

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETANOL-METANOL KARIŞIMININ TAYİNİ İÇİN YÜZEY BASKILI  
ELEKTROTLARIN MODİFİYE EDİLMESİYLE AMPEROMETRİK ALKOL  
BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ**

**Melike ŞAHİN**

**DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**2013**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETANOL-METANOL KARIŞIMININ TAYİNİ İÇİN YÜZEY BASKILI  
ELEKTROTLARIN MODİFİYE EDİLMESİYLE AMPEROMETRİK ALKOL  
BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ**

**Melike ŞAHİN**

**DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

Bu tez .././2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Erol AYRANCI (Danışman)  
Doç. Dr. Ülkü ANIK  
Doç. Dr. Pınar ÇAMURLU  
Prof. Dr. Erdal KENDÜZLER  
Yrd. Doç. Dr. Sevil AKSU

## ÖZET

### ETANOL-METANOL KARIŞIMININ TAYİNİ İÇİN YÜZEY BASKILI ELEKTROTLARIN MODİFİYE EDİLMESİYLE AMPEROMETRİK ALKOL BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Melike ŞAHİN

Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Erol AYRANCI  
Aralık 2013, 189 sayfa

Çalışma temel olarak etanol, metanol ve etanol-metanol karışımının tayini için, çeşitli materyallerle modifiye edilmiş, tek kullanımlık, ekonomik, çift enzimli amperometrik enzim biyosensörünün geliştirilmesini amaçlamaktadır. Karbon nanotüp (CNT), altın nanoparçacık (AuNp) ve poli(nötral) kırmızı (PNR) ile farklı türdeki yüzey baskılı elektrotlar (YBE) modifiye edilerek, elektrokimyasal reaktivitesi yüksek tek kullanımlık çeviriciler geliştirilmiştir. Geliştirilen sistemler alkol oksidaz ve alkol dehidrojenaz enzimleri ile modifiye edildikten sonra bu biyosensörlerin etanol, metanol ve etanol-metanol karışımının tayini için optimum çalışma koşulları araştırılmıştır. Optimum koşullardaki alkol biyosensörleri ile gerçek numunelerdeki etanol miktarı ve etanol/metanol karışımındaki etanol ve metanol miktarları belirlenmiştir. Deneysel çalışmalarda döngüsel voltametri ve kronoamperometri gibi voltametrik teknikler kullanılmıştır.

Çalışmada ilk olarak nikotinamid adenin dinükleotitin (NADH) medyatörsüz, düşük potansiyelde girişimsiz tayini için yeni YBCE/MWCNT/AuNP/PNR formüllü kompozit elektrodu geliştirilmiştir. Geliştirilen amperometrik NADH sensörünün optimum pH'ı 7,5 olarak belirlenmiştir. Analitiksel karakterizasyonlar sonucunda NADH sensörünün tekrarlanabilirliği 100 µM NADH için bağıl standart sapma (R.S.D.) % 2,55 (n=10), duyarlılığı 15,82 µA.mM<sup>-1</sup>, gözlemlenebilme ve tayin sınırları ise sırasıyla 4,82 ve 16,09 µM, doğrusal aralık 16,07 µM – 150 µM olarak bulunmuştur.

NADH sensörleri ve alkol dehidrojenaz (ADH) temelli biyosensörlerde, PNR'nin nanoparçacıklar ile olan sinerjik etkisi incelenmiş, PNR'nin sadece MWCNT veya AuNP ile hazırlanmış sensör ve biyosensörlerin formülasyonuna dahil olduğunda duyarlılığı artırdığı gözlenmiştir. MWCNT ve PNR'nin sahip oldukları özellikleri sayesinde yaptıkları π-π elektronik ve hidrofobik etkileşimlerle, sensör ve biyosensörlerin elektronik iletkenliği, sinerjik bir etkiyle artmıştır. En yüksek elektronik iletkenlik ve elektrokatalitik etki, PNR'nin hem MWCNT hem de AuNP ile oluşturduğu kompozit elektrot olan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR ile hazırlanmış sensör ve biyosensörlerde gözlenmiştir. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodundaki MWCNT ve AuNP'nin miktar optimizasyonları yapılmıştır. YBCE yüzeyinde MWCNT'nin 3 tabaka, AuNP'nin 2 tabaka olduğu miktarlarda en yüksek pik akımları elde edilmiştir.

ADH temelli biyosensörlerin optimum elektrot türü ve formülasyonu YBCE/MWCNT/AuNP/PNR, optimum pH'sı 7,75, çalışma potansiyeli + 0,2 V, enzim ve koenzim miktarları sırasıyla 150 unit ve 7 mM olarak bulunmuştur. Analitiksel karakterizasyonlar sonucunda ADH temelli biyosensörlerin tekrarlanabilirliği 400 µM etanol için RSD % 1,57 (n=10), duyarlılığı 0,49 µA.mM<sup>-1</sup>, doğrusal aralığı 320,2 µM – 1000 µM, gözlemlenebilme ve tayin sınırları ise sırasıyla 96,1 ve 320,2 µM, olarak bulunmuştur.

ADH temelli biyosensörler ve NADH sensörü için optimum elektrot türü ve formülasyonu olan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrotları ile Alkol oksidaz (AOx) temelli biyosensörler hazırlanmıştır. AOx temelli biyosensörlerin optimum pH'ı 7,0, çalışma potansiyeli - 0,3 V ve enzim miktarı 1,2 unit olarak bulunmuştur. Analitiksel karakterizasyonlar sonucunda AOx temelli biyosensörlerin tekrarlanabilirliği 400 µM metanol ve 400 µM etanol için R.S.D.'ler sırasıyla % 1,65 (n=5) ve % 1,12 (n=5) olarak bulunmuştur. Metanol ve etanol için sırasıyla gözlemlenebilme sınırları, 100,8 µM ve 53,5 µM, tayin sınırları 335,9 µM ve 178,5 µM, doğrusal aralıkları 335,9 µM - 1000 µM ve 178,5 µM – 1000 µM, duyarlılıkları ise 0,509 ve 0,482 µA.mM<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır. AOx temelli biyosensörlerle etanol/metanol karışımının tayini için de analitiksel karakterizasyonlar yapılmıştır.

Etanol/metanol karışımındaki etanol miktarı ADH temelli biyosensörlerle, metanol miktarı ise AOx temelli biyosensörlerle yapılan amperometrik tayin sonucu elde edilen akım değerlerinin, kalibrasyon grafiklerinin doğru denklemlerinde yerine yazılmasıyla bulunmuştur. AOx temelli biyosensörlerin metanole karşı duyarlılığının etanole göre daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır. AOx temelli biyosensörler, etanol- metanol karışımının tayini için kullanılmış ve etanol varlığında metanolün duyarlılığının azaldığı gözlenmiştir.

Tez kapsamında yeni YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu, NADH sensörü, etanol, metanol ve etanol/metanol biyosensörleri başarıyla geliştirilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Alkol biyosensörü, yüzey baskılı elektrotlar, alkol dehidrojenaz, alkol oksidaz, poli(nötral) kırmızı, karbon nanotüp, altın nanoparçacık

**JÜRİ:** Prof. Dr. Erol AYRANCI (Danışman)

Doç. Dr. Ülkü ANIK

Doç. Dr. Pınar ÇAMURLU

Prof. Dr. Erdal KENDÜZLER

Yrd. Doç. Dr. Sevil AKSU

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF AN AMPEROMETRIC ALCOHOL BIOSENSOR WITH MODIFIED SCREEN-PRINTED ELECTRODES FOR THE DETECTION OF A MIXTURE OF ETHANOL AND METHANOL

Melike SAHİN

PhD Thesis in Chemistry  
Supervisor: Prof. Dr. Erol AYRANCI  
December 2013, 189 pages

The present work mainly aimed the development of a dual enzymes amperometric enzyme biosensor which is modified with various materials, disposable and low-cost, for detection of methanol, ethanol and methanol-ethanol mixtures. Disposable transducers of high electrochemical reactivity were developed by modifying various types of screen-printed electrodes (SPCE) with carbon nanotubes (CNT), gold nanoparticles (AuNP) and poly (neutral) red (PNR). After modifying the developed systems with alcohol oxidase and alcohol dehydrogenase enzymes, the optimum working conditions of these biosensors were investigated for the analysis of ethanol, methanol and ethanol-methanol mixture. The amount of ethanol in real samples and the amounts of ethanol and methanol in ethanol-methanol mixtures were determined with the alcohol biosensors at optimum conditions. Voltammetric techniques such as cyclic voltammetry and chronoamperometry were used in experimental studies.

In the work, firstly a new composite electrode of SPCE/MWCNT/AuNP/PNR formulation was developed for the determination of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at low potentials, without any mediator and without any interference. Optimum pH of this biosensor was determined as 7.5. Reproducibility for 100  $\mu\text{M}$  NADH, sensitivity, limit of detection and limit of quantification, linear range of NADH sensor were found to be 2.55 % ( $n=10$ ) as relative standart deviation (R.S.D.), 15.82  $\mu\text{A.mM}^{-1}$ , 4.82  $\mu\text{M}$  and 16.09  $\mu\text{M}$ , 16.07  $\mu\text{M}$  – 150  $\mu\text{M}$  respectively, after analytical characterizations.

The synergic effect of PNR with nanoparticles in NADH sensors and alcohol dehydrogenase (ADH) based biosensors was investigated and it was observed that PNR increased the sensitivity when it is included in the formulation of sensor or biosensors prepared with only MWCNT or AuNP. Electronic conductivity of sensor and biosensors increased with a synergic effect displayed due to characteristics possessed by PNR and MWCNT. The highest electronic conductivity and electrocatalytic effect were observed in sensors and biosensors prepared with SPCE/MWCNT/AuNP/PNR composite electrode. Quantity optimizations of MWCNT and AuNP were accomplished in SPCE/MWCNT/AuNP/PNR composite electrode. The highest peak currents were obtained when there are 3 layers of MWCNT and 2 layers of AuNP at the SPCE surface.

It was found that optimum electrode type and formulation is SPCE/MWCNT/AuNP/PNR, optimum pH is 7.75, working potential is + 0.2 V, the amounts of enzyme and coenzyme are 150 unit and 7 mM, respectively, for the ADH based biosensors. Sensitivity, linear range, limit of detection and limit of quantification were found to be  $0.49 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$ ,  $320.2 \mu\text{M} - 1000 \mu\text{M}$ ,  $96.1 \mu\text{M}$  and  $320.2 \mu\text{M}$ , respectively, for the ADH based biosensors after analytical characterizations. Reproducibility of ADH based biosensors for  $400 \mu\text{M}$  ethanol relative standard deviation (R.S.D.) was calculated to be 1.57 % (n=10).

Alcohol oxidase (AOx) based biosensors were prepared with SPCE/MWCNT/AuNP/PNR composite electrodes which is the optimum electrode type and formulation for ADH based biosensors and NADH sensor. The optimum pH, working potential and enzyme amount were found to be 7.0, - 0.3 V and 1.2 unit, respectively. Reproducibility of AOx based biosensors for  $400 \mu\text{M}$  methanol and  $400 \mu\text{M}$  ethanol relative standard deviation (R.S.D.) were calculated to be 1.12 % (n=5) and 1.65 % (n=5), respectively. It was calculated that the limit of detections were  $100.8 \mu\text{M}$  and  $53.5 \mu\text{M}$ , limit of quantification were  $335.9 \mu\text{M}$  and  $178.5 \mu\text{M}$ , linear ranges  $335.9 \mu\text{M} - 1000 \mu\text{M}$  and  $178.5 \mu\text{M} - 1000 \mu\text{M}$ , sensitivities were  $0.509$  and  $0.482 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$  for methanol and ethanol, respectively. Analytical characterization for the determination of ethanol/methanol mixture with AOx based biosensors were also made.

The amount of ethanol in ethanol/methanol mixture was determined with ADH biosensors while the amount of methanol was found by substituting the current values obtained by amperometric analysis with AOx based biosensors into the equation of calibration curves. It was concluded that AOx based biosensors were more sensitive for methanol compared to ethanol. The AOx based biosensors were used for ethanol-methanol mixture and the sensitivity for methanol was observed to decrease in the presence of ethanol.

A new SPCE/MWCNT/AuNP/PNR composite electrode, NADH sensor and biosensors for ethanol, methanol and ethanol/methanol were developed successfully within the scope of the thesis.

**KEYWORDS:** Alcohol biosensor, screen-printed electrodes, alcohol dehydrogenase alcohol oxidase, poly(neutral) red, carbon nanotubes, gold nanoparticles

**COMMITTEE:** Prof. Dr. Erol AYRANCI (Supervisor)  
Assoc. Prof. Dr. Ülkü ANIK  
Assoc. Prof. Dr. Pınar ÇAMURLU  
Prof. Dr. Erdal KENDÜZLER  
Asst. Prof. Dr. Sevil AKSU

## ÖNSÖZ

Gıda, alkol, kâğıt endüstrisi, tarım ve çevre analizleri, klinik ve adli alanlar gibi birçok alanda, yüksek duyarlık, seçicilik ve doğrulukta alkollerin tanımlanması ve tayini oldukça önemlidir. Etanol, metanol ve diğer alifatik alkoller için pek çok analitiksel metot geliştirilmiştir (kromatografik, spektroskopik vb). Ancak bu metotlar kesin ve güvenilir olmasına rağmen, kompleks ve zaman alıcı olması, destilasyon gibi ön işlemleri gerektirmesi, cihazların pahalılığı gibi dezavantajlara sahiptir. Enzimatik metotlarla bu dezavantajların üstesinden gelinebilir. Metanol daha ucuz olması nedeniyle yasal olmayan yollarla alkollü içkilerin yapımında etanolün yerine kullanılmaktadır. Bu sahte içkiler insanların hayatlarını kaybetmelerine yol açmaktadır. Alkollü içkilerde bir miktar metanol etanolla birlikte bulunmaktadır. Etanol-metanol karışımının tayini özellikle alkollü içkilerdeki alkol miktarının tespiti için önemlidir. Tezin amacı etanol, metanol ve etanol-metanol karışımının tayini için, çeşitli materyallerle modifiye edilmiş, tek kullanımlık, maliyeti düşük, çift amperometrik enzim biyosensörlerinin geliştirilmesine yöneliktir.

Biyosensörler konusunda doktora tez çalışması yapmamı maddi manevi destekleyen ve bana her konuda yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Erol AYRANCI'ya (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi) çok teşekkür eder sonsuz saygılarımı sunarım. Deneysel çalışmalarımızdaki değerli yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Ülkü ANIK'a (Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi) çok teşekkür ederim. Görüş ve önerileri için Sayın Doç. Dr. Pınar ÇAMURLU (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi), Sayın Yrd. Doç. Dr. Sevil Aksu'ya (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi) ve Sayın Prof. Dr. Suna TİMUR'a (Ege Üniversitesi Fen Fakültesi) teşekkür ederim. Manevi desteklerinden dolayı bölümümüz araştırma görevlisi arkadaşlarıma, doktora çalışmam süresince her zaman yanımda olan ve desteklerini hiç eksik etmeyen başta kayınvalideme, eşime, anneme, anneanneme ve varlığıyla bana güç veren oğluma sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
ÖNSÖZ .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xxi
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Biyosensörler .....	1
1.1.1. Biyosensörlerin yapısı ve sınıflandırılması .....	1
1.1.2. Biyosensörlerin avantajları ve uygulama alanları .....	2
1.1.3. Elektrokimyasal biyosensörler .....	3
1.1.3.1. Kondüktometrik biyosensörler .....	3
1.1.3.2. Potansiyometrik biyosensörler .....	4
1.1.3.3. Amperometrik biyosensörler .....	4
1.1.4. Biyosensörlerin performans kriterleri .....	6
1.1.4.1. Kalibrasyon karakteristikleri: duyarlık, çalışma ve doğrusal derişim aralığı, gözlenebilme ve nicel tayin sınırları .....	6
1.1.4.2. Seçicilik ve güvenilirlik .....	7
1.1.4.3. Durgun hal ve geçiş hal cevap zamanları, numune miktarı .....	8
1.1.4.4. Tekrarlanabilirlik, kararlılık ve biyosensör ömrü .....	8
1.2. Enzim Temelli Biyosensörlerde Tutuklama Yöntemleri .....	9
1.2.1. Adsorpsiyon .....	11
1.2.2. Hapsetme .....	12
1.2.3. Çapraz bağlama .....	14
1.2.4. Kovalent bağlama .....	14
1.2.5. Afinite .....	15
1.3. Alkoller .....	16
1.3.1. Etanol .....	16
1.3.2. Metanol .....	17
1.3.3. Alkollerin tayin yöntemleri .....	18
1.4. Alkol Dehidrojenaz Enziminin Genel Özellikleri .....	19
1.5. Nikotin Amid Adenin Dinükleotit Koenzimin Genel Özellikleri .....	20
1.6. Alkol Oksidaz Enziminin Genel Özellikleri .....	23
1.7. Biyosensörlerde Nanomateryallerin Kullanımı .....	25
1.7.1. Karbon nanotüpler .....	25
1.7.2. Altın nanoparçacıklar .....	27
1.8. Poli(nötral)kırmızı .....	28
1.9. Yüzey Baskılama Teknolojisi ve Yüzey Baskılı Elektrotlar .....	33
1.10. Akışa enjeksiyon analiz .....	35
1.10.1. Akışa enjeksiyon yönteminin çalışma ilkesi .....	36
1.10.2. Akışa enjeksiyon yönteminin düzeneğinin ana bileşenleri .....	37
1.11. Voltametri .....	38
1.11.1. Voltametrde uyarma sinyalleri .....	38
1.11.2. Voltamogramlar .....	39
1.11.3. Döngüsel voltametri .....	41



1.12. Kronoamperometri .....	44
1.13. Çalışmanın amacı .....	46
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI .....	47
3. MATERYAL VE METOD .....	51
3.1. Materyal .....	51
3.1.1. Kullanılan kimyasallar .....	51
3.1.2. Kullanılan cihazlar .....	51
3.1.2.1. Elektrokimyasal ölçüm sistemi .....	51
3.1.2.2. Akışa enjeksiyon analiz sistemi .....	52
3.1.3. Kullanılan elektrotlar, hücreler ve konnektörler .....	53
3.2. Metot .....	55
3.2.1. Elektrot yüzeyinin temizlenmesi ve aktivasyonu .....	55
3.2.2. Destek elektrolit çözeltisinin hazırlanması .....	56
3.2.3. YBE'lerin MWCNT-COOH ile modifikasyonu .....	56
3.2.4. YBE'lerin AuNP ile modifikasyonu .....	56
3.2.5. YBE üzerinde PNR'nin hazırlanması .....	56
3.2.6. AOx temelli biyosensörlerin hazırlanması .....	57
3.2.6.1. Jelâtin ile tutuklama .....	57
3.2.7. ADH temelli biyosensörlerin hazırlanması .....	57
3.2.7.1. Glutaraldehit ile tutuklama .....	57
3.2.8. Elektrokimyasal ölçümler .....	57
3.2.9. ADH temelli biyosensörlerin ölçüm prensibi .....	58
3.2.10. AOx temelli biyosensörlerin ölçüm prensibi .....	58
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	60
4.1. Elektrodun Temizlenme ve Aktivasyonu İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi .....	60
4.2. NADH'nin Yükseltgenmesinin Takibi İçin Uygun Elektrot Türü ve Formülasyonunun Belirlenmesi .....	61
4.3. Nötral Kırmızının Elektropolimerizasyonunun Karakterizasyonu .....	78
4.3.1. Farklı türlerdeki YBE'lerde NR'nin elektropolimerizasyonunun karakterizasyonu .....	78
4.3.2. Nanomateryallerle modifiye edilmiş YBCE'lerde NR'nin elektropolimerizasyonunun karakterizasyonu .....	81
4.3.3. NR'nin elektropolimerizasyonunda döngü sayısının optimizasyonu .....	89
4.4. Nanoparçacıkların miktar optimizasyonları .....	91
4.4.1. MWCNT'nin miktar optimizasyonu .....	91
4.4.2. AuNP'nin miktar optimizasyonu .....	99
4.5. Amperometrik NADH Tayinine İlişkin Bulgular .....	105
4.5.1. pH optimizasyonu .....	106
4.5.2. Analitiksel karakterizasyon .....	106
4.6. Enzimlerin İmmobilizasyonu İçin Uygun Yöntemin Belirlenmesi .....	109
4.7. ADH Temelli Biyosensörlere İlişkin Bulgular .....	110
4.7.1. ADH temelli biyosensörlerde NADH'nin yükseltgenmesinin takibi .....	110
4.7.2. ADH temelli biyosensörlerde etanolün amperometrik tayini .....	112
4.7.3. ADH temelli biyosensörlerde elektrot türünün etkisi .....	113
4.7.4. ADH temelli biyosensörlerde MWCNT etkisinin incelenmesi .....	115
4.7.5. ADH temelli biyosensörlerde AuNP etkisinin incelenmesi .....	116
4.7.6. ADH temelli biyosensörlerde PNR etkisinin incelenmesi .....	117

4.7.7. ADH temelli biyosensörlerde PNR ve nanoparçacık etkisinin incelenmesi.	118
4.7.7.1. MWCNT ve PNR'nin sinerjik etkisi .....	118
4.7.7.2. AuNP ve PNR'nin sinerjik etkisi.....	120
4.7.7.3. MWCNT, AuNP ve PNR'nin sinerjik etkisi .....	120
4.7.8. ADH temelli biyosensörlerde optimum elektrot formülasyonunun belirlenmesi .....	122
4.7.9. ADH temelli biyosensörlerde pH optimizasyonu .....	124
4.7.10. ADH temelli biyosensörlerde NAD <sup>+</sup> koenziminin miktar optimizasyonu	124
4.7.11. ADH temelli biyosensörlerde enzim miktarının optimizasyonu .....	126
4.7.12. ADH temelli biyosensörlerde çalışma potansiyelinin optimizasyonu ..	128
4.7.13. Analitiksel karakterizasyon .....	130
4.7.14. Gerçek numune analizi .....	135
4.8. AOx Temelli Biyosensörlere İlişkin Bulgular .....	136
4.8.1. AOx temelli biyosensörlerde oksijenin indirgenmesinin takibi .....	136
4.8.2. AOx temelli biyosensörlerde pH optimizasyonu .....	137
4.8.3. AOx temelli biyosensörlerde enzim miktarının optimizasyonu .....	138
4.8.4. AOx temelli biyosensörlerde çalışma potansiyelinin optimizasyonu ....	139
4.8.5. AOx temelli biyosensörlerde MWCNT, AuNP ve PNR etkisi .....	141
4.8.6. AOx temelli biyosensörlerde analitiksel karakterizasyon .....	144
4.8.7. Gerçek numune analizi .....	147
4.9. Etanol/metanol karışımının analizi .....	148
5. SONUÇ .....	150
6. KAYNAKLAR .....	154
ÖZGEÇMİŞ	

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

A	Yardımcı elektrot
A	Elektrot yüzey alanı
C	Derişim
$c^0$	1 M olan referans derişim
$^{\circ}\text{C}$	Derece santigrat
CV	Döngüsel voltametri
$c_A$	analit derişimi
D	Difüzyon katsayısı
dk	Dakika
E	Enzim
$E_{pc}$	Katodik pik potansiyeli
$E_{pa}$	Anodik pik potansiyeli
$E_{1/2}$	Yarı dalga potansiyeli
$\Delta E_p$	Anodik ve katodik pik potansiyeli arasındaki fark
$I_{pa}$	Anodik pik akımı
$I_{pc}$	Katodik pik akımı
$i_l$	sınır akımı
Km	Maksimum hızın yarısındaki substrat derişimi
LSV	Doğrusal taramalı voltametri
$\mu\text{A}$	Mikroamper
mL	Mililitre
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
mg	Miligram
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molarite
mV	Milivolt
nm	Nanometre
n	Mol sayısı
$n$	Alınan verilen elektron sayısı
P	Ürün
R	Referans elektrot
Rbl	Zemine karşı alınmış cevap
Rss	Kararlı hal cevabı
s	Saniye
S	Substrat
S'	Kosubstrat
V	Potansiyel
$v$	Tarama hızı
W	Çalışma elektrodu

## Kısaltmalar

ADH	Alkol dehidrojenaz
AEA	Akışa enjeksiyon analiz
AOx	Alkol oksidaz
AuNP	Altın nanoparçacık
CNT	Karbon nanotüp
ÇE	Çalışma elektrodu
DEAE	Dietilaminoetil
DMF	Dimetil formamid
DWCNT	Çift duvarlı karbon nanotüp
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FAD	Flavin adenindinükleotit
FADH <sub>2</sub>	Flavin adenindinükleotitin indirgenmiş hali
FIA	Flow injection analysis
G	Jelâtin
GA	Glutaraldehit
IMAC	İmmobilize metal afinite kromatografisi
ISFET	İyon seçimli alan etkili elektrotlar
ISE	İyon seçici elektrotlar
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LB	Langmuir–Blodgett
LOD	Tayin sınırı
LOQ	Gözlemlenebilme sınırı
MM-YBE	Meldola mavisini ile modifiye edilmiş yüzey baskılı karbon elektrot
MWCNT	Çok duvarlı karbon nanotüp
MWCNT-COOH	Karboksil fonksiyonlu çok duvarlı karbon nanotüp
MWCNT-YBE	Karboksil fonksiyonlu çok duvarlı karbon nanotüp ile modifiye edilmiş yüzey baskılı karbon elektrot
NAD <sup>+</sup>	$\beta$ -Nikotinamid adenin dinükleotit
NADH	$\beta$ -Nikotinamid adenin dinükleotitin indirgenmiş hali
Nf	Nafion
NHS	N-Hidroksil süksinimid
NR	Nötral kırmızı
PDMS	Polidimetilsiloksan
PNR	Polinötral kırmızı
ROH	Alkollerin genel formülü
SCE	Doygun kalomel elektrot
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SWCNT	Tek duvarlı karbon nanotüp
YBE	Yüzey baskılı elektrot
YBCE	Yüzey baskılı karbon elektrot

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi .....	1
Şekil 1.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması .....	2
Şekil 1.3. I. nesil (A), II. nesil (B) ve III. nesil (C) amperometrik enzim biyosensörleri..	5
Şekil 1.4. Enzim tutuklama yöntemlerinin şematik gösterimi .....	9
Şekil 1.5. Etanolün molekül formülü .....	16
Şekil 1.6. Metanolün molekül formülü .....	17
Şekil 1.7. Kristallografik simetri ile elde edilen alkol dehidrojenaz homotetramerinin üç boyutlu yapısı.....	19
Şekil 1.8. Etanolün yükseltgenmesinde enzimatik olarak açığa çıkan NADH'nin medyatör yardımıyla takibi.....	20
Şekil 1.9. NADH'nin kimyasal yapısı .....	21
Şekil 1.10. NADH'nin yükseltgenme tepkimesi ve redoks dönüşümleri .....	22
Şekil 1.11. <i>H. polymorpha</i> alkol oksidaz monomerinin üç boyutlu yapısı: yeşil: $\alpha$ -heliks; turkuaz, $\beta$ katlanmaları; mor: FAD .....	23
Şekil 1.12. AOx tarafından etanolün yükseltgenme tepkimesi sonucu üretilen hidrojen peroksitin a) doğrudan ve b) dolaylı olarak takibinin mekanizması.....	24
Şekil 1.14. Tek duvarlı karbon nanotüpün (SWCNT) a) sandalye b) zigzag c) kiral formları .....	26
Şekil 1.15. Nötral kırmızı'nın kimyasal yapısı .....	28
Şekil 1.16. NR'nin pH'ya bağlı olarak redoks değişim mekanizmalarının şematik gösterimi.....	30
Şekil 1.17. NR tetramerinin olası yapısı .....	30
Şekil 1.18. NR katkılama mekanizmasının şematik gösterimi .....	31
Şekil 1.19. FAD'nin rejenarasyonu için önerilen mekanizma.....	32
Şekil 1.20. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'nin tayini için önerilen mekanizma.....	33
Şekil 1.21. A) Yüzey baskılama makinesi DEK248'in fotoğrafı B) Yüzey baskılı elektrot yapımı basmaklarının şematik gösterimi C) Üretilen yüzey baskılı	

elektrotun şekli .....	34
Şekil 1.22. Çeşitli markalardaki ticari yüzey baskılı elektrotlar a) Dropsens b) Zensor c) Pine Instrument d) Metrhom e) BVT f) PalmSens .....	35
Şekil 1.23. Akışa enjeksiyon analiz sisteminin şematik gösterimi .....	36
Şekil 1.24. Voltametrde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri .....	39
Şekil 1.25. Hipotetik bir A türünün bir P türünü vermek üzere indirgenmesi için doğrusal taramalı voltamogram.....	40
Şekil 1.26. Döngüsel voltametrik uyarma sinyali .....	41
Şekil 1.27. $K_3Fe(CN)_6$ yönünden 6,0 mM ve $KNO_3$ yönünden 1,0 M olan bir çözeltinin döngüsel voltamogramı.....	42
Şekil 1.28. Dönüşümlü, dönüşümsüz ve yarı-dönüşümlü reaksiyonlar için voltamogramlar döngüsel voltamogramı .....	43
Şekil 1.29. a) Kronoamperometrik potansiyel uyarma sinyali, b) konsantrasyon gradyentleri ve c) akım zaman eğrisi .....	44
Şekil 3.1. PalmSens potentiostat .....	52
Şekil 3.2. Akışa enjeksiyon analiz sistemi .....	52
Şekil 3.3. Yüzey baskılı elektrotların genel yapısı.....	53
Şekil 3.4. Yüzey baskılı elektrotlar türleri a) YBCE b) MWCNT-YBE c) MM-YBE ...	53
Şekil 3.5. YBCE ve MWCNT-YBE elektrotlarının SEM fotoğrafları .....	54
Şekil 3.6. Yüzey baskılı elektrotlar için sensor konnektör çeşitleri a) Damlamalı..... analizler için kutu şeklinde b) Akışa enjeksiyon analiz için kablo şeklinde... 54	54
Şekil 3.7. Yüzey baskılı elektrotlar için elektrokimyasal hücre çeşitleri a) kesikli analiz için hücre b) Akışa enjeksiyon analiz için akış hücresi .....	55
Şekil 4.1. YBCE'ler için her bir işlem sonrası 1mM $K_3Fe(CN)_6$ içerisinde $50mV.s^{-1}$ tarama hızında + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramlar .....	60
Şekil 4.2. MWCNT-YBE'ler için her bir işlem sonrası 1mM $K_3Fe(CN)_6$ içerisinde 50 $mV.s^{-1}$ tarama hızında + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramlar.....	61
Şekil 4.3. 1 mM NADH çözeltisinin YBCE, MWCNT-YBE ve MM-YBE yalın	

elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50 mV.s <sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) .....	63
Şekil 4.4. MM-YBE ile NADH'nin akışa enjeksiyon analiz ile amperometrik tayininde elde edilen kronoamperogram (100 mM pH 7,5 fosfat tamponu, 0,1M KCl, + 0,1 V) .....	64
Şekil 4.5. YBCE, MWCNT-YBE ve MM-YBE ile NADH'nin amperometrik tayini sonrasında elde edilen akım-derişim grafikleri (100 mM pH 7,5 fosfat tamponu, 0,1M KCl) .....	64
Şekil 4.6. 0,5 mM NADH çözeltisinin MM-YBE ve MM-YBE/MWCNT/AuNP/PNR yalın ve kompozit elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50 mV.s <sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl).....	66
Şekil 4.7. MM-YBE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrotlarının 0,5 mM NADH ve tampon çözeltisinde elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50 mV.s <sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl).....	66
Şekil 4.8. MM-YBE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrotlarının NADH derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, +0,1V).....	67
Şekil 4.9. 1 mM NADH çözeltisinin YBCE ve YBCE/MWCNT/AuNP/PNR yalın ve kompozit elektrotlarında elde edilen döngüsel (Tarama hızı: 50 mV.s <sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl).....	68
Şekil 4.10. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrotlarının 1 mM NADH ve tampon çözeltisinde elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50 mV.s <sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl).....	68
Şekil 4.11. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrotlarının NADH derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,2 V) .....	69
Şekil 4.12. 1 mM NADH çözeltisinin YBCE ve YBCE/PNR elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50 mV.s <sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) .....	71
Şekil 4.13. 1 mM NADH çözeltisinin YBCE, YBCE/AuNP, YBCE/MWCNT ve YBCE/MWCNT/AuNP elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50 mV.s <sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl).....	72
Şekil 4.14. 1 mM NADH çözeltisinin YBCE, YBCE/AuNP, YBCE/MWCNT ve YBCE/PNR elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50 mV.s <sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) .....	74

Şekil 4.15. 1 mM NADH çözeltisinin YBCE/PNR ve YBCE/AuNP/PNR Elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50 mV.s <sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) .....	75
Şekil 4.16. 1 mM NADH çözeltisinin YBCE/PNR ve YBCE/MWCNT/PNR elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50 mV.s <sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) .....	75
Şekil 4.17. 1 mM NADH çözeltisinin farklı modifikasyonlardaki YBCE yalın elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50 mV.s <sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) .....	77
Şekil 4.18. NR'nin YBCE üzerindeki elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları (0,1 M NaNO <sub>3</sub> içeren pH 5,5 0,025 M fosfat tamponunda 1,0 mM NR monomer çözeltisinde, 50 mV.s <sup>-1</sup> tarama hızında, 15 döngü).....	79
Şekil 4.19. NR'nin yalın MWCNT-YBE üzerindeki elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları (0,1 M NaNO <sub>3</sub> içeren pH 5,5 0,025 M fosfat tamponunda 1,0 mM NR monomer çözeltisinde, 50 mV.s <sup>-1</sup> tarama hızında, 15 döngü) .....	80
Şekil 4.20. NR'nin yalın MM-YBE üzerindeki elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları (0,1 M NaNO <sub>3</sub> içeren pH 5,5 0,025 M fosfat tamponunda 1,0 mM NR monomer çözeltisinde, 50 mV.s <sup>-1</sup> tarama hızında, 15 döngü) .....	80
Şekil 4.21. NR'nin YBCE/AuNP üzerindeki elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları (0,1 M NaNO <sub>3</sub> içeren pH 5,5 0,025 M fosfat tamponunda 1,0 mM NR monomer çözeltisinde, 50 mV.s <sup>-1</sup> tarama hızında, 15 döngü) .....	82
Şekil 4.22. NR'nin YBCE/MWCNT üzerindeki elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları (0,1 M NaNO <sub>3</sub> içeren pH 5,5 0,025 M fosfat tamponunda 1,0 mM NR monomer çözeltisinde, 50 mV.s <sup>-1</sup> tarama hızında, 15 döngü) .....	83
Şekil 4.23. NR'nin YBCE/MWCNT/AuNP üzerindeki elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları (0,1 M NaNO <sub>3</sub> içeren pH 5,5 0,025 M fosfat tamponunda 1,0 mM NR monomer çözeltisinde, 50 mV.s <sup>-1</sup> tarama hızında, 15 döngü) .....	83
Şekil 4.24. A) YBCE/PNR yalın elektrodunun tampon çözeltide - 1,0 V ile + 1,0 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 mV.s <sup>-1</sup> , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri .....	85



- Şekil 4.25. A) YBCE/AuNP/PNR yalın elektrodunun tampon çözeltide -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 mV.s<sup>-1</sup>, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri .....86
- Şekil 4.26. A) YBCE/MWCNT/PNR yalın elektrodunun tampon çözeltide -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 mV.s<sup>-1</sup>, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri .....87
- Şekil 4.27. A) YBCE/MWCNT/AuNP/PNR yalın elektrodunun tampon çözeltide -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 mV.s<sup>-1</sup>, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri .....88
- Şekil 4.28. Farklı döngü sayılarında hazırlanan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR yalın elektrotlarının tampon çözeltide -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Döngü sayısı: 5, 10, 15 ve 20, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl 50 mV.s<sup>-1</sup> tarama hızında) .....89
- Şekil 4.29. Farklı döngü sayılarında hazırlanan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR elektrotlarının NADH derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,5 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,2 V) .....90
- Şekil 4.30. 1mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> içerisinde tabaka tabaka MWCNT (tabaka sayısı: 0, 1, 2, 3, 4 ve 5) ile modifiye edilmiş YBCE elektrotlarının 100 mV.s<sup>-1</sup> tarama hızında +0,7 V ile -0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları .....92
- Şekil 4.31. A) 1mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> içerisinde YBCE elektrodunun (0 tabaka MWCNT) + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 75, 100, 125 mV.s<sup>-1</sup>) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri.....93
- Şekil 4.32. A) 1mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> içerisinde 1 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 75, 100, 125 mV.s<sup>-1</sup>) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri .....94
- Şekil 4.33. A) 1mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> içerisinde 2 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 100, 125 mV.s<sup>-1</sup>) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök

tarama hızı grafikleri.....	95
Şekil 4.34. A) 1mM $K_3Fe(CN)_6$ içerisinde 3 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri .....	96
Şekil 4.35. A) 1mM $K_3Fe(CN)_6$ içerisinde 4 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri .....	97
Şekil 4.36. A) 1mM $K_3Fe(CN)_6$ içerisinde 5 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 75, 100, 125 $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri .....	98
Şekil 4.37. 1mM $K_3Fe(CN)_6$ içerisinde tabaka tabaka AuNP (tabaka sayısı: 0, 1, 2 ve 3) ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT elektrotlarının 100 $mV.s^{-1}$ tarama hızında + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları.....	100
Şekil 4.38. A) 1mM $K_3Fe(CN)_6$ içerisinde YBCE/MWCNT elektrodunun (0 tabaka AuNP) + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 100, 125 $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri.....	101
Şekil 4.39. A) 1mM $K_3Fe(CN)_6$ 1 tabaka AuNP ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT/AuNP elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 100, 125 $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri.....	102
Şekil 4.40. A) 1mM $K_3Fe(CN)_6$ 2 tabaka AuNP ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT/AuNP elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 100, 125 $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri.....	103
Şekil 4.41. A) 1mM $K_3Fe(CN)_6$ 3 tabaka AuNP ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT/AuNP elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 100, 125 $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri.....	104

Şekil 4.42. Farklı pH'lardaki 100 µM NADH çözeltisinin, YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu kullanılarak elde edilen akımlara karşı pH grafiği (+ 0,2V, 0,1 M KCl) .....	106
Şekil 4.43. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodunda 10 µM NADH'nin ardışık katımı ile elde edilen kronoamperogram (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu, 0,1 M KCl) .....	107
Şekil 4.44. YBCE/MWCNT/AuNP elektrodunda NADH derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu, 0,1 M KCl) .....	108
Şekil 4.45. YBCE/MWCNT/AuNP kompozit elektrodunun 100 µM NADH derişimine karşı elde edilen akım değerleri-gün sayısı grafiği (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu, 0,1 M KCl) .....	109
Şekil 4.46. ADH temelli biyosensörlerin ölçüm prensibinin şematik gösterimi .....	110
Şekil 4.47. YBCE/ADH/NAD <sup>+</sup> /G/GA biyosensörünün maviden kırmızıya 50, 100 ve 500 µM etanol içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl) .....	111
Şekil 4.48. YBCE/ADH/NAD <sup>+</sup> /G/GA (kırmızı) ve YBCE/ADH/NAD <sup>+</sup> /NF/GA (mavi) biyosensörlerinin farklı potansiyel aralıklarında 50 µM etanol içerisindeki differansiyel puls voltamogramları (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl) .....	111
Şekil 4.49. YBCE/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2 mM NAD <sup>+</sup> , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V) .....	113
Şekil 4.50. MWCNT-YBE/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2 mM NAD <sup>+</sup> , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V) .....	114
Şekil 4.51. YBCE/MWCNT/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2mM NAD <sup>+</sup> , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V) .....	115
Şekil 4.52. YBCE/AuNP/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2mM NAD <sup>+</sup> , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V) .....	117
Şekil 4.53. YBCE/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2mM NAD <sup>+</sup> , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V) .....	118
Şekil 4.54. YBCE/MWCNT/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2 mM NAD <sup>+</sup> , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu,	

0,1 M KCl, + 0,7 V) .....	119
Şekil 4.55. YBCE/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2 mM NAD <sup>+</sup> , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V) .....	120
Şekil 4.56. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2 mM NAD <sup>+</sup> , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V) .....	121
Şekil 4.57. MWCNT, AuNP ve PNR ile modifiye edilmiş YBCE'ler ile hazırlanan ADH temelli biyosensörlerin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2 mM NAD <sup>+</sup> , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V) .....	122
Şekil 4.58. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün, farklı pH'larda elde edilen akımlara karşı pH grafiği (400 µM etanol, 2 mM NAD <sup>+</sup> , + 0,7 V, 0,1 M KCl) .....	124
Şekil 4.59. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin 3 farklı sabit NAD <sup>+</sup> derişiminde (2, 4 ve 7 mM NAD <sup>+</sup> ), etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V) .....	125
Şekil 4.60. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün farklı NAD <sup>+</sup> derişimlerinde elde edilen akımlara karşı NAD <sup>+</sup> derişimi grafiği (100 µM etanol, pH 7,75, + 0,7 V, 0,1 M KCl) .....	126
Şekil 4.61. Farklı enzim miktarlarında hazırlanmış YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin, etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 7 mM NAD <sup>+</sup> , 0,1 M KCl, +0,7 V).....	127
Şekil 4.62. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün farklı NAD <sup>+</sup> derişimlerinde elde edilen akımlara karşı NAD <sup>+</sup> derişimi grafiği (100 µM etanol, pH 7,75, + 0,7 V, 0,1 M KCl) .....	128
Şekil 4.63. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün farklı potansiyellerde, etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 7 mM NAD <sup>+</sup> , 0,1 M KCl, 150 unit ADH).....	129
Şekil 4.64. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensöründe 100 µM etanolün ardışık katımı ile elde edilen kronoamperogram (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 150 U ADH) .....	131
Şekil 4.65. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensöründe 100 µM etanolün ardışık katımı ile elde edilen akım-derişim grafiği (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 150 U ADH) .....	132

- Şekil 4.66. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün 400 µM etanol derişimine karşı elde edilen akım değerleri-gün sayısı grafiği (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 150 U ADH) .....133
- Şekil 4.67. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinde 100 µM etanolün ardışık katımı ile elde edilen akım-derişim grafikleri (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 150 U ADH) .....134
- Şekil 4.68. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinde 100 µM etanolün ardışık katımı ile elde edilen akım-etanol yüzdesi grafikleri (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 150 U ADH) .....135
- Şekil 4.69. AOx temelli biyosensörlerin ölçüm prensibinin şematik gösterimi .....136
- Şekil 4.70. YBCE/AOx/G/GA biyosensörünün diferansiyel puls voltamogramları (100 µM metanol, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, - 0,1 V ile 1,0 V potansiyel aralığı) .....137
- Şekil 4.71. YBCE/AOx/G/GA biyosensörünün, farklı pH'larda elde edilen akımlara karşı pH grafiği (100 µM metanol, - 0,45 V, 0,1 M KCl) .....138
- Şekil 4.72. Farklı enzim miktarlarında hazırlanmış YBCE/AOx/G/GA biyosensörlerinin metanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, - 0,45 V) .....139
- Şekil 4.73. YBCE/AOx/G/GA biyosensörünün, farklı potansiyelerde elde edilen akımlara karşı potansiyel grafiği (100 µM metanol, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl) .....140
- Şekil 4.74. YBCE/AOx/G/GA biyosensörünün farklı potansiyelerde, metanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1,2 unit AOx) .....141
- Şekil 4.75. YBCE/AOx/G/GA ve YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G biyosensörlerinin 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisindeki döngüsel voltamogramları Tarama hızı: 50 mV.s<sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1,2 unit AOx) .....142
- Şekil 4.76. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G biyosensörlerinin 200 µM metanol ve tampon çözeltide elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50 mV.s<sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1,2 unit AOx) .....142
- Şekil 4.77. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörünün, farklı potansiyelerde elde edilen akımlara karşı potansiyel grafiği (200 µM metanol, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1,2 U AOx) .....144
- Şekil 4.78. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörlerinin metanol ve etanol derişimlerine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,0 fosfat

tamponu, -0,30 V, 0,1 M KCl, 1,2 U AOx) .....	145
Şekil 4.79. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G biyosensörlerinin 0,1, 0,2 ve 0,3 mM sabit etanol derişiminde hazırlanmış farklı metanol derişimlerine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, - 0,30 V, 1.2 U AOx) .....	146
Şekil 4.80. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörlerinde 50 µM etanolün ardışık katımı ile elde edilen akım-etanol yüzdesi grafikleri (- 0,30 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1,2 U AOx) .....	147

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Beş temel tutuklama metodunun avantaj ve dezavantajları.....	10
Çizelge 3.1. Elektrot yüzeyinin temizlenmesi ve aktivasyonu için YCBE ve MWCNT YBE'lere uygulanan işlemler.....	55
Çizelge 4.1. YBCE ve MWCNT-YBE'lerin yüzey aktivasyonu ve karakterizasyonu sonrası voltamogramlardan elde edilen $I_{pa}/I_{pc}$ ve $\Delta E$ değerleri .....	61
Çizelge 4.2. Şekil 4.5'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri .....	65
Çizelge 4.3. YBE'lerin türü ve modifikasyonlarının, NADH'nin amperometrik tayin performanslarına etkilerinin karşılaştırılması .....	69
Çizelge 4.4. Şekil 4.17'de verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen $E_{pa}$ ve $I_{pa}$ değerleri .....	78
Çizelge 4.5. Şekil 4.29'da verilen grafiklerden elde edilen hassasiyet ve korelasyon katsayısı değerleri .....	91
Çizelge 4.6. Farklı tabakalarda MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE'lerin $100 \text{ mV.sn}^{-1}$ tarama hızındaki döngüsel voltametriden elde edilen $E_{pa}$ , $I_{pa}$ , yüzey alanı, $\Delta E_p$ , ve $I_{pa}/I_{pc}$ değerleri .....	99
Çizelge 4.7. Farklı tabakalarda AuNP ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT'lerin $100 \text{ mV.sn}^{-1}$ tarama hızındaki döngüsel voltametriden elde edilen $E_{pa}$ , $I_{pa}$ , yüzey alanı, $\Delta E_p$ , ve $I_{pa}/I_{pc}$ değerleri .....	105
Çizelge 4.8. NADH'nin amperometrik tayini için YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodunda elde edilen analitiksel parametreler .....	108
Çizelge 4.9. ADH temelli biyosensörlerin analitiksel performanslarına YBE türlerinin etkilerinin karşılaştırılması .....	114
Çizelge 4.10. YBCE/MWCNT/ADH/GA ve MWCNT-YBE/ADH/GA biyosensörlerinin duyarlılık ve korelasyon katsayısı değerleri .....	116
Çizelge 4.11. Şekil 4.57'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlılık ve korelasyon katsayıları değerleri .....	123
Çizelge 4.12. Şekil 4.59'da verilen grafiklerden elde edilen duyarlılık ve korelasyon katsayıları değerleri .....	125

Çizelge 4.13. Şekil 4.61’de verilen grafiklerden elde edilen duyarlılık ve korelasyon katsayıları değerleri .....	127
Çizelge 4.14. Şekil 4.63’de verilen grafiklerden elde edilen duyarlılık ve korelasyon katsayıları değerleri .....	130
Çizelge 4.15. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile etanolün amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler...	132
Çizelge 4.16. Şekil 4.67’de verilen grafiklerden elde edilen duyarlılık ve korelasyon katsayıları değerleri .....	135
Çizelge 4.17. Seyreltilmiş numunelerin analizi sonucu ölçülen akım değerleri ve hesaplanan alkol yüzdeleri .....	136
Çizelge 4.18. Şekil 4.72’de verilen grafiklerden elde edilen duyarlılık ve korelasyon katsayıları değerleri .....	139
Çizelge 4.19. Şekil 4.74’de verilen grafiklerden elde edilen duyarlılık ve korelasyon katsayıları değerleri .....	141
Çizelge 4.20. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörleri ile etanol ve metanolün amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler .....	145
Çizelge 4.21. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörleri ile sabit etanol derişiminde metanolün amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler .....	146
Çizelge 4.22. Seyreltilmiş numunelerin analizi sonucu ölçülen akım değerleri ve hesaplanan alkol yüzdeleri .....	148
Çizelge 4.23. Etanol/metanol karışımının analizine ilişkin veriler ve sonuçlar.....	149





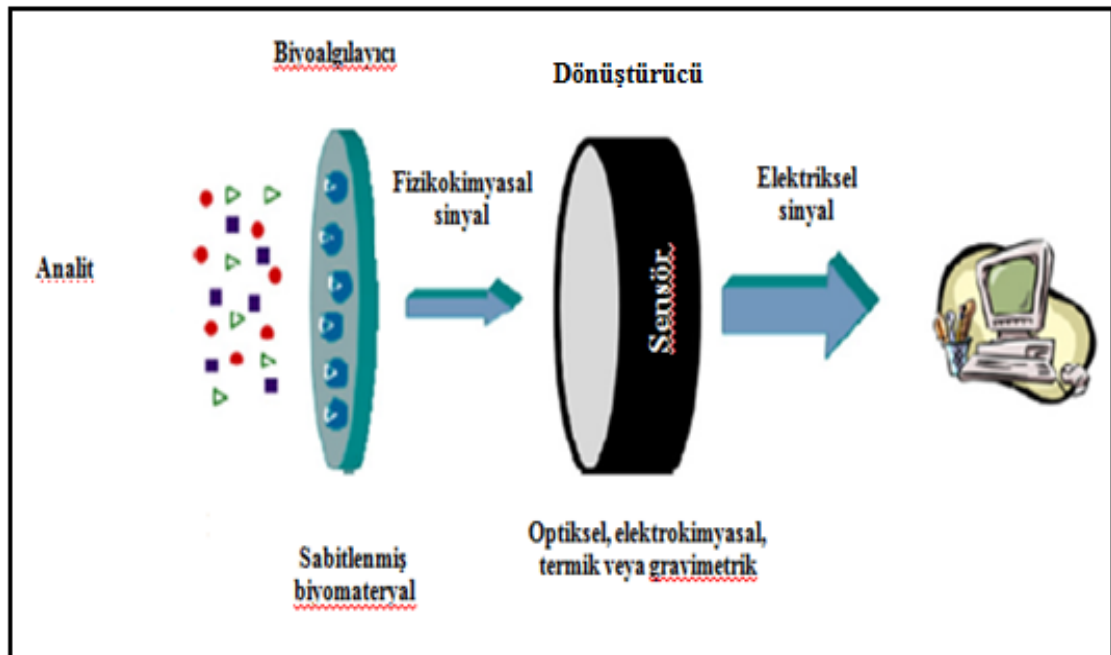
# 1. GİRİŞ

## 1.1. Biyosensörler

Biyosensör terimi ilk olarak 1977 yılında K. Cammann tarafından ortaya atılmıştır. Fakat biyosensörün IUPAC tanımı ancak 1999-2001 yılları arasında ortaya çıkmıştır (Thevenot vd 2001). Biyosensörler, analit derişimi ile orantılı olarak ölçülebilen bir sinyal üretmek için biyolojik bir tanımlama elemanı ve fiziksel bir dönüştürücü içeren analitik bir cihazdır (Su vd 2011). IUPAC'ye göre bir biyosensör, biyolojik tanımlama elemanı (biyokimyasal algılayıcı) kullanarak özgün nicel veya yarı-nicel analitiksel bilgiyi sağlama yeteneğine sahip olan ve kendi kendine yeten birleşik (entegre) bir cihaz olarak tanımlanır.

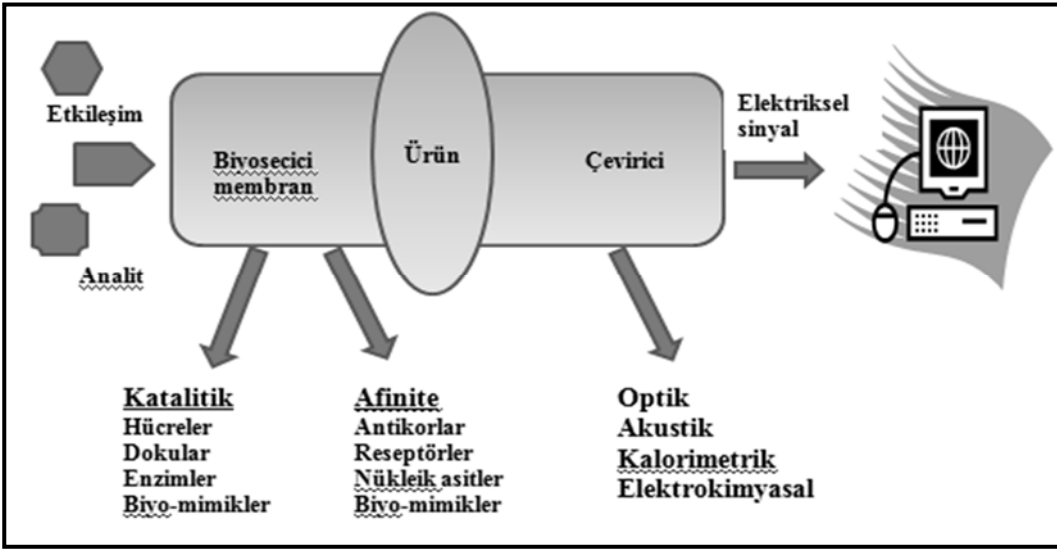
### 1.1.1. Biyosensörlerin yapısı ve sınıflandırılması

Biyosensörler biyobileşen (biyoalgılayıcı) ile fiziksel bileşenlerden (fiziksel dönüştürücü) oluşur. Biyosensörlerin görevi biyolojik bir olayın ölçülebilir bir sinyale dönüştürülmesidir (Telefoncu 2012). Biyosensörlerin yapısında görev alan biyolojik materyal hedef analite karşı cevap verir. Bu biyomateryaller enzim, mikroorganizma, bitki veya hayvan dokusu, hücre, organel gibi biyokatalizörler ve antikor, lektin veya nükleik asit gibi biyoligantlar olarak iki gruba ayrılabilirler. Fiziksel dönüştürücü ise biyomateryalin hedef analit ile etkileşimi sonucu algıladığı biyolojik sinyali tanımlanabilir bir sinyale dönüştürür ve bu sinyal analit ile orantılıdır. Fiziksel dönüştürücüler, elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik), optik, akustik, mekanik, kalorimetrik, piezoelektrik ve manyetik özellikte olabilir (Mao vd 2008, Castillo vd 2004). Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi Şekil 1.1'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.1. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi

Biyosensörler genel olarak sahip oldukları biyobileşen veya fiziksel dönüştürücünün türüne göre sınıflandırılırlar. Biyobileşen, sistemin seçilen yüzeyine tutuklanmış analiti tanıyıcı elemandır. Bu biyobileşen antikor, enzim, protein, nükleik asit gibi biyolojik bir molekül olabilir. Dolayısıyla, antijen/antikor ilişkisi, nükleik asit etkileşimleri, enzimatik tepkimeler, hücrel metabolik farklanmalar ya da biyometrik materyaller (sentetik biyoalgılayıcılar) ile oluşturulan etkileşimler uygun dönüştürücünün seçimiyle izlenebilir. İletici sistemler olan dönüştürücüler, sensör elemanı olan elektrik akımını, potansiyeli, impedans gibi unsurları ölçen amperometrik, potansiyometrik, impedimetrik, konduktometrik, akustik, optik ya da kalorimetrik elemanlardan biri olarak seçilebilir (Timur 2012). Biyosensörlerin sınıflandırılması Şekil 1.2’de verilmiştir (Dzyadevych vd 2008).



Şekil 1.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması

### 1.1.2. Biyosensörlerin avantajları ve uygulama alanları

Biyosensörlerin geleneksel analitik tekniklere göre, yerinde ve gerçek zamanlı izleme olasılığı, yoğun numune hazırlama gerektirmeden daha ucuz, hızlı ve portatif tayin gibi birçok avantajları vardır (Dorst vd 2010). Minyatürleştirmeye uygun, basit yapılı, üretimi ve kullanımının kolay, ucuz, tek kullanımlık, biyokimyasal seçiciliğinin olması, numune hazırlama gerektirmemesi, sürekli izleme ve yatak başı uygulanabilirlik gibi özellikleri nedeniyle biyosensörlerin kullanımı tercih edilmektedir (Telefoncu 2012).

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel aktivitede özellikle, otomasyon, kalite kontrolü ve durum tespitinde çok önemli rol oynarlar. Metabolitler, peptidler, proteinler ve DNA gibi biyomoleküller yanında bakteriler, virüsler gibi biyoparçacıkları ve birçok çevre kirlenici veya gıda kirlenicilerini çok seçici ve yüksek duyarlılıkta tayin edebilmektedirler. Ayrıca biyoterörizm aktiviteleri ve pandemilerin zamanında tespiti ve önlem alınması bakımından büyük önem taşımaktadır (Telefoncu 2012).

Biyosensörlerin tarihi, 1962 yılında Cincinnati Çocuk Hastanesinde (Ohio, ABD) Clark ve Lyons tarafından glukoz enzim elektrotları ile yapılan ilk sensörün geliştirilmesiyle başlar. İlk glukoz enzim elektrot, yarı-geçirgen bir diyaliz membran yardımıyla bir oksijen elektrodunun glukoz oksidaz ile ince bir tabaka halinde kaplanmasıyla ilgilidir. Elektrokimyasal ölçümler, enzim katalizli tepkime ile tüketilen oksijen miktarının izlenmesini temel almaktadır (Wang 2008). Ticari olarak üretilen ilk biyosensör ise şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayinini mümkün kılan glukoz oksidaz elektrodudur. Bunu real fonksiyon testleri için geliştirilen üre ve kreatinin elektrotları ile kas gücünü ölçmeye yönelik laktat elektrotları izlemiştir. İnsan vücuduna yerleştirilebilen biyosensörler de geliştirilmiştir. Bunlar, biyolojik sıvıların vücut dışına alınmadan ve tüketilmeden analizine imkânı verirler ki, özellikle ameliyat sırasında bu bilgilerin kesintisiz sağlanması çok önemlidir. Son yıllarda analizörlere enzim elektrotları monte edilmiş ve yoğun bakım ünitelerinde kullanılmaya başlanmıştır. Biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde başta glukoz olmak üzere birçok monosakkarit, amino asitler, organik asitler (laktik asit), üre ve alkol tayinlerinde enzim sensörleri kullanılmaktadır. Ayrıca gıdalarda yabancı maddeler (pestisitler, toksinler ve yabancı hormonlar vb) yanında aroma ve tazelik gibi kompleks parametreler için de biyosensörler hazırlanabilir (Telefoncu 2012).

### **1.1.3. Elektrokimyasal biyosensörler**

Elektrokimyasal biyosensörler en yaygın olarak kullanılan biyosensörlerdir. Diğer tip biyosensörlerin kullanımında görülen dezavantajların üstesinden gelmesi, hızlı, pratik ve ekonomik olması gibi avantajları nedeniyle daha çok tercih edilir. Bu biyosensörlerin temeli, biyo-etkileşim işlemi süresince elektronlar gibi elektrokimyasal türlerin tüketilmesi veya üretilmesiyle oluşan elektrokimyasal sinyalin bir elektrokimyasal detektör tarafından ölçülmesine dayanır. Elektrokimyasal biyosensörler detektör sistem tarafından ölçülen elektrokimyasal özelliğine göre kondüktometrik, potansiyometrik ve amperometrik biyosensörler olmak üzere üç sınıfa ayrılır (Chaubey ve Malhotra 2002).

#### **1.1.3.1. Kondüktometrik biyosensörler**

İletkenlik ölçümüne dayalı olarak yapılan analiz yöntemine kondüktometri denir. Kondüktometrik biyosensörlerde enzimatik tepkimelerin yüklü türleri oluşturması veya tüketmesi sonucunda analiz edilmek istenen numunede oluşan değişiklik ölçülür. Kondüktometrik dönüştürücü, minyatürize edilmiş elektrotlardan oluşur ve elektrot yüzeyi yakınındaki ince elektrolit tabakasının iletkenliğini ölçer. Elektrot yakınındaki bu çözeltilerde oluşan iletkenlik değişiminden bir enzimatik tepkime izlenebilir. Kondüktometrik ölçüm yöntemi enzim katalizinde kullanılarak, bileşik derişimi ve enzim aktivitesi tayini yapılabilir. Bu durumda seçicilik kullanılan enzimden kaynaklanır (Anık 2012).

Kondüktometrik ilkeleri temel alan biyosensörlerin birçok avantajı vardır (Jaffrezic-Renault ve Dzyadevych 2008):

- a. İnce film elektrotlarla minyatürleştirilmeye uygundur ve pahalı teknoloji gerektirmeden büyük çapta üretilebilirler,

- b. Herhangi bir referans elektrot gerektirmezler,
- c. Dönüştürücüler ışığa duyarlı değildir,
- d. Çalışma potansiyeli oldukça düşüktür,
- e. Çeşitli tepkime ve mekanizmaları temel alan, farklı doğal bileşiklerin geniş bir spektrumda tayini yapılabilir

### 1.1.3.2. Potansiyometrik biyosensörler

Galvanik bir pil sisteminde iki elektrot arasındaki potansiyel farkın sıfır ya da çok düşük akım altında gözlenebilmesine dayalı ölçüm yöntemine potansiyometri denir (Anık 2012). Potansiyometrik sensörler pH ve iyon derişimindeki değişimi ölçebilir. Potansiyometrik biyosensörler, iyon seçici elektrotlar (ISE) gibi dönüştürücünün yüzeyindeki membran üzerine genellikle enzim, antijen veya antikor gibi biyolojik aktif materyallerin tutuklanmasını ve analitin bu membrandaki biyolojik materyalle etkileşimi sonucu oluşan aktif türlerin derişiminin logaritması ile doğru orantılı olarak çalışma elektrodunda üretilen potansiyelin referans elektrota karşı ölçülmesiyle tayin edilmesini temel alır. Potansiyometrik biyosensörlerde, biyolojik tepkimeyi elektrik sinyale dönüştürmek için ISE ile elektrik sinyal yükselticinin birleştirilmesi ile elde edilen iyon seçici alan etkili elektrotlar (ISFET) da transistör olarak kullanılmaktadır (Mello ve Kubota 2002).

Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan elektrotlar üç grup halinde toplanabilir (Anık 2012):

- a. Normal pH elektrot. Bu elektrotlar özgün bağlanma bölgelerine bağlanan katyon derişimine bağlı olarak elektriksel potansiyel oluşturmaktadır. Membranın seçiciliği camın bileşimine bağlı olarak değişmektedir.
- b. CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> veya H<sub>2</sub>S'ye duyarlı gaz geçirgen cam membranlarla kaplanmış pH elektrotlar. Bu membrandan difüzlener gazlar membran ve elektrot arasındaki çözeltilerde pH değişimine neden olur.
- c. Gümüş sülfür ve gümüş halojenür karışımından oluşan ince bir membran içeren katı hal elektrotları

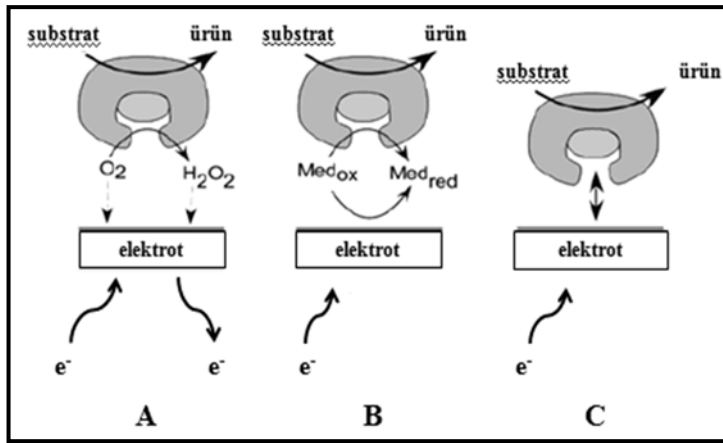
### 1.1.3.3. Amperometrik biyosensörler

Sabit potansiyel altında akım değişimini izleyerek derişim tayini yapılan yöntem amperometri yöntemidir (Anık 2012). Amperometrik biyosensörler, analit çözeltilisindeki elektroaktif türlere bir potansiyel uygulandığında, türlerin kimyasal tepkimeleri sonucunda üretilen akımı derişimleri ile orantılı olarak ölçer. Amperometrik biyosensörler hızlı, potansiyometrik olanlara göre çok daha hassas, kesin ve doğrudur. Bu yüzden termodinamik denge elde edilinceye kadar beklemeye gerek yoktur. Hatta amperometrik sensörlerin seçiciliği sadece var olan elektroaktif türlerin redoks potansiyeli ile kontrol edilir. Sonuç olarak, cihaz tarafından ölçülen akım birkaç kimyasal türün katkısını içerir (Mello ve Kubota 2002).

En yaygın olarak kullanılan biyosensörler enzim bazlı amperometrik elektrotlardır. Bu biyosensörler medyatörün doğasına ve tutuklanma yöntemine bağlı

olarak birinci, ikinci ve üçüncü nesil olarak sınıflandırılabilirler (Şekil 1.3) (Castillo vd 2004).

*Birinci nesil biyosensörlerin* temeli, substrat ürüne dönüşürken doğal oksijen kosubstratın tüketiminin veya enzimatik tepkime sonucu hidrojen peroksit üretiminin takibine dayanır (Wang 2008). Sadece bir biyoalgılayıcı ve bir dönüştürücüden oluşan birinci nesil elektrokimyasal biyosensörler, uygun bir potansiyelde polarize edildiğinde, ya moleküler oksijen indirgenecektir ya da oluşan hidrojen peroksit yükseltgenecektir. Kaydedilen akım substrat derişimi ile doğru orantılıdır. Birinci nesil biyosensörlerin başlıca dezavantajı, elektrokimyasal tayinin yüksek potansiyel uygulanarak yapılması ve böylelikle analitin seçiciliğinde düşük duyarlılığa yol açmasıdır. Gerçek numunelerde bulunan düşük miktarlardaki oksijen, elektrokimyasal ölçümlerde sınırlayıcı faktör olmaktadır (Castillo vd 2004).



Şekil 1.3. I. nesil (A), II. nesil (B) ve III. nesil (C) amperometrik enzim biyosensörleri

Amperometrik biyosensörler medyatör adı verilen aracı molekülleri ile modifiye edildiğinde *ikinci nesil biyosensörler* olarak sınıflandırılırlar. Medyatörler, fizyolojik olmayan, indirgenmiş enzim ve elektrot arasında elektronların karşılıklı taşınmasını sağlayan küçük redoks maddelerdir (Azevedo vd 2005).

Biyosensörler için uygun redoks medyatörlerinin özellikleri şöyle olmalıdır (Borgmann vd 2011):

- Elektrokimyasal olarak tersinir olmalı,
- İndirgenmiş ve yükseltgenmiş formları kararlı olmalı,
- Yan tepkimelere girmemeli,
- Redoks potansiyeli enzimatik tepkimelere uyumlu olmalıdır (düşük redoks potansiyeli).

Yaygın olarak kullanılan medyatörler ferrosenler, potasyum ferrosiyaniür ve osmiyum kompleksleridir (Azevedo vd 2005).

Medyatörsüz olarak enzim ile elektrodun doğrudan birleşmesi ile hazırlanan biyosensörlere *üçüncü nesil biyosensörler* denir. Bu sistemlerin temelinde enzimin redoks merkezi ile elektrot yüzeyi arasında doğrudan bir etkileşim ve substrat ürüne

dönüşürken doğrudan elektron aktarımı vardır. Bu mekanizmada elektronlar, enzimatik tepkimeler için ikinci bir substrat olarak davranır ve katalitik bir akım üretilmesini sağlar (Mello ve Kubota 2002, Anık 2012).

#### 1.1.4. Biyosensörlerin performans kriterleri

1994 yılında Buck ve Lindner, moleküler tanımlama esaslı tüm biyosensörler için, biyosensör cevabının karakterizasyonunun önemli olduğunu bildirmişlerdir. Bu uygulama parametreleri hız sınırlayıcı basamakların doğası (taşıma veya tepkime) ve verilen bir matris içinde biyosensörün optimizasyonunun belirlenebilmesi için de önemlidir. Dolayısıyla, önemli performans kriterlerinin ve bunların bir elektrokimyasal biyosensörün dönüştürücüsü ve reseptörüyle ilişkilerinin tartışılması yararlı olacaktır. Performans kriterleri sadece biyosensörlere özgü değildir; kimyasal sensörler hatta analitik metotların çoğu için ortaktır. Bu kriterler standart IUPAC tanımlamalarında önerilen duyarlık, doğruluk, laboratuvarlar arası ve farklı kullanıcılar arasındaki tekrarlanabilirlik olarak sıralanabilir (Thevenot vd 2001).

Biyosensörlerin hızlı değişimi ve çeşitliliği, performans kriterlerinin tanımlanmasını zorlaştırmaktadır. Her bir sensör sadece özel bir uygulama için karakterize ediliyor olmasına rağmen, performans kriterlerinin incelenmesi için standart IUPAC protokollerin kullanılması uygun görünmektedir. Bu protokoller genel kullanım için önerilmekte ve birçok farklı parametreyi içermektedir. Bu parametreler aşağıdaki başlıklarda açıklanmıştır (Thevenot vd 2001).

##### 1.1.4.1. Kalibrasyon karakteristikleri: duyarlık, çalışma ve doğrusal derişim aralığı, gözlenebilme ve nicel tayin sınırları

Genel olarak sensör kalibrasyonu, analitin standart çözeltilerinin ilavesi ve durgun hal cevaplarının ( $R_{ss}$ ), analit derişimine ( $c$ ) karşı veya onun logaritmasına karşı ( $\log c/c^\circ$ ) grafiğe geçirilmesiyle elde edilir.  $R_{ss}$ , bir tanığa (blank) karşı alınmış cevap ( $R_{bl}$ ) ile düzeltilmiş sinyaldir.  $c^\circ$ , 1 M olan referans derişimini simgeler (Thevenot vd 2001).

Duyarlık ve durgun hal kalibrasyon eğrilerinin doğrusal derişim aralığı, ( $R_{ss}-R_{bl}$ ) /  $c$  veya ( $R_{ss}-R_{bl}$ ) /  $\log c/c^\circ$  oranlarının,  $\log c/c^\circ$  ye karşı grafiğe geçirilmesiyle belirlenebilir. Bu yöntem, ( $R_{ss}-R_{bl}$ )'nin  $c$  veya  $\log c/c^\circ$  ye karşı çizilerek oluşturulan alışlagelmiş kalibrasyon eğrilerine göre daha kullanılışlıdır. Elektrokimyasal biyosensörler daima geniş bir doğrusal derişim aralığına sahiptirler. Bunun sebebi, biyokimyasal ya da biyolojik reseptörün biyokatalitik veya biyokompleksleşme özellikleri ile doğrudan ilişkilidir. Enzim temelli biyosensörlerde bu aralık, substrat için bir dış tabaka difüzyon bariyeri kullanımıyla ciddi anlamda genişletilebilmektedir. Ancak bu genişlemenin sensör duyarlığında azalmaya neden olabileceği açıktır. Tepkime tabakasındaki bölgesel substrat ( $S$ ) derişimi, yığın çözeltilisinden 2 kat daha düşük olabilir (Thevenot vd 2001).

Enzim temelli biyosensörler, Michaelis-Menten kinetikleri açısından ilişkilendirildiğinde,  $K_m$  ve ( $R_{ss}-R_{bl}$ )maks değerleri ile karakterize edilirler.  $K_m$ , bilindiği gibi maksimum hızın yarısındaki substrat derişimini ifade etmektedir, ( $R_{ss}-$

$R_{bl}$ )maks değeri ise sonsuz substrat derişimini göstermektedir. Görünür  $K_m$  değeri, çözünebilir enzimin  $K_m$  değerinden daha büyük olduğu zaman, ya numune ve tepkime tabakası arasında önemli bir substrat difüzyon bariyeri vardır ya da kosubstratın ( $S'$ ) enzimle olan tepkime hızı artmıştır. Enzim çözeltisinin kinetiği için görünür  $K_m$ , genellikle Lineweaver-Burk diyagramları ( $1/(R_{ss}-R_{bl})$ ) ye karşı  $1/c$  grafikler) kullanılarak belirlenmektedir. Herhangi bir elektrokimyasal sensör için, kullanılan standartların sayısı ve bileşimi ve numune matrisinin nasıl olduğu mutlaka dikkate alınmalıdır. Her bir biyosensör türü ve uygulaması için özgün işleyişler gerekli olabilir (Thevenot vd 2001).

Duyarlık,  $(R_{ss}-R_{bl})$ 'ye karşı  $c$  veya  $\log c/c^\circ$  gibi bir kalibrasyon grafiğinin eğimidir. Duyarlık ve tayin sınırları terimlerinin birbirine kesinlikle karıştırılmaması gerekmektedir. Gözlemlenebilme (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) için kör ve sinyal dalgalanmaları (gürültü) dikkate alınmalıdır. LOD ve LOQ tanımlamaları, biyosensöre özgü değildir ve IUPAC tavsiyeleri kullanılmalıdır. Çalışma derişim aralığı, doğrusal derişim aralığının geniş olarak düşünülebilir ve LOQ'nün düşük ve yüksek değerleri ile tayin edilir (Thevenot vd 2001).

#### 1.1.4.2. Seçicilik ve güvenilirlik

Biyosensörün seçiciliği, diğer amperometrik ve potansiyometrik sensörlerde olduğu gibi belirlenir ve tanımlanır (Naught ve Wilkinson 1997). Seçicilik, biyolojik algılayıcının ve dönüştürücünün seçimine bağlıdır. Enzimlerin çoğu özgündür. Ancak buna rağmen, alkol, şeker grubu veya aminoasit oksidazlar, peroksidazlar, laktaz, tirozinaz, seruloplazmin, alkol veya glukoz NAD-dehidrojenazlar seçici olmayan enzim grubu da, biyosensörlerin geliştirilmesi için kullanılmaktadır. Örneğin, çevre ve gıda numunelerinde fenol tayini için bu tür biyosensörler sıklıkla kullanılmıştır. Bakteri, maya veya doku kültürleri de doğal olarak özgün biyoreseptörler değildirler. Oksijen ve pH elektrotları ve ISFET'ler yeterli düzeyde seçicilik sağlarken, metal elektrotlar pek çok girişim yapan maddeye karşı sıklıkla duyarlık göstermektedirler (Thevenot vd 2001).

Biyosensörün seçicilik tayinine yönelik mevcut çeşitli metotlar içinde, en çok biyosensör ölçümlerini esas alan iki tanesi önerilmektedir. Bunlardan birincisi, biyosensörün ilave edilen girişimci maddeye karşı olan cevabının ölçümünü içerir. Aynı çalışma koşullarında hem her bir girişimci maddeye ilişkin, hem de analite ilişkin kalibrasyon grafikleri oluşturulur ve karşılaştırılır. Buradaki seçicilik, aynı derişimde analit için elde edilen sinyalin, girişimci için elde edilen sinyale oranı olarak tarif edilebilir. İkinci işleyişte ise ölçüm hücresine analit ilave edilir ve tahmin edilen sinyalin yarısına ulaşıldığı zaman girişim yapan maddeler ilave edilir. Seçicilik, biyosensör cevabının % değişimi olarak ifade edilir. İkinci yöntem, birinci yöntemde yapılan kalibrasyon eğrisi karşılaştırmasına göre daha kolay olmasına rağmen, ikinci metot her uygulama için karakteristiktir ve daha sınırlı bir önem arz etmektedir. Bu tür bir seçicilik, analitin derişimine aralığına bağlıdır (Thevenot vd 2001).

Verilen numuneler için biyosensörlerin güvenilirliği, onların hem seçicilik hem de tekrarlanabilirliğine bağlıdır. Güvenilirlik, gerçek çalışma koşullarında muhtemel girişimci maddeler varlığında belirlenmelidir. Bir biyosensörün, bir analizeci açısından



güvenilir olabilmesi için, biyosensör cevabı doğrudan analit derişimiyle ilişkili olmalıdır ve numune matrisinden gelebilecek girişimci maddelerin derişim değişimlerinden etkilenmemelidir. Bu yüzden, her bir biyosensör ve numune matrisi için öncelikle girişim yapabilecek maddelerin çok iyi incelenmesi ve bu girişimin sonuçlarının nasıl olacağını belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca güvenilirlik tayini, her bir uygulamadaki doğruluğun değerlendirilmesi için de gereklidir (Thevenot vd 2001).

#### 1.1.4.3. Durgun hal ve geçiş cevap zamanları, numune miktarı

Durgun hal cevap zamanı, ölçüm hücreğine her analit ilavesi için kolayca belirlenebilir. Durgun hal cevabının % 90 düzeyine ulaşması için belirli bir süre geçmesi gerekir (Buck vd 1986). Geçiş cevap zamanı, analit ilavesini takiben çıkış sinyalinin zamana göre birinci türevinin maksimum değerine,  $(dl/dt)_{maks}$ , ulaşması için gerekli olan süre olarak nitelendirilir. Her iki cevap zamanı da, analit, kosubstrat ve ürünlerin farklı tabakalar veya membranlar boyunca taşınma hızlarına bağlıdır. Bu yüzden, bu tabakaların kalınlıkları ve geçirgenlikleri gerekli parametrelerdir. Bununla birlikte, her iki cevap zamanı da moleküler tanıma sisteminin aktivitesine bağlıdır. Moleküler tanıma sisteminin aktivitesinin yüksek olması bu cevap sürelerini kısaltır. Sensörlerin *in vivo* veya endüstriyel reaktörlere yerleştirilmesi durumunda bu sensörlerin operasyonel cevap zamanları, analit ve kosubstratın sensör bölgesine taşınma hızlarına da bağlı olacaktır (Thevenot vd 2001).

#### 1.1.4.4. Tekrarlanabilirlik, kararlılık ve biyosensör ömrü

Tekrarlanabilirliğin tanımı, elektrokimyasal biyosensörler için diğer analitik cihazlarıkiyle aynıdır. Tekrarlanabilirlik, belirli bir zaman periyodu içerisinde elde edilen sonuçlardaki farklılıkların ya da dağılımların bir ifadesidir. Genellikle, kullanılan bir doğrusal aralıktaki analit derişimleri için belirlenir (Thevenot vd 2001).

Bir biyosensör cevabının uygulama kararlılığı, büyük ölçüde sensörün geometrisine, hazırlanma yöntemine, reseptör ve dönüştürücüye bağlıdır. Üstelik substratın iç veya dış difüzyonu veya biyolojik tanıma tepkimesi gibi cevap hızını sınırlayıcı faktörler de uygulama kararlılığını oldukça etkilemektedir. Son olarak uygulama koşulları da kararlılığı değiştirebilmektedir. Uygulama kararlılığının belirlenebilmesi için, analit derişimi, biyosensörün analit çözeltisiyle sürekli veya aralıklarla teması, sıcaklık, pH, tampon bileşimi, organik çözenlerin varlığı ve numune matrisinin bileşimi gibi parametrelerin düşünülmesi gerekmektedir (Thevenot vd 2001).

Bazı biyosensörlerin laboratuvar koşullarında bir yıldan fazla kullanım sürelerinin olduğu rapor edilmiş olmasına rağmen, endüstriyel işlemlerde veya implante biyosensörlerin pratik kullanım ömürleri günler veya haftalarla ifade edilmektedir (Pickup ve Thevenot 1993). Depo kararlılığının değerlendirilmesi için önemli parametreler ise depolama ortamının kuru veya nemli oluşu, atmosferin bileşimi (hava veya azot), pH'ı, tampon bileşimi ve katkı maddelerinin varlığıdır. Biyosensörlerin depo ve operasyonel ömrünün nasıl saptandığı (rafta saklanılarak mı yoksa kullanılarak mı), depo ve çalışma koşullarının nasıl olduğu ve substrat derişiminin Km'ye göre belirlenip belirlenmediği çok önemlidir. Biyosensörün hız belirleme basamağı veya faktörünün

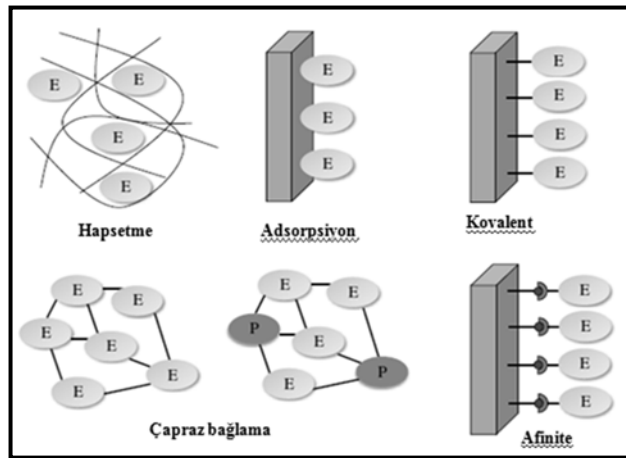
bilinmesinin, kararlılık özelliklerinin anlaşılabilmesi için oldukça önemlidir (Thevenot vd 2001).

Son olarak kullanım ömrünün, başlangıç duyarlılığı, kalibrasyon grafiğinin doğrusal tayin aralığının üst sınırı, doğruluk veya tekrarlanabilirlik gibi belirli referanslara göre belirlenmesi gerekmektedir. 2001 yılında Thevenot vd biyosensör ömrünün ( $t_L$ ) tanımının, geçerli duyarlık düzeyi için gerekli olan depo veya uygulama süresi olduğunu ve bir doğrusal derişim aralığı içinde sonuçların % 10 ( $t_{L10}$ ) veya % 50 ( $t_{L50}$ ) azalışı şeklinde gösterilebileceğini önermişlerdir. Depo ömrünün belirlenebilmesi için, aynı üretim şartlarında hazırlanmış biyosensörlerin belirli şartlar altında farklı sürelerde depolanması sonucu, farklı biyosensörlerdeki duyarlılığın karşılaştırılması gerekmektedir (Thevenot vd 2001).

## 1.2. Enzim Temelli Biyosensörlerde Tutuklama Yöntemleri

Enzim tutuklanması, iyi uygulanabilirlik ve saklama kararlılığı, yüksek duyarlık ve seçicilik, kısa cevap zamanı ve yüksek tekrarlanabilirlik gibi uygun performansa sahip etkili biyosensör geliştirmek için önemli bir faktördür. Tutuklanmış biyomoleküller, tutuklamadan sonra yapılarını, fonksiyonlarını ve biyolojik aktivitelerini sürdürmeli, yüzeye kuvvetli bağlanmalı ve biyosensörün kullanımı süresince yüzeyden ayrılmamalıdır. Üstelik ideal bir biyosensör uzun-dönem uygulamalar için kararlı olmak zorundadır. Ölçümlerin doğruluğu, sensörden sensöre tekrarlanabilirlik ve uygulama yarı-ömrü gibi faktörler enzimin stabilitesinden etkilenmektedir. Bir biyosensörün analitik performansı tutuklama işleminden güçlü bir şekilde etkilenmekte ve bu sebeple enzimin başarılı tutuklanması oldukça önemli olmaktadır (Sassolas vd 2012).

Adsorpsiyon, kovalent bağlanma, hapsetme, çapraz bağlanma ve afinite gibi çeşitli tutuklama stratejileri geliştirilmiştir (Şekil 1.4). Her bir tutuklama yönteminin bazı avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Hatta bazı durumlarda enzimin tutuklanması için birkaç tutuklama yönteminin bir kombinasyonu yapılmaktadır. Beş temel tutuklama yönteminin avantaj ve dezavantajları Çizelge 1.1'de verilmiştir.



Şekil 1.4. Enzim tutuklama yöntemlerinin şematik gösterimi (E: Enzim, P: ürün)

En uygun ve mantıklı tekniğin seçimi, enzimin doğasına, dönüştürücünün türüne ve ilgili tayin yöntemine bağlıdır. Tutuklama işleminin tekrarlanabilirliği, ucuz olması ve zorluğu da düşünülmelidir. Eğer enzim tutuklandığında, enzimin denaturasyonuna veya konformasyonel değişimine neden oluyor ve özellikle de aktif merkezi modifiye oluyorsa, yapılan tutuklama biyosensörün duyarlılığını azaltır. Daha iyi bir duyarlılığı, dönüştürücü yüzeyine enzimin yönelimli tutuklanması veya kovalent bağlanma şartlarında destek yüzeyi ve enzim arasında enzimin doğasına uygun bir molekül ayırıcının seçilmesiyle elde edilir. Düzgün olarak yönlendirilmiş enzim doğrudan molekül ayırıcıların aktif merkezinden, çözelti fazına maruz kalır. Polietilen glikol gibi daha uzun ve esnek molekül ayırıcılar sterik engeli önleyebilirler ve sabitlenmiş enzimin hareketini sınırlayabilirler. Pek çok tutuklama tekniği, substratın ulaşabilmesi ile aktif merkezinin engellenmesi veya enzimin denaturasyonu nedeniyle kısmen veya tamamen aktivite kaybını içeren enzim molekülünün rastgele dağılımını veya zayıf yönelimini içerir (Sassolas vd 2012).

Çizelge 1.1. Beş temel tutuklama yönteminin avantaj ve dezavantajları (Sassolas vd 2012)

Tutuklama yöntemi	Bağlanmanın doğası	Avantajları	Dezavantajları
Adsorpsiyon	Zayıf bağlanma	Basit ve kolay Enzimin aktivite kaybı sınırlı	Desorpsiyon Özgün olmayan bağlanma
Kovalent bağlama	Enzim ve desteğin fonksiyonel grupları arasındaki kimyasal bağ	Difüzyon bariyeri yok Kararlı Kısa cevap zamanı Yüksek enzim aktivite kaybı	Matris rejenere edilemez Toksik ürünlerle birleşebilir
Hapsetme	Bir polimer veya bir jel içinde enzimin karışması	Enzim ve monomer arasında aktivite kaybına neden olan kimyasal tepkime yok Birkaç farklı enzim aynı polimer içinde tutuklanabilir	Difüzyon bariyeri Enzimin sızması Monomer ve enzimim yüksek derişimleri elektropolimerizasyon için gereklidir
Çapraz bağlama	Enzim/çapraz bağlayıcı/inert molekül arasındaki bağ	Basit	Yüksek enzim aktivite kaybı
Afinite	Bir protein sekansındaki afinite ucu ve desteğin fonksiyonel grubu arasındaki afinite bağı	Kontrollü ve yönelimli tutuklama	Enzim üzerinde özgün grupların (Histidin gibi) bulunması gerekir

### 1.2.1. Adsorpsiyon

Enzimin katı destek üzerine adsorpsiyonu, fiziksel tutuklama yönteminin en kolayıdır (Choi 2004). Enzim bir çözeltide çözülür ve sabit bir zaman periyodunda enzim çözeltisi katı destek yüzeyi ile temas ettirilir. Sonra adsorplanmamış enzim tampon ile yıkanarak çıkarılır. Adsorpsiyon mekanizması Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik ve/veya hidrofobik etkileşimler gibi zayıf bağları temel alır. Bu teknik destek yüzeyinin herhangi bir fonksiyonlaştırılmasını içermez ve genellikle enzimin aktivitesine bozucu etki yapmaz. Ancak buna rağmen bu tekniğin, enzimin destek üzerine gevşek bağlanması ve sıcaklık, iyonik şiddet ve pH'daki değişiklik sonucu enzimin yüzeyinden desorbe olması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu yüzden enzimin adsorplanmasını temel alan biyosensörlerin, zayıf uygulama ve saklama kararlılığı, diğer protein ve maddelerin özgün olmayan adsorpsiyonu gibi problemleri vardır (Sassolas vd 2012).

Adsorpsiyon ile enzimin dönüştürücü yüzeye bağlanması birkaç yolla gerçekleşir:

- a. Fiziksel adsorpsiyon
- b. Elektrostatik etkileşim
- c. Tabaka tabaka kaplama
- d. Elektrokimyasal katkılama
- e. İyon değiştirici boncuklar üzerinde ön tutuklama
- f. Lipidik mikro çevrede tutunma (Langmuir–Blodgett teknolojisi)

*Fiziksel adsorpsiyon*, bir enzimin bir yüzeye zayıf bağlarla tutunarak basitçe kaplanmasıyla oluşur. Bu tutuklama stratejisi enzimatik biyosensörlerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin Bonnet vd 2003 yılında yüzey baskılı elektrotlar üzerine asetilkolinesteraz enzimini basit adsorpsiyon ile tutuklayarak bir amperometrik biyosensör hazırlamışlardır. Bu sistemin uygulama kararlılığını artırmak amacıyla, elektrotlar, adsorplanmamış enzimleri yüzeyden temizlemek için, bir seri uygun tamponla yıkanmışlardır. Bu şekilde elektrotlar sekiz aralıksız deney için kararlılık göstermiş ve vakum altında saklandığında 50 gün boyunca aynı aktiviteyi göstermiştir (Sassolas vd 2012).

Enzimler yüklü yüzeylere *elektrostatik etkileşimle* de tutuklanabilirler. Eğer enzimin izoelektrik noktası çözeltinin pH değerinden düşükse, enzim negatif olarak yüklenir ve böylece pozitif olarak yüklenmiş desteğe bağlanabilir. Elektrostatik adsorpsiyonu temel alan elektrokimyasal katkılama yöntemi, tabaka tabaka kaplama ve iyon değiştirici tanecikler üzerinde ön tutuklama teknikleri enzimatik biyosensörlerin geliştirilmesinde kullanılan adsorpsiyon metotlarından (Sassolas vd 2012).

Enzimlerin *tabaka tabaka kaplama tekniği* ile elektrostatik tutuklanması ilk olarak 1991 yılında Decher ve Hong tarafından tanımlanmıştır. Bu metot karşı yüklü enzim ve polielektrolit tabakalarının ardışık olarak değişmesini temel alır (Zhao vd 2006). Poliialilamin, poli-L-lisin, polietilenimin, polidimetildiallilamoniyumklorür, poliialilaminhidroklorür ve kitosan veya türevlerini içeren polikasyonlar, büyük bir çoğunlukla tabaka tabaka film oluşumunda kullanılır. En yaygın olarak kullanılan polianyonlar polistirensülfonat, polivinilsülfonat, polianilinpropensülfonik asit,

poliakrilik asit ve polimetakrilik asittir (Zhao vd 2006). Başlangıç olarak, bir elektrot yüklü bir tabakayla modifiye edilmek zorundadır. Negatif (veya pozitif) olarak yüklenmiş yüzey, ilk pozitif (veya negatif) olarak yüklenmiş tabakayı oluşturmak için bir polikatyon (veya polianyon) çözeltisine daldırılır. Negatif olarak yüklenmiş enzim elektrostatik kuvvetler vasıtasıyla polikatyonik elektrot üzerine tutuklanabilir. Bu kaplama işlemi istenilen sayıda tabaka elde etmek için tekrar edilerek gerçekleştirilir. Tabaka tabaka yaklaşımı kapsamlı ve tutuklanmış filmlerin özelliklerinin mantıklı dizaynını yapmak için bir strateji sağlar (Campas ve O'Sullivan 2003).

Enzimler *elektrokimyasal katkılama* ile de tutuklanabilirler. Kontrollü pH, negatif veya pozitif olarak yüklü enzimler, sırasıyla yükseltgenme veya indirgenme işlemi süresince iletken polimer film içine katkılanabilirler. Yükseltgenme süresince polimer pozitif olarak yüklenir. Verilen pH değerinde, negatif olarak yüklü enzim molekülleri bir enzim elektrot oluşturmak için yükseltgenme işlemi süresince iletken polimer içine katkılanabilir (Zhang vd 2007).

Enzimler, dimetilaminoetil (DEAE) anyon değiştirici boncuklar üzerine elektrostatik olarak tutuklanabilir. Çoğu oksidazlar önce pozitif olarak yüklenmiş DEAE boncukları üzerinde ön adsorbe edilir sonra bir biyolojik (polisakkarit gibi) veya kimyasal polimer (fotopolimer veya silikajel) içinde hapsedilir. *Boncuklar üzerine ön tutuklama* enzimin gözenekli tutuklama matrisinden sızmasını engeller (Sassolas vd 2012).

*Langmuir-Blodgett (LB) teknolojisi*, bir katı destek üzerinde bir hava/su ara yüzeyinde oluşan bir monomoleküler film, moleküler organizasyonu ve katmanın tam kontrolü ile aktarımı, katmanlı lipid istiflenmesinin oluşumuna izin verir (Girard-Egrot vd 2005). Bir hava/su ara yüzeyinde amfifilik biyomoleküllerin self-assembly özelliklerini temel alan bu teknik, enzim tutuklanması için uygun ultra ince tabakaların hazırlanması olanağını sağlar. Enzimler önceden oluşturulan LB filmleri üzerine kolayca adsorbe olabilir. Her nasılsa, protein moleküllerinin lipidik yüzeye zayıf etkileşimi nedeniyle serbest kalması büyük bir dezavantajdır (Sassolas vd 2012).

### 1.2.2. Hapsetme

Enzimler bir elektropolimerize film, polidimetilsiloksan (PDMS)'dan oluşan amfifilik bir ağ, bir fotopolimer, silika jel, polisakkarit veya karbon hamuru gibi üç boyutlu matrisler içinde tutuklanabilir. Bu tutuklamayı gerçekleştirmek kolaydır. Enzim, medyatör ve katkı maddeleri aynı algılayıcı tabakada eş zamanlı olarak biriktirilebilir. Enzimin aktivitesi tutuklama işlemi süresince korunabilsin diye, enzime herhangi bir modifikasyon yapılmaz. Fiziksel olarak hapsedilmiş enzimleri temel alan biyosensörler, uygulama ve saklama stabilitesinin artışı ile karakterize edilirler. Her nasılsa bu yöntemin, biyobileşenin sızması ve olası difüzyon bariyeri gibi sistemin performansını kısıtlayabilen sınırlamaları vardır (Sassolas vd 2012).

Hapsetme ile enzimin dönüştürücü yüzeye bağlanması birkaç yolla olur:

- Elektropolimerizasyon
- Amfifilik bir ağ içinde hapsetme
- Fotopolimerizasyon

- Sol-gel işlemi
- Polisakkarit bir jel içinde hapsedme
- Bir karbon hamur içinde hapsedme
- Kille modifiye edilmiş elektrotlar

*Elektrokimyasal polimerizasyon (elektropolimerizasyon)*, elektrot yüzeyine enzimin kontrollü tutuklama için basit ve ilgi çekici bir metottur. Tek basamaklı metot, hem enzim hem de monomer molekülünü içeren bir sulu çözeltiden dönüştürücüye ıslatmak (soaked) için uygun bir potansiyel veya akım uygulanmasıyla oluşur. Monomerin yükseltgenmesiyle bir radikal katyonu oluşur ve bu radikal ya ikinci bir radikal katyonu ile ya da nötral bir polimer ile bir dimer oluşturmak üzere tepkimeye girer. Sonra oluşan dimer oksitlenir ve son olarak elektrot yüzeyinde bir polimer oluşur. Enzim molekülü elektrot yüzeyi çevresinde o anda bulunduğu için büyüyen polimer ağına fiziksel olarak dâhil olur. Elektropolimerize filmlerin çoğu, polianilin, polipirrol veya politiyofen gibi iletken polimerlerle biyomolekülün tutuklanması için kullanılır. Polimer filmin kalınlığı ve iletkenliği kolayca kontrol edilebilir ve iletken olmayan polimerlerin aksine filmin inceliği kısıtlanmaz (Sassolas vd 2012).

*Amfifilik bir ağ içinde hapsedmenin* ilkesi, kullanılan amfifilik polimerlerin şişme özelliğini temel alır. Enzim, amfifilik polimer içine hapsedilerek elektrot yüzeyine tutuklanabilir (Sassolas vd 2012).

*Sol-gel işlemi*, hidrolitik olarak etiketlenmiş öncülerin (örneğin silisik esterler, polisiklik asit, alkoksit ve alüminyum halojenür) sulu işlem ile metal veya yarı-metal katı oluşturma yeteneğini temel alır (Gill ve Ballesteros 2000). Sol-gel işlemi, gözenekli bir jel oluşumuna yol açan hidroksilatlanmış birimlerin kondenzasyonunu takip eden, asidik (veya alkali) şartlar altındaki alkoksit öncülerin hidrolizini içerir. İlk olarak, düşük molekül ağırlıklı metal alkoksit öncü molekülü (tetrametoksi silan gibi) asidik (veya bazik) pH'da su varlığında, Si-OH gruplarının oluşması sonucu hidrolize olur. İkinci basamakta, alkali (veya asidik) pH'da siloksan polimerlerinin (Si-O-Si) oluşması sonucu silanol uçları arasında kondenzasyon tepkimesi oluşur. Bu oluşan matris içinde enzim başarılı olarak hapsedilebilir (Sassolas vd 2012). Sol-gel işlemi enzimle tutuklanmış biyosensörleri geliştirmek için klasik olarak kullanılmaktadır (Gill ve Ballesteros 2000).

Enzimler *bir polisakkarit bazlı jel* (alginat, kitosan veya agaroz) içinde de hapsedilebilir. Poliakrilamid gibi sentetik polimerlerin aksine, bu matrisler biyo uyumludur, toksik değildir, enzim için doğal mikro çevre sağlar ve enzim ve elektrot arasındaki elektron döngüsü için yeterli geçiş imkânı verir (Sassolas vd 2012).

Karbon (grafit) tozu ve bir bağlayıcının (pasta sıvısı) karışımı olan karbon hamuru, çeşitli elektrotlar, sensörler ve dedektörler hazırlamak için kullanılan popüler bir elektrot materyalidir (Svancara vd 2009). Karbon hamuru biyolojik bileşenlerin karışımı için uygun bir matristir ve enzim, medyatör ve hızlı elektron aktarımına izin veren algılayıcı karışımı arasında yakın teması sağlar. Çok amaçlı, kararlı ve yüzeyi kolayca iyi bir tekrarlanabilirlikle yenilenebilir. Enzimlerle modifiye edilen *karbon hamur elektrotlar*, enzim çözeltisinin ve grafit tozunun karıştırılmasıyla hazırlanır. Sonra enzimatik toz mineral yağ (örneğin parafin) ile karıştırılır. Son hamur, plastik

silindir kartuş içine doldurularak enzim karbon hamuru içine hapsedilmiş ve biyosensör hazırlanmış olur (Sassolas vd 2012).

*Silika veya kil* gibi ev sahibi inorganik matrislerin kullanımı, biyosensörlerde enzimlerin tutuklanması için yaygın olarak kullanılan organik polimerlere bir alternatiftir. Katyonik ve anyonik killer, redoks medyatörünün araya girmesi ve enzimle etkileşimi için tercih edilen açık yapı, iki boyutlu, katmanlı inorganik katılardır. Bu materyaller, biyohibrit oluşumu nedeniyle biyosensörlerde enzimlerin tutuklanması için uygun ev sahibi matrislerdir (Mousty 2004, Mousty 2010).

### 1.2.3. Çapraz bağlama

Glutaraldehit gibi çapraz bağlayıcılarla veya glikoksal veya heksametilendiamin gibi diğer bifonksiyonel ajanlarla enzimlerin tutuklanması, biyosensörleri geliştirmek için diğer iyi bilinen yaklaşımlardır. Enzim ya bir diğeri ile ya da sığır serum albumin gibi fonksiyonel olarak inert bir protein varlığında çapraz bağlanır. Bu metot, basitliği ve biyomoleküller arasında güçlü kimyasal bağlanmanın başarılabilmesi nedeniyle ilgi çekicidir. Bu yöntemin başlıca dezavantajı, aktif enzim konformasyonunun bozulması ve çapraz bağlanma süresince aktif merkezlerinin kimyasal değişimi nedeniyle aktivite kaybının olasılığıdır (Sassolas vd 2012).

### 1.2.4. Kovalent bağlama

Enzimlerin polimerik desteğe kovalent bağlanması, enzimatik biyosensörleri geliştirmek için kullanılan popüler bir kimyasal metottur. Bu amaçla, biyokatalistler içerdikleri ve katalitik aktiviteleri için gerekli olmayan fonksiyonel grupları üzerinden yüzeye bağlanır. Enzimlerin katı desteğe bağlanması, genellikle kullanılan çok fonksiyonlu reaktiflerin (örneğin glutaraldehit veya karbodiimid) yüzeye aktivasyonu başlar, enzimin aktive edilmiş yüzeye bağlanmasını takip eder, fazla ve bağlanmamış olan biyomoleküllerin çıkarılmasıyla sonlanır. Taşıyıcı destek, bir anorganik materyal (kontrollü gözenekli cam), bir doğal (selüloz) veya sentetik polimer (naylon) olabilir, ya da zaten önceden aktive edilmiş olan membranlar da kullanılabilir. Kovalent tutuklanma doğrudan dönüştürücü yüzeye veya dönüştürücü üzerindeki ince membrana sabitlenebilir (Sassolas vd 2012).

Katı yüzeyin aktive edilmesi için pek çok protokol tanımlanmıştır:

- Karboksilik grupların aktivasyonu
- Amino gruplarının aktivasyonu
- Kemisorpsiyon

Karbodiimidler, amino grubu içeren bir enzim ile *karboksil grubu* bir destek arasında bağlanmayı sağlarlar. N-Hidroksil süksinimid (NHS), etkili tutuklanması geliştirmek için karbodiimid ile birleşebilir. Bu işleyiş enzimatik biyosensörleri geliştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Karbodiimidler, karboksil grubu içeren bir enzim ile *amino grubu* bir destek arasında da bağlanmayı sağlarlar (Sassolas vd 2012).

Tiyol ve altın substratlar arasındaki güçlü afinite nedeniyle, tiyol grubu içeren enzimler, altın yüzey üzerine doğrudan tutuklanabilirler. Bu *kemisorpsiyon* tekniğinin başlıca avantajı, basitliği ve biyomolekülün kararlı ve güçlü tutunmasıdır. Enzim, altına bağlanması için tiyol ucu içermeli ya da tiyol ucu içermesi için modifiye edilmelidir (Sassolas vd 2012).

### 1.2.5. Afinite

Enzimlerin yönelimini ve bölgeye özel tutuklanmayı temel alan biyosensörleri geliştirmek için yapılan çabalar başarılı olmuştur. Lektin, avidin, metal, şelat ve bir protein sekansının özgün grubu (karboksilat kalıntısı, biotin, histidin gibi kuyruk ucu) ile aktive edilmiş bir destek arasında bioafinite bağı yapmak için geliştirilen bir stratejidir. Bu metot enzimin deaktivasyonunu ve/veya aktif merkezinin bloke olmasını önlemek için biyomolekülün yönelimini kontrol etmeyi sağlar (Sassolas vd 2012). Bir enzim, sekansında (bir şeker ucu gibi) afinite tagları içerebilir. Ancak bazı durumlarda afinite tagı (örneğin biyotin), alan hedefli mutajenez, protein birleştirme teknolojisi ve post-transkripsiyonel modifikasyon gibi genetik mühendisliği metotlarıyla enzimin protein sekansına bağlamak gerekebilir (Andreescu ve Marty 2006).

Birkaç afinite yöntemi tanımlanmıştır:

- Biyotin-avidin (strept)
- Metal iyon-şelat
- Lektin-karbohidrat

*Biyotin ve avidin (strept)* arasındaki güçlü afinite etkileşimi, enzimleri tutuklamak için kullanılan bir stratejidir. Proteinlerin biyotinleşmesi, biyotinin proteine tercihen modifiye lisin kalıntıları gibi biyotin-ester reaktiflerinin kullanımıyla kovalent bağlanması yoluyla başarılabilir (Nilsson vd 1997). Enzimin C-terminaline kaynaşmış biyotin akseptör peptit sekanslarının kullanılmasıyla, enzimler genetik olarak da biyotinleştirilebilir (Zhang ve Cass 2000).

*Bir metal katyonu ve bir şelat* (nitrilo asetik asit, imido asetik asit veya polihistidin tagı gibi) arasındaki güçlü afinite bağı da enzimatik biyosensörlerin geliştirilmesinde kullanılabilir. Bu metot tutuklanmış metal afinite kromatografisinin (IMAC) ilkesini temel almaktadır. Şelat tarafından bir kromatografik reçinenin metal iyonuna tutuklanması, taglanmamış proteinden histidinle (His) taglanmış proteinin ayrılmasına izin verir. Bağlı molekül pH'nin azaltılması ve tamponun iyonik şiddetinin artırılmasıyla veya EDTA veya imidazol kullanılarak reçineden ayrılabilir. Bu prensibe dayanarak, yapılarında His kalıntısı olan enzimler bir metal şelat içeren desteğe kolayca tutturulabilir. Her nasılsa, birkaç His kalıntısı enzimin yüzeyinde vardır ve şelatla modifiye edilmiş yüzeye bağlanmak için geçebilir. Bu problemi çözmek için genetik mühendisliği metotları, proteinin özgün bir pozisyonuna His bağlanarak taglanmış enzimin üretilmesine izin verir.



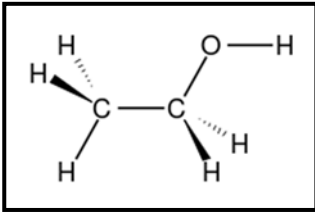
### 1.3. Alkoller

Alkoller (ROH),  $sp^3$  melezleşmesi yapmış bir karbona bir hidroksil (-OH) grubunun bağlanmasıyla oluşmuş bileşiklerdir. Alkol kelimesi, göz kapaklarını karartmak amacıyla kozmetik olarak ince toz edilmiş antimon anlamına gelen Arapça sözcük Alkuhl'den türetilmiştir. Bu türetilmiş sözcük onsekizinci asırda, alkuhl “ruh, esans” anlamında kullanıldığında ortaya çıkmıştır. Şarap ruhu denilen etanole *alcohol vini* denirdi. Ondokuzuncu yüzyılın başında *vini* atılmış ve *alcohol*, alkole dönüşmüştür (Fessenden vd 2001).

Günlük hayatta pek çok alkolle karşılaşılır. Etanol (etil alkol), hububat alkolü veya alkollü içkilerde kullanılır. 2-propanol (izopropil alkol veya masaj alkolü), antibakteriyel olarak işe yarar. Metanol (metil alkol ya da odun alkolü), otomobillerde yakıt donanımı antrifrizi olarak da işlev görür. Bütün bu bileşikler laboratuvarlarda ve sanayide çözücü ve çıkış maddesi olarak kullanılır (Fessenden vd 2001).

#### 1.3.1. Etanol (Etil alkol)

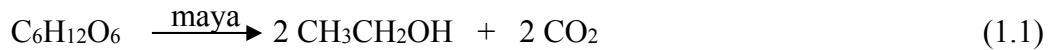
Etanol, primer alkollerin bir üyesi olup  $C_2H_5OH$  yapısında, suda çözünen renksiz, yüksüz, küçük ve polar bir moleküldür (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Etanolün molekül formülü

Etanol, şekerlerin fermantasyonuyla elde edilir ve tüm alkollü içkilerin alkolüdür. Meyve sularındaki şekerlerin fermentasyonu ile etanolün şarap şeklindeki sentezi, belki de, organik sentez alanındaki ilk başarımızdır. Çok değişik kaynaklardaki şekerler, alkollü içkilerin üretiminde kullanılır. Bu şekerler çoğunlukla hububattan elde edildiklerinden etanole hububattan türediği anlamda, “hububat alkolü” de denilmektedir.

Fermantasyon genellikle, suyla şekerlerin karışımına maya ilavesiyle yapılır. Mayanın içerdiği enzimler, uzun bir tepkime dizisi sonunda basit şekeri ( $C_6H_{12}O_6$ ), etanol ve karbon dioksit dönüştürür.



Fermantasyon sonunda, etanol içeriği % 12-15'ten daha yüksek olan içki meydana gelmez; çünkü daha yüksek derişimlerde maya enzimleri etkinliklerini kaybederler. Daha yüksek alkol içerikli içkileri üretmek için sulu çözelti damıtılmalıdır. Brandi, viski ve votka bu şekilde üretilir. Bir alkollü içkinin “alkol derecesi” (“prof”) alkol yüzdesinin hacimce iki katıdır. Yüz derecelik viskinin % 50'si etanoldür. Değişik

damıtık likörlerin tat ve kokuları, alkol ve suyla birlikte damıtılan diğer organik bileşiklerden kaynaklanır.

Etanol ve su çözeltisinin damıtılmasıyla % 95'den daha derişik etanol elde edilemez. % 95 Etanol ve % 5 su karışımı, saf etanol (kn 78,3<sup>0</sup> C) ve saf sudan (kn 100<sup>0</sup> C) daha düşük sıcaklıkta kaynar (kn 78,15<sup>0</sup> C). Bu tür bir karışım azeotrop örneğidir. Saf etanol, % 95'lik etanol su karışımına benzenin ilavesi ve sonra bu çözeltinin damıtılmasıyla elde edilebilir. Benzen, etanol ve suyla % 7,5 su içeren başka bir azeotrop oluşturur. Bu azeotrop 64,9<sup>0</sup> C'de kaynar ve suyun uzaklaşmasını sağlar. Daha sonra saf etanol damıtılır. Saf etanole mutlak etanol denir.

Etanol önemli bir endüstriyel kimyasaldır. Dünyada en çok üretilen alkoldür. Etil alkolün genellikle %80'lik sulu çözeltisinden kolonya üretilir. İspirto % 65-70'lik etil alkol çözeltisidir. İspirtonun içinde bir miktar metanol vardır.

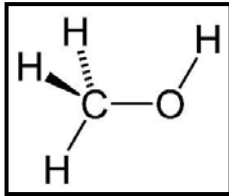
Endüstriyel amaçlı etanolün büyük çoğunluğu, etenin asit katalizli hidrasyonu ile elde edilir.



Etanol bir hipnotiktir (uyku verici). Uyarıcı olduğuna inanılmasına karşın, beynin üst kısmının etkinliğini azaltır. Etanol de zehirlidir; ancak metanole oranla zehirliliği çok daha düşüktür (Solomon ve Fryhle 2002).

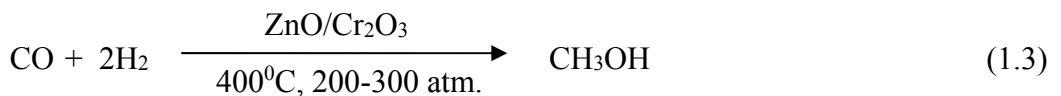
### 1.3.2. Metanol (Metil alkol)

Metanol mono alkollerin ilk üyesidir. CH<sub>4</sub>O kapalı formülüyle gösterilen metanolün molekül formülü Şekil 1.6'da verilmiştir.



Şekil 1.6. Metanolün molekül formülü

Eski yıllarda metanolün çoğu, odunun kuru kuru damıtılması (havasız ortamda odunun yüksek sıcaklıklarda ısıtılması) ile elde edilirdi. Bu üretim yönteminden dolayı, metanole “odun alkolü” de denilmektedir. Günümüzde metanolün büyük bir kısmı, karbonmonoksitin hidrojenlenmesiyle elde edilir. Bu tepkime, yüksek basınç altında ve 300-400<sup>0</sup>C sıcaklıkta meydana gelir.



Metanol teknikte boya, vernik ve cila için çözen olarak da kullanılır. Ayrıca formaldehitin elde edilmesinde ve benzinle karıştırmak için kullanılır (Solomon ve Fryhle 2002).

Damıtık alkollü içkilerde bulunan metanol, fermantasyon boyunca pektolitik enzimler vasıtasıyla pektinden metoksil grubunun hidrolize olması sonucunda oluşan doğal bir üründür (Apostolopoulou vd 2005). Alkol fermantasyonunda metanolün oluşumu hem hammaddekteki pektin miktarına hem de pektolitik enzimlerin miktar ve aktivitelerine bağlıdır (Koçak 1993, Fidan ve Anlı 2002). Pektik maddeler, özellikle meyvelerin kabuk ve çekirdeklerinde yoğunlaşmışlardır. Bu sebeple kırmızı şarap, rakı ve diğer yüksek alkollü içkilerin yapımında kuru üzüm, yaş üzüm ve meyveler cibrelere ile birlikte fermantasyona tabi tutulduklarından; kabuk, çekirdek, sap gibi kısımlarda bulunan çözünebilir pektik maddeler şıraya geçmekte ve daha fazla metanol oluşmaktadır (Koçak 1993). Bu nedenle damıtıktaki metanol miktarı, ekstraksiyon süresi ve uygulanan işlemlerle yakından ilişkilidir (Soufleros vd 2004). Fermantasyon ürünlerinde metanol miktarını etkileyen birincil faktör hammaddektir. Hammaddenin pektin miktarı, olgunluk ve sağlamlık durumu ile işleme tekniği oluşan metanol miktarını etkiler. Aşırı olgun, sağlam olmayan veya hastalıklı üzümlerin fermantasyon ürünü metanol içeriği bakımından zengin olur (Cabaroğlu, 2004).

Metanol bilindiği gibi toksik ve insan sağlığına zararlı bir maddedir. Vücuda alınması ve solunması körlük ya da ölüme neden olur. Vücuda alındıktan sonra, önce formaldehite yükseltgenir, daha sonra formik aside dönüşerek merkezi sinir sistemini etkiler. Metanolün yükseltgenmesi sırasında oluşan laktik asit miktarının kanda artmasıyla merkezi sinir sistemi etkilenir ve aşırı durumlarda ölüme kadar gider. Öldürücü doz olarak 50-75 g verilmekte ise de 11,5 g'da bile ölüm saptanmıştır. (Cabaroğlu, 2004).

Son zamanlarda rakı, sıklıkla basında, metanol zehirlenmeleri ile kötü bir şekilde gündeme gelmiştir. Bunun en büyük nedeni damıtık alkollü içkiler üzerindeki yüksek vergilerdir. Bunun neden olduğu fiyat artışı kar heveslilerini, insan hayatını düşünmeksizin, kaçak içki üreterek kısa yoldan para kazanmaya teşvik etmiştir (Koca 2007).

“Türk Gıda Kodeksi Distile Alkollü İçkiler Tebliği”ne göre rakıda metanol miktarı hacmen % 100 alkolün hektolitresinde 150 gramdan fazla olmamalıdır. Avrupa Birliği yüksek alkollü içkiler standardına göre ise metanol miktarı şaraptan elde edilen damıtık alkolde 200 g/hl mA'yı, üzüm cibresinden elde edilen damıtık alkolde 1000 g/hl mA'yı geçmemelidir (Bulur 2010).

### 1.3.3. Alkol tayin yöntemleri

Gıda, alkol, kâğıt endüstrisi, tarım ve çevre analizleri, klinik ve adli alanlar gibi birçok alanda, yüksek duyarlık, seçicilik ve doğrulukta alkollerin tanımlanması ve tayini oldukça önemlidir. Etanol, metanol ve diğer alifatik alkoller için pek çok analitiksel metot geliştirilmiştir:

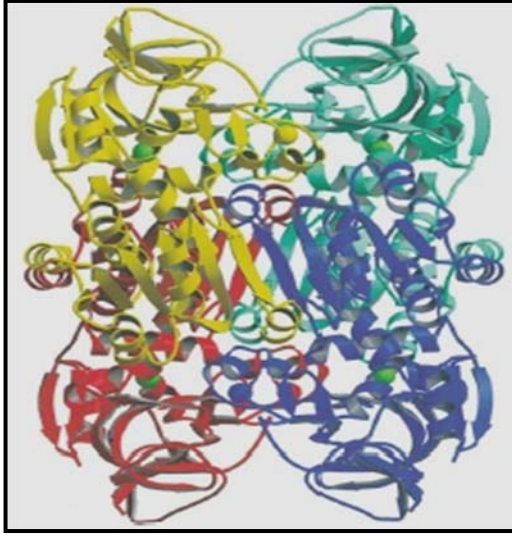
- Redoks titrasyonları gibi kimyasal metotlar

- Kolorimetrik metotlar
- Özgün ağırlık ve kırılma indisi ölçümleri
- Gaz ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi gibi kromatografik metotlar
- Spektroskopik metotlar (Raman spektrometresi vb)
- Kapiler elektroforezi

Bu metotlar kesin ve güvenilir olmasına rağmen, kompleks ve zaman alıcı olması, destilasyon gibi ön işlemleri gerektirmesi, cihazların pahalılığı gibi dezavantajları vardır. Enzimatik metotlarla bu dezavantajların üstesinden gelinbilir (Azevedo vd 2005).

#### 1.4. Alkol Dehidrojenaz Enziminin Genel Özellikleri

Alkol dehidrojenaz (ADH, EC 1.1.1.1), geniş özgülükte bir çinko metalloenzimdir. Maya ve at karaciğeri alkol dehidrojenazları, ADH'nin en çok çalışılan iki enzimidir. At karaciğeri ADH molekülü simetrik bir yapıya sahip bir dimerdir ve molekül ağırlığı 40000 Dalton olan iki eş zincirden oluşmuştur. Her bir zincir nikotin amid adenin dinükleotit (NAD<sup>+</sup>) için bir bağlanma bölgesi, çinko iyonu için ise iki bağlanma bölgesi içerir. Maya ADH, molekül ağırlığı 145000 olan bir tetramerdir. Her bir zincir NAD<sup>+</sup> ve çinko iyonu için birer tane bağlanma bölgesi içerir (Fersht 1984). ADH homotetramerinin üç boyutlu yapısı Şekil 1.7'de verilmiştir (Esposito vd 2002).



Şekil 1.7. Kristallografik simetri ile elde edilen alkol dehidrojenaz homotetramerinin üç boyutlu yapısı

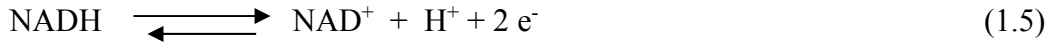
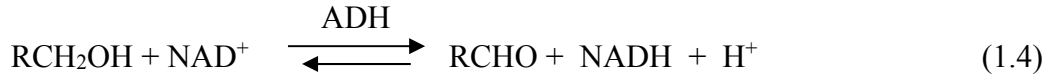
ADH monomerinde, hem substrat hem de koenzim NAD<sup>+</sup>'nin ucunun yerleşebileceği iki ana etki alanı, derin bir boşluk içeren bir çukur ile ayrılmıştır. Substrat veya inhibitörün yokluğunda katalitik bölge, enzimin gerekli katalizini sağlayan çinko iyonunun varlığıyla tanımlanabilir. Memelilerdeki ADH enzimleri, genellikle dimeriktir, hem katalitik hem de yapısal çinko atomları içerir (Esposito vd 2002).

ADH enzimleri büyüklüklerine göre üç sınıfa ayrılırlar (Esposito vd 2002):

- Metal iyonu içermeyen kısa zincirli enzimler (zincir başına yaklaşık 250 kalıntı)
- Genellikle çinko içeren orta zincirli enzimler (zincir başına yaklaşık 350 kalıntı)
- Uzun zincirli enzimler (zincir başına yaklaşık 385 kalıntı, bazen 900 kalıntı)

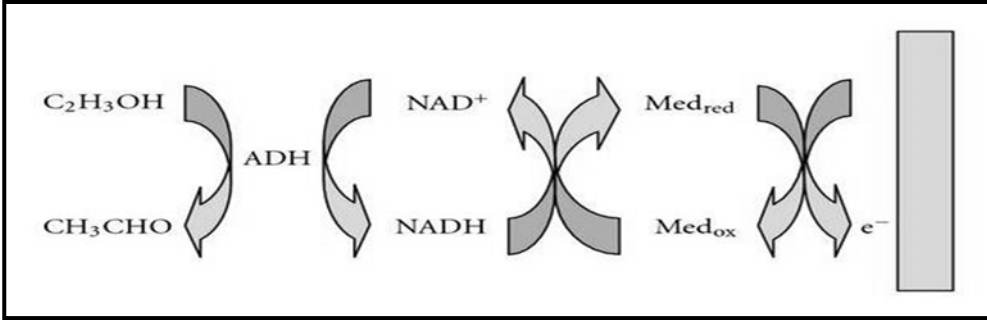
Bakteriler, mayalar ve bitkilerde genellikle orta zincirli ADH enzimleri bulunmaktadır.

ADH, metanol hariç primer alifatik ve aromatik alkolleri tersinir olarak aldehitlerine oksitleyen ve  $\text{NAD}^+$  koenzimi ile birlikte işlev yapan bir oksidoreduktaz enzimidir (Azevedo vd 2005).



$\text{NAD}^+$ , primer alkolleri aldehitlerine yükseltirken kendisi  $\text{NADH}$ 'ye indirgenir. ADH ise bu tepkimeyi katalizler.

ADH'yi temel alan alkol biyosensörleri çok kararlı ve özgün olmasına rağmen nikotinamid adenin dinükleotit ( $\text{NAD}^+$ ) koenziminin ilavesi gerekir ve kofaktor enzime çok yakın olmalıdır. Dehidrojenazlar, koenzim içerdikleri için ve koenzimlerin yeniden redoks tepkimesine girerek, açığa çıkan elektronu elektroda aktarımı için medyatöre ihtiyaçları vardır (Azevedo vd 2005). Şekil 1.8'de yüzey baskılı elektroda ADH enziminin tutuklanmasıyla hazırlanmış alkol biyosensörünün yüzeyinde gerçekleşen etanol yükseltgenmesi, enzimatik olarak açığa çıkan  $\text{NADH}$ 'nin medyatör yardımıyla takibinin mekanizması verilmiştir (Jubete vd 2009).

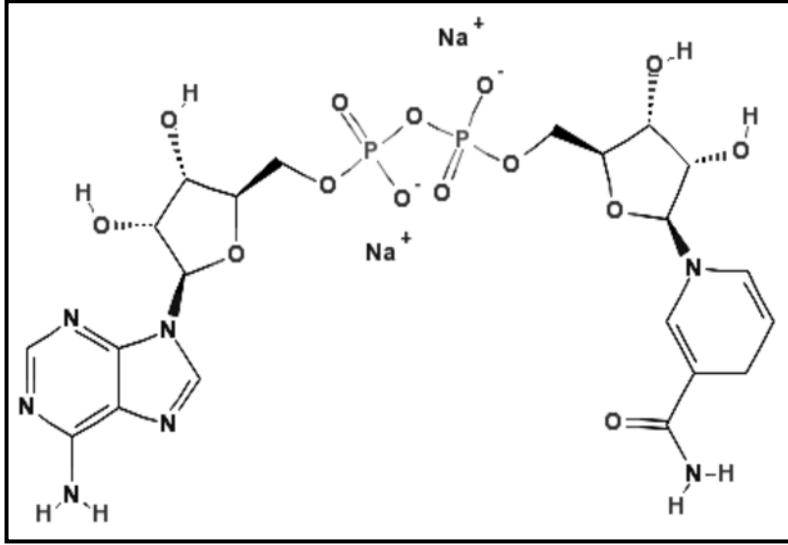


Şekil 1.8. Etanolün yükseltgenmesinde enzimatik olarak açığa çıkan  $\text{NADH}$ 'nin medyatör yardımıyla takibi

### 1.5. Nikotinamid Adenin Dinükleotit Koenziminin Genel Özellikleri

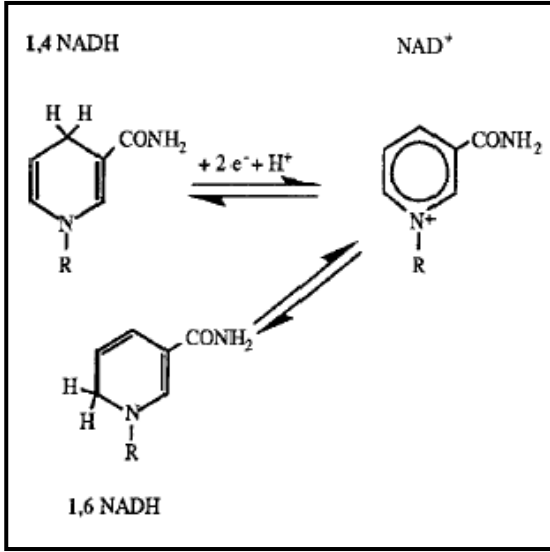
Nikotin amid adenin dinükleotitin indirgenmiş formu ( $\text{NADH}$ ), hücrelerdeki önemli metabolik redoks tepkimelerinde yer alan ve elektron taşıyıcı olarak davranan bir koenzimdir. 500'den fazla dehidrojenaz enzimi  $\text{NADH}$  koenziminin yükseltgenmiş

formunu ( $\text{NAD}^+$ ), organizmaların metabolizmasına katılan bir kofaktör olarak kullandığı için, enzim deneylerinde  $\text{NADH}$ 'nin analizi oldukça önemlidir.  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , dehidrojenaz bazlı enzimlerle hazırlanan biyosensörlerde, analitle tepkimelerine giren ve aerobik organizmalarda bulunabilen düşük negatif potansiyele sahip, düşük molekül kütleli doğal redoks medyatörüdür (Karyakin vd 2003, Kumar ve Chen 2008).  $\text{NADH}$ 'nin kimyasal yapısı Şekil 1.9'da verilmiştir (Kumar ve Chen 2008).



Şekil 1.9.  $\text{NADH}$ 'nin kimyasal yapısı

$\text{NAD}^+/\text{NADH}$ 'nin genel olarak kabul edilen formal potansiyeli  $-0,56 \text{ V}$ 'dur (vs SCE, pH 7,0, Clark 1960). Şekil 1.10'da  $\text{NADH}$ 'nin yükseltgenme tepkimesi ve redoks dönüşümleri verilmiştir (Katakis ve Dominguez 1997).  $\text{NADH}$ 'nin doğrudan yükseltgenmesi, yalnız elektrotlarda (örneğin; Au, camı karbon elektrot vs) oldukça yüksek aşırı potansiyel gerektirmektedir ( $>1\text{V}$ ) (Kumar ve Chen 2008). Örneğin, pH 7,0'de  $\text{NADH}$ 'nin yükseltgenmesi karbon elektrot için yaklaşık  $1,1 \text{ V}$  (Moiroux ve Elving 1978), platin elektrot için ise  $1,3 \text{ V}$  (Jaegfeldt 1980) yüksek potansiyel gerektirmektedir. Katekolamin, askorbik asit ve ürik asit gibi çoğu elektroaktif biyomolekül de,  $\text{NADH}$ 'nin yükseltgenmesine yakın potansiyelde yükseltgenmektedir.



Şekil 1.10. NADH'nin yükseltgenme tepkimesi ve redoks dönüşümleri

NADH, bir hidrit iyonu gibi iki elektron ve bir proton kaynağı olarak davranır. Çoğu durumda NADH'nin iki elektronlu yükseltgenmesi, bir substrata bir elektronun aktarımı ile başlar ve böylece NADH<sup>•+</sup> radikal katyonu oluşur. NADH<sup>•+</sup> radikal katyonları, NADH ve NAD<sup>+</sup> arasındaki redoks dönüşümünde önemli bir reaktif ara üründür (Fukuzimi 2003). Elektrot yüzeyinde NADH'nin elektroyükseltgenmesi için aşağıdaki tepkime mekanizması önerilmiştir (Katakis ve Dominguez 1997):



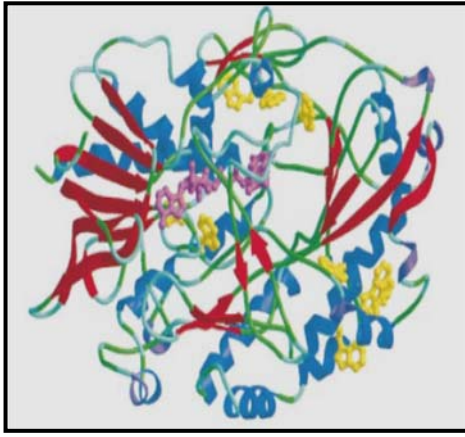
Burada B bir bazdır. Ayrıca aşağıda verilen disproporsiyonlanma tepkimesinin oluşumu da olasıdır (Katakis ve Dominguez 1997):



NADH<sup>•+</sup> radikal katyonlarının oluşumu, koenzimin turnover sayısının azalmasına neden olur. Bunun yanında yalın elektrotlarda NADH'nin doğrudan yükseltgenmesi, NAD<sup>+</sup>'nin enzimatik olarak inaktif tersinmez formlarının oluşmasına ve bu ürünlerin adsorpsiyonu nedeniyle elektrot yüzeyinin kontaminasyonuna (fouling) ve gerçek örneklerde girişim yapan background akıma neden olmaktadır. Bu da düşük duyarlılığa, seçiciliğe ve kararsız analitiksel sinyale neden olmaktadır (Kumar ve Chen 2008, Gorton ve Dominguez 2002). Bu sebeple NADH'nin amperometrik olarak tayini için genellikle düşük potansiyel sağlayan uygun bir medyatör, iletken veya redoks polimeri veya nanopartiküller kullanılmaktadır.

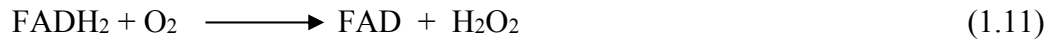
## 1.6. Alkol Oksidaz Enziminin Genel Özellikleri

Alkol oksidaz (AOx, E.C. 1.1.3.13), yarı-kübik bir dizilimde düzenlenmiş, sekiz özdeş alt birimden oluşmuş oligomerik bir enzimdir (Şekil 1.11). Her bir alt birimde güçlü olarak ancak kovalent olmayan bir bağ ile bağlanmış flavin adenin dinükleotit (FAD) molekülü bulunmaktadır (Vonck ve van Bruggen, 1990). AOx enzimi, *Hansenula*, *Pichia* ve *Candida* türündeki metilotropik mayalar tarafından, sitozolde sentezlenir ve sonra aktif hale gelmesi için (metanolü metabolize edebilmek için) peroksizomlara yerleşir. AOx, metilotropik mayaların metanol yükseltgenmesi yolağındaki ilk enzimdir. Fizyolojik rolünün metanol yükseltgenmesi olmasına rağmen, etanol, propanol ve bütanol gibi diğer kısa zincirli alkoller de oksitleyebilir (Azevedo vd 2005, Boteva vd 1999).



Şekil 1.11. *H. polymorpha* alkol oksidaz monomerinin üç boyutlu yapısı: mavi:  $\alpha$ -heliks; kırmızı,  $\beta$  katlanmaları; mor: FAD

Alkol oksidaz (AOx), kısa zincirli düşük molekül ağırlıklı alifatik alkoller, tekabül eden aldehytlere oksitleyen ve bunun için akseptör olarak oksijen kullanan bir enzimdir. AOx tarafından alkollerin yükseltgenmesi, oksijenin güçlü oksitleme karakteri nedeniyle tersinmezdir (Azevedo vd 2005).

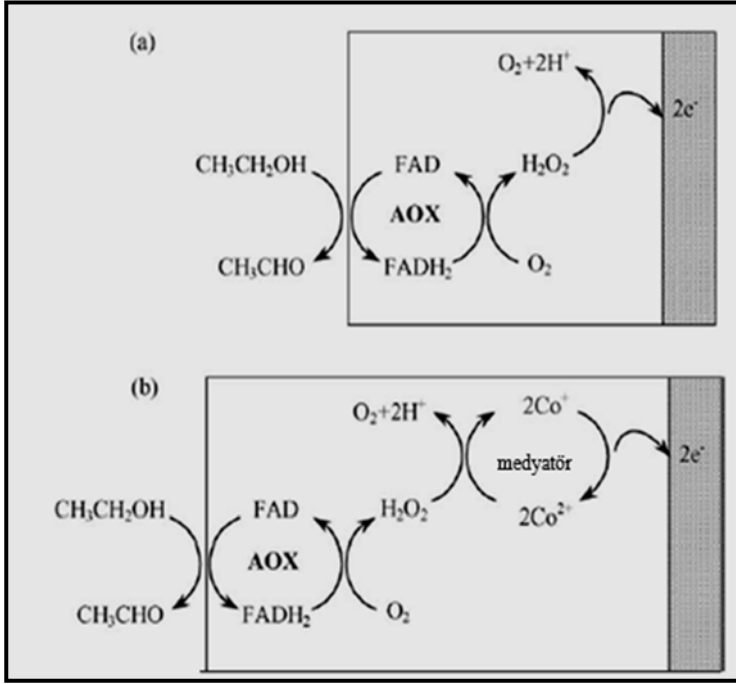


AOx enzimin kofaktörü olan flavin adenin dinükleotit (FAD), tepkimede FADH<sub>2</sub>'ye indirgenir ve ortamda bulunan O<sub>2</sub> tarafından tekrar FAD'ye yükseltgenir. Oksidazlarla katalizlenen tepkimeleri takip etmek için izlenen klasik yollar, çözeltideki oksijen derişiminin azalışının ya da hidrojen peroksit derişiminin artışının ölçülmesidir (Azevedo vd 2005).

Enzimatik tepkimeler sonucu üretilen hidrojen peroksidin amperometrik takibi ya anotta yükseltgenmesi ya da katotta indirgenmesinin ölçümü ile yapılır. Hidrojen peroksidin takibi doğrudan ya da bir medyatör yardımıyla dolaylı olarak da yapılabilir. Şekil 1.12'de AOx tarafından etanolün yükseltgenmesi tepkimesinde hidrojen

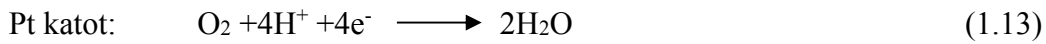


peroksidin doğrudan ve dolaylı olarak takibinin mekanizmaları şematik olarak verilmiştir. Enzimatik tepkimede indirgenmiş FADH<sub>2</sub> oksijen tarafından tekrar yükseltgenirken, açığa çıkan hidrojen peroksit doğrudan oksijene yükseltgenmektedir (Şekil 1.12.a). Enzimatik olarak üretilen hidrojen peroksit bir medyatör ile tepkimeye girebilir. İndirgenmiş medyatörün yükseltgenmesi ile dolaylı olarak hidrojen peroksidin yükseltgenmesi takip edilmektedir (Şekil 1.12.b) (Azevedo d 2005).



Şekil 1.12. AOx tarafından etanolün yükseltgenme tepkimesi sonucu üretilen hidrojen peroksidin a) doğrudan ve b) dolaylı olarak takibinin mekanizması

Elektrokimyasal olarak çözeltideki oksijen derişiminin azalışı da takibi edilmektedir. Oksijenin takibi için en genel metot Clark tip oksijen elektrodunu temel alır. Bu elektrot, oksijen geçirici hidrofobik zarla kaplanmış bir platin disk elektrotla, platin elektrodun çevresini kaplayan gümüş bir levhadan oluşmaktadır. Bu metaller ve tamponlanmış KCl çözeltisi ile kombine elektrot sistemi oluşturulur. Pile sabit gerilim kaynağından uygun düzeyde potansiyel uygulanırsa, gözenekli zardan geçen oksijen derişimine bağlı olarak devreden bir akım geçer (Anık 2012). Pt elektrot ve Ag/AgCl referans elektroda karşı -600 mV bir potansiyel uygulandığında, oksijen Pt katotta indirgenir (Azevedo vd 2005).



FAD, enzimin merkezine güçlü olarak bağlıdır ve yapının derinliklerinde gömülü olarak bulunmaktadır. Jordan ve Cialkosz (1991), diğer oksidazların aksine AOx enziminin, hem substratın hem de oksijenin aynı aktif merkeze bağlanması nedeniyle, oksijenden başka yükseltgen kabul etmediğini bildirmişlerdir. Bu sebeple AOx enzimini temel alan biyosensörlerde, alkolün yükseltgenmesi sırasında oluşan

hidrojen peroksidin oksijene çevrilmesi ve burada açığa çıkan elektronun elektroda aktarımı için ya bir elektron aktarım medyatörü ya da horseradish peroksidaz veya katalaz gibi enzimler kullanılması önerilmektedir. Bu enzimler, hidrojen peroksiti substrat olarak kullanırlar (Azevedo vd 2005).

### 1.7. Biyosensörlerde Nanomateryallerin Kullanımı

Nanoteknoloji biyosensörlerin geliştirilmesinde giderek daha önemli bir rol oynamaktadır. 1-100 nm aralığındaki küçük boyutları nedeniyle nanopartiküller, yığın materyallerden farklı olarak eşsiz kimyasal, fiziksel ve elektronik özellikler göstermektedir. Mükemmel özellikleri nedeniyle elektrokimyasal sensör ve biyosensörlerin geliştirilmesinde ve nanosensör, nanoprob ve diğer nanosistemlerde, hücre içi birçok maddenin hızlı kimyasal ve biyolojiksel tayini gibi alanlarda kullanılması devrim yaratmıştır. Manyetik nanopartiküller, karbon nanotüpler, nanoçubuklar, kuantum dotlar, nanokanallar gibi nanomateryallerin kullanımıyla, tayin edici sistemlerin algılama kapasitesi son zamanlarda oldukça geliştirilmiştir. Bu nanomateryaller elektriksel biyosensörlerde kullanıldığında, çok yüksek yük aktarım kapasitesine sahip olurlar. Bu ise biyosensörlerin düşük tayin sınırı ve yüksek duyarlık değerine ulaşmasını sağlar (Luo vd 2005, Perez-Lopez ve Merkoçi 2011).

Nanopartiküllerin farklı türleri bazen de aynı çeşit nanopartiküllerin farklı boyutları, enzim sensörleri, immünosensörler ve DNA sensörleri gibi farklı elektrokimyasal sistemlerde farklı rol oynayabilirler. Genellikle metal nanoparçacıklar mükemmel iletkenlik ve katalitik özelliklere sahiptirler. Bu özellikleri, elektrokimyasal tepkimelerde katalizi artırmak için, elektrot yüzeyi ve proteinlerin redoks merkezi arasındaki elektron aktarımını artırmak için *elektronik tel* olarak hareket etmelerini sağlarlar. Yarıiletken nanoparçacıklar genellikle elektrokimyasal analizde işaretleyici ya da izleyici olarak kullanılırken, oksitlenmiş nanoparçacıklar sıklıkla biyoyumlulukları nedeniyle biyomoleküllerin tutuklanmasında kullanılırlar (Luo vd 2005).

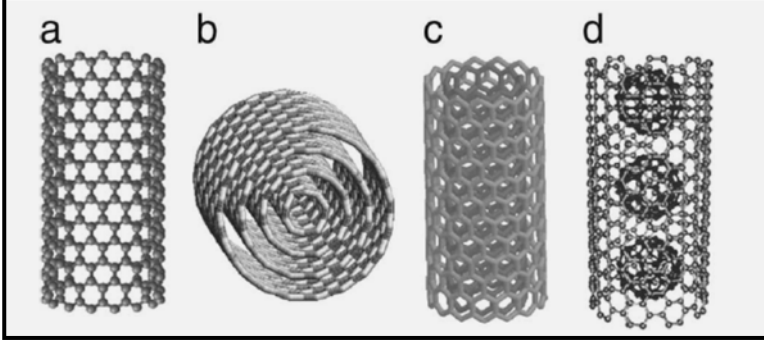
Karbon nanotüplerin ve altın nanoparçacıkların, mükemmel iletkenlik ve elektrokatalitik aktivitesi, yüksek yüzey/hacim oranı ve fonksiyonilize edilebilme gibi özellikleri nedeniyle yeni elektrokimyasal biyosensör sistemlerinde kullanılması oldukça ilgi çekicidir (Perez-Lopez ve Merkoçi 2011).

#### 1.7.1. Karbon nanotüpler

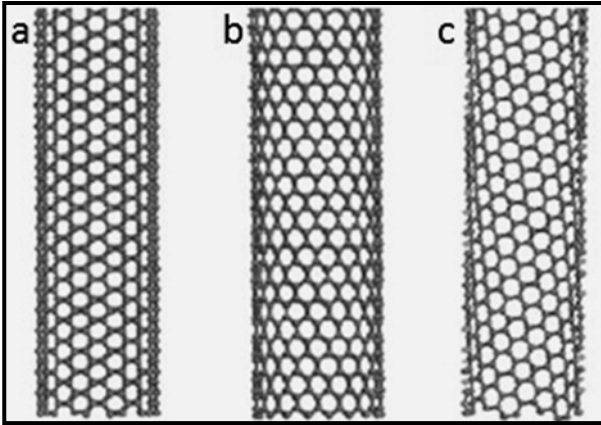
Karbon nanotüplerin (CNT) yapısı ilk kez 1991 yılında Ijima tarafından geçişli elektron mikroskopu kullanılarak aydınlatılmıştır. Diğer bir görüşe göre Radushkevich ve Lukyamvich adlı iki Rus bilim adamı 1952'de Sovyet Journal of Physical Chemistry dergisinde 50 tane nanotüpün resmini yayınlamışlardır. Rusça yayımlanan makale soğuk savaş döneminde diğer bilim adamlarınca fark edilememiştir (Dursun ve Dilgin 2012).

CNT'ler tek, çift, çok duvarlı veya fulleren içeren türde olabilir (Şekil 1.13). Tek duvarlı karbon nanotüpler katlanışına göre zikzak ve koltuk şeklinde ya da kiral olabilir (Şekil 1.14). Suda çözünürlükleri az olduğundan, kararlı süspansiyonlarını oluşturmada toluen, tetrahidro furan ve dimetil formamid gibi organik çözücüler kullanılır. Bu

tüplerin yan yüzeylerine hidroksil ve karboksil grupların bağlanmasıyla, kuvvetli asitlere ve diğer kimyasal yükseltgenlere karşı oldukça reaktif hale gelirler. Oldukça geniş yüzey alanı/hacim oranına sahip olan CNT'ler, inert atmosferde mükemmel bir ısı kararlılığı sahiptirler (Dursun ve Dilgin 2012).



Şekil 1.13. a) Tek duvarlı karbon nanotüp (SWCNT) b) çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) c) iki duvarlı karbon nanotüp (DWCNT) d) Fullerenle doldurulmuş tek duvarlı karbon nanotüpten oluşan kabuklu bezelye nanotüp



Şekil 1.14. Tek duvarlı karbon nanotüpün (SWCNT) a) sandalye b) zigzag c) kiral formları

Elektrot malzemesi olarak kullanılmadan önce karbon nanotüp kuvvetli asitlerle muamele edilerek, hem üretim aşamasında taşınan safsızlıkları (metal katalizörler ya da diğer safsızlıklar) giderilebilmekte hem de koşullandırma yapılarak tüp uçlarında fonksiyonel  $-COOH$  grupları oluşturularak iletkenlik, optik, mekanik dayanıklılığı ve yüzey polaritesi değiştirilebilmektedir. CNT'ler asitler dışında oksijen plazmada yükseltgenme ile daha fazla  $-COO^-$  oluşturabilmektedir. Genelde bu değişimler iyi bir elektrokatalitik etkinlik göstermeyle sonuçlanmaktadır. Ayrıca fonksiyonel gruplarının farklı kimyasallarla modifiye edilebilmesi, seçici analitik uygulamalarda önemli bir avantaj sağlar (Dursun ve Dilgin 2012).

CNT'ler, yüksek elektronik iletkenlik ve yüksek mekaniksel direnç gibi özellikleriyle son yıllarda elektroanalitik uygulamalarda en yaygın olarak kullanılan nanoparçacıktır. CNT ile modifiye edilmiş elektrotlar, NADH veya  $H_2O_2$  gibi

moleküllerin elektroyükseltgenmesi karşı elektrokatalitik aktivite göstermektedir. CNT'nin bu yeteneği, dehidrojenaz veya oksidaz bazlı elektrokimyasal biyosensörlerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmasına neden olmaktadır. Üstelik CNT, elektrodun aktif yüzey alanını artırarak elektrokimyasal cevabı kuvvetlendirmekte ve elektrot yüzeyinin anti-fouling yeteneğine sahip olmasını sağlamaktadır (Agui vd 2008).

### 1.7.2. Altın nanoparçacıklar

Elektrokimyasal biyosensörlerde dönüştürücülerin modifiye edilmesinde ya da biyolojik tanımlama elemanının tutuklanmasında altın nanoparçacıkların (AuNP) kullanımı, son yıllarda biyosensör çalışmalarında oldukça önemli bir rol oynamaktadır. AuNP'lerin eşsiz özelliklerinden yararlanılarak türetilen biyoelektroanalitik cihazlar, büyük bir umut vadetmektedir. Biyomoleküllerin dönüştürücü yüzeyine tutuklanmaları sırasında biyolojik aktivitelerinin korunması için kararlı bir yüzey sağlayabilme yeteneği, biyosensörlerin hazırlanmasında çok yararlıdır. Bu yeteneği, biyomoleküllerin serbest olarak yüzeye yönelmelerini kuvvetlendirebilmesinden kaynaklanmaktadır. Üstelik AuNP'ler yığın elektrot materyali ile redoks proteinleri arasındaki elektron aktarımına izin vererek, herhangi bir elektron aktarım medyatörü kullanmaya gerek kalmadan elektrokimyasal algılamayı sağlamaktadır (Yanez-Sedeno ve Pingarron 2005, Katz vd 2003).

AuNP'lerin yüksek yüzey/hacim oranı, yüksek yüzey enerjisi gibi çeşitli karakteristik özelliklerinin biyosensör kullanımındaki avantajları şöyledir:

- Protein ve metal nanoparçacıklar arasındaki mesafeyi azaltır.
- Elektrot yüzeyi ve prostetik grup arasında elektron-iletim yolu olarak hareket eder.
- Elektrot yüzeyi ve redoks proteini arasındaki elektron aktarımını kolaylaştırır.

Işık saçılımı özellikleri ve bölgesel elektromanyetik alanı çok fazla kuvvetlendirmesi gibi özellikleri ile AuNP'ler farklı türdeki biyosensörlerde sinyal yükseltici uç olarak kullanılır (Yanez-Sedeno ve Pingarron 2005).

Altın nanoparçacıkların NADH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya O<sub>2</sub> gibi biyokimyasal tepkimelerde elektrokatalizlenebilen, analitiksel olarak önemli olan moleküllerin redoks işleminde kullanışlı bir ara yüzey sağladığı gösterilmiştir (Hernandez-Santos vd 2002). Son olarak nanoparçacıkların biyosensing uygulamalarında önemli parametreler olan tanecik boyutunun ve yüzey morfolojisinin, kolayca ayarlanabilen şartlarda deneysel olarak kontrol edilebilmesi altın nanoparçacıkların kullanımının önemli bir avantajıdır (Yanez-Sedeno ve Pingarron 2005).

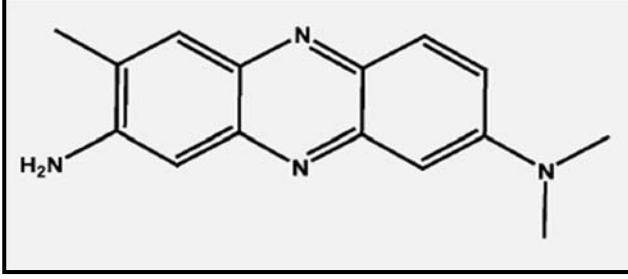
Altın nanoparçacıklarla modifiye edilmiş elektrotlar üç yolla hazırlanır:

1. Kendiliğinden oluşan tek tabaka yöntemiyle (SAM) elde edilen fonksiyonel gruplarla altın nanoparçacıkların bağlanması
2. Yığın elektrot yüzeyine nanoparçacıkların doğrudan yerleştirilmesi
3. Kompozit elektrot matrisindeki diğer bileşenlerle altın nanoparçacıkların karıştırılmasıyla elektrodun içine koloidal altının yerleştirilmesi

Altın nanoparçacıklar hazırlanmış elektrot yüzeyine biyomolekülün tutuklanması ile biosensör hazırlanmış olur (Yanez-Sedeno ve Pingarron 2005).

### 1.8. Poli(nötral) Kırmızı

Nötral kırmızı (NR; N8, N8, 3-trimetil-fenazin-2,8,-diamin klorür), virüsler gibi biyolojik materyalleri incelemek için bir renklendirici, biyokimyasal sistemlerde pH indikatörü, optik veya elektrokimyasal metotlar kullanarak DNA'nın tayini gibi çeşitli amaçlarla kullanılan bir fenazin boyasıdır (Şekil 1.15) (Pauliukaite ve Brett 2008).



Şekil 1.15. Nötral kırmızı'nın kimyasal yapısı

NR, diğer fenazin boya gibi elektrokimyasal olarak polimerleştirilerek iletken bir polimer oluşturabilir. Son zamanlarda poli(nötral kırmızı) (PNR), sensor ve biosensörlerde hem iletken polimer hem de redoks medyatörü olarak kullanılan bir polimerdir (Pauliukaite ve Brett 2008).

NR'nin elektrokimyasal polimerizasyonu ile ilgili ilk çalışma Nikolskii vd tarafından 1970 yılında yapılmıştır. Bu araştırmalar pH 0,5 ile 11,5 arasındaki bölgede nötral kırmızı-leuko-nötral kırmızı sisteminin yükseltgenme potansiyelinin pH'ya olan bağıllığını bildirmişlerdir. Elde edilen eğim verilerine göre dört doğrusal aralık vardır:

$$0,5 \leq \text{pH} \leq 4,3 \quad - 110 \text{ mV pH}^{-1} \quad (1)$$

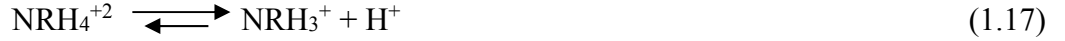
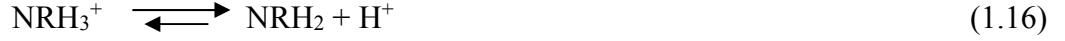
$$4,3 \leq \text{pH} \leq 6,1 \quad - 74 \text{ mV pH}^{-1} \quad (2)$$

$$6,1 \leq \text{pH} \leq 7,3 \quad - 37 \text{ mV pH}^{-1} \quad (3)$$

$$7,3 \leq \text{pH} \leq 11,5 \quad - 74 \text{ mV pH}^{-1} \quad (4)$$

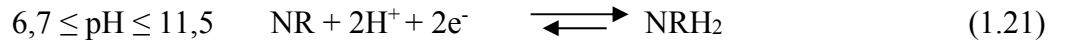
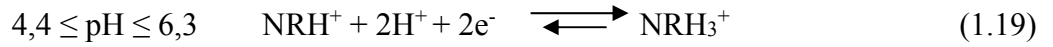
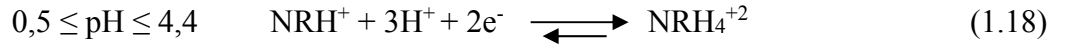
1, 2 ve 3'üncü bölgelerin eğimleri sırasıyla NR'nin toplam derişimin artmasıyla azalır. Yazarlar bu kaymayı nötral kırmızı kationunun (NR'nin tek protonlu formu) dimerizasyonu ve tetramerizasyonu olarak yorumlamışlardır. Daha önceki çalışmalarında yaptıkları hesaplamalardan yola çıkarak Nikolskii vd aşağıdaki dengeleri önermişlerdir:





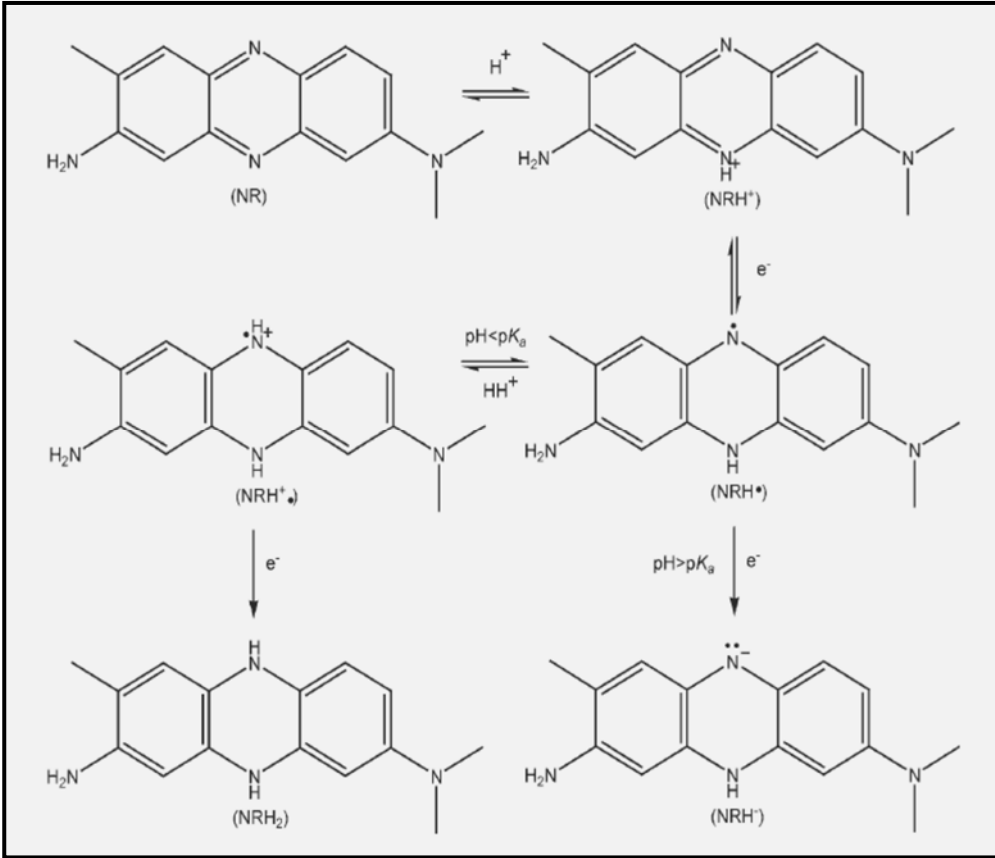
Bu tepkimelerde NR nötral kırmızıyı, NRH<sub>2</sub> leuko-nötral kırmızı molekülünü göstermektedir. Deprotonlama tepkimelerinin pKa değerleri tepkime (1.15) için 6,7, tepkime (1.16) için 6,3, tepkime (1.17) için ise 4,4 olarak bulunmuştur.

NR ve leuko-NR'nin protonlanmasıyla ilgili bilgilerin bir kombinasyonu farklı pH bölgelerinde NR'nin indirgenmesi için aşağıdaki tepkimeler elde edilmiştir (Halliday ve Matthews 1983):

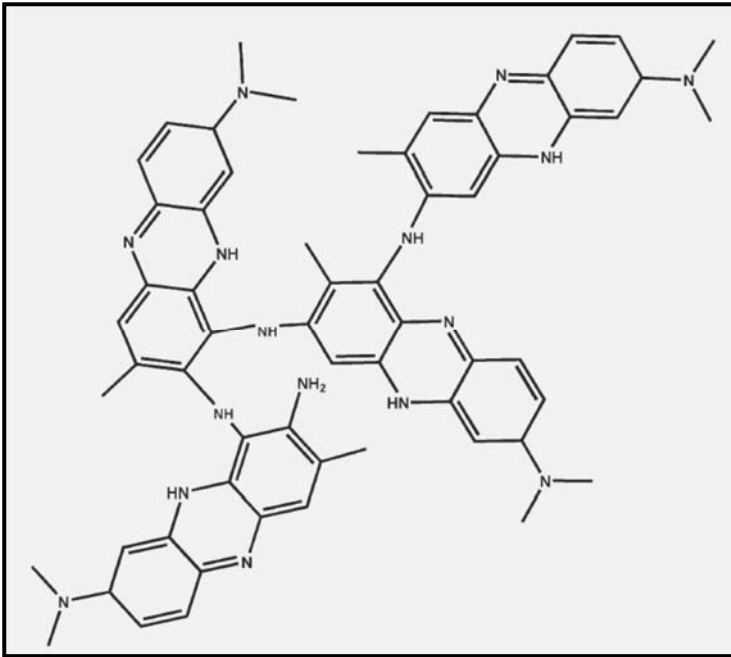


Tepkimeler (1.8), (1.19.), ve (1.20) NR'nin katyonlarını içerirken, tepkimeler (1.21) nötral NR molekülünü içermektedir. pH 0,5 ile 11,5 aralığı deneysel bilgilerin sınırlamaları için önemlidir.

Polimer oluşumuna neden olan elektrokimyasal tepkimeler şekil 1.16'da verilmiştir (Pauliukaite ve Brett 2008). NR'nin yükseltgenmesi süresince elde edilen mekanizmalar polimerizasyon işlemini başlatır ve oluşan radikallerin sayısı polimerin yapısını tanımlar. Oluşan radikallerin sayısı arttıkça daha çok dallanmış polimer elde edilir (Pouget vd 1994). NR'nin polimerizasyonu, hem radikal oluşumdan sorumlu olan uygulanan potansiyel ile hem de pH ile kontrol edilebilir (Nikolski vd 1970, Halliday ve Matthews 1983, Karyakin vd 1995, Karyakin vd 1999). Polimerizasyon mekanizması, radikallerin oluşumunu, monomerin dimerizasyonunu ve tetramerizasyonunu ve sonrasında polimer oluşturmak üzerine birleşmelerini içerir. Polimer C-N bağlanmasıyla oluşur. Bu mekanizma FT Raman ve <sup>1</sup>H NMR spektroskopik çalışmaları ile uyumlu olan IR spektroskopisi ile doğrulanmıştır. Bu çalışmalar NR'nin polimerizasyonunun NR'nin NH<sub>2</sub> grupları arasında olduğunu göstermiştir (Broncova vd 2004). NR tetramerinin olası yapısı Şekil 1.17'de verilmiştir (Pauliukaite ve Brett 2008).

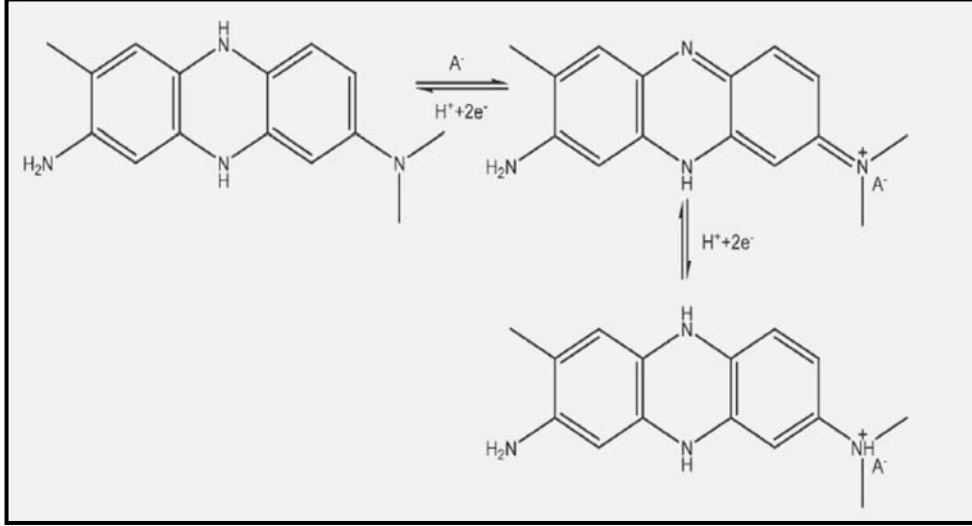


Şekil 1.16. NR'nin pH'ya bağlı olarak redoks değişim mekanizmalarının şematik gösterimi



Şekil 1.17. NR tetramerinin olası yapısı

PNR'nin büyümesi, monomerin fenazin aromatik sistemi değişmeksizin gerçekleşir. Hem monomer hem de türetilmiş polimeri aynı redoks potansiyeli ve benzer optiksel spektrumu göstermektedir. Polimerin büyümesi monomerin aromatik halkasındaki karbon atomlarından birinin (büyük bir olasılıkla N(R)<sub>2</sub>'ye göre orto konumundaki karbon atomu) –N(R)<sub>2</sub> ile bağlanması ile oluşur (Schlereth ve Karyakin 1995).



Şekil 1.18. NR katkılama mekanizmasının şematik gösterimi

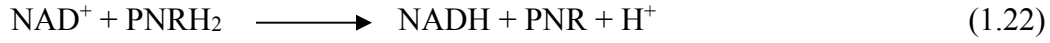
İletken organik polimerlerin polimerizasyonunda karşıt iyonların tanımlanması, iletkenliklerini artırabildikleri için çok önemlidir. NR'nin doping/de-doping mekanizmasının bir şeması Şekil 1.18'de gösterilmiştir. NO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonlarının PNR oluşumu için oldukça önemli olduğu bulunmuştur. Çünkü NO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonları NR'nin elektropolimerizasyonunu katalizlemekte ve oluşan polimeri stabilize etmektedir (Pauliukaite vd 2007). Fourier transform Raman spektrası ile PNR'nin dopant anyonlarla kompanse edildiği bir polikasyon olduğu kanıtlanmıştır (Broncova vd 2004). Elektron spin rezonans spektrası ile PNR'nin polimerik yapısındaki radikallerin varlığının kanıtlamış ve NR'nin elektropolimerizasyonundan sonra konjuge yapısında büyük değişiklikler olduğu FTIR ile gösterilmiştir (Yang vd 2006).

Karyakin vd 1995 yılında camsı karbon üzerinde 0,4 mM NR'nin elektropolimerizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. NR'nin elektrokimyasal polimerizasyonu ile elde edilen döngüsel voltamogramlarında, PNR'nin belirli potansiyellerde aynı karakteristik redoks potansiyeli gösterdiğini bildirmişlerdir. NR-leuko NR tersinir dönüşümünün yaklaşık - 0,5 V'da (tepkime 1.15), doping/de-doping dönüşümünün yaklaşık 0 V'da ve tersinmez NR yükseltgenmesi ve monomerin polimerizasyonu başlatan radikal oluşumunun ise + 0,8 V ile + 1,0 V arasında gerçekleştiğini açıklamışlardır. PNR'nin pik potansiyeli pH'ya, elektrot substratına ve elektrolit bileşimine bağlıdır. Monomerin redoks işlemine eşlik eden kütle değişimleri, yükseltgenmesi süresince NR'nin adsorpsiyonu ve indirgenme süresince adsorplanmış türlerin desorpsiyonu ile ilişkilidir. Elektropolimerizasyon süresince polimer film oluşumu nedeniyle kütle azalır. Asidik ortamda PNR'nin başlıca redoks tepkimesi basitçe 2e, 2H<sup>+</sup> işlemi olarak (tepkime 1.19) tanımlanabilir. Yükseltgenmiş hali,

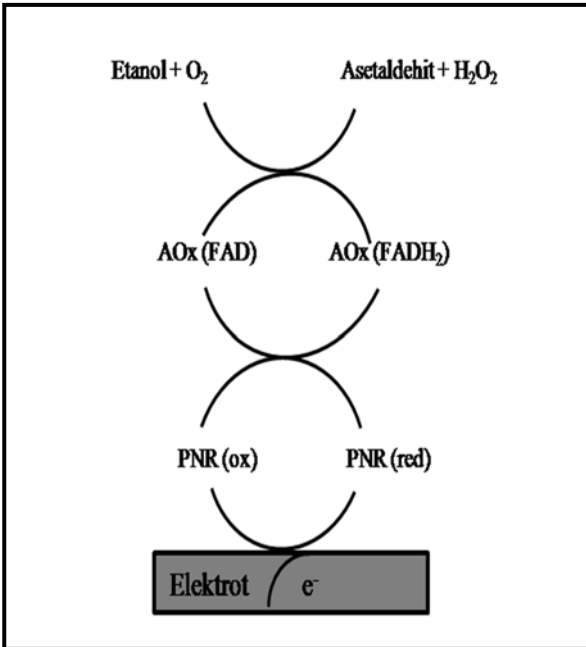


indirgenmiş haline göre daha fazla hidratlanır yani daha fazla şişme özelliğine sahiptir. Yüksek pH değerinde indirgenmiş halde olduğu için anyonlar adsorplanabilir (tepkime 1.21). Yüksek pozitif potansiyelerde kinetik olarak tersinmez tepkimelerin oluşumuna anyonların sorpsiyonu eşlik eder. Eğer potansiyel hemen ardından düşürülürse anyonlar filminden ayrılırlar. Eğer uygulanan pozitif potansiyel ile filmde aşırı yükseltgenmesi oluşuyorsa, PNR filminin yüzeyi yavaşça çözülür (Chen ve Gao 2007).

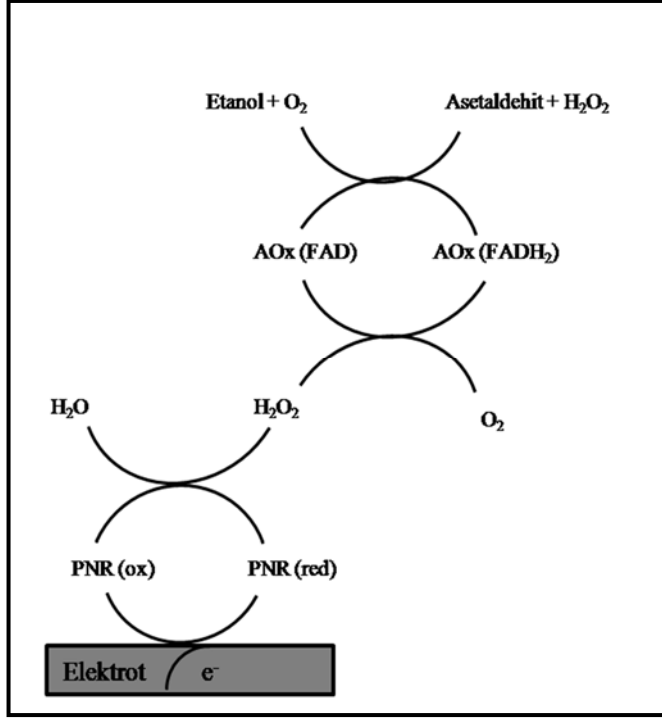
Nikotinamid dinükleotitin elektrokimyasal olarak yeniden üretilebilmesi ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ) son 30 yıl boyunca biyoelektrokimyanın zorluklarından biri olmuştur. PNR filmi, nikotinamid dinükleotiti elektrokimyasal olarak yeniden üretilebilme yeteneğine sahiptir. 1995 yılında Karyakin vd, PNR-modifiyeli elektrot kullanılarak  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ 'nin indirgenme/yükseltgenme tersinir voltametrik dalgalarını gözlemişler ve 2003 yılında ise denge potansiyelini tayin etmişlerdir. PNR,  $\text{NAD}^+$ 'nin indirgenmesinin elektrokimyasal hızını artırmaktadır ( $\sim -0.6$  V vs. SCE, pH 6.0) (Karyakin vd 1995, Ghica vd 2007).



Brett ve arkadaşlarının 2007 ve 2008 yıllarında oksidaz bazlı enzimlerle (glukoz ve alkol oksidaz) yaptıkları biyosensörlerde PNR'yi redoks medyatörü olarak kullanmışlardır. PNR bazlı oksidaz biyosensörlerinde iki mekanizma önermişlerdir. İlk mekanizmada PNR'nin oksidazların kofaktörü olan FAD'nin rejenarasyonunu elektrokatalizleyen bir medyatör olarak davrandığını bildirmişlerdir (Şekil 1.19). İkinci mekanizmada ise PNR'nin  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin indirgenmesini elektrokatalizlediğini bildirmişlerdir (Şekil 1.20) (Barsan ve Brett 2008).



Şekil 1.19. FAD'nin rejenarasyonu için önerilen mekanizma



Şekil 1.20.  $H_2O_2$ 'nin tayini için önerilen mekanizma

Diğer taraftan PNR, iletken polimer özelliği ile ilgili olarak hem dopamin hem de askorbik asitin elektroyükseltgenmesi için de kullanılmıştır (Sun vd 1998). Asetat, adipat, benzoat, sitrat, glutarat, malat, malonat vb gibi çoğu karboksilatlarla karşı da PNR'nin duyarlılığı bulunmaktadır (Ghica ve Brett 2006).

### 1.9. YüzeY Baskılama Teknolojisi ve YüzeY Baskılı Elektrotlar

YüzeY baskılama teknolojisi, çeşitli inert substratlar üzerine farklı iletken veya yalıtkan mürekkep katmanlarının ardışık olarak yerleştirilmesini temel alır ve kalın film elektrotların seri üretimi için yaygın olarak kullanılır. Bu elektrotlar karmaşık numune ön işlemleri olmaksızın kullanılabilen, biyolojik ve kimyasal sensörlerin yapımında sıklıkla kullanılır ve dolayısıyla yerinde izlemeye uygundur (Fanjul-Bolado vd 2007, Guix vd 2010, Wang vd 1998). YüzeY baskılı elektrotların birçok avantajı vardır (Tudorche ve Bala 2007):

- Çok yönlü modifikasyon,
- Doğrudan yerinde ölçüm,
- Tek kullanımlık olması,
- Düşük fiyat,
- Hızlı ve basit olması

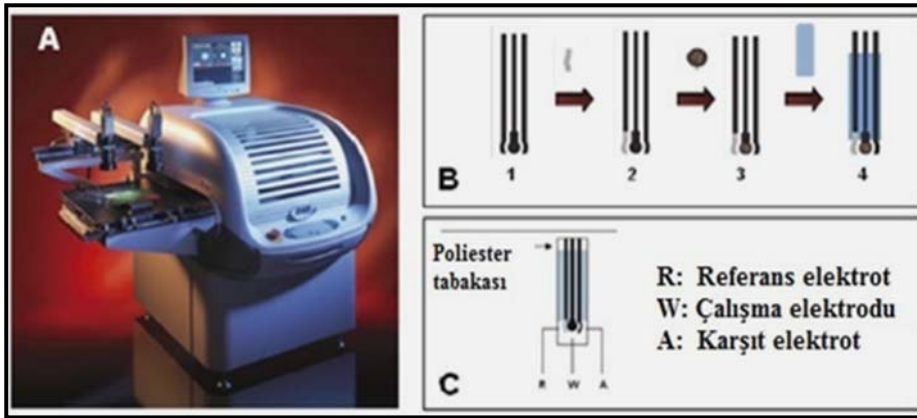
Büyük miktarlarda düşük maliyetli sensör çubukları üretiminde çeşitli mürekkepler, substratlar, medyatörler, nanoparçacıklar ve iletken polimer materyaller kullanılabilir (Wang vd 1998). Genellikle yüzeY baskılama işleminde kullanılan inert substratlar seramik veya polimerik maddelerdir. Poliester dayanıklı, sert, termal ve

hidroskobik olarak kararlı olması nedeniyle en çok kullanılan polimerik substrattır (Guix 2009). Ancak seramik substratlar, plastik substratlara göre mürekkebin daha yüksek sıcaklıklarda pişirilmesine olanak sağlar. Kalın film elektrotların üretiminde kullanılan baskılama mürekkepleri ticari olduğu için bileşimi kesin değildir. Fakat bu mürekkeplerin başlıca bileşenlerinin sentetik kalitede grafit, vinil veya epoksi bazlı polimerik bağlayıcılar ve çözücüler olduğu bilinmektedir (Fanjul-Bolado vd 2007). Ticari karbon ve metal (Pt veya Au) mürekkep formülasyonları çalışma elektrotlarının baskılanmasında kullanılırken, gümüş bazlı mürekkepler ise genellikle referans elektrotların elde edilmesi için kullanılmaktadır. Karbon mürekkepleri, bağıl olarak ucuz olması ve düşük zemin akım ve geniş potansiyel aralığı sağlaması nedeniyle sensör uygulamaları için oldukça ilgi çekicidir. Bu mürekkepler, grafit parçacıkları, bir polimer bağlayıcı ve disperse edici, baskılayıcı ve yapıştırıcı gibi diğer katkı maddelerinden oluşurlar. Mürekkep kompozisyonundaki (grafit parçacıklarının doldurulması, türü veya boyutu gibi), baskılama ve pişirme şartlarındaki bazı farklılıklar, elektron aktarımını ve karbon sensörünün tüm analitiksel performansını etkileyebilir (Wang vd 1998).

Kalın film işleminde temel basamaklar, düzlemsel substrat materyali üzerine uygun mürekkebin desenli bir şablon yardımıyla yüzeye baskılanması ve sonrasında doğru sıcaklıkta pişirilmesidir (Wang vd 1998).

Şekil 1.21’de yüzey baskılı elektrot üretimi için örnek bir yüzey baskılama işleminde verilmiştir (Guix 2009). İşlem dört basamakta oluşmaktadır:

1. Grafit mürekkebinin yerleştirilmesi
2. Ag/AgCl mürekkebinin yerleştirilmesi
3. Modifikasyon için çalışma elektrodu üzerine ilave bir tabakanın yerleştirilmesi
4. Yalıtkan mürekkebin (poliester) yerleştirilmesi



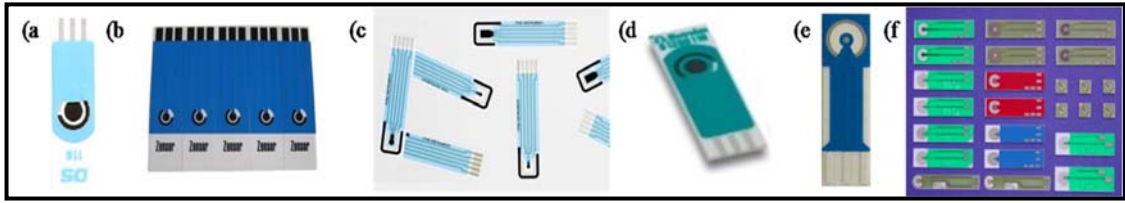
Şekil 1.21. A) Yüzey baskılama makinesi DEK248’in fotoğrafı B) Yüzey baskılı elektrot yapımı basamaklarının şematik gösterimi C) Üretilen yüzey baskılı elektrotun şekli

Her bir tabaka yerleştirildikten sonra yakma işlemine geçilir. Basılmış tabaka 15 dk. boyunca 90°C’lik fırında bekletilir. Bu süreçte mürekkep tabakanın üzerine adsorplanır ve çözücü buharlaşır.

Üretilen yüzey baskılı elektrot üçlü elektrot sistemini içerir:

- W: Çalışma elektrodu. Tepkimenin gerçekleştiği elektrottur.
- R: Referans elektrot. Sabit referans bir potansiyel sağlar
- A: Karşıt elektrot. Akımın referans elektrot içinden geçmesini engellemek için kullanılır.

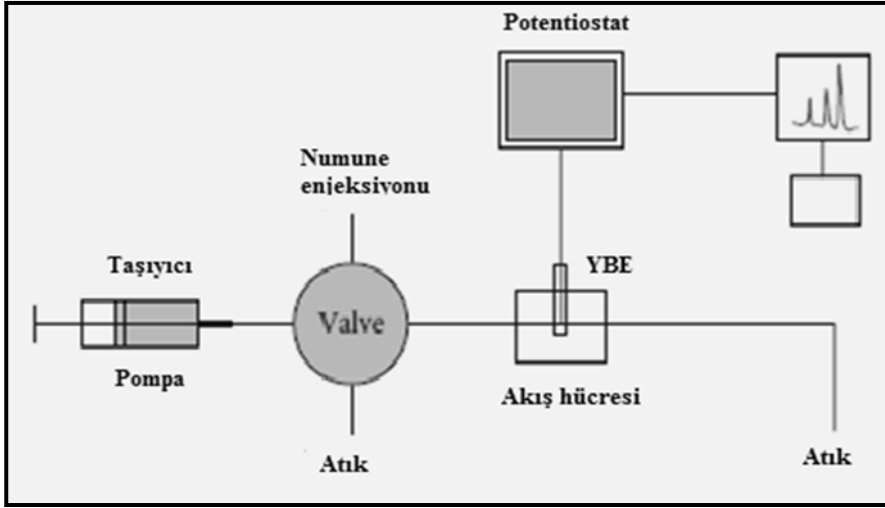
Yüzey baskılı elektrotlar, laboratuarda otomatik veya yarı otomatik baskılama makinelerinde istenilen özellikte üretilebileceği gibi, ticari olarak da çeşitli formülasyonlarda basılmış olarak satılmaktadır. Şekil 1.22’de çeşitli markalardaki ticari yüzey baskılı karbon elektrotlar görülmektedir.



Şekil 1.22. Çeşitli markalardaki ticari yüzey baskılı elektrotlar a) DropSens b) Zensor c) Pine Instrument d) Metrohm e) BVT f) PalmSens

### 1.10. Akışa Enjeksiyon Analiz

İlk kez 1975 yılında Ruzicka ve Hansen tarafından “Flow Injection Analysis”, FIA, adıyla önerilmiş olan Kesiksiz Analiz Yöntemi (Akışa Enjeksiyon Analiz), akışın sürekli olduğu ortama numune enjeksiyonu ile oluşan numune zonunun dedektör sistemine taşınarak, sinyalin sürekli izlenmesi ilkesine dayanmaktadır. Kısaca “akan bir sisteme enjeksiyonla analiz” de denebilir. 20 yıl önce nicel otomatik analizlerde kullanılmaya başlandığından beri, otomatik sistemler arasında çok yönlü ve etkili bir teknik olmuştur. FIA’da sinyal, zamana bağlı pik formundadır. Cam malzemelerin (beher, erlen, büret, pipet vb cam düzenekler) yerine taşıyıcı kolon, pompa ve enjeksiyon vanası kullanılarak hızlı analiz yapıldığı gibi, kapalı sistem oluşturulması nedeniyle kullanıcının zehirli maddelerle doğrudan teması, ayrıca örnek ve reaktiflerin hava ile etkileşimleri de önlenmektedir. Sistem az bir deneyim ve ucuz bir alet donanımı ile kurulabilir (Nişli vd 2010). Şekil 1.23’de akışa enjeksiyon analiz sisteminin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 1.23. Akışa enjeksiyon analiz sisteminin şematik gösterimi

Kesikli analiz yöntemi ile karşılaştırıldığında, akış herhangi bir hava kabarcığı ile kesilmediği için FIA sürekli akış yöntemidir. Örnek taşıyıcı sistem içine enjekte edilmekte (örnek sisteme sürekli verilmemekte), enjekte edilen örnek sistem boyunca taşınırken fizikokimyasal işlemler gerçekleşebilmektedir. Örneğin kısmi dispersiyonu ya da seyrelmesi hidrodinamik koşulların kontrol edilmesi ile mümkün olmaktadır. Yöntemde kimyasal ve fiziksel dengenin oluşmasını bekleme zorunluluğu yoktur. Ancak tüm sistemin tekrarlanabilir çalışması gerektiği gibi, örnekleme zamanının da tekrarlanabilir olması gereklidir. Çünkü denge konumuna ulaşılmadan ölçüm yapılmakta ve küçük değişimler büyük yanılgılara neden olabilmektedir (Nişli vd 2010).

Özetle akışa enjeksiyon analiz yöntemi sürekli bir akış, doğrudan enjeksiyon, kontrollü kısmi dispersiyon ve tekrarlanabilir örnekleme zamanı özelliklerine sahip olduğu koşullarda ideal çalışma olanağı sağlar (Nişli vd 2010).

### 1.10.1. Akışa enjeksiyon analiz yönteminin çalışma ilkesi

Yöntem üç ilkenin bileşimidir:

- Örnek enjeksiyonu,
- Enjekte edilen örneğin kontrollü dağılımı (dispersiyonu)
- Enjeksiyon noktasından dedektöre olan hareketin tekrarlanabilir zamanlı olması

Örnek enjekte edildikten sonra, örnek zonu ilk önce dikdörtgen şeklinde olup, daha sonra kolonda laminar akış koşullarındaki dağılıma nedeniyle genişler. Dağılmaya konveksiyon ve difüzyon neden olmaktadır (Nişli vd 2010).

*Konveksiyonla taşınmada* kolonun dairesel kesitine göre, çeperinde sıfır ve merkezinde maksimum olacak şekilde parabolik bir hız profili oluşur. Örnek çözeltinin taşıyıcı çözelti içine açılma ve akış yönüne dik difüzyondan ötürü derişim gradiyenti oluşur. Bu nedenle zon açılma dağılımlardan gelen toplam dağılım, dağılıma uğramış örnek zonunu genişletir ve pik daha simetrik gaussian şekle dönüşür. Örnek zonunun dağılımı ilk derişime, kolon geometrisine ve akış hızına bağlıdır (Nişli vd 2010).

Dağılma oranını (dispersiyon katsayısı, D) örnek hacmi, akış kolonu uzunluğu ve akış hızı etkilemektedir. Örnek hacmi büyüdüğünde dağılma oranı 1'e yaklaşırken, kolon uzunluğu arttığında ise karışma daha fazla olacağından  $D > 1$  olacaktır. Dağılma oranı 1- 3 arasında ise sınırlı, 3-10 arasında ise orta ve  $D > 10$  olursa geniş dağılım (dispersiyon) tanımlamaları yapılmaktadır. Akış hızı ve kolon boyu arttıkça ve örnek hacmi azaldıkça dağılma derecesi artar (Nişli vd 2010).

### 1.10.2. Akışa enjeksiyon analiz düzeneğinin ana bileşenleri

Böyle bir düzenek, akışı sağlayan sürükleyici sistem, enjeksiyon sistemi, taşıyıcı kolon yada reaktör ve algılayıcı sistem (dedektör) olmak üzere dört ana kısımdan oluşur (Nişli vd 2010).

*Sürükleyici kısım:* Taşıyıcı sistemin akışı peristaltik pompa, pistonlu pompalar ya da gaz baskısı ve yer çekimine dayalı sıvı baskısı yoluyla sağlanır. En yaygın olarak kullanılan sürükleyiciler peristaltik pompalardır. Tek kanallı olduğu gibi çok kanallı da olabilirler. FIA'da genellikle dört kanallı pompalar kullanılmaktadır. Aynı anda çok sayıda kanal kullanıldığında, akış hızında küçük değişimler olsa da bu yolla daha ucuz bir maliyetle bir arada tayinler mümkündür. Peristaltik pompalarda gözlenen gürültü (puls) etkisini gidermek için; öncelikle plastikten yapılmış makaraların sayısını artırmak, enjeksiyon öncesi kullanılan akış kolonunu uzun tutmak ve atık çözeltisini de yine bir kolon yardımıyla pompadan çekmek gerekir (Nişli vd 2010).

*Enjeksiyon sistemi:* Taşıyıcı çözelti ortamına enjekte edilen örnek hacminin çok iyi bilinmesi ve akışın durdurulmadığı koşullarda tekrarlanabilir katımın yapılması gerekmektedir. Akışkan ortamla ilgili yapılan ilk çalışmalarda şırınga enjeksiyon sistemi kullanılmasına karşın örnekleme için tekrarlanabilir olmadığı verilerden açıkça görülmüştür. Son yıllarda, akışkan ortama örneğin katımı özellikle vana kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Akışkan sistemlerde enjeksiyon en önemli kesim olması nedeniyle, özellikle vananın döndürülmesinden kaynaklanan gürültü etkisini gidermek için çalışmalar devam etmektedir. Enjeksiyonlar çoğunlukla döner enjeksiyon, orantılı enjeksiyon ve yan geçişli vana sistemleri ile yapılmaktadır (Nişli vd 2010).

*Taşıyıcı kolonlar ve reaktörler:* Örnek zonu oluşturduğu ve dağıldığı taşıyıcı çözelti içeren kolonlar aynı zamanda taşıyıcı ile örnek arasında bir tepkime varsa, reaktör gibi davranırlar. Bu kolonlar asitlere ve organik çözümlere karşı değişik dayanıklılık özelliği gösteren polivinil klorür, tygon, silikon kauçuk gibi malzemelerden yapılır. Bu akış kolonları örneğin sistem içinde kalış zamanını ve dispersiyon derecesini kontrol etmede önemli rol oynar (Nişli vd 2010).

*Algılayıcı sistem (dedektör):* Akış yöntemlerinin en önemli kısmını oluştururlar. Akışkan geçişli bir hücreden (flow-cell) ve bir yazıcıdan oluşur. Herhangi bir dedektör sistemi, analitin oluşturduğu özelliği yazıcıda kaydedilen sürekli bir sinyale dönüştürür. Son yıllarda elektrokimyasal dedektörler, akışkan ortamlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Dedektörler, küçük hacimli, düşük gürültü sinyalli, hızlı ve geniş bir derişim aralığında madde miktarıyla doğru orantılı yanıt vermelidir. Ayrıca tayin sınırının düşük ve pik genişliğinde etkisinin az olması gerekmektedir (Nişli vd 2010).

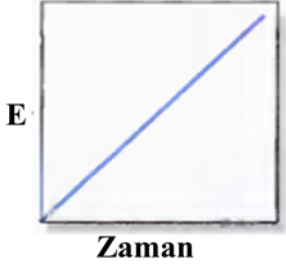
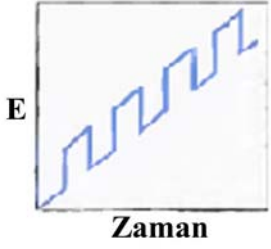

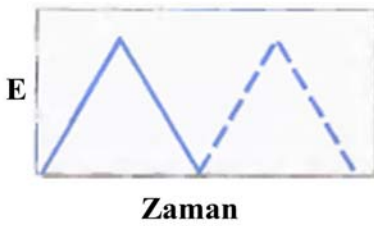
## 1.11. Voltametri

Voltametri, bir indikatör veya çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesinden faydalanarak analit hakkında bilgi edinilen bir grup elektroanalitik yöntemi kapsar. Genel olarak, voltametricide kullanılan çalışma elektrotları, polarizasyonu artırmak için, yüzey alanları çoğunlukla birkaç milimetrekare ve bazı uygulamalarda ise birkaç mikrometrekare veya daha küçük olan mikroelektrotlardır.

Tarihsel olarak voltametri, Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920'lerin başında bulunan voltametrinin özel bir tipi olan polarografi tekniğinin geliştirilmesi ile başlamıştır. Voltametri, inorganik, fizikokimya ve biyokimyacılarca, çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme-indirgenme olaylarının, yüzeylerdeki adsorpsiyon olaylarının ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerindeki elektron aktarım mekanizmalarının temel çalışmalarını kapsayan, analitik olmayan amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır. 1960'ların ortalarında klasik voltametric yöntemlerde, yöntemin duyarlılığı ve seçiciliğini önemli ölçüde artıran birçok ana değişiklik geliştirildi. Yaklaşık aynı zamanlarda, düşük maliyetli yükselticilerin ortaya çıkması, bu değişikliklerin çoğu ile ilişkili nispeten daha ucuz aletlerin yapılmasını ve onların bütün kimyacıların kullanımına sunulmasını mümkün kıldı. Böylece özellikle farmosötik, çevre ve biyolojik açıdan önemli türlerin tayini için voltametric yöntemlerin uygulanmasıyla ilişkili çalışmalara ilgi artmıştır. Modern voltametri, yükseltgenme ve indirgenme olaylarının yanı sıra adsorpsiyon olayları ile de ilgilenen kimyacıların birçoğu tarafından halen güçlü bir cihaz olarak kullanılmaya devam etmektedir (Skoog vd 1992).

### 1.11.1. Voltametricide uyarma sinyalleri

Voltametricide, bir mikroelektrot içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir bir potansiyel *uyarma sinyali* uygulanır. Bu uyarma sinyali yöntemin dayandığı karakteristik bir akım cevabı oluşturur. Voltametricide en çok kullanılan uyarma sinyallerinin dördünün dalga şekli Şekil 1.24'de verilmiştir. Klasik voltametric uyarma sinyali, hücreye uygulanan doğru akım potansiyelinin zamanın bir fonksiyonu olarak doğrusal olarak arttığı (genellikle 2-3 V arasında), Şekil 1.24.a'da gösterilen doğrusal bir taramadır. Sonra hücrede oluşan akım, zamanın bir fonksiyonu olarak ve böylece uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Şekil 1.24.b ve 1.24.c'de iki puls tipi uyarma sinyali görülmektedir. Akımlar bu pulsların ömrü süresince çeşitli zamanlarda ölçülür. Potansiyel, Şekil 1.24.d'de görülen üçgen şeklindeki dalga ile iki değer arasında devreder. Önce bir maksimuma kadar doğrusal olarak artar ve sonra aynı eğimli orijinal değerine doğrusal olarak azalır. Bu işlem, akımın zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilirken defalarca tekrarlanabilir. Bir tam devir 100 veya daha fazla saniye sürebilir veya bir saniyeden daha az sürede tamamlanabilir. (Skoog vd 1992).

Adı	Dalga şekli	Voltametrimin tipi
(a) Doğrusal taramalı		Polarografi Doğrusal-taramalı voltametri
(b) Diferansiyel puls		Diferansiyel puls polarografisi
(c) Kare dalga		Kare dalga voltametrisi
(d) Üçgen		Dönüşümlü voltametri

Şekil 1.24. Voltametri de kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri

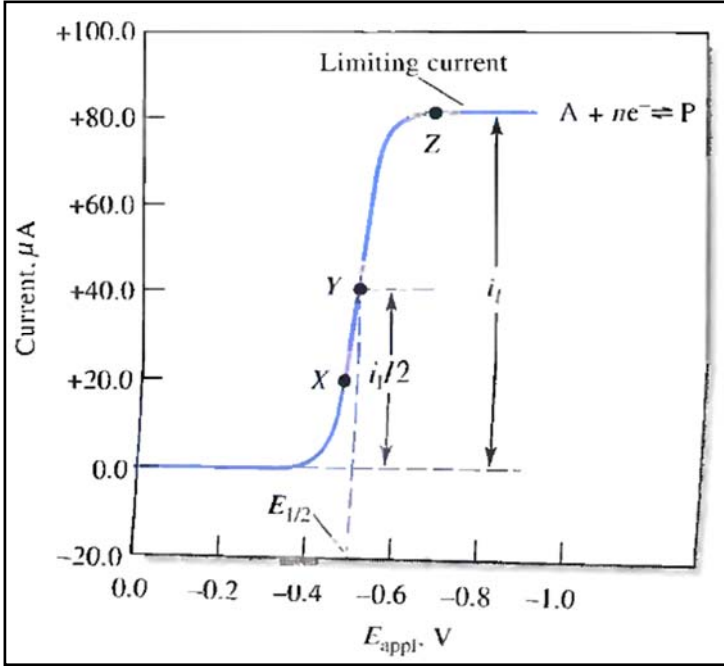
### 1.11.2. Voltamogramlar

Bir civa film mikroelektrot üzerinde bir A türünün bir P türüne indirgendiği bir elektroliz için tipik bir doğrusal taramalı voltamogram Şekil 1.25’de verilmiştir. Burada, uygulanan potansiyellerin negatif işaretli olması için mikroelektrodun, doğrusal tarama üreticinin negatif ucuna bağlandığı varsayılır. Geleneksel olarak, katodik akımlar daima pozitif, anodik akımlar ise negatif işaretlerle gösterilir. Bu hipotetik deneyde, çözelti A bakımından yaklaşık  $10^{-4}$  M, P bakımından 0,0 M ve destek elektrolit olarak kullanılan KCl bakımından da 0,1 M olarak kabul edilmiştir. Mikroelektrottaki yarı-reaksiyon aşağıdaki gibi tersinir bir reaksiyondur:





Burada kolaylık açısından A ve P üzerindeki yükler yazılmamış ve ayrıca reaksiyonun potansiyeli de -0,26 V olarak kabul edilmiştir.



Şekil 1.25. Hipotetik bir A türünün bir P türünü vermek üzere indirgenmesi için doğrusal taramalı voltamogram

Doğrusal taramalı voltamogramlar genellikle voltametrik dalga adı verilen sigmodial-şekilli (S şeklinde) eğrilerdir. Dik artıştan sonra gelen sabit akıma difüzyon kontrollü akım veya basitçe *sınır akımı*,  $i_l$ , denir. Çünkü bu akım, analitin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızındaki sınırlamadan kaynaklanır. Sınır akımları genellikle analitin derişimi ile doğru orantılıdır. Bu yüzden;

$$i_l = kc_A \quad (1.24)$$

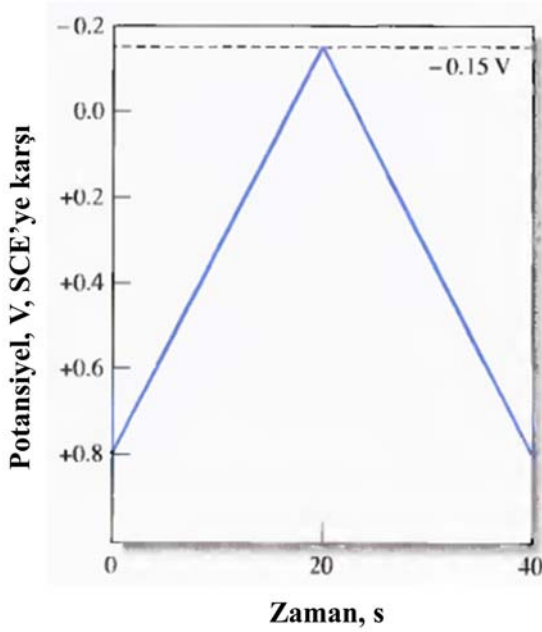
dır. Burada,  $c_A$  analit derişimi ve  $k$  ise bir sabittir. Kantitatif doğrusal taramalı voltametri bu ilişkiye dayanır.

Akımın, sınır akımının yarısına eşit olduğu potansiyele yarı dalga potansiyeli denir ve  $E_{1/2}$  sembolü ile gösterilir. Referans elektrot potansiyeline göre düzeltildikten sonra (doymuş kalomel elektrot ile 0,242 V), yarı-dalga potansiyeli ile yakından ilgilidir. Fakat genellikle bu sabite eşit değildir. Yarı-dalga potansiyelleri bazen bir çözeltideki bileşenlerin belirlenmesinde faydalıdır.

Hızlı bir şekilde sınır akımları elde etmek için çözelti veya mikroelektrot sürekli ve tekrarlanabilir bir hareket halinde olmalı ya da bir damlayan civa elektrot gibi bir damlayan elektrot kullanılmalıdır. Çözelti veya mikroelektrodun sürekli hareket halinde olduğu doğrusal taramalı voltametriye *hidrodinamik voltametri* denir. Bir damlayan elektrodun kullanıldığı voltametriye de *polarografi* adı verilir. (Skoog vd 1992).

### 1.11.3. Döngüsel Voltametri

Döngüsel voltametri (CV) tekniği, elektrokimyasal çalışmalarda özel bir yere sahiptir ve çok yaygın olarak kullanılır. Bu teknik, gelişmiş voltametrik gibi analitik duyarlılığı artırmaya yönelik değil, daha çok elektrokimyasal mekanizmanın aydınlatılmasına yönelik çalışmalarda kullanılır. CV’de karıştırılmayan bir çözeltide küçük bir durgun elektrodun akım cevabı, Şekil 1.26’da gösterildiği gibi bir üçgen dalga şekilli potansiyel ile uyarılır. Bu örnekte, potansiyel ilk önce SCE’ye karşı +0,8 V’den -0,15 V’a kadar doğrusal olarak değiştirilir, sonra tarama yönü tersine çevrilir ve potansiyel orijinal değeri olan +0,8 V’a getirilir. Her iki yöndeki tarama hızı 50 mV/s’dir. Bu uyarma çevrimi genellikle birkaç kez tekrarlanır. Ters yöndeki potansiyellere (bu durumda -0,15 V ve +0,8 V) *çevirici potansiyeller* denir. Verilen bir deney için çevirici potansiyellerin aralığı, bir veya daha fazla analitin difüzyon kontrollü bir yükseltgenme veya indirgenmenin olduğu potansiyeldir. Başlangıç taramasının yönü, numunenin bileşimine bağlı olarak burada gösterildiği gibi negatif veya pozitif olabilir. Genel olarak, çevrim süresi 1 ms veya daha kısa süreden 100 sn veya daha uzun süre aralığındadır (Skoog vd 1992).



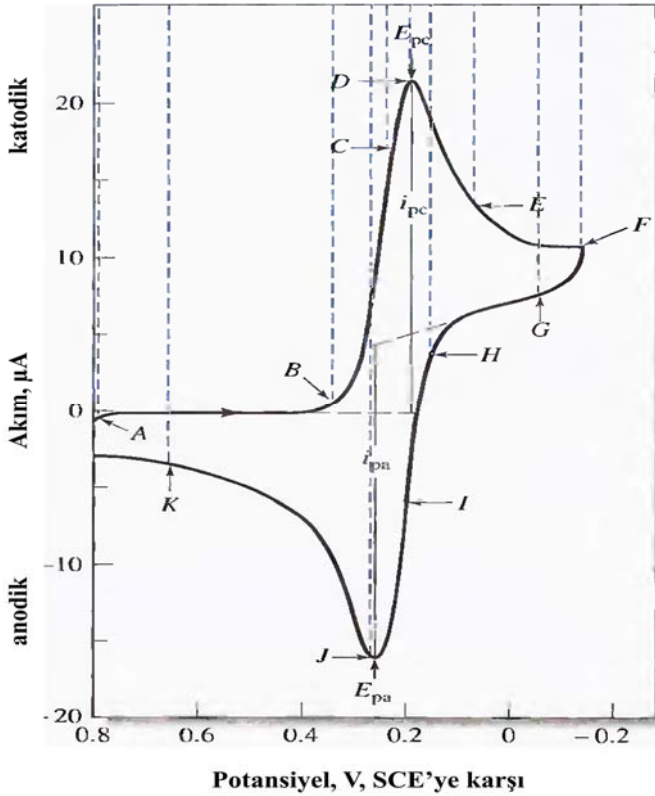
Şekil 1.26. Döngüsel voltametrik uyarma sinyali

Şekil 1.27’de 6,0 mM  $K_3Fe(CN)_6$  ve 1 M  $KNO_3$  çözeltisinin Şekil 1.26’da gösterilen dönüşümlü uyarma sinyaline verdiği akım cevabı görülmektedir. Çalışma elektrodu durgun bir platin mikroelektrot ve referans elektrot da bir doymuş kalomel elektrottur. +0,8 V’luk başlangıç potansiyelinde zayıf bir anodik akım gözlenmiş ve tarama devam ettikçe hemen sıfıra düşmüştür. Bu ilk negatif akım, suyun yükseltgenerek oksijenlenmesi sonucu oluşur (daha pozitif potansiyellerde bu akım hızla artar ve yaklaşık +0,9 V’da oldukça büyük değere ulaşır). +0,7 ve +0,4 V potansiyelleri arasında hiç akım gözlenmez çünkü bu potansiyel aralığında indirgenebilir veya yükseltgenebilir türler yoktur. Potansiyel biraz daha düşük pozitif değerlere (+0,4 V) gelince, heksasiyanoferrit (III) iyonunun heksasiyano ferrat (II)

iyonuna indirgenmesi sebebiyle bir katodik akım gözlenir (B noktası). Burada, katottaki reaksiyon şöyledir:



B'den D'ye kadarki bölgede  $\text{Fe(CN)}_6^{3-}$ 'nin yüzey derişimi gittikçe küçülürken, akımda hızlı bir artış olur. Pik akımı iki bileşenden meydana gelir. Biri, analitin yüzey derişimini Nerst eşitliği ile verilen denge derişimine eşitlemek için gerekli başlangıç akım artışıdır. İkincisi ise normal difüzyon kontrollü akımdır. Sonra ilk akım, difüzyon tabakası elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça hızla azalır (D noktasından F noktasına). -0,15 V'luk noktada (F) tarama yönü çevrilir. Bununla beraber, tarama daha pozitif potansiyellere doğru olduğu halde akım katodik olmaya devam eder. Çünkü bu potansiyeller halen  $\text{Fe(CN)}_6^{3-}$ 'nin indirgenmesine yetecek kadar negatiftir. Potansiyel yeteri kadar pozitif olduğunda  $\text{Fe(CN)}_6^{3-}$ 'nin indirgenmesi daha fazla devam etmez, akım sıfıra gider ve sonra da anodik olur. Anodik akım, ileri yöndeki tarama sırasında yüzey yakınlığında biriken  $\text{Fe(CN)}_6^{4-}$ 'nin yeniden yükseltgenmesi sonucu oluşur. Bu anodik akım pik yapar ve sonra biriken  $\text{Fe(CN)}_6^{4-}$ 'nin anodik reaksiyon yoluyla kullanılmasıyla azalır.



Şekil 1.27.  $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$  yönünden 6,0 mM ve  $\text{KNO}_3$  yönünden 1,0 M olan bir çözeltinin döngüsel voltamogramı

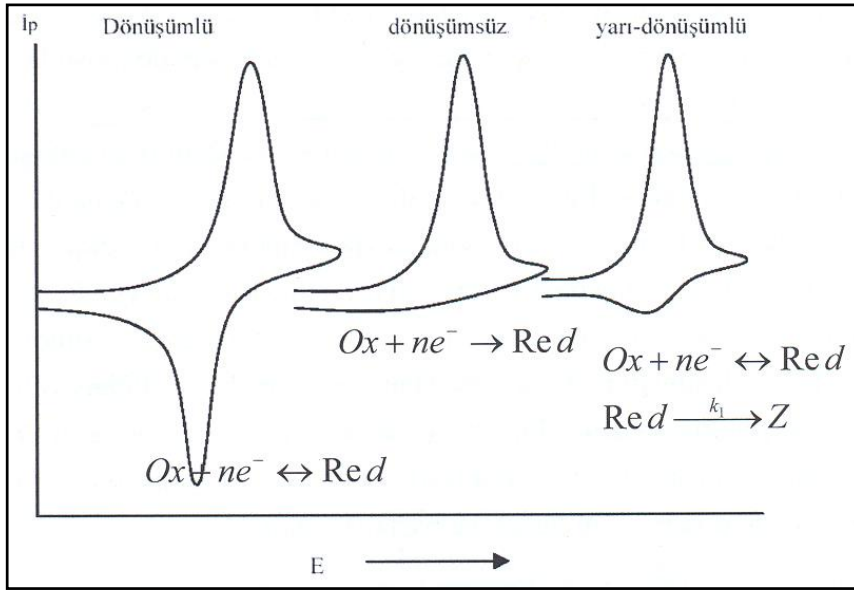
Bir döngüsel voltamogramın önemli parametreleri, katodik pik potansiyeli ( $E_{pc}$ ) ve anodik pik potansiyeli ( $E_{pa}$ ), katodik pik akımı ( $I_{pc}$ ), anodik pik akımı ( $I_{pa}$ )'dır. Tersinir bir elektrot reaksiyonu için anodik ve katodik pik akımları mutlak değer olarak

yaklaşık eşit, fakat zıt işaretlidir ve pik potansiyellerinin farkı  $59 \text{ mV}/n$ 'dir. Burada  $n$ , yarı reaksiyonda yer alan elektron sayısıdır (Skoog vd 1992).

Döngüsel voltametri; elektrokimyasal tepkimelerin niteliği hakkında hızla bilgi edinilebilen ve bu nedenle incelemelerde ilk başvuru bir tekniktir. Bu yolla tarama hızına bağlılıktan yararlanılarak, kimyasal bir tepkime ile eşleşmiş homojen tepkimeler kolaylıkla aydınlatılabilir ve adsorpsiyon gibi olaylar da tanımlanabilir.

Döngüsel voltamogramlarda akım-potansiyel değişimi genellikle pik şeklindedir. Genellikle bu piklerin yüksekliği ve potansiyel değerleri üzerine çalışılan potansiyel aralığında tarama hızının etkisi izlenir. Pik yüksekliklerinin tarama hızına bağlılığından gidilerek, adsorpsiyon, difüzyon ve eşleşmiş voltamogramlar arasındaki farklanmalar mekanizmaya ilişkin bilgiler verir. Bununla birlikte, kinetik veriler ancak ilk taramanın analizinden doğru olarak elde edilebilir. Anodik ve katodik tarama hızları ( $v_{\text{anodik}}$  ve  $v_{\text{katodik}}$ ) genellikle eşit tutulur ancak, hızlı homojen tepkimeler incelenirken, bu değerler farklıdır (Pelit vd 2013).

Döngüsel voltametri de voltamogramlar, reaksiyon mekanizmasına göre değişik şekillerde olabilir (Şekil 1.28). Genelde, bu şekiller yani voltamogramların yapısı incelenerek (a)'nın dönüşümlü (b)'nin dönüşümsüz (c)'nin ise önce elektron transfer daha sonra da kimyasal reaksiyondan kaynaklandığını görmek mümkündür. Kısaca voltamogramın şekli, elektron transfer hızına, difüzyona (kütle transferi) ve elektrotta meydana gelen reaksiyonlara bağlıdır.



Şekil 1.28. Dönüşümlü, dönüşümsüz ve yarı-dönüşümlü reaksiyonlar için voltamogramlar

Döngüsel voltametri tekniğinde dönüşümlü elektrokimyasal reaksiyonlar için pik akımı aşağıdaki Randles-Sevcik denklemi ile verilir.

$$i_p = 2,96 \times 10^5 n^{3/2} AD^{1/2} C v^{1/2} \quad (1.26)$$

Burada,  $i_p$  pik akımı (A),  $n$  alınan verilen elektron sayısı,  $A$  elektrot yüzey alanı ( $\text{cm}^2$ ),  $D$  difüzyon katsayısı ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $C$  derişim ( $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) ve  $v$  ise tarama hızıdır ( $\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Dönüşümlü reaksiyonlar için  $E_{pa}$  ve  $E_{pc}$  aşağıdaki eşitliklerle verilebilir.

$$E_{p,c} = E_{1/2} - 1,11 \frac{RT}{nF}, E_{p,a} = E_{1/2} + 1,11 \frac{RT}{nF}, E_{1/2} = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{f_{red}}{f_{ox}} \left[ \frac{D_{ox}}{D_{red}} \right] \quad (1.27)$$

Bu eşitlikler,  $25^\circ \text{C}$ 'de dönüşümlü elektrokimyasal reaksiyonlar için  $\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = 59 \text{ mV} / n$  ve  $i_{p,a} / i_{p,c} \approx 1$  olması gerektiğini göstermektedir.

Dönüşümsüz reaksiyonlar için  $E_p$  ve  $i_p$  tamamen farklı eşitliklerle gösterilir.

$$i_p = 2,99 \times 10^5 n (\alpha N_a)^{1/2} AD^{1/2} C v^{1/2} \quad (1.28)$$

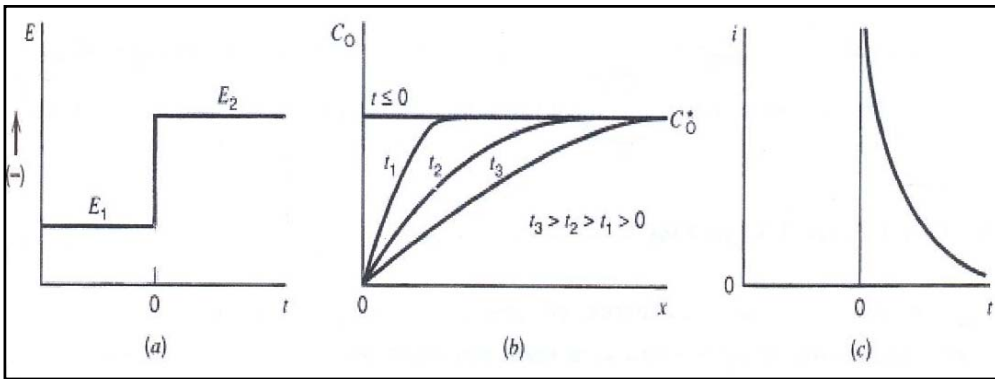
Burada,  $\alpha$  geçiş hali için potansiyel enerji simetrisini gösteren transfer katsayısı,  $N_a$  ise hız tayin eden basamaktaki transfer olan elektron sayısıdır.

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha N_a F} \left( 0,78 + \ln \sqrt{\frac{D_{ox} \alpha N_a F v}{RT}} - \ln k_s \right) \quad (1.29)$$

Burada ise  $k_s$  birinci dereceden yük transfer reaksiyonu için heterojen reaksiyon hız sabiti olup, değişik tarama hızlarında alınan voltamogramlardan elde edilen  $E_p$  nin  $\log v$  ye karşı grafiğinden bulunabilir (Demir 2010).

## 1.12. Kronoamperometri

Karıştırılmayan bir çözeltide, çalışma elektrodun potansiyeli reaksiyon olmadığı bir potansiyelden, reaksiyonun olduğu bir potansiyele aniden değiştirildiğinde çalışma elektrodunda oluşan akımın zaman karşı ölçülmesidir (Şekil 1.29).



Şekil 1.29. a) Kronoamperometrik potansiyel uyarma sinyali, b) konsantrasyon gradientleri ve c) akım zaman eğrisi

Difüzyon ve akı hızı Fick kanunu ile verildiğinden

$$j = D \left[ \frac{\partial C_{x,t}}{\partial X} \right] \quad (1.30)$$

Faraday kanunu ve  $j$ 'nin tanımından aşağıdaki eşitlik çıkarabilir.

$$j = \frac{i}{nFA}, \quad i = nFA \left[ \frac{\partial C_{x,t}}{\partial X} \right] \quad (1.31)$$

Bu denklem elektroliz akım ve konsantrasyon gradiyenti arasındaki ilişkiyi verir. Akım ile zaman arasındaki ilişkiyi bulmak için ise elektrodun geometrisi göz önüne alınır.

Düzlemsel bir elektrot için Fick'in ikinci kanunu çözümlerse aşağıdaki eşitlik elde edilir.

$$\frac{\partial C_{x,t}}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_{x,t}}{\partial x^2} \quad (1.32)$$

Bu denklem özel matematiksel yöntemlerle çözüldüğünde Cottrell denklemini elde edilir:

$$i_t = \frac{nFAD_0^{1/2}C_0}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (1.33)$$

Burada akım direkt olarak konsantrasyon ve elektrot yüzey alanı ile ve zamanın karekökü ile ters orantılıdır. Ancak bu denklem ilk birkaç saniye için ve 30-40 saniyeden sonraki akımlar için geçerli değildir. Çünkü ilk anda Faradik akım değil kapasitif akım baskın olup eğrinin sonunda konveksiyon problem olabilir. Güvenilir bölge aşağıdaki eşitlik ile test edilebilir (Demir 2010).

$$i_t t^{1/2} = \frac{nFAD_0^{1/2}C_0}{\pi^{1/2}} \quad (1.34)$$

Kronoamperometri tekniği kullanılarak,

- Bir maddenin difüzyon katsayısı bulunabilir.
- Elektron aktarım reaksiyonunun hız sabiti hesaplanabilir.
- Elektrot reaksiyonunun mekanizması belirlenebilir.
- Elektron aktarım basamağına eşlik eden bir kimyasal reaksiyonun hız sabiti bulunabilir.
- Elektrotta bir adsorpsiyon olayı meydana gelip gelmediği belirlenebilir (Çekirdek 2005).

### 1.13. Çalışmanın Amacı

Etanol, metanol ve etanol/metanol karışımının tayinine yönelik çeşitli materyallerle modifiye edilmiş, tek kullanımlık, maliyeti düşük, çift amperometrik enzim biyosensörünün geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışmanın amacı üç aşamadan oluşmaktadır:

- Etanol tayini için ADH temelli biyosensörlerin geliştirilmesi
- Metanol tayini için AOx temelli biyosensörlerin geliştirilmesi
- Geliştirilen AOx ve ADH biyosensörlerinin, gerçek numune analizinde ve etanol/metanol karışımının tayininde kullanılması

Geliştirilecek olan alkol biyosensörlerinin etanol ve metanole karşı olan duyarlığına, MWCNT, AuNP nanoparçacıkları, PNR redoks iletken polimeri, ADH ve AOx enzimlerinin etkileri incelenecek ve çift biyosensörün optimum çalışma koşulları belirlenecektir. Optimum koşulları belirlenen ADH ve AOx temelli biyosensörlerle gerçek numunelerdeki etanol analizi ve etanol/metanol karışımının analizi yapılacaktır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

Alkol biyosensörleri ile ilgili literatürde onlarca çalışma vardır. Bu sebeple bu bölümde sadece tek kullanımlık elektrotlarla yapılmış olan amperometrik alkol biyosensörlerini içeren çalışmalara yer verilecektir.

İnsan kan numunelerindeki etanolün tayini için ADH enzimini temel alan birkaç tek kullanımlık amperometrik biyosensör geliştirilmiştir. Luo ve çalışma arkadaşları 2008 yılında iki benzer çalışma yapmışlardır. İlk çalışmada, nafion üzerine adsorbe olmuş meldola mavisi ile modifiye edilmiş tek kullanımlık yüzey baskılı elektrotların üzerine, ADH ve NAD<sup>+</sup> çapraz bağlama yöntemi ile tutuklanmıştır. Meldola mavisi medyatör olarak kullanılmış ve ikinci nesil biyosensör yapılmıştır. Yüzey baskılı elektrotlar ticari olarak satın alınmamış, laboratuarda basılmıştır. Hazırlanan tek kullanımlık alkol biyosensörünün optimum çalışma potansiyeli -0,17 V (SCE'ye karşı) ve optimum pH'sı 8,0 olarak belirlenmiştir. Optimum şartlarda alkol biyosensörünün tayin sınırı  $1,1 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, gözlemlenebilen en yüksek alkol derişimi 5 mmol.L<sup>-1</sup>, K<sub>m</sub> değeri ise 5.8 mmol.L<sup>-1</sup>, olarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik testleri aynı biyosensörle 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> alkol derişiminde ardışık 10 ölçüm yapılarak tespit edilmiş ve bağıl standart sapma % 3,6 olarak hesaplanmıştır. Rasgele seçilen 5 farklı biyosensörle aynı şartlarda yapılan alkol analizinin tekrarlanabilirliği için bulunan bağıl standart sapma ise % 4,3'tür. Biyosensörün saklama stabilitesi için 4<sup>0</sup>C'de 10, 20 ve 30 gün bekletildikten sonra yapılan analizlerde akımın, başlangıç akım değerlerine göre sırasıyla % 3,7, % 5,7 ve % 8,4 azaldığı bulunmuştur. Hazırlanan biyosensör gerçek insan serum örneklerindeki alkol analizinde kullanılmış ve sonuçlar GC'de yapılan analizler ile karşılaştırılmıştır. Her iki analiz ile elde edilen sonuçlar iyi bir korelasyon göstermiştir (Luo vd 2008). İkinci çalışmada ise meldola mavisi yüzey baskılı elektrot yüzeyinde değildir. Elektrodun mürekkebine karıştırılmış ve basılmıştır. Meldola mavisi ile modifiye edilmiş yüzey baskılı elektrotlar ADH/NAD<sup>+</sup>/Nafion/AuNP karışımı ile modifiye edilmiştir. Biyosensörün optimum çalışma potansiyeli, 0,0 V (SCE'ye karşı) ve optimum pH 8,0 olarak bulunmuştur. Optimum şartlarda alkol biyosensörünün tayin sınırı  $1,6 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, gözlemlenebilen en yüksek alkol derişimi 8 mmol.L<sup>-1</sup>, K<sub>m</sub> değeri ise 8.3 mmol.L<sup>-1</sup>, olarak hesaplanmıştır. Biyosensörün doğruluk performansının değerlendirilmesi için aynı biyosensörle 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> alkol derişiminde ardışık 10 ölçüm yapılmıştır ve bağıl standart sapma değerinin % 5,49 olduğu belirlenmiştir. Biyosensörün saklama stabilitesi için 4<sup>0</sup>C'de 10, 20 ve 30 gün bekletildikten sonra yapılan analizlerde akımın, başlangıç akım değerlerine göre sırasıyla % 3,1, % 4,6 ve % 7,7 azaldığı bulunmuştur. Her iki çalışmada da hazırlanan biyosensörler gerçek numunelerdeki alkol analizinde kullanılmış ve sonuçlar GC'de yapılan analizler ile karşılaştırılmıştır. Her iki analiz ile elde edilen sonuçlar iyi bir korelasyon göstermiştir (Luo vd 2008).

Küçük hacimdeki kan numunelerinde etanol tayini için, yüzey baskılı elektrot, nanokompozit film ve ADH kullanılarak tek kullanımlık alkol biyosensörü Zhen vd tarafından 2011 yılında geliştirilmiştir. Bu çalışmada da yüzey baskılı elektrotlar laboratuarda hazırlanmıştır. İlk olarak AuNP-MWCNT-Nafion nanokompozit film, çalışma elektrodunun üzerine modifiye edilmiştir. Sonra medyatör olarak kullanılan meldola mavisi ve ADH/NAD<sup>+</sup>, nanokompozit film üzerine fiziksel adsorpsiyon ile tutuklanmıştır. Son olarak çalışma elektrodunun yüzeyi küçük hacimde (5 µL) numune



analizi için hidrofilik bir membran ile kaplanmıştır. Alkol biyosensörünün optimum çalışma potansiyeli -0,13 V (Ag/AgCl'ye karşı) ve optimum pH 7,5 olarak belirlenmiştir. Optimum şartlarda alkol biyosensörünün tayin sınırı  $5 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, ve doğrusal çalışma aralığı  $2 \times 10^{-4}$  -  $25 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>, K<sub>m</sub> değeri ise 5.3 mmol.L<sup>-1</sup>, olarak bulunmuştur. Biyosensörün 4°C'de 20 ve 30 gün bekletildikten sonra yapılan stabilize testlerinde akımın, başlangıç akım değerlerine göre sırasıyla % 3,6 ve % 5,8 azaldığı gözlenmiştir. Alkol biyosensörünün tekrarlanabilirlik testleri 10 farklı biyosensörle 5,0 mmol.L<sup>-1</sup> alkol derişiminde yapılmış ve varyasyon katsayısı % 4,1 olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen biyosensör gerçek kan numunelerinde alkol analizi için kullanılmış ve sonuçlar GC'de yapılan analizler ile karşılaştırılmıştır. Her iki analiz ile yapılan sonuçlar iyi bir korelasyon göstermiştir (Zhen vd 2011).

İnsan nefesindeki etanolün tayini için geliştirilen ADH enzimini temel alan tek kullanımlık amperometrik biyosensör ile ilgili yapılmış iki çalışma vardır. Bunlardan ilki Park ve çalışma arkadaşlarının 1995 yılında etanol buharının tayini için geliştirdikleri ADH/NAD<sup>+</sup>'yi temel alan tek kullanımlık amperometrik biyosensördür. Yüzey baskılama tekniğini kullanarak esnek poliester substrat üzerine karbon hamurunun baskılanmasıyla elde edilen elektrotlarla alkol biyosensörünü hazırlamışlardır. Biyosensör kullanılmadan önce aktive olması için ilk olarak tampon çözeltiye daldırılmış ve sonrasında analizde kullanılmıştır (Park vd 1995). İkinci çalışma ise 1999 yılında yine Park ve çalışma arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada nefesteki alkol tayinini daha da geliştirmek için ADH/NAD<sup>+</sup>'yi temel alan diferansiyel tip amperometrik biyosensör dizayn edilmiştir. Kullanılan yüzey baskılı elektrotlar iki çalışma elektrodu içermektedir. Çalışma elektrotlarından birisi ADH/NAD<sup>+</sup> ile modifiye edilmiş ve aktiftir, diğeri ise sadece sığır serum albumini ile modifiye edilmiş ve inaktiftir. İnaktif çalışma elektrodunun insanın nefesinde var olan oksitlenebilen türlerin büyük bir kısmının girişimini minimuma indirmesi nedeniyle, aktif ve inaktif çalışma elektrodu arasındaki diferansiyel sinyal, girişim etkisi minimum olan bir sinyaldir. Amperometrik ölçüm öncesi biyosensör, pH 7,4 fosfat tampon çözeltisine daldırılarak ıslatılır ve optimum çalışma potansiyeli olan 0,47 V'da (Ag/AgCl'e karşı) analiz için kullanılır. Geliştirilen biyosensörün insan nefesindeki alkolü 20-800 ppm derişim aralığında tayin edebildiği bildirilmiştir (Park vd 1999).

ADH/NAD<sup>+</sup> enzimi temel alan yüzey baskılı elektrotlarla gerçekleştirilen bir başka çalışma da Wang vd tarafından 1995 yılında yapılmıştır. Rutenyumla disperse edilmiş karbon mürekkebi kullanarak yüzey baskılı film elektrodu hazırlanmıştır. Rutenyumla modifiye edilmiş elektrot yüzeyi, ADH/NAD<sup>+</sup> ile modifiye edilerek düşük potansiyel aralığında (0,0 ile 0,2 V arası) ölçüm sağlayan medyatörsüz amperometrik alkol biyosensörü geliştirilmiştir. Rutenyumun çalışma potansiyelinin azalmasını sağlayıcı etki gösterdiği bildirilmiştir (Wang vd 1995).

AOx enzimini temel alan tek kullanımlık amperometrik biyosensörler de özellikle alkollü içeceklerdeki etanolün tayini için geliştirilmiştir. Boujtita vd 2000 yılında yaptıkları çalışmada birada etanol tayini için kimyasal olarak modifiye edilmiş tek kullanımlık yüzey baskılı elektrotları, AOx ile tutuklanarak amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Laboratuarda hazırlanan yüzey baskılı elektrotlar % 5'lik kobalt ftalosiyanın ile doplanmış ve sonrasında AOx ile kaplanmıştır. Elektrot yüzeyi girişimleri önleme amaçlı, bariyer olarak yarıgeçirgen bir membran ile kaplanmıştır.

Etanolün ölçümü enzimatik tepkime sonucu üretilen hidrojen peroksidin sinyalinin takibini temel almaktadır. Geliştirilen biyosensörün optimum pH'ı 7,2 ve optimum çalışma potansiyeli 0,4 V (Ag/AgCl'ye karşı) olarak bulunmuştur. Optimum şartlarda amperometrik biyosensör bira örneklerindeki etanol tayininde kullanılmıştır (Boujtita vd 2000).

2001 yılında Patel vd farklı kaynaklardan izole ettikleri AOx enzimlerini (*Hanseluna sp.*, *Candida boidinii* ve *Pichia pastoris*'den) tek kullanımlık yüzey baskılı elektrotlara modifiye ederek alkol biyosensörleri hazırlamışlardır. Daha sonra bu amperometrik biyosensörlerin analitiksel performanslarını kıyaslamışlar ve şarap numunelerindeki etanol analizi için kullanmışlardır. Yüzey baskılı elektrotlar laboratuarda basılmış ve AOx enzimleri platin çalışma elektrodu yüzeyine polikarbomilsülfonat hidrojeni kullanılarak tutuklanmıştır. Her üç enzimle hazırlanan biyosensörlerin optimum pH'sı 7,5 olarak belirlenmiştir. *Hanseluna sp.*'den izole edilmiş AOx enzimi ile hazırlanan amperometrik biyosensörün analitiksel performansının en yüksek olduğu bulunmuştur. Biyosensörlerin % 3'den daha az standart sapmaya sahip olduğu, iyi bir tekrarlanabilirlik gösterdiği ve 4°C'de 3 hafta boyunca kararlılığını koruduğu sonucuna varılmıştır. Şarap numunelerindeki etanol analizi ve resmi destilasyon piknometre yöntemi ile yapılan analiz sonuçları karşılaştırıldığında, alkol biyosensörleri ile yapılan analiz sonuçlarının şarap numunelerindeki matris etkisi nedeniyle % 10 hata içerdiği bulunmuştur (Patel vd 2001).

Farklı alkollü içkilerdeki etanol analizi için, farklı medyatörlerle modifiye edilmiş ticari yüzey baskılı elektrotlar ile farklı kaynaklardan elde edilmiş AOx enzimleri (*Hanseluna sp.*, *Candida boidinii* ve *Pichia pastoris*'den) kullanılarak amperometrik biyosensörler hazırlanmış ve analitiksel performansları karşılaştırılmıştır (Costa Rama vd 2012). Ticari yüzey baskılı elektrotlarda var olan medyatörler Prusya mavisi, ferrosiyanür ve kobalt ftalosiyanindir. Prusya mavisi ve ferrosiyanür ile modifiye edilmiş elektrotlara AOx enzimleri, horseradish peroksidaz (HRP) enzimi ile birlikte modifiye edilirken, kobalt ftalosiyanin ile modifiye edilmiş elektrotlarda AOx enzimi tek başına fiziksel adsorpsiyon ile modifiye edilmiştir. Amperometrik ölçümlerde uygulanan çalışma potansiyelleri Prusya mavisi, ferrosiyanür ve kobalt ftalosiyanin ile modifiye edilmiş elektrotlar için sırasıyla, -0,1 V, -0,1V ve 0,4 V'dur. Geliştirilen alkol biyosensörleri içinde en iyi analitiksel performans gösteren elektrot türü, ön işlem basamağı ve HRP enzimi gerektirmediği için, kobalt ftalosiyanin ile modifiye edilmiş elektrot olduğu bulunmuştur. *Hanseluna sp.* AOx enzimi ile hazırlanan biyosensörler ile en iyi sonuçlar elde edilmiştir. *Hanseluna sp.* AOx ve kobalt ftalosiyanin ile geliştirilen alkol biyosensörü en yüksek duyarlılığı (1211 nA.mM<sup>-1</sup>), en düşük tayin sınırı değerini (0,02 mM), en yüksek tekrarlanabilirliği (% 2.1) ve en geniş doğrusal aralığı (0,05-1,0 mM) göstermiştir (Costa Rama vd 2012).

Gouveia-Caridade vd 2008 yılında MWCNT ile modifiye edilmiş yüzey baskılı elektrotlara AOx enzimini çapraz bağlama yöntemi ile modifiye ederek alkol biyosensörü geliştirmişlerdir. Amperometrik alkol biyosensörünün optimum çalışma potansiyeli -0,3 V (SCE'ye karşı) ve optimum pH'sı 7,5 olarak bulunmuştur. MWCNT, biyosensörün hem çalışma potansiyelini azaltmış hem de duyarlılığını artırmıştır. MWCNT ile modifiye edilmiş biyosensörün cevabının, MWCNT ile modifiye edilmeyene göre 20 kat daha hassas olduğu gözlenmiştir. Geliştirilen alkol

biyosensörünün tayin sınırı 86  $\mu\text{M}$ , en yüksek alkol derişimi 1,4 mM ve  $K_m$  değeri ise 2,2 mM olarak hesaplanmıştır (Gouveia-Caridade vd 2008).

2008 yılında Barsan ve Brett, karbon film elektrot ve AOx enzimi ile geliştirdikleri alkol biyosensöründe polinötral kırmızısı redoks medyatörünü kullanmışlardır. Polinötral kırmızısı karbon film elektrot yüzeyine elektropolimerizasyon ile modifiye edilmiştir. AOx enziminin tutuklanması ise çapraz bağlama yöntemi ile yapılmıştır. Geliştirilen biyosensörün optimum pH'sı 7,5 ve optimum çalışma potansiyeli -0,3 V olarak belirlenmiştir. Polinötral kırmızısının elektron akseptörü olarak davrandığı ve redoks medyatörü olduğu, önerdikleri mekanizma ile açıklanmıştır. PNR/AOx biyosensörünün analitiksel performansının belirlenmesi için tekrarlanabilirlik ve kararlılık testleri yapılmıştır. Amperometrik alkol biyosensörünün tayin sınırı 29,7  $\mu\text{M}$  (% 5,2 RSD, n=3), en yüksek alkol derişimi 0,7 mM (% 4,3 RSD), duyarlılığı 171,8  $\text{NA}\cdot\text{mM}^{-1}$  (% 8,6 RSD) ve  $K_m$  değeri 1,96 mM (% 5,7 RSD, n=3) olarak bulunmuştur. Biyosensörün duyarlılığın 6 hafta sonra başlangıç değerinin sadece % 12'si kadar azaldığı kararlılık testlerinden anlaşılmıştır. Geliştirilen alkol biyosensörü kırmızı ve beyaz şarap numunelerinde etanol analizi için kullanılmıştır (Barsan ve Brett 2008).

ADH ve AOx enzimlerini temel alan tek kullanımlık yüzey baskılı elektrotlarla yapılmış amperometrik biyosensörler ile ilgili yukarıda bahsedilen çalışmaların hiçbirinde etanol-metanol karışımının tayini ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Etanol-metanol karışımının tayini ile ilgili literatürde yapılmış sadece bir çalışma vardır. 2008 yılında Bucur ve arkadaşları, ADH ve AOx enzimlerini temel alan çift amperometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Bu çalışmada elektrotlar laboratuarda basılmıştır. ADH enzimi maldola mavisi (MM) medyatörü ile modifiye edilmiş, AOx enzimi ise kobalt ftalosiyanın (Co-PH) medyatörü ile modifiye edilmiş yüzey baskılı elektrotlara, stilbazolyum grupları içeren fotoçapraz bağlanabilen bir polivinil alkol içerisine hapsedilerek tutuklanmıştır. Biyosensörlerin çalışma potansiyelleri ADH/MM bazlı biyosensör için 0,6 V (Ag/AgCl'e karşı), AOx/Co-PH bazlı biyosensör için ise -0,01 V (Ag/AgCl'e karşı) olarak belirlemiştir. Optimum pH her iki enzim için de uygun bir değer olan 8,0 seçilmiştir. ADH/MM bazlı biyosensörün etanol için doğrusal çalışma aralığı 0,3 - 8  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  olarak bulunmuştur. AOx/Co-PH bazlı biyosensörün doğrusal çalışma aralığı metanol için 3 - 70  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , etanol için ise 15 - 110  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  olduğu hesaplanmıştır. Geliştirilen çift alkol biyosensörü gerçek ve sahte alkollü içkilerin alkol analizinde kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar GC analizi sonuçları ile karşılaştırılmış ve iyi bir korelasyon olduğu bulunmuştur (Bucur vd 2008).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Alkol oksidaz (E.C. 1.1.3.13., *Hansenula sp.*'den), alkol dehidrojenaz (E.C. 1.1.1.1., *Saccharomyces cerevisiae*'den),  $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotit ( $\text{NAD}^+$ ),  $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotitin indirgenmiş hali ( $\text{NADH}$ ), glutaraldehit (GA) (% 25'lik a/h) çözeltisi, jelâtin (G), nafion (% 25'lik a/h), koloidal altın nanoparçacık çözeltisi (20 nm) ve hidrojen peroksit (% 35'lik) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Potasyum dihidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), potasyum hidrojen fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), potasyum klorür (KCl), nötral kırmızısı, mutlak etanol, metanol, dimetil formamid (DMF), hidroklorik asit (HCl, % 37'lik), sodyum hidroksit (NaOH) ve sülfürik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  % 98'lik) Merck'ten temin edilmiştir. Karboksil grupları ile modifiye edilmiş çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT-COOH) ise Dropsens firması tarafından sağlanmıştır. Kullanılan tüm kimyasallar yüksek analitik saflıktadır.

##### 3.1.2. Kullanılan cihazlar

Elektrokimyasal ölçümler PalmSens potentiostat yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Spetec Perimax 12 rollers peristaltik pompa ve omfinit manuel numune enjeksiyon vanası akışa enjeksiyon analiz sisteminde kullanılmıştır. 25 °C' de istenilen pH'da tampon çözelti hazırlamak için, standart tampon çözeltilerle kalibre edilmiş Mettler Toledo pH-metre kullanılmıştır. Batch şartlarda amperometrik tayin sırasında çözeltiyi istenilen hızda karıştırmak için Hanna manyetik karıştırıcı kullanılmıştır. Katı kimyasalların tartımı için Precia XR 2055M-DR 0,01 mg duyarlı elektronik terazi kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan ultra saf su Millipore Milli-Q Direct Q-3 ultra saf su cihazından elde edilmiştir.

##### 3.1.2.1. Elektrokimyasal ölçüm sistemi

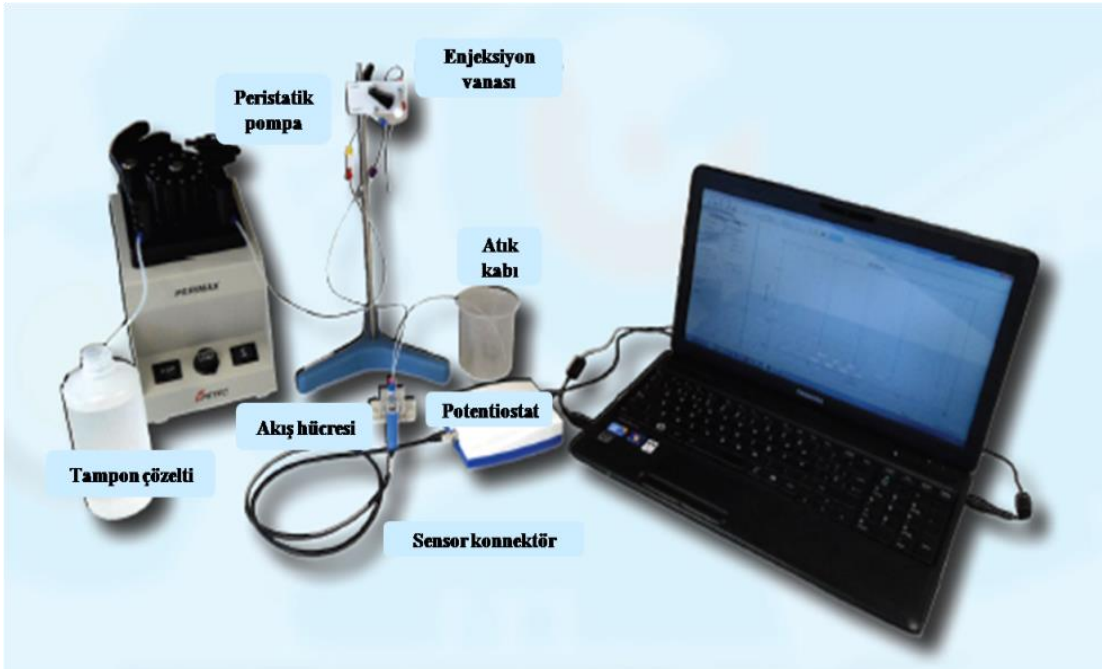
Deneylerde voltametri, kromoamperometri gibi çeşitli elektrokimyasal metotların çalışılabildiği PalmSens (Şekil 3.1) elektrokimyasal ölçüm sistemi kullanılmıştır. Bu cihaz özellikle biyosensör sistemlerinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Bilgisayar kontrollü olan PalmSens cihazının sinyalleri PStace 4.2 yazılımı ile değerlendirilmiştir. Deney verileri grafik şeklinde görülebildiği gibi, PStace 4.2 yazılımı ile üst üste çakıştırılarak karşılaştırmalı çalışmalar yapılabilmektedir. Elektronik ortamda dosyalar olarak kaydedilen veriler istenildiği zaman tekrar görülebilmektedir.



Şekil 3.1. PalmSens potentiostat

### 3.1.2.2. Akışa enjeksiyon analiz sistemi

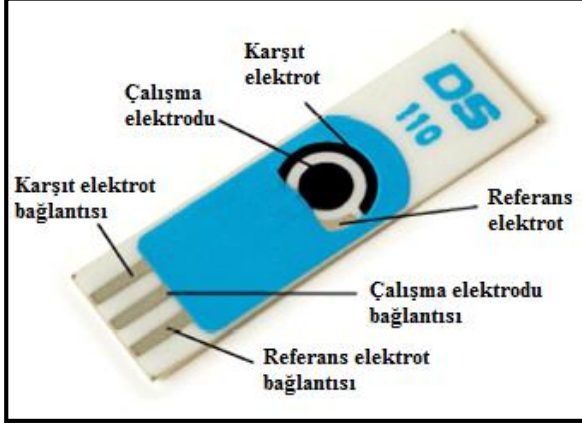
Akışa enjeksiyon analiz (AEA) sistemi, Spetec Perimax 12 rollers peristaltik pompa, omfinit manuel numune enjeksiyon vanası, DropSens akış hücresi, potentiostat, bilgisayar, tampon çözelti kabı ve atık kabından oluşmaktadır (Şekil 3.2). Peristaltik pompa ve farklı iç çaplarına sahip hortum çeşitleriyle, tampon çözeltinin akış hızı  $0,0015 - 20 \text{ mL.dakika}^{-1}$  değerleri arasında ayarlanabilmektedir. Manuel vananın numune döngüsü 0,5, 1,0 ve 2,5 mL olmak üzere üç farklı sabit hacimdedir.



Şekil 3.2. Akışa enjeksiyon analiz sistemi

### 3.1.3. Kullanılan elektrotlar, hücreler ve konnektörler

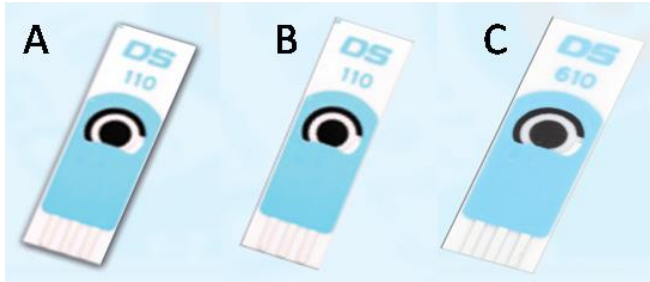
DropSens firmasından temin edilmiş üç farklı türde tek kullanımlık yüzey baskılı elektrotlar kullanılmıştır. Yüzey baskılı elektrotların genel yapısı Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Yüzey baskılı elektrotların genel yapısı

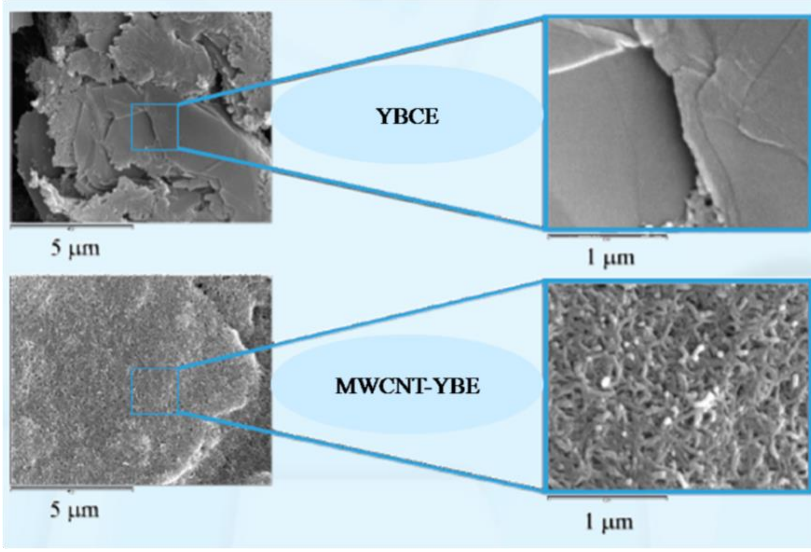
Çalışılan yüzey baskılı elektrotların türleri ve özellikleri şöyledir (Şekil 3.4):

- Yüzey baskılı karbon elektrot (YBCE): (Çalışma elektrodu: C (4 mm), Yardımcı elektrot: C, Referans elektrot: Ag / AgCl (0,1 M KCl)).
- Karboksil fonksiyonlu çok duvarlı karbon nanotüp ile modifiye edilmiş yüzey baskılı karbon elektrot (MWCNT-YBE): (Çalışma elektrodu: MWCNT-COOH / C (4 mm), Yardımcı elektrot: C, Referans elektrot: Ag / AgCl (0,1 M KCl)).
- Meldola Mavisi ile modifiye edilmiş yüzey baskılı karbon elektrot (MM-YBE): (Çalışma elektrodu: MM / C (4 mm), Yardımcı elektrot: C, Referans elektrot: Ag / AgCl (0,1 M KCl)).



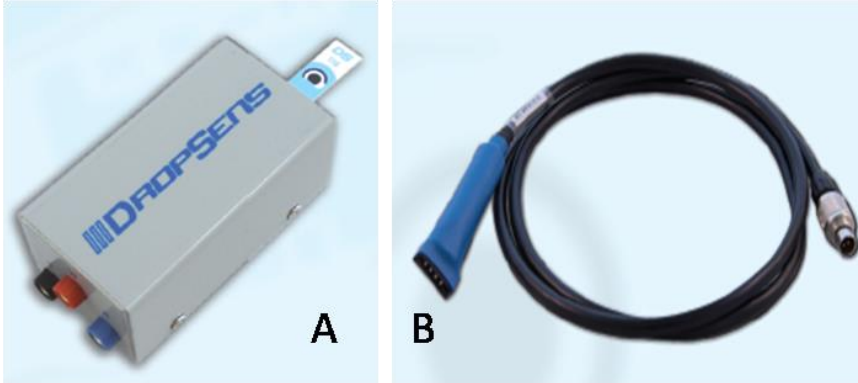
Şekil 3.4. Yüzey baskılı elektrot türleri A) YBCE B) MWCNT-YBE C) MM-YBE

Şekil 3.5'te DropSens YBCE ve MWCNT-YBE elektrotlarının broşürlerinde yer alan SEM fotoğrafları görülmektedir. MWCNT-YBE'ye ait SEM fotoğraflarından elektrot yüzeyindeki MWCNT'lerin varlığı ve homojen olarak modifiye edildiği görülmektedir.



Şekil 3.5. YBCE ve MWCNT-YBE elektrotlarının SEM fotoğrafları

Elektrotların PalmSens potentiostata bağlantısı DropSens'ten temin edilmiş konnektörler ile sağlanmıştır. Sensör konnektörleri akışa enjeksiyon analiz sistemi ve damlamalı analizler için farklı (Şekil 3.6) olarak tasarlanmıştır. Batch analizlerde her iki konnektör de kullanılabilir.



Şekil 3.6. Yüzeysel elektrotlar için sensör konnektör çeşitleri A) Damlamalı analizler için kutu şeklinde B) Akışa enjeksiyon analiz için kablo şeklinde

Elektrokimyasal ölçümlerde, akışa enjeksiyon ve kesikli analiz için farklı elektrokimyasal hücreler kullanılmıştır (Şekil 3.7). Her iki hücre de metil metakrilattan yapılmıştır. Kesikli analizde kullanılan hücre 5-8 mL gibi büyük hacimli çözeltiler ve karıştırma şartları için uygundur.



Şekil 3.7. Yüze baskılı elektrotlar için elektrokimyasal hücre çeşitleri A) kesikli analiz için hücre B) Akışa enjeksiyon analiz için akış hücresi

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Elektrot yüzeyinin temizlenmesi ve aktivasyonu

Yüze baskılı karbon elektrotların (YBE) üretiminde, mürekkepteki yüksek miktardaki polimer, heterojen reaksiyonun ve yarı-tersinir veya tersinmez redoks prosesinin kinetiğinin yavaşlamasına neden olur. Dolayısıyla, YBCE'lerin optimum elektrokimyasal performansı için ılımlı elektrokimyasal aktivasyonu gereklidir (Nassef vd 2008). Elektrotların yüzeylerinin temizlenmesi ve aktivasyonu, elektrokimyasal ölçümlerde akımın artmasına, sinyal/gürültü oranının azalmasına yol açar, tersinmez reaksiyonların azalmasını sağlar. Elektrot yüzeyinin aktivasyonu için birkaç farklı yöntem vardır; yüzey temizleme, lazerle aktivasyon, elektrokimyasal ön işlem (McCreey 2008). Elektrot yüzeyinin temizlenmesi ve aktivasyonu için, YBCE ve MWCNT-YBE'lere farklı işlemler uygulanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Elektrot yüzeyinin temizlenmesi ve aktivasyonu için YBE ve MWCNT YBE'lere uygulanan işlemler

İşlem 1	0,1M pH 8 fosfat tamponu içerisinde 50 mV.s <sup>-1</sup> tarama hızında - 0,5 ile + 0,7 V potansiyel aralığında 3 kez döngüsel voltametri
İşlem 2	0,1M pH 8 fosfat tamponu içerisinde + 1,4V'de 300 s boyunca potansiyel uygulanarak elektrokimyasal ön işlem
İşlem 3	1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> içerisinde 100 mV.s <sup>-1</sup> tarama hızında - 0,5 ile + 1,0 V potansiyel aralığında 8 kez döngüsel voltametri
İşlem 4	0,05M HNO <sub>3</sub> içerisinde 50 mV.s <sup>-1</sup> tarama hızında -0,5 ile + 1,0 V potansiyel aralığında 8 kez döngüsel voltametri

MWCNT-YBE'ye tüm işlemler uygulanırken, YBCE'lere işlem 1, 2 ve 3 uygulanmıştır. Uygulanan işlemlerden hangisinin etkili olduğunun anlaşılabilmesi için elektrotlara 1 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> içerisinde 50 mV.s<sup>-1</sup> tarama hızında + 0,5 ile - 0,7 V potansiyel aralığında 3 kez döngüsel voltametri uygulanarak karakterizasyonu yapılmıştır.

Döngüsel voltametri sonuçlarının değerlendirilmesinde, voltamogramlardan elde edilen anodik pik akımı (I<sub>pa</sub>) ve katodik pik akımı (I<sub>pc</sub>) arasındaki oran (I<sub>pa</sub> /I<sub>pc</sub>) ile



anodik pik potansiyeli ( $E_{pa}$ ) ve katodik pik potansiyeli ( $E_{pc}$ ) arasındaki fark ( $\Delta E_p$ ) verilerinden yararlanılır.  $I_{pa}/I_{pc} = 1$  olmalıdır.  $I_{pa}/I_{pc}$  değerinin 1'den uzaklaşması homojen kinetik tepkimelerin ya da elektrot işleminde komplikasyonların işaretidir.  $\Delta E_p$  değeri ise çok iyi bir tanımlayıcı kriterdir. Elektron transferi hızlı olduğunda, tersinir elektrot reaksiyonunu belirtir ve  $\Delta E_p$  değeri 59 mV/n'ye eşit olur (Scholz 2010).

Kullanılmadan önce YBCE ve MWCNT-YBE elektrotlarına, belirlenen optimum yüzey temizleme ve aktivasyon işlemleri uygulanmış, ultra saf su ile yıkanmış ve yüksek saflıktaki  $N_2$  gazı ile kurutulmuştur.

### 3.2.2. Destek elektrolit tampon çözeltisinin hazırlanması

Deneylerde destek elektrolit olarak 0,1 M KCl içinde,  $KH_2PO_4$  ve  $K_2HPO_4$  kullanılarak hazırlanan 50 mM fosfat tamponu kullanılmıştır. Destek elektrolit hazırlanırken üzerine 1 M NaOH veya 1 M HCl ilave edilerek pH ayarlaması yapılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm çözeltiler fosfat tampon sistemi içerisinde hazırlanmıştır.

### 3.2.3. YBE'lerin MWCNT-COOH ile modifikasyonu

MWCNT-YBE elektrotlarında MWCNT-COOH, çalışma elektrodu (ÇE) yüzeyine basılmıştır. MWCNT-COOH'nin ÇE yüzeyine sonradan modifiye edilmesi durumunda mı, yoksa ÇE yüzeyine basılmış durumda mı daha etkili olduğunu incelemek için, YBE'ler MWCNT-COOH ile modifiye edilmiştir. Bu amaçla, 1mg MWCNT-COOH ve 1mL DMF:H<sub>2</sub>O (1:1) karışımına 3 saatlik sonikatör uygulamasıyla kararlı ve homojen bir süspansiyon hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışımdan YBE'lerin ÇE yüzeyine her bir tabaka için 4  $\mu$ L damlatılmıştır (Fanjul-Bolado vd 2007, Lamas-Ardisana vd 2008). Karanlıkta, kapalı ortamda kuruyuncaya kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra ultra saf su içerisinde 30 s boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak temizlenmiş ve yüksek saflıktaki  $N_2$  gazı ile kurutulmuştur.

### 3.2.4. YBE'lerin AuNP ile modifikasyonu

YBE'lerin ÇE yüzeyine koloidal altın nanoparçacık çözeltisinden (AuNP) (20 nm) 20  $\mu$ L damlatılmıştır. İlk önce MWCNT-COOH ile modifiye edilen elektrotların ÇE yüzeyine damlatılan AuNP hacmi her bir tabaka için 5  $\mu$ L'dir. Karanlıkta, kapalı ortamda kuruyuncaya kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir (Serafin vd 2011). Daha sonra ultra saf su içerisinde 30 s boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak temizlenmiş ve yüksek saflıktaki  $N_2$  gazı ile kurutulmuştur.

### 3.2.5. YBE üzerinde PNR'nin hazırlanması

0,1 M  $KNO_3$  içeren 0,025 M pH 5,5 fosfat tamponu içerisinde 1,0 mM monomer nötral kırmızı çözeltisi hazırlanmıştır. Döngüsel voltammetri uygulanarak YBE üzerinde nötral kırmızının elektropolimerizasyonu, dolayısıyla da PNR oluşumu sağlanmıştır. Döngüsel voltammetri, - 0,9V ile + 0,9 V potansiyel aralığında 50 mV.s<sup>-1</sup> tarama hızında 15 döngü uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Barsan ve Brett 2008). YBE'ler ultra saf su ile yıkandıktan sonra yüksek saflıktaki  $N_2$  gazı ile kurutulmuştur.

Elektrot formülasyonunda nanopartikül (MWCNT-COOH veya AuNP) bulunması tasarlandığında, YBE yüzeyleri önce nanopartikül ile sonra PNR ile modifiye edilmiştir.

### **3.2.6. AOx temelli biyosensörlerin hazırlanması**

#### **3.2.6.1. Jelâtin ile tutuklama**

- Uygun aktiviteye sahip AOx enzimi ve 1 mg jelâtin tartılmıştır. 10 µL 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, jelâtin ve uygun aktivitedeki enzim üzerine mikro pipetle aktarılmış ve çözünmesi için 38 °C'lik su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir.
- AOx-jelâtin karışımının 5 µL'si YBCE'nin çalışma elektrodu üzerine (ÇE) damlatılmıştır. Hazırlanan biyosensör 1 saat +4 °C'de sabit nem ortamında bekletilmiştir.
- Bir saat sonunda %1'lik GA çözeltisinden 1 µL ÇE üzerine damlatılmış ve biyosensör +4 °C'de sabit nem ortamında bekletilmiştir.

### **3.2.7. ADH temelli biyosensörlerin hazırlanması**

#### **3.2.7.1. Glutaraldehit ile tutuklama**

- Uygun aktivitedeki enzim üzerine, 10 µL 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu mikro pipetle aktarılmıştır.
- Bu enzim çözeltisinin 5 µL'si YBE'lerin ÇE'si üzerine damlatılmıştır. Böylece hazırlanan biyosensörler 1 saat +4 °C'de sabit nem ortamında bekletilmiştir.
- %1'lik GA çözeltisinden bir önceki işlemde hazırlanan biyosensörün ÇE üzerine 1 µL damlatılmıştır. Biyosensörler +4 °C'de sabit nem ortamında stabilizasyon işleminin tamamlanması için bir gece bekletilmiştir.

### **3.2.8. Elektrokimyasal ölçümler**

Kesikli analiz 8 mL fosfat tamponu içeren hücre içerisinde yapılmıştır. Kronoamperometrik ölçümler karıştırma şartları altında yapılmıştır. Amperometrik tayinde sabit akım elde edildiğinde analit ilavesi yapılmış ve ölçülen akım potantostat tarafından kaydedilmiştir.

Akışa enjeksiyon analiz, akış hücresi içerisine yüzey baskılı elektrotun yerleştirilmesi ve hücrenin içerisinden akış hızı peristaltik pompa ile 0,5 mL/dk'ya ayarlanmış olan tampon çözeltinin geçirilmesi ile çalışan sistemde gerçekleştirilmiştir. Manuel vanaya enjekte edilen analitin hacmi 0,5 mL'dir.

Damlamalı analiz ise, elektrot yüzeyine 50 µL analit ilavesi ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.9. ADH temelli biyosensörlerin ölçüm prensibi

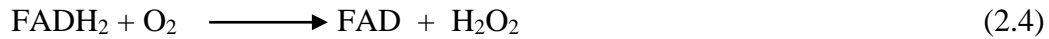
Etanol tayinine yönelik olarak geliştirilmek istenilen ADH temelli biyosensörün ölçüm prensibi NADH'nin yükseltgenmesinin takibine dayanmaktadır ve herhangi bir medyatör kullanılmamıştır. Etanol derişimi arttıkça NADH miktarı da artacaktır.



Amperometrik ölçümler Ag/AgCl'ye (0,1 M KCl, yalancı referans elektrot) karşı +0,2 V potansiyelde kesikli analiz ile yapılmıştır. 7 mL 50 mM pH 7,75 fosfat tamponu ve 1 mL 7 mM NAD<sup>+</sup> çözeltisi elektrokimyasal hücreye transfer edilmiştir. Akım kararlı hale geldikten sonra belirli derişimdeki etanol ardışık olarak katılmıştır.

### 3.2.10. AOx temelli biyosensörlerin ölçüm prensibi

Metanol tayinine yönelik geliştirilmek istenen AOx temelli biyosensörün ölçüm prensibi oksijenin amperometrik olarak takibine dayanmaktadır. Alkol derişimi arttıkça, reaksiyona giren oksijen miktarı da artacak ve daha fazla oksijen tüketilecektir. Çözeltide bulunan oksijen ise aşağıdaki reaksiyona göre katotta indirgenecektir.



PNR medyatörü varlığında AOx temelli biyosensörlerin ölçüm prensibi ise, PNR'nin yükseltgenmesinin amperometrik olarak takibine dayanmaktadır. Alkolün enzimatik reaksiyonunda yükseltgenmiş haldeki PNR, indirgenen FADH<sub>2</sub>'yi tekrar FAD'ye yükseltirken, kendisi indirgenir. İndirgenmiş PNR'nin elektrot yüzeyinde yeniden yükseltgenmesi ile açığa çıkan elektronlar elektroda transfer edilir. Alkol miktarı arttıkça anotta daha fazla PNRH<sub>2</sub> yükseltgenecektir.



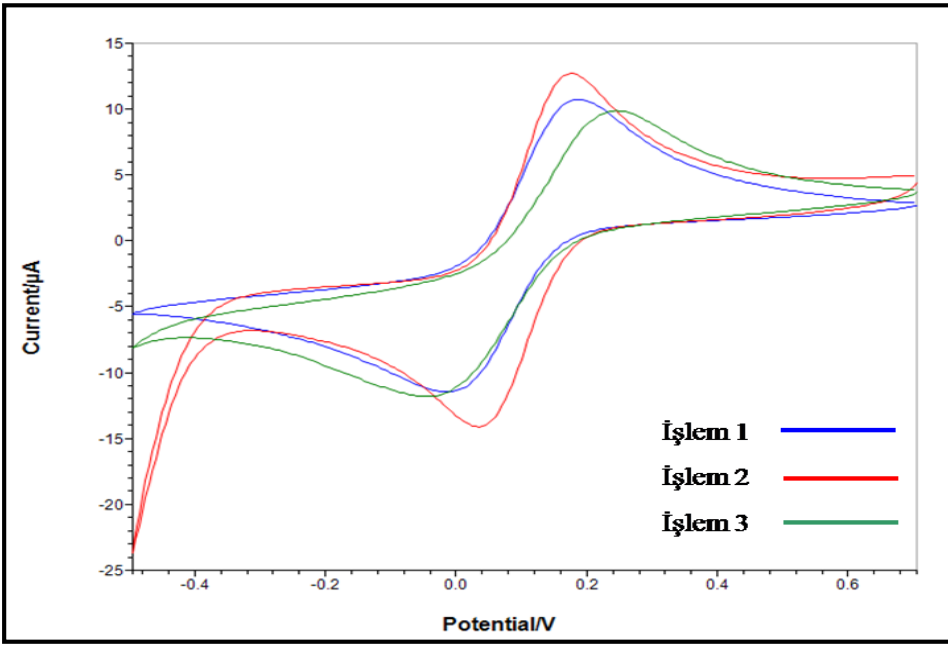
AOx biyosensörleri için amperometrik ölçümler Ag/AgCl'ye (0,1 M KCl, yalancı referans elektrot) karşı medyatör yokken -0,45 V, PNR medyatörü varlığında -0,30 V potansiyelde akışa enjeksiyon analiz ile yapılmıştır. Belirli derişimdeki metanol

belirli aralıklarla akıŖa enjeksiyon sistemine enjekte edilmiŖtir. Voltametrik ölçümler ise kesikli analiz ile yapılmıŖtır.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

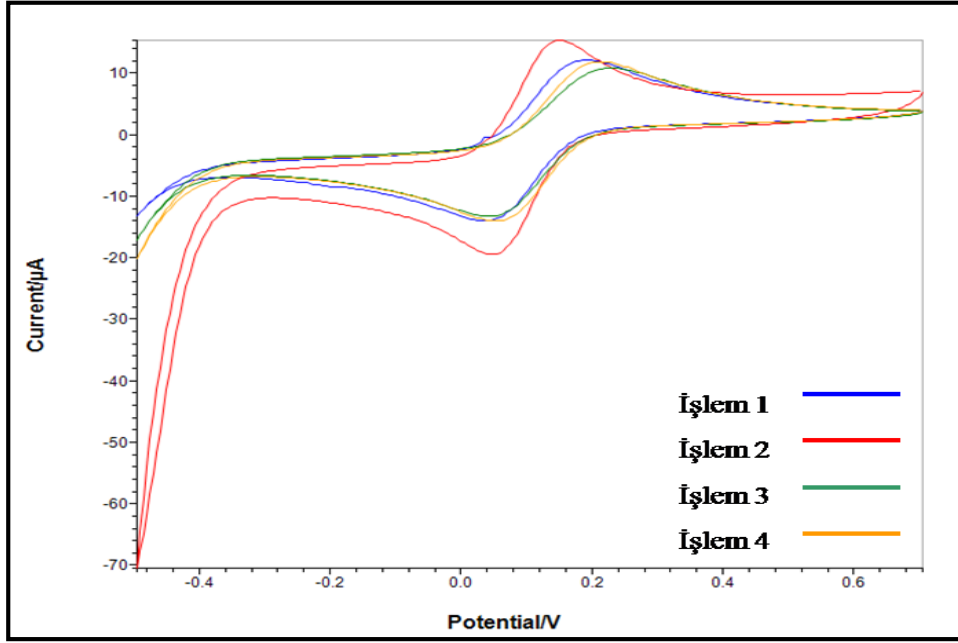
### 4.1. Elektrodun Temizlenme ve Aktivasyonu İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi

YBCE ve MWCNT-YBE elektrotlarının yüzeyinin temizlenmesi ve aktivasyonu için Çizelge 3.1’de verilen işlemler uygulanmış ve karakterizasyonu için 1 mM  $K_3Fe(CN)_6$  içerisinde  $50\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  tarama hızında + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında döngüsel voltametri uygulanmıştır (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Döngüsel voltamogramlardan yararlanılarak YBCE ve MWCNT-YBE için anodik ve katodik pik potansiyellerinin oranı ( $I_{pa}/I_{pc}$ ) ve anodik ve katodik pik potansiyelleri arasındaki fark ( $\Delta E_p$ ) verileri bulunmuş ve Çizelge 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. YBCE’ler için her bir işlem sonrası 1mM  $K_3Fe(CN)_6$  içerisinde  $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  tarama hızında + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramlar

Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’deki voltamogramlardan, İşlem 2’nin yani 300 s boyunca +1,4 V potansiyel uygulamanın (elektrokimyasal ön işlem) her iki elektrot türü için de pik akımını artırdığı görülmektedir. Çizelge 4.1 incelendiğinde en düşük  $\Delta E_p$ , 1’e yakın  $I_{pa}/I_{pc}$  değerleri ve en yüksek anodik ve katodik pik akımları, İşlem 2 uygulandığında elde edilmektedir.  $\Delta E_p$  değerinin düşük olması elektron transferinin hızlı olduğunu gösteren bir kriterdir. Bu sonuçlardan yararlanılarak YBCE ve MWCNT-YBE’lerin kullanılmadan önce temizlenmesi ve aktivasyonu için İşlem 2 yani elektrokimyasal ön işlem uygulanmıştır.



Şekil 4.2. MWCNT-YBE'ler için her bir işlem sonrası 1mM  $K_3Fe(CN)_6$  içerisinde  $50 \text{ mV.s}^{-1}$  tarama hızında + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramlar

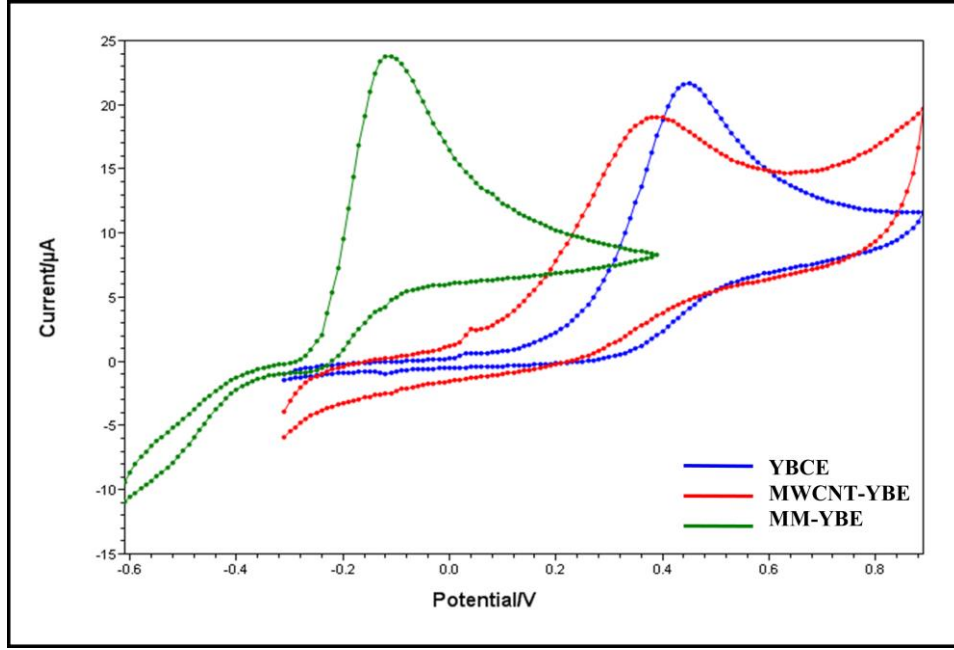
Çizelge 4.1. YBCE ve MWCNT-YBE'lerin yüzey aktivasyonu ve karakterizasyonu sonrası voltamogramlardan elde edilen  $I_{pa}/I_{pc}$  ve  $\Delta E$  değerleri

	İşlem 1		İşlem 2		İşlem 3		İşlem 4	
	$\Delta E_p$ (mV)	$I_{pa}/I_{pc}$	$\Delta E_p$ (mV)	$I_{pa}/I_{pc}$	$\Delta E_p$ (mV)	$I_{pa}/I_{pc}$	$\Delta E_p$ (mV)	$I_{pa}/I_{pc}$
YBCE	229	0,93	131	0,91	267	0,85	-	-
MWCNT-YBE	149	0,85	104	0,86	184	0,82	168	0,82

#### 4.2. NADH'nin Yükseltgenmesinin Takibi İçin Uygun Elektrot Türü ve Formülasyonunun Belirlenmesi

NADH'nin yükseltgenmesinin takibinde elektrot türünün etkisini incelemek için YBCE, MWCNT-YBE ve MM-YBE yalın elektrotlarının 1 mM NADH içindeki döngüsel voltamogramları alınmış ve Şekil 4.3'de verilmiştir. MM-YBE elektrodunun maddela mavisi medyatörünü içermesi sebebiyle NADH'nin yükseltgenme potansiyelini önemli ölçüde düşürdüğü Şekil 4.3'deki voltamogramlardan anlaşılmaktadır. Karbon bazlı elektrotlarda (GC için 0,7 V) NADH'nin yükseltgenme potansiyeli +0,6 V ve daha yüksek potansiyelerde gözlenmektedir (Wooten ve Gorski 2010). NADH'nin yükseltgenme piki YBCE ve MWCNT-YBE elektrotlarında sırasıyla yaklaşık +0,44 ve +0,36 V potansiyelde gözlenmiştir. NADH'nin yükseltgenme pikinin YBCE ve MWCNT-YBE elektrotlarında, karbon bazlı elektrotlara göre, daha düşük potansiyelde

gözlenmesinin nedeni, bu elektrotlara uygulanan elektrokimyasal ön işlemdir. Elektrokimyasal ön işlem ile YBCE ve MWCNT yüzeyinde oksijen içeren gruplar oluşmakta ve oksijen içeren bu gruplar uyarılmaktadır. NADH'nin elektroyükseltgenmesine oksijen içeren grupların etkisinin büyük olduğu ve elektron transferini kuvvetlendirdiği Pumera tarafından bildirilmiştir (Pumera 2012). YBCE'ye uygulanan elektrokimyasal ön işlemle, kenar uç karbonil grupları oluşmakta ve NADH'nin yükseltgenmesine karşı MWCNT gibi elektrokatalitik etki göstermektedir. Tek kullanımlık YBCE'lere elektrokimyasal ön işlem uygulanmasıyla kenar uç karbonil gruplarının ortaya çıktığı, kenar uç grafit veya CNT ile modifiye edilmiş elektrotlarla benzer hareket ettiği literatürde yer almaktadır (Liu vd 2010, He vd 2010). MWCNT-YBE'nin YBCE elektroduna göre yükseltgenme potansiyelini biraz düşürmesinin bir nedeni yapısında MWCNT nanoparçacıklarını içermesidir. MWCNT nanoparçacıkları, NADH'nin yükseltgenmesine karşı elektrokatalitik özellik göstermektedir (Agui vd 2008). MWCNT'nin yapısındaki kenar uç alanlarının ve kusurlu yapılarının varlığı nedeniyle temel NADH yükseltgenme piki, difüzyon kontrollü proses üzerinden yürümüş, tek bir pik gözlenmiş ve pik potansiyeli azalmıştır. MM-YBE ve YBCE elektrotlarında da gözlenen tek pikin varlığı, difüzyon kontrollü proses üzerinden yürüdüğünü belirtmektedir. Elektrot yüzeylerinde adsorplanmış türler bulunmamaktadır. MWCNT-YBE'ye uygulanan elektrokimyasal ön işlem ile MWCNT'nin yapısındaki kusurlu yapılar da uyarılmaktadır. MWCNT-YBE'nin YBCE elektroduna göre yükseltgenme potansiyelini biraz düşürmesinin diğer bir nedeni ise elektronik basamaklarındaki aktif kenar uç alanlarındaki yoğunluklarının daha fazla olmasıdır (Pumera 2012). MWCNT-YBE elektrodundaki MWCNT'nin karboksil grupları ve kullanılmadan önce MWCNT-YBE'lere elektrokimyasal ön işlem uygulanması sonucu oluşan oksijen içeren diğer fonksiyonel grupların (epoksi/eter, karbonil ve hidroksil/alkoksit grupları) varlığı ile elektrot yüzeyinde kinon türlerinin oluşabildiği literatürde yer almaktadır (Zhang vd 2011, Zu vd 2007, Yang ve Liu 2009). Elektrokimyasal ön işlem uygulanmasıyla YBCE yüzeyinde oluşan oksijen içeren grupların ve kenar uç karbonil gruplarının varlığı ile YBCE yüzeyinde de kinon türleri oluşmuştur. Kinon türleri, NADH'nin enzimatik reaksiyonunda redoks medyatörü olarak hareket etmekte ve hızlı elektron transfer kinetiği sağlamaktadır. YBCE ve MWCNT-YBE elektrotlarında NADH'nin yükseltgenmesindeki medyatörlü prosesin mekânmasına göre, yüzey kinon (Q) türleri NADH'deki hidrür iyonunu kabul eder ve elektronların delokalizasyonunu kolaylaştırır (Banks vd 2005, Wooten ve Gorski 2010, Zhang vd 2011). Böylelikle NADH'nin yükseltgenme potansiyeli YBCE ve MWCNT-YBE'de karbon bazlı elektrotlara göre oldukça azalmış ve NADH'ye karşı elektrokatalitik etki göstermiştir. MWCNT-YBE'deki kusurlu yapıların varlığı ise potansiyelin daha da düşmesine neden olmuştur.

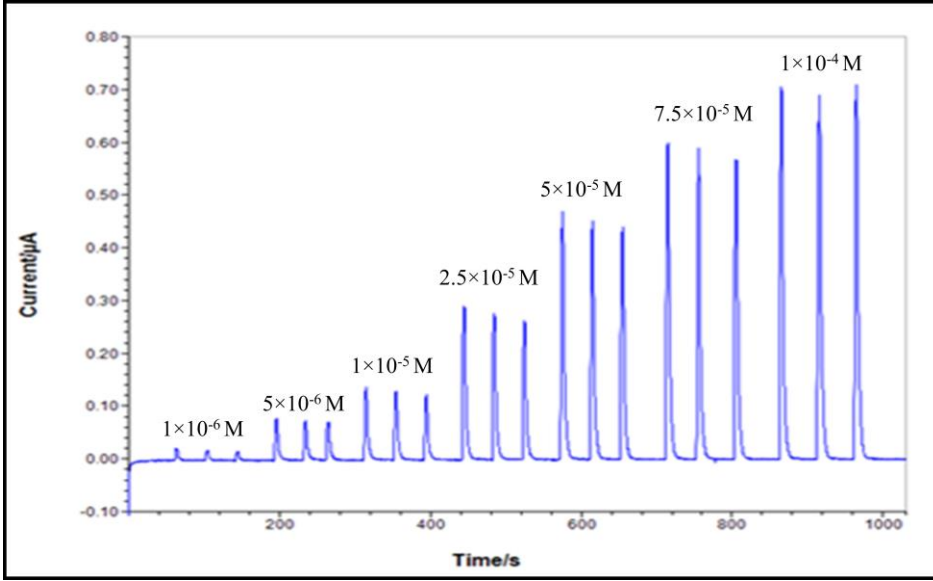


Şekil 4.3. 1 mM NADH çözeltisinin YBCE, MWCNT-YBE ve MM-YBE yalın elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl)

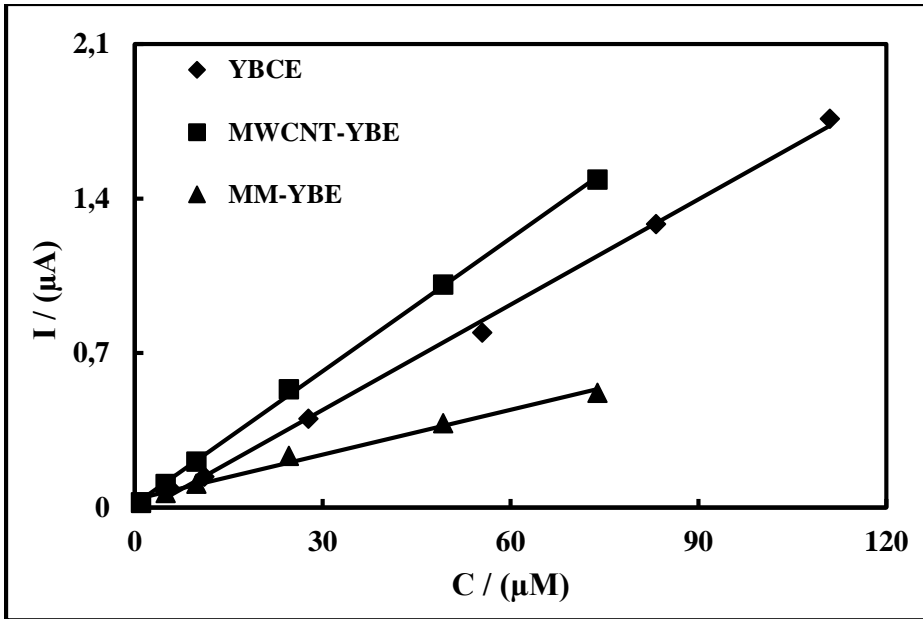
YBCE ve MWCNT-YBE elektrotlarında NADH'nin yükseltgenmesi ECE (elektrokimyasal-kimyasal-elektrokimyasal) mekanizmasına göre yürümektedir. İlk basamakta NADH,  $\text{NAD}\cdot^+$  katyon radikali üretmek için bir elektron kaybederek tersinmez olarak yükseltgenir. İkinci basamak birinci dereceden deprotonlama reaksiyonudur. Bu basamakta,  $\text{NAD}\cdot^+$  radikalinden proton ayrılmasıyla tersinmez olarak nötral  $\text{NAD}\cdot$  radikali üretilir. Üçüncü basamak, ikinci heterojen elektron transfer reaksiyonudur ve tersinirdir. Bu basamakta ise  $\text{NAD}\cdot$  nötral radikali pozitif potansiyelde elektrot yüzeyinde hemen  $\text{NAD}^{++}$ 'ya yükseltgenir. NADH'nin yükseltgenmesi için elde edilen döngüsel voltamogramlarda gözlenen tersinmezliğin nedeni, NADH'nin yükseltgenmesinde birinci basamakta gerçekleşen elektrokimyasal reaksiyonda, elektron transferinin tersinmez olması ve hızı belirleyici basamak olmasıdır (Moiroux ve Elving, 1980, Banks vd 2005). MM-YBE elektrodunda NADH'nin yükseltgenmesi, MM medyatörünün NADH'deki hidrür iyonunu kabul etmesi üzerinden yürüyen CE (kimyasal-elektrokimyasal) mekanizmasıdır. MM'nin yapısındaki aromatik halka ise elektronların delokalizasyonunu kolaylaştırmaktadır (Wooten ve Gorski, 2010).

NADH'nin elektroyükseltgenmesinde elektrot türünün etkisini belirlemek için YBCE, MWCNT-YBE ve MM-YBE elektrotları kullanılarak NADH'nin amperometrik tayinleri akışa enjeksiyon analizi ile yapılmıştır. Fanjul-Bolado vd 2008 yılında YBCE ve MWCNT-COOH ile modifiye ettikleri YBCE'lerle NADH'nin amperometrik tayinini akışa enjeksiyon analiz sistemi ile + 0,45 V'da gerçekleştirmişlerdir (Fanjul-Bolado vd 2008). Şekil 4.3'deki döngüsel voltamogramlardan ve literatür bilgilerinden yararlanılarak NADH'nin amperometrik tayinlerinde uygulama potansiyelleri YBCE ve MWCNT-YBE'ler için + 0,45 V, MM-YBE için ise + 0,1 V olarak belirlenmiştir. Şekil 4.4'de örnek olarak MM-YBE kullanıldığında elde edilen kronoamperogram verilmiştir.





Şekil 4.4. MM-YBE ile NADH'nin akışa enjeksiyon analiz ile amperometrik tayininde elde edilen kronoamperogram (100 mM pH 7,5 fosfat tamponu, 0,1M KCl, + 0,1 V)



Şekil 4.5. YBCE, MWCNT-YBE ve MM-YBE ile NADH'nin amperometrik tayini sonrasında elde edilen akım-derişim grafikleri (100 mM pH 7,5 fosfat tamponu, 0,1M KCl)

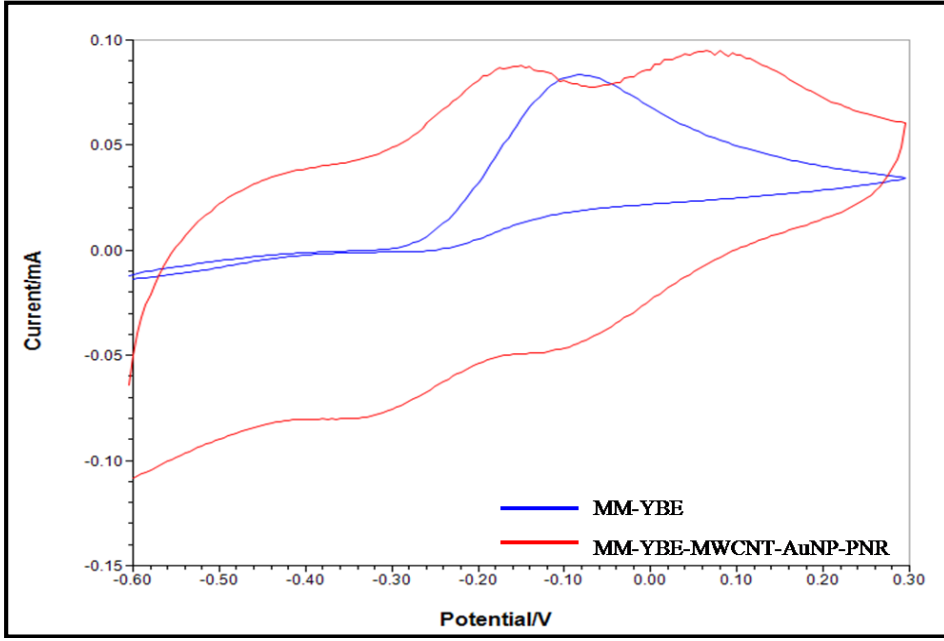
YBCE, MWCNT-YBE ve MM-YBE kullanılarak yapılan NADH analizi sonrasında, her bir derişimde ölçülen üç akımın ortalamasının NADH derişimine karşı çizilen grafikleri şekil 4.5'de verilmiştir. Grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Şekil 4.5’de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri

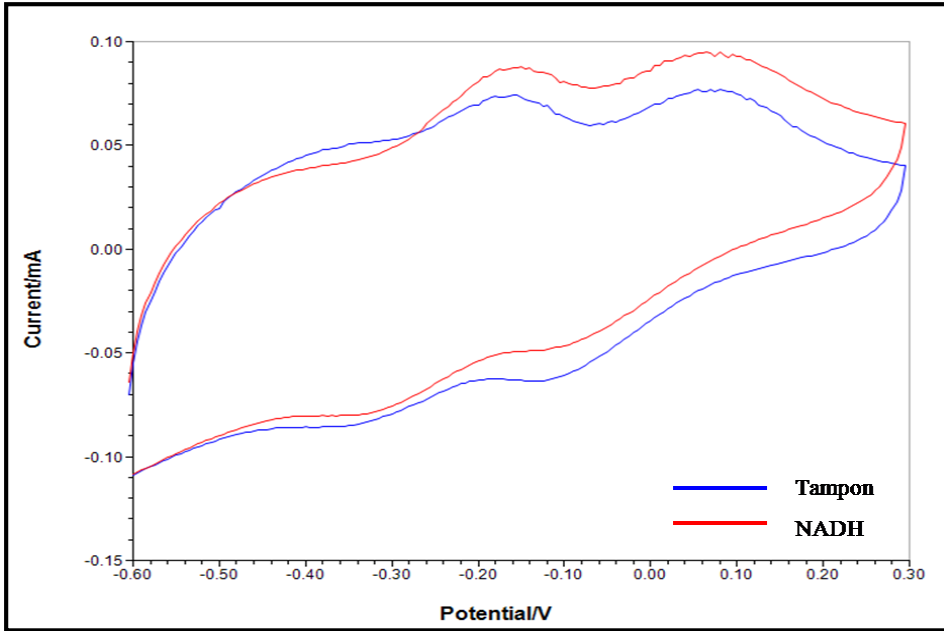
Elektrot türü	Duyarlık	Korelasyon katsayısı
YBCE	15,91 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,999
MWCNT-YBE	20,08 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,999
MM-YBE	6,58 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,995

NADH’nin amperometrik tayininde ölçüm duyarlığının en yüksek olduğu elektrot türünün MWCNT-YBE olduğu Çizelge 4.2’den anlaşılmaktadır. Amperometrik çalışma potansiyeli YBCE ve MWCNT-YBE’ler için + 0,45 V iken, MM-YBE için + 0,10 V’dur. Bunun nedeni de MM-YBE’de meldola mavisi medyatörünün kullanılmasıdır. Çalışma potansiyelinin düşük olması girişim yapabilecek türlerin etkisini azaltması nedeniyle tercih edilen bir durumdur. Bu sebeple NADH analizi için incelenen türler arasında en iyi elektrot türünün MWCNT-YBE olduğu analitiksel parametrelerle belirlenmiş olsa da, çalışma potansiyelinin düşük olması nedeniyle MM-YBE elektrodunun NADH tayini için en uygun elektrot türü olduğu sonucuna varılmıştır.

MM-YBE elektrodunun duyarlığının artırılması için MM-YBE elektrodu nanoparçacık ve redoks iletken polimeri ile modifiye edilmiştir. Nanoparçacık olarak MWCNT-COOH ve AuNP, iletken redoks polimeri olarak da PNR kullanılmıştır. Medyatörün etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi ve karşılaştırma yapılabilmesi, bunun yanında medyatörsüz, düşük potansiyelde girişimsiz NADH analizinin yapılıp yapılamayacağını tartışmak için YBCE elektrotları da MWCNT-COOH, AuNP ve PNR ile modifiye edilmiştir. Bu amaçla YBCE/MWCNT/AuNP/PNR ve MM-YBE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrotları hazırlanmış ve karakterizasyonları için NADH çözeltisinde 50  $\text{mV.s}^{-1}$  tarama hızındaki döngüsel voltamogramları alınmıştır. Şekil 4.6’da MM-YBE ve MM-YBE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrotlarının 0,5 mM NADH içindeki döngüsel voltamogramları verilmiştir. MM-YBE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu ile yaklaşık - 0,20 V ve + 0,05 V olmak üzere NADH için iki yükseltgenme potansiyeli gözlenmektedir. - 0,20 V’da gözlenen pik meldola mavisi (MM) medyatörü varlığı nedeniyledir. MWCNT ve MM medyatörünün,  $\pi$ -konjuge yapıları arasındaki  $\pi$ - $\pi$  elektronik etkileşim nedeniyle MM’nin pik potansiyeli azalmıştır. MM’deki NADH’nin yükseltgenme mekanizması hidrür transferi üzerinden yürümektedir. MM hidrürü kabul eder ve MMH/MM<sup>+</sup> redoks çifti elektronların delokalizasyonunu kolaylaştırır (Wooten ve Gorski, 2010). + 0,05 V’da gözlenen pik ise MWCNT varlığı nedeniyledir. CNT’lerin elektrot yüzeyine çok tabakalı yapıda modifiye edilmesiyle elektrotların ince film etkisi gösterdiği bilgisi literatürde yer almaktadır (Pumera 2012). Film modifiye MWCNT elektrotlarında, elektroaktif türler yarı sonsuz çözeltiden hem elektrot yüzeyine ve hem de MWCNT tabakalarının içine difüzenir.



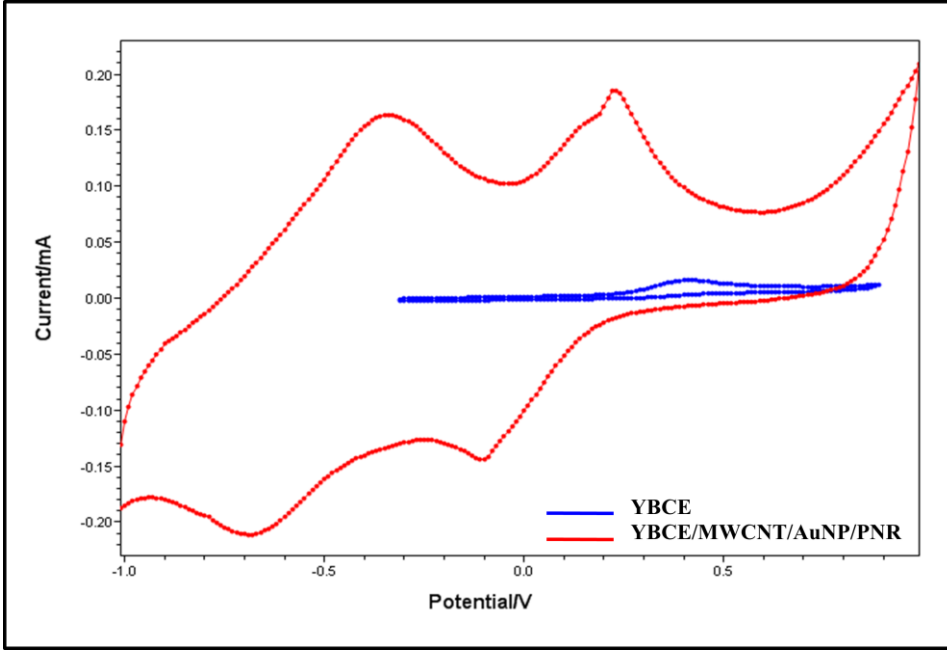
Şekil 4.6. 0,5 mM NADH çözeltisinin MM-YBE ve MM-YBE/MWCNT/AuNP/PNR yalın ve kompozit elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramlar (Tarama hızı:  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl)



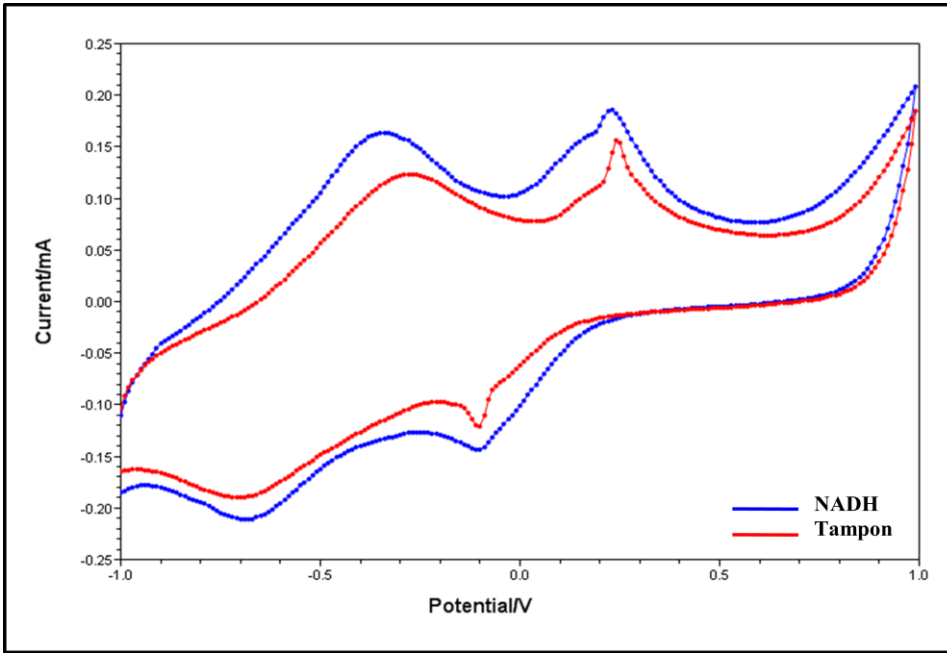
Şekil 4.7. MM-YBE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrotlarının 0,5 mM NADH ve tampon çözeltisinde elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı:  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl)

NADH varlığında bu potansiyelerde pik akımının arttığını kanıtlamak için MM-YBE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodunun NADH ve tampon çözeltilerindeki döngüsel voltamogramları alınmış ve Şekil 4.7'de verilmiştir. NADH varlığında yaklaşık - 0,20 V ve + 0,05 V potansiyellerindeki pik akımlarının arttığı Şekil 4.7'de





Şekil 4.9. 1 mM NADH çözeltisinin YBCE ve YBCE/MWCNT/AuNP/PNR yalın ve kompozit elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı:  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl)

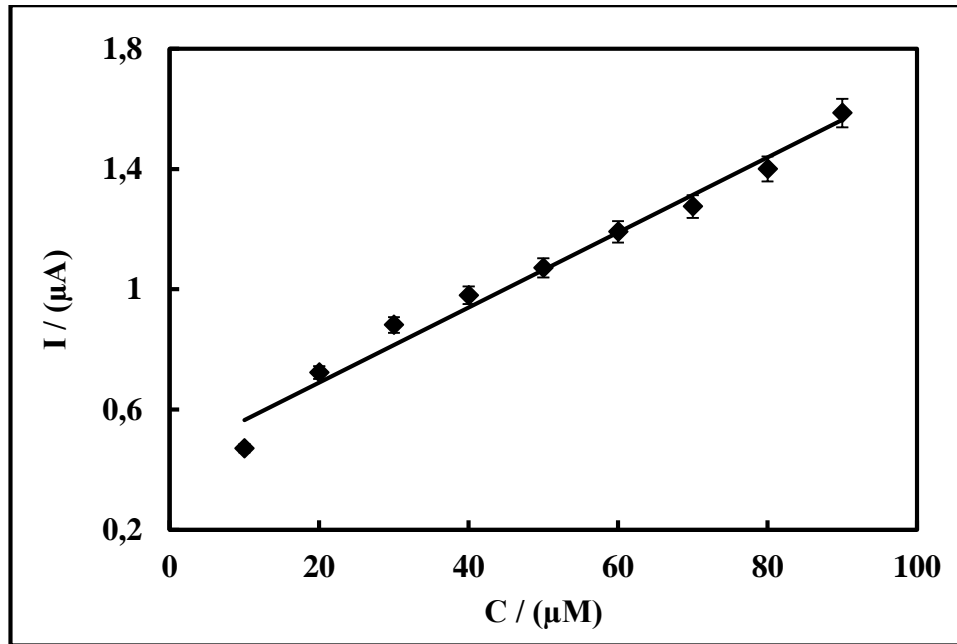


Şekil 4.10. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrotlarının 1 mM NADH ve tampon çözeltisinde elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı:  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

Elektrot formülasyonunda YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodunun NADH'ye cevap verdiğini kanıtlamak için NADH ve tampon çözeltilerindeki döngüsel voltamogramları alınmış ve Şekil 4.10'de verilmiştir. NADH varlığında yaklaşık + 0,2

V'da pik akımlarının arttığı döngüsel voltamogramlardan görülmektedir. Literatürde NADH'nin yükseltgenmesinin tayini için YBCE/MWCNT/AuNP/PNR formülasyonundaki bir elektrot daha önce kullanılmamıştır. NADH'nin yükseltgenme potansiyelinin düşürülmesi oldukça önemli bir konudur. Çalışmamızda hazırladığımız YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu, NADH'nin medyatörsüz, düşük potansiyelde girişimsiz tayini için oldukça umut vericidir.

YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrotları ile NADH'nin tayini + 0,2 V potansiyelde yapılmıştır. Amperometrik tayin sonucu NADH derişimine karşı ölçülen akım değerleri grafiklendirilmiştir ve Şekil 4.11'de verilmiştir. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrotları ile NADH'nin amperometrik tayini için elde edilen grafiğin korelasyon katsayısı 0,990, duyarlığı ise  $12,48 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$  olarak bulunmuştur.



Şekil 4.11. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR elektrotlarının NADH derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,2 V)

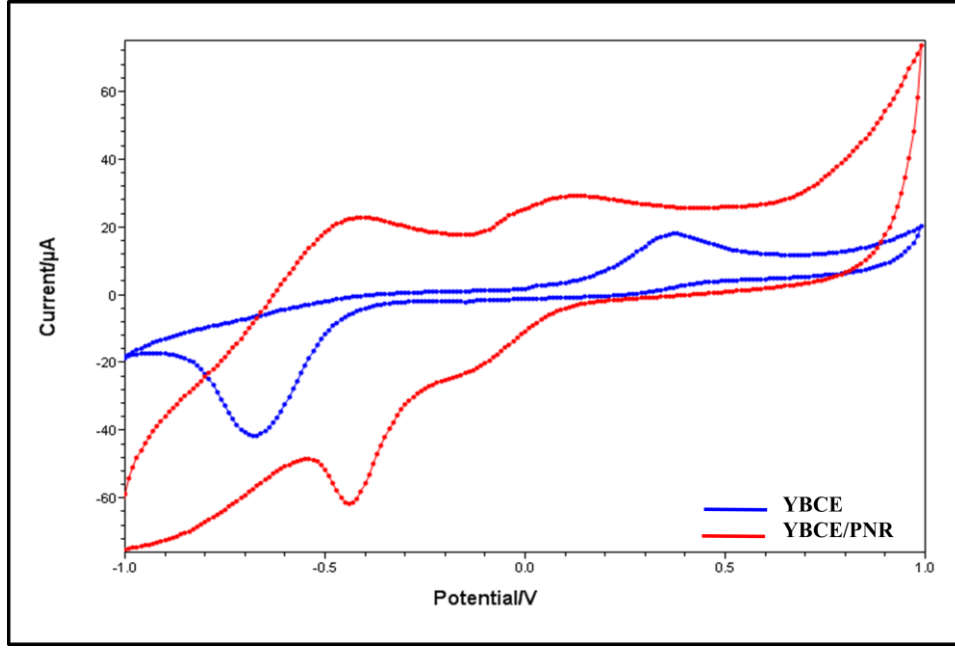
Çizelge 4.3. YBE'lerin türü ve modifikasyonlarının, NADH'nin amperometrik tayin performanslarına etkilerinin karşılaştırılması

Elektrot türü	Duyarlık	Korelasyon katsayısı	Çalışma potansiyeli
YBCE	$15,91 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$	0,999	+ 0,45 V
MWCNT-YBE	$20,08 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$	0,999	+ 0,45 V
MM-YBE	$6,58 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$	0,995	+ 0,10 V
YBCE/MWCNT/AuNP/PNR	$12,48 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$	0,990	+ 0,20 V
MM-YBE/MWCNT/AuNP/PNR	$13,87 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$	0,994	+ 0,10 V

Çizelge 4.3'de NADH'nin amperometrik tayini için kullanılan farklı tür ve modifikasyonlardaki YBE'lerin, analiz sonrası elde edilen grafiklerinden belirlenen

duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri ve uygulanan potansiyeller verilmiştir. NADH'nin yükseltgenme potansiyelinin düşük olması, amperometrik tayinlerde ortamda bulunabilecek girişim yapan türlerin etkisini azaltmak için oldukça önemlidir. Bu verilere göre düşük potansiyelde amperometrik tayinin yapılabildiği elektrotlar MM-YBE, MM-YBE/MWCNT/AuNP/PNR ve YBCE/MWCNT/AuNP/PNR'dir. En yüksek duyarlığa sahip elektrot ise MWCNT-YBE'dir. MWCNT, AuNP ve PNR'nin elektrot formülasyonlarında birlikte bulunmasının sinerjik etki yarattığı hem döngüsel voltamogramlardan hem de Çizelge 4.3'de verilen analitiksel parametrelerden anlaşılmaktadır. YBCE elektrot türü için elektrot formülasyonlarına MWCNT, AuNP ve PNR'nin duyarlığı biraz azaltsa da yükseltgenme potansiyelini önemli ölçüde düşürmesi, yarattığı sinerjik etkiyi göstermektedir. MM-YBE elektrot türü için ise nanoparçacık ve PNR yine sinerjik etki göstererek, duyarlığı iki kat artırmıştır. Hem elektrot türü hem de çalışma potansiyeli düşünüldüğünde en uygun elektrot türü MM-YBE/MWCNT/AuNP/PNR'dir. Ancak analitiksel performansının MM-YBE/MWCNT/AuNP/PNR'ye yakın ve özellikle medyatörsüz olması nedeniyle NADH'nin yükseltgenmesinin amperometrik tayini için en uygun formülasyonu ve elektrot türüne sahip elektrot YBCE/MWCNT/AuNP/PNR olarak seçilmiştir.

Nanoparçacıkların ve PNR'nin birlikte kullanılmasının NADH'nin yükseltgenme potansiyelini düşürmesindeki sinerjik etkiyi incelemek için ise YBCE, YBCE/AuNP, YBCE/MWCNT, YBCE/PNR, YBCE/MWCNT/AuNP, YBCE/AuNP/PNR, YBCE/MWCNT/PNR ve YBCE/AuNP/MWCNT/PNR elektrotlarının 1 mM NADH çözeltisindeki döngüsel voltamogramları alınmıştır. İlk olarak PNR'nin NADH'nin yükseltgenmesine karşı tek başına olan etkisini incelemek için, Şekil 4.12'de 1 mM NADH çözeltisinin YBCE ve YBCE/PNR elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları verilmiştir. Bu voltamogramlara göre, yalnız YBCE elektrodunda NADH'nin yükseltgenme potansiyeli + 0,40 V'da gözlenirken, elektrot formülasyonunda sadece PNR'nin yer alması ile bu potansiyel + 0,10 V'a düşmektedir. Buna göre, NADH'nin yükseltgenmesine karşı PNR'nin elektrokatalitik bir etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Flavinler, NAD<sup>+</sup>/NADH rejenerasyonundan sorumludur ve NR flavin yapısına sahiptir (Williams 1976). Redoks polimeri olan polifenazinin bazı karboksilik asit ve NADH'ye karşı elektrokatalitik etki gösterdikleri ve NAD<sup>+</sup>/NADH dönüşümü için gerekli potansiyeli düşürerek rejenarasyona izin verdikleri bildirilmiştir. Bu sebeple polifenazinler, NADH'nin tayini için NADH sensörü olarak kullanılmaktadır (Pauliukaite vd 2010). Düzenli mezogözenekli karbon (OMC) ve PNR kompozit elektrot ile NADH'nin düşük potansiyelde yükseltgendiği ve PNR'nin NADH'ye karşı elektrokatalitik etki gösterdiği 2010 yılında Lu ve çalışma arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Dilgin ve arkadaşları ise PNR/GC elektrodunda NADH'nin fotoelektrokatalitik olarak yükseltgenmesini incelemişler ve onlar da PNR'nin NADH'ye elektrokatalitik etki gösterdiği sonucuna varmışlardır (Dilgin vd 2011). Çalışmamızda PNR'nin NADH'nin yükseltgenmesine karşı gösterdiği elektrokatalitik etkinin, literatür çalışmalarıyla da uyumlu olduğu bulunmuştur.

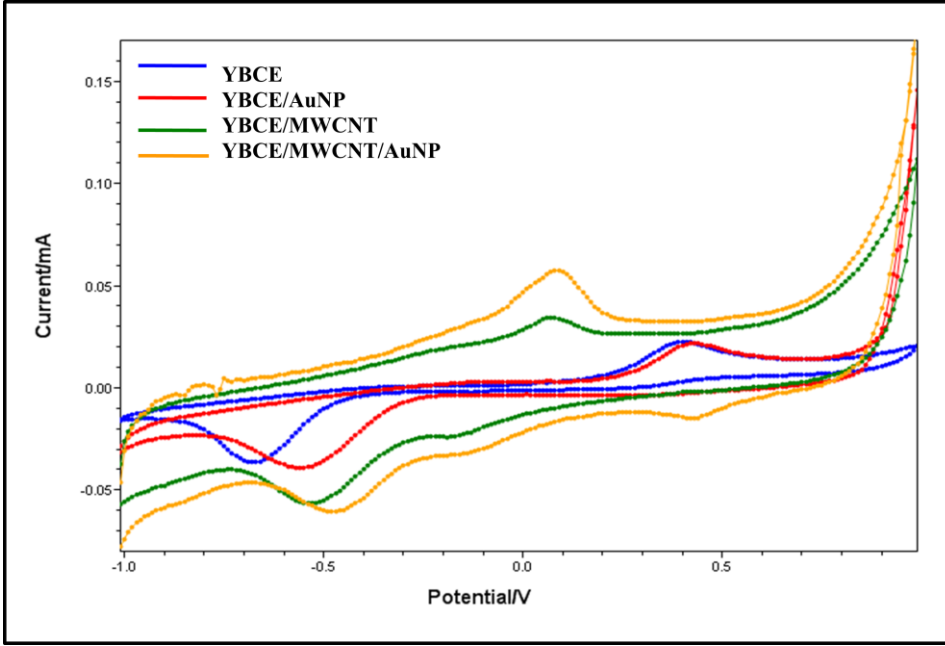


Şekil 4.12. 1 mM NADH çözeltisinin YBCE ve YBCE/PNR elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50 mV.s<sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl)

NADH'nin elektroksidasyonuna karşı nanoparçacıkların tek başlarına ve birlikte kullanıldığı durumlardaki etkilerini incelemek için YBCE/AuNP, YBCE/MWCNT ve YBCE/MWCNT/AuNP elektrotlarının 1 mM NADH'deki döngüsel voltamogramları alınmış ve Şekil 4.13'de verilmiştir. AuNP'nin tek başına nanoparçacık olarak etkisinin yalnız YBCE ile kıyaslandığında NADH'nin yükseltgenmesine karşı elektronik iletkenliği biraz artırdığı ancak yükseltgenme potansiyelini anodik yönde + 0,02 V ( $E_{pa} = + 0,420$  V) kaydıracağı gözlenmiştir. AuNP'nin NADH'ye karşı elektrokatalitik bir etki göstermediği, yalnızca elektrodun yüzey alanını artırarak elektronik iletkenliği artırdığı bulunmuştur. YBCE/MWCNT elektrodunda, NADH'nin yükseltgenme potansiyeli + 0,06 V'da gözlenmiş ve MWCNT, NADH'ye karşı elektrokatalitik aktivite göstermiştir. CNT'lerin NADH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin elektron transfer reaksiyonlarını ilerlettiği çeşitli çalışmalarla da bildirilmiştir (Valentini vd 2003, Wang vd 2003, Wang 2005). YBCE/MWCNT'nin NADH'nin yükseltgenmesine karşı gösterdiği elektrokatalitik etkinin bir nedeni, MWCNT-COOH'nin yapısında oksijen içeren -COOH fonksiyonel grubuna sahip olmasıdır. Elde ettiğimiz bu sonuçlar literatür tarafından da desteklenmektedir. Musameh ve çalışma arkadaşları, 2002 yılında CNT ile modifiye ettikleri GC elektrot ile NADH'nin düşük potansiyelde tayinini içeren bir çalışma yapmışlardır. NADH'nin yükseltgenme pikini yalnız GC elektrot ile + 0,82 V'da, MWCNT/GC elektrot ile + 0,33 V'da gözlemlemişler ve CNT'nin elektrokatalitik etki gösterdiği sonucuna varmışlardır. CNT'nin NADH'ye karşı olan elektrokatalitik davranışına, yüzeyindeki oksijence zengin grupların kısmi olarak sorumlu olduğunu ve NADH'nin yükseltgenmesinin CNT'ler üzerindeki ilerleme mekanizmasının gerçek nedeninin tamamen anlaşamadığını bildirmişlerdir (Musameh vd 2002). 2010 yılında Carvalho ve çalışma arkadaşları MWCNT ile modifiye ettikleri camı karbon elektrodunu (GC), askorbatın elektrokatalitik tayininde kullanmışlardır. MWCNT'nin askorbata karşı çok yüksek elektrokatalitik etki gösterdiğini ( $E_{pa} = +0,07$  V) ve bu



etkinin MWCNT'nin yapısındaki oksijen içeren gruplar nedeniyle olduğunu açıklamışlardır. YBCE/MWCNT'nin NADH'nin yükseltgenmesine karşı gösterdiği elektrokatalitik etkinin diğer nedenleri ise elektrot yüzeyinde oluşan kinon türlerinin redoks medyatörü olarak davranması ve MWCNT'nin aktif kenar uç alanlarında NADH'nin adsorplanması ve sonra da yükseltgenmesidir. MWCNT'deki oksijen içeren gruplar kenar uç alanlarında bulunmaktadır (Zhang vd 2011).



Şekil 4.13. 1 mM NADH çözeltisinin YBCE, YBCE/AuNP, YBCE/MWCNT ve YBCE/MWCNT/AuNP elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50 mV.s<sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl)

CNT'ler, herhangi bir işlem görmeden tek başına sahip olduğu eşsiz özelliklerini gösteremez. Bu sebeple ya disperse edilerek saflaştırılmalı ya da kimyasal olarak işlem görmelidir. Dispersiyon işlemi sonucunda, CNT'lerin yüzeyi kaplanabilir veya CNT kendi yapısına saldırabilir. Bu sebeple uygulanan işlemlerinin etkisiyle CNT'nin sahip olduğu özellikleri değiştirebilir. CNT'lerin farklı yollarla üretimi de sahip olduğu elektrokimyasal özelliklerini etkilemektedir (Kuznetsova vd 2001). Kimyasal buhar çöktürme (CVD) yöntemi, ark boşaltma metoduna göre CNT'deki yapısal değişiklikleri minimuma indirmektedir. Çok duvarlı karbon nanotüplerin üretiminde CVD metodu tercih edilir. Çalışmamızda DropSens firmasından temin edilen MWCNT-COOH, CVD metodu ile üretilmiş nanotüpler kullanılmıştır. Karboksil (-COOH) grup fonksiyonuna sahiptir ve bu -COOH fonksiyonunun yaklaşık % 5 olduğu XPS ölçümleriyle belirlendiği firma tarafından belirtilmiştir. Bu modifikasyon hem MWCNT'nin dispersiyonunu hem de enzimlerin yüzeye modifikasyonunu kolaylaştırmaktadır. CNT'lere kimyasal işlem uygulanması (HNO<sub>3</sub> ile muamele gibi) sonucu yan duvarlarının fonksiyonlaştırılması (-COOH fonksiyonu gibi) ile CNT'de bulunan amorf karbonun çıkarılmasını sağlamaktadır. Bu kimyasal işlemde, amorf karbonun oksidasyon ile fonksiyonlaşması sonucunda CCF (karboksillenmiş karbon içerikli fragmentler) kalıntısı oluşmaktadır. CCF'ler CNT duvarları üzerinde sürekli bir katman

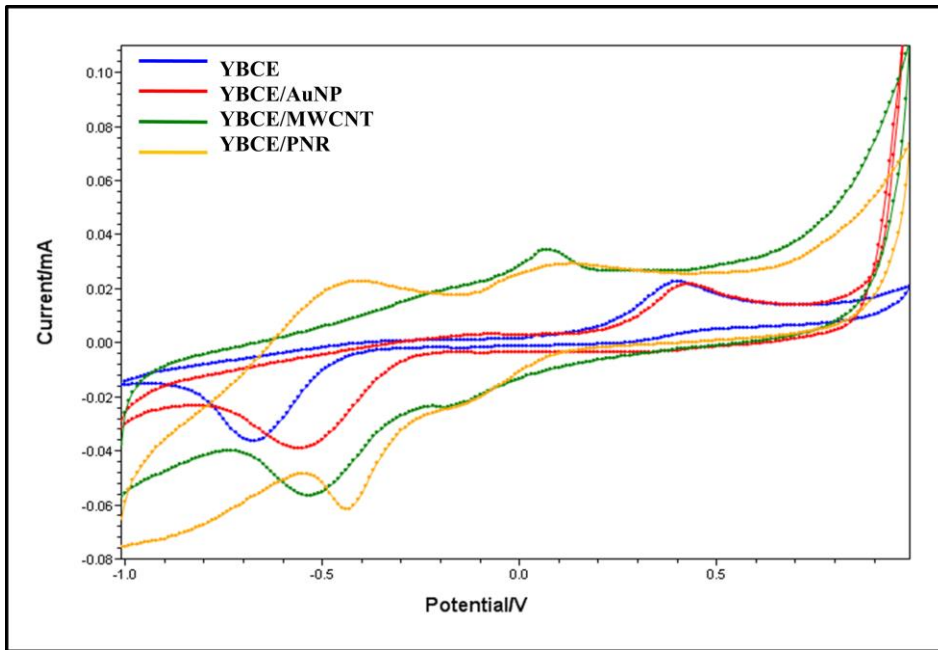
oluşturarak, CNT'lerin kendilerine saldırılarını da önlemektedir (Shao vd 2007). Çalışmamızda satın aldığımız MWCNT-COOH'ın yapısında depolanmış olarak bulunan serbest amorf karbon ve katalist özelliğe sahip metal parçacıkların çıkarılarak saflaştırıldığı, % 95'den daha fazla saflıkta karbon içerdiği ve ortalama yarıçaplarının 10 nm, ortalama uzunluğunun ise 1,5 µm olduğu bilgisi firma tarafından verilmiştir. Daha önceki çalışmalara göre, CNT'lerin elektroaktif yüzey alanlarının yarıçapları ile ters orantılı olduğu bulunmuştur. Zhan vd'nin geçişli elektron mikroskobu (TEM) ve azot adsorpsiyonu ile yaptıkları incelemeler, CNT elektrotlarının BET (Brunauer–Emmett–Teller)-spesifik yüzey alanlarının nanotüpün yarıçaplarının artışıyla azaldığını göstermiştir (Zhang vd 2007). Çalışmamızda kullanılan MWCNT-COOH'ın yarıçapının çok küçük olması, kütle yoğunluğu başına yüksek bir elektroaktif yüzey alanına sahip olduğunu göstermektedir. YBCE/MWCNT elektrodunda gözlenen NADH'nin yükseltgenme pik akımındaki artış, MWCNT-COOH'un sahip olduğu yüksek elektroaktif yüzey alanı ve yüksek elektronik iletkenliği nedeniyledir.

YBCE/MWCNT ve YBCE/AuNP elektrotlarının NADH'nin yükseltgenmesine karşı gösterdiği pik akımları incelendiğinde ise MWCNT'nin tek başına AuNP'ye göre daha fazla yüzey alanına sahip olduğu için daha fazla elektronik iletkenlik gösterdiği sonucuna varılmıştır.

MWCNT ve AuNP'nin birlikte elektrot formülasyonunda yer alması durumunda ise, NADH'nin yükseltgenme pik akımı YBCE/AuNP'ye göre yaklaşık 2,5 kat artmış ve yükseltgenme pik potansiyeli YBCE/MWCNT'ye göre anodik yönde + 0,02 V ( $E_{pa} = + 0,08$  V) kaymıştır. Anodik pik potansiyelindeki + 0,02 V'luk kaymanın AuNP'nin etkisi nedeniyle olduğu düşünülmüştür. AuNP, tek başına elektrot formülasyonunda yer aldığı da aynı etkiyi göstermiştir. YBCE/MWCNT/AuNP hibrit elektrodunda anodik pik akımında gözlenen 2,5 katlık artışın sebebi, MWCNT ve AuNP'nin birlikte sinerjik bir etki yaratarak elektrodun elektroaktif yüzey alanını artırması ve bunun sonucu olarak da elektronik iletkenliği artırmasıdır. MWCNT/AuNP hibrit materyali NADH'nin yükseltgenme reaksiyonunu ilerletmiş, elektron transfer hızını ivmelendirerek artırmış ve elektrokimyasal performansı artırmıştır. Aynı zamanda MWCNT/AuNP hibriti NADH'nin elektrooksidasyonuna karşı elektrokatalitik bir etki de göstermiştir. Son yıllarda CNT ve metal nanoparçacıklar arasındaki etkileşimin önemi oldukça artmıştır. Metal nanoparçacıkların CNT'lere tutunması ve CNT'lerin yan duvarlarına karşı olan ilgisi nanotüp/nanoparçacık hibrit materyal elde etmek için yararlı bir özelliktir (Kong vd 2001). Yapılan çalışmalarda CNT ve metal nanoparçacık komplekslerinin oluştuğu kanıtlanmıştır. Örneğin Jiang vd 2003 yılında, AuNP'yi azot doplu MWCNT'ye tutturmayı başarmışlardır. Gümüş nanoparçacıklar ise 4-aminobenzenle modifiye edilmiş MWCNT üzerinde elektrokimyasal olarak sentezlenmiştir (Gao ve Li, 2005). Son zamanlarda, Yang vd tarafından polielektrolit ile platin nanoparçacıklar ve CNT'nin kendiliğinden oluşan çok katmanlı filmleri elde edilmiştir (Yang vd 2006). Guo vd 2010 yılında, GC elektrodu ile triptofanın amperometrik tayini için AuNP/MWCNT hibriti hassasiyeti artırıcı materyal olarak kullanılmıştır. AuNP ve MWCNT birlikte elektroaktif yüzey alanını artırdığı ve elektron transferini hızlandırdığı için AuNP/MWCNT/GC elektrodunda, daha düşük potansiyelde ve daha hassas (daha yüksek pik akımı) triptofan tayini yapılmıştır (Guo vd 2010). CNT ve NP'lerin hibrit yapısı, elektriksel, optiksel ve sensör cihazların üretimi için, geniş potansiyel uygulama alanları vardır (Jiang ve Gao 2003). Çalışmamızda kullanılan MWCNT/AuNP/YBCE

hibrit elektrodunun NADH'ye karşı göstermiş olduğu elektrokatalitik etki, NADH'nin hassas ve girişimsiz amperometrik tayini için oldukça ümit vericidir.

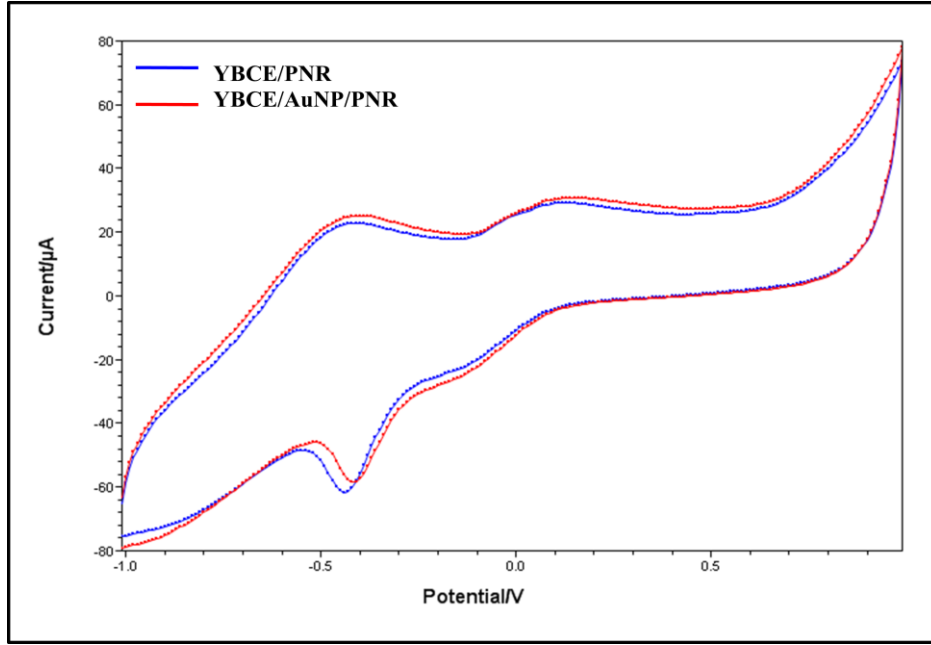
AuNP, MWCNT ve PNR'nin her birinin NADH'ye karşı olan etkilerinin daha iyi anlaşılması için YBCE, YBCE/AuNP, YBCE/MWCNT ve YBCE/PNR elektrotlarının 1 mM NADH çözeltisindeki döngüsel voltamogramları Şekil 4.14'de verilmiştir. MWCNT'nin NADH'nin elektroyükseltgenmesine karşı, PNR ve AuNP'ye göre daha fazla elektrokatalitik etki (Epa: + 0,06 V) ve daha yüksek elektronik iletkenlik gösterdiği döngüsel voltamogramlardan anlaşılmaktadır. PNR ve AuNP'nin elektronik iletkenliklerinin birbirine yakın olmasına karşın PNR, NADH'ye karşı elektrokatalitik aktivite göstermiş ancak AuNP'nin böyle bir etkisi olmamıştır. Bu sonuçlar, MWCNT'nin daha yüksek elektroaktif yüzey alanına sahip olması ve elektron transfer hızını artırması, PNR'nin flavin yapısında bir iletken redoks polimeri olması nedeniyle NADH'nin yükseltgenmesi katalizlemesi ve AuNP'nin ise elektroaktif yüzey alanını artırmasıyla elektronik iletkenliği artırması nedeniyledir.



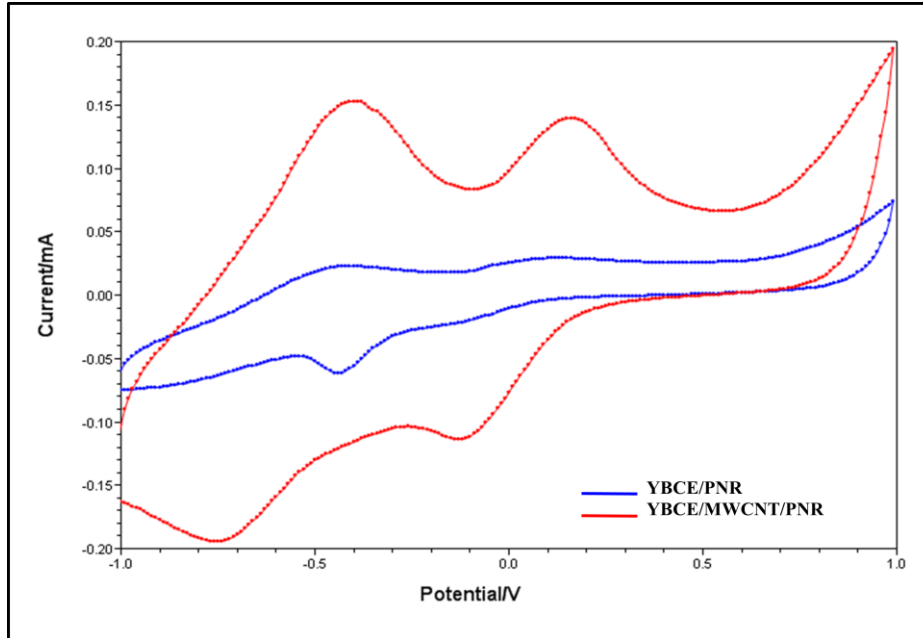
Şekil 4.14. 1 mM NADH çözeltisinin YBCE, YBCE/AuNP, YBCE/MWCNT ve YBCE/PNR elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50 mV.s<sup>-1</sup> 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl)

PNR ve nanoparçacıkların elektrot formülasyonunda birlikte kullanılmasının, NADH'nin yükseltgenmesine karşı olan etkisini incelemek için Şekil 4.15'de YBCE/PNR ve YBCE/AuNP/PNR, Şekil 4.16'de ise YBCE/PNR ve YBCE/MWCNT/PNR elektrotlarının 1 mM NADH çözeltisindeki döngüsel voltamogramları verilmiştir. YBCE/PNR formülasyonuna AuNP'nin girilmesiyle NADH'nin yükseltgenme potansiyeli anodik yönde + 0,02 V daha sağa kaymış ve anodik pik akımı biraz artmıştır (Şekil 4.15). AuNP'nin varlığı PNR'nin iletkenliğinin artmasını sağlamıştır. Yapılan çalışmalara göre, iletken polimerlerde AuNP'nin varlığının elektrokimyasal aktivite ve iletkenliği artırdığı bildirilmiştir (Pinagron vd 2008). YBCE/AuNP ve YBCE/MWCNT/AuNP elektrotlarında da gözlenen anodik pik

potansiyelindeki + 0,02 V'luk bu kaymanın da yine AuNP'nin etkisi nedeniyle olduğu düşünülmektedir.



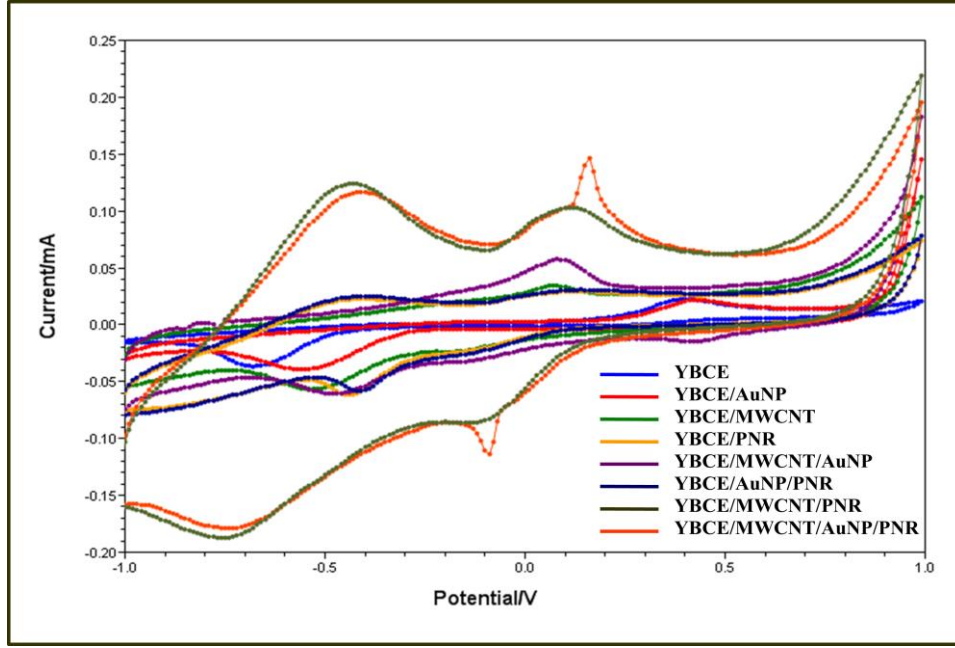
Şekil 4.15. 1 mM NADH çözeltisinin YBCE/PNR ve YBCE/AuNP/PNR elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı:  $50 \text{ mV.s}^{-1}$  50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl)



Şekil 4.16. 1 mM NADH çözeltisinin YBCE/PNR ve YBCE/MWCNT/PNR elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı:  $50 \text{ mV.s}^{-1}$  50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl)

YBCE elektrodunda hem MWCNT hem de PNR'nin birlikte bulunması durumunda (YBCE/MWCNT/PNR) ise NADH'nin yükseltgenme pik akımının YBCE/PNR'ye göre yaklaşık 5 kat arttığı ve yükseltgenme pik potansiyelinin de +0,11 V olduğu Şekil 4.16'da görülmektedir. Buna göre MWCNT ve PNR'nin birlikte elektronik iletkenliği artırarak bir sinerjik etki yarattığı sonucuna varılmıştır. CNT'lerin oksijen içeren uçları ile açık son grupları, sp<sup>2</sup> karbonlarından oluşan hidrofobik yan duvarları ve  $\pi$ -konjuge yapıları vardır. CNT'lerin bu eşsiz yapısal ve elektronik özellikleri, üç boyutlu iletken matris oluşturmalarına izin verir. CNT'lerin  $\pi$ -konjuge yapıları, organik aromatik bileşiklerle  $\pi$ - $\pi$  elektronik ve hidrofobik etkileşim yapmasını sağlar (Carvalho vd 2010). Literatürde verilen bilgiler ışığında, MWCNT ve PNR arasındaki bu sinerjik etkinin, PNR ve MWCNT'nin yapısında bulunan  $\pi$ -konjuge yapıları arasındaki  $\pi$ - $\pi$  elektronik etkileşim nedeniyle olduğu ve böylelikle elektron transfer hızının arttığı ve faradik cevabın kuvvetlendiği sonucuna varılmıştır. MWCNT'nin sahip olduğu yüksek elektroaktif yüzey alanı da yine bu etkileşimlerle artmıştır. MWCNT ve PNR arasındaki bu sinerjik etki ile NADH'nin yükseltgenmesine karşı olan hassasiyet de artmıştır. YBCE/MWCNT/PNR elektrodu ile NADH'nin yükseltgenmesine karşı elde edilen sonuçlar literatürdeki bazı çalışmalar tarafından da desteklenmektedir. Carvalho vd'nin 2010 yılında askorbat tayini için GC/MWCT/PNR elektrodu kullanmışlardır. PNR ve MWCNT'nin birlikte bir sinerji yaratarak elektronik iletkenliği artırdığını bildirmişlerdir. 2007 yılında Qu vd'nin yaptıkları bir çalışmada ise MWCNT/PNR/GC elektrodu kullanarak glukoz biyosensörü geliştirmişlerdir. Bu çalışmada da yine MWCNT ve PNR arasında sinerjik bir etki olduğunu, bu davranışın ise MWCNT ve PNR'nin mükemmel elektron transfer yeteneği ile redoks aktivitesini geliştirmesi nedeniyle olduğunu açıklamışlardır.

Biyouyumluluk özelliği ve MWCNT ile birlikte yarattığı sinerjik etkisi nedeniyle AuNP, sinerjik etkisi daha fazla olan formülasyona (YBCE/MWCNT/PNR) dâhil edilmiş ve YBCE/MWCNT/AuNP/PNR elektrodunun da NADH'nin yükseltgenmesine karşı olan elektrokimyasal davranışı incelenmiştir. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR elektrodunda hem nanoparçacık hem de PNR'nin varlığı oldukça fazla bir sinerjik etki yaratarak yükseltgenme pik akımını YBCE/MWCNT/PNR'ye göre 2 kat artırmıştır (Şekil 4.17). NADH'ye karşı olan yükseltgenme pik potansiyeli ise + 0,16 V'da gözlenmiştir. AuNP'nin varlığı ile anodik pik akımı artmış olmasına rağmen, anodik pik potansiyeli anodik yönde daha pozitif değerlere kaymıştır. YBCE/MWCNT/PNR'ye göre pik potansiyelindeki + 0,05 V'luk bu kaymanın AuNP'nin etkisi nedeniyle olduğu sonucuna varılmıştır. AuNP'nin elektrot formülasyonlarına girdiği durumlarda pik potansiyellerindeki kaymalar + 0,02 V iken, YBCE/MWCNT/AuNP/PNR elektrodunda + 0,05 V olmasının yine nanoparçacık ve PNR'nin sinerjik etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür.



Şekil 4.17. 1 mM NADH çözeltisinin farklı modifikasyonlardaki YBCE yalın elektrotlarında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 50  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl)

Şekil 4.17’de YBCE, YBCE/AuNP, YBCE/MWCNT, YBCE/PNR, YBCE/MWCNT/AuNP, YBCE/AuNP/PNR, YBCE/MWCNT/PNR ve YBCE/MWCNT/AuNP elektrotlarının 1 mM NADH çözeltisinde elde edilen döngüsel voltamogramları ve Çizelge 4.4’de ise bu voltamogramlarından elde edilen Epa ve Ipa değerleri verilmiştir. Çizelge 4.4 incelendiğinde NADH’nin yükseltgenmesine karşı daha önceden de belirlendiği gibi en uygun elektrot türünün YBCE/MWCNT/AuNP/PNR olduğu, en yüksek anodik pik akımı değerinden ve anodik pik potansiyelini yalın YBCE’ye göre oldukça fazla düşürmesinden anlaşılmaktadır. Aynı zamanda MWCNT, AuNP ve PNR’nin birlikte oldukça fazla bir sinerjik etki yarattığı da görülmektedir. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu, NADH’ye karşı yüksek elektrokatalitik aktivite ve yüksek elektronik iletkenlik göstermektedir. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR’nin NADH’nin yükseltgenmesine karşı gösterdiği bu yüksek sinerjik etkinin nedeni şu şekilde açıklanabilir. Elektrokimyasal ön işlem uygulanmış YBCE elektrodu üzerine  $-\text{COOH}$  fonksiyonuna sahip MWCNT- $\text{COOH}$ ’ın modifiye edilmesiyle yüksek elektroaktif yüzey alanına sahip bir elektrot elde edilmişti. YBCE/MWCNT elektrodu AuNP ile modifiye edildiğinde ise MWCNT’nin  $-\text{COOH}$  fonksiyonuna ve açık uçlara sahip olması nedeniyle AuNP, MWCNT yüzeyine tutunur. Böylelikle YBCE elektrodunda MWCNT/AuNP hibrit yapısı oluşur. MWCNT/AuNP hibrit yapısı da elektronik iletkenliği ve hassasiyeti artırıcı etki yapar. Elektroaktif yüzey alanı ve elektronik iletkenliği oldukça artmış olan YBCE/MWCNT/AuNP hibrit elektrodu üzerinde NR’nin elektropolimerizasyonu ile PNR filmi oluşur. PNR filminin yapısında bulunan  $\pi$  konjuge yapıları, MWCNT’de bulunan  $\pi$  konjuge yapıları ile  $\pi$ - $\pi$  elektronik etkileşimini ve hidrofobik etkileşim yapar. Böylece YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodunda elektron transfer hızı oldukça artar ve faradik cevap kuvvetlenir. AuNP’nin biyouyumluluk özelliği ise, NADH’nin redoks reaksiyonunda uyumlu bir mikroçevre yaratır. MWCNT’nin

YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodundaki varlığı, yalın elektrotlarda NADH'nin yükseltgenmesi ile oluşan kirliliklerin elektrot yüzeyinde birikmesini de anti-fouling etkisi ile önlemiştir. Yalın elektrotlarda yüksek aşırı potansiyelde NADH'nin tersinmez reaksiyonları ile oluşan ürünlerin yalın elektrotların yüzeyinde birikmesi sonucu meydana gelen kirliliklerin, CNT'nin anti-fouling etkisi ile yok edildiği literatürde yer almaktadır (Musameh vd 2002). NAD<sup>+</sup>/NADH rejenerasyonu yeniden şarj edilebilir biyobattaryalar için oldukça önemlidir. Biyoyakıt hücreleri, mikroorganizma, organel veya enzim gibi biyoelektrokatalistleri temel alan, kimyasal enerjiyi elektriksel enerjiye dönüştüren elektrokimyasal cihazlardır. Enzimatik yakıt hücrelerinde, oksidoredüktaz enzimlerinin çoğu kullanılmaktadır ve enzimler NAD<sup>+</sup>'ya bağımlıdır. Enzim ve elektrot arasındaki elektron döngüsü, koenzim NAD<sup>+</sup> tarafından kesildiğinde bu döngünün devam etmesi için bir elektrokatalist gereklidir. Yeniden şarj edilebilir biyobattaryaların geliştirilmesi için NAD<sup>+</sup>'nin indirgenmesi ve NADH'nin yükseltgenmesini katalizlemek için PNR'nin varlığı önemlidir (Marguerite vd 2011). Geliştirdiğimiz YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu biyoyakıt hücreleri ve biyobattaryalarda kullanımı açısından önemli bir yeniliktir.

Çizelge 4.4. Şekil 4.17'de verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen E<sub>pa</sub> ve I<sub>pa</sub> değerleri

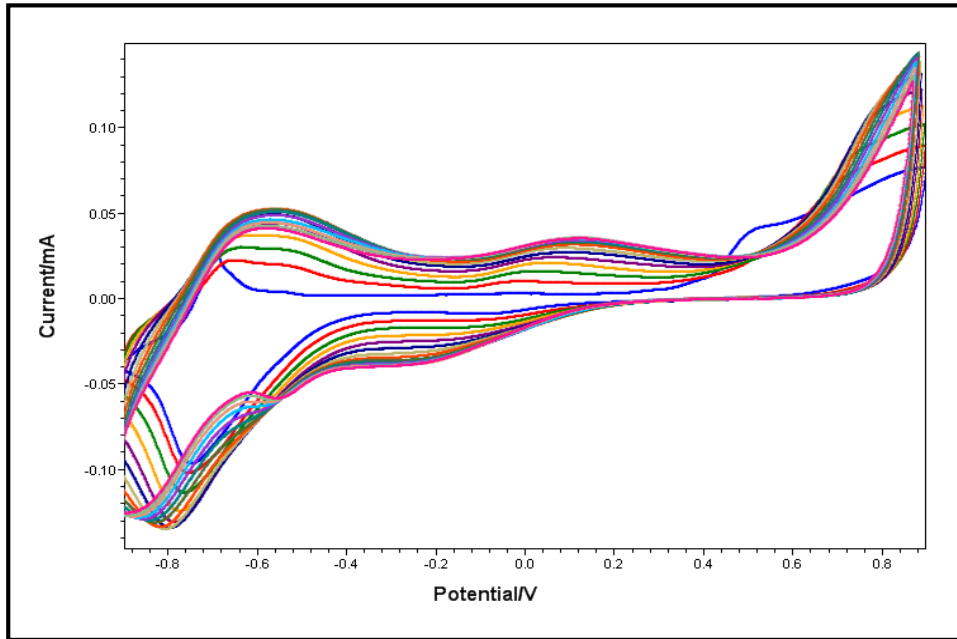
Elektrot türü	E <sub>pa</sub>	I <sub>pa</sub>
YBCE	+ 0,40 V	13,11 µA
YBCE/AuNP	+ 0,42 V	13,22 µA
YBCE/MWCNT	+ 0,06 V	14,23 µA
YBCE/PNR	+ 0,10 V	7,97 µA
YBCE/MWCNT/AuNP	+ 0,08 V	32,92 µA
YBCE/AuNP/PNR	+ 0,12 V	8,02 µA
YBCE/MWCNT/PNR	+ 0,11 V	38,49 µA
YBCE/MWCNT/AuNP/PNR	+ 0,16 V	79,13 µA

### 4.3. Nötral Kırmızının Elektropolimerizasyonunun Karakterizasyonu

#### 4.3.1. Farklı türlerdeki YBE'lerde NR'nin elektropolimerizasyonunun karakterizasyonu

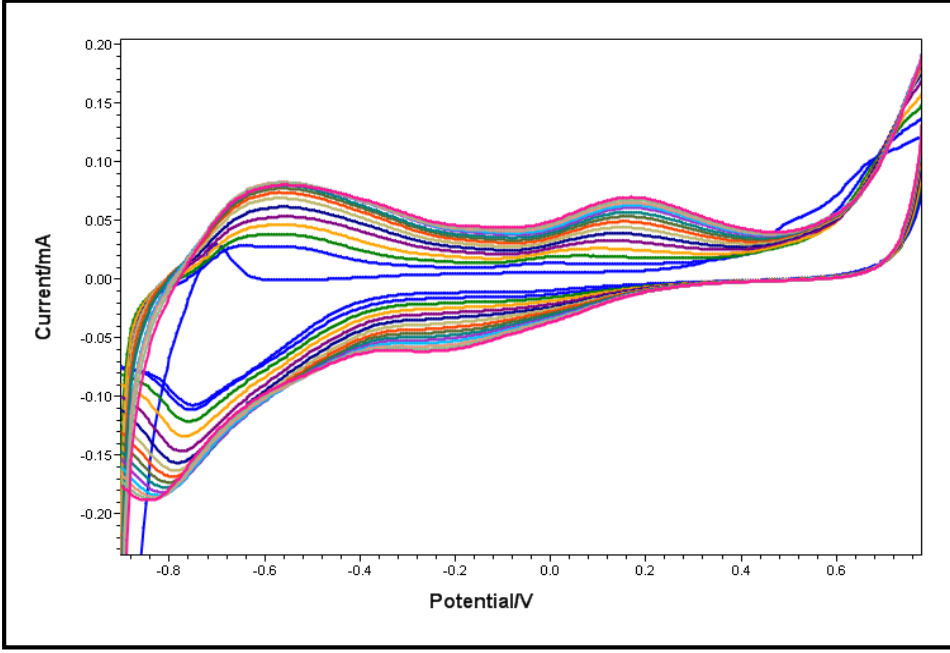
Nötral kırmızı, YBE'lerin yüzeyinde 0,1 M KNO<sub>3</sub> içeren 0,025 M pH 5,5 fosfat tamponu içerisinde, - 0,9 V ile + 0,8 V potansiyel aralığında 50 mV.s<sup>-1</sup> tarama hızında 15 döngü uygulanarak elektrokimyasal olarak polimerleştirilmiştir. YBE'ler üzerinde NR'nin elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları YBCE, MWCNT-YBE ve MM-YBE elektrotları için sırasıyla Şekil 4.18, 4.19 ve 4.20'de verilmiştir. Bu voltamogramlar 2007 yılında Pauliukaite vd'nin NR'nin elektropolimerizasyonu ile ilgili yapmış oldukları çalışmada elde ettikleri döngüsel voltamogramlarla uyumludur. Pauliukaite vd (2007), NR monomerinin tersinmez yükseltgenme pik potansiyelini yaklaşık + 0,7 V'da gözlemlemişlerdir (SCE'ye karşı). Bizim çalışmamızda NR monomerinin yükseltgenme pik potansiyeli tüm YBE türleri için yaklaşık + 0,6 V'da

gözlenmiş ve tarama sayısı arttıkça bu potansiyel daha pozitif değerlere kaymıştır. Bunun sebebinin, PNR filminin oluşmasıyla elektrot yüzeyinin değişmesi ve elektrot yüzeyindeki pH değişimleri olduğu düşünülmüştür (Pauliukaite vd 2007). Tüm YBE türlerinde döngü sayısı arttıkça, monomerin katyon radikali ile yükseltgenmesi nedeniyle anodik akım da artmıştır. Bu durum pirrol, anilin ve diğer iletken polimer monomerlerinin davranışı ile benzerdir (Pauliukaite vd 2007). NR-leuko NR tersinir dönüşümü (redoks çiftinin merkezi, Redoks I) tüm YBE türleri için - 0,8 V - 0,6 V arasındadır. Her bir döngü ile indirgenme piki daha negatif potansiyele kaymakta, indirgenme pik akımı azalmış ve potansiyel sürekli daha negatif değerlere kayarak pik genişlemiştir. Bu durumun PNR'nin dallanması ve elektrot yüzeyinin yapısının değişmesiyle ilgili olabileceği savunulmaktadır (Pauliukaite vd 2007). Döngü sayısı arttıkça da yükseltgenme pik akımı sürekli artmakta ve pik potansiyeli daha pozitif değerlere kaymaktadır. Polimerin orta redoks çiftinin (doping/de-doping, Redoks II) potansiyel aralıkları YBE türleri ile değişmektedir. Bu değerler YBCE, MWCNT-YBE ve MM-YBE elektrotları için sırasıyla 0,0 V ile + 0,14 V, 0,0 V ile + 0,18 V, - 0,20 V ile - 0,10 V potansiyel aralığındadır ve döngü sayısının artışı ile pozitif yöre doğru çok yavaş artmaktadır.

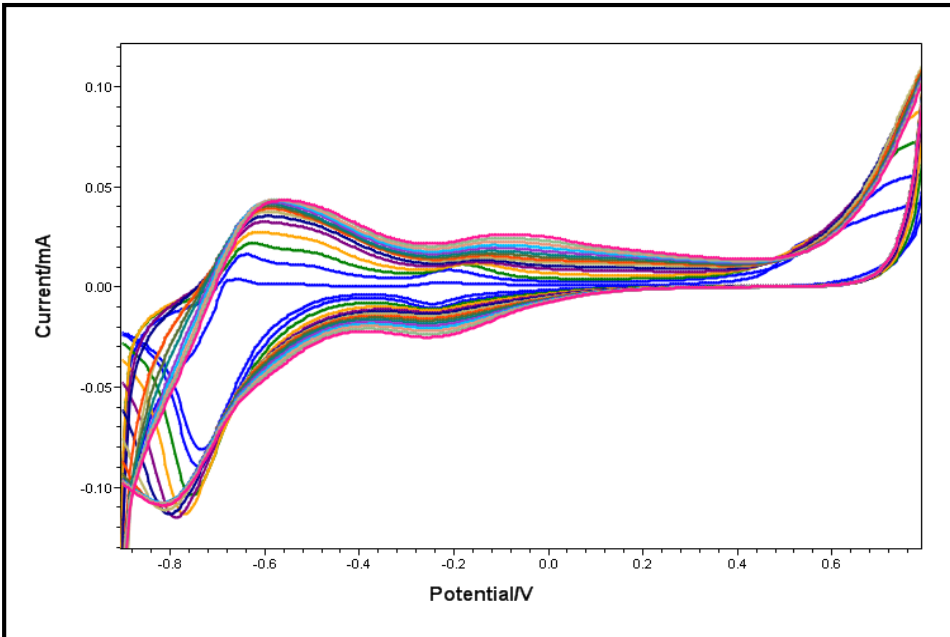


Şekil 4.18. NR'nin YBCE üzerindeki elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları (0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren pH 5,5 0,025 M fosfat tamponunda 1,0 mM NR monomer çözeltisinde, 50 mV.s<sup>-1</sup> tarama hızında, 15 döngü)





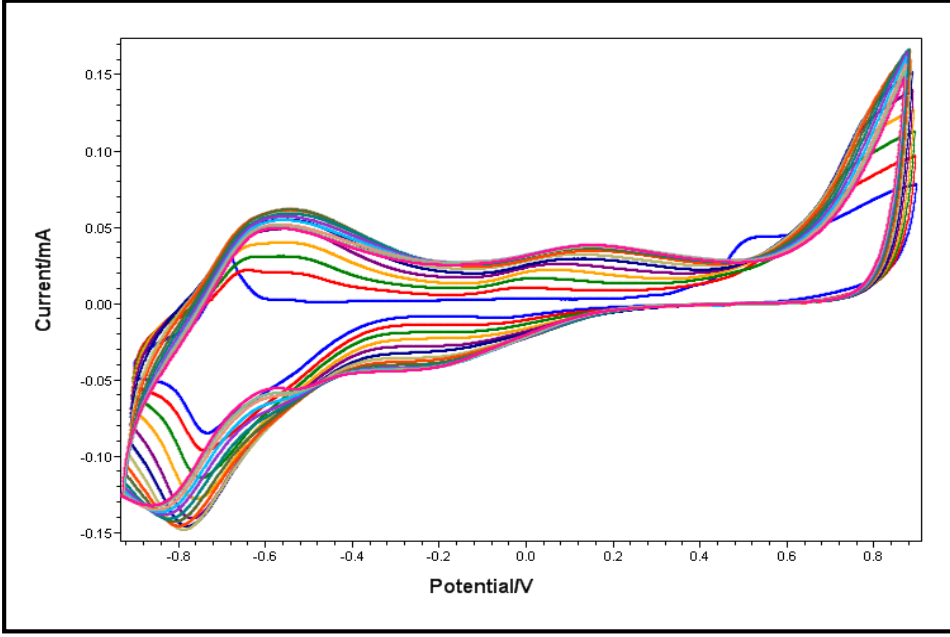
Şekil 4.19. NR'nin yalnız MWCNT-YBE üzerindeki elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları (0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren pH 5,5 0,025 M fosfat tamponunda 1,0 mM NR monomer çözeltisinde, 50 mV.s<sup>-1</sup> tarama hızında, 15 döngü)



Şekil 4.20. NR'nin yalnız MM-YBE üzerindeki elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları (0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren pH 5,5 0,025 M fosfat tamponunda 1,0 mM NR monomer çözeltisinde, 50 mV.s<sup>-1</sup> tarama hızında, 15 döngü)

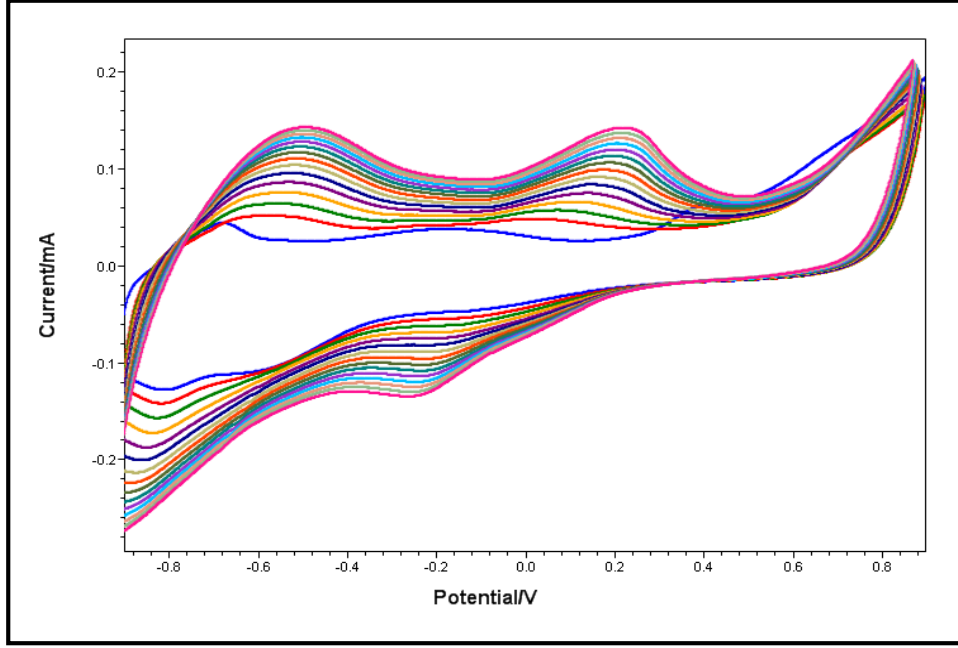
#### 4.3.2. Nanomateryallerle modifiye edilmiş YBCE'lerde NR'nin elektropolimerizasyonun karakterizasyonu

NR'nin nanomateryallerle modifiye edilmiş YBCE'ler üzerindeki elektropolimerizasyonlarında da benzer sonuçlar elde edilmiştir. YBCE/AuNP, YBCE/MWCNT ve YBCE/MWCNT/AuNP elektrotları üzerinde NR'nin elektropolimerizasyonun döngüsel voltamogramları sırasıyla Şekil 4.21, 4.22 ve 4.23'de verilmiştir. Elektropolimerizasyon pozitif potansiyelde monomer katyon radikallerin oluşmasıyla başlar ve zincir büyümesiyle devam eder. Monomerin katyon radikallerinin oluşması için gerekli pozitif potansiyel, yalnız YBCE elektrodunun MWCNT, AuNP ve MWCNT/AuNP ile modifiye edilmesiyle, + 0,6 V'dan + 0,5 V'a düşmüş ve NR monomerinin yükseltgenme piki yaklaşık + 0,5 V'da gözlenmiştir. Nanomateryallerle modifiye edilmiş YBCE'lerde gözlenen monomerin yükseltgenme potansiyelindeki bu azalma, MWCNT ve AuNP'lerin YBCE'lerin elektroaktif yüzey alanını ve elektronik iletkenliği artırmasıyla elektropolimerizasyonun daha istekli olmasının bir sonucudur. Yalnız elektrotlarda olduğu gibi nanomateryallerle modifiye edilmiş elektrotlarda da, tarama sayısı arttıkça bu potansiyel daha pozitif değerlere kaymış, döngü sayısı arttıkça monomerin katyon radikali ile yükseltgenmesi nedeniyle anodik pik akımları da artmıştır. NR-leuko NR tersinir dönüşümü (redoks çiftinin merkezi, Redoks I) tüm YBE türlerinde olduğu gibi, YBCE/AuNP ve YBCE/MWCNT/AuNP elektrotları için de - 0,8 V ile - 0,6 V arasındadır. YBCE/MWCNT elektrodunda ise potansiyel aralığı biraz daha geniştir (- 0,6 V ile - 0,9 V arası). Her bir döngü ile indirgenme piki daha negatif potansiyele kaymakta, indirgenme pik akımı azalmakta ve potansiyel sürekli daha negatif değerlere kayarak pik genişlemektedir. Döngü sayısı arttıkça yükseltgenme pik akımı da sürekli artmakta ve pik potansiyeli daha pozitif değerlere kaymaktadır. Katodik ve anodik pik potansiyellerindeki kayma YBCE/MWCNT elektrodunda daha fazladır. Polimerin orta redoks çiftinin (doping/de-doping, Redoks II) potansiyel aralıkları YBCE/AuNP, YBCE/MWCNT ve YBCE/AuNP/MWCNT elektrotları için sırasıyla - 0,2 V ile + 0,20 V, - 0,25 V ile + 0,23 V ve - 0,2 V ile + 0,15 V potansiyel aralığındadır ve döngü sayısının artışı ile pozitif yönde doğru çok yavaş artmaktadır.

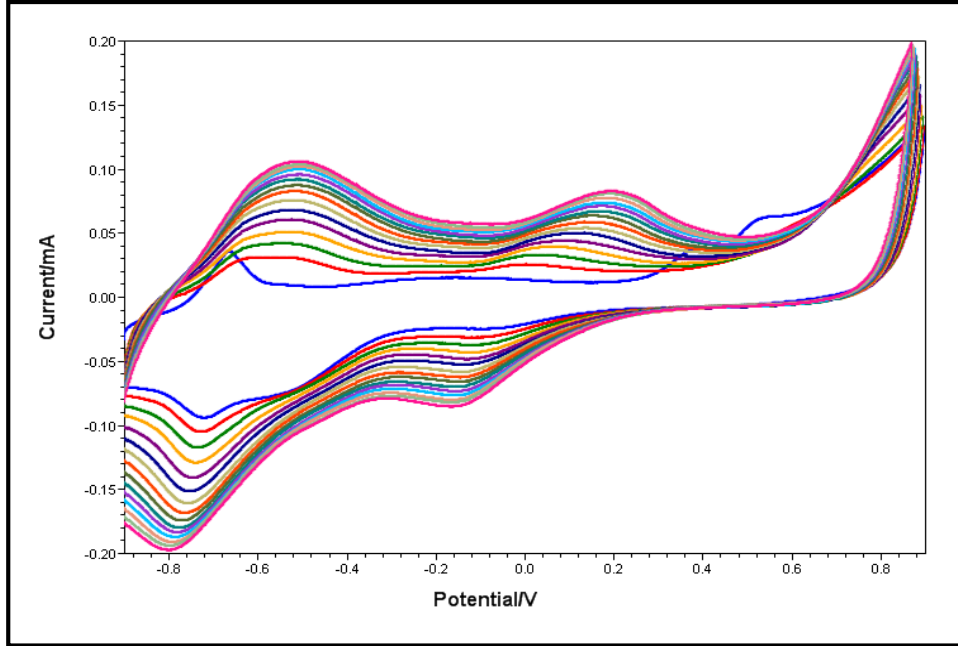


Şekil 4.21. NR'nin YBCE/AuNP üzerindeki elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları (0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren pH 5,5 0,025 M fosfat tamponunda 1,0 mM NR monomer çözeltisinde, 50 mV.s<sup>-1</sup> tarama hızında, 15 döngü)

YBCE/MWCNT üzerinde NR'nin elektropolimerizasyonu daha istekli gerçekleştiği, döngüsel voltamogramlardaki Redoks I'deki anodik pik ve Redoks II'deki anodik ve katodik pik akımlarındaki artışlardan anlaşılmaktadır (Şekil 4.22). MWCNT, elektron transfer yolunu kolaylaştırarak polimerizasyon prosesini kolaylaştırmıştır. YBCE/MWCNT/PNR elektrodunda Redoks II'nin anodik piki MWCNT'nin varlığıyla yalnız YBCE'ye göre daha iyi tanımlanırken, Redoks I'in hem anodik hem de katodik piki ise daha az iyi tanımlanmıştır. NR'nin YBCE/MWCNT üzerindeki elektropolimerizasyonu ile elde edilen döngüsel voltamogramlar, Carvalho vd'nin 2010 yılında GC/MWCNT üzerinde NR'nin elektropolimerizasyonu ile elde edilen döngüsel voltamogramlarla uyumludur ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. YBCE/MWCNT/AuNP üzerinde NR'nin elektropolimerizasyonu da YBCE/MWCNT'de olduğu gibi yalnız YBCE'ye göre daha istekli gerçekleştiği Şekil 4.23'deki döngüsel voltamogramlardan anlaşılmıştır. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR elektrodunda hem Redoks II piki hem de Redoks I piki, MWCNT/AuNP hibritinin yaratmış olduğu sinerjik etkiyle yalnız YBCE'ye göre daha iyi tanımlanmıştır. Redoks I piki ise YBCE/MWCNT/PNR'ye göre daha iyi tanımlanmıştır. Redoks I ve Redoks I çiftlerinde anodik ve katodik pik potansiyelleri arasındaki fark YBCE/MWCNT/PNR'ye göre daha düşüktür.



Şekil 4.22. NR'nin YBCE/MWCNT üzerindeki elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları (0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren pH 5,5 0,025 M fosfat tamponunda 1,0 mM NR monomer çözeltisinde, 50 mV.s<sup>-1</sup> tarama hızında, 15 döngü)

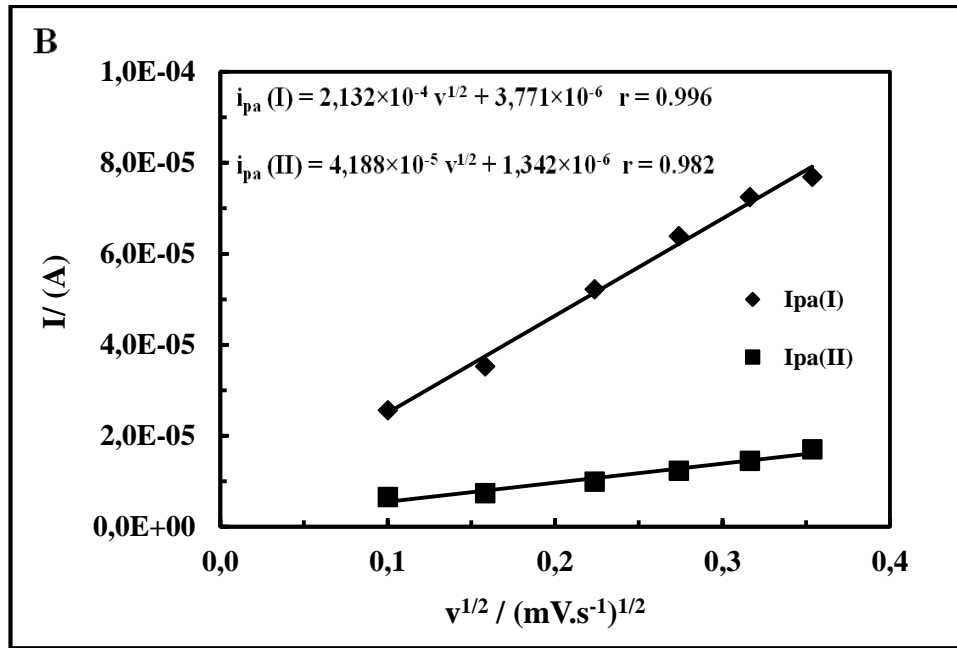
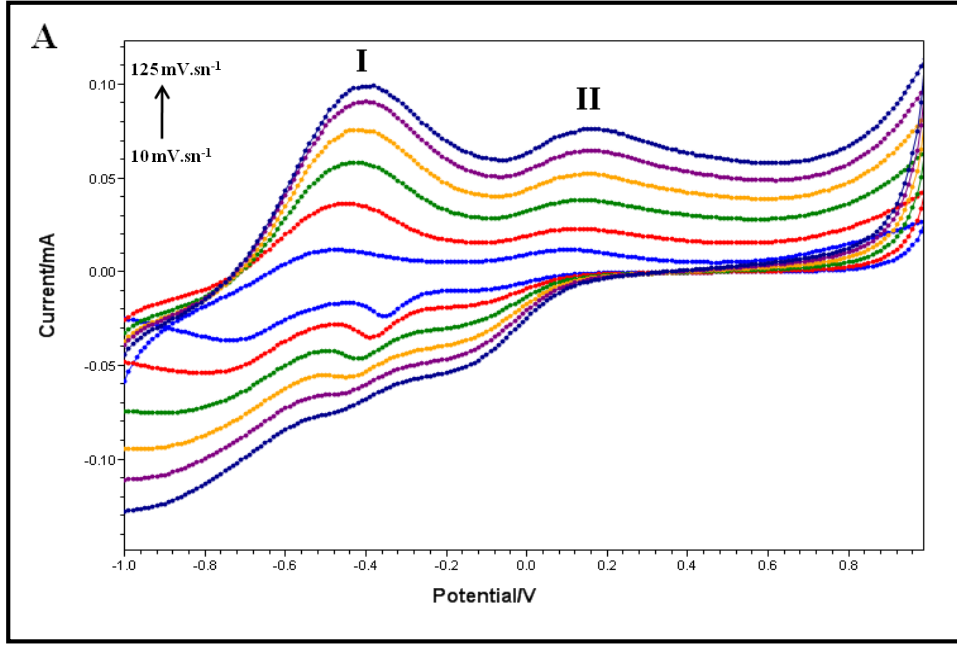


Şekil 4.23. NR'nin YBCE/MWCNT/AuNP üzerindeki elektropolimerizasyonunun döngüsel voltamogramları (0,1 M NaNO<sub>3</sub> içeren pH 5,5 0,025 M fosfat tamponunda 1,0 mM NR monomer çözeltisinde, 50 mV.s<sup>-1</sup> tarama hızında, 15 döngü)

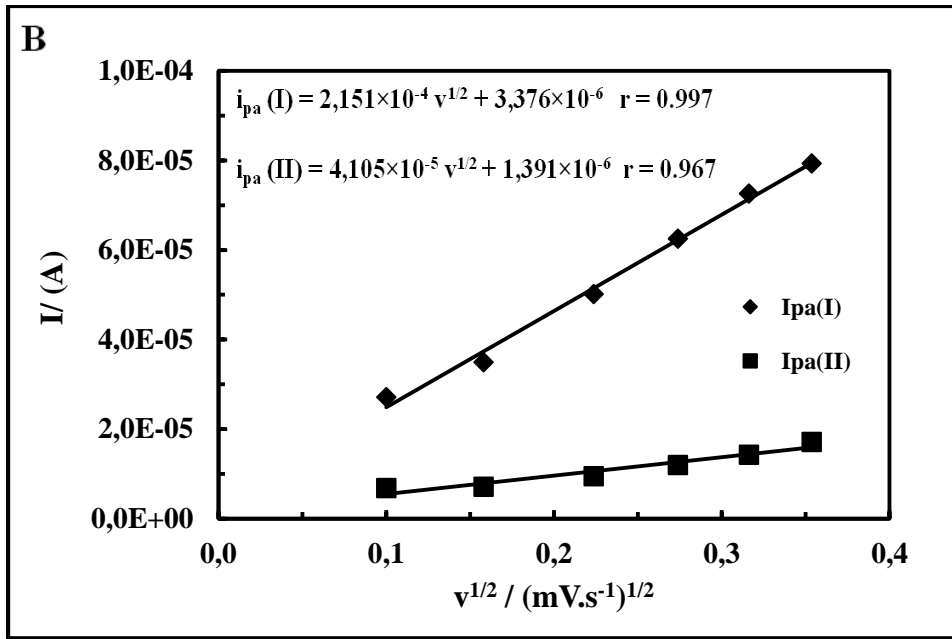
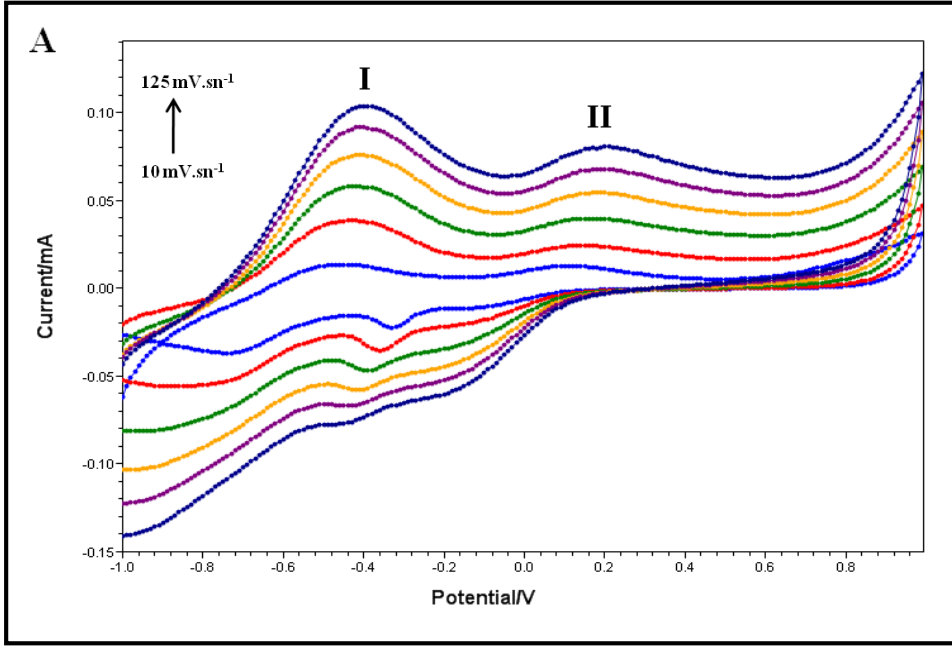
YBCE, YBCE/AuNP, YBCE/MWCNT ve YBCE/MWCNT/AuNP elektrotlarında NR'nin elektropolimerizasyonunun karakterizasyonu için YBCE/PNR,

YBCE/AuNP/PNR, YBCE/MWCNT/PNR ve YBCE/MWCNT/AuNP/PNR elektrotlarının 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde farklı tarama hızlarında döngüsel voltamogramları alınmıştır. Her bir elektrot için elde edilen döngüsel voltamogramlar Şekil 4.24 (A), 4.25 (A), 4.26 (A) ve 4.27 (A)'da verilmiştir. Tarama hızının kareköküne karşı döngüsel voltamogramlardan elde edilen birinci ve ikinci anodik pik akımlarının grafikleri çizilmiş ve yine her bir elektrot için sırasıyla Şekil 4.24 (B), 4.25 (B), 4.26 (B) ve 4.27 (B)'de verilmiştir. Tarama hızı arttıkça anodik pik akımlarının arttığı, her bir formülasyondaki elektrot türü için elde edilen döngüsel voltamogramlardan görülmektedir. Anodik pik akımlarındaki bu artışın, tarama hızının karekökü ile doğrusal olduğu, grafiklerden elde edilen doğrunun denkleminde anlaşılmaktadır. Bu sonuçlara göre YBCE, YBCE/AuNP, YBCE/MWCNT ve YBCE/MWCNT/AuNP elektrotlarında NR'nin elektropolimerizasyonu ile oluşan PNR filmindeki elektrokimyasal proses, karşı iyonun difüzyonuyla, difüzyon kontrollüdür ve tamponda artık monomer yoktur.

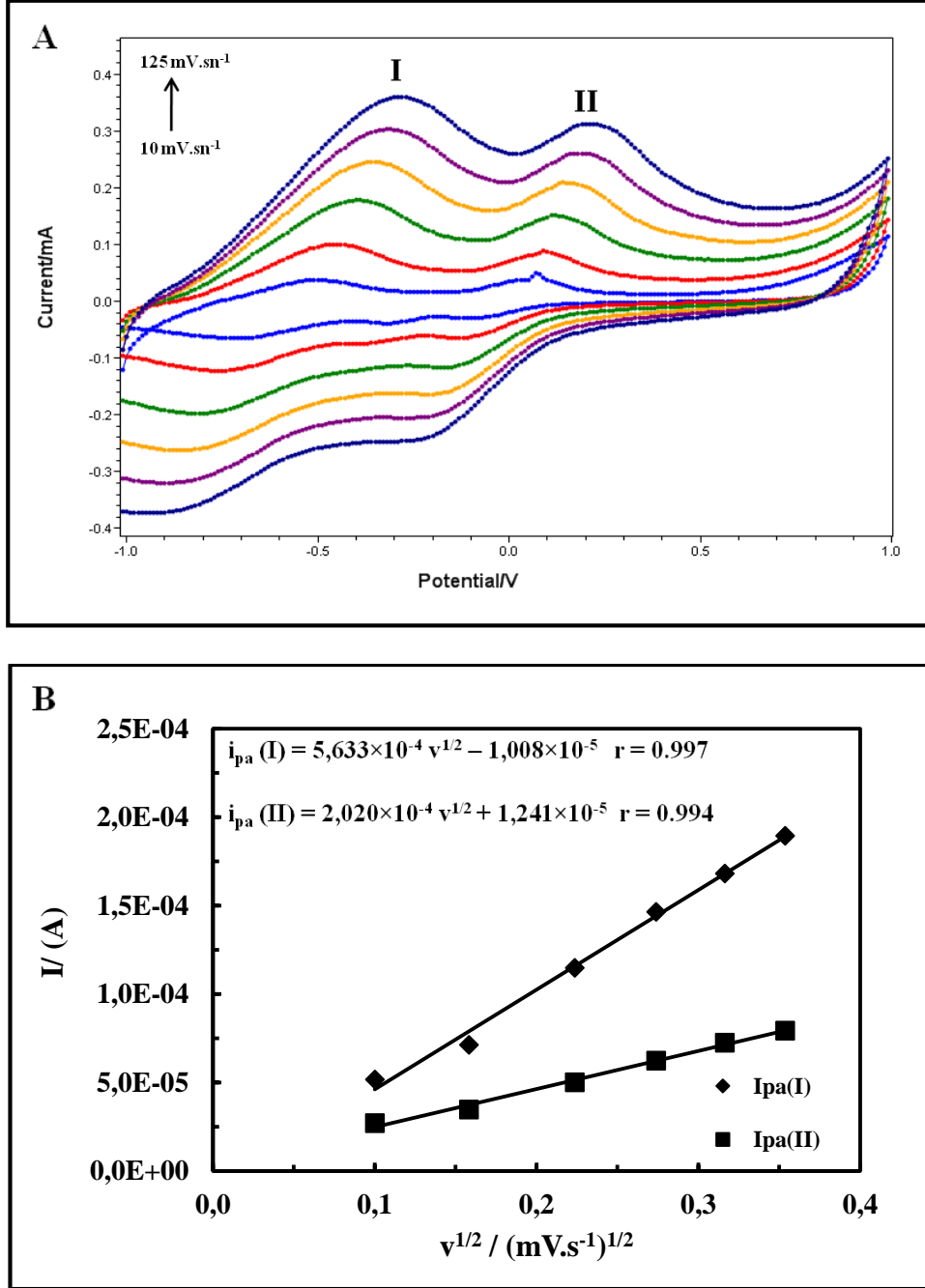
YBCE/PNR ve YBCE/AuNP/PNR elektrotları ile tampon çözeltide elde edilen döngüsel voltamogramlara göre, anodik pik potansiyellerinin tarama hızı artışıyla değişmediği görülmektedir. YBCE/MWCNT/PNR ve YBCE/MWCNT/AuNP/PNR elektrotları ile tampon çözeltide elde edilen voltamogramlarda ise anodik pik potansiyellerinin tarama hızı arttıkça biraz değiştiği ve bu değişimin YBCE/MWCNT/PNR elektrodunda daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. YBCE/MWCNT/PNR elektrodunun fosfat tamponu içerisinde farklı tarama hızlarında elde edilen döngüsel voltamogramları, Carvalho vd'nin 2010 yılında GC/MWCNT/PNR elektrodunda elde etmiş oldukları voltamogramlarla uyumludur.



Şekil 4.24. A) YBCE/PNR elektrodunun tampon çözeltide - 1,0 V ile + 1,0 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125  $\text{mV.s}^{-1}$ , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri

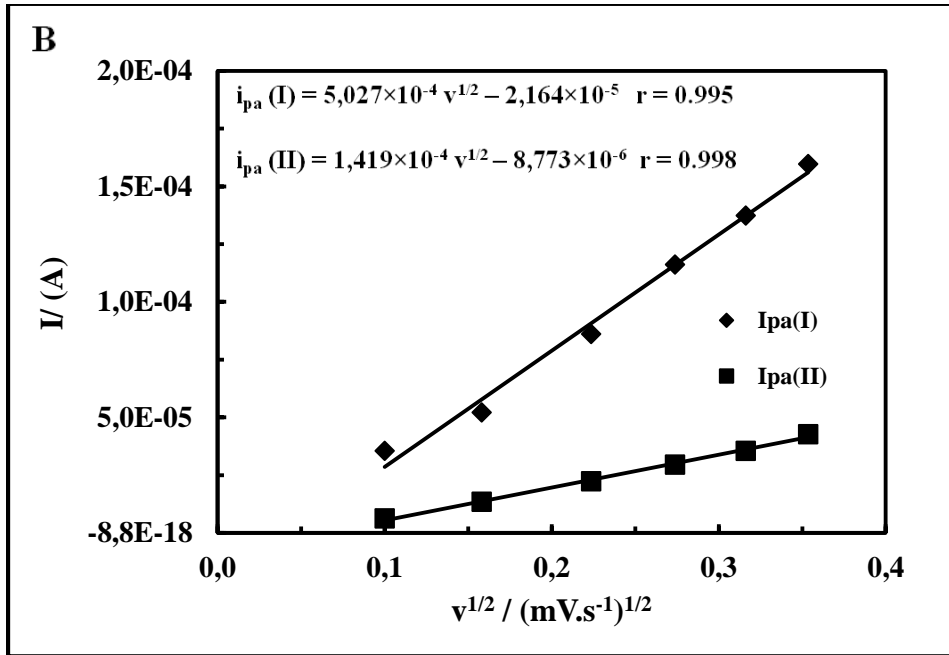
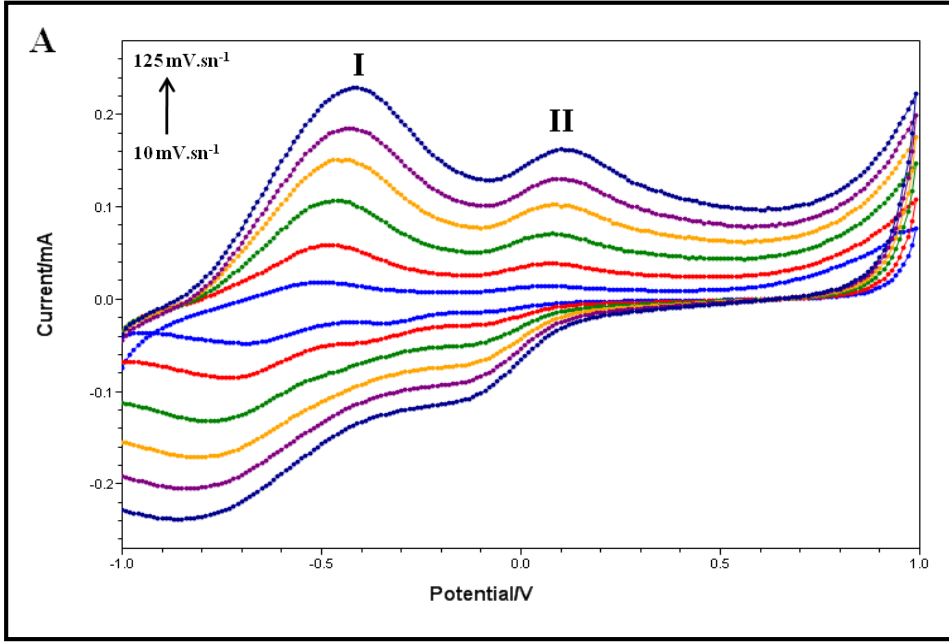


Şekil 4.25. A) YBCE/AuNP/PNR kompozit elektrodunun tampon çözeltide -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 mV.s<sup>-1</sup>, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri



Şekil 4.26. A) YBCE/MWCNT/PNR kompozit elektrodunun tampon çözeltide -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125 mV.s<sup>-1</sup>, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri

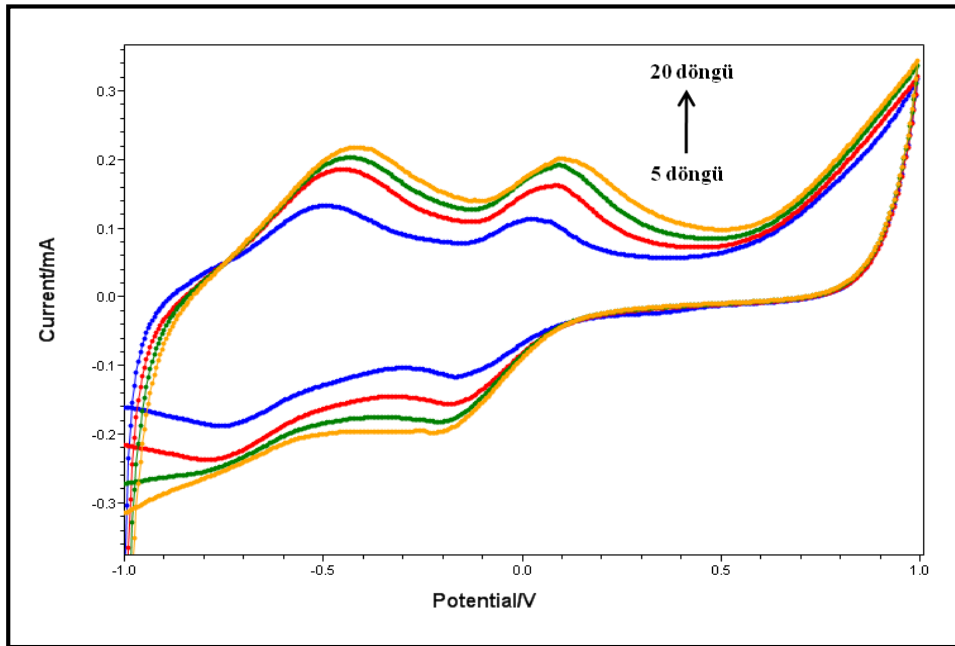




Şekil 4.27. A) YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodunun tampon çözeltide -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 10, 25, 50, 75, 100, 125  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri

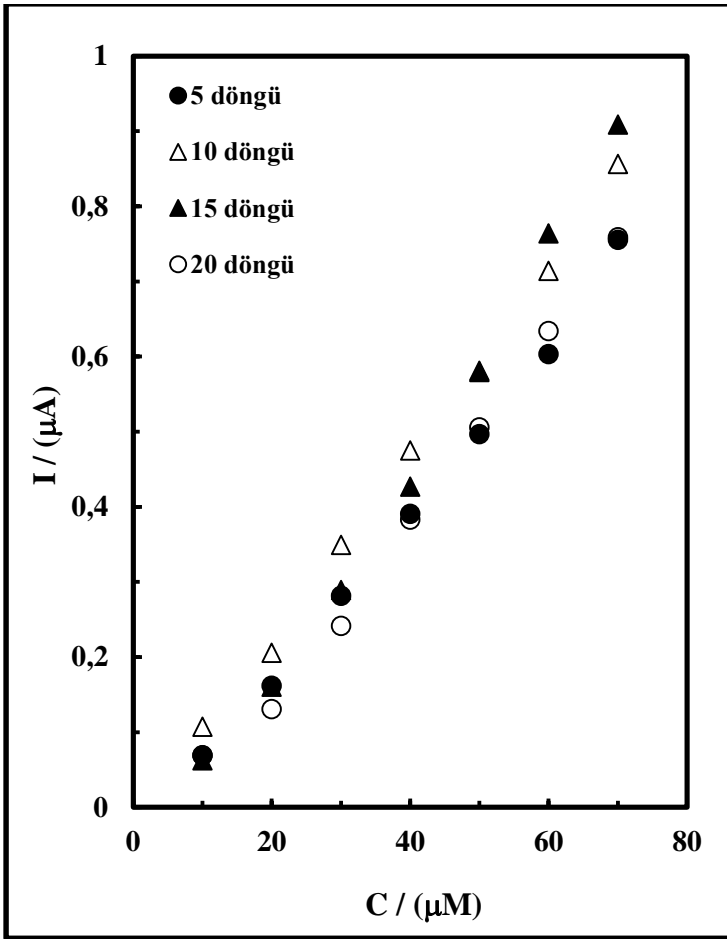
### 4.3.3. NR'nin elektropolimerizasyonunda döngü sayısının optimizasyonu

Döngüsel voltametri tekniği kullanılarak yapılan bir iletken ya da redoks monomerinin elektropolimerizasyonunda döngü sayısının optimizasyonu önemlidir. Döngü sayısı az olduğunda polimerin elektrot yüzeyindeki film kalınlığı çok ince olurken, döngü sayısı fazla olduğunda ise film kalınlığı fazla olmakta ve difüzyon zor olmaktadır (Qu vd 2007). Nötral kırmızının elektropolimerizasyonunda döngü sayısının optimizasyonu için YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrotlarında NR'nin elektropolimerizasyonu farklı döngü sayılarında (5, 10, 15 ve 20 döngü) gerçekleştirilmiştir. Döngü sayısının optimizasyonu için kullanılan YBCE/MWCNT/AuNP hibrit elektrotlarının, ilk olarak nanoparçacık miktar optimizasyonu yapılmıştır. NR'nin elektropolimerizasyonları optimum miktarlarda nanoparçacık kullanılarak hazırlanan YBCE/MWCNT/AuNP elektrotları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.28'de bu elektrotların tampon çözelti içerisinde elde edilen döngüsel voltamogramları verilmiştir. Döngü sayısının artışıyla anodik ve katodik pik akım yükseklikleri de filmin büyümesine paralel olarak artmıştır. Ancak pik akım yüksekliklerindeki bağıl artış döngü sayısı artışı ile azalmaktadır. 15 ve 20 döngü ile hazırlanan elektrotlarla elde edilen pik akım yükseklikleri birbirine yakın değerdedir. Döngüsel voltamogramlara göre NR'nin elektropolimerizasyonu için döngü sayısı 15'den fazla olduğunda, film kalınlığı giderek artmış bu da difüzyonu azaltıcı yönde etki yapmıştır. Bu sebeple, PNR'nin döngü sayısının 15 olmasının yeterli olduğu düşünülmüştür.



Şekil 4.28. Farklı döngü sayılarında hazırlanan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrotlarının tampon çözeltide -1,0 V ile +1,0 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Döngü sayısı: 5, 10, 15 ve 20, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1M KCl 50 mV.s<sup>-1</sup> tarama hızında)

Bu sonuçlardan emin olmak için, farklı döngü sayılarında hazırlanan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR elektrotları ile + 0,2 V'da NADH'nin amperometrik tayini yapılmıştır. NADH derişimine karşı ölçülen akım değerleri grafiklendirilmiş ve Şekil 4.29'de verilmiştir. NADH'nin amperometrik tayini sonrasında akım-derişim grafiklerinden elde edilen hassasiyet ve korelasyon katsayısı değerleri ise Çizelge 4.5'de yer almaktadır. Kalın bir PNR polimer filmi, MWCNT ve AuNP ile birlikte yarattığı sinerjik etkinin de artışıyla pik akımlarını artırırken, elektrodun polimer membranında elektron transferinin baskılanması/kesilmesi nedeniyle düşük hassasiyet göstermiştir. Eğer film çok ince olursa, polimer filmin korunması ve nanomateryallerle yarattığı sinerjik etki de azalır. PNR'nin döngü sayısının NADH sensörünün hassasiyetini etkilediği ve en yüksek hassasiyetin 15 döngü PNR ile hazırlanmış olan elektrotla elde edildiği Çizelge 4.5'den anlaşılmaktadır. YBCE/MWCNT/AuNP hibrit elektrotlarında PNR'nin optimum döngü sayısı 15 olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısmında hazırlanan kompozit elektrotlarda, NR'nin elektropolimerizasyonu 15 döngü ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.29. Farklı döngü sayılarında hazırlanan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR elektrotlarının NADH derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,5 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,2 V)

Çizelge 4.5. Şekil 4.29’da verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri

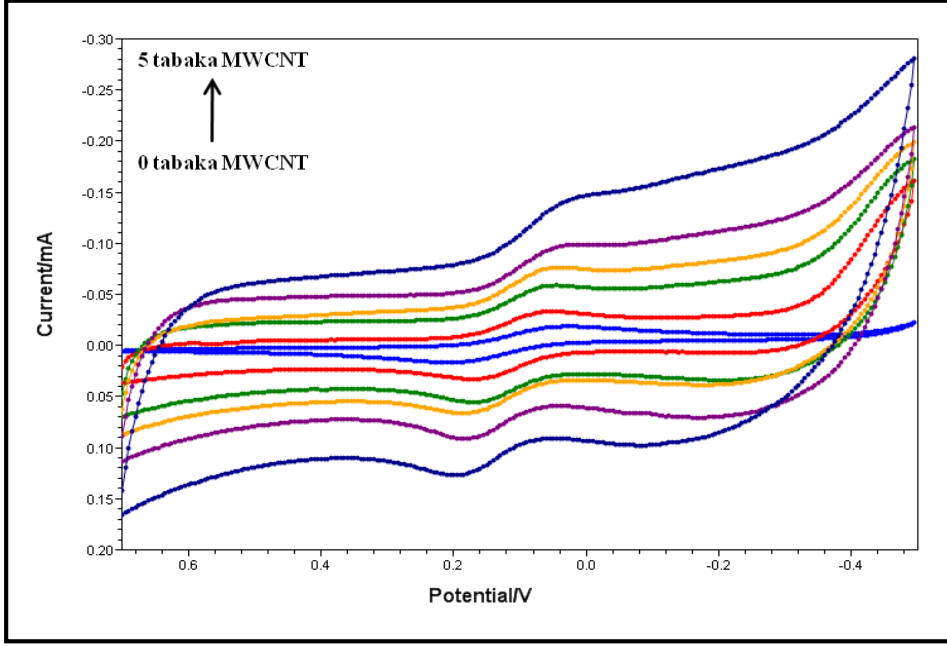
Döngü sayısı	Duyarlık	Korelasyon katsayısı
5	11,3 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,998
10	12,5 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,999
15	14,4 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,996
20	11,9 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,996

#### 4.4. Nanoparçacıkların miktar optimizasyonları

YBCE/MWCNT/AuNP kompozit elektrodunun elektrokimyasal özellikleri, modifikasyonda kullanılan materyallerin miktarına bağlıdır ve bu nedenle miktar optimizasyonu da önemlidir. PNR miktarını yani film kalınlığını belirleyen, döngü sayısının optimizasyonu bir önceki kısımda anlatılmıştı. Çalışmanın bundan sonraki kısımda YBCE/MWCNT/AuNP kompozit elektrodundaki diğer iki materyal olan MWCNT ve AuNP’nin miktar optimizasyonlarından bahsedilecektir.

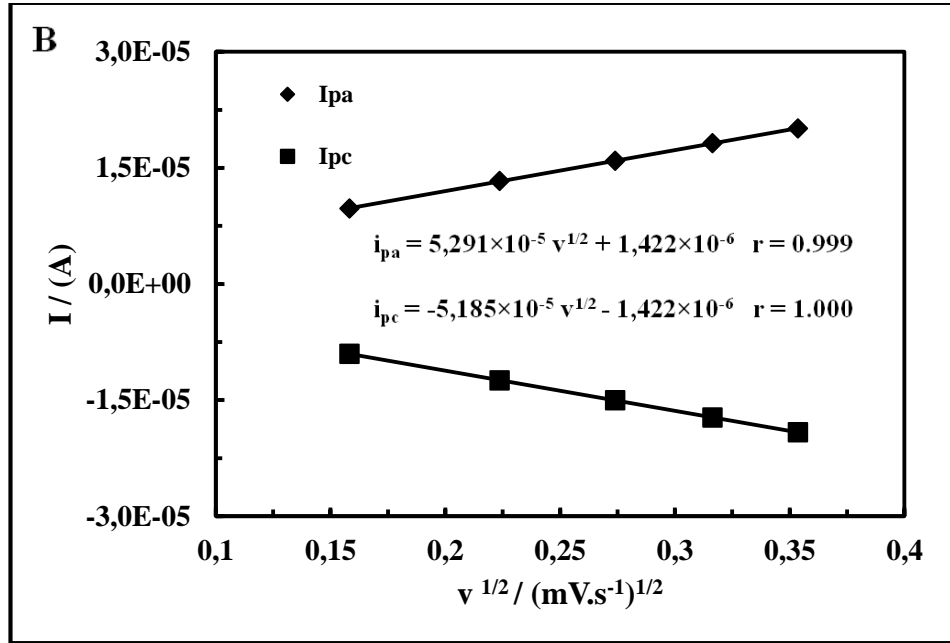
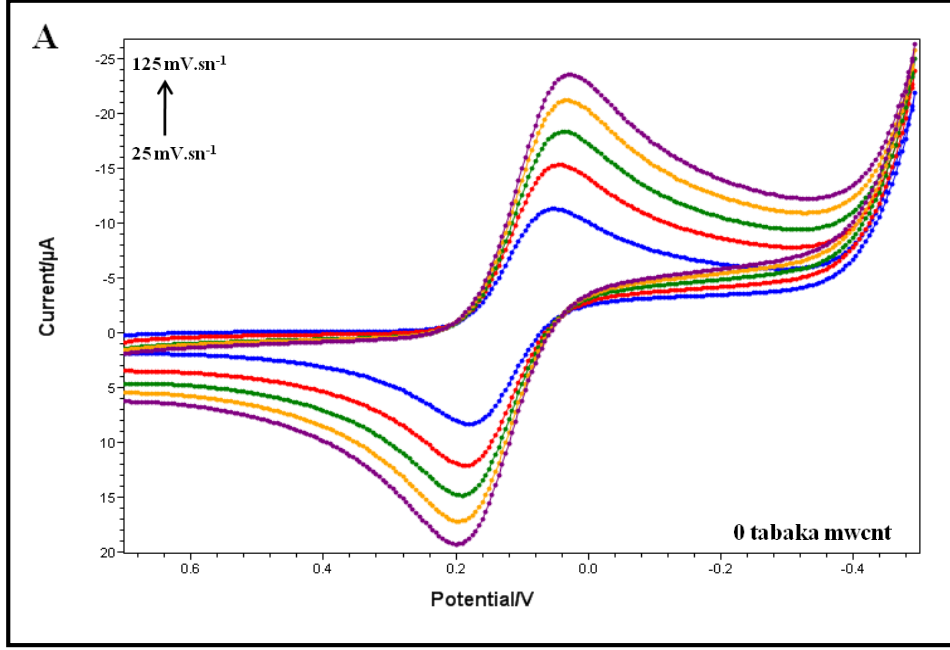
##### 4.4.1. MWCNT’nin miktar optimizasyonu

CNT’ler ile elektrotların modifikasyonlarının iyi olması için farklı parametreler de düşünülmelidir. CNT miktarı genellikle optimize edilmez. Ancak yetersiz CNT miktarı elektrot yüzeyinin doğasının karışık bir davranış göstermesine neden olabilir. CNT’nin aşırısı da analitik amaçlar için bazı dezavantajlar sebep olabilir. CNT miktarının artmasıyla elektroaktif yüzey alanı artarak faradik akımın artmasına ve buna paralel olarak da kalibrasyonların hassasiyetinin artmasını sağlar. Bu avantajlara karşın, CNT miktarının artışı, kapasitif akımın da artmasına ve akım değerlerinin düşmesine neden olabilir (Lamas-Ardisana vd 2008). Bu sebeple, YBCE üzerinde MWCNT miktarının optimizasyonu oldukça önemlidir. YBCE’lerin, MWCNT ile modifiye edilmesinden sonra YBCE/MWCNT elektrodu üzerinde önce AuNP’nin, sonrasında da PNR’nin modifikasyonu yapılacaktır. Bu sebeple ilk olarak MWCNT’nin miktar optimizasyonu yapılmıştır. MWCNT’nin optimum miktarını belirlemek için YBCE yalın elektrotları, tabaka tabaka (layer by layer) metodu ile 1, 2, 3, 4 ve 5 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiştir. MWCNT ile modifiye edilen YBCE’lerin karakterizasyonu için 1 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  içerisinde 100  $\text{mV.s}^{-1}$  tarama hızında + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında döngüsel voltametri uygulanmış ve Şekil 4.30’de verilmiştir.

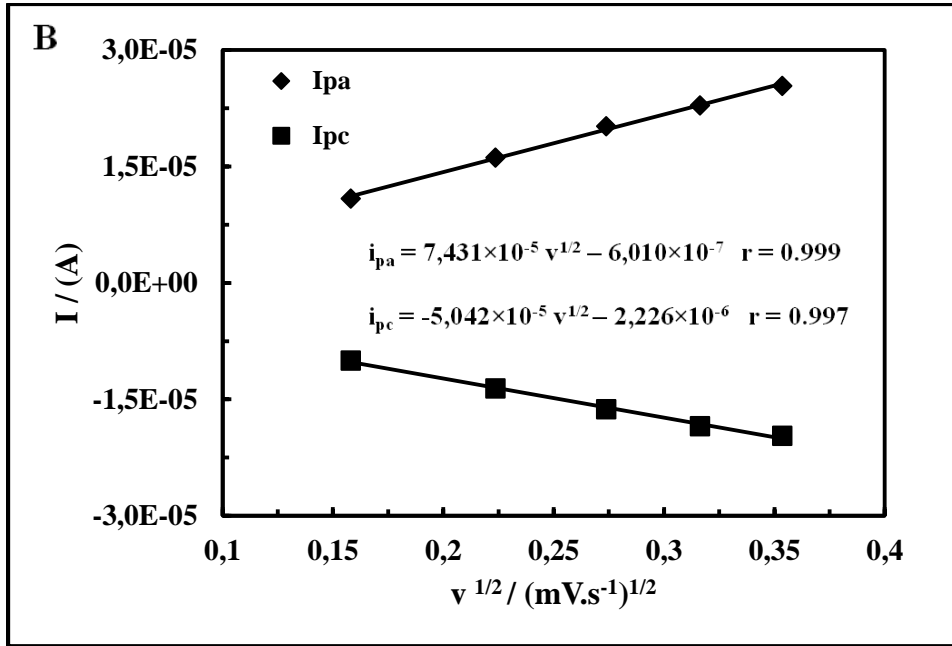
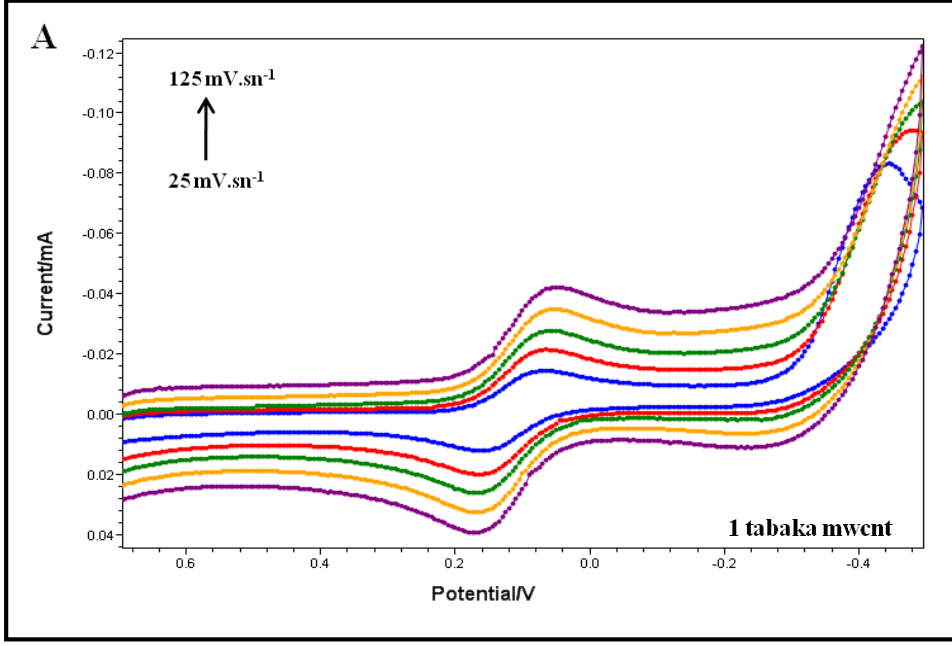


Şekil 4.30. 1mM  $K_3Fe(CN)_6$  içerisinde tabaka tabaka MWCNT (tabaka sayısı: 0, 1, 2, 3, 4 ve 5) ile modifiye edilmiş YBCE elektrotlarının  $100 \text{ mV.s}^{-1}$  tarama hızında +0,7 V ile -0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları

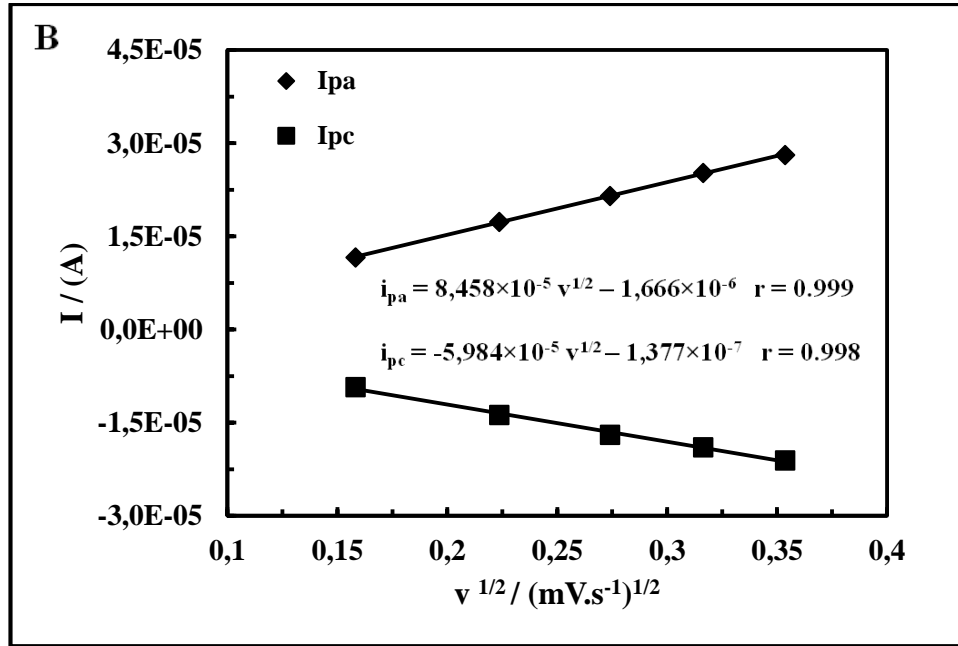
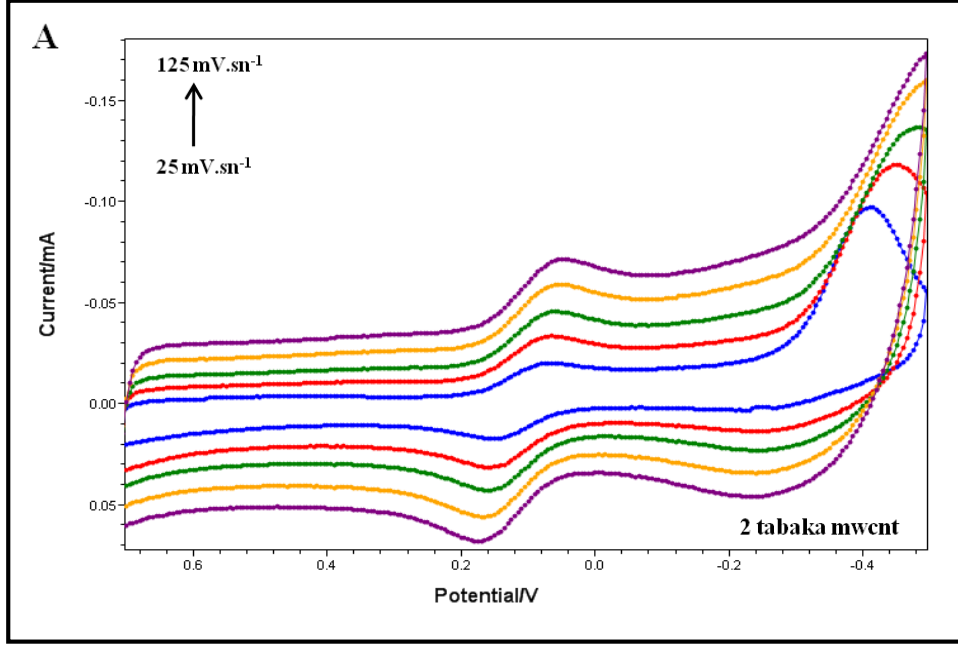
Optimum tabaka sayısını belirlemek için farklı tabaka sayılarında hazırlanmış olan YBCE/MWCNT elektrotlarına, 1mM  $K_3Fe(CN)_6$  içerisinde farklı tarama hızlarında döngüsel voltametri uygulanmıştır. Her bir farklı tabaka sayısında hazırlanan YBCE elektrotları için elde edilen döngüsel voltamogramlar Şekil 4.31 (A), 4.32 (A), 4.33 (A), 4.34 (A), 4.35 (A), ve 4.36 (A)'de verilmiştir. Farklı tabaka sayılarında MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE elektrotları için, 1 mM  $K_3Fe(CN)_6$ 'nin tarama hızının kareköküne karşı döngüsel voltamogramlardan elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.31 (B), 4.32 (B), 4.33 (B), 4.34 (B) 4.35 (B) ve 4.36 (B)). Grafikler incelendiğinde,  $I_{pa}$  ve  $I_{pc}$  değerlerinin, tarama hızlarının karekökü ile doğrusal olarak değiştiği tüm YBCE'lerde gözlenmiştir. Böylelikle YBCE elektrotlarında gerçekleşen reaksiyonlar difüzyon kontrollüdür. Tarama hızının karekökü ile pik akımları arasındaki doğrusal ilişkiler incelendiğinde, en yüksek hassasiyetin 3 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE'de olduğu görülmektedir. Tabaka sayısı 4 olduğunda hassasiyet azalmış, 5 olduğunda ise hassasiyette artış olmasına rağmen doğrusallıkta bir azalma meydana gelmiştir. MWCNT'nin tabaka sayısı 5 olduğunda, anodik ve katodik pik potansiyelleri arasındaki fark tarama hızının artmasıyla birlikte artmıştır. YBCE yüzeyindeki MWCNT miktarının artmasıyla faradik akımdaki artışla birlikte kapasitif akım da artmış ve bunu sonucunda pik akımlarında da bir azalma meydana gelmiştir. Pik akımlarındaki azalmanın en belirgin olduğu elektrot, 5 tabaka MWCNT ile modifiye edilen elektrottur.



Şekil 4.31. A) 1mM  $K_3Fe(CN)_6$  içerisinde YBCE elektrodunun (0 tabaka MWCNT) + 0,7 V ile -0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 75, 100, 125  $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-tarama hızının karekökü grafikleri

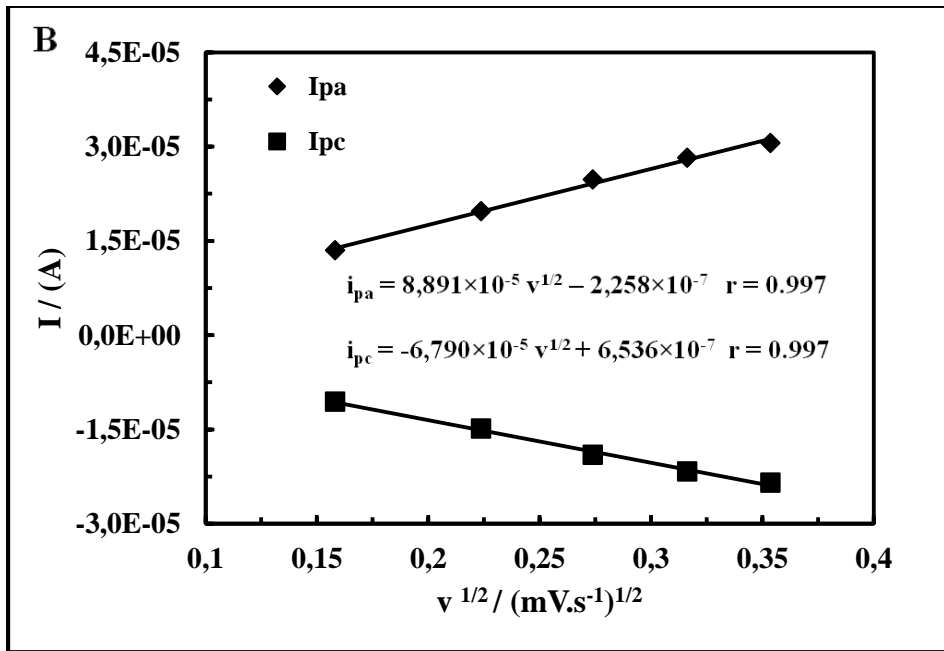
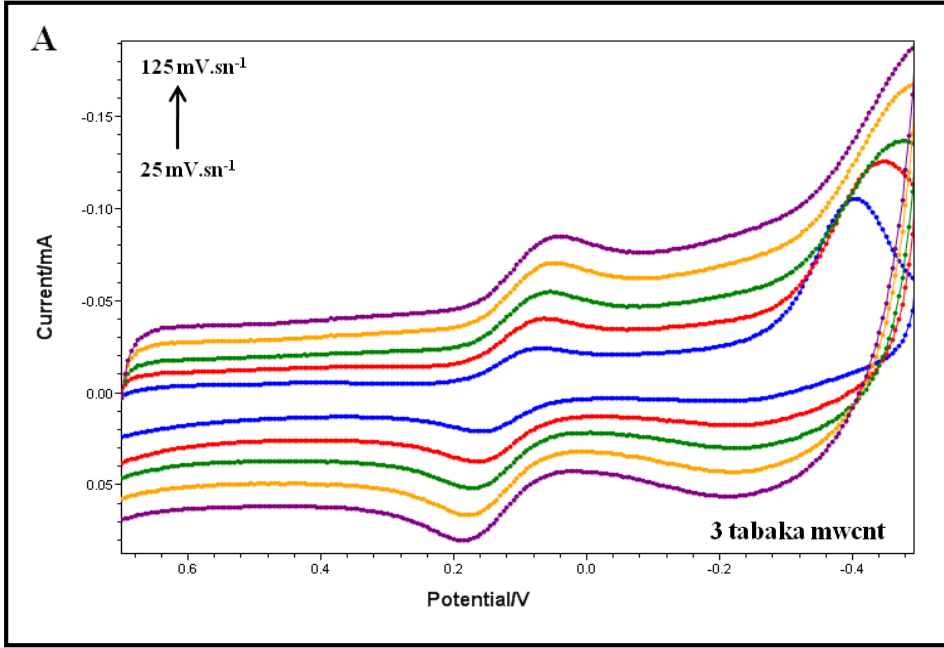


Şekil 4.32. A) 1mM  $K_3Fe(CN)_6$  içerisinde 1 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 75, 100, 125  $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı- karekök tarama hızı grafikleri

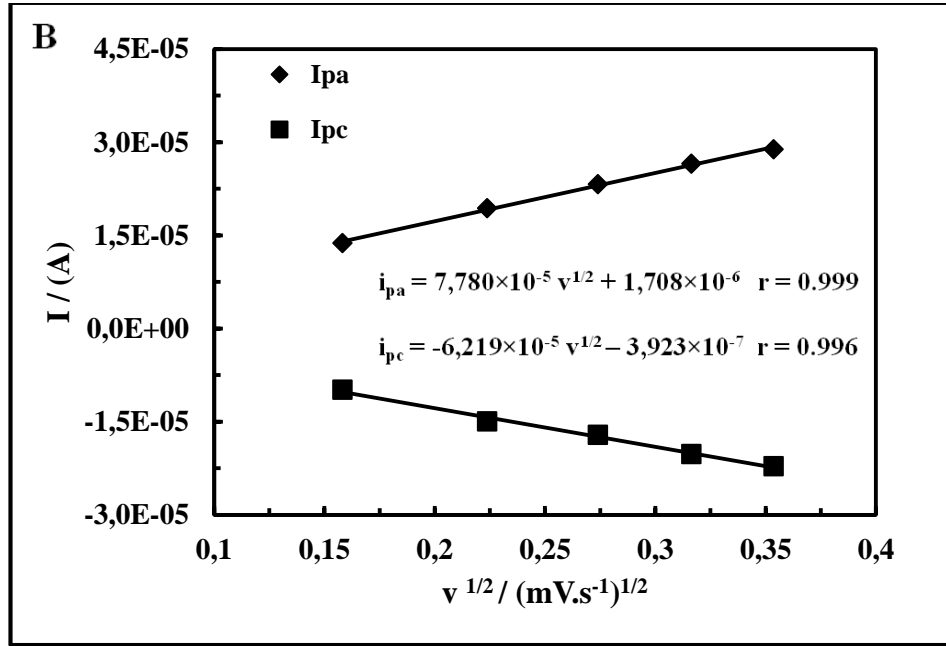
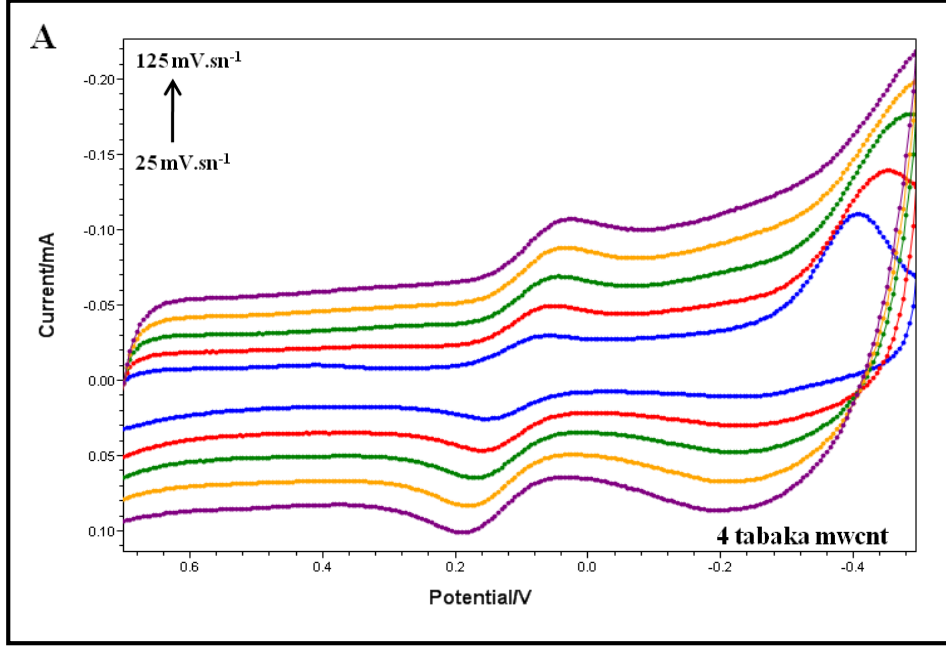


Şekil 4.33. A) 1mM  $K_3Fe(CN)_6$  içerisinde 2 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 100, 125  $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri

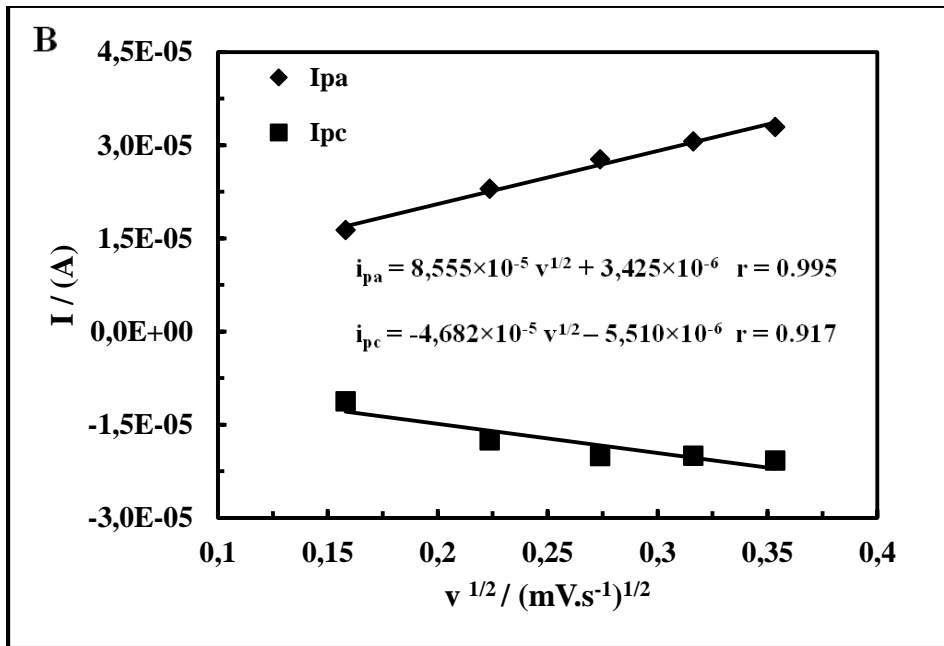
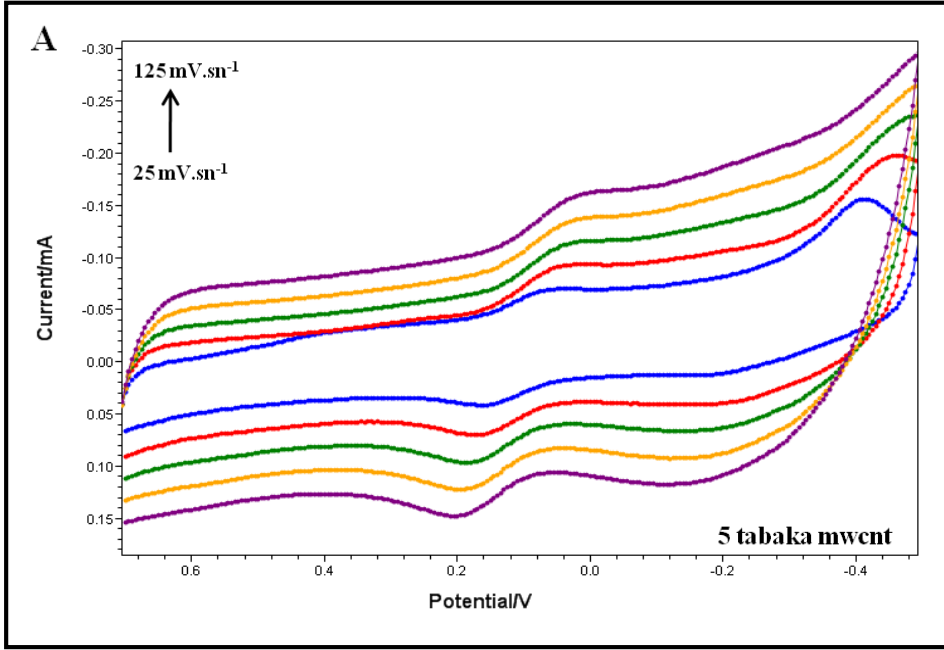




Şekil 4.34. A) 1mM  $K_3Fe(CN)_6$  içerisinde 3 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 75, 100, 125  $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri



Şekil 4.35. A) 1mM  $K_3Fe(CN)_6$  içerisinde 4 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 75, 100, 125  $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri



Şekil 4.36. A) 1mM  $K_3Fe(CN)_6$  içerisinde 5 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 75, 100, 125  $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri

Şekil 4.30'da 100  $mV.s^{-1}$  tarama hızındaki döngüsel voltamogramlardan elde edilen  $E_{pa}$ ,  $I_{pa}$ ,  $I_{pa}/I_{pc}$  ve  $\Delta E_p$  değerleri ve elektroaktif yüzey alanı değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir. YBCE'lerin elektroaktif yüzey alanı değerleri Randles-Sevcik eşitliğinden hesaplanmıştır. Randles-Sevcik eşitliğinde;

$$i_p = 2,96 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (4.1)$$

$i_p$  pik akımı (A),  $n$  alınan verilen elektron sayısı,  $A$  elektrot yüzey alanı ( $\text{cm}^2$ ),  $D$  difüzyon katsayısı ( $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $C$  konsantrasyon ( $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) ve  $v$  ise tarama hızıdır ( $\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$ ).  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  için difüzyon katsayısı  $7,63 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  dir (Bard ve Faulkner 2001).

Çizelge 4.6 incelendiğinde, yalın YBCE elektrodunun 1 tabaka MWCNT ilavesiyle anodik pik potansiyeli ( $E_{pa}$ ) + 0,20 V'dan + 0,160 V'a düşmüştür. Tabaka sayısının artışı ile  $E_{pa}$  değeri artmaya başlamıştır. En yüksek anodik pik akımı ( $I_{pa}$ ), 3 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE'de gözlenmiştir.  $I_{pa}$  değerleri, elektroaktif yüzey alanı ile doğru orantılı olarak artar. Yalın YBCE'de 1'e en yakın  $I_{pa}/I_{pc}$  değeri elde edilirken, ikinci en yakın değer 3 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE'de elde edilmiştir. Düşük  $\Delta E_p$  değerlerinde elektron transferinin hızlı olduğu bilinmektedir. Yüksek  $\Delta E_p$  değerleri, elektrot ve analit arasındaki elektron transferinin yavaş olduğu zaman meydana gelir. Bu durumda yük transfer kinetiği yavaş ilerler.  $\Delta E_p$  değerlerindeki en küçük değer 1 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE'de gözlenmiş olmasına rağmen, 2 ve 3 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE'lerle elde edilen  $\Delta E_p$  değerlerine yakındır. En yüksek yüzey alanına sahip elektrot ise 3 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE'dir.  $I_{pa}$  değerleri, yüzey alanları ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Tüm değerler göz önüne alındığında 3 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş elektrot ile elde edilen değerlerin, elektroaktif yüzey alanının yüksek olması da göz önüne alınarak, analitik uygulamalar için daha uygun olduğuna karar verilmiştir. Böylelikle optimum MWCNT miktarının 3 tabaka MWCNT ile modifiye edilmesi ile elde edildiği sonucuna varılmıştır. Çalışmanın bundan sonraki kısmında YBCE elektrotları 3 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiştir.

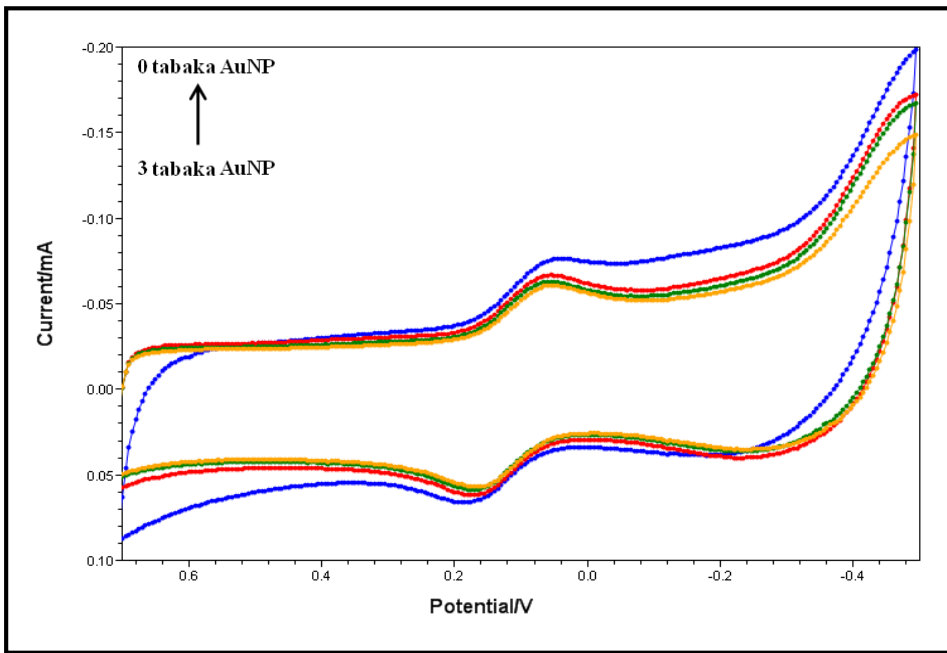
Çizelge 4.6. Farklı tabakalarda MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE'lerin  $100 \text{ mV} \cdot \text{sn}^{-1}$  tarama hızındaki döngüsel voltametriden elde edilen  $E_{pa}$ ,  $I_{pa}$ , yüzey alanı,  $\Delta E_p$ , ve  $I_{pa}/I_{pc}$  değerleri

Tabaka sayısı	$E_{pa}$ (V)	$I_{pa}$ ( $\mu\text{A}$ )	Yüzey alanı ( $\text{cm}^2$ )	$I_{pa}/I_{pc}$	$\Delta E_p$ (V)
0	+ 0,200	17,11	0,071	1,11	0,165
1	+ 0,160	22,86	0,100	1,24	0,095
2	+ 0,165	25,23	0,113	1,31	0,100
3	+ 0,175	28,22	0,119	1,16	0,115
4	+ 0,180	26,52	0,114	1,31	0,135
5	+ 0,190	27,43	0,115	1,53	0,160

#### 4.4.2. AuNP'nin miktar optimizasyonu

Optimum MWCNT miktarında hazırlanan YBCE/MWCNT elektrotları üzerinde AuNP'nin modifikasyonu yapılmış ve YBCE/MWCNT/AuNP hibrit elektrodu hazırlanmıştır. AuNP'nin YBCE/MWCNT yüzeyine modifikasyonu sonucu oluşan hibrit elektrodun elektroaktif yüzey alanı ve elektronik iletkenliği, AuNP'nin ve MWCNT'nin sinerjik etkileşimi sonucu arttığı daha önceki kısımlarda gözlenmiş ve bu sinerjik etki bölüm 4.2'de açıklanmıştı. MWCNT/AuNP hibriti önemli bir sinerjik etki

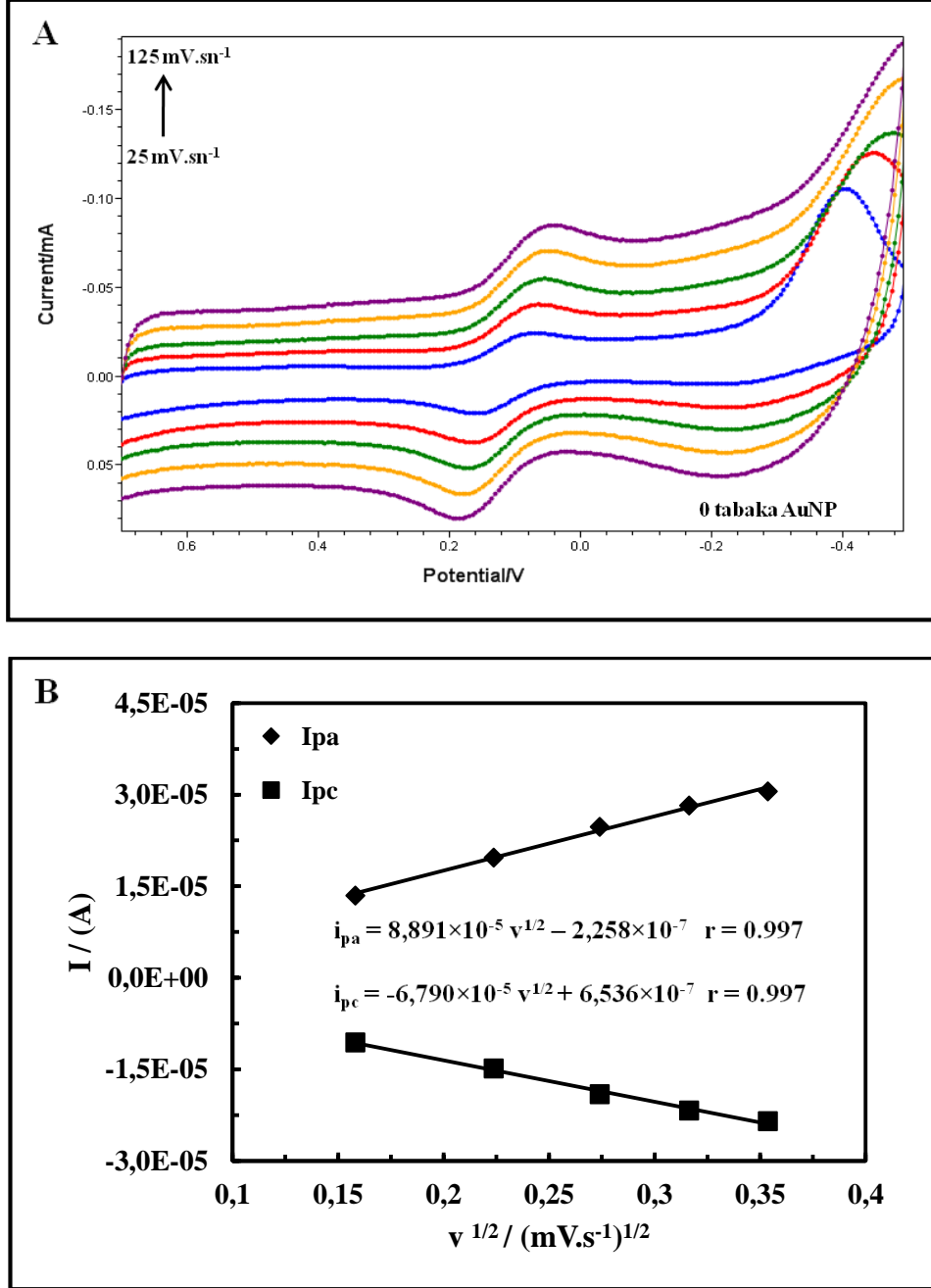
yaratmış olsa da, AuNP bir metal nanoparçacık olduğu için, elektrik akımında bir direnç yaratacak ve bunun sonucunda akımın azalmasına neden olacaktır. Bu sebeple MWCNT/AuNP hibritindeki AuNP'nin optimum miktarının belirlenmesi de oldukça önemlidir. Bu amaçla optimum miktarda hazırlanmış olan YBCE/MWCNT elektrodu yüzeyinde AuNP'nin modifikasyonu, tabaka tabaka metodu ile 1, 2 ve 3 tabaka AuNP olacak şekilde YBCE/MWCNT/AuNP hibrit elektrotları hazırlanmıştır. Karakterizasyon için YBCE/MWCNT/AuNP elektrotlarına 1 mM  $K_3Fe(CN)_6$  içerisinde  $100 \text{ mV.s}^{-1}$  tarama hızında + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında döngüsel voltametri uygulanmıştır. Şekil 4.37'de verilen döngüsel voltamogramlara göre tabaka sayısı arttıkça, hem anodik hem de katodik pik akımları AuNP olmayan elektroda göre artmıştır. YBCE/MWCNT/AuNP hibrit elektrodunda gözlenen bu davranış, nanoparçacıkların yarattığı sinerjik etkinin bir sonucudur.



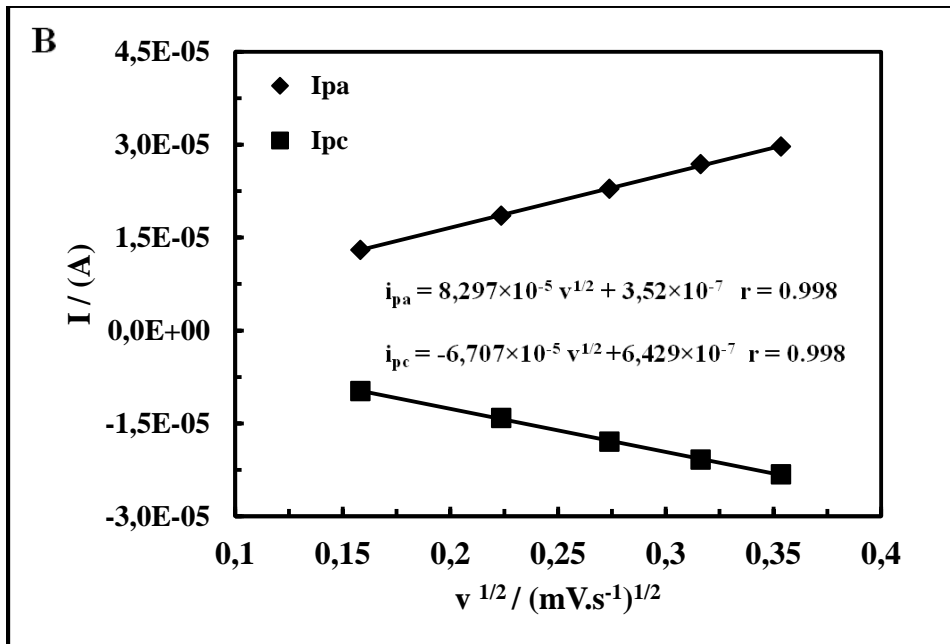
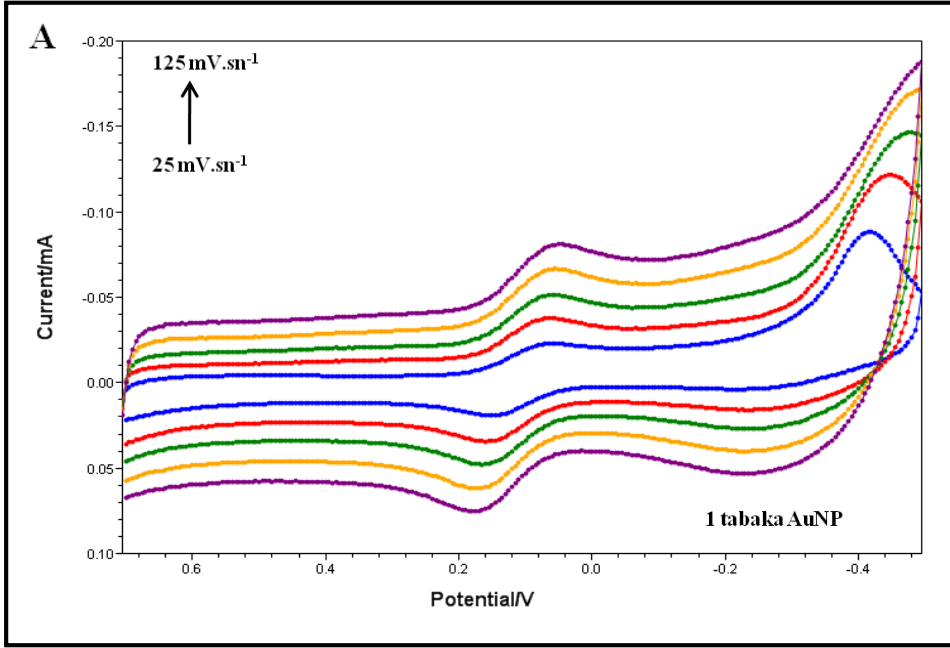
Şekil 4.37. 1 mM  $K_3Fe(CN)_6$  içerisinde tabaka tabaka AuNP (tabaka sayısı: 0, 1, 2 ve 3) ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT elektrotlarının  $100 \text{ mV.s}^{-1}$  tarama hızında + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları

Optimum tabaka sayısını belirlemek için YBCE/MWCNT/AuNP elektrotlarına 1mM  $K_3Fe(CN)_6$  içerisinde farklı tarama hızlarında döngüsel voltametri uygulanmıştır. Her bir farklı tabaka sayısında hazırlanan YBCE elektrotları için elde edilen döngüsel voltamogramlar Şekil 4.38 (A), 4.39 (A), 4.40 (A) ve 4.41 (A)'da verilmiştir. Farklı tabaka sayılarında MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE elektrotları için, 1 mM  $K_3Fe(CN)_6$ 'nin tarama hızının kareköküne karşı döngüsel voltamogramlardan elde edilen anodik ve katodik pik akımlarının grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.38 (B), 4.39 (B), 4.40 (B) ve 4.41 (B)). Grafikler incelendiğinde,  $I_{pa}$  ve  $I_{pc}$  değerlerinin, tarama hızlarının karekökü ile doğrusal olarak değiştiği tüm YBCE'lerde gözlenmiştir. Böylelikle YBCE elektrotlarında gerçekleşen reaksiyonlar difüzyon kontrollüdür. Tarama hızının karekökü ile pik akımları arasındaki doğrusal ilişkiler incelendiğinde, en yüksek hassasiyetin 0 tabaka AuNP ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT'de olduğu

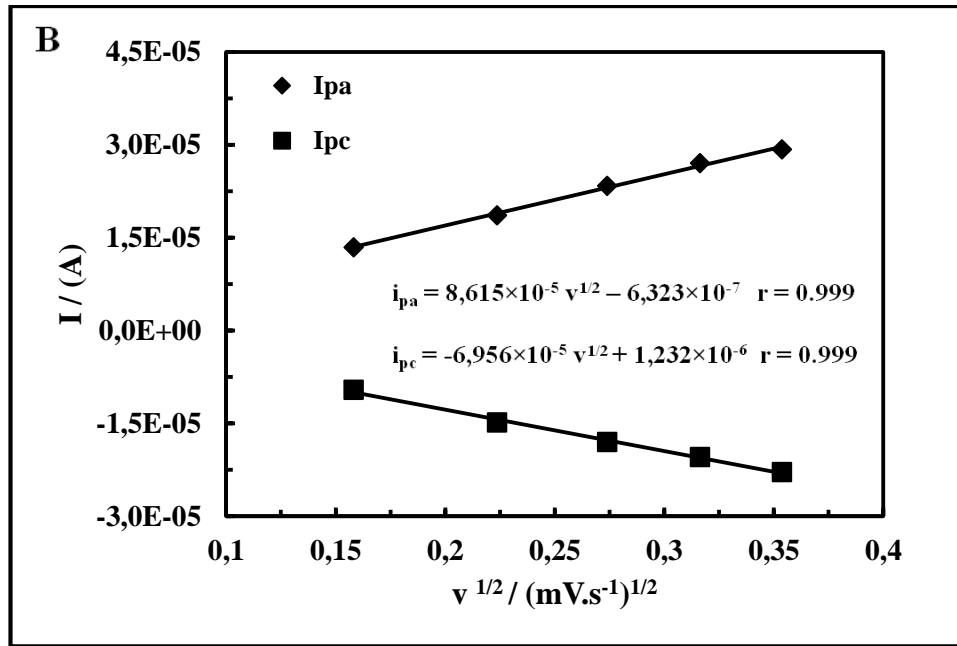
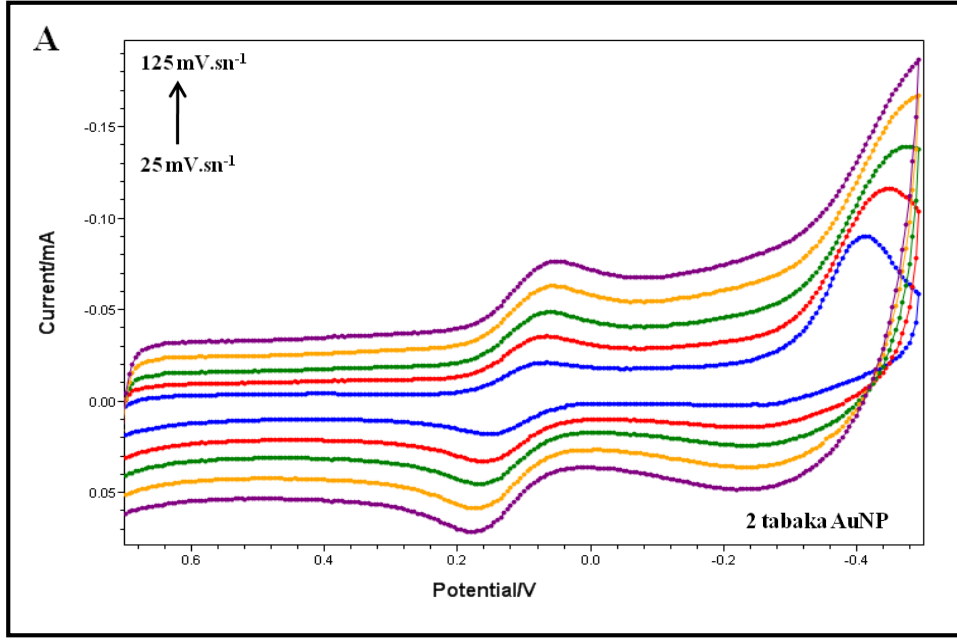
görülmektedir. Ancak YBCE/MWCNT'ler AuNP ile modifiye edildiğinde tüm YBCE'lerde faradik akımın 0 tabaka AuNP'ye göre arttığı, kapasitif akımın ise azaldığı döngüsel voltametriden anlaşılmıştır. AuNP'nin varlığı duyarlılığı ve pik potansiyellerindeki ayrımın daha iyi tanımlanmasını sağlamıştır.



Şekil 4.38. A) 1 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> içerisinde YBCE/MWCNT elektrodunun (0 tabaka AuNP) + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 100, 125 mV.s<sup>-1</sup>) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri

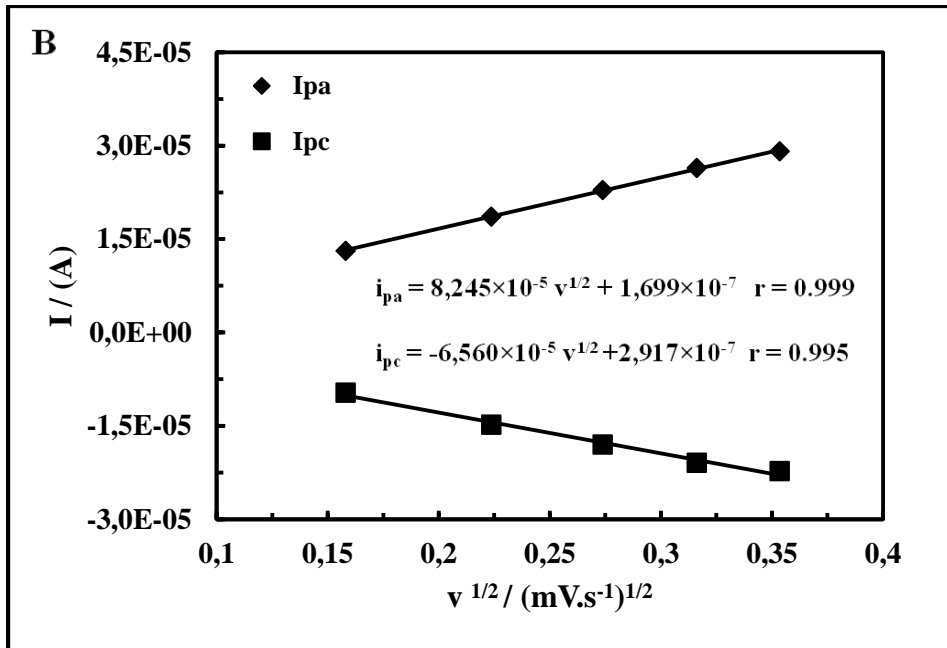
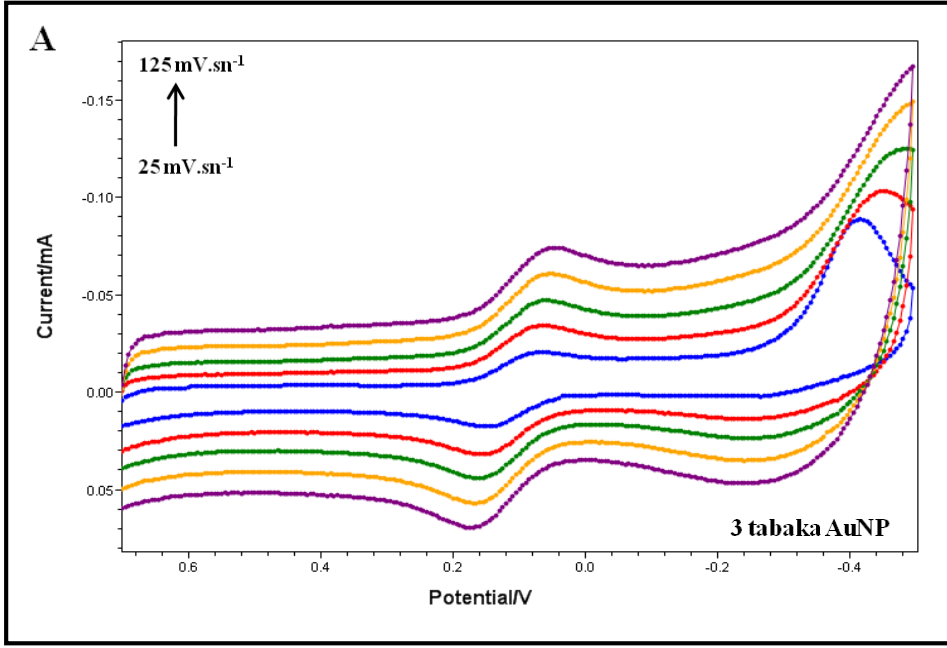


Şekil 4.39. A) 1 mM  $K_3Fe(CN)_6$  1 tabaka AuNP ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT/AuNP elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 100, 125  $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri



Şekil 4.40. A) 1 mM  $K_3Fe(CN)_6$  2 tabaka AuNP ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT/AuNP elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 100, 125  $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri





Şekil 4.41. A) 1 mM  $K_3Fe(CN)_6$  3 tabaka AuNP ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT/AuNP elektrodunun + 0,7 V ile - 0,5 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı: 25, 50, 100, 125  $mV.s^{-1}$ ) B) A'da verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen pik akımı-karekök tarama hızı grafikleri

Şekil 4.37'de verilen döngüsel voltamogramlardan elde edilen  $E_{pa}$ ,  $I_{pa}$ , elektroaktif yüzey alanı,  $I_{pa}/I_{pc}$  ve  $\Delta E_p$  değerleri Çizelge 4.7'de verilmiştir. AuNP'nin formülasyona girmesi ile  $I_{pa}$  değerinde bir artış gözlenmiş olmasına rağmen, bu artışın MWCNT'ye oranla daha az olduğu görülmektedir. YBCE/MWCNT/AuNP elektrodundaki bu davranışın, AuNP'nin bir metal nanoparçacık olması nedeniyle

yarattığı direnç ile akımı azaltmasının bir sonucu olduğu düşünülmüştür. AuNP'nin tabaka sayısı arttıkça akımın artış hızında bir azalma görülmektedir. AuNP'nin YBCE/MWCNT elektrodundaki varlığı pik potansiyelinde de azalmaya neden olmuştur ve tabaka sayısının artışı ile çok fazla değişmemiştir. En yüksek yüzey alanına sahip elektrot ise 2 tabaka AuNP ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT'dir.  $I_{pa}$  değerleri, yüzey alanları ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Çizelge 4.7'de verilen tüm değerler göz önüne alındığında 2 tabaka AuNP ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT elektrotları ile elde edilen değerlerin, elektroaktif yüzey alanının yüksek olması da göz önüne alınarak, analitik uygulamalar için daha uygun olduğuna karar verilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak optimum AuNP miktarının 2 tabaka olduğuna karar verilmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısmında 3 tabaka MWCNT ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT elektrotları, 2 tabaka AuNP ile modifiye edilmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı tabakalarda AuNP ile modifiye edilmiş YBCE/MWCNT'lerin 100  $mV.sn^{-1}$  tarama hızındaki döngüsel voltametriden elde edilen  $E_{pa}$ ,  $I_{pa}$ , yüzey alanı,  $\Delta E_p$ , ve  $I_{pa}/I_{pc}$  değerleri

Tabaka sayısı	$E_{pa}$ (V)	$I_{pa}$ ( $\mu A$ )	Yüzey alanı ( $cm^2$ )	$I_{pa}/I_{pc}$	$\Delta E_p$ (V)
0	+ 0,175	28,22	0,119	1,16	0,115
1	+ 0,170	29,15	0,121	1,14	0,110
2	+ 0,170	29,56	0,125	1,12	0,110
3	+ 0,165	28,43	0,120	1,15	0,100

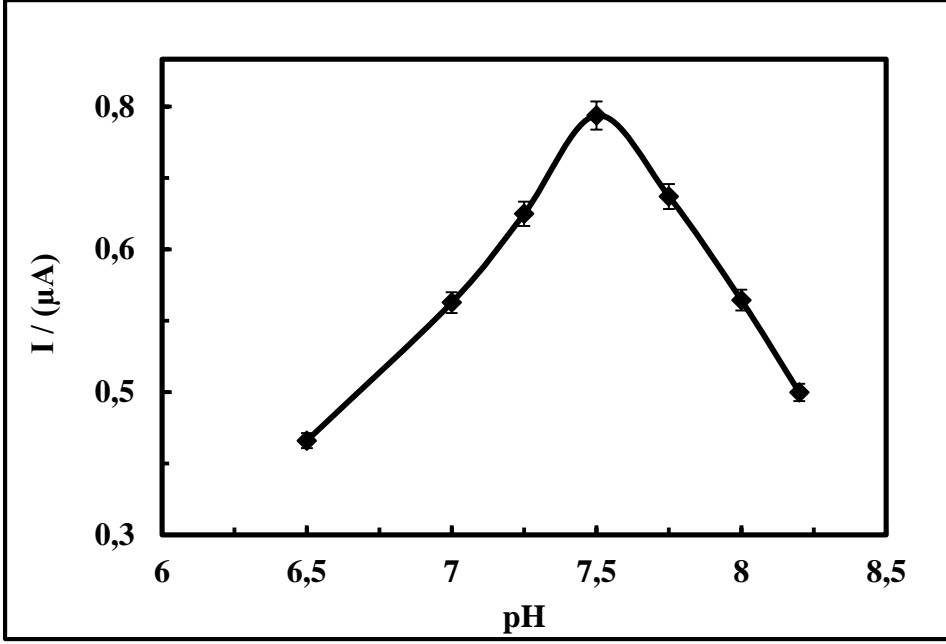
DropSens firmasından temin edilmiş olan yalın YBCE'lerin elektrokimyasal yüzey alanı  $0,071 cm^2$  olarak hesaplanmıştı (Çizelge 4.6). Bu yüzey alanından hesaplanan yalın YBCE elektrodunun geometrik yarıçapı 1,5 mm'ye eşit olur. DropSens elektrotlarının yarıçaplarının 2 mm olduğu dikkate alınır, yalın YBCE'de hesaplanan bu değer nedeniyle şöyle açıklanabilir: Elektrot yüzeyindeki olası kirlilikler veya karbon mürekkebindeki organik bağlayıcılar tarafından karbon, kısmi olarak etkisizleşmiştir. YBCE'ler kullanılmadan önce elektrokimyasal ön işlem uygulanarak temizlenmiş ve elektrot yüzeyinin aktivasyonu yapılmıştı. Elektrokimyasal ön işlemin yapılmasına rağmen, YBCE'lerdeki karbonun yeterli derecede aktive olmadığı anlaşılmaktadır. 3 tabaka MWCNT ile modifikasyon sonrası elektroaktif yüzey alanı  $0,119 cm^2$ 'ye artmış ve hesaplanan yarıçap 1,95 mm olarak bulunmuştur. YBCE/MWCNT'lerin 2 tabaka AuNP ile modifikasyonu sonrasında ise elektroaktif yüzey alanı  $0,125 cm^2$ , yarıçap ise (1,995 mm yaklaşık 2 mm) olarak hesaplanmıştır. YBCE'lerin nanoparçacık ile modifikasyonu ile elektroaktif yüzey alanı yalın YBCE'lere göre yaklaşık % 60 oranında artmıştır.

#### 4.5. Amperometrik NADH Tayinine İlişkin Bulgular

Çalışmamızda hazırladığımız YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodun NADH'nin yükseltgenmesine karşı gösterdiği yüksek elektrokatalitik etki, yüksek elektronik iletkenlik ve yüksek duyarlılık, bu elektrodun NADH'nin amperometrik tayininde sensör olarak kullanılması için bir yeniliktir. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodunun NADH'nin amperometrik tayininde sensör olarak kullanımı ile ilgili yapmış olduğumuz çalışmalardan bahsedilecektir.

#### 4.5.1. pH optimizasyonu

Amperometrik NADH tayini için destek elektrolit olarak kullanılan fosfat tamponunun optimum pH'sını belirlemek için, 50 mM derişiminde farklı pH'larda (6,5 ile 8,2 aralığında) fosfat tampon çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir farklı pH'ya sahip tampon çözeltiler kullanılarak 100  $\mu$ M sabit derişimde NADH çözeltileri hazırlanmış ve bu NADH çözeltilerinin + 0,2 V'daki akımları ölçülmüştür. Elde edilen akım değerlerine karşı pH grafiğı çizilmiş ve Şekil 4.42'de verilmiştir.

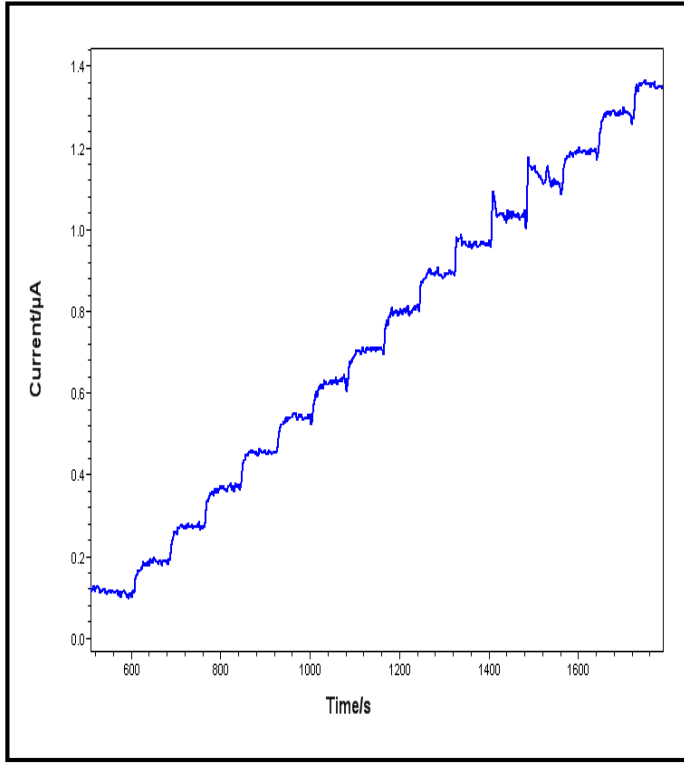


Şekil 4.42. Farklı pH'lardaki 100  $\mu$ M NADH çözeltisinin, YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu kullanılarak elde edilen akımlara karşı pH grafiğı (+ 0,2 V, 0,1 M KCl)

6,5'dan 7,5'a pH arttıkça, pik akımının arttığı, pH 7,5'dan sonra ise hızla azaldığı Şekil 4.42'deki grafikten görülmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak optimum pH değerinin 7,5 olduğu belirlenmiştir. NADH'nin yüksek alkali pH çözeltilerinde karasız olduğu ve hemen bozunduğı bilinmektedir. NADH'nin amperometrik tayininde bundan sonraki ölçümler 50 mM pH 7,5 fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir.

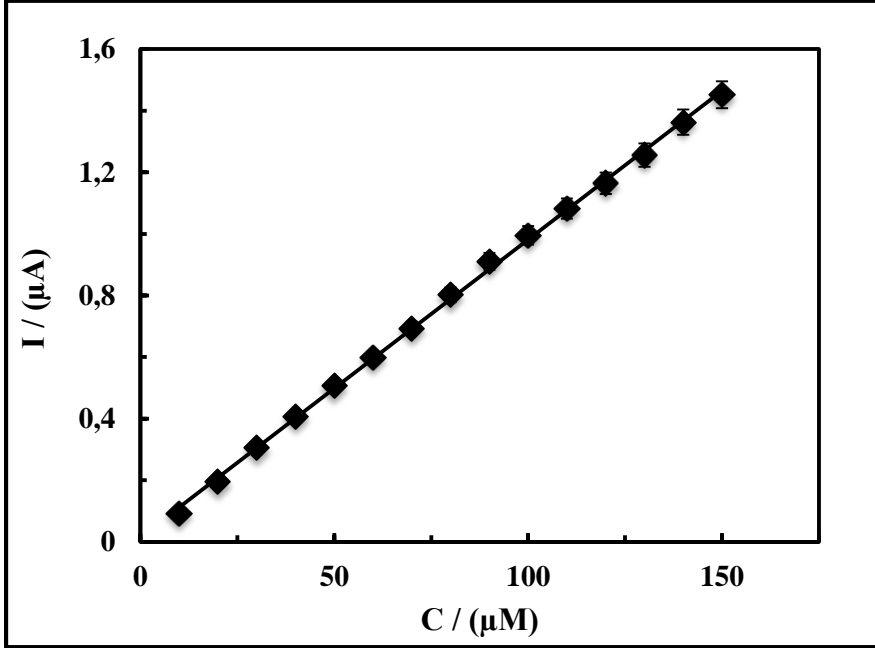
#### 4.5.2. Analitiksel karakterizasyon

NADH'nin YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu ile amperometrik tayini, içerisinde 8 ml 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu bulunan elektrokimyasal hücrede, çözeltinin sabit hızda sürekli karıştırıldığı şartlarda + 0,2 V'da gerçekleştirilmiştir. Akım kararlı hale geldikten sonra, 10  $\mu$ M NADH elektrokimyasal hücreye ardışık olarak katılmış ve zamana karşı akım değerleri potantiyostat tarafından kaydedilmiştir. Şekil 4.43'de NADH'nin amperometrik tayini için elde edilen örnek bir kronoamperogram verilmiştir. NADH ilavesiyle zamanla akımda bir artış olduğu kronoamperogramdan anlaşılmaktadır.



Şekil 4.43. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodunda 10  $\mu\text{M}$  NADH'nin ardışık katımı ile elde edilen kronoamperogram (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

NADH konsantrasyonu ile artan akım değerleri kullanılarak NADH'nin kantitatif tayini yapılabilir. NADH amperometrik tayini sonucu kronoamperogramlardan elde edilen akım değerlerinin NADH'nin konsantrasyonuna karşı çizilen grafiği Şekil 4.44'de verilmiştir. NADH miktarının artması ile akım değerleri de doğru orantılı olarak artmıştır.



Şekil 4.44. YBCE/MWCNT/AuNP elektrodunda NADH derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

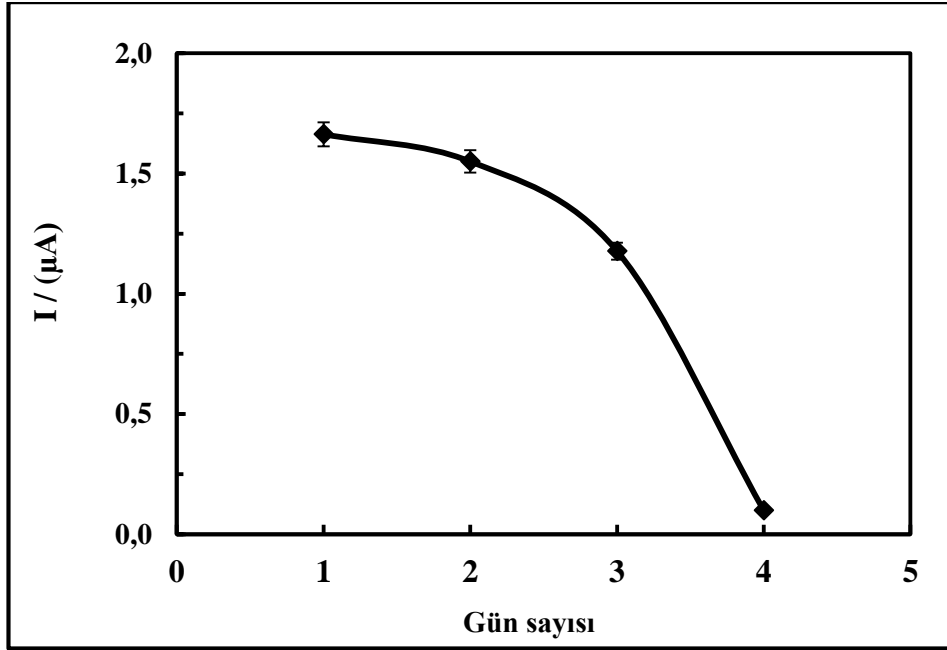
NADH'nin amperometrik tayini için kullanılan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodunun analitiksel karakterizasyonu için gözlemlenebilme ve tayin sınırı, duyarlık ve tekrarlanabilirlik gibi parametreler belirlenmiş ve Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. NADH'nin amperometrik tayini için YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodunda elde edilen analitiksel parametreler

Tayin sınırı	4,82 μM
Gözlemlenebilme sınırı	16,07 μM
Doğrusal aralık	16,07 μM – 150 μM
Duyarlık	15,82 μA.mM <sup>-1</sup>
Tekrarlanabilirlik	RSD % 2,55 (n=10), 100 μM NADH

Çizelge 4.8 incelendiğinde, YBCE/MWCNT/AuNP/PNR sensörünün duyarlığının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Duyarlığın yüksek olması, elektroaktif yüzey alanının ve elektronik iletkenliğin artmasıyla, elektron transferinin hızlı olması nedeniyledir. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu ile NADH'nin amperometrik tayininin ardışık katım ile yapılabilmesi, özellikle MWCNT'nin sahip olduğu anti-fouling etkisi nedeniyledir. Bu etki NAD<sup>+</sup>'nin yüksek aşırı potansiyelde meydana gelen tersinmez reaksiyonları sonucu elektrot yüzeyinde biriken kirlilikleri önlemesiyle oluşur. + 0,2 V'da 100 μM NADH sensörünün tekrarlanabilirliği test edilmiş ve bağıl standart sapma (R.S.D.) % 2,55 olarak hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlik için hesaplanan RSD değeri, 10 tekrara kadar NADH'nin amperometrik tayininin iyi olduğunu göstermektedir.

YBCE/MWCNT/AuNP/PNR sensörünün kararlılığı, 7 gün boyunca 100  $\mu\text{M}$  derişiminde NADH'nin akımının ölçülmesiyle test edilmiştir. Ölçülen akım-gün sayısı arasındaki ilişkiyi gösteren grafik Şekil 4.45'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde, NADH sensörünün kararlılığının 3. günde azalmaya başladığı, 4. günün sonunda ise ölçülen akım değerlerinin iyice azaldığı görülmektedir. 4. günden sonra ise gürültü arttığı için amperometrik ölçüm yapılamamıştır. Her ölçüm 3'er kere yapıldığı için, kararlılıktaki bu hızlı azalışın ölçüm sayısı ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Çünkü YBE'ler, tek kullanımlık elektrot olarak üretilmektedir.



Şekil 4.45. YBCE/MWCNT/AuNP kompozit elektrodunun 100  $\mu\text{M}$  NADH derişimine karşı elde edilen akım değerleri-gün sayısı grafiği (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

#### 4.6. Enzimlerin Tutuklanması İçin Uygun Yöntemin Belirlenmesi

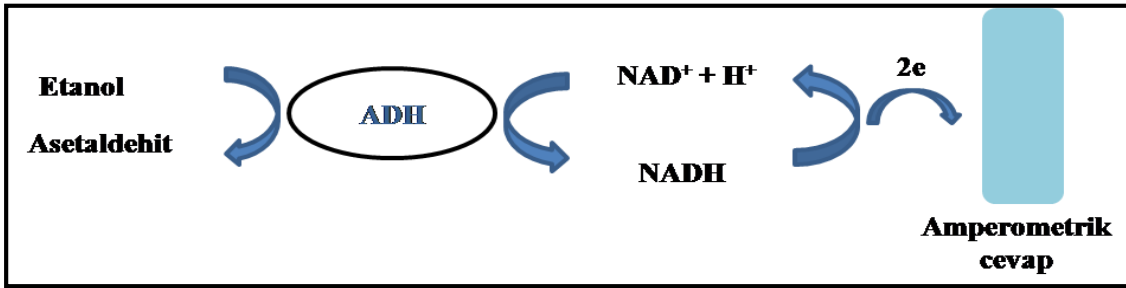
AOx ve ADH enzimlerinin YBE yüzeyine tutuklanması için birkaç farklı yöntem (Nafion membran ile hapsetme, GA ile çapraz bağlama, jelâtin ile tutuklama, fiziksel adsorpsiyon) denenmiştir. Ancak bu yöntemlerde enzimler, seramik yüzey üzerine basılmış olan yüzey baskılı elektrotlardan zamanla ayrılmıştır. Özellikle kesikli analizde YBE'ler ile hazırlanan biyosensörler çözelti içine daldırıldığında, biyomateryalin elektrot yüzeyinden ayrılmaması için kuvvetli bir tutuklamanın olması gerekmektedir. Çalışma elektrodu (ÇE) yüzeyinden ayrılma problemini ortadan kaldırmak için enzimler jelâtin ile sabitlenmiştir. Bu yöntemde enzim yüzeye kuvvetle tutuklanmasına karşın, ADH temelli biyosensörlerde muhtemelen NAD<sup>+</sup> koenziminin difüzyon zorluğundan kaynaklanan, zayıf ve gürültülü bir amperometrik cevap alınmıştır. Bu sebeple ADH enziminin nafion membranı ile hapsedilerek tutuklanması yapılmıştır. Ancak bu yöntemde de biyomateryal tabaka çözelti içinde ÇE yüzeyinden zamanla ayrılmıştır. 2010 ve 2012 yıllarında Gorton ve çalışma arkadaşları, dehidrojenaz bazlı enzimler ve YBE'ler ile biyosensör hazırlarken biyomateryali sadece

GA kullanarak ÇE yüzeyine sabitlemişlerdir. Stabilizasyon işleminin tamamlanması için, biyosensörler + 4 °C’de gece boyu bekletilmiştir (Safina vd 2010, Zafar vd 2012). Çalışmamızda ADH temelli biyosensörler için aynı yöntem uygulanmıştır. AOx temelli biyosensörlerde ise enzim jelâtin yardımıyla tutuklanmıştır. Ayrıca tüm biyosensörler sabit nem ortamında bekletilmiştir. Bu işlem ile özellikle ADH temelli biyosensörlerde biyomateryalin ÇE yüzeyinden ayrılmasının önüne geçildiği çalışmamızda gözlenmiştir. Aynı zamanda bu metotlarla enzimlerin elektrot yüzeyine tutuklandıktan sonra aktivitelerini sürdürebildikleri amperometrik tayin sonuçlarından da anlaşılmıştır.

#### 4.7. ADH Temelli Biyosensörlere İlişkin Bulgular

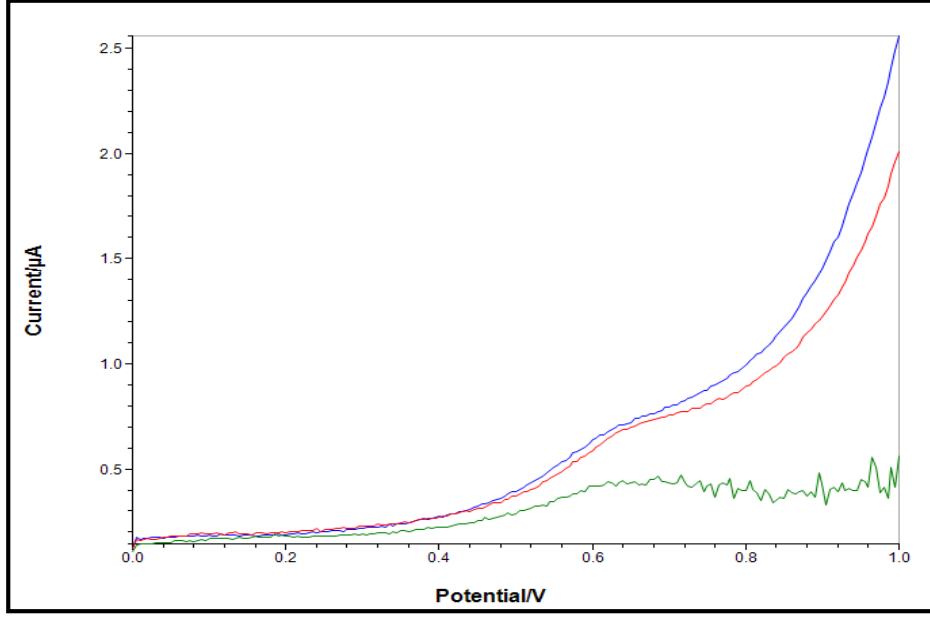
##### 4.7.1. ADH temelli biyosensörlerde NADH’nin yükseltgenmesinin takibi

ADH temelli biyosensörlerin ölçüm prensibi NADH’nin yükseltgenmesinin takibine dayanmaktadır (Şekil 4.46).



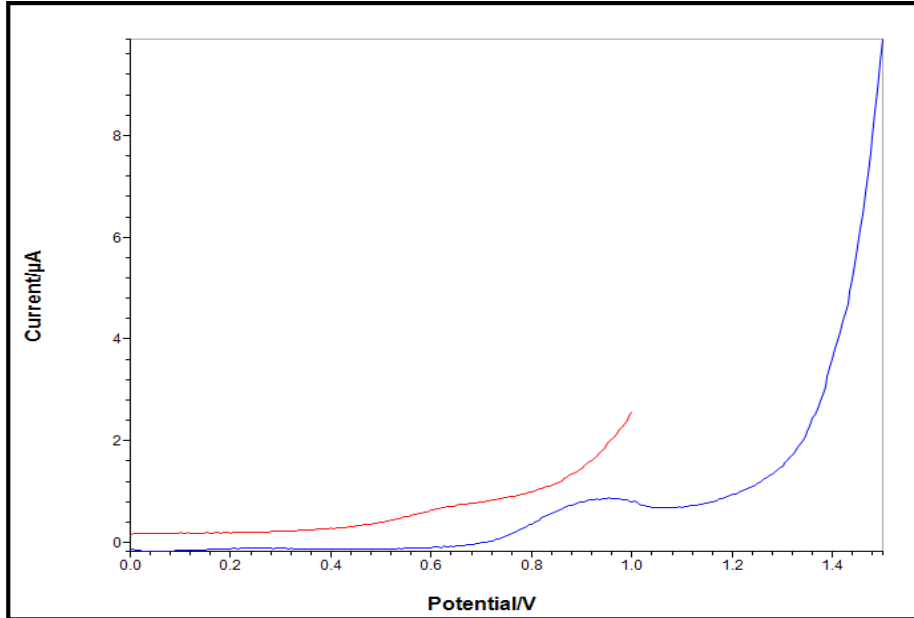
Şekil 4.46. ADH temelli biyosensörlerin ölçüm prensibinin şematik gösterimi

NADH’nin yükseltgenmesinin takibi için diferansiyel puls voltametrisinden yararlanılmıştır. YBCE/ADH/NAD<sup>+</sup>/G/GA formülasyonunda hazırlanmış biyosensörlerin 0,0 V ile + 1,0 V aralığında, farklı etanol derişimindeki diferansiyel puls voltamogramları Şekil 4.47’de verilmiştir. Yaklaşık + 0,6 V’da YBCE/ADH/NAD<sup>+</sup>/G/GA biyosensörü etanole karşı cevap vermektedir. Etanol derişimi arttıkça NADH’nin tersinmez yükseltgenmesi nedeniyle voltamogramlarda bozulma olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.47. YBCE/ADH/NAD<sup>+</sup>/G/GA biyosensörünün maviden kırmızıya 50, 100 ve 500  $\mu$ M etanol içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

Şekil 4.48’de YBCE/ADH/NAD<sup>+</sup>/G/GA ve YBCE/ADH/NAD<sup>+</sup>/NF/GA biyosensörlerinin farklı potansiyel aralıklarında, 50  $\mu$ M etanol içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları verilmiştir. Her iki voltamogramda da yaklaşık + 0,6 V’dan itibaren biyosensörlerin etanole karşı cevap verdiği görülmektedir.



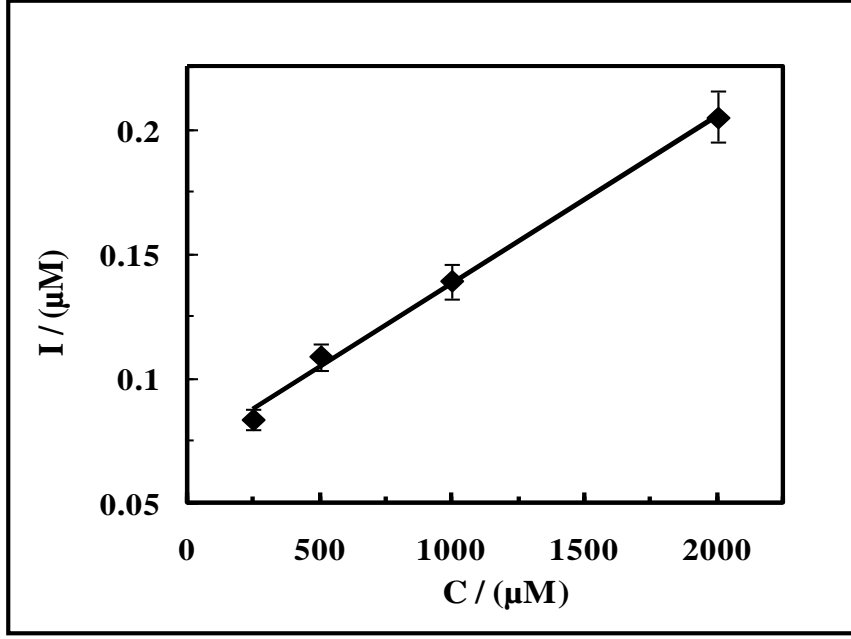
Şekil 4.48. YBCE/ADH/NAD<sup>+</sup>/G/GA (kırmızı) ve YBCE/ADH/NAD<sup>+</sup>/NF/GA (mavi) biyosensörlerinin farklı potansiyel aralıklarında 50  $\mu$ M etanol içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)



#### 4.7.2. ADH temelli biyosensörlerde etanolün amperometrik tayini

Diferansiyel puls voltamogramları neticesinde, YBCE/ADH/NAD<sup>+</sup>/NF/GA ve YBCE/ADH/NAD<sup>+</sup>/G/GA biyosensörleri ile etanolün amperometrik tayini +0,7 V'da yapılmıştır. Zaten NADH'nin daha yüksek potansiyellerdeki yükseltgenmesi giriş bölümünde anlatılan dezavantajlar nedeniyle tercih edilmemektedir. Bu biyosensörlerle yapılan amperometrik tayinlerde, NAD<sup>+</sup> koenziminin yüzeye tutuklanması nedeniyle, ölçümlerde yüksek gürültü olmuş ve akım kararsızlaşmıştır. Literatürdeki bazı çalışmalarda NAD<sup>+</sup> koenzimi ÇE yüzeyine sabitlenirken (Luo vd 2008), bazı çalışmalarda çözelti içerisinde (Serafin vd 2011, Tsai vd 2007, Lee and Tsai 2009) kullanılmıştır. Azevedo vd 2005 yılında ADH temelli biyosensörler için gerekli olan NAD<sup>+</sup> koenziminin, tersinmez bir şekilde hapsedilmeden veya bağlanmadan enzime yakın olması gerektiğini bildirmişlerdir (Azevedo vd 2005). Hem deney sonuçlarından hem de literatür bilgilerinden yola çıkarak çalışmanın bundan sonraki kısmında, NAD<sup>+</sup> koenzimi YBE'lerin yüzeyine sabitlenmemiş, bilinen sabit derişimde çözelti içine eklenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak YBCE/ADH/GA formülasyonuna sahip biyosensörler hazırlanmış ve + 0,7 V'da etanolün amperometrik tayini için kullanılmıştır.

Etanolün ADH temelli biyosensörler ile amperometrik tayini, içerisinde 8 ml 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu ve 2 mM sabit derişimde NAD<sup>+</sup> koenzimi bulunan elektrokimyasal hücrede, çözeltinin sabit hızda sürekli karıştırıldığı şartlarda + 0,7 V'da gerçekleştirilmiştir. Akım kararlı hale geldikten sonra, sabit derişimdeki etanol çözeltisi elektrokimyasal hücreye ardışık olarak katılmış ve zamana karşı akım değerleri potantiyostat tarafından kaydedilmiştir. YBCE/ADH/GA biyosensörü ile yapılan amperometrik tayin sonucunda etanol derişimine karşı ölçülen akım değerleri grafiklendirilmiş ve Şekil 4.52'de verilmiştir.

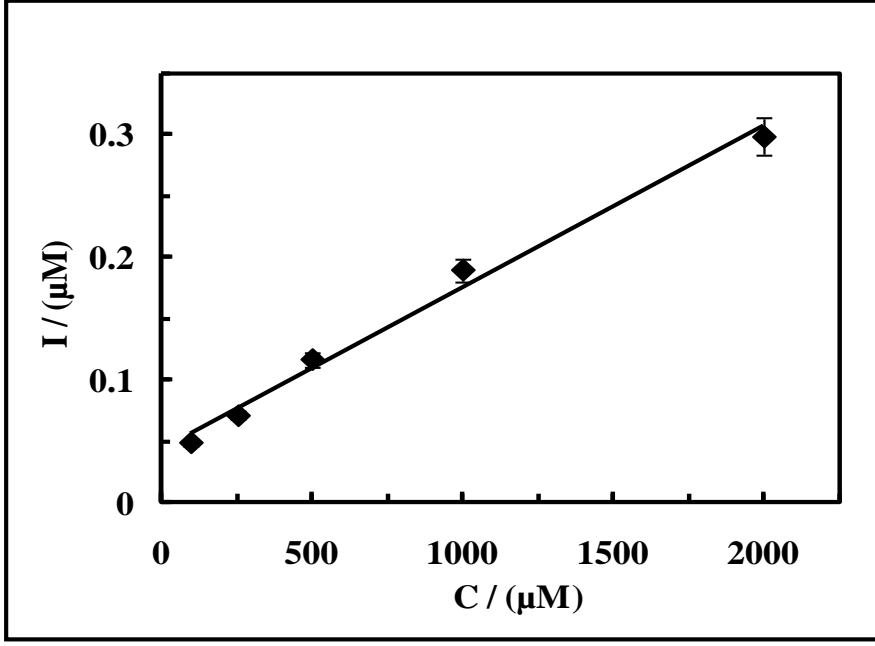


Şekil 4.49. YBCE/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2 mM NAD<sup>+</sup>, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V)

YBCE/ADH/GA biyosensörleri ile elde edilen grafiğin korelasyon katsayısı 0,998, duyarlık ise 0,067  $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$  olarak bulunmuştur.

#### 4.7.3. ADH temelli biyosensörlerde elektrot türünün etkisi

NADH'nin yükseltgenmesinin takibi ve amperometrik tayini için en uygun elektrot türü ve formülasyonu bölüm 4.2'de incelenmişti. Ancak elektrotlar biyomateryal ile tutuklandıkları zaman, yüzey özellikleri değişmektedir. Bu sebeple ADH temelli biyosensörler hazırlanırken enzim varlığında, bazı elektrot türü ve formülasyonların etkisi incelenmiştir. ADH temelli biyosensörler üzerine elektrot türü ve formülasyon etkisinin karşılaştırılabilmesi için YBCE yalın elektrotları ile biyosensörler hazırlanmış ve etanolün amperometrik tayininde kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar bir önceki kısımda verilmiştir (Bölüm 4.7.2). MWCNT-YBE yalın elektrotları ile MWCNT-YBE/ADH/GA biyosensörleri de hazırlanmış ve + 0,7 V'da etanolün amperometrik tayini için kullanılmıştır. Amperometrik tayin sonucu etanol derişimine karşı ölçülen akım değerleri grafiklendirilmiş ve Şekil 4.50'de verilmiştir.



Şekil 4.50. MWCNT-YBE/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2 mM NAD<sup>+</sup>, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V)

MWCNT-YBE/ADH/GA biyosensörleri ile elde edilen grafiğın korelasyon katsayısı 0,995, duyarlık ise 0,132  $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$  olarak bulunmuştur.

MM-YBE elektrotları ile ADH/GA formülasyonunda biyosensörler hazırlanmış ve etanolün amperometrik tayininde kullanılmıştır. Farklı çalışma potansiyellerinde ölçümler yapılmış olmasına rağmen, kararlı akım sinyali elde edilememiştir. ADH temelli biyosensörlerin analitiksel performanslarına elektrot türünün etkilerini incelemek için, Çizelge 4.9'da bu elektrotlarla yapılan amperometrik tayinler sonucu elde edilen duyarlık, korelasyon katsayısı ve çalışma potansiyeli değerleri verilmiştir. MWCNT-YBE ile hazırlanan ADH temelli biyosensörünün duyarlığının daha iyi olduğu Çizelge 4.9'dan anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.9. ADH temelli biyosensörlerin analitiksel performanslarına YBE türlerinin etkilerinin karşılaştırılması

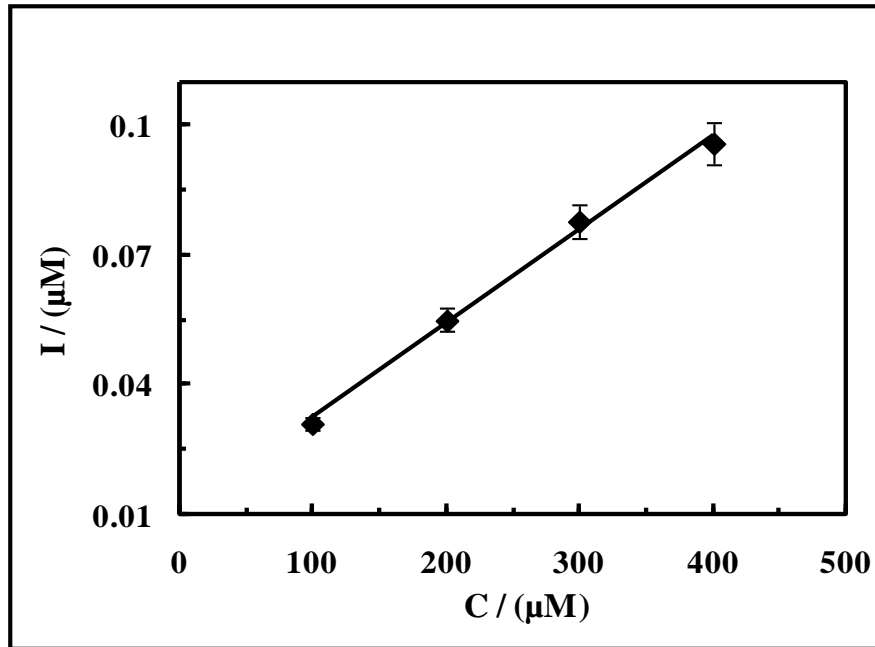
Elektrot türü	Duyarlık	Korelasyon katsayısı	Çalışma potansiyeli
YBCE/ADH/GA	0,067 $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$	0,998	+ 0,7 V
MWCNT-YBE/ADH/GA	0,132 $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$	0,995	+ 0,7 V
MM-YBE/ADH/GA	-	-	-

ADH temelli biyosensörlerle yapılan etanol tayinlerdeki gürültüyü azaltmak, daha kararlı amperometrik yanıt almak ve çalışma potansiyelini düşürmek için, YBE'lerin nanoparçacık ve PNR ile modifiye edilmesi amaçlanmıştır. Bölüm 4.2'de nanoparçacık ve PNR'nin sinerjik etkisi tartışılmıştı. Bundan sonraki kısımlarda ise

ADH temelli biyosensörlerin analitiksel performansına nanoparçacık ve PNR'nin etkileri tartışılacaktır.

#### 4.7.4. ADH temelli biyosensörlerde MWCNT etkisinin incelenmesi

ADH temelli biyosensörlerde NADH, NAD<sup>+</sup>'nin indirgenme ürünüdür ve NADH'nin yükseltgenmesi takip edilmektedir. MWCNT'nin mükemmel elektrokatalitik, yüksek elektronik iletkenlik ve anti-fouling etkisi, Bölüm 4.2'de NADH'nin yükseltgenmesi ile ilgili kısımda tartışılmıştı. NADH sensörü ile ilgili elde ettiğimiz bilgiler ışığında, MWCNT'nin ADH temelli biyosensörler üzerinde de benzer etkiyi gösterebileceği düşünülmüştür. Bu amaçla, ADH temelli biyosensörler üzerine MWCNT-COOH etkisini incelemek için, YBCE'ler MWCNT-COOH ile modifiye edilmiş, sonrasında elektrot yüzeyine ADH enzimi tutuklanmış ve etanolün amperometrik tayininde kullanılmıştır. Amperometrik tayinde uygulanacak potansiyelin belirlenmesi için literatür bilgileri kullanılmıştır. 2007 ve 2009 yıllarında Tsai ve çalışma arkadaşları etanol tayini için sırasıyla polivinil alkol-MWCNT-ADH ve MWCNT-kitosan-ADH biyosensörlerini hazırlamışlardır (Tsai vd 2007, Lee ve Tsai 2009). Her iki çalışmada da etanolün amperometrik tayinleri + 0,7 V (vs Ag/AgCl) potansiyelde yapılmıştır. Literatür bilgilerinden yola çıkarak YBCE/MWCNT/ADH/GA formülasyonunda hazırlanan biyosensörler ile etanolün amperometrik tayinleri + 0,7 V'da yapılmıştır. YBCE/MWCNT/ADH/GA biyosensörleri ile yapılan amperometrik tayin sonucu etanol derişimine karşı ölçülen akım değerleri grafiklendirilmiş ve Şekil 4.51'de verilmiştir.



Şekil 4.51. YBCE/MWCNT/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2mM NAD<sup>+</sup>, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V)

YBCE/MWCNT/ADH/GA biyosensörleri ile elde edilen grafiğin korelasyon katsayısı 0,998, duyarlık ise 0,218  $\mu\text{A.mM}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Amperometrik ölçümler sırasında da zemin akım, yalın YBCE elektrot ile hazırlanan ADH biyosensörüne göre azalmıştır. YBCE/MWCNT/ADH/GA biyosensörleri ile elde edilen duyarlık, YBCE/ADH/GA biyosensörü ile elde edilen duyarlığa göre ( $0,067 \mu\text{A.mM}^{-1}$ ) yaklaşık 3 kat artmıştır. YBCE/MWCNT/ADH/GA biyosensöründe gözlenen zemin akımın azalması ve amperometrik tayin sonucu duyarlıkta elde edilen artış, biyosensör formülasyonunda MWCNT'nin varlığındandır. Çünkü MWCNT, YBCE elektrodunun elektroaktif yüzey alanını artırarak, elektronik iletkenliği artırmış ve elektron transferini hızlandırmıştır. Bunun sonucunda da ADH biyosensörünün duyarlığı artmıştır. MWCNT'nin varlığı NADH'nin yükseltgenme reaksiyonunu ilerletmiştir. Ayrıca NADH'nin yalın elektrotlarda yükseltgenmesi sonucu oluşan  $\text{NAD}^{+}$ 'nin, enzimatik olarak inaktif tersinmez formlarının oluşması nedeniyle meydana gelen elektrot yüzeyinin kontaminasyonu olayı, MWCNT'nin anti-fouling özelliği ile önlemiştir. Zemin akımındaki azalma da, elektrot yüzeyindeki kontaminasyonun azalması ile ilişkilidir. Ayrıca MWCNT'nin yapısında bulunan  $-\text{COOH}$  fonksiyonu, ADH enzimin elektrot yüzeyine tutuklanmasını kolaylaştırmış, enzimin elektrot yüzeyinden ayrılma problemini azaltmıştır.

YBE elektrotlarında MWCNT'nin varlığının etkisi, elektrot yüzeyine sonradan modifiye edilmesi durumunda mı, yoksa yüzey baskılama prosesinde elektrot mürekkebinde yer alması durumunda mı daha fazladır? Bu sorunun yanıtını bulmak için YBCE/MWCNT/ADH/GA ve MWCNT-YBE/ADH/GA biyosensörleri ile yapılan etanolün amperometrik tayini sonucu elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. YBCE/MWCNT/ADH/GA ve MWCNT-YBE/ADH/GA biyosensörlerinin duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri

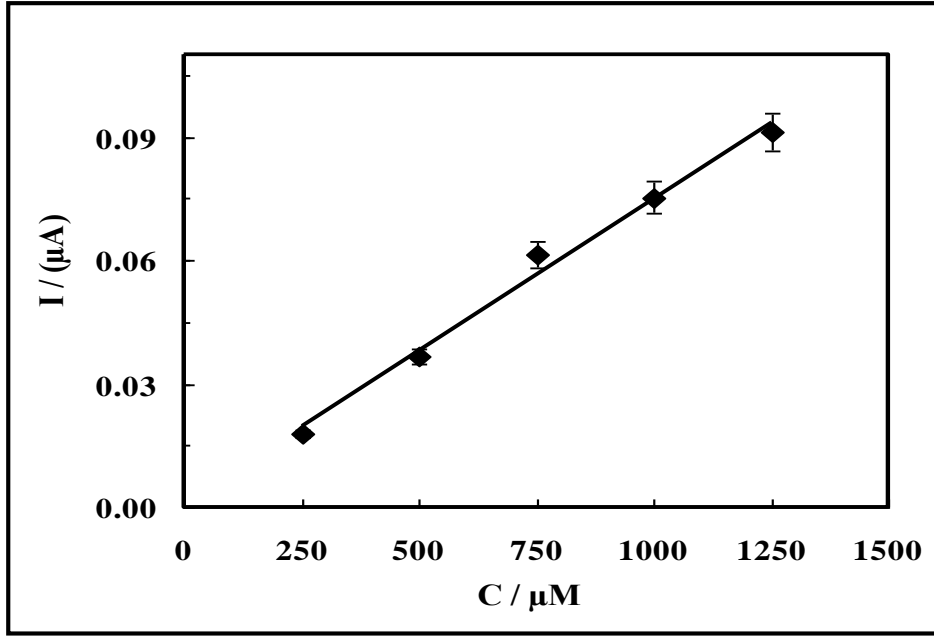
Elektrot türü	Duyarlık	Korelasyon katsayısı
YBCE/MWCNT/ADH/GA	0,218 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,998
MWCNT-YBE/ADH/GA	0,132 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,995

YBCE/MWCNT/ADH/GA biyosensörünün etanole karşı duyarlığının MWCNT-YBE/ADH/GA biyosensörüne göre daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar MWCNT'nin elektrot yüzeyine sonradan modifiye edildiğinde, yüzey baskılama ile modifiye edildiği duruma göre elektronik özelliklerinin daha etkili olduğunu göstermektedir. Bu sebeple çalışmanın bundan sonraki kısımlarında elektrot formülasyonunda MWCNT'nin olması istendiğinde, MWCNT-YBE elektrotlarını kullanmak yerine, YBCE elektrotlarının yüzeyinin MWCNT ile modifiye edilmesi tercih edilmiştir.

#### 4.7.5. ADH temelli biyosensörlerde AuNP etkisinin incelenmesi

AuNP'nin ADH temelli biyosensör üzerine etkisini incelemek için, AuNP ile modifiye edilmiş YBCE'ler üzerine ADH enzimi tutuklanmış ve etanolün amperometrik tayininde kullanılmıştır. YBCE/AuNP/ADH/GA formülasyonunda hazırlanan

biyosensörler ile etanolün amperometrik tayini de + 0,7 V'da yapılmış ve etanol derişimine karşı ölçülen akım değerleri grafiklendirilmiştir (Şekil 4.52).

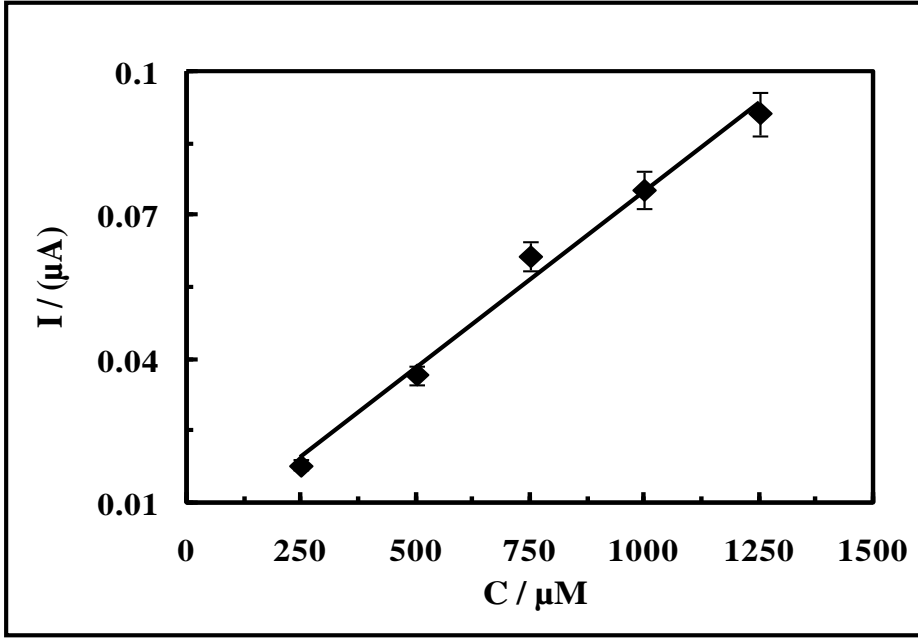


Şekil 4.52. YBCE/AuNP/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2mM NAD<sup>+</sup>, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V)

YBCE/AuNP/ADH/GA biyosensörleri ile elde edilen grafiğin korelasyon katsayısı 0,995, duyarlılığı ise 0,074  $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Biyosensör formülasyonunda AuNP'nin bulunması elektronik iletkenliği artırmış ve yalnız YBCE'lerle hazırlanan biyosensörlere göre, etanole karşı olan duyarlılığı biraz artırmıştır. AuNP, ADH temelli biyosensörlerin etanole karşı olan duyarlılığını, MWCNT'ye göre daha az artırmıştır. Bunun sebebi ise Bölüm 4.2'de tartışıldığı gibi, MWCNT'nin AuNP'ye göre elektrodun yüzey alanını daha fazla artırması sebebiyle elektronik iletkenliği daha fazla artırmasıdır. AuNP'nin bir metal nanoparçacık olması, akıma karşı direncin artmasına ve MWCNT'ye göre daha az elektronik iletkenlik göstermesine neden olabilir. AuNP'nin biyosensörlerde kullanılmasının en önemli nedeni, enzimin elektrot yüzeyine tutunmasında, enzimin elektroda karşı doğru olan yönelimini sağlayarak uygun mikroçevre oluşturmasıdır. AuNP'nin bu özelliği, enzimin biyolojik aktivitesinin korunmasını sağlamaktadır. Biyolojik aktivitesi mümkün olduğunca korunmuş bir biyosensörde daha duyarlı bir sonuç elde edilir.

#### 4.7.6. ADH temelli biyosensörlerde PNR etkisinin incelenmesi

ADH temelli biyosensörlerde PNR etkisini incelemek için YBCE/PNR/ADH/GA formülasyonunda hazırlanan biyosensörler ile etanolün amperometrik tayini + 0,7 V'da yapılmıştır. YBCE/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile yapılan amperometrik tayin sonucu etanol derişimine karşı ölçülen akım değerleri grafiklendirilmiş ve Şekil 4.53'de verilmiştir.



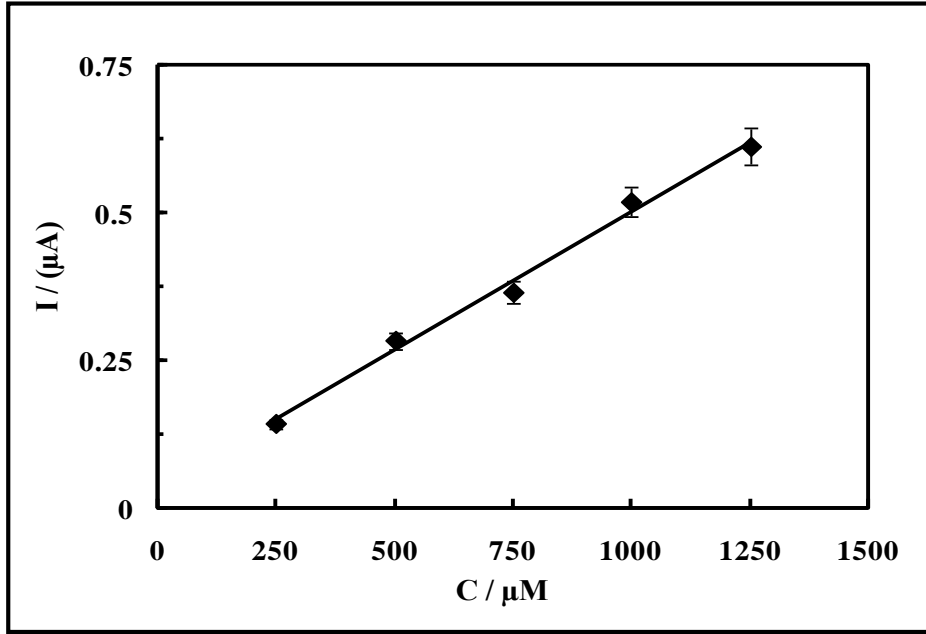
Şekil 4.53. YBCE/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2mM NAD<sup>+</sup>, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V)

YBCE/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile elde edilen grafiğin korelasyon katsayısı 0,996, duyarlılığı ise 0,241  $\mu\text{A.mM}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Biyosensör formülasyonunda PNR'nin bulunması elektronik iletkenliği artırmış ve YBCE/PNR/ADH/GA biyosensörünün etanole karşı olan duyarlılığını, YBCE/ADH/GA'ya göre yaklaşık 3 kat artırmıştır. PNR'nin aromatik halkalarında bulunan  $\pi$  konjuge yapı PNR'nin elektronik iletkenliğe sahip olmasını sağlar. PNR, NADH'nin yükseltgenmesine karşı elektrokimyasal ilgi göstermektedir. Bu kısım Bölüm 4.2'de tartışılmıştı. Ayrıca NR'nin elektropolimerizasyonu sonucu oluşan PNR zincirinde serbest  $-\text{NH}_2$  grupları bulunmaktadır. Serbest  $-\text{NH}_2$  gruplarının varlığı, ADH enziminin GA ile birlikte elektrot yüzeyine çapraz olarak bağlanmasını sağlar. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen enzimatik reaksiyonlarda, enzimin elektrot yüzeyine kuvvetli tutunması, substratın enzime ulaşmasını kolaylaştırır. PNR'nin elektrot formülasyonunda bulunması sadece duyarlılığı değil, aynı zamanda akımın kararlılığını da artırmıştır.

#### 4.7.7. ADH temelli biyosensörlerde PNR ve nanoparçacık etkisinin incelenmesi

##### 4.7.7.1. MWCNT ve PNR'nin sinerjik etkisi

MWCNT ve PNR'nin, NADH'nin yükseltgenmesine karşı birlikte gösterdiği sinerjik etkiyi, ADH temelli biyosensörlerde de incelemek için YBCE/MWCNT/PNR/ADH/GA formülasyonunda biyosensörler hazırlanmış ve etanolün amperometrik tayininde kullanılmıştır. + 0,7 V'da YBCE/MWCNT/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile yapılan etanolün amperometrik tayini sonucunda elde edilen amperogramlardan yararlanılarak, etanol derişimine karşı ölçülen akım değerleri grafiklendirilmiş ve Şekil 4.54'de verilmiştir.



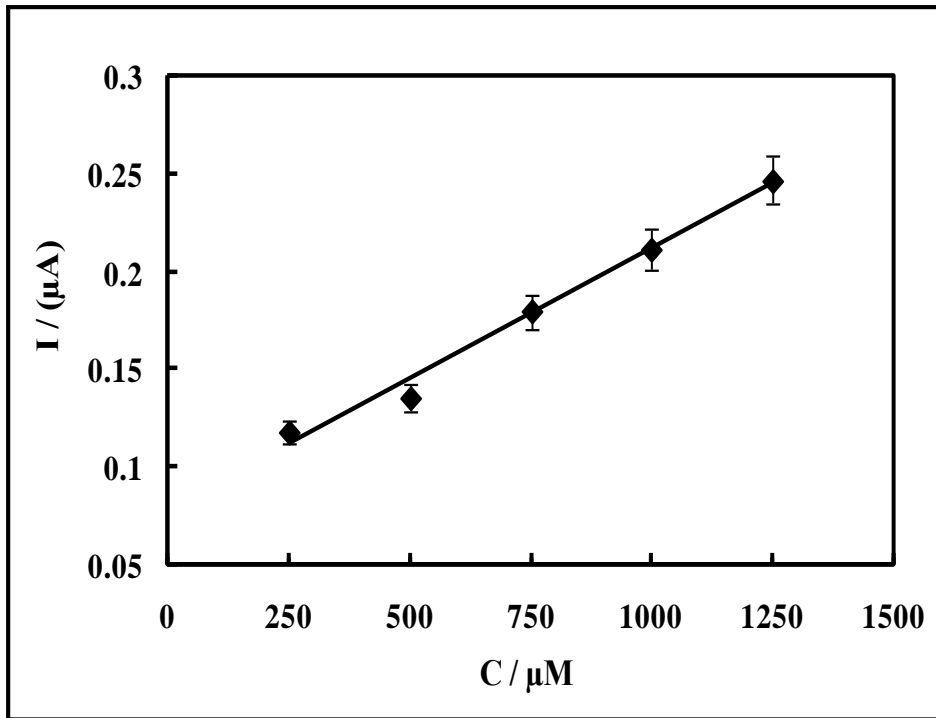
Şekil 4.54. YBCE/MWCNT/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2 mM NAD<sup>+</sup>, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V)

YBCE/MWCNT/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile elde edilen grafiğin korelasyon katsayısı 0,996, duyarlılığı ise 0,47  $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Biyosensör formülasyonunda MWCNT ve PNR'nin birlikte bulunması YBCE/MWCNT/PNR/ADH/GA biyosensörünün etanole karşı olan duyarlılığını, YBCE/ADH/GA'ya göre yaklaşık 7 kat, YBCE/MWCNT/ADH/GA ve YBCE/PNR/ADH/GA'ya göre yaklaşık 2 kat artırmıştır. Biyosensör formülasyonunda MWCNT ve PNR'nin birlikte bulunması, NADH sensöründe de olduğu gibi sinerjik bir etki yaratarak, elektronik iletkenliği ve duyarlılığı oldukça artırmıştır. Zemin akımı da azaltarak daha kararlı amperometrik yanıt alınmasını sağlamıştır. Bu sinerjik etki şöyle açıklanabilir. MWCNT'nin formülasyonda bulunması elektroaktif yüzey alanını ve bunun sonucu olarak da elektronik iletkenliği artırmıştır. MWCNT'nin -COOH fonksiyonuna,  $\text{sp}^2$  karbonlarından oluşan hidrofobik yan duvarlarına ve  $\pi$ -konjuge yapılarına sahip olması, PNR'nin aromatik halkasında bulunan  $\pi$ -konjuge konjuge yapıları ile,  $\pi$ - $\pi$  elektronik ve hidrofobik etkileşim yapmasına neden olmuştur. PNR ve MWCNT arasındaki bu etkileşim sonucu elektronik iletkenlik, sinerjik bir etkiyle artmıştır. Elektronik iletkenliğin artışıyla da elektron transfer hızı ve faradik cevabı artırmıştır. Ayrıca hem MWCNT hem de PNR'nin NADH'nin yükseltgenme reaksiyonuna karşı elektrokimyasal bir ilgi gösterir. Hem MWCNT'nin yapısında bulunan -COOH grupları hem de PNR'nin serbest -NH<sub>2</sub> grupları, ADH enziminin elektrot yüzeyine daha kuvvetli tutuklanması sağlamıştır. Böylece hem enzimin elektrot yüzeyinden ayrılma problemini azalmış hem de substratın enzime ulaşması kolaylaşmıştır. Bahsedilen tüm bu özellikler sayesinde YBCE/MWCNT/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin duyarlılığı oldukça fazla artmıştır.



#### 4.7.7.2. AuNP ve PNR'nin sinerjik etkisi

ADH temelli biyosensörlerde AuNP ve PNR'nin sinerjik etkisini incelemek için YBCE/AuNP/PNR/ADH/GA formülasyonunda hazırlanan biyosensörler ile etanolün amperometrik tayini + 0,7 V'da yapılmıştır. YBCE/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile yapılan amperometrik tayin sonucu etanol derişimine karşı ölçülen akım değerleri grafiklendirilmiş ve Şekil 4.55'de verilmiştir. YBCE/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile elde edilen grafiğin korelasyon katsayısı 0,994, duyarlığı ise 0,134  $\mu\text{A}.\text{mM}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Formülasyonlarda AuNP ve PNR'nin birlikte bulunması, sadece AuNP ile modifiye edilmiş elektrotlarla hazırlanan biyosensörle yapılan amperometrik tayinlere göre bir sinerji yaratarak elektronik iletkenliği artırmış ve bunun sonucu olarak da duyarlık artmıştır. Amperometrik ölçümlerde zemin akım da azalmıştır.

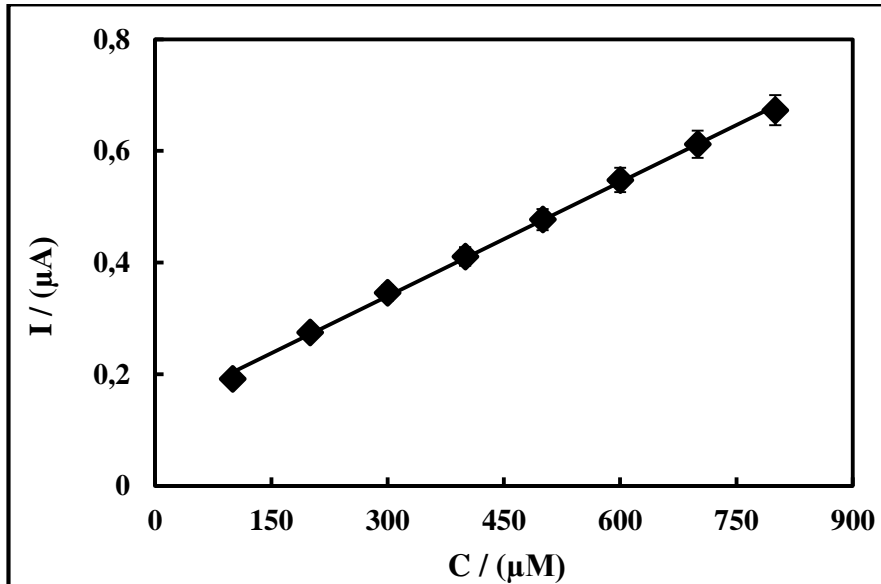


Şekil 4.55. YBCE/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2 mM  $\text{NAD}^+$ , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V)

#### 4.7.7.3. MWCNT, AuNP ve PNR'nin sinerjik etkisi

MWCNT, AuNP ve PNR'nin birlikte sinerjik etkisini incelemek için ise, YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu ile ADH temelli biyosensörler hazırlanmıştır ve YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörü ile etanolün amperometrik tayini + 0,7 V'da yapılmıştır. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile yapılan amperometrik tayin sonucu etanol derişimine karşı ölçülen akım değerleri grafiklendirilmiş ve Şekil 4.56'da verilmiştir. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile elde edilen grafiğin korelasyon katsayısı 0,999, duyarlığı ise 0,681  $\mu\text{A}.\text{mM}^{-1}$  olarak bulunmuştur.

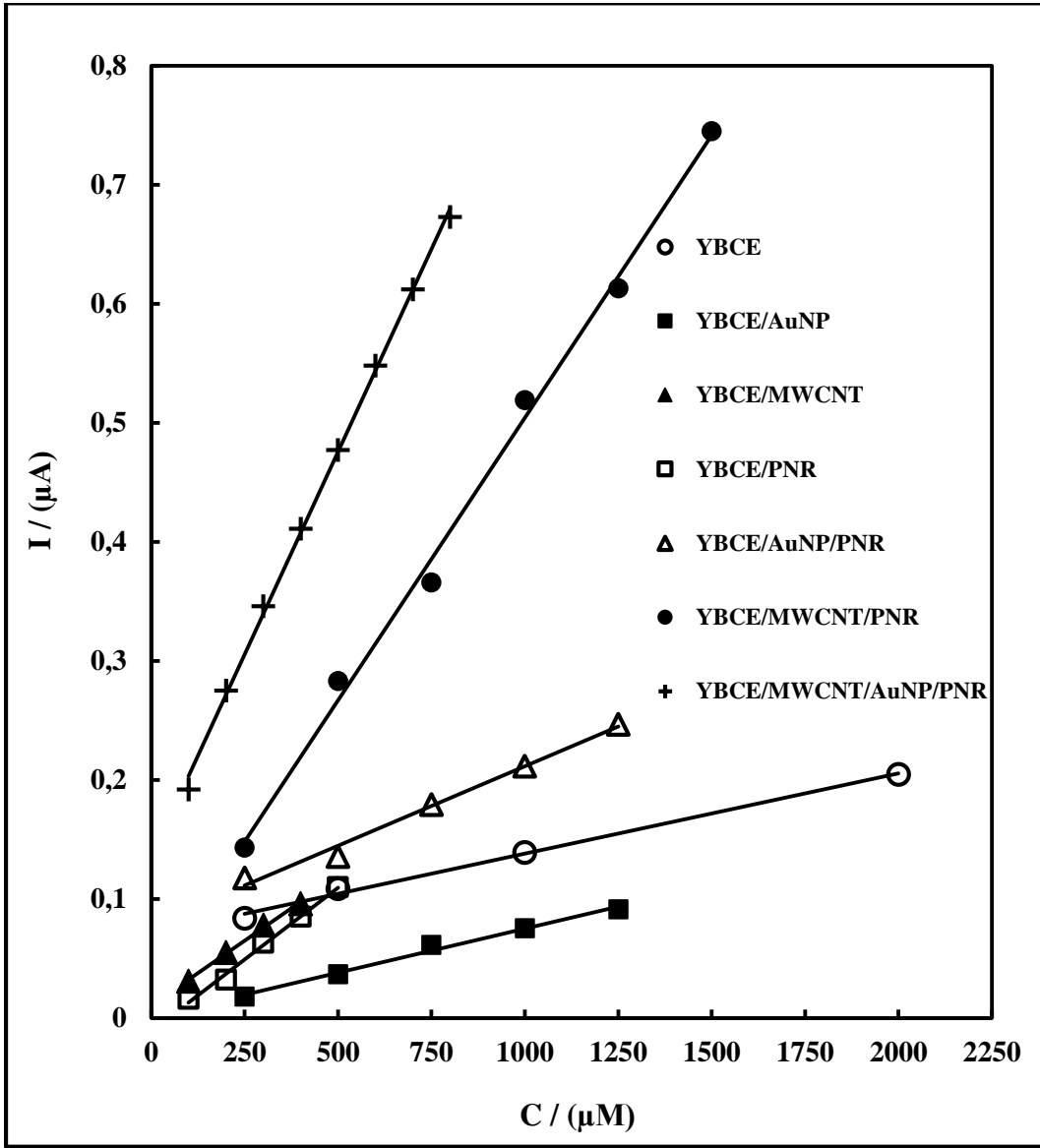
MWCNT, AuNP ve PNR'nin birlikte bulunması YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün etanole karşı olan duyarlılığını, YBCE/ADH/GA'ya göre yaklaşık 10 kat artırmıştır. ADH temelli biyosensörlerde en yüksek duyarlık YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu ile hazırlanan biyosensörde gözlenmiştir. MWCNT, AuNP ve PNR'nin formülasyonda birlikte bulunması çok yüksek bir sinerjik etki yaratmıştır. Bu yüksek sinerjik etki şöyle açıklanabilir. AuNP metal nanoparçacık, MWCNT'nin yüzeyine tutunarak MWCNT/AuNP hibrit materyalini oluşturmuştur. AuNP, metal bir nanoparçacık olduğu için MWCNT'nin elektrokatalitik ve elektronik özelliklerini artırmıştır. Aynı zamanda elektrodun elektroaktif yüzey alanı da artmıştır. MWCNT/AuNP hibrit materyali NADH'nin yükseltgenmesine karşı daha fazla elektrokatalitik özellik göstererek bu reaksiyonun ilerlemesini sağlamıştır. NR'nin YBCE/MWCNT/AuNP hibrit elektrodu üzerinde elektropolimerize olmasıyla MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu oluşmuştur. Bu kompozit elektrotta ise, hem MWCNT'nin hem de PNR'nin NADH'ye karşı olan elektrokatalitik etkisi, MWCNT ve PNR arasında gerçekleşen  $\pi$ - $\pi$  elektronik ve hidrofobik etkileşimleri ile daha artmıştır. AuNP, sadece MWCNT'nin elektrokatalitik özelliğini artırmamış aynı zamanda ADH enziminin elektrot yüzeyine tutunması için uygun yönelimi ve mikroçevreyi sağlayarak biyoyumluluk etki göstermiştir. Hem MWCNT'deki -COOH grubu hem de PNR'deki serbest -NH<sub>2</sub> grubu, ADH enziminin elektrot yüzeyine, glutaraldehit çapraz bağlayıcısı ile birlikte daha kuvvetli tutunmasını sağlarken, AuNP ise biyoyumluluk etkisi ile enzimin yüzeye kuvvetli bağlanmasından ileri gelen aktivite kaybını azaltmaktadır. Böylece, hem ADH enziminin yüzeye kuvvetli tutunmasıyla elektrot yüzeyinden ayrılma problemi azalmış olmakta, hem substratın enzime ulaşması kolaylaşmakta hem de enzimin yüzeye tutunmasıyla oluşan konformasyonel değişiklik nedeniyle biyolojik aktivitesinde meydana gelen kayıp azalmaktadır.



Şekil 4.56. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2 mM NAD<sup>+</sup>, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V)

#### 4.7.8. ADH temelli biyosensörlerde optimum elektrot formülasyonunun belirlenmesi

MWCNT-COOH, AuNP ve PNR ile modifiye edilmiş YBCE'ler ile hazırlanan biyosensörler ile + 0,7 V'da yapılan amperometrik tayinler sonucunda etanol derişimine karşı ölçülen akım değerleri grafiklendirilmiş ve Şekil 4.57'de verilmiştir. Grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları Çizelge 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.57. MWCNT, AuNP ve PNR ile modifiye edilmiş YBCE'ler ile hazırlanan ADH temelli biyosensörlerin etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (2 mM  $\text{NAD}^+$ , 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V)

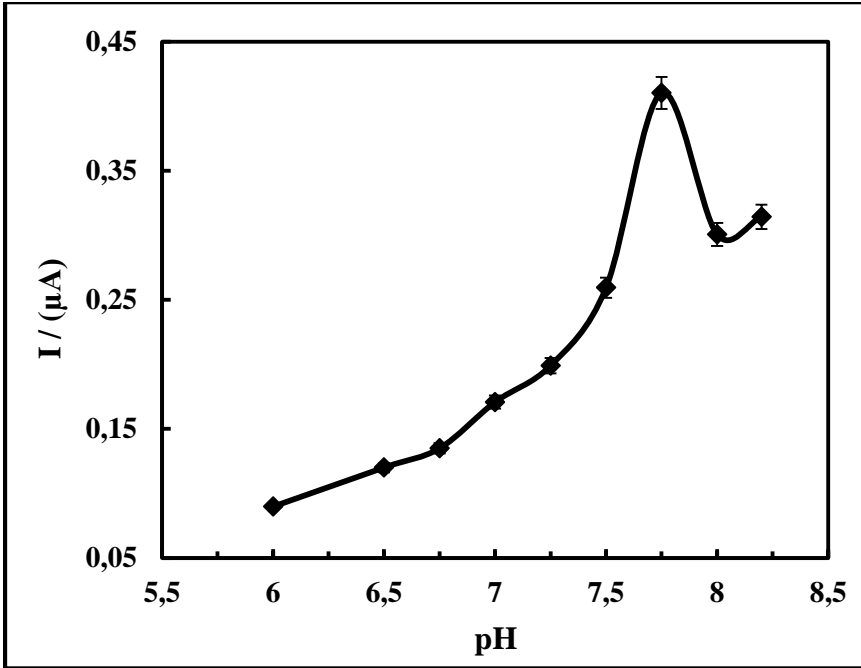
Çizelge 4.11. Şekil 4.57’de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri

Biyosensör formülasyonu	Duyarlık	Korelasyon katsayısı
YBCE/ADH/GA	0,067 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,998
YBCE/AuNP/ADH/GA	0,074 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,995
YBCE/MWCNT/ADH/GA	0,218 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,998
YBCE/PNR/ADH/GA	0,241 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,996
YBCE/AuNP/PNR/ADH/GA	0,134 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,994
YBCE/MWCNT/PNR/ADH/GA	0,470 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,996
YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA	0,681 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,999

Formülasyonlarda nanoparçacık ve iletken redoks polimerinin bulunması, yalnız elektrotlarla hazırlanan biyosensörlerle yapılan amperometrik tayinlere göre iletkenliği artırarak kararlı amperometrik yanıt alınmasını sağlamıştır. Formülasyonlar içerisinde yalnız YBCE ile hazırlanan biyosensörler, etanole karşı daha düşük duyarlık göstermektedir. YBCE yalnız elektrotlarının AuNP ile modifiye edilmesiyle hazırlanan biyosensörlerde, duyarlık biraz artmıştır. Elektrot formülasyonuna nanoparçacık olarak AuNP yerine MWCNT’nin girmesi ile biyosensörün duyarlığı yaklaşık 3 kat artmıştır. İletken redoks polimeri olan PNR ile hazırlanan biyosensörler ile yapılan analizlerde ise duyarlık AuNP ile hazırlanan biyosensörlere göre 3 katından fazla, MWCNT ile hazırlanan biyosensörlere göre ise biraz arttığı anlaşılmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkılarak MWCNT ve AuNP ile hazırlanan biyosensörlere PNR’nin etkisini incelemek için YBCE/AuNP/PNR/ADH/GA ve YBCE/MWCNT/PNR/ADH/GA biyosensörleri hazırlanmıştır. Yapılan analizler sonucunda PNR’nin, hem AuNP hem de MWCNT içeren formülasyona girmesiyle biyosensörün duyarlığı yaklaşık 2 kat artmıştır. Nanoparçacık ve iletken redoks polimerinin birlikte YBCE’ye modifikasyonunun biyosensörün duyarlığını ve iletkenliğini artırdığı gözlenmiştir. MWCNT, AuNP ve PNR’nin birlikte olan etkisini incelemek için ise YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri hazırlanmıştır. Yapılan analizler sonucunda biyosensörün duyarlığı YBCE/ADH/GA’ya göre 10 kat arttığı gözlenmiştir. MWCNT, AuNP ve PNR’nin birlikte çok yüksek sinerjik etki gösterdiği anlaşılmıştır. ADH temelli biyosensörler ile yapılan analizler sonucunda, etanole karşı en yüksek duyarlığa sahip biyosensör formülasyonunun YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA olduğu Şekil 4.57 ve Çizelge 4.11’den anlaşılmaktadır. Çalışmanın bundan sonraki kısmında optimum formülasyon olarak belirlenen YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu ile ADH temelli biyosensörler hazırlanmıştır.

#### 4.7.9. ADH temelli biyosensörlerde pH optimizasyonu

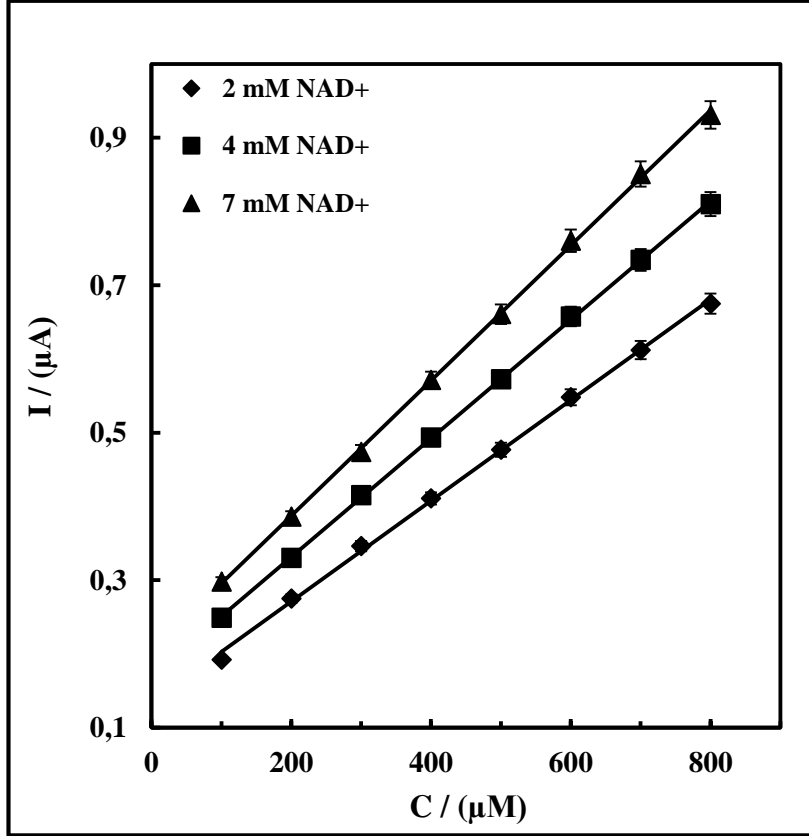
ADH temelli biyosensörlerin etanole karşı olan cevabına pH'nın etkisini incelemek ve optimum pH değerini belirlemek için optimum formülasyona sahip olan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri hazırlanmıştır. Bu biyosensörlerin 50 mM derişiminde farklı pH'larda (6,0 ile 8,2 aralığında) hazırlanmış fosfat tampon çözeltileri içerisinde, + 0,7 V'da, 2 mM sabit  $\text{NAD}^+$  ve 400  $\mu\text{M}$  sabit etanol derişimindeki akımları ölçülmüştür. Elde edilen akım değerlerine karşı pH grafiği çizilmiştir. 6,0'dan 7,75'e pH arttıkça, pik akımının arttığı, pH 7,75'den sonra ise hızla azaldığı Şekil 4.58'deki grafikten görülmektedir. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün etanole karşı en yüksek akım cevabı pH 7,75'de gözlenmiş ve optimum pH değeri olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısmında 50 mM pH 7,75 tamponu kullanılmıştır.



Şekil 4.58. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün, farklı pH'larda elde edilen akımlara karşı pH grafiği (400  $\mu\text{M}$  etanol, 2 mM  $\text{NAD}^+$ , + 0,7 V, 0,1 M KCl)

#### 4.7.10. ADH temelli biyosensörlerde $\text{NAD}^+$ koenziminin miktar optimizasyonu

$\text{NAD}^+$  koenzim miktarının, ADH temelli biyosensörlerin etanole karşı olan cevabına etkisini incelemek ve optimum miktarını belirlemek için YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri hazırlanmıştır. Bu biyosensörler kullanılarak 3 farklı sabit  $\text{NAD}^+$  derişiminde (2, 4 ve 7 mM  $\text{NAD}^+$ ), etanolün amperometrik tayini + 0,7 V'da pH 7,75'de yapılmıştır. Amperogramlardan elde edilen verilerden yararlanılarak akım-derişim grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.59). Grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri Çizelge 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.59. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin 3 farklı sabit NAD<sup>+</sup> derişiminde (2, 4 ve 7 mM NAD<sup>+</sup>), etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, + 0,7 V)

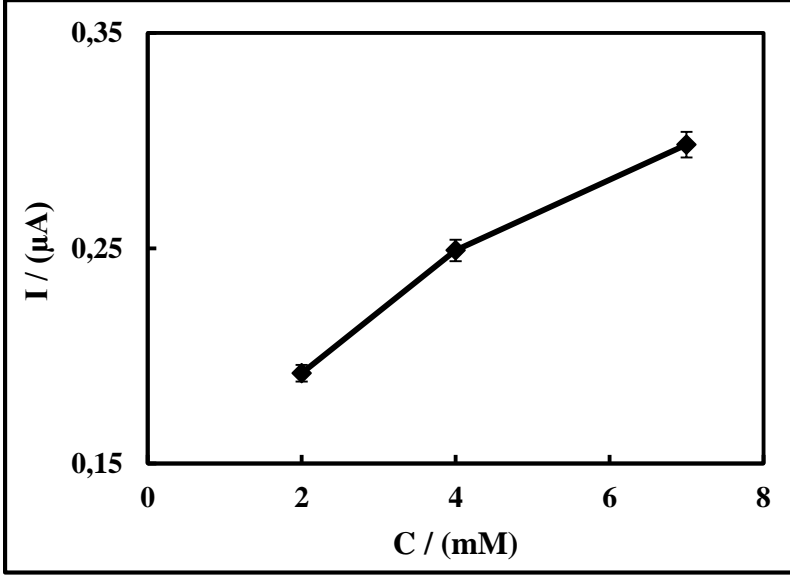
YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin etanole karşı olan duyarlılığının, 2, 4 ve 7 mM NAD<sup>+</sup> derişimindeki koenzim varlığında da yüksek olduğu, bu duyarlılığın 7 mM NAD<sup>+</sup> derişiminde daha fazla olduğu hem Şekil 4.62'deki grafiklerden hem de Çizelge 4.12'deki duyarlık değerlerinden anlaşılmaktadır. NAD<sup>+</sup> koenziminin derişimi arttıkça, etanol-asetaldehit dönüşümünü de artmakta ve daha yüksek akım değerleri elde edilmektedir.

Çizelge 4.12. Şekil 4.59'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri

NAD <sup>+</sup> miktarı	Duyarlık	Korelasyon katsayısı
2 mM	0,683 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,999
4 mM	0,804 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,999
7 mM	0,917 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,999

Şekil 4.60'da YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün 2, 4 ve 7 mM NAD<sup>+</sup> derişimindeki koenzim varlığında 100  $\mu\text{M}$  sabit etanol derişiminde elde

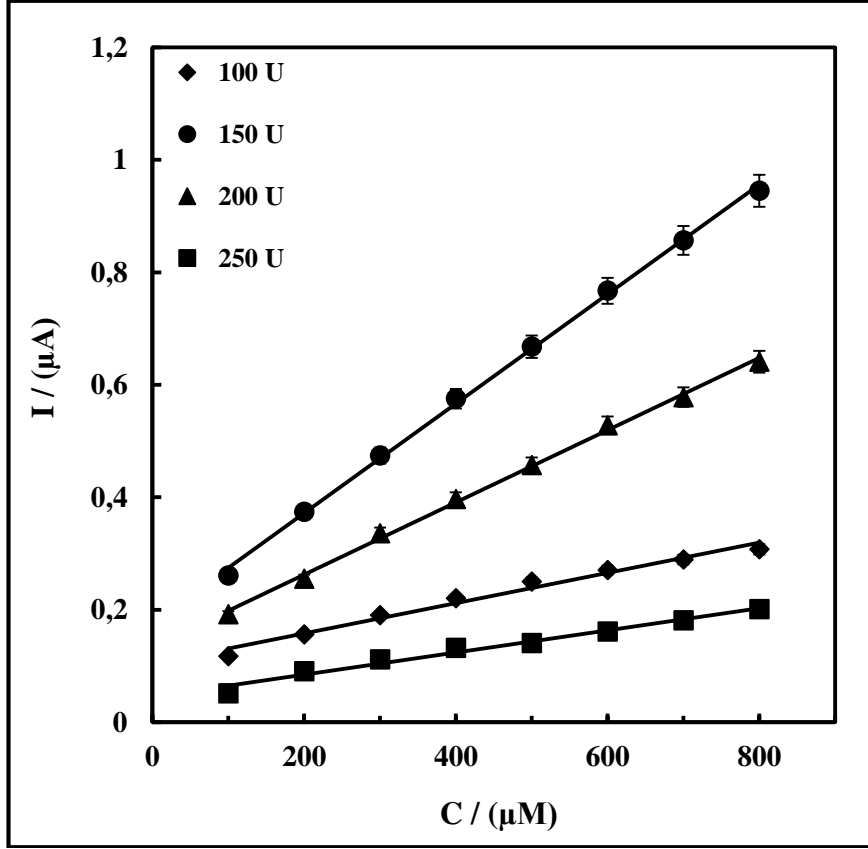
edilen akım değerlerinin  $\text{NAD}^+$  derişiminine karşı grafiği verilmiştir.  $\text{NAD}^+$  koenziminin derişimi arttıkça, etanol-asetaldehit dönüşümü artmış olmasına rağmen, bu dönüşümün hızı 4 mM  $\text{NAD}^+$ 'dan 7 mM  $\text{NAD}^+$ 'ye doğru biraz azalmaktadır. Bu sebeple 7 mM'dan sonraki  $\text{NAD}^+$  derişimlerinin etanol-asetaldehit dönüşümünün hızını azaltacağı, belki de inhibitör etkisi yaratabileceği düşünölmüştür. En yüksek akım ve duyarlık değerleri, 7 mM  $\text{NAD}^+$  derişiminde elde edildiği için ADH temelli biyosensörlerde optimum  $\text{NAD}^+$  değeri 7 mM olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısmında 7 mM  $\text{NAD}^+$  kullanılmıştır.



Şekil 4.60. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün farklı  $\text{NAD}^+$  derişimlerinde elde edilen akımlara karşı  $\text{NAD}^+$  derişimi grafiği (100 μM etanol, pH 7,75, + 0,7 V, 0,1 M KCl)

#### 4.7.11. ADH temelli biyosensörlerde enzim miktarının optimizasyonu

Biyosensörlerde elektrot yüzeyinde bulunan biyolojik materyalin miktarının optimizasyonu, gerçekleşen biyoelektrokimyasal reaksiyonda transfer edilen elektronun hızı açısından oldukça önemlidir. ADH temelli biyosensörlerde enzim miktarının optimizasyon çalışması için, farklı enzim miktarlarında YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri hazırlanmıştır. 50 unit, 100 unit, 150 unit, 200 unit ve 250 unit enzim miktarında hazırlanan biyosensörler ile etanolün amperometrik tayini + 0,7 V'da pH 7,75'de 7 M  $\text{NAD}^+$  derişiminde yapılmıştır. Her bir farklı enzim miktarında yapılan amperometrik tayin sonucu elde edilen amperogramlardan yararlanılarak akım-derişim grafikleri çizilmiş ve Şekil 4.61'de verilmiştir. 50 unit enzim miktarında hazırlanan ADH temelli biyosensörleri ile yapılan amperometrik tayinde, enzim miktarı yetersiz gelmiş ve sinyal/gürültü oranı çok yüksek bir amperogram elde edilmiştir. Bu sebeple 50 unit enzim miktarında hazırlanan ADH temelli biyosensör için akım-derişim grafiği çizilememiştir.



Şekil 4.61. Farklı enzim miktarlarında hazırlanmış YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin, etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 7 mM  $\text{NAD}^+$ , 0,1 M KCl, +0,7 V)

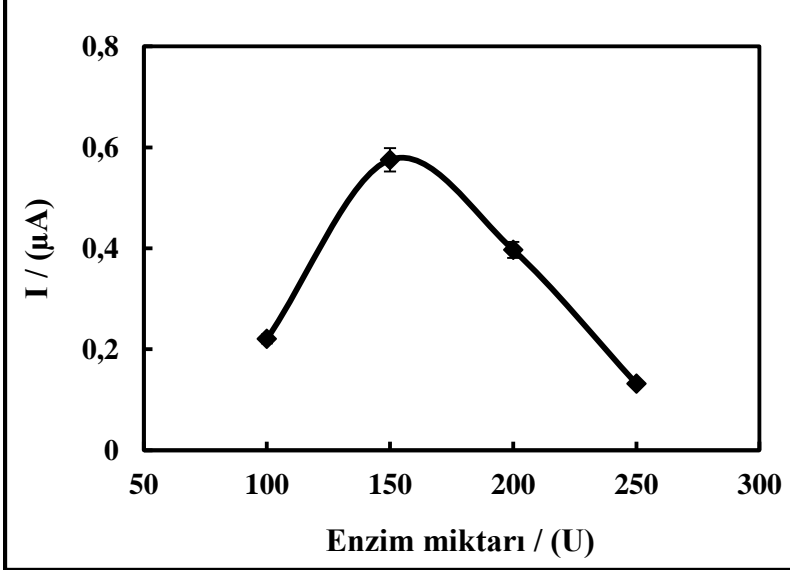
Çizelge 4.13. Şekil 4.61’de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri

ADH miktarı	Duyarlık	Korelasyon katsayısı
100 U	0,270 $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$	0,990
150 U	0,973 $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$	0,999
200 U	0,642 $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$	0,999
250 U	0,197 $\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$	0,989

Farklı enzim miktarlarında hazırlanmış olan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin etanole karşı olan duyarlığının, düşük ve yüksek enzim miktarlarında diğerlerine göre daha az olduğu Şekil 4.61’deki grafiklerden ve çizelge 4.13’de verilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerlerinden anlaşılmaktadır. Etanole karşı en yüksek duyarlık, 150 unit enzim miktarında hazırlanmış biyosensörlerde elde edilmiştir. 150 unitten daha yüksek enzim



miktarlarına sahip biyosensörlerde, elektrot yüzeyinde daha kalın ve kompleks bir tabaka oluşmakta ve çözeltilen elektrot yüzeyine olan difüzyon zorlaşmaktadır. Buna bağlı olarak da biyoelektrokimyasal reaksiyonda gerçekleşen elektron transfer aktarım hızı yavaşlamış ve biyosensörün duyarlılığı azalmıştır. 150 unitten daha düşük enzim miktarlarında hazırlanmış olan ADH temelli biyosensörlerde ise istenilen duyarlılığa ulaşılamamıştır.



Şekil 4.62. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün farklı  $NAD^+$  derişimlerinde elde edilen akımlara karşı  $NAD^+$  derişimi grafiği (100  $\mu M$  etanol, pH 7,75, + 0,7 V, 0,1 M KCl)

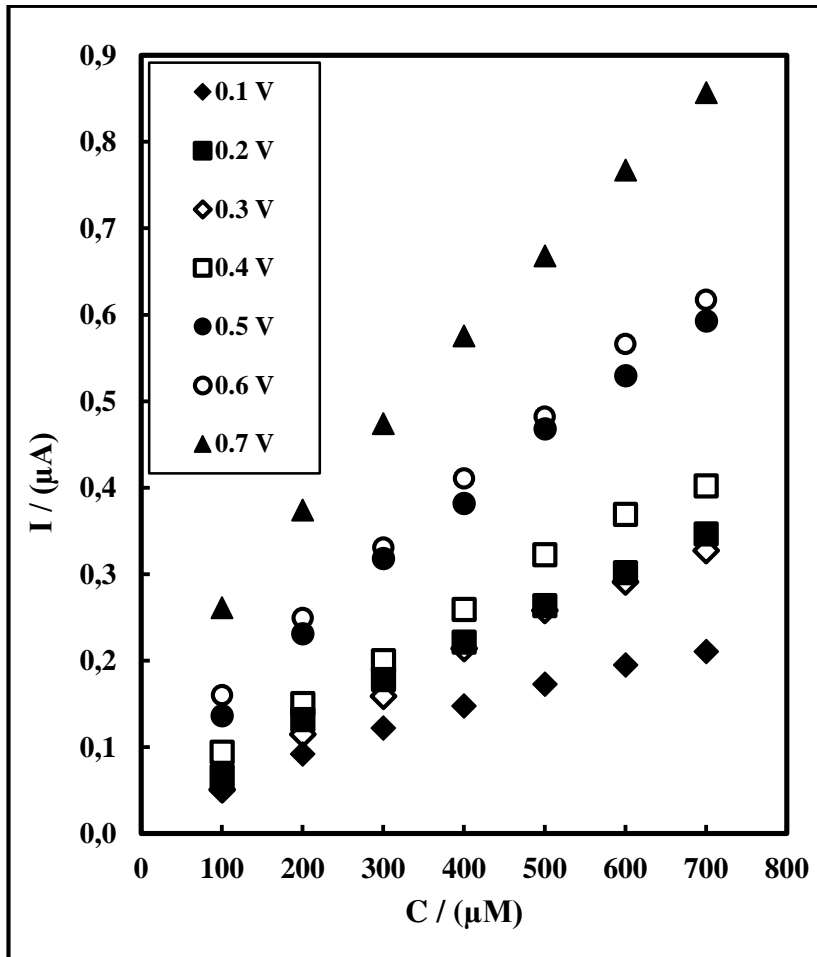
Şekil 4.62'de 100 unit, 150 unit, 200 unit ve 250 unit enzim miktarlarında hazırlanmış YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün 400  $\mu M$  sabit etanol derişiminde elde edilen akım-enzim miktarı grafiği verilmiştir. Etanole karşı en yüksek akım değerinin 150 unit enzim miktarına sahip biyosensörde elde edildiği ve enzim miktarı arttıkça da elektron transferini engellemesi nedeniyle akım değerinin azaldığı anlaşılmaktadır (Şekil 4.62). Bu sonuçlardan yola çıkarak optimum enzim miktarı 150 unit olarak belirlenmiş ve çalışmanın bundan sonraki kısmında ADH temelli biyosensörler 150 unit ADH miktarında hazırlanmıştır.

#### 4.7.12. ADH temelli biyosensörlerde çalışma potansiyelinin optimizasyonu

Amperometrik biyosensörlerde, çalışma potansiyelinin düşük olması girişim yapan türlerin etkisini azaltmak için arzu edilen bir durumdur. Ancak her zaman istenilen çalışma potansiyelinde tayin yapılamayabilir. Biyosensörlerde takip edilen elektroaktif türün yükseltgenme ve indirgenme potansiyeli genellikle yüksektir. Bu sebeple analit ile beraber ortamda bulunan diğer elektroaktif türler de çalışılan potansiyelde reaksiyona girebilir. Çalışma potansiyelini düşürmek için genellikle elektroaktif türe karşı elektrokatalitik etki gösteren bir materyal kullanılır. Bu materyal bir medyatör, bir redoks polimeri ya da bir nanoparçacık olabilir. ADH temelli biyosensörlerde  $NADH$ 'nin yükseltgemesi takip edildiğinden ve  $NADH$ 'nin yalnız elektrotlarda yükseltgenmesi yüksek bir potansiyel gerektirdiğinden, YBCE'ler

MWCNT, AuNP ve PNR ile modifiye edilerek kompozit bir elektrot hazırlanmıştı. ADH temelli biyosensörler için etanole karşı en yüksek duyarlık göstermesi sebebiyle YBCE/NADH/AuNP/PNR kompozit elektrodu, optimum formülasyon olarak belirlenmişti (Bölüm 4.7.8). YBCE/NADH/AuNP/PNR sensörünün NADH'nin yükseltgenmesine karşı gösterdiği elektrokatalitik etki gösterdiği ise Bölüm 4.2'de açıklanmıştı.

Çalışmanın bu kısmında, YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin etanole karşı farklı potansiyelerde gösterdiği amperometrik yanıtlar incelenmiştir. 150 unit enzim miktarında hazırlanan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile etanolün amperometrik tayini, pH 7,75'da ve 7 mM NAD<sup>+</sup> derişiminde farklı potansiyelerde yapılmıştır ve elde edilen Amperogramlardan yararlanılarak akım-derişim grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.63). Bu grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri ise Çizelge 4.14'de verilmiştir.



Şekil 4.63. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün farklı potansiyelerde, etanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 7 mM NAD<sup>+</sup>, 0,1 M KCl, 150 unit ADH)

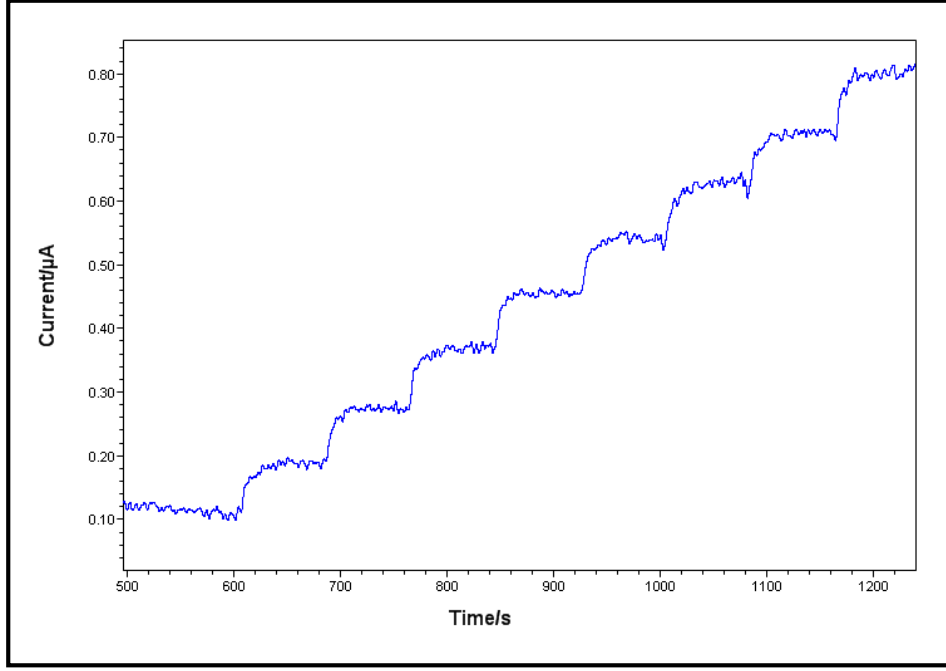
YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörü ile + 0,1 V en düşük potansiyelde dahi etanole karşı amperometrik yanıt alınmıştır. Bu sonuç, YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodunun NADH'ye karşı ne kadar yüksek elektrokatalitik etki gösterdiğini belirtmektedir. Çalışma potansiyeli arttıkça, akım değerleri ve duyarlık da artmaktadır. ADH temelli biyosensörlerin etanole karşı en düşük duyarlığı + 0,1 V'da, en yüksek duyarlığı ise + 0,7 V'da yapılan amperometrik tayinler sonucunda elde edilmiştir. + 0,2 V'da elde edilen duyarlık, + 0,1 V'da elde edilene göre 2 kat daha fazladır. + 0,2 V ve + 0,3 V'da yapılan analizlerde elde edilen akım ve duyarlık değerleri ise birbirine yakındır. + 0,5 V'dan itibaren ise duyarlık hızla artmaya başlamıştır. Ancak, çalışma potansiyelinin düşük olması tercih edildiğinden optimum çalışma potansiyeli olarak duyarlığı nispeten yüksek olan + 0,2 V belirlenmiştir. Kompozit elektrotta yer alan MWCNT ve PNR, ADH temelli biyosensörün çalışma potansiyelini yarattığı yüksek sinerjik etki ile mükemmel bir şekilde düşürmüştür. Böylece ADH temelli biyosensörler ile etanolün girişimsiz tayini yapılabilecektir.

Çizelge 4.14. Şekil 4.63'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri

Çalışma potansiyeli	Duyarlık	Korelasyon katsayısı
+ 0,1 V	0,264 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,981
+ 0,2 V	0,452 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,993
+ 0,3 V	0,458 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,990
+ 0,4 V	0,503 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,995
+ 0,5 V	0,756 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,996
+ 0,6 V	0,771 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,996
+ 0,7 V	0,988 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,999

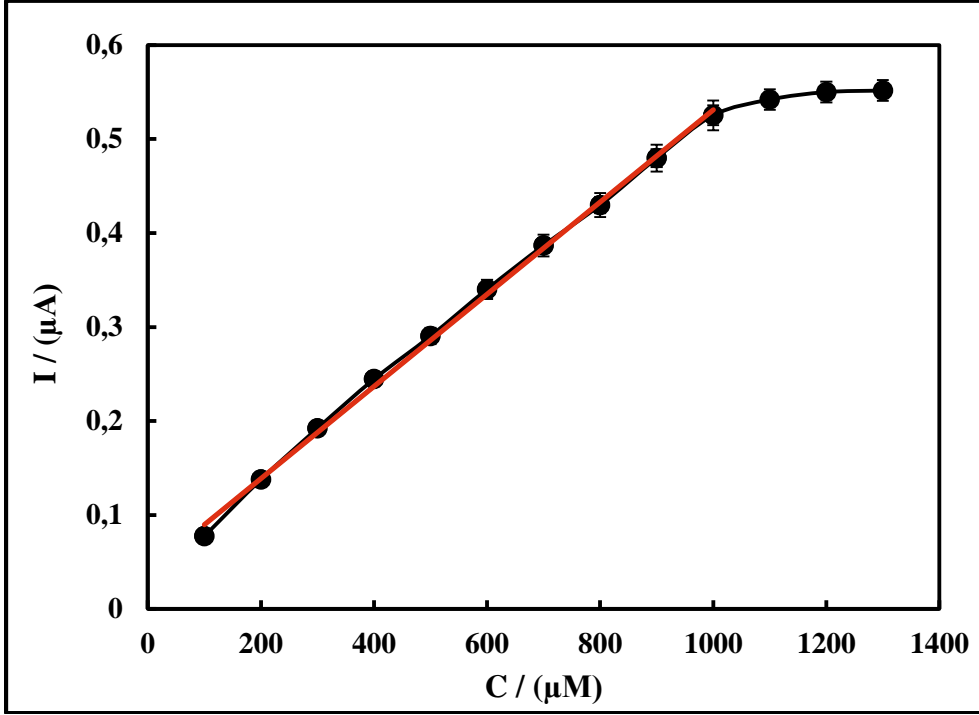
#### 4.7.13. Analitiksel karakterizasyon

150 unit enzim miktarında hazırlanan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile etanolün amperometrik tayini, içerisinde 7 ml 50 mM pH 7,75 fosfat tamponu ve 1 ml  $\text{NAD}^+$  çözeltisi bulunan elektrokimyasal hücrede, çözeltinin sabit hızda sürekli karıştırıldığı şartlarda + 0,2 V'da gerçekleştirilmiştir. Akım kararlı hale geldikten sonra 100  $\mu\text{M}$  etanol, elektrokimyasal hücreye ardışık olarak katılmış ve zamana karşı akım değerleri potansiyostat tarafından kaydedilmiştir. Şekil 4.64'de etanolün amperometrik tayini için elde edilen örnek bir kronoamperogram verilmiştir. Etanol ilavesiyle zamanla akımda bir artış olduğu kronoamperogramdan anlaşılmaktadır. Etanol konsantrasyonu ile artan akım değerleri kullanılarak etanolün kantitatif tayini yapılabilir.



Şekil 4.64. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensöründe 100  $\mu\text{M}$  etanolün ardışık katımı ile elde edilen kronoamperogram (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

Şekil 4.65’de 100  $\mu\text{M}$  etanolün ardışık katımı ile yapılan amperometrik tayin sonucu elde edilen grafik çizilmiştir. Etanol derişimi arttıkça akım değerleri de doğru orantılı olarak artmıştır. Etanol derişimi 1000  $\mu\text{M}$ ’ye ulaşınca akımdaki artış hızı azalmış ve grafiğin doğrusallığı ve biyosensörün hassasiyeti azalmıştır. 1000  $\mu\text{M}$ ’dan sonraki etanol derişimlerinde enzim doygunluğa ulaşmaya başlamıştır.



Şekil 4.65. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensöründe 100  $\mu\text{M}$  etanolün ardışık katımı ile elde edilen akım-derişim grafiği (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

Etanolün amperometrik tayini için kullanılan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün analitiksel karakterizasyonu için gözlemlenebilme ve tayin sınırı, duyarlık ve tekrarlanabilirlik gibi parametreler belirlenmiş ve Çizelge 4.15’de verilmiştir.

Çizelge 4.15. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile etanolün amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler

Gözlemlenebilme sınırı	96,1 $\mu\text{M}$
Tayin sınırı	320,2 $\mu\text{M}$
Doğrusal aralık	320,2 $\mu\text{M}$ – 1000 $\mu\text{M}$
Duyarlık	0,490 $\mu\text{A.mM}^{-1}$
Tekrarlanabilirlik	RSD % 1,57 (n=10), 400 $\mu\text{M}$ etanol

Çizelge 4.15 incelendiğinde, YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün etanole karşı olan duyarlığının, + 0,2 V’da yapılan amperometrik tayin için oldukça iyi olduğu görülmektedir. Biyosensörde MWCNT ve PNR’nin bulunması, NADH’ye karşı olan elektrokatalitik etkileri nedeniyle çalışma potansiyelini düşürmüştür. MWCNT, AuNP ve PNR’nin yarattığı sinerjik etki ise elektroaktif yüzey alanı ve duyarlığı artırmıştır. MWCNT’nin anti-fouling ve NADH reaksiyonlarını iletme etkisi nedeniyle, 1000  $\mu\text{M}$  etanol derişimine ulaşınca kadar ardışık katımla amperometrik tayin yapılabilmektedir. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörü ile etanolün düşük potansiyelde ve iyi duyarlıkta amperometrik tayini yapılabilmektedir.

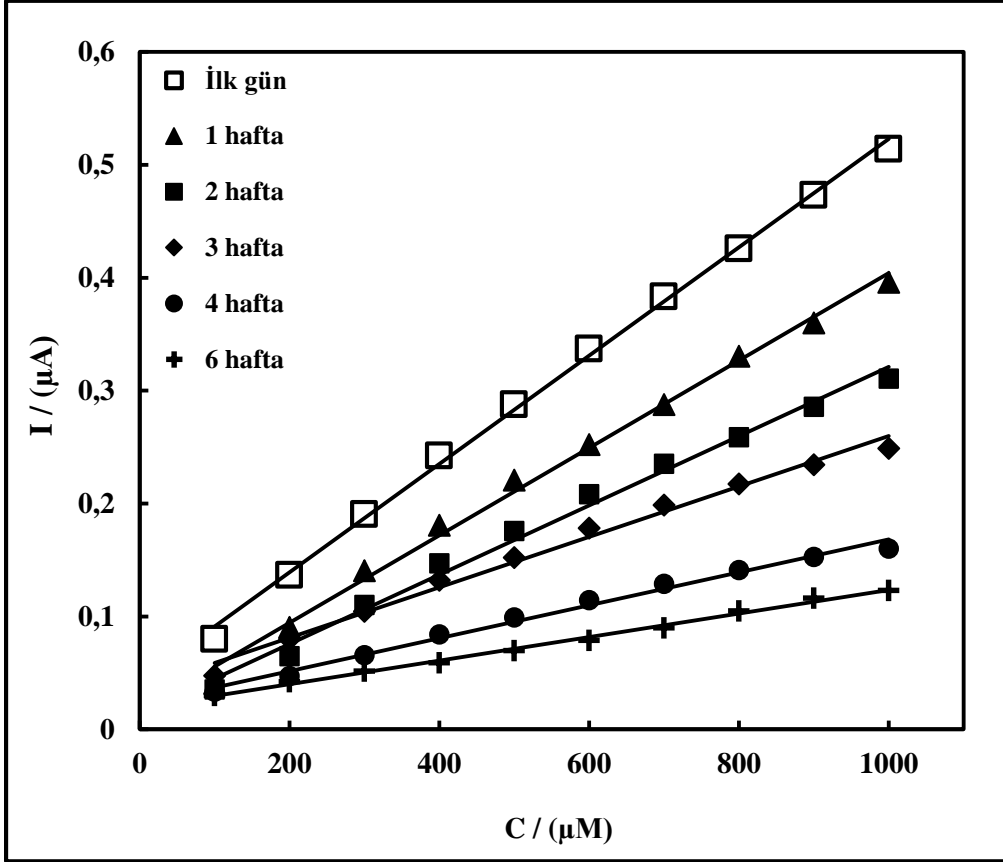
YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün + 0,2 V'da etanolün amperometrik tayinine karşı tekrarlanabilirliği 400  $\mu$ M etanol için (n=10) test edilmiş, bağıl standart sapma (R.S.D.) % 1,57 olarak hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlik için hesaplanan RSD değeri, 10 tekrarlı etanolün amperometrik tayininin iyi olduğunu göstermektedir.

YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün uygulama kararlılığı 400  $\mu$ M etanol derişimine karşı akımların 7 gün boyunca ölçülmesiyle test edilmiştir. Ölçülen akım-gün sayısı arasındaki ilişkiyi gösteren grafik Şekil 4.66'da verilmiştir. Grafik incelendiğinde, 2. günün sonunda başlangıç amperometrik cevabının % 12,62'sininin, 3. günün sonunda ise % 54,03'ünün kaybedildiği görülmektedir. Enzimin aktivitesindeki bu azalış, 7. günün sonunda % 72,17'ye ulaşmıştır. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün uygulama kararlılığı ilk kullanımdan sonra azalmış olsa da, 7. güne kadar etanole karşı amperometrik yanıt vermiştir. Tek kullanımlık olarak hazırlanan bir biyosensör için, bu uygulama kararlılığının iyi olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.66. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörünün 400  $\mu$ M etanol derişimine karşı elde edilen akım değerleri-gün sayısı grafiği (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

Sıcaklık, nem, kimyasal maddeler gibi etkilerle enzimlerin aktif merkezlerinde değişiklikler meydana gelir. Enzimler uygun koşullarda saklanmış olsalar da, zamanla aktivite kaybına uğrarlar. Geliştirilen etanol biyosensörünün depolama kararlılığını belirlemek için, hazırlanan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri + 4  $^{\circ}$ C'de sabit nem ortamında bekletilmiştir. 1, 2, 3, 4 ve 6 hafta boyunca depolanan biyosensörlerle etanolün amperometrik tayini yapılmıştır. Amperometrik tayin sonucu elde edilen akım-derişim grafikleri Şekil 4.67'de, bu grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları ise Çizelge 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.67. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinde 100 μM etanolün ardışık katımı ile elde edilen akım-derişim grafikleri (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

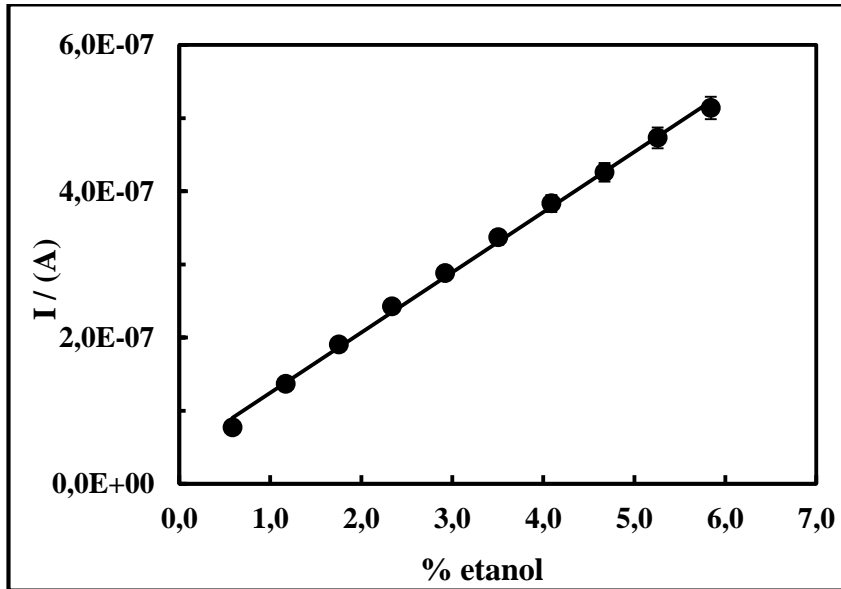
YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin 6. haftaya kadar etanole karşı yanıt verdiği amperometrik Şekil 4.67'de verilen grafiklerden anlaşılmaktadır. Çizelge 4.16'da verilen duyarlık değerleri incelendiğinde, depolama süresince YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin enzim aktivitesinde bir azalma olduğu görülmektedir. Enzim aktivitesinde zamanla azalma olmasına rağmen, ADH temelli biyosensörleri düşük duyarlıkta olsa da 6. haftada etanole karşı cevap vermiştir. Bu sonuç, elektrot formülasyonunda bulunan AuNP'nin biyoyoumluluk özelliği sayesinde, enzimin aktif merkezindeki konformasyonel değişiklikleri azaltması nedeniyle elde edilmiştir. Depolama süresince YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinin duyarlıklarının 1, 2, 3, 4, 5 ve 6. hafta sonunda, ilk güne göre sırasıyla % 19,38 % 36,04, % 49,79, 4 % 69,58 ve % 78.33 azaldığı bulunmuştur.

Çizelge 4.16. Şekil 4.67’de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri

Depolama zamanı	Duyarlık	Korelasyon katsayısı
İlk gün	0,480 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,999
1 hafta	0,387 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,997
2 hafta	0,307 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,996
3 hafta	0,223 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,995
4 hafta	0,146 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,995
6 hafta	0,104 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,997

#### 4.7.14. Gerçek numune analizi

Geliştirdiğimiz ADH temelli biyosensörler, gerçek numunelerin analizinde kullanılmıştır. Yeni Rakı, İllegüp beyaz şarap ve Nobel kırmızı şarap gerçek numune olarak kullanılmıştır. Kırmızı ve beyaz şarap numuneleri 1:2 oranında, rakı numunesi ise 1:10 oranında tampon çözelti ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş alkol numunelerinin amperometrik tayini + 0,2 V’da YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile yapılmıştır. Geliştirilen biyosensörler için elde edilen akım-derişim grafikleri, x-eksenlerinde bulunan  $\mu\text{M}$  etanol derişimlerinin, % etanole dönüştürülmesiyle yeniden çizilmiş ve doğrunun denklemi belirlenmiştir (Şekil 4.68).



Şekil 4.68. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörlerinde 100  $\mu\text{M}$  etanolün ardışık katımı ile elde edilen akım-etanol yüzdesi grafikleri (+ 0,2 V, 50 mM pH 7,75 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)



Seyreltilmiş numunelerin etanol yüzdesini bulmak için, ölçülen akım değerleri  $y = 8,24 \times 10^{-8} x + 4,2 \times 10^{-8}$  denklemde yerine yazılmıştır. Çizelge 4.17’de seyreltilmiş numunelerin analizi sonucu ölçülen akım değerleri, hesaplanan seyreltilmiş, seyreltilmemiş ve orijinal alkol yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 4.17. Seyreltilmiş numunelerin analizi sonucu ölçülen akım değerleri ve hesaplanan alkol yüzdeleri

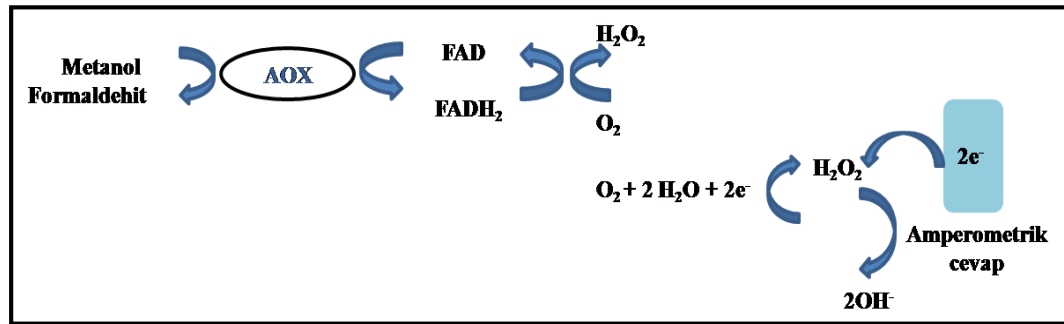
Alkol numunesi	Yeni Rakı	Nobel Kırmızı Şarap	İllegüp Beyaz Şarap
Ölçülen akım (A)	$4,09 \times 10^{-7} \pm 7,64 \times 10^{-9}$	$5,49 \times 10^{-7} \pm 3,24 \times 10^{-8}$	$5,24 \times 10^{-7} \pm 3,29 \times 10^{-8}$
Seyreltilmiş % alkol	% 4,46	% 6,16	% 5,85
Seyreltilmemiş % alkol	% 44,6	% 12,32	% 11,70
Orijinal numunedeki % alkol	% 45		% 11,5-12

Analiz sonucunda hesaplanan alkol yüzdeleri, orijinal numunedeki alkol yüzdelere yakın bulunmuştur. Geliştirmiş olduğumuz YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile düşük maliyetli, numune ön işlemi gerektirmeyen pratik ve duyarlı bir etanol analizi yapılmıştır.

#### 4.8. AOx Temelli Biyosensörlere İlişkin Bulgular

##### 4.8.1. AOx temelli biyosensörlerde oksijenin indirgenmesinin takibi

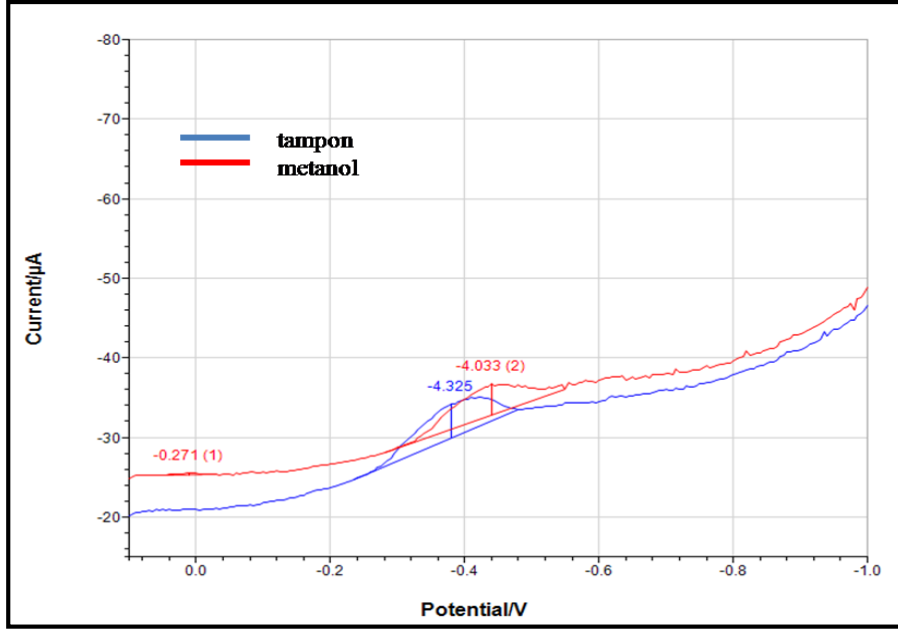
AOx temelli biyosensörlerin ölçüm prensibi oksijenin indirgenmesinin takibine dayanmaktadır (Şekil 4.69).



Şekil 4.69. AOx temelli biyosensörlerin ölçüm prensibinin şematik gösterimi

Oksijenin indirgenmesinin takibi için diferansiyel puls voltametrisinden yararlanılmıştır. YBCE/AOx/G/GA formülasyonunda hazırlanmış biyosensörlerin, - 0,1 V ile + 1,0 V potansiyel aralığında, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu ve 100 µM metanol'deki diferansiyel puls voltamogramları Şekil 4.70'de verilmiştir. Voltamogramlara göre - 0,3 V ile - 0,5 V aralığında pik gözlenmektedir. Oksijenin indirgenme pik potansiyelinin tampon içerisinde - 0,38 V'da, 100 µM metanol

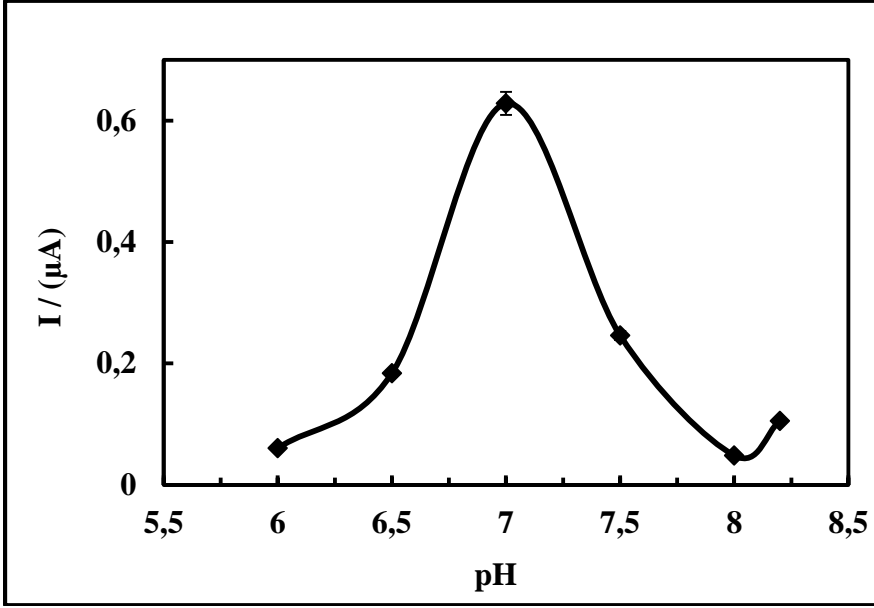
içerisinde ise - 0,44 V'da olduğu, pik akımlarının ise tamponda 4,325  $\mu\text{A}$ , 100  $\mu\text{M}$  metanolde ise 4,033  $\mu\text{A}$  olduğu voltamogramdan görülmektedir. Substrat ilave edildiğinde ortamdaki oksijeninin azaldığı pik akımının azalmasından anlaşılmaktadır. FAD/FADH<sub>2</sub> redoks çiftinin formal potansiyeli doygun kalomel elektroda karşı - 0,45 V'dur (Gouveia-Caridade vd 2008). Diferansiyel puls voltamogramlarından elde edilen pik akımlarının FAD/FADH<sub>2</sub>'nin formal potansiyeli olan - 0,45 V'a yakın olması, FADH<sub>2</sub>'nin de bu potansiyelde indirgenildiğini göstermektedir. Oksijenin ve FADH<sub>2</sub>'nin indirgenmesi aynı potansiyel aralığında gerçekleşmektedir.



Şekil 4.70. YBCE/AOx/G/GA biyosensörünün diferansiyel puls voltamogramları (100  $\mu\text{M}$  metanol, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, - 0,1 V ile 1,0 V potansiyel aralığı)

#### 4.8.2. AOx temelli biyosensörlerde pH optimizasyonu

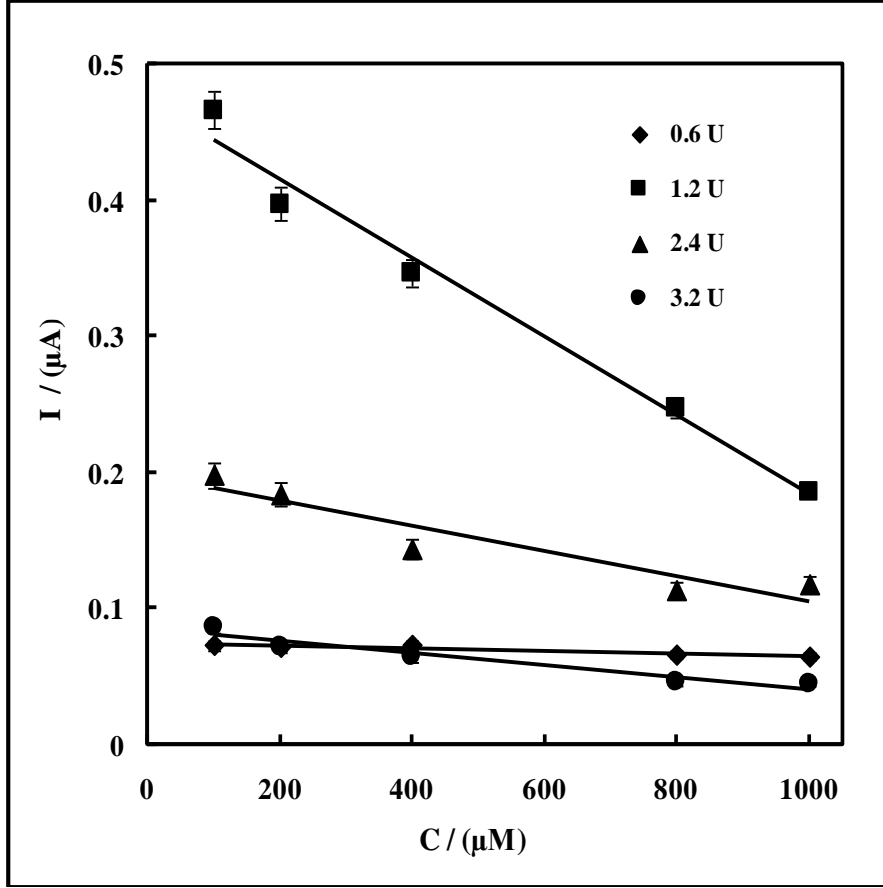
AOx temelli biyosensörlerin metanole karşı olan cevabına pH'nın etkisini incelemek ve optimum pH değerini belirlemek için YBCE/AOx/G/GA formülasyonunda biyosensörler hazırlanmıştır. Bu biyosensörlerin 50 mM derişiminde farklı pH'larda hazırlanmış fosfat tampon çözeltileri içerisinde, - 0,45 V'da ve 100  $\mu\text{M}$  sabit metanol derişimindeki akımları ölçülmüştür. Elde edilen akım değerlerine karşı pH grafiği çizilmiştir. 6,0'dan 7,0'ye pH arttıkça, pik akımının arttığı, pH 7,0'den sonra ise hızla azaldığı Şekil 4.71'deki grafikten görülmektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak optimum pH değerinin 7,0 olduğu belirlenmiştir. AOx enzimi ile AOx temelli biyosensörün optimum pH değerlerinin uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. AOx enziminin YBCE yüzeyine tutuklandıktan sonra pH'sında fazla bir değişiklik olmamasının, tutuklama yönteminin enzimin yapısını fazla değiştirmediğini göstermektedir. Optimum pH 7,0 olarak belirlendiğinden, bundan sonraki ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.71. YBCE/AOx/G/GA biyosensörünün, farklı pH'larda elde edilen akımlara karşı pH grafiği (100 µM metanol, - 0,45 V, 0,1 M KCl)

#### 4.8.3. AOx temelli biyosensörlerde enzim miktarının optimizasyonu

Çalışmanın bu kısmında jelâtin ve GA sabit tutularak 0,6, 1,2, 2,4 ve 3,2 unit AOx içeren biyosensörler hazırlanmış ve amperometrik ölçümler fosfat tamponunda (50 mM, pH 7,0) - 0,45 V'da gerçekleştirilmiştir. Amperogramlardan elde edilen akım ortalamalarına karşı derişim grafiği çizilmiştir (Şekil 4.72). Grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri Çizelge 4.18'de verilmiştir. En yüksek duyarlık ve korelasyon değerleri, 1,2 unit enzim miktarı içeren AOx biyosensörü ile elde edilmiştir. 1,2 unitten daha yüksek enzim miktarına sahip biyosensörlerde difüzyonun giderek azalması nedeniyle, duyarlık ve korelasyon değerlerinin azaldığı gözlenmektedir. 1,2 unitten daha düşük enzim miktarında ise istenilen duyarlığa ulaşamamıştır. Optimum enzim miktarının 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, - 0,45 V'da 1,2 unit olduğu belirlendikten sonra, bundan sonraki biyosensörler 1,2 unit enzim miktarında hazırlanarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.



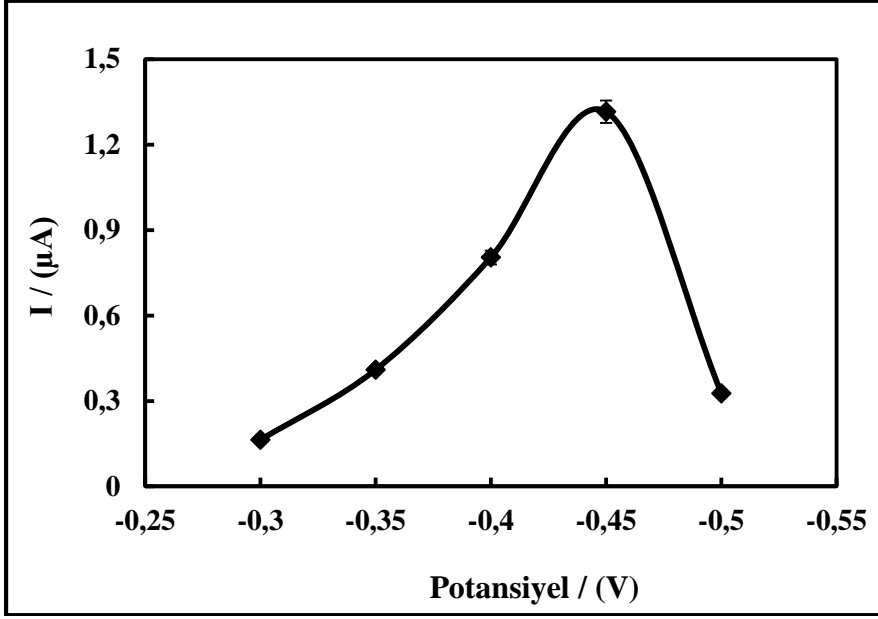
Şekil 4.72. Farklı enzim miktarlarında hazırlanmış YBCE/AOx/G/GA biyosensörlerinin metanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, - 0,45 V)

Çizelge 4.18. Şekil 4.72'da verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri

Enzim miktarı (U)	Duyarlık	Korelasyon katsayısı
0,6	0,0102 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,949
1,2	0,288 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,991
2,4	0,092 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,940
3,2	0,043 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,962

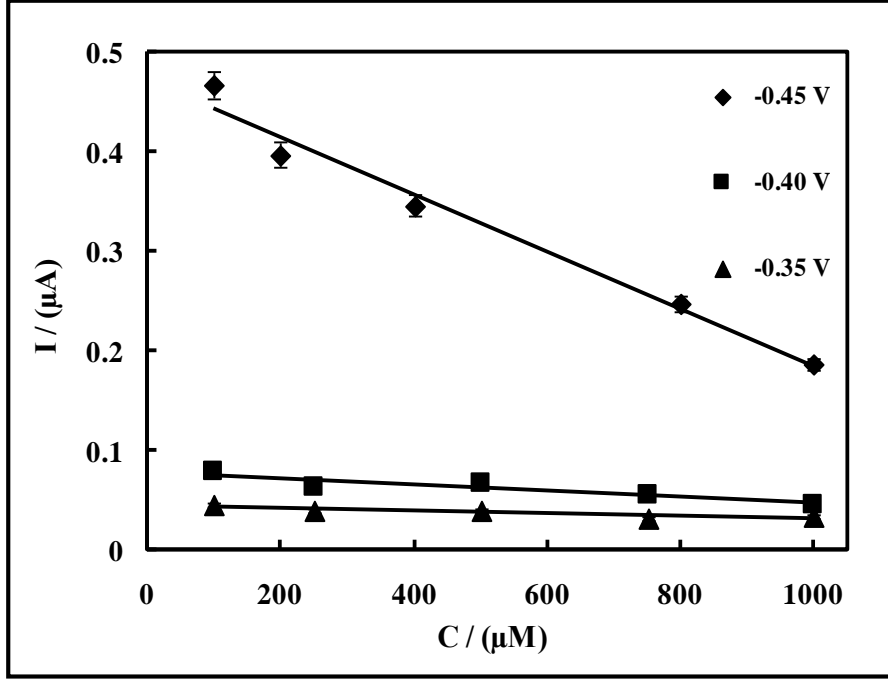
#### 4.8.4. AOx temelli biyosensörlerde çalışma potansiyelinin optimizasyonu

YBCE/AOx/G/GA biyosensörlerinin optimum çalışma potansiyelini belirlemek için, 100  $\mu\text{M}$  metanol derişiminde, - 0,3 V ile - 0,5 V aralığında multistep amperometri uygulanmıştır. Amperogramlardan elde edilen akım ortalamalarına karşı potansiyel grafiği çizilmiştir. Şekil 4.73'deki grafiğe göre en yüksek pik akımı - 0,45 V'da gözlenmiştir. Bu sonuçlar Şekil 4.70'deki voltamogramlarla uyumludur.



Şekil 4.73. YBCE/AOx/G/GA biyosensörünün, farklı potansiyelerde elde edilen akımlara karşı potansiyel grafiği (100 µM metanol, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl).

YBCE/AOx/G/GA biyosensörlerinin çalışma potansiyelinin optimizasyonunu analitiksel olarak karakterize etmek için ise, - 0,30, - 0,40 ve - 0,45 V'da amperometrik tayin yapılmıştır. Kronoamperogramlardan elde edilen akım verilerinin metanol derişimine karşı olan grafikleri çizilmiştir. Grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri Çizelge 4.19'da verilmiştir. En yüksek duyarlık ve korelasyon değerleri, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, 1,2 U enzim miktarında, - 0,45 V'da elde edilmiştir (Şekil 4.74).



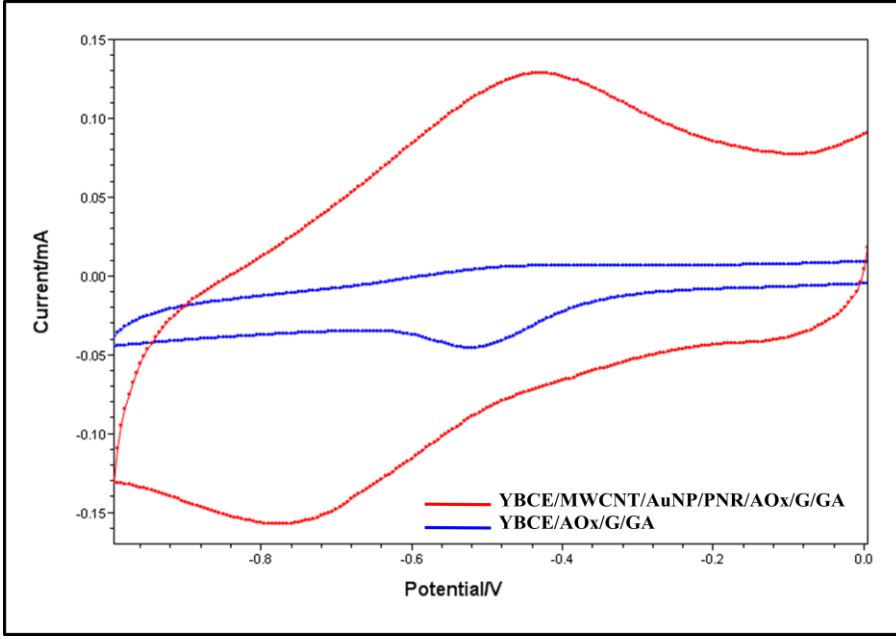
Şekil 4.74. YBCE/AOx/G/GA biyosensörünün farklı potansiyellerde, metanol derişimine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1,2 unit AOx).

Çizelge 4.19. Şekil 4.74'de verilen grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayıları değerleri

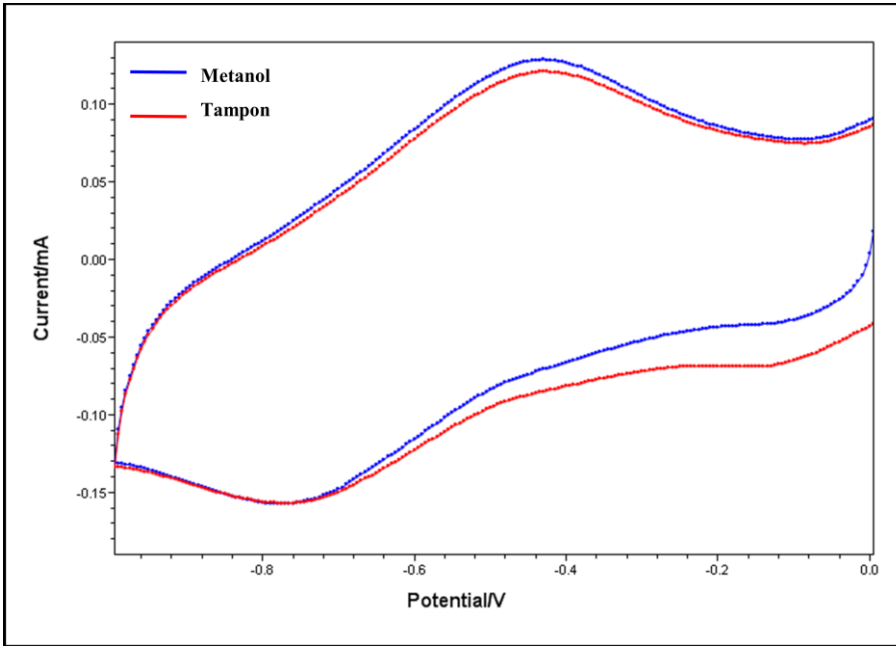
Potansiyel (V)	Duyarlık	Korelasyon katsayısı
-0,35	0,014 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,912
-0,40	0,030 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,919
-0,45	0,288 $\mu\text{A.mM}^{-1}$	0,991

#### 4.8.5. AOx temelli biyosensörlerde MWCNT, AuNP ve PNR etkisi

NADH sensörü ve ADH temelli biyosensörler üzerinde yarattığı sinerjik etkileri nedeniyle, MWCNT, AuNP ve PNR materyalleri, AOx temelli biyosensörlerin geliştirilmesi için YBCE elektrotlarının modifikasyonunda kullanılmıştır. Şekil 4.75'de YBCE/AOx/G/GA ve YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörlerinin tampon çözeltideki döngüsel voltamogramları verilmiştir. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensöründe PNR'nin yükseltgenme pik akımı -0,465 V'da, indirgenme pik akımı ise -0,745 V'da gözlenmiştir. Metanol varlığında YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörünün verdiği cevap, Şekil 4.76'daki döngüsel voltamogramlardan anlaşılmaktadır.



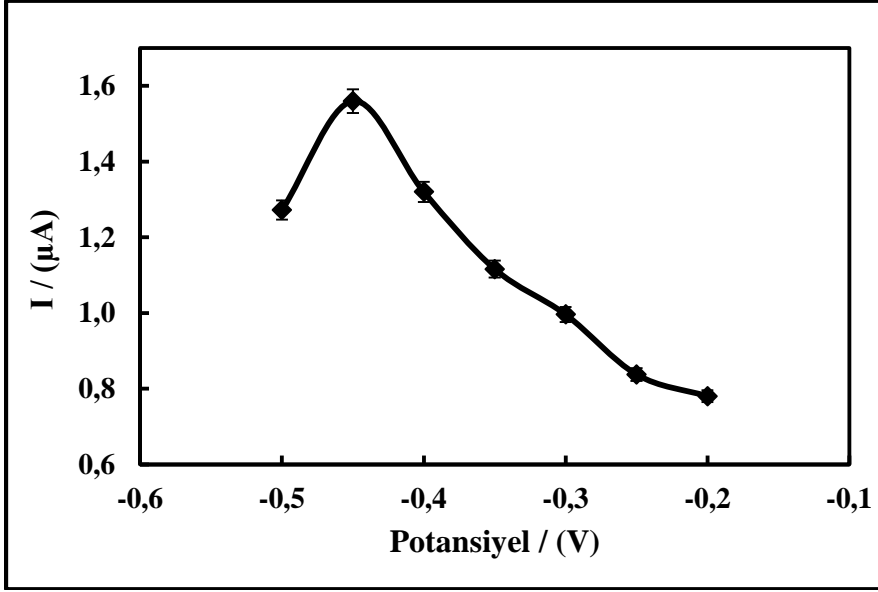
Şekil 4.75. YBCE/AOx/G/GA ve YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G biyosensörlerinin 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisindeki döngüsel voltamogramları (Tarama hızı:  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1,2 unit AOx)



Şekil 4.76. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G biyosensörlerinin 200  $\mu\text{M}$  metanol ve tampon çözeltide elde edilen döngüsel voltamogramları (Tarama hızı:  $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$  50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, 1,2 unit AOx)

YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörlerinin optimum çalışma potansiyelini belirlemek için, 200 µM metanol derişiminde, - 0,2 V ile - 0,5 V aralığında multistep amperometri uygulanmıştır. Amperogramlardan elde edilen akım ortalamalarına karşı potansiyel grafiği çizilmiştir. Şekil 4.77'deki grafiğe göre en yüksek pik akımı - 0,45 V'da gözlenmiş ve potansiyel artışıyla akım azalmıştır. PNR'nin yükseltgenmesi takip edileceği için çalışma potansiyeli, -0,465 V'dan daha düşük bir potansiyelde olmalıdır. Metanolün enzimatik reaksiyonunda yükseltgenmiş haldeki PNR, indirgenen FADH<sub>2</sub>'yi tekrar FAD'ye yükseltgerken, kendisi indirgenir. İndirgenmiş PNR'nin elektrot yüzeyinde yeniden yükseltgenmesi ile açığa çıkan elektronlar elektroda transfer edilir. PNR, oksidaz temelli biyosensörlerde redoks medyatörü olarak kullanılmaktadır. Glukozun düşük potansiyelde tayini için karbon film elektrodu, PNR ve glukoz oksidaz (GOx) ile modifiye edilerek glukoz biyosensörü Pauliukaite vd tarafından 2007 yılında geliştirilmiştir. Glukozun amperometrik tayinini -0,25 V'da gerçekleştirmişler, PNR'nin FADH<sub>2</sub>'nin yükseltgenmesini katalizlediğini ve redoks medyatörü olarak davrandığını bildirmişlerdir. 2007 yılında Qu vd GC/MWCNT/PNR/GOx biyosensörü ile -0,2 V'da glukozun girişimsiz tayinini gerçekleştirmişlerdir. Barsan vd 2008 yılında alkol analizi için karbon film elektrot/PNR/AOx biyosensörünü geliştirmişlerdir. PNR'nin AOx enzimi için redoks medyatörü olarak görev yaptığını bildirmişlerdir. 2008 yılında Anık vd bizmut film elektrodunu (BiFE) glukoz oksidaz (GOx) ile modifiye ederek BiFE/GOx biyosensörünü geliştirmişlerdir. Glukozun tayininde NR monomerini çözelti içerisinde redoks medyatörü olarak kullanmışlardır. NR, FADH<sub>2</sub>'nin yeniden yükseltgenmesi için kullanılan oksijenin yerini alarak medyatör görevi yapmıştır. Çalışmamızda geliştirdiğimiz YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensöründe de PNR, medyatör olarak kullanılmış ve PNR'nin yükseltgenme potansiyeli girişim yapan türlerin etkisini azaltmak için takip edilmiştir. Şekil 4.77 incelendiğinde YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörü -0,2 V'a kadar metanole cevap vermiş, ancak -0,3 V'dan sonra akımdaki azalma hızı biraz artmıştır. -0,25 ve -0,20 V'da gözlenen akımlar ise birbirine yakındır. Akım değerleri, düşük potansiyelde tayin ve literatürdeki çalışmalar dikkate alındığında, YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörünün optimum çalışma potansiyeli -0,30 V olarak belirlenmiştir.

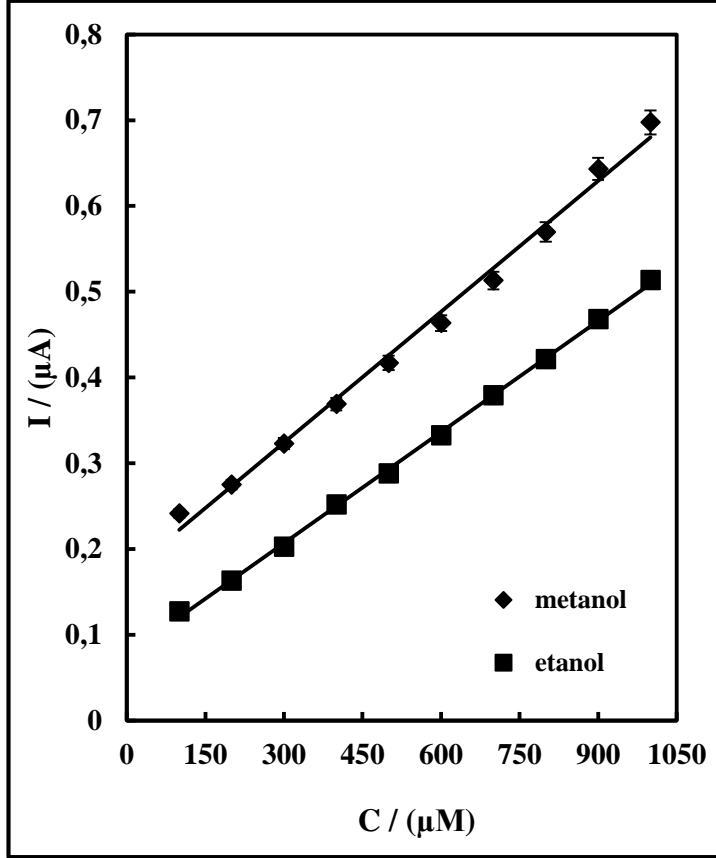




Şekil 4.77. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörünün, farklı potansiyelerde elde edilen akımlara karşı potansiyel grafiği (200 µM metanol, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl).

#### 4.8.6. AOx temelli biyosensörlerde analitiksel karakterizasyon

YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörleri ile metanolün ve etanolün -0,30 V'da amperometrik tayinleri yapılmış ve kronoamperogramlardan elde edilen akım verilerinin metanol ve etanol derişimine karşı grafikleri çizilmiştir. Şekil 4.78'de verilen grafiklerin duyarlılığı ve korelasyon katsayıları sırasıyla metanol için 0,509 µA.mM<sup>-1</sup> ve 0,999, etanol için ise 0,432 µA.mM<sup>-1</sup> ve 0,999 olarak bulunmuştur. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörlerinin tekrarlanabilirliği 400 µM metanol (n=5) ve 400 µM etanol (n=5) için test edilmiş, bağıl standart sapma (R.S.D.) metanol için % 1,12, etanol için % 1,65 olarak hesaplanmıştır. Biyosensör formülasyonunda MWCNT, AuNP ve PNR'nin bulunması yarattıkları sinerjik etki ile elektrodun elektroaktif yüzey alanını artırmış ve daha duyarlı amperometrik yanıt alınmasını sağlamıştır. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörleri ile etanol ve metanolün amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler Çizelge 4.19'da verilmiştir.



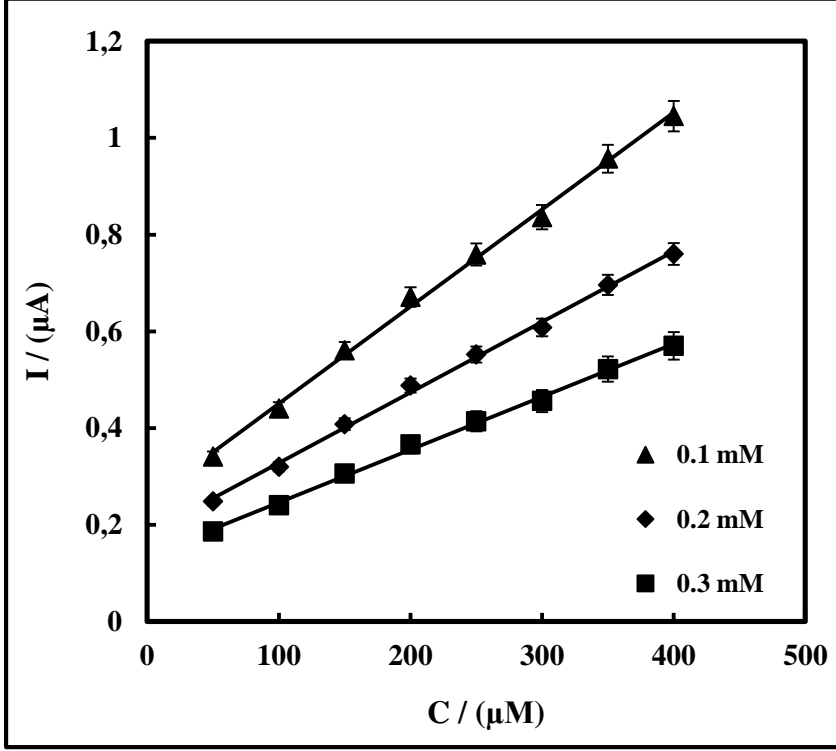
Şekil 4.78. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörlerinin metanol ve etanol derişimlerine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, -0,30 V, 0,1 M KCl, 1,2 unit AOx)

Çizelge 4.20. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörleri ile etanol ve metanolün amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler

	Etanol	Metanol
Gözlemlenebilme sınırı	53,5 μM	100,8 μM
Tayin sınırı	178,5 μM	335,9 μM
Doğrusal aralık	178,5 μM – 1000 μM	335,9 μM - 1000 μM
Duyarlık	0,432 μA.mM <sup>-1</sup>	0,509 μA.mM <sup>-1</sup>
Tekrarlanabilirlik	RSD % 1,65 (n=5), 400 μM	RSD % 1,12 (n=5), 400 μM

YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörleri etanol/metanol karışımının tayini için kullanılmıştır. Şekil 4.79'de 0,1 mM, 0,2 mM ve 0,3 mM sabit etanol derişimlerinde hazırlanmış olan farklı derişimlerdeki metanol çözeltilerinin -0,30 V'da yapılan amperometrik tayini için elde edilen akım-derişim grafikleri verilmiştir. Grafiklerden elde edilen doğruların denklemleri, 0,1 mM, 0,2 mM ve 0,3 mM sabit etanol derişimleri için sırasıyla  $y = 1,1 \times 10^{-3} x + 1,35 \times 10^{-7}$ ,  $y = 1,46 \times 10^{-3} x + 1,82 \times 10^{-7}$

ve  $y = 1,99 \times 10^{-3} x + 2,52 \times 10^{-7}$  dir. Etanol/metanol karışımının tayininde, etanol derişiminin artışıyla, aynı metanol derişimlerdeki akım değerlerinde de bir artış gözlenmiştir. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörleri ile sabit etanol derişiminde metanolün amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler Çizelge 4.20’de verilmiştir.



Şekil 4.79. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G biyosensörlerinin 0,1, 0,2 ve 0,3 mM sabit etanol derişiminde hazırlanmış farklı metanol derişimlerine karşı elde edilen akım grafikleri (50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl, - 0,30 V, 1.2 U, AOx)

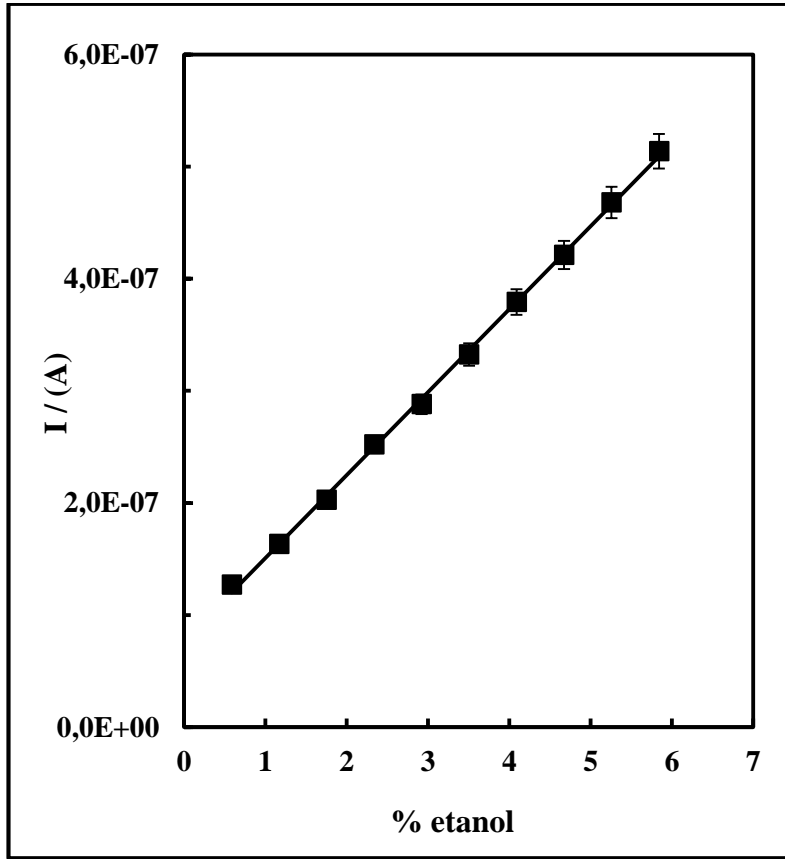
Çizelge 4.21. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörleri ile sabit etanol derişiminde metanolün amperometrik tayini için elde edilen analitiksel parametreler

	0,1 mM etanolde metanol	0,2 mM etanolde metanol	0,4 mM etanolde metanol
Gözlemlenebilme sınırı	36,82 µM	37,40 µM	37,99 µM
Tayin sınırı	126,6 µM	124,7 µM	122,7 µM
Doğrusal aralık	126,6 - 400 µM	124,7 - 400 µM	122,7 - 400 µM
Duyarlık	1,10 µA.mM <sup>-1</sup>	1,46 µA.mM <sup>-1</sup>	1,99 µA.mM <sup>-1</sup>
Tekrarlanabilirlik	RSD % 1,81 (n=5), 200 µM	RSD % 2,12 (n=5), 200 µM	RSD % 2,36 (n=5), 200 µM

AOx enzimi çok hassas bir enzim olduğundan hazırlanır hazırlanmaz hemen analiz için kullanılmıştır. YBCE/AOx/G/GA biyosensörleri için depolama ve uygulama kararlılığı testleri denenmiş, ancak AOx enziminin ışıktan çok etkilenmesi ve hemen aktivitesini kaybetmesi nedeniyle sonuç alınamamıştır.

#### 4.8.7. Gerçek numune analizi

Geliştirdiğimiz AOx temelli biyosensörler, gerçek numunelerin analizinde kullanılmıştır. Yeni Rakı, İllegüp beyaz şarap ve Nobel kırmızı şarap gerçek numune olarak kullanılmıştır. Kırmızı ve beyaz şarap numuneleri 1:2 oranında, rakı numunesi ise 1:10 oranında seyreltilmiştir. Seyreltilmiş alkol numunelerinin amperometrik tayini -0,3 V'da YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOX/G/GA biyosensörleri ile yapılmıştır. Geliştirilen biyosensörler için elde edilen akım-derişim grafikleri, x-eksenlerinde bulunan  $\mu\text{M}$  etanol derişimlerinin, % etanole dönüştürülmesiyle yeniden çizilmiş ve doğrunun denklemi belirlenmiştir (Şekil 4.80).



Şekil 4.80. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOX/G/GA biyosensörlerinde 50  $\mu\text{M}$  etanolün ardışık katımı ile elde edilen akım-etanol yüzdesi grafikleri (-0,30 V, 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu, 0,1 M KCl)

Seyreltilmiş numunelerin etanol yüzdesini bulmak için, ölçülen akım değerleri  $y = 7,4 \times 10^{-8} x + 7,71 \times 10^{-8}$  denklemde yerine yazılmıştır. Çizelge 4.21'de seyreltilmiş numunelerin analizi sonucu ölçülen akım değerleri, hesaplanan seyreltilmiş, seyreltilmemiş ve orijinal alkol yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 4.22. Seyreltilmiş numunelerin analizi sonucu ölçülen akım değerleri ve hesaplanan alkol yüzdeleri

Alkol numunesi	Yeni Rakı	Nobel Kırmızı Şarap	İllegüp Beyaz Şarap
Ölçülen akım (A)	$4,22 \times 10^{-7} \pm 7,81 \times 10^{-9}$	$5,45 \times 10^{-7} \pm 3,14 \times 10^{-8}$	$5,18 \times 10^{-7} \pm 3,21 \times 10^{-8}$
Seyreltilmiş % alkol	% 4,66	% 6,32	% 5,96
Seyreltilmemiş % alkol	% 46,6	% 12,72	% 11,92
Orijinal numunedeki % alkol	% 45		% 11,5-12

Analiz sonucunda hesaplanan alkol yüzdeleri, orijinal numunedeki alkol yüzdelerine yakın bulunmuştur. Geliştirmiş olduğumuz YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörleri ile düşük maliyetli, numune ön işleme gerektirmeyen pratik ve duyarlı bir etanol analizi yapılmıştır. ADH temelli biyosensörler ve AOx temelli biyosensörler kullanılarak yapılan etanol tayin sonuçları karşılaştırıldığında, ADH temelli biyosensörler ile etanole karşı daha duyarlı bir tayin yapıldığı sonucuna varılmıştır. Bunun sebebi ise ADH enziminin etanole karşı ilgisinin AOx'e göre daha fazla olmasıdır. Gerçek numune analizlerinde ise AOx temelli biyosensörlerle elde edilen % alkol değerleri, ADH temelli biyosensörle elde edilen sonuçlara göre biraz yüksek çıkmıştır. ADH enziminin AOx'e göre etanole karşı daha duyarlı olmasına rağmen, AOx analizinde elde edilen alkol yüzdesi değerlerinin biraz yüksek çıkmasının, numunelerde bir miktar metanol olduğunu göstermektedir. Şarap ve rakı gibi alkollü içeceklerde Türk Gıda Kodeksi Distile Alkollü İçkiler Tebliğine göre, gıda alkollü kullanılmaktadır. Gıda alkollerinde ise bir miktar metanol bulunmaktadır. Çalışmamızın amacı öncelikle etanolün düşük potansiyelde girişimsiz tayini için ADH temelli biyosensör, hem etanol hem de metanolün girişimsiz tayini için ise AOx temelli biyosensör geliştirmek ve her iki biyosensörün etanol tayinine karşı performanslarını karşılaştırmaktır. Geliştirilen her iki biyosensör ile etanol varlığında metanolün tayinini gerçekleştirmek ise diğer bir amacımızdır.

#### 4.9. Etanol/metanol karışımının analizi

Geliştirdiğimiz ADH ve AOx temelli biyosensörlerle, etanol/metanol karışımının tayini yapılmıştır. Bu amaçla hazırladığımız alkol örnekleri, ADH ve AOx temelli biyosensörleri ile ayrı ayrı analiz edilmiştir. ADH temelli biyosensörler ile alkol örneğindeki etanol derişimi ölçülen akımın, YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA için elde edilen doğrunun denkleminde ( $y = 4,81 \times 10^{-4} x + 4,2 \times 10^{-8}$ ) yerine yazılması ile hesaplanmıştır. Alkol örneğindeki metanol derişimi ise, AOx temelli biyosensörler ile yapılan amperometrik tayin sonucu ölçülen akım değerinin, ADH temelli biyosensörler ile derişimi daha önce belirlenen etanol derişimi ile ilişkili olan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA için elde edilen doğru denklemlerinin kullanılmasıyla bulunmuştur. Analize ilişkin veriler ve sonuçlar Çizelge 4.22'de verilmiştir. ADH temelli biyosensörlerle ölçülen akımlar  $I_{ADH}$  ile AOx temelli biyosensörlerle ölçülen akımlar ise  $I_{AOx}$  ile gösterilmiştir.

Çizelge 4.23. Etanol/metanol karışımının analizine ilişkin veriler ve sonuçlar

Etanol / metanol karışımı	$I_{ADH} / (A)$	$I_{AOx} / (A)$	$C_{\text{etanol}} / (\mu\text{M})$	$C_{\text{metanol}} / (\mu\text{M})$
200 $\mu\text{M}$ / 100 $\mu\text{M}$	$1,379 \times 10^{-7} \pm 1,42 \times 10^{-9}$	$2,418 \times 10^{-7} \pm 3,76 \times 10^{-9}$	199,37	97,09
200 $\mu\text{M}$ / 200 $\mu\text{M}$	$1,362 \times 10^{-7} \pm 1,31 \times 10^{-9}$	$3,571 \times 10^{-7} \pm 3,09 \times 10^{-9}$	195,84	201,91
200 $\mu\text{M}$ / 300 $\mu\text{M}$	$1,390 \times 10^{-7} \pm 1,37 \times 10^{-9}$	$4,646 \times 10^{-7} \pm 3,51 \times 10^{-9}$	201,66	299,64
300 $\mu\text{M}$ / 100 $\mu\text{M}$	$1,851 \times 10^{-7} \pm 1,23 \times 10^{-9}$	$3,275 \times 10^{-7} \pm 2,79 \times 10^{-9}$	297,51	99,66
300 $\mu\text{M}$ / 200 $\mu\text{M}$	$1,859 \times 10^{-7} \pm 1,19 \times 10^{-9}$	$4,756 \times 10^{-7} \pm 2,11 \times 10^{-9}$	299,17	201,09
300 $\mu\text{M}$ / 300 $\mu\text{M}$	$1,876 \times 10^{-7} \pm 1,26 \times 10^{-9}$	$6,181 \times 10^{-7} \pm 2,38 \times 10^{-9}$	302,70	298,69
400 $\mu\text{M}$ / 100 $\mu\text{M}$	$2,329 \times 10^{-7} \pm 1,06 \times 10^{-9}$	$4,508 \times 10^{-7} \pm 3,17 \times 10^{-9}$	396,89	99,89
400 $\mu\text{M}$ / 200 $\mu\text{M}$	$2,328 \times 10^{-7} \pm 1,12 \times 10^{-9}$	$6,515 \times 10^{-7} \pm 1,81 \times 10^{-9}$	396,67	200,75
400 $\mu\text{M}$ / 300 $\mu\text{M}$	$2,342 \times 10^{-7} \pm 1,09 \times 10^{-9}$	$8,481 \times 10^{-7} \pm 2,71 \times 10^{-9}$	399,58	299,55

Çizelge 4.23 incelendiğinde, AOx ve ADH temelli biyosensörler kullanılarak, etanol/metanol karışımındaki hem etanolün hem de metanolün analizi, numune ön işlemi gerektirmeden, başarı ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirdiğimiz AOx ve ADH temelli biyosensörler, sahte içkilerdeki metanolün pratik, basit ve ucuz tayini için umut vaat etmektedir.

## 5. SONUÇ

Çalışmadan elde edilen sonuçlar şöyledir:

- YBCE ve MWCNT-YBE'ler için elektrot yüzeyinin temizlenmesi ve aktivasyonu için uygulanan işlemler arasında en düşük  $\Delta E_p$  ve  $l'$ e yakın  $I_{pa}/I_{pc}$  değerleri, elektrokimyasal ön işlem yapıldığında elde edilmiştir. Optimum elektrot yüzeyi temizleme ve aktivasyonu metodunun elektrokimyasal ön işlem olduğu sonucuna varılmıştır.
- Nötral kırmızının elektropolimerizasyonu hem farklı türdeki yalın YBE'ler hem de nanoparçacık ile modifiye edilmiş YBCE'ler üzerinde başarılı olarak gerçekleştirilmiştir. Yalın YBCE'de NR'nin elektropolimerizasyonu 2007 yılında Pauliukaite vd'nin, NR'nin YBCE/MWCNT üzerindeki elektropolimerizasyonu ise Carvalho vd'nin 2010 yılında NR'nin elektropolimerizasyonu ile ilgili yapmış oldukları çalışmada elde ettikleri voltamogramlarla uyumludur. NR'nin yükseltgenme pik potansiyeli ve NR-leuko NR tersinir dönüşümünün potansiyeline, YBE türlerinin çok fazla etki etmediği ancak nanoparçacıklarla modifiye edilmiş YBCE'lerde değiştiği gözlenmiştir. PNR polimerinin orta redoks çiftinin (doping/de-doping) potansiyel aralıklarının ise hem YBE türleri hem de nanoparçacıklarla modifiye edilmiş YBCE'ler ile değiştiği voltamogramlardan anlaşılmıştır.
- NADH'nin yükseltgenmesinin takibi için en uygun elektrot türünün, çalışma potansiyelinin düşük olması ve dolayısıyla girişim yapabilecek türlerin etkisini azaltması nedeniyle MM-YBE olduğu sonucuna varılmıştır. En uygun elektrot formülasyonunun ise nanoparçacık ve iletken redoks polimerinin birlikte yarattığı sinerjik etki nedeniyle MWCNT/AuNP/PNR kompoziti olduğu bulunmuştur. Kompozit elektrottaki PNR, MWCNT ve AuNP'nin NADH'nin yükseltgenmesine karşı ayrı ayrı ve birlikte gösterdikleri elektrokatalitik ve elektronik etkiler, karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.
- MWCNT/AuNP/PNR kompozit formülasyonunun, NADH'nin amperometrik tayini için en uygun olduğu belirlenen MM-YBE'ye ve karşılaştırma için YBCE'lere uygulandığında, MM-YBE'nin duyarlılığını 2 katına çıkardığı ve YBCE'nin NADH'ye karşı olan yükseltgenme pik potansiyelini + 0,2 V'a düşürdüğü gözlenmiştir.
- MM-YBE/MWCNT/AuNP/PNR ve YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrotlarının analitiksel performanslarının birbirine yakın olması elektrot türünün NADH'nin amperometrik tayini için önemli bir fark yaratmadığı anlaşılmıştır. Bu sebeple özellikle medyatörsüz olması nedeniyle YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu, NADH'nin amperometrik tayini için en uygun formülasyona sahip elektrot olarak seçilmiştir. Literatürde NADH'nin yükseltgenme potansiyelinin düşürülmesi oldukça önemli bir çalışma konusudur ve NADH'nin amperometrik tayini için YBCE/MWCNT/AuNP/PNR formülasyonundaki bir elektrot daha önce kullanılmamıştır. Çalışmamızda hazırladığımız YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu, NADH'nin medyatörsüz, düşük potansiyelde girişimsiz tayini için oldukça umut verici bir yeniliktir.

- Geliştirilen NADH sensörü için pH optimizasyonu çalışması yapılmış ve optimum pH 7,5 olarak bulunmuştur. NADH'nin YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu ile amperometrik tayini sonucu analitiksel karakterizasyonu yapılmış, gözlemlenebilme ve tayin sınırı, duyarlılık ve tekrarlanabilirlik değerleri bulunmuştur. Düşük gözlemlenebilme değerine, yüksek duyarlılık ve tekrarlanabilirliğe sahip düşük potansiyelde girişimsiz tayin yapılabilen yeni amperometrik NADH sensörü başarıyla geliştirilmiştir.
- YBCE elektrotlarının modifikasyonunda kullanılan nanoparçacıkların miktar optimizasyonları yapılmıştır. Nanoparçacıklar tabaka tabaka yöntemi ile elektrot yüzeyine modifiye edilmiştir. YBCE yüzeyinde optimum nanoparçacık miktarının, 1 mM  $K_3Fe(CN)_6$  için en yüksek pik akımlarının elde edildiği, MWCNT için 3 tabaka, AuNP için ise 2 tabaka olduğu sonucuna varılmıştır.
- Enzimlerin YBE'ler üzerine kuvvetli immobilizasyonu ve sonrasında aktivitelerinin korunabilmesi için en uygun tutuklama yöntemleri belirlenmiştir. ADH temelli biyosensörler için GA ile çapraz bağlama, AOx temelli biyosensörler için ise jelâtin yardımıyla immobilizasyonunun en uygun yöntem olduğu sonucuna varılmıştır. Tüm biyosensörlerin sabit nem ortamında bekletilmesinin özellikle ADH temelli biyosensörlerde biyomateryalin ÇE yüzeyinden ayrılmasının önüne geçildiği de çalışmamızda gözlenmiştir.
- ADH temelli biyosensörlerde  $NAD^+$  koenziminin YBE'lerin yüzeyine immobilizasyonunun amperometrik tayinlerde, akımda gürültüyü artırdığı ve çok kararsızlaştırdığı gözlenmiştir. Bu sebeple  $NAD^+$  koenziminin YBE'lerin yüzeyine tutuklanmaması ve bilinen sabit derişimde çözelti içine eklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.
- ADH temelli biyosensörler için en uygun elektrot türünün MWCNT-YBE olduğu sonucuna varılmıştır. NADH'nin amperometrik tayini için optimum elektrot türü olan MM-YBE'nin, ADH enzimi ile immobilize edildiğinde aynı etkiyi göstermediği anlaşılmıştır.
- ADH temelli biyosensörlerde MWCNT etkisi incelenmiş ve MWCNT nanomateryalinin elektrot yüzeyine sonradan modifiye edildiğinde özelliklerinin, yüzey baskılama prosesinde elektrot mürekkebinde yer aldığı duruma göre daha etkili olduğu anlaşılmıştır.
- ADH temelli biyosensörlerde AuNP etkisi incelenmiş ve etanole karşı olan duyarlılığı yalın YBCE'lere göre biraz artırdığı sonucuna varılmıştır. AuNP'nin en etkili özelliğinin enzimin aktivitesini korumasını sağlamak olduğu düşünülmüştür.
- ADH biyosensörlerinde MCWNT'nin üstün elektrokatalitik ve elektronik özellikleri nedeniyle AuNP'den daha etkili bir nanomateryal olduğu sonucuna varılmıştır.



- ADH temelli biyosensörlerde PNR'nin etkisi incelenmiştir. PNR'nin aromatik halkasında bulunan  $\pi$  konjuge yapı sayesinde sahip olduğu iletken polimer özelliği ile elektronik iletkenliği artırdığı, NADH'ye karşı elektrokatalitik aktive gösterdiği ve serbest  $-NH_2$  gruplarının varlığı ile enziminin elektrot yüzeyine kuvvetli tutunmasını sağladığı bulunmuştur. Bu özellikleri nedeniyle PNR'nin ADH biyosensörünün duyarlılığını tek başına MWCNT ve AuNP'den daha fazla artırdığı anlaşılmıştır.
- ADH temelli biyosensörler ve NADH sensörlerinde, PNR'nin nanoparçacıklar ile olan sinerjik etkisi incelenmiştir. PNR'nin sadece MWCNT veya AuNP ile hazırlanmış sensör ve biyosensörlerin formulasyonuna dahil olduğunda duyarlılığı artırdığı gözlenmiştir. MWCNT ve PNR'nin sahip oldukları özellikleri sayesinde yaptıkları  $\pi$ - $\pi$  elektronik ve hidrofobik etkileşimlerle, sensör ve biyosensörlerin elektronik iletkenliğini, sinerjik bir etkiyle artırmıştır. En yüksek elektronik iletkenlik ve elektrokatalitik etki, PNR'nin hem MWCNT hem de AuNP ile oluşturduğu kompozit elektrot olan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR ile hazırlanmış sensör ve biyosensörlerde gözlenmiştir.
- ADH temelli biyosensörler için optimum elektrot türü, elektrot formülasyonu ve optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodunun, ADH temelli biyosensörleri için optimum elektrot türü ve formülasyonu olduğu sonucuna varılmıştır. Optimum pH 7,75, enzim miktarı 150 unit, koenzim miktarı 7 mM ve çalışma potansiyeli ise + 0,2 V olarak bulunmuştur.
- Optimum çalışma koşullarında YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile yapılan etanolün amperometrik tayinleri sonucunda analitiksel karakterizasyon yapılmış, gözlemlenebilme ve tayin sınırı, duyarlılık ve tekrarlanabilirlik değerleri bulunmuştur. Düşük gözlemlenebilme değerine, yüksek duyarlılık ve tekrarlanabilirliğe sahip düşük potansiyelde girişimsiz tayin yapılabilen yeni amperometrik etanol biyosensörü başarıyla geliştirilmiştir. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile şarap ve rakı numunelerindeki etanol miktarlarının tayinleri de yapılmış ve firma tarafından verilen etanol miktarlarına yakın sonuçlar elde edilmiştir.
- Metanol ve etanol/metanol karışımın tayini için hazırlanan YBCE/AOx/G/GA biyosensörlerinin optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. Optimum pH 7,0, enzim miktarı 1,2 Unit ve çalışma potansiyeli ise -0,45 V olarak bulunmuştur.
- AOx temelli biyosensörlerin analitiksel performansını geliştirmek için, hem NADH sensörü hem de ADH biyosensörü için optimum kompozit elektrot olan YBCE/MWCNT/AuNP/PNR ile AOx temelli biyosensörler hazırlanmış ve çalışma potansiyeli yeniden optimize edilmiştir. YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörünün optimum çalışma potansiyeli, PNR'nin medyatör etkisi nedeniyle -0,30 V olarak bulunmuştur.
- AOx temelli biyosensörlerle etanol, metanol ve etanol/metanol karışımın amperometrik tayinleri sonucunda analitiksel karakterizasyonları yapılmış, gözlemlenebilme ve tayin sınırı, duyarlılık ve tekrarlanabilirlik değerleri bulunmuştur.

YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörünün metanole karşı duyarlılığının etanole göre fazla olduğu, bunun ise AOx enziminin metanole karşı teorik  $K_m$  değerinin daha yüksek olması nedeniyle olduğu sonucuna varılmıştır.

- YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörünün metanole karşı duyarlılığının, etanol varlığında azaldığı gözlenmiştir. Bunun sebebinin her iki substratın da enzimle yarışmasının bir sonucu olduğu düşünülmüştür.
- YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA biyosensörleriyle rakı ve şarap numunelerindeki etanol miktarlarının tayinleri yapılmış ve firma tarafından verilen etanol miktarlarına yakın sonuçlar elde edilmiştir. Her iki biyosensör ile yapılan analizlerin sonuçları karşılaştırıldığında, ADH temelli biyosensörler ile elde edilen sonuçların daha iyi olduğu bulunmuştur. Bunun sebebinin, hem ADH enziminin etanole karşı duyarlılığının AOx'e göre daha fazla olması hem de AOx enziminin alkollü içeceklerde düşük miktarlarda var olan metanole karşı gösterdiği duyarlılık nedeniyle olduğu sonucuna varılmıştır.
- YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/AOx/G/GA ve YBCE/MWCNT/AuNP/PNR/ADH/GA biyosensörleri ile derişimi bilinen farklı oranlarda hazırlanmış olan etanol/metanol karışımının amperometrik tayinleri yapılmıştır. Etanol/metanol karışımındaki etanol miktarı ADH temelli biyosensörlerle, metanol miktarı ise AOx temelli biyosensörlerle yapılan amperometrik tayin sonucu elde edilen akım değerlerinin, kalibrasyon grafiklerinin doğru denklemlerinde yerine yazılmasıyla bulunmuştur.
- Tez kapsamında yeni YBCE/MWCNT/AuNP/PNR kompozit elektrodu, NADH sensörü, etanol, metanol ve etanol/metanol biyosensörleri başarıyla geliştirilmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- ANDRESCU, S. ve MARTY, J.L. 2006. Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications. *Biomol Eng*, 23: 1-15.
- AGUI, L., YANEZ-SEDEN, P. and PINGARRON, J.M. 2008. Role of carbonnanotubes in electroanalytical chemistry: A review. *Anal Chim Acta*, 622: 11-47.
- ANIK, U., TIMUR, S., CUBUKCU, M. and MERKOCI, A. 2008. The usage of a bismuth film electrode as transducer in glucose biosensing. *Microchim Acta*, 160: 269–273.
- ANIK, Ü. 2012. Elektrokimyasal Biyosensörler. Telefoncu A. ve Kılınç A. (Editörler), Biyosensörler: Metodlar, Uygulamalar ve Son Gelişmeler. Ege Üniv. Matbaası, 97-107 ss. İzmir.
- APOSTOLOPOULOU, A.A., FLOUROS, A.I., DEMERTZIS, P.G. and AKRIDADEMERTZI, K. 2005. Differences in Concentration of Principal Volatile Constituent in Traditional Grek Distillates. *Food Control*, 16: 157-164.
- ARECHEDERRA, M.N., ADDO, P.K. and MINTEER, S.D. 2011. Poly(neutral red) as a NAD<sup>+</sup> reduction catalyst and a NADH oxidation catalyst: Towards the development of a rechargeable biobattery. *Electrochimica Acta*, 56: 1585–1590.
- AZEVEDO, A.M., PRAZERES, D.M.F., CABRAL, J.M.S. and FONSECA, L.P. 2005. Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. *Biosens Bioelectron*, 21: 235-247.
- BANKS, C.E. and COMPTON, R.G. 2005. Exploring the electrocatalytic sites of carbon nanotubes for NADH detection: an edge plane pyrolytic graphite electrode study. *Analyst*, 130, 1232–1239.
- BARD, A.J. and FAULKNER, L.R. 2001., *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Second Edition, Wiley.
- BARSAN, M.M. and BRETT, C.M.A. 2008. An alcohol oxidase biosensor using PNR redox mediator at carbon film electrodes. *Talanta*, 74: 1505-1510.
- BONNET, C., ANDRESCU, S. and MARTY, J.L. 2003. Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. *Anal Chim Acta*, 481: 209–11.
- BORGMANN, S., SCHULTE, A., NEUGEBAUER, S. and SCHUHMANN, W. 2011. *Advances in Electrochemical Science and Engineering*. Richard C. Alkire, Dieter M. Kolb, and Jacek Lipkowski (Editors), *Amperometric Biosensors*. Wiley-VCH, pp. 1-13, Weinheim.

- BOTEVA, R., VISSER, A.J., FILIPPI, B., VRIEND, G., VEENHUIS, M. and van der KLEI, I.J. 1999. Conformational transitions accompanying oligomerization of yeast alcohol oxidase, a peroxisomal flavoenzyme. *Biochemistry*, 38: 5034-5044.
- BOUJTITA, M., HART, J.P. and PITTSON, R. 2000. Development of a disposable ethanol biosensor based on a chemically modified screen-printed electrode coated with alcohol oxidase for the analysis of beer. *Biosens Bioelectron*, 15: 257-263.
- BRONCOVA, G., SHISHKANOVA, T.V., MATEJKA, P., VOLF, R. and KRAL, V. 2004. Citrate selectivity of poly(neutral red) electropolymerized films. *Anal Chim Acta*, 511 (2): 197-205.
- BUCK, R.P. and LINDNER, E. 1994. Recommendations for nomenclature of ion sensitive electrodes (IUPAC Recommendations). *Pure Appl Chem*, 66: 2527-2536.
- BUCUR, B., RADU, G.L. and TOADER, C.N. 2008. Analysis of methanol-ethanol mixtures from falsified beverages using a dual biosensors amperometric system based on alcohol dehydrogenase and alcohol oxidase. *Eur Food Res Technol*, 226: 1335-1342.
- BULUR, A. 2010. Çukurova Bölgesinde Üretilen Boğma Rakıların Kimyasal Bileşimleri Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 10 s., İzmir.
- CABAROĞLU, T. 2004. Methanol Contents of Turkish Varietal Wines and Effect of Processing. *Food Control*, 16 (2): 177-181.
- CAMMANN, K. 1977. Biosensors based on ion - selective electrodes. *Z Anal Chem Fresenius*, 287 (1): 1 – 9.
- CAMPAS, M. and O'SULLIVAN, C. 2003. Layer-by-layer biomolecular assemblies for enzyme sensors, immunosensing and nanoarchitectures. *Anal Lett*, 36: 2551-2569.
- CARVALHO, R.C., GOUVEIA-CARIDADE, C. and BRETT C.M.A. 2010. Glassy carbon electrodes modified by multiwalled carbon nanotubes and poly(neutral red): A comparative study of different brands and application to electrocatalytic ascorbate determination, *Anal Bioanal Chem*, 398:1675–1685.
- CASTILLO, J., GASPAR, S., LETH, S., NICULESCU, M., MORTARI, A., BONTIDEAN, I., SOUKHAREV, V., DORNENANU, S.A., RYABOV, A.D. and CSOREGI, E. 2004. Biosensors for life quality Design, development and applications. *Sensors Actuat B*, 102: 179-194.
- ÇEKİRDEK, P. 2005. Voltametrik Metotlarla ditiyofosfonat anyonlarının

elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 26 s., Ankara.

- CHAUBEY, A. and MALHOTRA, B.D. 2002. Mediated biosensors. *Biosens Bioelectron*, 17: 441-456.
- CHEN, C. and GAO, Y. 2007. Electrosyntheses of poly(neutral red), a polyaniline derivative. *Electrochim Acta*, 52: 3143-3148.
- CHOI, M.F.M. 2004. Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers. *Microchim Acta*, 148: 107-32.
- CLARK, L.C. and LYONS, C. 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann Ny Acad Sci*, 102 (1): 29-45.
- CLARK, W.M. 1960. Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems, William and Wilkins, Baltimore, ML.
- COSTA RAMA, E., BISCAY, J., GONZALEZ GARCIA, M.B., REVIEJO, A.J., PINGARRON CARRAZON, J.M. and COSTA GARCIA, A. 2012. Comparative study of different alcohol sensors based on screen-printed carbon electrodes. *Anal Chim Acta*, 728: 69-76.
- DECHER, G. and Hong. J.D. 1991. Builup of ultrathin multilayer films by a self assembly process, I. Consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces. *Makromol Chem Macromol Symp*, 46: 321-327.
- DEMİR, U. 2010. Döngüsel voltametri ve kronoamperometri, Gökçel İ. (Editör), Emin Dikman 1. Ulusal Lisansüstü Uygulamalı Elektrokimya Yaz Okulu. Ege Üniv. Basımevi, 39-44 ss, İzmir.
- DİLGİN, D. G., GLIGOR, D., GÖKÇEL, H.İ., DURSUN, Z. and DİLGİN, Y. 2011. Glassy carbon electrode modified with poly-Neutral Red for photoelectrocatalytic oxidation of NADH. *Microchim Acta*, 173:469-476.
- DORST, B.V., MEHTA, J., BEKAERT, K., ROUAH-MARTIN, E., COEN, W.D., DUBRUEL, P., BLUST, R. and ROBBENS, J. 2010. Recent advances in recognition elements of food and enviromental biosensors: A review. *Biosens Bioelectron*, 26: 1178-1194.
- DRESSLHAUSE, M.S., LIN, Y.M., RABIN, O., JORIOA, A., SOUZA FILHO, A.G., PIMENTA, M.A., SAITO, Y., SAMSONIDZE, G.G. and DRESSLHAUSE, G. 2003. Nanowires and nanotubes. *Mater Sci Eng C*, 23: 129-140.
- DURSUN, Z. ve DİLGİN, Y. 2012. Kimyasal modifiye elektrotların hazırlanması ve uygulamaları. Gökçel İ. (Editör), II. Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu. 58 s, Çanakkale.

- DZYADEVYCH, S.V., ARKHYPOVA, V.N., SOLDATKIN, A.P., EL'SKAYA, .V., MARTELET, C. and JAFFREZIC-RENAULT, N. 2008. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *ITBM-RBM*, 29: 171-180.
- ESPOSITO, L., SICA, F., RAIA, A.C., GIORDANO, A., ROSSI, M., MAZZARELLA, L. and ZAGARI, A. 2002. Crystal Structure of the Alcohol Dehydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* at 1.85 Å Resolution. *J Mol Biol*, 318: 463-477.
- FANJUL-BOLADO, P., HERANDEZ-SANTOS, D., LAMAS-ARDISANA, P. J., MARTIN-PERNIA, A. and COSTA-GARCIA, A. 2008. Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *Electrochim Acta*, 53: 3635-3642.
- FANJUL-BOLADO, P., QUEIPO, P., LAMAS-ARDISANA, P.J. and COSTA-GARCIA, A. 2007. Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools. *Talanta*, 74: 427-433.
- FERSHT, A. 1984. Enzyme structure and mechanism. Freeman W.H. and Company, 392-393 ss., USA
- FESSENDEN J.R., FESSENDEN J.S. and LOGUE M.W. 2001. Organik Kimya, Tahsin UYAR (Çeviri Editörü). Güneş Kitabevi, 275 s., Ankara.
- FİDAN, I. ve ANLI, E. 2002. Yüksek Alkollü İçkiler. Kavaklıdere Eğitim Yayınları, No: 6, 258s., Ankara.
- FUKUZIMI, S., INADA, O. and SUENOBU, T. 2003. Mechanisms of electron transfer oxidation of NADH analogues and chemiluminescence. detection of the keto and enol radical cations. *J Am Chem Soc*, 125: 4808-4816.
- GHICA, M.E. and BRETT, C.M.A. 2006. Development of Novel Glucose and Pyruvate Biosensors at Poly(Neutral Red) Modified Carbon Film Electrodes. Application to Natural Samples. *Electroanal*, 18: 748-756.
- GHICA, M.E., PAULIKAITE, R., MARCHAND, N., DEVIC, E. and BRETT, C.M. A. 2007. An improved biosensor for acetaldehyde determination using a bienzymatic strategy at poly(neutral red) modified carbon film electrodes. *Anal Chim Acta*, 591: 80-86.
- GILL, I. and BALLESTEROS, A. 2000. Bioencapsulation within synthetic polymers (part 1): sol-gel encapsulated biologicals. *Tibtech*, 18: 282-296.
- GIRARD-EGROT, A.P. GODOY, S. and BLUM, L.J. 2005. Enzyme association with lipidic Langmuir-Blodgett films: interests and applications in nanobioscience. *Adv Colloid Interface Sci*, 116: 205-25.
- GORTON, L. and DOMINGUEZ, E. 2002. Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator-modified electrodes. *Rev Mol Biotechnol*, 82: 371-392.

- GOUVEIA-CARIDADE, C., PAULIKAITE, R. and BRETT, C.M.A. 2008. Development of electrochemical oxidase biosensors based on carbon nanotube-modified carbon film electrodes for glucose and ethanol. *Electrochim Acta* 53: 6732–6739.
- GUIX, M. 2009. Carbon nanotubes modified electrochemical biosensor for phenol detection. Master Thesis. Institut Català de Nanotecnologia, Universitat Autònoma de Barcelona, p 2. Bellaterra (Barcelona), Spain.
- GUIX, M., PEREZ, B., SAHIN, M., ROLDAN, M., AMBROSIA A. and MERKOCI, A. 2010. Structural characterization by confocal laser scanning microscopy and electrochemical study of multi-walled carbon nanotube tyrosinase matrix for phenol detection. *Analyst*, 135: 1918-1925.
- HALLIDAY, C.S. and MATTHEWS, D.B. 1983. *Aust J Chem.* 36: 507.
- HE, S., SONG, B. LI, D., ZHU, C., QI, W., WEN, Y., WANG, L., SONG, S., FANG, H. and FAN, C. 2010. A Graphene Nanoprobe for Rapid, Sensitive and Multicolor Fluorescent DNA Analysis. *Funct. Mater.* 20 (2010) 453.
- HERNANDEZ-SANTOS, D., GONZALEZ-GARCIA, M.B. and COSTA-GARCIA, A. 2002. Metal-Nanoparticles Based Electroanalysis. *Electroanal* 14: 1225-1235.
- IJIMA, S. 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354: 56-58.
- JAEGFELDT, H, 1980. Adsorption and electrochemical oxidation behaviour of NAD at a clean platinum electrode. *J Electroanal Chem*, 110: 295-302.
- JAFFREZIC-RENAULT, N and DZYADEVYCH, S.V. 2002. Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring. *Sensors*, 8: 2569-2588.
- JORDAN, J. and CIOLKOSZ, M.K. 1991. Enzymatic mechanisms and electrontransfer mediation in chronoamperometric biosensors. *J Sol Chem*, 20(10): 995-1000.
- JUBETE, E., LOAIZA, O.A., OCTOTECO, E., POMPOSO, J.A., GRANDE, H. and RODRIGUEZ, J. 2009. Nanotechnology: A Tool for Improved Performance on Electrochemical Screen-Printed (Bio)Sensors, *Hindawi Publishing Corporation Journal of Sensors*, doi:10.1155/2009/842575, 1-13.
- KARYAKIN, A.A., BOBROVA, O.A. and KARYAKINA, E.E. 1995. Electroreduction of NAD<sup>+</sup> to enzymatically active NADH at poly(neutral red) modified electrodes. 399: 179-184.
- KARYAKIN, A.A., KARYAKINA, E.E. and SCHMIDT, H. 1999. Electropolymerized Azines: A New Group of Electroactive Polymers. *Electroanal*, 11(3): 149-155.

- KARYAKIN, A.A., IVANOVA Y.N., and KARYAKINA, E.E. 2003. Equilibrium (NAD<sup>+</sup>/NADH) potential on poly(Neutral Red) modified electrode. *Electrochem Comm*, 5: 677-680.
- KATAKIS, I. and DOMINGUEZ, E. 1997. Catalytic Electrooxidation of NADH for Dehydrogenase Amperometric Biosensors. *Mikrochim Acta*, 126: 11-32.
- KATZ, E., WILLNER, I. and WANG, H. 2004. Electroanalytical and Bioelectroanalytical Systems Based on Metal and Semiconductor Nanoparticles. *Electroanal*, 16(1-2): 19-44.
- KOCA İ. 2007. Rakılarda Anetol ve Özellikle Metanol Olmak Üzere Uçucu Bileşenlerin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 70 s., Ankara.
- KOÇAK, S. 1993. Çeşitli Alkollü ve Yüksek Alkollü İçkilerde Metil Alkol ve Yüksek Alkol Düzeylerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 66 s., İzmir.
- KUMAR, S.A. and CHEN, S. 2008. Electroanalysis of NADH using conducting and redox active polymer/carbon nanotubes modified electrodes - A Review. *Sensors*, 8: 739-766.
- KUZNETSOVA, A., POPOVA, I., YATES, J.T. Jr., BRONIKWSKI, M.J., HUFFMAN, C.B., LIU, J., SMALLEY, R.E., HWU, H.H. and CHEN, J.G. 2001. Oxygen-Containing Functional Groups on Single-Wall Carbon Nanotubes: NEXAFS and Vibrational Spectroscopic Studies. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 10699-10704.
- LAMAS-ARDISANA, P.J., QUEIPO, P., FANJUL-BOLADO, P. and COSTA-GARCIA, A. 2008. Electrochemical study and flow injection analysis of paracetamol in pharmaceutical formulations based on screen-printed electrodes and carbon nanotubes. *Anal Chim Acta*, 615: 30-38.
- LEE, C. and TSAI, Y. 2009. Preparation of multiwalled carbon nanotube-chitosan alcohol dehydrogenase nanobiocomposite for amperometric detection of ethanol. *Sensor Actuat B: Chemical*, 138: 518-523.
- LIU, C., ALWARAPPAN, S., CHEN, Z., KONG, X. And LI, C. 2010. Membraneless enzymatic biofuel cells based on graphene nanosheets. *Biosens. and Bioelectron.* 25: 1829–1833.
- LI, Y., SCHLUESENERB, H.J. and XUA, S. 2010. Gold nanoparticle-based biosensors. *Gold Bulletin*, 43 (1). 29-41.
- LUO, X., MORRIN, A., KILLARD, A.J. and SMYTH, M.R. 2005. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. *Electroanalysis* 18(4): 319-326.



- LUO, P., LIU, Y., XIE, G., XIONG, X., DENG, S. and SONG, F. 2008. Determination of serum alcohol using a disposable biosensor. *Forensic Sci Int*, 179: 192-198.
- LUO, P., XIE, G., LIU, Y., XU, H., DENG, S. and SONG, F. 2008. Electrochemical detection of blood alcohol concentration using a disposable biosensor based on screen-printed electrode modified with nafion and gold nanoparticles. *Clin Chem Lab Med*, 46(11): 1641-1647.
- LU, B., BAI, J., BO, X., YANG, L. and GUO, L. 2010. Electrosynthesis and efficient electrocatalytic performance of poly(neutral red)/ordered mesoporous carbon composite. *Electrochimica Acta*, 55: 4647-4652.
- McCREEY, R. L. 2008. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry, *Chem Rev* 108: 2646-2687.
- MAO, X., WU, J. and YING, Y. 2008. Application of electrochemical biosensors in fermentation. *Chinese Journal Anal Chem*, 36(12): 1749-1755.
- MERKOCI, A. 2006. Carbon nanotubes in analytical sciences. *Microchim Acta* 152: 157-174.
- MELLO, L.D. and KUBOTA, L.T. 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem*, 77: 237-256.
- MOIROUX, J., and ELVING, P.J. 1978. Effects of Adsorption, Electrode Material, and Operational Variables on the Oxidation of Dihydronicotinamide Adenine Dinucleotide at Carbon Electrodes. *Analy Chem*, 50: 1056-1062.
- MOIROUX, J., and ELVING, P.J. 1980. Mechanistic Aspects of the Electrochemical Oxidation of Dihydronicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH). *J. Am. Chem. Soc.* 102, 6533-6538.
- MOUSTY, C. 2004. Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes - new trends. *Appl Clay Sci*, 27: 159-177.
- MOUSTY, C. 2010. Biosensing applications of clay-modified electrodes: a review. *Anal Bioanal Chem*, 396: 315-325.
- McNUUGHT, A.D. and WILKINSON, A. 1997. Compendium of chemical terminology, Second edition. Blackwell Science, Oxford.
- MUSAMEH M., WANG, J., MERKOCI, A. and Lin, Y. 2002. Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes *Electrochem Comm*, 4: 743-746.
- NASSEF, H.M., CIVIT, L., FRAGOSO, A. and SULLIVIAN, C.K. 2008. Amperometric sensing of ascorbic acid using a disposable screen-printed

- electrode modified with electrografted o-aminophenol film. *Analyst*, 133: 1736-1741.
- NIKOLSKI, B.P., PALCHEVSKII, V.V., POLYANSKAYA, L.A. and RODICHEV, A. G. 1970. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 193: 1334.
- NILLSON, J., STAHL, S., LUNDEBERG, J., UHLEN, M., NYGREN, P-A. 1997. Affinity fusion strategies foe detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr Purif* 11: 1-16.
- NİŞLİ, G., GÖKÇEL, İ. ve DURSUN, Z. 2010. Hidrodinamik voltammetri ve akışa enjeksiyon teknikleri., Gökçel İ. (Editör), Emin Dikman 1. Ulusal Lisansüstü Uygulamalı Elektrokimya Yaz Okulu. Ege Üniv. Basımevi, 176-184 ss, İzmir.
- PARK, J., YEE, H. and KIM, S. 1995. Amperometric biosensor for determination of ethanol vapor. *Biosens Bioelectron*, 10(6-7): 587-594.
- PARK, J., YEE, H., LEE, K. S., LEE, W., SHIN, M., KIM, T. and KIM, S. 1999. Determination of breath alcohol using a differential-type amperometric biosensor based on alcohol dehydrogenase. *Anal Chim Acta*, 390(1-3): 83-91.
- PATEL, N.G., MEIER, S., CAMMAN, K. and CHEMNITIUS, G.C. 2001. Screen printed biosensors using different alcohol oxidases. *Sensor Actuat B*, 75: 101-110.
- PAULUKAITE, R., GHICA, M.E., BARSAN, M. and BRETT, C.M.A. 2007. Characterisation of poly(neutral red) modified carbon film electrodes application as a redox mediator for biosensors. *J Solid State Electrochem*, 11: 899-908.
- PAULUKAITE, R. and BRETT, C.M.A. 2008. Poly(neutral red): Electrosynthesis, Characterization, and Application as a Redox Mediator. *Electroanal*, 20: 1275-1285.
- PAULUKAITE, R., GHICA, M.E., BARSAN, M. and BRETT, C.M.A. 2010. Phenazines and Polyphenazines in Electrochemical Sensors and Biosensors. *Analytical Letters*, 43: 1588–1608.
- PELİT, L., ANIK, U. ve ERTAŞ, F.N. 2013. Döngüsel Voltammetri, 1. Uluslar arası Katılımlı Elektrokimya Çalıştayı, Nanoyapı Modifiye Elektrokimyasal ve Biyoelektrokimyasal Sistemler, 145.
- PEREZ-LOPEZ, B. and MERKOCI, A. 2011. Nanomaterials based biosensors for food analysis applications. *Trends Food Sci Tech*. 22: 625-639.
- PICKUP, J., and THEVENOT, D.R., 1993. In: Turner, A.P.F. (Ed.), Chemical sensors for in vivo monitoring: advances in biosensors. Supplement1, JAI Press, pp. 201.

- POUGET, J.P., OBLAKOWSKI, Z., NOGAMI, Y., ALBOUY, P.A., LARIDJANI, M., OH, E.J., MIN, Y., MacDIARMID, A.G., TSUKAMOTO, J., ISHIGURO, T., EPSTEIN, A.J. 1994. Recent structural investigations of metallic polymers, *Synth Met*, 65: 131-140.
- PUMERA, M. 2012. Voltammetry of Carbon Nanotubes and Graphenes: Excitement, Disappointment, and Reality. *The Chemical Record*, 12, 201–213.
- QU, F., YANG, M., CHEN, J., SHEN, G and YU, R. 2007. Amperometric Biosensors for Glucose Based on Layer-by-Layer Assembled Functionalized Carbon Nanotube and Poly (Neutral Red) Multilayer Film, *Analytical Letters*, 39: 1785–1799.
- RUZICKA, J. and HANSEN, E. H. 1975. Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal Chim Acta*, 78: 145.
- SAFINA, G., LUDWING, R. and GORTON, L. 2010. A simple and sensitive method for lactose detection based on direct electron transfer between immobilised cellobiose dehydrogenase and screen-printed carbon electrodes. *Electrochim Acta*, 55: 7690-7695.
- SASSOLAS, A., BLUM, L.J. and LECA-BOUVIER, B.D. 2012. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol Adv*, 30: 489-511.
- SCHELERETH, D.D. and KARYAKIN, A.A. 1995. Electropolymerization of phenothiazine, phenoxazine and phenazine derivatives: Characterization of the polymers by UV-visible difference spectroelectrochemistry and Fourier transform IR spectroscopy. *J Electroanal Chem*, 395: 221-232.
- SCHOLZ, F. 2010. *Electroanalytical Methods, Guide to Experiments and Applications*, Springer, pp. 57-102.
- SERAFIN, V., AGUL, L., YANEZ-SEDENO, P. and PINGARRON, J.M. 2011. A novel hybrid platform for the preparation of disposable enzyme biosensors based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) electrodeposition in an ionic liquid medium onto gold nanoparticles-modified screen-printed electrodes. *Journal of Electroanal Chem*, 656: 152-158.
- SHAO, L., TOBIAS, G., SALZMANN, C.G., BALLESTEROS, B., HONG, S.Y., CROSSLEY, A., DAVIS, B.G., GREEN, M.L.H. 2007. Removal of amorphous carbon for the efficient sidewall functionalisation of single-walled carbon nanotubes. *Chem. Commun*, 5090–5092.
- SKOOG, D.A., HOLLER, F. J. and NIEMAN, T. A., 1998. *Enstrümental Analiz İlkeleri*, Esma KILIÇ, Fitnat KÖSEOĞLU ve Hamza YILMAZ (Çeviri Editörleri). 5. Baskı. Bilim Yayıncılık, 639-656 ss. Ankara.

- SKOOG, D.A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. and CROUCH, S.R. 2004, Fundamentals of Analytical Chemistry, Eighth Edition, Thomson, Chapter 23: Voltammetry, 665 s Canada,
- SOLOMON, G. and FRYHLE, C. 2002. Organik Kimya, Gral OKAY ve Yılmaz YILDIRIR (Çeviri Editrleri). Literatür Yayıncılık, 482-483 ss. İstanbul.
- SOUFLERAS, E.,H., MYGDALIA, A.S. and NATSKOULIS, P. 2004. Characterization and Safety Evaluation of the Traditional Grek Fruit Distilate “Mouro” by Flavor Compounds and Mineral Analysis. *Food Chem*, 86: 625-636.
- SU, L., JIA, W., HOUB, C. and LEIA,Y. 2011. Microbial biosensors: A review. *Biosensor Bioelectron*, 26: 1788-1799.
- SUN, Y., YE, B., ZHANG, W. and ZHOU, X. 1998. Simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid at poly(neutral red) modified electrodes. *Anal Chim Acta*, 363: 75.
- SVANCARA, I., VYTRAS, K. KALCHER, K., WALCARIUS, A. and WANG, J. 2009. Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: a review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. *Electroanal*, 21: 7-28.
- TELEFONCU, A. 2012. Biyosensörlere genel bakış ve biyosensör uygulamalarında son gelişmeler. Telefoncu A. ve Kılınç A. (Editrler), Biyosensörler: Metodlar, Uygulamalar ve Son Gelişmeler. Ege niv. Matbaası, 5-12 ss, İzmir.
- THEVENOT, D.R., TOTH, K., DURST, R.A., and WILSON, G.S. 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensor Bioelectron*, 16 (1–2): 121-131.
- TİMUR, S. 2012. Biyosenslerin temel ilkesi ve gelişimi. Gökçel İ. (Editör), II. Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu. 119-121 ss, Çanakkale.
- TSAI, Y., HUANG, J. and CHIU, C. 2007. Amperometric ethanol biosensor based on poly(vinyl alcohol)–multiwalled carbon nanotube–alcohol dehydrogenase biocomposite. *Biosens Bioelectron*, 22: 3051-3056.
- TUDORACHE, M. and BALA, C. 2007. Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. *Anal Bioanal Chem*, 388: 565-578.
- ULUZ, M. ve AKTAN, N. 1974. Türk Damıtık Alkollü İçkilerinde Metanol ve Fuzel Yağlarının Gaz Kromatografisi ile Tayini ve Yabancı Damıtık İçkilerle Mukayesesi. TBİTAK Yayınları: 224, TOAG Seri no:31, 41s., Ankara.

- VONCK, J., van BRUGGEN, E.F., 1990. Electron microscopy and image analysis of two-dimensional crystals and single molecules of alcohol oxidase from *Hansenula polymorpha*. *Biochim Biophys Acta* 1038(1): 74-79.
- YANEZ-SEDENO, P. and PINGARRON, J.M. 2005. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Anal Bioanal Chem*, 382: 884-886.
- YANG, C., YI, J., TANG, Z., ZHOU, G. and ZENG, Y. 2006. Studies on the spectroscopic properties of poly(neutral red) synthesized by electropolymerization. *React Funct Polym*, 66: 1336-1341.
- VALENTINI, F., AMINE A., ORLANDUCCI, S., TERRANOVA, M. L. and PALLESCHI, G. 2003. Carbon nanotube purification: preparation and characterization of carbon nanotube paste electrodes. *Analytical Chemistry*, 75:5413–5421.
- WANG, J., CHEN, Q., PEDRERO, M. and PINGARRON, J. 1995. Screen-printed amperometric biosensors for glucose and alcohols based on ruthenium-dispersed carbon inks. *Analy Chem*, 300(1-2): 111-116.
- WANG, J., TIAN, B., NASCIMENTO, V.B. and ANGNES, L. 1998. Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks. *Electrochim Acta*, 43: 3459-3465.
- WANG, J., MUSAMEH, M. and LIN, Y. 2003. Solubilization of Carbon Nanotubes by Nafion toward the Preparation of Amperometric Biosensors. *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (9), 2408–2409.
- WANG, J. and MUSAMEH, M. 2003. Carbon nanotube/teflon composite electrochemical sensors and biosensors. *Anal. Chem.* 75, 2075–2079.
- WANG, J. 2005. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Electroanalysis*, 17, No. 1
- WANG, J. 2008. Electrochemical glucose biosensors. *Chem Rev*, 108: 814-825.
- WILLIAMS, C. H. Jr. 1976. The Enzymes, vol. 13 (Boyer, P. D., ed.) 3rd edn, Academic Press, New York.
- WOOTEN, M. and GORSKI, W. 2010. Facilitation of NADH Electro-oxidation at Treated Carbon Nanotubes. *Anal. Chem.* 82, 1299–1304.
- ZAFAR, M. N., SAFIAN, G., LUDWING, R. and GORTON, L. 2012. Characteristics of third-generation glucose biosensors based on *Corynascus thermophilus* cellobiose dehydrogenase immobilized on commercially available screen-printed electrodes working under physiological conditions. *Anal Biochem*, 425: 36-42.

- ZHANG, J. and CASS, A.E.G. 2000. Electrochemical analysis of immobilised chemical and genetic biotinylated alkaline phosphatase. *Anal Chim Acta*, 408: 241-247.
- ZHANG, J., SHAN, D. and MU, S.L. 2007. Improvement in selectivity and storage stability of a choline biosensor fabricated from poly(aniline-co-o-aminophenol). *Front Biosci*, 12: 783-90.
- ZHANG, Y., PAN, Y., SU, S., ZHANG, L., SHUPING, L. and SHAO, M. 2007. A Novel Functionalized Single-Wall Carbon Nanotube Modified Electrode and Its Application in Determination of Dopamine and Uric Acid in the Presence of High Concentrations of Ascorbic Acid. *Electroanalysis*, 19: 1695-1701.
- ZHANG, L., LI, Y., LI, ZHANG, L., LI, D., KARPUZOV, D and LONG, Y., 2011. Electrocatalytic Oxidation of NADH on Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide Modified Screen-Printed Electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6, 819 - 829.
- ZHAO, W. and JU, H. 2006. Multilayer membranes for glucose biosensing via layer by-layer assembly of multiwall carbon nanotubes and glucose oxidase. *Anal Biochem*, 350: 138-44.
- ZHAO, W., XU, J-J. CHEN, H-Y. 2006. Electrochemical biosensors based on layer-by layer assemblies. *Electroanal*, 18: 1737-1748.
- ZHEN, S., WANGA., Y., LIU, C., XIE, G., ZOU, C., ZHENG, J. and ZHU, Y. 2011. A novel microassay for measuring blood alcohol concentration using a disposable biosensor strip. *Forensic Sci Int*, 207: 177-182.
- ZHU, L.D., ZHAI, J.G., YANG, R.L., TIAN, C. Y. and GUO, L.P. 2007. Electrocatalytic oxidation of NADH with Meldola's blue functionalized carbon nanotubes electrodes. *Biosens. Bioelectron*. 22: 2768.

## ÖZGEÇMİŞ

Melike ŞAHİN 1981 yılında Nazilli’de doğdu. İlköğrenimini Nazilli’de, orta ve lise öğrenimini Antalya’da tamamladı. 1999 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’nden 2003 yılında Kimyager unvanını alarak Onur Belgesi ile mezun oldu. Şubat 2004 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda başladığı Yüksek Lisans öğrenimini Ağustos 2006 yılında tamamladı. Eylül 2006 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Doktora öğrenime başladı. Ekim-2005 tarihinde Akdeniz Üniversitesi, Fen-Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı ve halen bu görevi sürdürmektedir. Melike ŞAHİN’in SCI tarafından taranan, uluslar arası hakemli dergilerde yayınlanmış 8 adet makalesi bulunmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir.