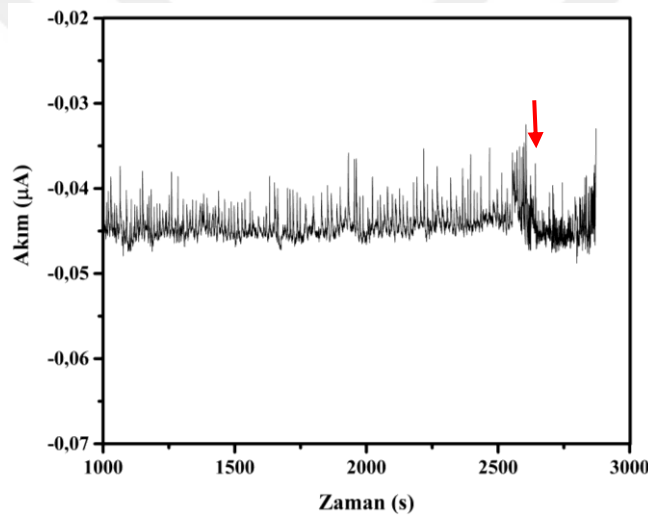


Şekil 4.49. YBCE/PAN-MWCNT-TH-NFs/Üreaz biyosensörünün üre ilavesi sırasında **a)** 0,0 V; **b)** -0,1 V; **c)** -0,4 V çalışma potansiyelinde kayıt edilen kronoamperogramları (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)

Şekil 4.49a incelendiğinde 0,0 V’da art arda yapılan her bir üre ilavesi sonrasında analit miktarındaki artışa bağlı olarak akımda da bir artış meydana gelmiştir. Ancak ardışık yapılan üç üre ilavesi sonrasında yapılan üre ilavesine karşılık olarak herhangi bir yanıt alınamamıştır. Yapılan 3 tekrar sonucunda da benzer bir durumla karşılaşmıştır. Bu nedenle farklı bir çalışma potansiyeli denemesi gerçekleştirilmiştir. -0,1 V çalışma potansiyelinde ise ardışık yapılan üre ilaveleri sonunda 0,0 V’a göre daha belirgin yanıtlar alınmış olsa da benzer bir şekilde eklemelere devam edilmesi durumunda akımda azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.49b). Aynı şartlarda hazırlanan biyosensörler ile gerçekleştirilen 2 tekrar sonucunda ise bu potansiyelde üreye karşı herhangi bir yanıt alınamamış olması nedeniyle aynı çalışma -0,4 V potansiyelde de denenmiştir. Şekil 4.49c incelendiğinde ise üre ilavesi sonucunda akımda ilk başta bir artış meydana gelmiş gibi görünse de diğer potansiyelerde karşılaşılan durum tekrarlanmıştır. Tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde PAN-MWCNT-TH-NFs matrisi ile tekrarlanabilir ve başarılı bir şekilde üre analizi gerçekleştirilemediği sonucuna varılmıştır.

4.3.1.3. YBCE/PAN-MWCNT-AuNP-Fc-Nfs/Üreaz biyosensörünün kronoamperometri çalışmaları

Nanoparçacıkların biyosensör matrisine ilavesi, iletkenliği arttırması ve buna bağlı olarak da biyosensör duyarlılığında artış meydana getirmesi nedeni ile literatürde sıklıkla kullanılmıştır. Bunlar arasında en çok kullanılan altın nanoparçacıklar (AuNP) dır. Bu sebeple, YBCE üzerinde elde edilen PAN-MWCNT-Fc-NFs'ları üzerine 5 μ L AuNP ilave edilmiş ve elektrot kuruduktan sonra daha önceden belirtildiği şekilde biyosensörler hazırlanmıştır. Bu biyosensörler ile -0,2 V çalışma potansiyelinde ve 0,1 M pH 8,0 PBS'de kronoamperometri çalışması gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda ardışık üre ilavesi sırasında elde edilen akıma karşılık zaman grafiği Şekil 4.50'da verilmiştir. Aynı çalışma 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.50'dan da görülebileceği gibi 1 mM üre ilavesi sonrasında akımda daha önce de karşılaştığımız gibi akımda bir düşme meydana gelmiştir. Bu durumda bize altın nanoparçacıkların tekrarlanabilir amperometrik tepki elde edilmesine katkı vermediğini göstermiştir.

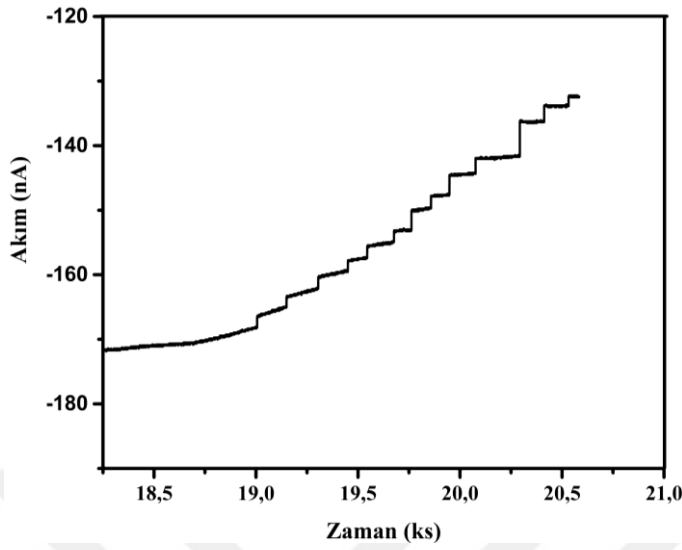


Şekil 4.50. YBCE/PAN-MWCNT-AuNP-Fc-Nfs/Üreaz biyosensörü ile üre tespiti için yapılan denemelere ait örnek bir kronoamperogram (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)

4.3.2. Pt/PAN-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörünün kronoamperometri çalışmaları

Çalışmanın bir sonraki adımında, elektrot türünün değiştirilmesiyle ve farklı bir medyatör kullanımıyla yaşanan problemin çözümünün mümkün olup olmayacağı araştırılmıştır. Bu amaçla daha önce optimum olarak belirlediğimiz şartlarda Pt disk elektrot üzerinde PAN-MWCNT-NFs/Fc/Üreaz biyosensörlerin üreye karşı yanıtının değerlendirilmesi için YBCE elektrot ile yapılan çalışmaların benzerleri gerçekleştirilmiştir. Literatürde ferrosen için en çok kullanılan -0,1 V çalışma potansiyelinde ve 0,1 M pH 8,0 PBS tamponu ile kronoamperometri çalışması gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki örnek çalışmada da görülebileceği gibi yapılan toplam 7 deneme sonucunda da başarılı bir şekilde analit olan üreye karşı yanıt alınmıştır (Şekil 4.51). Ancak laboratuvarımızda daha devam eden diğer çalışmalar dikkate alınarak bu

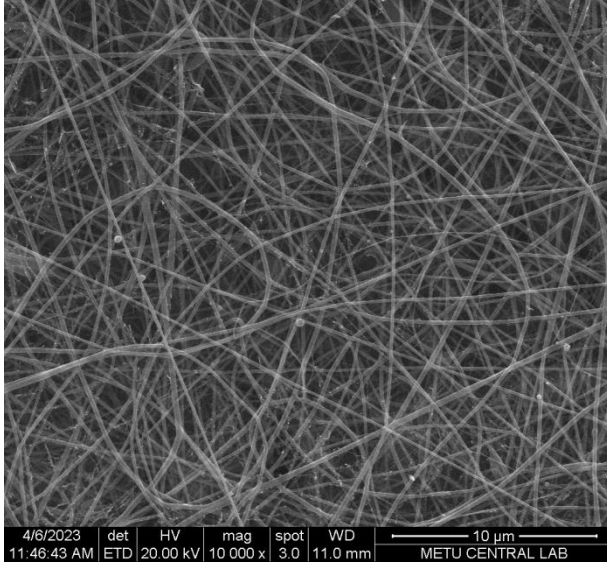
matris ile ilgili çalışmalara devam edilmemiştir. Ancak, bu çalışma ile YBCE elektrot yerine Pt disk elektrotların üre tayini açısından daha uygun oluğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.51. Pt/PAN-MWCNT-Nfs/Fc/Üreaz biyosensörü ile üre tespiti için yapılan denemelere ait örnek bir kronoamperogram (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)

4.3.3. Pt/Naylon-6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörü ile ilgili çalışmalar

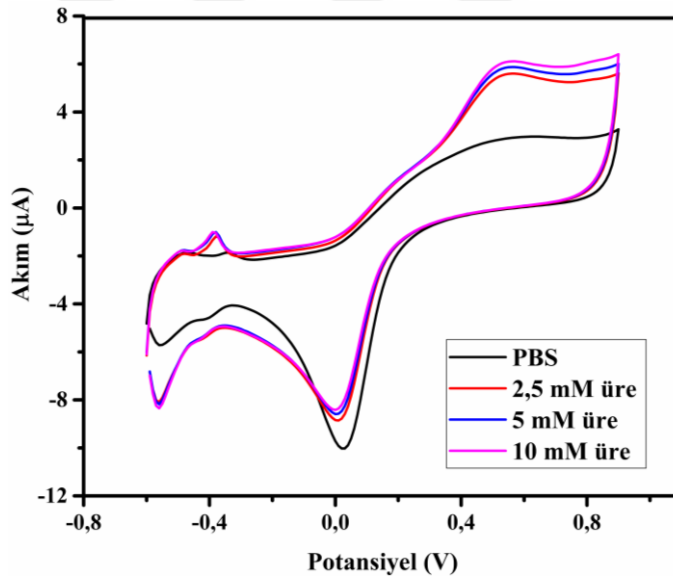
Polimerik membranların, iyi mekanik kararlılığa ve enzimler ile doğrudan reaksiyonlar için bazı reaktif fonksiyonel grupların ($-NH_2$ gibi) varlığı sayesinde, enzim immobilizasyonunda etkili bir membran oluşturdıkları bilinmektedir (Gabrovskaya vd. 2007). Naylon 6 polimerinin yapısında bulunan $-NH$ grubu, enzimin GA ile immobilizasyonunda elektrostatik etkileşimler sayesinde çapraz bağlanmayı kolaylaştırdığı ve buna bağlı olarak da hazırlanan elektrotun maksimum enzim aktivitesini sergileyeceği düşünülmektedir. Naylon 6 polimerinin yüksek gerilme mukavemeti sergilemesi, oldukça sert ve aşınmaya karşı dirençli olması ve çabuk kuruması gibi üstün özellikleri sayesinde literatürde biyosensör matrisi olarak kullanımı oldukça yaygındır (Scampicchio vd. 2008; Fuenmayor vd. 2014). Tez çalışmasının bu kısmında literatürdeki verilerden yararlanarak üre analizinde kullanılmak için Pt disk elektrot üzerinde Naylon 6-MWCNT-NFs'leri elde edilmiştir ve nanoliflerin morfolojik incelenmesi SEM analizi ile gerçekleştirilmiştir. Bu nanoliflere ait SEM görüntüsü Şekil 4.52'de verilmiş olup nanoliflerin ortalama çapı 137 ± 2 nm olarak hesaplanmıştır. Elde edilen nanoliflerin ağısı yapısının homojen olduğu ve tez kapsamında araştırılan diğer taşıyıcı materyaller (medyator ve nanomateryal dahil) ile kıyaslandığında çok daha ince olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun geliştirilen biyosensörün performansı için daha avantajlı olacağı düşünülmüştür.



Şekil 4.52. Nylon 6-MWCNT-NFs ait SEM görüntüsü

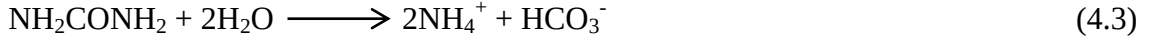
4.3.3.1. Elektrokimyasal analizlerin incelenmesi

Üreaz enzimi ile immobilizasyon öncesinde hazırlanan Pt/Nylon 6-MWCNT-Fc-NFs elektrotunun üreye karşı verdiği yanıt döngüsel voltametri (Şekil 4.53) yöntemi kullanılarak incelenmiştir.



Şekil 4.53. Pt/Nylon 6-MWCNT-Fc-NFs elektrotunun üre varlığında ve yokluğunda 100 mV/s tarama hızındaki döngüsel voltamogramı (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)

Bilindiği gibi amperometrik üre biyosensörleri, üreaz enziminin mevcudiyetinde ürenin hidrolizinden kaynaklanan amonyum iyonlarının tayin edilmesine dayanır (Eşitlik 4.3) (Mondal ve Sangaranarayanan 2012). Bu tez çalışması kapsamında ürenin algılanması için önerilen makul bir mekanizma şu şekilde varsayılabilir:

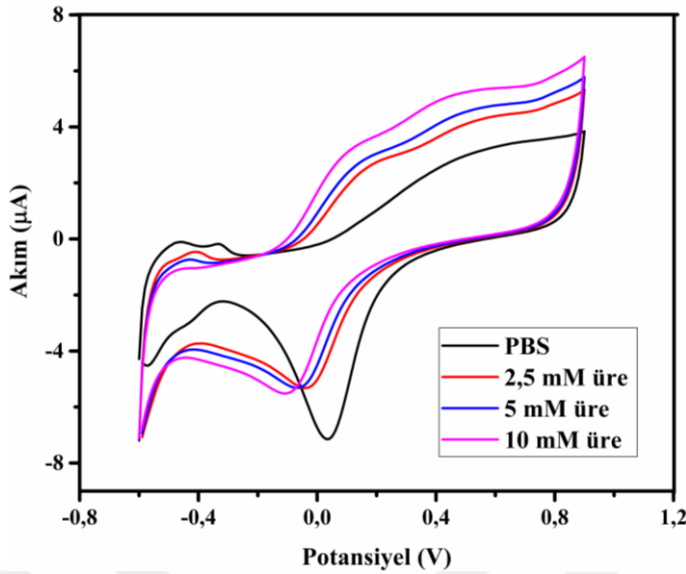


Enzimatik hidroliz gerçekleştikten sonra elektrota katodik potansiyel uygulandığında sonra ortamdaki NH_4^+ iyonları NH_3 iyonlarına indirgenir ve oluşan amonyağın bir fonksiyonu olarak üre konsantrasyonu belirlenir (Eşitlik 4.4).



Şekil 4.53 incelendiğinde, ürenin ortama ilavesi sonrasında yaklaşık 0,0 V potansiyelde NH_4^+ iyonlarının indirgenmesine atfedilen bir katodik pik gözlenmiştir. Bu koşullar altında üre, Pt elektrot yüzeyinde indirgenen amonyum iyonlarına dönüştürülür. Üre konsantrasyonundaki kademeli olarak gerçekleştirilen bu artışla katodik pik akımı negatif yönde artar ve karşılık gelen pik potansiyelleri daha negatif değerlere kayar. Benzer şekilde yaklaşık +0,45 V potansiyelde NH_3 iyonlarının yükseltgenmesine atfedilen bir yükseltgenme piki gözlenmiştir. Üre konsantrasyonu arttıkça bu pikin şiddetinde kademeli olarak meydana gelen artış, elektrotünüreye karşı yanıt verdiğinin bir ölçüsüdür.

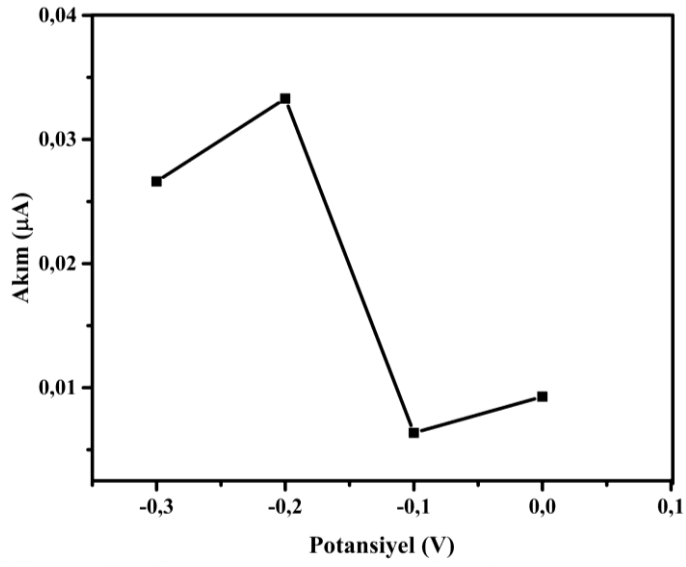
Üreaz enzimi ile immobilizasyon sonrası hazırlanan biyosensörün (Pt/Naylon-6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz) üreye karşı verdiği yanıt döngüsel voltametri yöntemi ile incelenmiştir. 100 mV/s tarama hızında 0,1 M pH 8,0 PBS ortamında ürenin varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilen analiz sonrası elde edilen döngüsel voltamogram Şekil 4.54'te gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde, enzimsiz olarak hazırlanan elektrota benzer şekilde artan üre konsantrasyonuna bağlı olarak hem katodik hem de anodik akımda artış meydana gelmiştir. NH_4^+ iyonlarının indirgenmesine atfedilen yaklaşık -0,1 V potansiyelde meydana gelen bu katodik akım, üre konsantrasyonun artmasıyla daha katodik alana kaymıştır. Böylelikle ürenin bu bölgede analizine olanak sağlayabileceği düşünülmüştür. Ayrıca yaklaşık 0,2 V'da meydana gelen diğer katodik pik de ferrosenin yükseltgenmesi sonucu oluşan ferrosenyum iyonunun oluşumuna atfedilebilir (Bourigua vd. 2009).



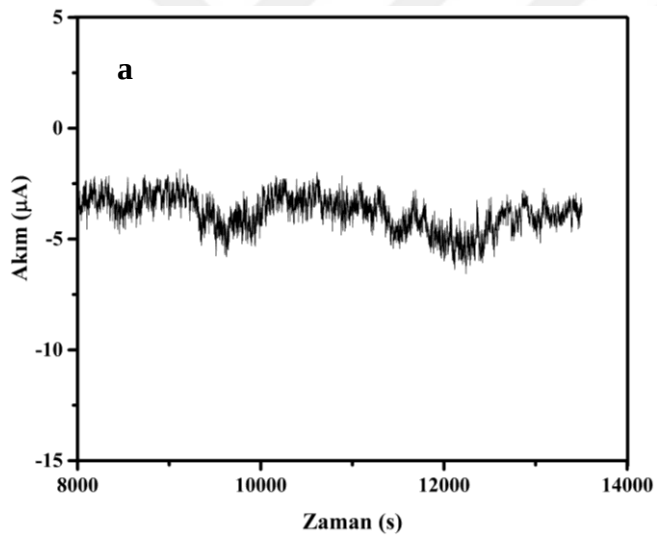
Şekil 4.54. Pt/Naylon-6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörünün üre varlığında ve yokluğundaki 100 mV/s tarama hızındaki döngüsel voltamogramı (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)

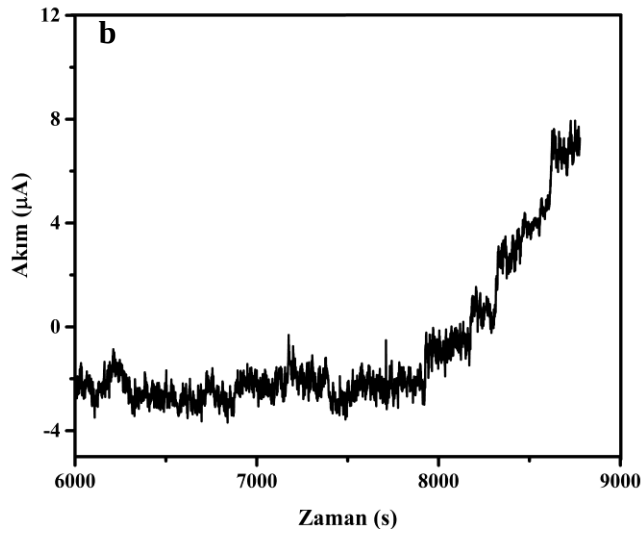
4.3.3.2. Kronoamperometri çalışmaları

Geliştirilen biyosensör ile üre tayini için uygun olan potansiyelin belirlenmesi için döngüsel voltametri çalışması sonucu öngörülen potansiyel aralıkların da (0,0 V ile -0,3 V) kronoamperometri çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, her bir potansiyelde ayrı ayrı olarak 0,1 M pH 8,0 PBS'de ortama 0,05 mM üre eklenmiş ve akım kaydedilmiştir. Ölçülen bu akım değerlerinin potansiyele karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen eğri Şekil 4.55'te verilmiştir. Ayrıca, döngüsel voltametri çalışması sonucu ferrosenin yükseltgenme potansiyeli olarak düşünülen potansiyel aralığında da ardışık üre ilavesi yapılarak kronoamperometri çalışması gerçekleştirilmiş ve +0,35 V için elde edilen amperogram Şekil 4.56a'da, +0,40 V için elde edilen amperogram ise Şekil 4.56b'de gösterilmiştir. Görüldüğü gibi +0,35 V'da elde edilen akım-zaman grafiğinde analit olan üreye karşı herhangi bir yanıt alınamamış olup Şekil 4.56b incelendiğinde yaklaşık 4 üre ilavesi sonrası akım cevabının sabitlendiği gözlenmiştir. Şekil 4.55'ten de görülebileceği gibi -0,2 V'da ölçülen değer en yüksek akım değeri olduğu için optimum çalışma potansiyeli bundan sonraki çalışmalar için -0,2 V olarak belirlenmiştir. Dahası, seçilen bu potansiyelin, gerçek numune analizinde olası girişim etkilerinden kaçınmak için uygun bir potansiyel olabileceği düşünülmüştür.



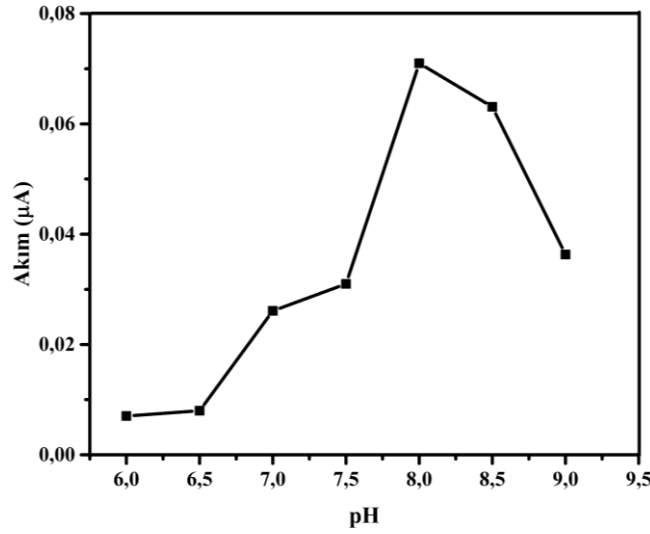
Şekil 4.55. Pt/Naylon-6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörünün optimum çalışma potansiyelin belirlenmesi (0,005 mM üre, 0,1 mM pH 8,0 PBS, 25 °C)





Şekil 4.56. a) +0,35 V ve b) +0,40 V çalışma potansiyelinde ardışık üre ilavesi sırasında kayıt elde edilen amperogramlar (0,1 mM pH 8,0 PBS, 25 °C)

Üreaz temelli biyosensörlerde ürenin hidrolizi sonucu oluşan amonyak/amonyum iyonlarının sulu ortamda dengede olmalarından dolayı ortam pH'ını optimize etmek çalışma potansiyelinin optimizasyonuna göre daha zordur. Ayrıca Üreaz enzimi, elektro-oksidasyon yoluyla üre tayini ile bağıntılı olarak amonyağın üretilmesinden de sorumludur. Bu nedenle, optimum pH seçilirken hem Üreazın katalitik aktivitesi hem de amonyağın elektro-oksidasyonu dikkate alınmalıdır. Ancak istenen reaksiyonda hidroliz adımı önceliklidir (Korkut vd. 2019). Üreaz temelli biyosensör için optimum pH'ın belirlenmesi amacıyla -0,2 V çalışma potansiyelinde 7 farklı pH aralığında kronoamperometri çalışmaları yapılmıştır. Üre ilavesi sonucu ölçülen akım değerlerinin pH'a karşı grafiğinin çizilmesi sonucu elde edilen grafik değerlendirildiğinde maksimum enzim aktivitesin görüldüğü en yüksek akım değeri pH 8,0 0,1 M PBS'de elde edildiği için optimum pH değeri 8,0 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.57).



Şekil 4.57. Pt/Naylon-6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörü için optimum pH değerinin belirlenmesi (0,05 mM üre, -0,2 V, 25 °C)

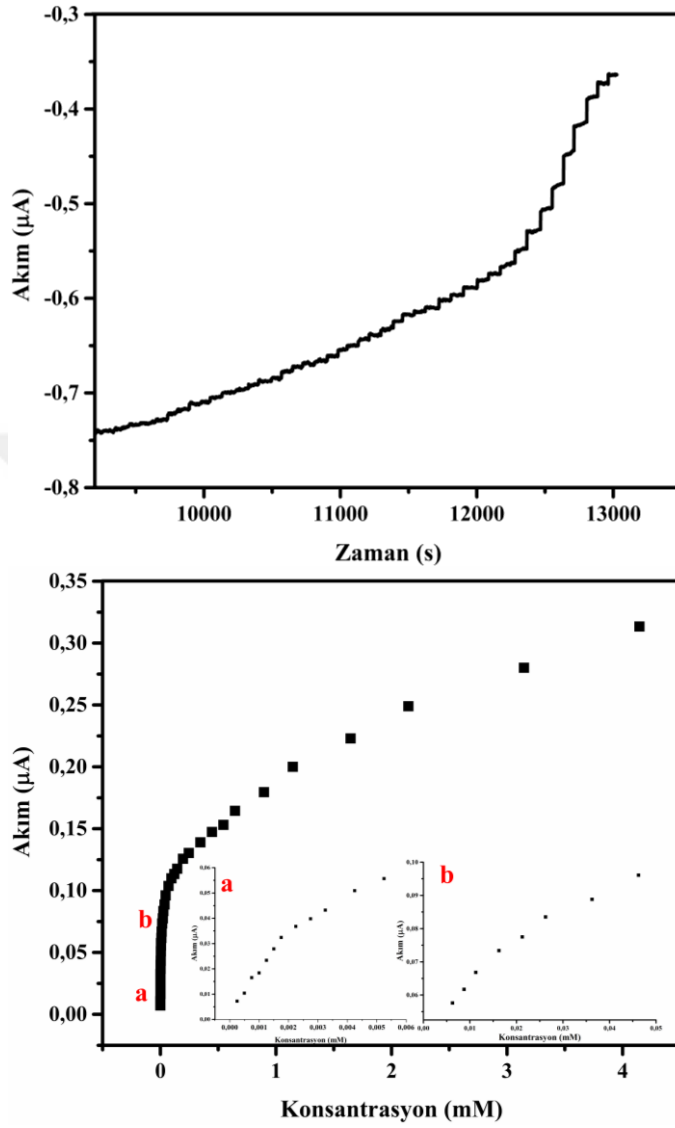
Hazırlanan Pt/Naylon-6-MWCNT-Fc-NFs elektrotları ile enzim immobilizasyonunun optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hazırlanan iki ayrı NFs elektrot ile 30 U ve 60 U Üreaz enzimi kullanılarak iki ayrı biyosensör hazırlanmıştır. Bu iki biyosensör ile -0,2 V, 0,1 M pH 8,0 PBS’de 0,005 mM üre eklenerek akım cevabı incelenmiştir. En yüksek akım cevabı 30 U enzim miktarında elde edildiği için optimum enzim miktarı 30 U olarak belirlenmiştir.

4.3.3.3. Biyosensörünün analitik performansının değerlendirilmesi

Pt/Naylon-6-MWCNT-Fc/Üreaz biyosensörünün analitik performansını değerlendirmek için konoamperometri çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.58a ardışık üre ilavesi sırasındaki akımı değişimi, Şekil 4.58b’de ise bu değişimlerin konsantrasyona bağlı olarak değerlendirildiği kalibrasyon grafiğini bulunmaktadır. Görüldüğü üzere, oldukça düşük üre konsantrasyonlarında bile ardışık eklemeler sırasında akımda oldukça net artışlar meydana gelmiş olup sistem doygunluğa ulaşana kadar konsantrasyonla orantılı bir şekilde sinyal alınmıştır. Şekil 4.58b incelendiğinde, üre tayini için 3 lineer aralıklı bir kalibrasyon grafiği elde edilmiş olduğu görülmektedir. Bu kalibrasyon grafiğinden elde edilen duyarlılık ve lineer aralık değerleri Çizelge 4.15’te listelenmiştir. Çizelge incelendiğinde oldukça geniş aralıkta üre tayinine olanak sağlayan literatüre göre üstün performansta bir biyosensör elde edildiği görülmüştür.

Pt/Naylon-6-MWCNT-Fc/Üreaz biyosensörüne ait K_m ve I_{max} değerlerinin belirlenebilmesi için çizilen $1/C$ ’ye karşılık $1/I$ grafiğinden faydalanılmıştır. Bu biyosensöre ait hesaplanan K_m ve I_{max} değerleri sırasıyla 0,086 mM ve 0,225 μA ’dır. Literatürde Gabrovskaya ve arkadaşları tarafından hazırlanan akrilonitril-rodium nanoparçacık temelli üre biyosensörünün K_m değeri 52 mM olarak bildirilmiştir (Gabrovskaya vd. 2011). Benzer şekilde Shu ve Lu tarafından geliştirilen iletken polimer (polianilin) temelli üre biyosensörüne ait K_m değeri 1,38 mM olarak bildirilmiştir (Shu ve Lu 2012). Görüldüğü üzere, tez çalışması kapsamında üre analizi için tasarlanan

biyosensörünün K_m değeri literatüre göre oldukça düşüktür. Düşük K_m değeri, immobilize enzimin aktif merkezine substratın kolay bir şekilde erişilebildiğini yani enzim-substrat ilgisinin oldukça yüksek olduğunu temsil etmektedir.



Şekil 4.58. Pt/Naylon 6-MWCNT-Fc/Üreaz biyosensörünün ardışık üre ilavesi sonrası elde edilen **a)** akım-zaman grafiği ve **b)** akım-konsantrasyon grafiği (-0,2 V, 0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)

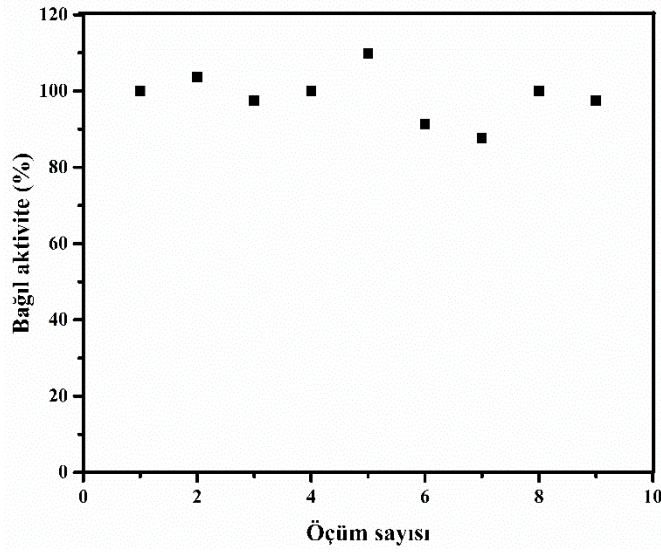
Çizelge 4.15. Pt/Naylon 6-MWCNT-Fc/Üreaz biyosensörünün analitik performansı

LOD (μM)	1. Lineer aralık (mM)	Duyarlılık ($\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$)	2. Lineer aralık (mM)	Duyarlılık ($\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$)	3. Lineer aralık (mM)	Duyarlılık ($\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$)
9,33	0,25-5,25	325,74	6,25-46,25	31,21	71,25-4146,25	1,74

Tasarlanan bu biyosensörün performansı, literatürde yer alan Derviseviç ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları Fc-poli(amidoamin)/MWCNT temelli üreaz biyosensörüne göre hem duyarlılık ($1,085 \mu\text{A}/\text{cm}^2\cdot\text{mM}$) hem de lineer aralık değeri açısından (0,2-1,8 mM) oldukça üstündür (Derviseviç vd. 2017). Üre analizi için literatürde bildirilen bir başka çalışma Vostiar ve arkadaşlarının hazırladıkları politoluidin mavisi temelli üre biyosensörüdür. Vostiar ve arkadaşlarının bildirdikleri lineer aralık ve duyarlılık değerleri sırasıyla $200\text{-}800 \mu\text{M}$ ve $0,98 \mu\text{A}/\text{cm}^2\cdot\text{mM}$ 'dir (Vostiar vd. 2002). Nduyen ve arkadaşlarının bildirdiği $\text{NiCo}_2\text{O}_4/3\text{D}$ grafen kompozit temelli üre biyosensörünün duyarlılık ve lineer aralık değerleri ise sırasıyla $166 \mu\text{A}/\text{cm}^2\cdot\text{mM}$ ve $60\text{-}300 \mu\text{M}$ 'dir (Nguyen vd. 2016). Görüldüğü üzere geliştirilen üre biyosensörünün analitik performansı duyarlılık ve lineer aralık açısından bildirilen birçok çalışmadan oldukça üstündür. Özellikle lineer aralık açısından tasarlanan biyosensör neredeyse 13000 kat daha geniş bir aralıkta tayine olanak sağlamaktadır. Naylon-6 kimyasal yapısında bulunan $-\text{NH}$ grubunun varlığı, yüksek enzim-GA etkileşimleri ile immobilizasyonu kolaylaştırdığı için bu yüksek etkileşim sayesinde maksimum enzim aktivitesinden faydalanılarak üstün hassasiyet elde edildiği düşünülmüştür. Tez çalışması kapsamında hazırlanan elektro-eğirilmiş nanoliflerin geniş yüzey alanından ve MWCNT'nin üstün iletkenliğinden yararlanılarak literatürden 2 kat daha fazla hassasiyet ile ürenin tayini için nispeten kolay ve uygun maliyetli alternatif bir yöntem geliştirilmiştir.

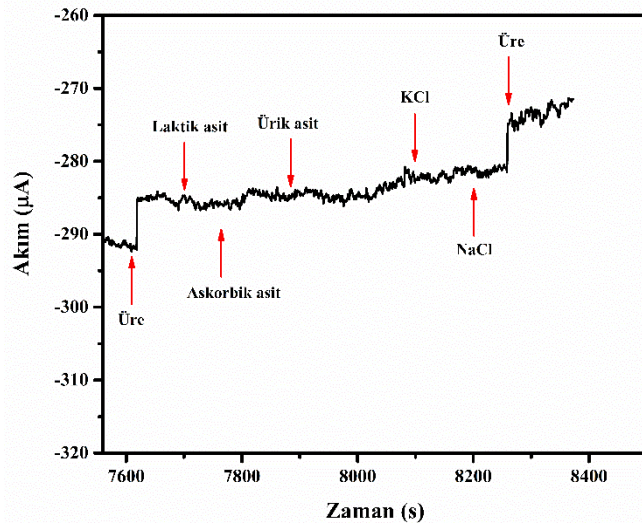
4.3.3.4. Kullanım kararlılığı, gerçek numune ve girişim etkisinin incelenmesi

Ardışık ölçümler sırasında ölçüm hassasiyetinde oluşan kayıp, biyosensörlerin pratik kullanımındaki en ciddi sınırlamalardan biridir (Rinken 2013). Pt/Naylon 6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörünü stabilite açısından değerlendirmek için hazırlanan elektrot ile aynı koşullar altında ardışık olarak 10 kez üre analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.59). Her bir ölçüm sonucunda elde edilen standart sapma $\pm 6,09$ ve RSD %6,17 ($n=10$) olarak hesaplanmıştır. %6,17 bağıl standart sapma ile elde edilen sonuçlar, biyosensörün kabul edilebilir yeniden üretilebilirliğe sahip olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.59. Pt/Naylon 6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörünün kararlılık analizi sonrası elde edilen %bağlı aktivite-ölçüm sayısı grafiği (0,10 M pH 8,0 PBS, 0,005 mM üre, 25 °C)

Klinik uygulamalarda tasarlanan biyosensörün davranışını değerlendirmek için gerçek numunelerde bulunabilen çeşitli interferantların (glikoz, ürik asit, askorbik asit, laktik asit, NaCl ve KCl) olası etkileri incelenmiştir. Şekil 4.60, üreye göre 1:10 oranında hazırlanan interferantların ortama eklenmesi sonucu akımda meydana gelen değişikliği temsil etmektedir. Buna göre, glikoz %8,57, laktik asit %8,57, askorbik asit %2,86, ürik asit %22,86, NaCl %8,57 ve KCl ise %31,43 oranında girişim etkisi göstermiştir. Sonuç olarak, interferantların 0,0125 mM üre çözeltisine eklenmesi ile akımda önemli ölçüde bir değişiklik gözlenmemiş olup seçilen potansiyelde herhangi bir girişim etkisi söz konusu olmaksızın sadece analit olan üreye karşı yanıt alındığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.60. Pt/Naylon-6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörünün -0,2 V çalışma potansiyelinde girişim yapabilecek türlerin etkisi için elde edilen kronoamperogram (0,1 M pH 8,0 PBS, 25 °C)

Gözlemlenen sınırlı girişim etkisi, geliştirilen biyosensörün pratik uygulamalar için yüksek potansiyele sahip olduğunu kanıtlamıştır. Gerçek numune analizi için insan idrar numuneleri kullanılmıştır. Bu amaçla, hazırlanan biyosensörler ile optimum şartlarda akım sabit hale geldikten sonra ortama 1:1 oranında seyreltilmiş insan idrar numunesi eklenmiştir ve bu analiz 3 tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda referans metotta göre elde edilen geri kazanım değerleri sırasıyla %105,64, %101,99 ve %103,26 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre geliştirilen biyosensörlerin, insan serumu gibi karmaşık bir numunede yalnızca istenen analitleri seçici olarak tespit etme yeteneğini kanıtlanmıştır.

5. SONUÇLAR

Nanoliflerin çalışma elektrotunda kullanılmasının biyosensörün analitik performansı üzerinde olumlu katkısı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle tez çalışmasının ilk kısmında yüzey baskılı elektrotlar üzerinde homojen ve düzgün morfolojiye sahip nanoliflerin elde edilmesi için taşıyıcı polimer olarak suda çözünmeyen, iyi mekanik özelliklere sahip PAN tercih edilmiştir.

- YBCE'ler üzerinde nanolif elde etmek amacıyla kütlece farklı konsantrasyonlarda (%10, %7, %5 ve %4) PAN-DMF çözeltileri hazırlanmıştır. Elektro-eğirme yöntemi kullanılarak YBCE'lerin çalışma elektrotu üzerinde tutunabilen ve homojen morfolojiye sahip nanolif eldesi için en uygun konsantrasyon kütlece %4 PAN-DMF çözeltisi olduğu belirlenmiştir.
- PAN nanolifleri için optimum elektro-eğirme koşulları akış hızı: 0,5 ml/saat, potansiyel: 20 kV ve iğne ile toplayıcı arasındaki mesafe: 30 cm olarak belirlenmiş ve nanolif çapı yaklaşık olarak 312 ± 2 nm olarak hesaplanmıştır.
- YBCE/PAN-NFs/GOx biyosensörü için uygun çalışma koşullarının pH 7,4'de ve +0,7 V olduğu ve sensörün 0,01-4,60 mM aralığında $35,98 \mu\text{A}/\text{mM.cm}^2$ duyarlılık ve $3,19 \mu\text{M}$ LOD ile glikoz tayininde kullanılabileceği belirlenmiştir. Bu sensörün tekrar kullanılabilirliği $n=20$ ölçüm için test edilmiş ve standart sapma $\pm 8,07$ ve varyasyon katsayısı (cv) %9,48 olarak hesaplanmıştır. Bu biyosensörün girişim yapabilecek türlere (sakkaroz, askorbik asit, fruktoz ve sitrik asit) karşı tepkisi değerlendirilmiş olup askorbik asitin %14,26, sitrik asitin %7,27 oranında girişim yaptığı, sakkaroz ve son olarak da fruktozun ise kayda değer bir oranda girişim yapmadığı tespit edilmiştir.
- Gerçek numune çalışmasında ise, ticari olarak temin edilen çeşitli meyve suları kullanılmıştır. Vişne meyve suyu için geri kazanım değeri %98,55 ve karışık meyve suyu için geri kazanım değerinin ise %99,32 olarak hesaplanmıştır.

Tez çalışmasının bir başka amacı medyatör temelli nanolif matrisinin tasarlanması ve bu matrislerin biyosensörlerinin geliştirilmesinde kullanımını içermektedir. Bu amaçla tiyonin, metilen mavisi ve nötral kırmızı boyaları medyatör olarak kullanılmıştır ve bu çalışmalarda medyatör miktarı, elektro-eğirme süresi gibi bazı parametreler optimize edilmiştir. Ayrıca, mediyatörlerin elektrot yüzeyinde elektrokimyasal polimerizasyonu ve nanolif yapısına MWCNT ilave edilmesi gibi katkılar değerlendirilmiştir.

- YBCE'ler üzerinde Tiyonin (TH) medyatörü içeren nanoliflerin eldesi için, 1 mM tiyonin içeren kütlece %4 PAN-DMF çözeltisi hazırlanmış ve akış hızı: 0,5 mL/dk, voltaj: 20 kV ve iğne ile toplayıcı arasındaki mesafe: 20 cm olduğu şartlarda elektro-eğirme yöntemi kullanılarak nanolif eldesi sağlanmış ve nanolif çapı 206 ± 3 nm olarak hesaplanmıştır.
- YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörleri için optimum pH değeri 7,0, çalışma potansiyeli -0,4 V, optimum medyatör miktarı 1 mM ve elektro-eğirme süresi 20 dk olarak belirlenmiştir.
- YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörünün duyarlılığının $126,73 \mu\text{A}/\text{mM.cm}^2$, lineer aralığının 0,01-0,7 mM arasında olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile PAN nanolif yapısına TH mediyatörünün eklemesinin sensörün duyarlılığının geliştirilmesi çok önemli katkı yaptığı görülmüştür.

- YBCE/PAN-TH-NFs/GOx biyosensörünün kararlılığının değerlendirilmesi için oda koşullarında, bir gün içerisinde arka arkaya 20 kronoamperometri çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda RSD değeri %8,27 (n=20) olarak hesaplanmış olup 20. kullanımda bile aktivitesinin %71,04'ünü korumuştur.
- YBCE/PAN-TH-NFs/GOx için hem -0,4 V hem de +0,7 V'da girişim çalışması yapılmış olup, her iki potansiyelde de bu sakkaroz, askorbik asit, sitrik asit ve früktoza karşı kayda değer bir oranda yanıt alınmamıştır. Bu durum geliştirilen biyosensörün oldukça seçici olduğunu kanıtlamıştır. Ayrıca, meyve suları gerçek numune olarak kullanılmış ve her iki potansiyelde de referans metoda karşılık hesaplanan geri kazanım değerleri %98 ile %101 arasında bulunmuştur.

Literatürde TH'nin kullanımı içeren çalışmaların tamamında mediyatör YBCE üzerinde elektrokimyasal polimerizasyona tabi tutulmuştur. Bu nedenle tasarlanan biyosensörün performansına nanolif matrisinde bulunan TH'nin polimerizasyonunun etkisinin olup olmayacağı araştırılmıştır. Bu amaçla YBCE/PAN-TH-NFs/PTH/GOx biyosensörü hazırlanmıştır. Grafen, karbon nanotüpler, altın nanopartiküller gibi çeşitli nanomalzemelerin kullanımı, yüksek iletkenlikleri sayesinde enzim ile elektrot arasındaki elektron transferinin hızlanması ve elektrot yüzey alanının artması nedeniyle daha yüksek hassasiyette biyosensörlerin tasarlanmasına olanak sağlamaktadır. Literatürce biyosensör performansı üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu bilinen MWCNT'nin elektro-eğirme çözeltisine eklenmesi ile nanolif kaplı elektrotlar daha sonra da YBCE/PAN-MWCNT-TH-NFs/GOx hazırlanmıştır.

- YBCE/PAN-TH-NFs/PTH/GOx duyarlılığı $65,45 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ olarak bulunmuştur. Bu değer polimerizasyon yapılmaksızın hazırlanan sensörüne neredeyse yarısı kadardır. Polimerizasyon işleminin, geliştirilen biyosensörün performansına olumlu bir yönde katkısının olmaması matrisin yüzey alanının azalması ile ilişkilendirilmiştir.
- YBCE/PAN-MWCNT-TH-NFs/GOx biyosensör için duyarlılık ve lineer aralık değerleri sırasıyla $121,17 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ ve 0,01-0,30 mM olarak belirlenmiştir. Nanolif yapısına MWCNT eklenmesinin analitik performansının geliştirilmesine katkı sağlamadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak polimerizasyon ve ek malzeme eklemeksizin hazırlan PAN-TH-NFs matrisinin GOx immobilizasyonu için ek işlem ve maliyet gerektirmeyen en uygun matris olduğu anlaşılmıştır.

Tez çalışması kapsamında incelenen bir diğer mediyatör metilen mavisi (MB) olup, bu mediyatör ve PAN kullanılarak YBCE/PAN-MB-NFs/GOx ve YBCE/PAN-MB-NFs/PMB/GOx biyosensörleri hazırlanmıştır.

- YBCE'ler üzerinde nanoliflerin eldesi için, çeşitli miktarlarda MB içeren küttelece %4 PAN-DMF çözeltisi hazırlanmış ve akış hızı: 0,5 mL/dk, voltaj: 20 kV ve iğne ile toplayıcı arasındaki mesafe: 20 cm olduğu şartlarda elektro-eğirme yöntemi kullanılarak nanolif eldesi sağlanmıştır.
- YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörleri için optimum pH değeri 7,0, çalışma potansiyeli -0,35 V, optimum MB miktarı 0,5 mM ve elektro-eğirme süresi 20 dk olarak belirlenmiş ve matris olarak kullanılan nanoliflerin çapı 185 ± 4 nm olarak hesaplanmıştır.

- YBCE/PAN-MB-NFs/GOx biyosensörünün duyarlılığının $110,8 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$, lineer aralığı $0,01-0,6 \text{ mM}$ ve LOD değeri ise $1,33 \mu\text{M}$ olarak belirlenmiştir.
- Polimerizasyon etkisini incelemek üzere hazırlanan YBCE/PAN-MB-NFs/PMB/GOx biyosensörü için $-0,35 \text{ V}$ 'da kronoamperometri çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonrası hesaplanan duyarlılık değeri $68,79 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ ve biyosensörün lineer aralığı da $0,01-0,7 \text{ mM}$ 'dır. Sonuç olarak polimerizasyonun biyosensör performansına katkısının olmadığı görülmüştür.

GOx temelli biyosensörler arasında nötral red (NR) boyası medyatör olarak incelenen son türdür. PAN-DMF çözeltisi içerisine 1 mM NR ilave edilerek hazırlanan çözelti ile YBCE'ler üzerinde elektro-eğirme yöntemi kullanılarak medyatör katkılı nanolifler (YBCE/PAN-NR-NFs) elde edilmiş ve glikoz biyosensörleri hazırlanmıştır.

- YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörü için en uygun enzim miktarı $91,57 \text{ U}$, optimum pH değeri $7,0$ ve optimum çalışma potansiyeli değeri ise $-0,50 \text{ V}$ olarak belirlenmiştir.
- YBCE/PAN-NR-NFs/GOx biyosensörünün duyarlılığı $99,19 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$, LOD değeri $0,068 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Bu biyosensörün $0,01$ ile $0,6 \text{ mM}$ aralığında doğrusal tepki verdiği görülmüştür.
- GOx temelli biyosensörler arasında değerlendirme yapıldığında TH, MB ve NR medyatörlerinin ortama ilave edilmesinin yalnız PAN-NFs matrisine kıyasla özellikle duyarlılığı artırdığı tespit edilmiştir.
- Glikoz tayini için tasarlanan nanolif temelli GOx biyosensörleri karşılaştırıldığında kullanılan medyatörlerin duyarlılık sıralamasının $\text{TH} > \text{MB} > \text{NR}$ şeklinde olduğu görülmüştür.

Tez kapsamında fenolik bileşiklerin tayini için tasarlanan Polifenol oksidaz (PPO) temelli biyosensör matris olarak $\%7 \text{ PAN}$ ve $\%0,7 \text{ MWCNT}$ karışımından hazırlanan nanolifleri içermektedir. Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörü çevre kirleticiliği açısından önemli olan katekol, fenol ve p-klorofenol tayininde kullanılmıştır.

- Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörünün katekole karşı duyarlılığı $366 \text{ mA}/\text{M}\cdot\text{cm}^2$ lineer aralığı $0,06-16 \mu\text{M}$ ve LOD değeri $4,3 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır.
- Aynı sensörün fenole karşı duyarlılığı ve LOD değeri sırası ile $14,67 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ ve $0,4 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır.
- p-klorofenol karşı gözlemlenen duyarlılık ve LOD değeri sırası ile $25 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ ve $0,1 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır.
- Geliştirilen Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO biyosensörleri tez çalışması kapsamında incelenen fenolik bileşiklerde bulunan hidroksil, karboksil ve halojenür gibi grupların amperometrik cevap üzerine etkisi incelendiğinde katekol > 4 -klorofenol $>$ fenol şeklinde olduğu görülmüştür.
- Katekol, tez kapsamında kullanılan diğer fenolik bileşiklere göre daha yüksek bir değerde duyarlılık gösterdiği için kararlılık çalışması sadece bu analit ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla optimum şartlarda hazırlanan biyosensör ile oda koşullarında, bir gün içerisinde arka arkaya 20 kronoamperometri çalışması yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda RSD değeri $\%14,17$ ($n=20$) olarak hesaplanmış olup 20 . kullanımda bile $\%75$ aktivite göstermektedir.
- Hazırlanan biyosensörün raf ömrü de benzer bir şekilde test edilmiştir. Bu amaçla ardışık olarak 7 gün boyunca her gün ve daha sonra da sırasıyla 14.gün 21.gün,

28. gün ve 35. gün olmak üzere farklı sürelerde aynı biyosensör ile optimum şartlarda kronoamperometri çalışması yapılmıştır ve ilk 20 gün sonunda depolama depolama ömrü, ilk performansın %85'inden fazlasını korumuş, 35. gün sonunda ise ilk güne göre yaklaşık %50 oranında düşmüştür.

- Önerilen matris, hem mono- hem de difenollerini tespit edebildiğinden geliştirilen biyosensör, musluk suyu numunelerindeki fenol içeriğini test etmek için kullanılmıştır. Standart ekleme yöntemi kullanılarak çeşme suyu üç fenol bileşiği ile testler yapılmış ve analizin doğruluğu hesaplanarak % geri kazanım değerleri belirlenmiştir ve önerilen biyosensörün su kaynaklarındaki eser miktardaki fenolik kirleticilerin tespitinde başarılı bir şekilde uygulanabileceği düşünülmüştür.

Tez kapsamında üre tayini için Üreaz temelli biyosensörler hem YBCE hem de Pt elektrot kullanarak hazırlanmıştır. YBCE'ler üzerinde elde edilen PAN-MWCNT-NFs, PAN-MWCNT-TH-NFs ve PAN-MWCNT-AuNP-Fc-NFs matrisleri ile gerçekleştirilen üre analizleri olumsuz olarak sonuçlanmıştır. Bu nedenle elektrot türü değiştirilmiştir. Pt elektrot üzerinde ise PAN-MWCNT-Fc-NFs matrisi incelenmiştir. Bu çalışma ile YBCE elektrot yerine Pt kullanılmasının Üreaz temelli biyosensörlerin hazırlaması için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

- Tez çalışması kapsamında üre analizinin gerçekleştirilmesi amacıyla Pt elektrot üzerinde Nylon 6-MWCNT-Fc içeren nanolifler elektro-eğirme yöntemi ile elde edilmiştir (Akış hızı: 0,03 mL/dk, potansiyel: 20 kV ve mesafe: 8 cm).

- Pt/Nylon-6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörleri ile üre analizi için belirlenen optimizasyon parametreleri şu şekildedir: pH 8,0, çalışma potansiyeli -0,2 V ve enzim miktarı ise 30 U.

- Pt/Nylon-6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörleri ile analitik performansının belirlenmesi amacıyla kronoamperometri çalışması yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda 3 lineer aralık belirlenmiştir. 1. Lineer aralık ve onun için hesaplanan duyarlılık değeri sırasıyla 0,25-5,25 mM ve 325,74 $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ olarak, 2. Lineer aralık ve onun için hesaplanan duyarlılık değeri sırasıyla 6,25-46,25 mM ve 31,1 $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ olarak ve son olarak da 3. lineer aralık ve onun için hesaplanan duyarlılık değeri sırasıyla 71,25-4146,25 mM ve 1,74 $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ olarak tespit edilmiştir.

- Pt/Nylon-6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörünü stabilite açısından değerlendirmek için hazırlanan elektrot ile aynı koşullar altında ardışık olarak 10 kez üre analizi gerçekleştirilmiştir. Her bir ölçüm sonucunda elde edilen standart sapma $\pm 6,09$ ve RSD %6,17 (n=10) olarak hesaplanmıştır.

- Klinik uygulamalarda tasarlanan biyosensörün davranışını değerlendirmek için gerçek numunelerde bulunabilen çeşitli interferansların (glukoz, ürik asit, askorbik asit, laktik asit, NaCl ve KCl) olası etkileri incelenmiştir. Buna göre, glukoz %8,57, laktik asit %8,57, askorbik asit %2,86, ürik asit %22,86, NaCl %8,57 ve KCl ise %31,43 oranında girişim etkisi göstermiştir.

- Pt/Nylon 6-MWCNT-Fc-NFs/Üreaz biyosensörü ile gerçek numune analizi için insan idrar numunesi kullanılmıştır. Referans metoda karşı hesaplanan geri kazanım değeri ortalama %103,63 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 5.1. Tez kapsamında hazırlanan tüm biyosensörlerin analitik performansı

Biyosensör	Elektrot Türü	Medyatör	Enzim	Analit	Duyarlılık ($\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$)	LOD (μM)	Geri Kazanım (%)	RSD (%)
YBCE/PAN-NFs/GOx	YBCE	-	GOx	Glikoz	35,98 4,99	2,43	Vişne Suyu %98,55	9,48 (n=20)
YBCE/PAN-TH-NFs/GOx	YBCE	TH	GOx	Glikoz	126,73 (-0,40 V) 34,66 (+0,7 V) 11,53 (+0,7 V)	1,17	Vişne Suyu %100,66	8,27 (n=20)
YBCE/PAN-TH-NFs/PTH/GOx	YBCE	TH	GOx	Glikoz	65,45	-	-	-
YBCE/PAN-MWCNT/TH-NFs/GOx	YBCE	TH	GOx	Glikoz	121,17	-	-	-
YBCE/PAN-MB-NFs/GOx	YBCE	MB	GOx	Glikoz	110,80 (-0,35 V) 51,08 (+0,7 V)	1,33	Vişne Suyu %100,65	10,95 (n=17)
YBCE/PAN-MB-NFs/PMB/GOx	YBCE	MB	GOx	Glikoz	68,79	-	-	-

YBCE/PAN-NR-NFs/GOx	YBCE	NR	GOx	Glikoz	99,19	0,068	Vişne Suyu %100,37	11,70 (n=20)
Pt/PAN-MWCNT-NFs/PPO	Pt disk	-	PPO	Katekol	366	4,37x10 ⁻³	Çeşme Suyu %98,43	14,17 (n=20)
				p-klorofenol	25	0,1		
				Fenol	14,67	0,41		
Pt/Naylon 6-MWCNT-Fc-Nfs/Üreaz	Pt disk	Fc	Üreaz	Üre	325,74 31,21 1,74	9,33	İdrar %103,63	6,17 (n=10)

6. KAYNAKLAR

- Ahangari, H., Kurbanoglu, S., Ehsani, A., Uslu, B. 2021. Latest trends for biogenic amines detection in foods: Enzymatic biosensors and nanozymes applications. *Trends Food Sci. Technol.*, 112: 75–87.
- Ahmad, N.M., Abdullah, J., Yusof, N.A., Rashid, A.H.A., Rahman, S.A., Hasan, M.R. 2016. Amperometric Biosensor Based on Zirconium Oxide/Polyethylene Glycol/Tyrosinase Composite Film for the Detection of Phenolic Compounds. *Biosensors*, 6: 31.
- Akyilmaz, E., Kozgus, O., Türkmen, H., Çetinkaya, B. 2010. A mediated polyphenol oxidase biosensor immobilized by electropolymerization of 1,2-diamino benzene. *Bioelectrochemistry*, 78: 135–140.
- Alvarado-Ramírez, L., Rostro-Alanis, M.; Rodríguez-Rodríguez, J.; Castillo-Zacarias, C.; Sosa-Hernández, J.E.; Barceló, D.; Iqbal, H.M.; Parra-Saldívar, R. 2021. Exploring current tendencies in techniques and materials for immobilization of laccases—A review. *Int. J. Biol. Macromol.*, 181: 683–696.
- Anton, F. 1934. Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads. U.S. Patent No 1,975,504, 2 October 1934.
- Apetrei, C., Rodríguez-Méndez, M.L., De Saja, J.A. 2011. Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized phosphate-doped polypyrrole film as an immobilization support. Application for detection of phenolic compounds. *Electrochimica Acta*, 56: 8919–8925.
- Apetrei, R.M., Camurlu, P. 2010. The effect of montmorillonite functionalization on the performance of glucose biosensors based on composite montmorillonite/PAN nanofibers. *Electrochim. Acta*, 353: 136484.
- Apetrei, R.M., Guven, N., Camurlu, P. 2022. Biosensing Efficiency of Nanocarbon-Reinforced Polyacrylonitrile Nanofibrous Matrices. *Journal of The Electrochemical Society*, 169: 020548.
- Armbruster, D.A., Pry, T. 2008. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin. Biochem. Rev.*, 29: S49.
- Auffan, M., Santaella, C., Thie'ry, A., Paille's, C., Rose, J., Achouak, W., Thill, A., Masion, A., Wiesner, M., Bottero, J.Y., Mouchet, F., Landois, P., Bourdiol, F., Fourquaux, I., vd. 2012. Encyclopedia of Nanotechnology, Springer Netherlands, Dordrecht, 2012, pp. 769–775.
- Aydın, E.B., Aydın, M., Sezgintürk, M.K. 2019. Biosensors and the evaluation of food contaminant biosensors in terms of their performance criteria. *International journal of environmental analytical chemistry*, 100 (5): 602–622.
- Bae, T.S., Shin, E., Im, J.S., Kim, J.G., Lee, Y.S. 2012. Effects of carbon structure orientation on the performance of glucose sensors fabricated from electrospun carbon fibers. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 358 (3): 544–549.
- Bahadır, E.B. and Sezgintürk, M.K. 2016. Food Biosensors: Perspective, Reliability, Selectivity, Response Time, Quality Control, and Cost-Effectiveness. *Food Biosens.* Chapter 20: 463.

- Balogh-Weiser, D., Németh, C., Ender, F., Gyarmati, B., Szilágyi, A., Poppe, L. 2018. Electrospun Nanofibers for Entrapment of Biomolecules. Electrospinning Method Used to Create Functional Nanocomposites Films. *Electrospinning Method Used to Create Functional Nanocomposites Films*, pp. 135-147.
- Bankar, S.B., Bule, M.V., Singhal, R.S., Ananthanarayan, L. 2009. Glucose oxidase — An overview. *Biotechnology Advances*, 27: 489–501.
- Banks, C.E., Davies, T.J., Wildgoose, G.G., Compton, R.G. 2005. Electrocatalysis at graphite and carbon nanotube modified electrodes: edge-plane sites and tube ends are the reactive sites, *Chem. Commun.*, 829–841.
- Bard, A.J. and Faulkner, L.R. 2001. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd Edition, Wiley.
- Barsan, M.M., and Brett, C.M.A. 2009. A new modified conducting carbon composite electrode as sensor for ascorbate and biosensor for glucose. *Bioelectrochemistry*, 76: 135–140.
- Batool, R., Rhouati, A., Nawaz, M.S., Hayat, A., Marty, J.L. 2019. A Review of the Construction of Nano Hybrids for Electrochemical Biosensing of Glucose. *Biosensors*, 46: 1-19.
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., Rizzolio, F. 2020. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25 (112): 1-15.
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., Estrela, P. 2016. Introduction to biosensors. *Essays Biochem.*, 60: 1–8.
- Bhardwaj, N. and Kundu, S.C. 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28: 325–347.
- Bounegru, A. and Apetrei, C. 2021. Laccase and Tyrosinase Biosensors Used in the Determination of Hydroxycinnamic Acids. *Int. J. Mol. Sci.*, 22: 4811.
- Bourigua, S., Hafaid, I., Korri-Yousoufi, H., Maaref, A., Jaffrezic-Renault, N. 2009. A Novel Urea Biosensor Based on Modified Electrodes with Urease Immobilized on Poly(N-hydroxyphthalimide-pyrrole-co-pyrrole) Film Incorporating Ethyl Amine Ferrocene as Redox Marker. *Sensor Letters*, 7 (5): 731-738.
- Bourourou, M., Holzinger, M., Bossard, F., Huguenel, F., Maaref, A., Cosnier, S. 2015. Chemically reduced electrospun polyacrylonitrile– carbon nanotube nanofibers hydrogels as electrode material for bioelectrochemical applications. *Carbon*, 87: 233-238.
- Boyce, S. and Tipton, K.F. 2001. Enzyme Classification and Nomenclature. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-12.
- Bozgeyik, I., Senel, M., Çevik, E., Abasıyanık, M.F. 2011. A novel thin film amperometric urea biosensor based on urease-immobilized on poly(N-glycidylpyrrole-co-pyrrole). *Current Applied Physics*, 11: 1083e1088.
- Briggs, G.E. and Haldane, J.B.S. 1925. A note on the kinetics of enzyme action. *Biochem. J.*, 19: 338.

- Callahan, B.P., Yuan, Y., Wolfenden, R., 2005. The burden borne by urease. *J. Am. Chem. Soc.*, 127: 10828-10829.
- Campanella, L., Beone, T., Sammartino, M.P., Tomasetti, M., 1993. Determination of phenol in wastes and water using an enzyme sensor. *Analyst*, 118 (8): 979–986.
- Cardona, P.J., Soto, C.Y., Giquel, B., August, G., Guirado, E., Sirakova, T., Kolattukudy, P., Julia' n, E., Luquin, M. 2006. Neutral-red reaction is related to virulence and cell wall methyl-branched lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb. Infect.*, 8: 183-190.
- Carlini, C.R. and Ligabue-Braun, R. 2016. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. *Toxicon*, 110: 90e109.
- Chandra, P. 2016. Nanobiosensors for Personalized and Onsite Biomedical Diagnosis, *Institution of Engineering and Technology*.
- Chen, K., Chou, W., Liu, L., Cui, Y., Xue, P., Jia, M. 2019. Electrochemical Sensors Fabricated by Electrospinning Technology: An Overview. *Sensors*, 19 (3676): 1-19.
- Cho, I.H., Kim, D.H., Park, S. 2020. Electrochemical biosensors: perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. *Biomaterials Research*, 24: 6.
- Choi, B., Rempala, G.A., Kim, J.K.K. 2017. Beyond the Michaelis-Menten equation: Accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. *Scientific Reports*, 7, Article number: 17018.
- Clark, Jr.L.C., ve Lyons, C. 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 105: 20-45.
- Cui, G., Hyun, J., Joung, Y., Lee, S., Yoo, J., Uhm, J.H., Cha, G.S., Nam, H. 2001. Effect of pre-treatment on the surface and electrochemical properties of screen-printed carbon paste electrodes. *Analyst*, 126: 1399–1403.
- Çetin, M.Z., Çamurlu, P. 2017. Utilization of Polypyrrole Nanofibers in Glucose Detection. *Journal of The Electrochemical Society*, 164: B585-B590.
- Das, G., and Yoon, H. 2015. Amperometric urea biosensors based on sulfonated graphene/polyaniline nanocomposite. *International Journal of Nanomedicine*, 10: 55–66.
- De Cruz, G., Abdullah, J., Sidek, H., Rahman, S.A., Azmi, N.E. 2011. Electrooxidative Polymerization of Methylene Blue on Screen Printed Carbon Paste Electrode and Its Application in NADH Determination. *Sensor letters*, 9: 1–6.
- Dede, S. and Altay, F. 2018. Biosensors from the First Generation to Nano-biosensors. *International Advanced Researches and Engineering Journal*, 02(02): 200-207.
- Demir, F. 2019. tiyazol süstitüe ftalosiyeninlerin sentezi ve biyosensör özelliklerinin incelenmesi. Doktora tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 112 s.
- Deng, C., Li, M., Xie, Q., Liu, M., Yang, Q., Xiang, C., Yao, S. 2007. Construction as well as EQCM and SECM characterizations of a novel Nafion/glucose oxidase-glutaraldehyde/poly(thionine)/Au enzyme electrode for glucose sensing. *Sensors and Actuators B*, 122: 148–157.

- Deng, C.Y., Li, M.R., Xie, Q.J., Liu, M.L., Tan, Y.M., Xu, X.H., Yao, S.Z. 2006. New glucose biosensor based on an poly(o-phenyldiamine)/glucose oxidase/glutaraldehyde/ Prussian blue/Au electrode with QCM monitoring of various electrode-surface modification. *Anal. Chim. Acta.*, 557:85
- Dervisevic, M. Dervisevic, E., Şenel, M. 2018. Design of amperometric urea biosensor based on Self-Assembled Monolayer of Cystamine/PAMAM-grafted MWCNT/Urease. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 254: 93-101.
- Dervisevic, M., Dervisevic, E., Senel, M. 2018. Design of amperometric urea biosensor based on Self-Assembled Monolayer of Cystamine/PAMAM-grafted MWCNT/Urease. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 254: 93-101.
- Dilgin, Y., Gorton, L., Nisli, G. 2007. Photoelectrocatalytic oxidation of NADH with electropolymerized toluidine blue O. *Electroanalysis*, 19: 286–293.
- Dincer, C., Bruch, R., Costa-Rama, E., Fernández-Abedul, M.T., Merkoçi, A., Manz, A., Urban, G.A., Güder, F. 2019. Disposable Sensors in Diagnostics, Food, and Environmental Monitoring. *Adv. Mater.*, 31: 1806739.
- Dong, W., Han, J., Shi, J., Liang, W., Zhang, Y., Dong, C. 2017. Amperometric Biosensor for Detection of Phenolic Compounds Based on Tyrosinase, N-Acetyl-L-cysteine-capped Gold Nanoparticles and Chitosan Nanocomposite, *Chin. J. Chem.*, 35(8): 1305-1310.
- Doshi, J., Reneker, D.H. 1995. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J. Electrostat.*, 35: 151–160.
- Ducey Jr, M.W., and Meyerhoff, M.E. 1998. Microporous gold electrodes as combined biosensor/electrochemical detectors in flowing streams, *Electroanalysis*, 10(3): 157-162.
- Ekabutr, P., Chailapakul, O., Supaphol, P. 2013. Modification of disposable screen-printed carbon electrode surfaces with conductive electrospun nanofibers for biosensor applications. *J. Appl. Polym. Sci.*, 130 (6): 3885-3895.
- Ekabutr, P., Sangsanoh, P., Rattanarat, P., Monroe, C.W., Chailapakul, O., Supaphol, P. 2014. Development of a Disposable Electrode Modified with Carbonized, Graphene-Loaded Nanofiber for the Detection of Dopamine in Human Serum. *J. Appl. Polym. Sci.*, 131 (19): 1-9.
- Ensafi, A.A. 2019. An introduction to sensors and biosensors. In *Electrochemical Biosensors*, 1st ed.; Ensafi, A.A., Ed.; Elsevier: Cambridge, MA, USA, pp. 1–10.
- Ensafi, A.A., Karimi-Maleh, H., Ghiaci, M., Arshadi, M. 2011. Characterization of Mn-nanoparticles decorated organo-functionalized SiO₂-Al₂O₃ mixed-oxide as a novel electrochemical sensor: Application for voltammetric determination of captopril. *J. Mater. Chem.*, 21: 15022–15030.
- Erdem, A., Kerman, K., Meric, B., Akarca, U.S., Ozsoz, M. 2000. Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virüs. *Analytica Chimica Acta*, 422: 139–149.

- Fang, D., Gao, G., Yang, Y., Wang, Y., Gao, L., Zhi, J. 2020. Redox Mediator-Based Microbial Biosensors for Acute Water Toxicity Assessment: A Critical Review. *ChemElectroChem.*, 7: 2513–2526.
- Fartas, F.M., Abdullah, J., Yusof, N.A., Sulaiman, Y., Saiman, M.I. 2017. Biosensor Based on Tyrosinase Immobilized on Graphene-Decorated Gold Nanoparticle/Chitosan for Phenolic Detection in Aqueous. *Sensors*, 17: 1132.
- Feng, H., Wang, H., Zhang, Y., Yan, B., Shen, G., Yu, R. 2007. A Direct Electrochemical Biosensing Platform Constructed by Incorporating Carbon Nanotubes and Gold Nanoparticles onto Redox Poly(thionine) Film. *Anal. Sci.*, 23: 235.
- Fiorentino, D., Gallone, A., Fiocco, D., Palazzo, G., Mallardi, A. 2010. Mushroom tyrosinase in polyelectrolyte multilayers as an optical biosensor for o-diphenols. *Biosens. Bioelectron.*, 25: 2033–2037.
- Fong, H., Chun, I., Reneker, D.H. 1999. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer*, 40: 4585–4592.
- Formhals, A. 1934. US Patent 1,975,504.
- Fracchiolla, N., Artuso, S., Cortelezzi, A. 2013. Biosensors in clinical practice: focus on oncohematology. *Sensors*, 13: 6423–6447.
- Fuenmayor, C.A., Lemma, S.M., Mannino, S., Mimmo, T., Scampicchi, M. 2014. Filtration of apple juice by nylon nanofibrous membranes. *Journal of Food Engineering*, 122: 110–116.
- Gabrovska, K., Georgieva, A., Godjevargova, T., Stoilova, O., Manolova, N. 2007. Poly(acrylonitrile)chitosan composite membranes for urease immobilization. *Journal of Biotechnology*, 129: 674–680.
- García-Guzmán, J.J., López-Iglesias, D., Cubillana-Aguilera, L., Lete, C., Lupu, S.; Palacios-Santander, J.M., Bellido-Milla, D. 2019. Assessment of the Polyphenol Indices and Antioxidant Capacity for Beers and Wines Using a Tyrosinase-Based Biosensor Prepared by Sinusoidal Current Method. *Sensors*, 19: 66.
- Garkal, A., Kulkarni, D., Musale, S., Mehtaa T., Giram, P. 2021. Electrospinning nanofiber technology: a multifaceted paradigm in biomedical applications. *New J. Chem.*, 45: 21508–21533.
- Ghica, M.E., and Brett, C.M.A. 2010. The influence of carbon nanotubes and polyazine redox mediators on the performance of amperometric enzyme biosensors. *Microchim. Acta*, 170: 257–265.
- Ghica, M.E., and Brett, C.M.A. 2014. Poly(brilliantgreen) and poly(thionine) modified carbon nanotube coated carbon film electrodes for glucose and uric acid biosensors. *Talanta*, 130: 198–206.
- Ghica, M.E., Pauliukaite, R., Fatibello-Filho, O., Brett, C.M.A. 2009. Application of functionalised carbon nanotubes immobilised into chitosan films in amperometric enzyme biosensors. *Sens. Actuator B Chem.*, 142 (1): 308–315.
- Giram, P.S., Shitole, A., Nande, S.S., Sharma, N., Garnaik, B. 2018. Fast dissolving moxifloxacin hydrochloride antibiotic drug from electrospun Eudragit L-100

- nonwoven nanofibrous Mats. *Materials Science and Engineering: C*, 92: 526–539.
- Gonzalez-Coronel, L.A., Cobas, M., Rostro-Alanis, M.D.J., Parra-Saldívar, R., Hernandez-Luna, C.E., Pazos, M., Sanromán, M. 2017. Immobilization of laccase of *Pycnoporus sanguineus* CS43. *New Biotechnol.*, 39: 141–149.
- Grate, J.W., Rosepehrsson, S.L., Venezky, D.L., Klusty, M., Wohltjen, H. 1993. Smart sensor system for trace organophosphorus and organosulfur vapor detection employing a temperaturecontrolled array of surface-acoustic wave sensors, automated sample preconcentration and pattern-recognition. *Analytical Chemistry*, 64(14), 1868–1881.
- Gul, I., Ahmad, M.S., Naqvi, S.M.S., Hussain, A., Wali, R., Farooqi, A.A., Ahmed, I. 2017. Polyphenol oxidase (PPO) based biosensors for detection of phenolic compounds: A Review. *J. Appl. Biol. Biotechnol.*, 5: 72–85.
- Guttenberg, M. 2000. A rapid staining procedure for arbuscules of living arbuscular mycorrhizas using neutral red as acidotropic dye. *Plant Soil*, 226: 211.
- Hafiz, M.N. <https://encyclopedia.pub/entry/15346> [Son erişim tarihi: 12.04.2023].
- Hayat, A., Catanante, G., Marty, J. 2014. Current trends in nanomaterial-based amperometric biosensors. *Sensors*. 14: 23439–23461.
- Hosseinian, M., Najafpour, G., Rahimpour, A. 2019. Amperometric urea biosensor based on immobilized urease on polypyrrole and macroporous polypyrrole modified Pt electrode. *Turk J. Chem.*, 43: 1063-1074.
- Huang, Z.M., Zhang, Y.Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S. 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63: 2223–2253.
- Ikehata, K., and Nicell, J.A. 2000. Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols, *Bioresour. Technol.*, 74(3): 191-199.
- Im, J.S., Yun, J., Kim, J.G., Bae, T.S., Lee, Y.S. 2012. The effects of carbon nanotube addition and oxyfluorination on the glucose-sensing capabilities of glucose oxidase-coated carbon fiber electrodes. *Applied Surface Science*, 258 (7): 2219–2225.
- Ivanova, E.V., Sergeeva, V.S., Oni, J., Kurzawa, C., Ryabov, A.D., Schuhmann, W. 2003. Evaluation of redox mediators for amperometric biosensors: Ru-complex modified carbon-paste/enzyme electrodes. *Bioelectrochemistry*. 60: 65– 71.
- Jeykumari, D.R.S., and Narayanan, S.S. 2008. A novel nanobiocomposite based glucose biosensor using neutral red functionalized carbon nanotubes. *Biosensors and Bioelectronics*, 23: 1404–1411.
- Jin, S., Kan, C.W., Xin, B. 2020. Electrospun Nanofibers and Applications: A Review. *AATCC Journal of Research*, 7 (3): 20-25.
- Ju, H., Zhou, J., Cai, C., Chen, H. 1995. The Electrochemical Behavior of Methylene Blue at a Microcylinder Carbon Fiber Electrode, *Electroanalysis*, 7: 1165.

- Kalisz, H.M., Hecht, H.J, Schomburg, D., Schmid R.D. 1991. Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys Acta*, 1080 (2): 138–142.
- Kausaite-Minkstimiene, A., Mazeiko, V., Ramanaviciene, A., Oztekin, Y., Solak, A.O., Ramanavicius, A. 2014. Evaluation of Some Redox Mediators in the Design of Reagentless Amperometric Glucose Biosensor. *Electroanalysis*, 26: 1528 – 1535.
- Khanna, V.K. 2012. Introduction to nanosensors. In *Nanosensors: Physical, Chemical, and Biological*, 1st ed.; Khanna, V.K., Ed.; CRC Press:Boca Raton, FL, USA, pp. 37–40.
- Komura, T., G. Y. Niu, T. Yamaguchi, M. Asano, and A. Matsuda. 2004. Coupled electron-proton transport in electropolymerized methylene blue and the influences of its protonation level on the rate of electron exchange with b-nicotinamide adenine dinucleotide. *Electroanalysis*, 16: 1791–1800.
- Korkut Uru, S., Kilic, M.S., Yetiren, F. 2021. Improved Sensing Performance of Amperometric Urea Biosensor by Using Platinum Nanoparticles. *Electroanalysis*, 33: 1911 – 1922.
- Korkut, S., Uzuncar, S., Kilic, M.S., Hazer, B. 2019. Electrochemical determination of urea using a gold nanoparticle-copolymer coated-enzyme modified gold electrode. *Instrumentation science and technology*, 47 (1): 1–18.
- Koushki, E., Mirzaei Mohammadabadi, F., Baedi, J., Ghasedi, A. 2020. The effects of glucose and glucose oxidase on the Uv-vis spectrum of gold nanoparticles: A study on optical biosensor for saliva glucose monitoring. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 30: 101771.
- Kozanoğlu, G.S. 2006. Elektrosinning yöntemiyle nanolif üretim teknolojisi. Yüksek lisans tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 161 s.
- Kurt, N. 2020. poli(tiyonin) destekli pt nanopartikülleri kullanılarak metanolün elektrokatalitik yükseltgenmesi. Yüksek lisans tezi, Ordu Üniversitesi, Ordu, 44 s.
- Li, G., Wang, Y., Xu, H. 2007. A Hydrogen Peroxide Sensor Prepared by Electropolymerization of Pyrrole Based on Screen-Printed Carbon Paste Electrodes. *Sensors.*, 7: 239.
- Li, D., Pang, Z., Chen, X., Luo, L., Cai, Y., Wei, Q. 2014. A catechol biosensor based on electrospun carbon nanofibers. *Beilstein J. Nanotechnol.*, 5: 346–354.
- Li, H., Liu, X., Li, L., Mu, X., Genov, R., Mason, A.J. 2016. CMOS electrochemical instrumentation for biosensor microsystems: a review. *Sensors.*, 17: 74.
- Li, Q.W., Zhang, J., Yan, H., He, M.S., Liu, Z.F. 2004. Thionine mediated chemistry of carbon nanotubes. *Carbon* 42: 287.
- Li, T., Yao, Z.H., Ding, L. 2004. Development of an amperometric biosensor based on glucose oxidase immobilized through silica sol–gel film onto Prussian Blue modified electrode. *Sens. Actuators B Chem.*, 101:155.

- Liu, Z.P., Zhang, L.L., Yang, Y.Y., Wu, D., Jiang, G., Yu, D.G. 2018. Preparing composite nanoparticles for immediate drug release by modifying electrohydrodynamic interfaces during electrospraying. *Powder Technol.*, 327: 179–187.
- Luong, J.H.T., Brown, R.S., Male, K.B., Cattaneo, M., Zhao, S.S. 1995. Enzyme reactions in the presence of cyclodextrins: biosensors and enzyme assays. *Trends in BioTechnology*, 13 (11): 457–463.
- Mammone, T., Gan, D., Collins, D., Lockshin, R.A., Marenus, K., Maes, D. 2000. Successful separation of apoptosis and necrosis pathways in HaCaT keratinocyte cells induced by UVB irradiation. *Cell Biol. Toxic.*, 16 (5): 293-302.
- Mansoori, G.A. and Soelaiman, T.A.F. 2005. Nanotechnology – An Introduction for the Standards Community. *Journal of ASTM International*, 2 (6): 1-25.
- Mayorga-Martinez, C.C., Cadevall, M.C., Guix, M., Ros, J., Merkoci, A. 2013. Bismuth nanoparticles for phenolic compounds biosensing application. *Biosensors and Bioelectronics*, 40: 57–62.
- Megelski, S., Stephens, J.S., Bruce Chase, D., Rabolt, J.F. 2002. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Macromolecules*, 35: 8456–8466.
- Mello, L.D. and Kubota, L.T. 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 77: 237–256.
- Mercante, L.A., Scagion, V.P., Migliorini, F.L., Mattoso, L.H.C., Correa, D.S. 2017. Electrospinning-based (bio)sensors for food and agricultural applications: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 91: 91-103.
- Mondal, S., and Sangaranarayanan, M.V. 2012. A novel non-enzymatic sensor for urea using a polypyrrole-coated platinum electrode. *Sensors and Actuators B*, 177: 478– 486.
- Moreno-Cortez, I.E., Romero-García, J., González-González, V., García-Gutierrez, D.I., Garza-Navarro, M.A., Cruz-Silva, R. 2015. Encapsulation and immobilization of papain in electrospun nanofibrous membranes of PVA cross-linked with glutaraldehyde vapor. *Materials Science and Engineering: C*, 52: 306-314.
- Nan, C., Zhang, Y., Zhang, G., Dong, C., Shuang, S., Choi, M.M.F. 2009. Activation of nylon net and its application to a biosensor for determination of glucose in human serum. *Enzyme and Microbial Technology*, 44: 249–253.
- Naresh, V. and Lee, N. 2021. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors*, 21: 1109.
- Newman, J.D. and Turner, A. 2005. Home blood glucose biosensors: A commercial perspective. *Biosens. Bioelectron.*, 20: 2435–2453.
- Nguyen, N.S, Das, G., Yoon, H.H. 2016. Nickel/cobalt oxide-decorated 3D graphene nanocomposite electrode for enhanced electrochemical detection of urea. *Biosensors and Bioelectronics*, 77: 372–377
- Ni, Y., Lin, D., Kokot, S. 2006. Synchronous fluorescence, UV–visible spectrophotometric, and voltammetric studies of the competitive interaction of

- bis(1,10-phenanthroline)copper(II) complex and neutral red with DNA. *Anal. Biochem.*, 352 (2): 231.
- Nistor, C., Emnéus, J., Gorton, L., Ciucu, A. 1999. Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds, *Anal. Chim. Acta*, 387(3): 309-326.
- O'Neill, R.D., Chang, S.C., Lowry, J.P., McNeil, C.J. 2004. Comparisons of platinum, gold, palladium and glassy carbon as electrode materials in the design of biosensors for glutamate. *Biosens. Bioelectron.*, 19: 1521–1528.
- O'Sullivan, C.K., Vaughan, R., Guilbault, G.G. 1999. Piezoelectric immunosensors-theory and applications. *Analytical Letters*, 32 (12): 2353–2377.
- Okkyoung Choi, O., Kim, B.C., An, J.H., Min, K., Kim, Y.H., Um, Y., Oh, M.K., Sang, B.I. 2011. A biosensor based on the self-entrapment of glucose oxidase within biomimetic silica nanoparticles induced by a fusion enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 49: 441– 445.
- Oriero, D.A., Gyan, I.O., Bolshaw, B.W., Cheng, I.F., Aston, D.E. 2015. Electrospun biocatalytic hybrid silica-PVA-tyrosinase fiber mats for electrochemical detection of phenols. *Microchemical Journal*, 118: 166–175.
- Özyurt, M. 2014. Glikoz Tayini İçin Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması, Gazi üniversitesi Yüksek lisans tezi, Ankara, pp. 1-100.
- Pakapongpan, S., Thachepan, S., Poo-arporn, Y., Palangsuntikul, R. 2012. Nanobiocomposite-based Bienzyme Screen-printed Electrode For Glucose Monitoring. *Advanced Materials Research*, 452-453: 909-912.
- Pariente, J.L., Kim, B.S., Atala, A. 2002. In vitro biocompatibility evaluation of naturally derived and synthetic biomaterials using normal human bladder smooth muscle cells. *J. Urol.*, 167: 1867-1871.
- Pauliukaite, R. and Brett, C.M.A. 2008. Poly(neutral red): Electrosynthesis, Characterization, and Application as a Redox Mediator. *Electroanalysis*, 20 (12): 1275 – 1285.
- Pauliukaite, R., Ghica, M.E., Barsan, M.M., Brett, C.M.A. 2010. Phenazines and polyphenazines in electrochemical sensors and biosensors. *Analytical Letters*, 43: 1588–1608.
- Pérez, J.A.C., Sosa-Hernández, J.E., Hussain, S.M., Bilal, M., Parra, R., Iqbal, H.M. 2019. Bioinspired biomaterials and enzyme-based biosensors for point-of-care applications with reference to cancer and bio-imaging. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 17: 168–176.
- Peveler, W.J., Yazdani, M., Rotello, V.M. 2016. Selectivity and specificity: pros and cons in sensing. *ACS Sens.* 1: 1282–1285.
- Pisoschi, A.M. 2016. Potentiometric Biosensors: Concept and Analytical Applications- An Editorial. *Biochem. Anal. Biochem.*, 5(3): 1-2.
- Prakash, R., Chandra, P. 2020. Nanobiomaterial Engineering: Concepts and Their Applications in Biomedicine and Diagnostics, Springer.

- Purohit, B., Vernekar, P.R., Shetti, N.P., Chandra, P. 2020. Biosensor nanoengineering: Design, operation, and implementation for biomolecular analysis. *Sensors International*, 1: 100040.
- R. Pauliukaite, M. E. Ghica, M. Barsan, C. M. A. Brett, 2007. Characterisation of poly(neutral red) modified carbon film electrodes; application as a redox mediator for biosensors. *J. Solid State Electrochem.*, 11: 899.
- Rajesh, Takashima, W., Kaneto, K. 2004. Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized PTS-doped polypyrrole film as an entrapment support. *Reactive and Functional Polymers*, 59: 163–169.
- Ramakrishna, S. 2005. An Introduction to Electrospinning and Nanofibers. In: Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W. E., Lim T. C., Ma Z. (eds.), World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.; New Jersey, London, Singapore, Beijing, Shanghai, Hong Kong, Taipei, Chennai, Chapter 1, pp. 1-21.
- Reneker, D.H. and Chun, I. 1996. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*, 7: 216.
- Ricci, V., Sommi, P., Fiocca, R., Necchi, V., Ramano, M., Solcia, E. 2002. Extracellular pH Modulates Helicobacter pylori-Induced Vacuolation and VacA Toxin Internalization in Human Gastric Epithelial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 292 (1): 167.
- Rinken, T. 2013. State of the Art in Biosensors: General Aspects, BoD–Books on Demand. 362 s.
- Rocchitta, G., Spanu, A., Babudieri, S., Latte, G., Madeddu, G., Galleri, G., Nuvoli, S., Bagella, P., Demartis, M.I., Fiore, V., Manetti, R., Serra, P.A. 2016. Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. *Sensors*, 16: 780.
- Roco, M.C. and Williams R. 1999. Nanotechnology research directions: IWGN workshop report: vision for nanotechnology in the next decade. P Alivisatos, The White House, Washington. 223 s.
- Rogers, A. and Gibon, Y. 2009. Enzyme Kinetics: Theory and Practice. Chapter 4. pp. 71-103.
- Rostro-Alanis, D.J.M., Mancera-Andrade, E.I., Patiño, M.B.G., Arrieta-Baez, D., Cardenas, B., Martinez-Chapa, S.O., Saldívar, R.P. 2016. Nanobiocatalysis: Nanostructured materials—A minireview. *Biocatalysis*, 2: 1–24.
- Sandeep, S., Santhosh, A.S., Kumara Swamy, N., Suresh, G.S., Melo, J.S. 2019. Detection of Catechol Using a Biosensor Based on Biosynthesized Silver Nanoparticles and Polyphenol Oxidase Enzymes. *Portugaliae Electrochimica Acta*, 37 (4): 257-270.
- Scampicchio, M., Bulbarello, A., Arecchi, A., Mannino, S. 2008. Electrospun nanofibers as selective barrier to the electrochemical polyphenol oxidation. *Electrochemistry Communications*, 10: 991–994.
- Serra, B., Jime'nez, S., Mena, M.L., Reviejo, A.J., Pingarro'n, J.M. 2002. Composite electrochemical biosensors: a comparison of three different electrode matrices

- for the construction of amperometric tyrosinase biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17: 217–226.
- Shitole, A.A., Giram, P.S., Raut, P.W., Rade, P.P., Khandwekar, A.P., Sharma, N., Garnaik, B. 2019b. Clopidogrel eluting electrospun polyurethane/polyethylene glycol thromboresistant, hemocompatible nanofibrous scaffolds. *J. Biomater. Appl.*, 33: 1327–1347.
- Shitole, A.A., Raut, P.W., Sharma, N., Giram, P., Khandwekar, A.P., Garnaik, B. 2019a. Electrospun polycaprolactone/hydroxyapatite/ZnO nanofibers as potential biomaterials for bone tissue regeneration. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 30: 51.
- Shu, H.C. and Lu, S.P. 2012. A Powder Based Polyaniline Carbon Paste Electrode for Urea Analysis. *J. Chin. Chem. Soc.*, 59: 226–230
- Sill, T.J. and Recum, H.A.V. 2008. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29: 1989–2006.
- Soares, J.C., Brisolari, A., Rodrigues, V.C., Sanches, E.A., Gonçalves, D. 2012. Amperometric urea biosensors based on the entrapment of urease in polypyrrole films. *Reactive & Functional Polymers*, 72: 148–152.
- Soleymani, L., Li, F. 2017. Mechanistic challenges and advantages of biosensor miniaturization into the nanoscale. *ACS Sens.* 2: 458–467.
- Streffer, K., Vijgenboom, E., Tepper, A.W., Makower, A., Scheller, F.W., Canters, G.W., Wollenberger, U. 2001. Determination of phenolic compounds using recombinant tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*, *Anal. Chim. Acta*, 427(2): 201–210.
- Sukhacheva, M.V., Davydova, M.E., Netrusov, A.I. 2004. Production of *Penicillium funiculosum* 433 glucose oxidase and its properties. *Appl Biochem Microbiol* 2004;40(1):25–9.
- Sun, B., Long, Y.Z., Zhang, H.D., Li, M.M., Duvail, J.L., Jiang, X.Y., Yin, H.L. 2014. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Prog. Polym. Sci.*, 39: 862–890.
- Tang, W., Li, L., Wu, L., Gong, J., Zeng, X. 2014. Glucose Biosensor Based on a Glassy Carbon Electrode Modified with Polythionine and Multiwalled Carbon Nanotubes. *Plos one*, 9 (5): e95030.
- Taylor, G.I. 1964. Disintegration of water drops in an electric field. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A Math. Phys. Sci.*, 280: 383–397.
- Temoçin, Z. 2021. Designing of a stable and selective glucose biosensor by glucose oxidase immobilization on glassy carbon electrode sensitive to H₂O₂ via nanofiber interface. *J. Appl. Electrochem.* 51: 283–293.
- Theavenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. 2001. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.*, 16: 121–131.

- Thenmozhi, S., Dharmaraj, N., Kadirvelu, K., Kim, H.Y. 2017. Electrospun nanofibers: New generation materials for advanced applications. *Materials Science and Engineering B*, 217: 36-48.
- Toloch, N.K. 2009. History of Nanotechnology. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), In Encyclopedia of Life Support Systems, Unesco, Paris, France, 6 s.
- Topçu, S., Sezgintürk, M.K., Dinçkaya, E. 2004. Evaluation of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. *Biosensors and Bioelectronics*, 20: 592-597.
- Valliee-Belisle, A., Ricci, F., Plaxco, K.W. 2012. Engineering biosensors with extended, narrowed, or arbitrarily edited dynamic range, *J. Am. Chem. Soc.* 134: 2876-2879.
- Vicentini, F.C., Garcia, L.L.C., Figueiredo-Filho, L.C.S., Janegitz B.C., Fatibello-Filho, O. 2016. A biosensor based on gold nanoparticles, dihexadecylphosphate, and tyrosinase for the determination of catechol in natural water. *Enzyme and Microbial Technology*, 84: 17-23.
- Vince, V., Thil, M.A., Veraart, C., Colin, I.M., Delbeke, J. 2004. Biocompatibility of platinum-metallized silicone rubber: in vivo and in vitro evaluation. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, 15: 173.
- Vostiar, I., Tkac, J., Sturdik, E., Gemeiner, P. 2002. Amperometric urea biosensor based on urease and electropolymerized toluidine blue dye as a pH-sensitive redox probe. *Bioelectrochemistry*, 56: 113-115.
- Wang, J., Pedrero, M., Sakslun, H., Hammerich, O., Pingarron, J. 1996. Electrochemical Activation of Screen-printed Carbon Strips. *Analyst*, 121: 345-350.
- Wang, Q., Zhang, H., Wu, Y., Yu, A. 2012. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on a glassy carbon electrode modified with polythionine and gold nanoparticles. *Microchim Acta*, 176: 279-285.
- Wang, T., Fan, X., Li, R., Xu, J., Liu, J. 2021. Multi-Enzyme-Synergetic ultrathin protein nanosheets display high efficient and switch on/off antibacterial activities. *Chem. Eng. J.* 416: 129082.
- Wang, Y., Zhai, F., Hasebe, Y., Jia, H., Zhang, Z. 2018. A highly sensitive electrochemical biosensor for phenol derivatives using a graphene oxide-modified tyrosinase electrode, *Bioelectrochem.*, 122: 174-182.
- White, R.M. 1987. A sensor classification scheme. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control.*, 34: 124-126.
- Wu, L., Lu, X., Niu, K., Dhanjai, Chen, J. 2020. Tyrosinase nanocapsule based nanobiosensor for ultrasensitive and rapid detection of bisphenol A with excellent stability in different application scenarios. *Biosens. Bioelectron.*, 165: 112407.
- Wu, L., Zhang, X., Ju, H. 2007. Amperometric glucose sensor based on catalytic reduction of dissolved oxygen at soluble carbon nanofiber. *Biosensors and Bioelectronics*, 23: 479-484.

- Xie, B., Mecklenburg, M., Danielsson, B., Ohman, O., Norlin, P., Winqvist, F. 1995. Development of an integrated thermal biosensor for the simultaneous determination of multiple analytes. *Analyst*, 120 (1): 155–160.
- Xu, J.Z., Zhu, J.J., Wu, Q., Hu, Z., Chen, H.Y. 2001. An Amperometric Biosensor Based on the Coimmobilization of Horseradish Peroxidase and Methylene Blue on a Carbon Nanotubes Modified Electrode. *Electroanalysis*, 15 (3): 219-224.
- Yang, G.Z., Li, H.P., Yang, Y.H., Wan, J., Yu, D.G. 2017. Influence of Working Temperature on The Formation of Electrospun Polymer Nanofibers. *Nanoscale Research Letters*, 12 (55): 1-10.
- Yao, H., Li, N., Xu, S., Xu, J.Z., Zhu, J.J., Chen, H.Y. 2005. Electrochemical study of a new methylene blue/silicon oxide nanocomposition mediator and its application for stable biosensor of hydrogen peroxide. *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 372–377.
- Yunus, S., Jonas, A.M., Lakard, B. 2013. Potentiometric Biosensors. In: Roberts, G.C.K. (eds) *Encyclopedia of Biophysics*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp 1941–1946.
- Zhang, K., Zhang, L., Xu, J., Wang, C., Geng, T., Wang, H., Zhu, J. 2010. A sensitive amperometric hydrogen peroxide sensor based on thionin/EDTA/carbon nanotubes—chitosan composite film modified electrode. *Microchim Acta*, 171: 139–144.
- Zhang, X., Shen, L., Wang, M., Siqin, G., Tong, Z., Xu, R., Zhang, D., Ma, J., Liu, L. 2014. A novel glucose biosensor constructed by glucose oxidase immobilized with methylene blue intercalated layered lanthanum niobic acid nanocomposite. *Materials Letters*, 135: 39–42.
- Zhang, Y., Liu, L., Xi, F., Wu, T., Lin, X. 2009. A Simple Layer-by-Layer Assembly Strategy for a Reagentless Biosensor Based on a Nanocomposite of Methylene Blue-Multiwalled Carbon Nanotubes. *Electroanalysis*, 22 (3): 277 – 285.
- Zhao, J., Zhi, J., Zhou, Y., Yan, W. 2009. A Tyrosinase Biosensor Based on ZnO Nanorod Clusters/Nanocrystalline Diamond Electrodes for Biosensing of Phenolic Compounds. *Analytical Sciences*, 25(9): 1083-1088.
- Zheng, H., Ma, X., Chen, L., Lin, Z., Guo, L., Qiu, B., Chen, G. 2013. Label-free electrochemical impedance biosensor for sequence-specific recognition of double-stranded DNA. *Anal Methods*, 5: 5005–5009.
- Zheng, H., Yan, Z., Wang, M., Chen, J., Zhang, X. 2019. Biosensor based on polyaniline-polyacrylonitrile-graphene hybrid assemblies for the determination of phenolic compounds in water samples. *Journal of Hazardous Materials*, 378: 120714.

ÖZGEÇMİŞ

Elif Merve ÖZER

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2017-2023	Fen Fakültesi, Kimya ABD., Antalya
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2014-2017	Fen Fakültesi, Kimya ABD., Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2010-2014	Fen Fakültesi, Kimya Bölümü., Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. E. M. SAHİN, B. LAL, E. AYRANCI “Densimetric and ultraacoustic study of LiCl in 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and in water: A comparative interaction analysis” J. Chem. Thermodyn. 110 (2017) 51-56.
2. M. BILGI, E. M. SAHİN, E. AYRANCI “Rosmarinic acid modified screen printed carbon electrode for electrochemical determination of NADH” Journal of Electroanalytical Chemistry 813 (2018) 67–74.
3. E. M. SAHİN, E. AYRANCI “Interactions of Imidazolium Based Ionic Liquids with Water Studied by Density and Speed of Sound Measurements: Effect of the Chain Length of an Alkyl Substituent on the Imidazolium Ion” Journal of Solution Chemistry 47 (2018) 246–261.
4. E. M. SAHİN, T. TONGUR, E. AYRANCI “Removal of azo dyes from aqueous solutions by adsorption and electrosorption as monitored with in-situ UV-visible spectroscopy” Separation Science and Technology 55 (2020) 3287-3298.

5. E. M. SAHİN, E. AYRANCI “Comparison of Solution Behaviors of Two Structurally Related Ionic Liquids in Water and in Acetonitrile as Studied by Volumetric and Acoustic Properties” Journal of Solution Chemistry. 48 (2019) 1503–1518.
6. E. M. OZER, R. M. APETREI, P. CAMURLU “Trace-Level Phenolics Detection Based on Composite PAN-MWCNTs Nanofibers” ChemBioChem. (2022) e202200139.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. M. ŞAHİN, E. M. ŞAHİN, E. AYRANCI, “Politiyonin/Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Modifiyeli Yüzey Baskılı Karbon Elektrotları Temel Alan Yeni Amperometrik NADH Sensörü” IV. Fiziksel Kimya Kongresi, 5-8 Haziran 2014, DENİZLİ (sözel sunum)

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. M. BİLGİ, E. M. SAHİN, E. AYRANCI, “Preparation of screen-printed carbon electrode modified rosmarinic acid: Application as redox mediator for biosensor” International Conference: 10th Aegean Analytical Chemistry Days, 29 September-2 October 2016, Çanakkale-TURKEY (poster presentation).
2. M. BİLGİ, E. M. SAHİN, E. AYRANCI, “Rosmarinic acid modified screen-printed electrode of NADH sensor” 3rd International Biosensor Congress, 5-7 October 2016, Ankara-TURKEY (poster presentation).
3. P. CAMURLU, E. M. SAHİN, “Design of electrospun PAN nanofiber matrix for sensitive and disposable glucose biosensor” 31st Anniversary World Congress on Biosensors: Biosensors, 26-29 July 2021, Busan-KOREA (poster presentation).
4. E. M. SAHİN, P. CAMURLU, “Design of disposable nanofiber-based biosensors for ultra-sensitive glucose detection” 6th International Conference on Biosensors and Bioelectronics, 20-21 May 2022, London-UK (oral presentation).
5. E. M. SAHİN, R. M. Apetrei, P. CAMURLU, “Facile and effective platform for detection of trace amounts of phenolics: PAN-MWCNTs composite nanofibers” VIII. Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi, 20-23 Haziran 2022, Malatya, TURKEY (poster presentation).